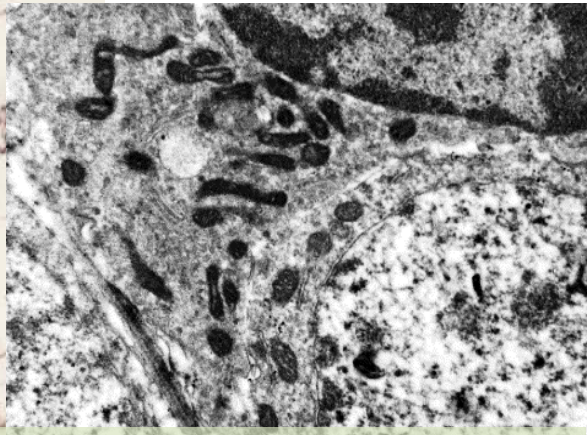
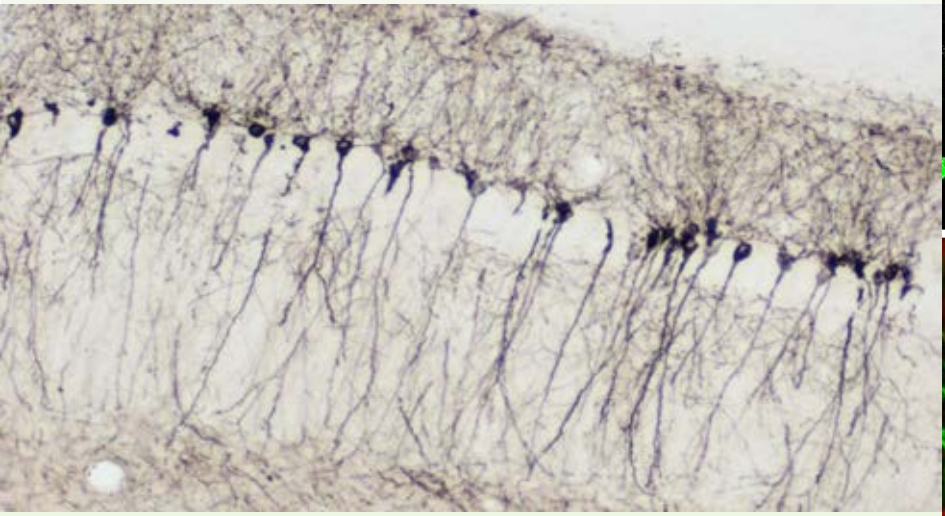


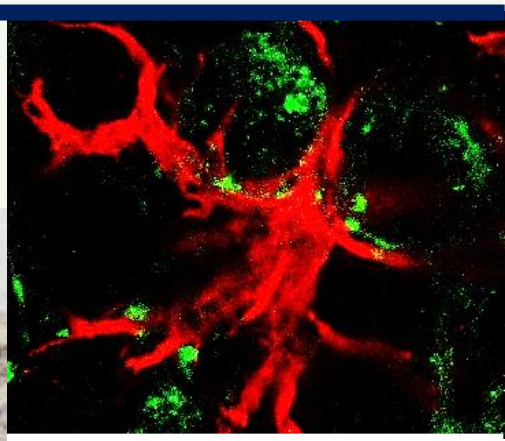
TESIS DOCTORAL

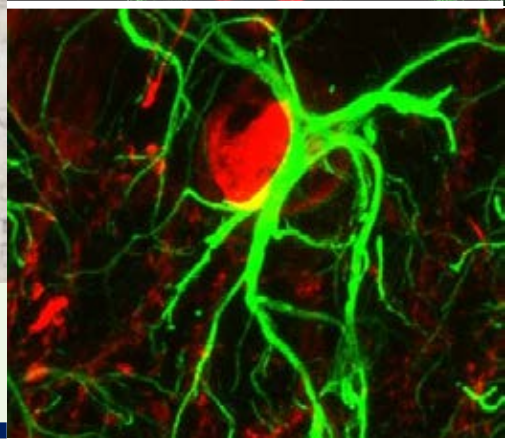
Contribución de la patología tau al proceso neuroinflamatorio y degenerativo en la enfermedad de Alzheimer: estudio en modelos animales transgénicos

Juan José Fernández Valenzuela

Málaga, 2020







Directoras
Antonia Gutiérrez Pérez
Raquel María Sánchez Varo

Doctorado en Biología Celular y Molecular
Dpto. Biología Celular, Genética y Fisiología
Facultad de Ciencias
Universidad de Málaga

AUTOR: Juan José Fernández Valenzuela

http://orcid.org/0000-0001-7285-9250

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga

Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:
http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode
Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización
pero con el reconocimiento y atribución de los autores.
No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

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

Doctorado en Biología Celular y Molecular

Dpto. Biología Celular, Genética y Fisiología

Área de Biología Celular, Facultad de Ciencias

Universidad de Málaga

TESIS DOCTORAL

CONTRIBUCIÓN DE LA PATOLOGÍA TAU AL PROCESO NEUROINFLAMATORIO Y DEGENERATIVO EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: ESTUDIO EN MODELOS ANIMALES TRANSGÉNICOS

Memoria presentada por el Licenciado D. Juan José Fernández Valenzuela

para Optar al Grado de Doctor por la Universidad de Málaga.

Directoras: Dra. Antonia Gutiérrez Pérez y Dra. Raquel María Sánchez Varo.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Málaga, 2020

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña JUAN JOSÉ FERNÁNDEZ VALENZUELA
Estudiante del programa de doctorado BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: CONTRIBUCIÓN DE LA PATOLOGÍA TAU AL PROCESO NEUROINFLAMATORIO Y DEGENERATIVO EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: ESTUDIO EN MODELOS ANIMALES TRANSGÉNICOS.

Realizada bajo la tutorización de ANTONIA GUTIÉRREZ PÉREZ y dirección de ANTONIA GUTIÉRREZ PÉREZ Y RAQUEL MARÍA SÁNCHEZ VARO (si tuviera varios directores deberá hacer constar el nombre de todos)

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 13 de OCTUBRE de 2020

Fdo.: JUAN JOSÉ FERNÁNDEZ VALENZUELA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

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

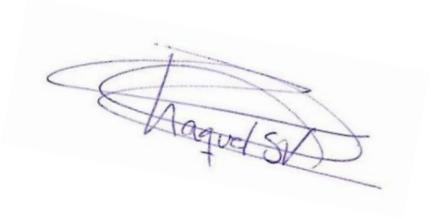
Dra. Antonia Gutiérrez Pérez, Catedrática de Biología Celular del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga,

Dra. Raquel María Sánchez Varo, Contratada postdoctoral en el Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga,

INFORMAN

Que **D. Juan José Fernández Valenzuela** ha realizado bajo su dirección el trabajo experimental que ha llevado a la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral, titulada "**Contribución de la patología tau al proceso neuroinflamatorio y degenerativo en la enfermedad de Alzheimer: estudio en modelos animales transgénicos**". Considerando que constituye Trabajo de Tesis Doctoral, autorizamos su presentación para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Málaga.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmamos el presente documento en Málaga a 12 de Septiembre de 2020.



Fdo. Antonia Gutiérrez Pérez

Fdo. Raquel Sánchez Varo

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Campus de Teatinos, s/n 29071 Málaga. Tlf: 952133344. Contacto: agutierrez@uma.es

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Proyectos

El presente Trabajo de Tesis Doctoral se ha financiado con los siguientes **Proyectos de Investigación:**

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

Evaluando la disfunción microglial y astroglial como parte del proceso neurodegenerativo y la demencia en la enfermedad de Alzheimer: nuevas aproximaciones terapéuticas. Entidad financiera: Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Economía y Competitividad. Ref. PI15/00796. IP: Dra. Antonia Gutiérrez Pérez. Duración: 2016-2018.

Disfuncion glial en la enfermedad de Alzheimer: implicaciones patogénicas y potencial clínico. Entidad Financiera: Instituto de Salud Carlos III. CIBERNED. Proyecto cooperativo. Ref. PI2017/2. IP: Dr. Antonia Gutiérrez Pérez. Duración 2018-2020.

Descifrando la diversidad funcional de la respuesta microglial y astroglial en la enfermedad de Alzheimer: potencial patológico y terapéutico. Entidad financiera: Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Economía y Competitividad. Ref. PI18/01557. IP: Dra. Antonia Gutiérrez Pérez. Duración: 2019-2021.

Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED). Programa 1: Enfermedad de Alzheimer y otras demencias degenerativas. Entidad financiera: Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Ciencias e Innovación. IP: Antonia Gutiérrez Pérez. Duración: 2007-actualidad.

Dr. Juan José Fernández Valenzuela, durante este tiempo ha disfrutado de una Beca de Iniciación a la Investigación (Plan Propio de la Universidad de Málaga); una Ayuda para la Formación del Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (convocatoria de 2014), un contrato de Investigación con cargo a Proyecto de Investigación y un Contrato Puente del Plan Propio de la Universidad de Málaga

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Publicaciones

1. **Fernandez-Valenzuela JJ**, Sanchez-Varo R, Muñoz-Castro C, De Castro V, Sanchez-Mejias E, Navarro V, Jimenez S, Nuñez-Diaz C, Gomez-Arboledas A, Moreno-Gonzalez I, Vizuete M, Davila JC, Vitorica J, Gutierrez A. *Enhancing microtubule-stabilization rescue cognitive déficits and ameliorates pathological phenotype in an amyloidogenic Alzheimer's disease model*. ***Scientific Reports*** 2020. *10: 1–17*. DOI: 10.1038/s41598-020-71767-4. Índice de impacto: 4,12.

2. Sanchez-Mejias E, Nuñez-Diaz C, Sanchez-Varo R, Gomez-Arboledas A, Garcia-Leon JA, **Fernandez-Valenzuela JJ**, Mejia-Ortega M, Trujillo-Estrada L, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Davila JC, Vitorica J, Gutierrez A. *Distinct disease-sensitive GABAergic neurons in the perirhinal cortex of Alzheimer's mice and patients.* ***Brain Pathology*** 2019. *30*(2): 345-363. DOI: 10.1111/bpa.12785. Índice de impacto: 6,352.

3. Romero-Molina C, Navarro V, Sanchez-Varo R, Jimenez S, **Fernandez-Valenzuela JJ**, Sanchez-Mico MV, Muñoz-Castro C, Gutierrez A, Vitorica J, Vizuete M. *Distinct microglial responses in two transgenic murine models of TAU pathology*. ***Frontiers in Cellular Neuroscience*****,** 2018. *12, 421.* DOI: 10.3389/fncel.2018.00421. Índice de impacto: 3,9.

4. Gomez-Arboledas, A., Davila, J. C., Sanchez-Mejias, E., Navarro, V., Nuñez-Diaz, C., Sanchez-Varo, R., Sanchez-Mico MV, Trujillo-Estrada L**, Fernandez-Valenzuela JJ**, Vizuete M, Comella JX, Galea E, Vitorica J, Gutierrez A. *Phagocytic clearance of presynaptic dystrophies by reactive astrocytes in Alzheimer's disease*. ***Glia*** *2018, 66(3): 637-653.* DOI: 10.1002/glia.23270. Índice de impacto: 5,829.

5. **Fernandez-Valenzuela JJ**, Sanchez-Varo R, Gutierrez A. Capítulo "*Descifrando la contribución patogénica de Abeta y TAU en modelos transgénicos de la enfermedad de Alzheimer*". (2018). *Metabolic Reprogramming as a Target for Cancer and Other Diseases*. ISBN: 978-84-17449-55-1. pp. 221 - 234. MA-1550-2018. Umaeditorial.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Y llegó el momento de dar las gracias. Dice un proverbio: "Sí quieres ir rápido, camina solo; si quieres ir lejos, ve acompañado". Pues bien, este trabajo de Tesis Doctoral, no hubiese llegado tan lejos si no me hubiera visto acompañado de una enorme cantidad de personas.

En primer lugar, tengo que darte las gracias a ti, Antonia, mi directora; por haber confiado en mí desde que entré de alumno interno y darme la oportunidad de participar de este maravilloso grupo de investigación y disfrutar de mi sueño de niñez de ser investigador. Me siento muy afortunado de todo lo que he aprendido gracias a ti, de tus consejos y de la pasión que transmites siempre por esta profesión. Gracias por todo tu apoyo, por tu comprensión y por todo lo que has luchado por mí a pesar de tantas dificultades que nos hemos encontrado en este camino. Por todo y más, ¡gracias!

En segundo lugar, gracias Raquel, mi directora. Muchas gracias por toda la dedicación, el esfuerzo y el tiempo que has puesto en ayudarme en esta Tesis. Gracias por toda la paciencia que has tenido conmigo estos años y por enseñarme prácticamente todo lo que sé de esta profesión. La mitad del mérito para culminar estos años de esfuerzo es enteramente tuya. Esta tesis es de los dos. Gracias de corazón.

Como no, agradecer al otro jefe del grupo, a José Carlos; por tu inmensa amabilidad y tu disponibilidad total para lo que siempre necesitase. Gracias por las partidas de bádminton en tu casa, y toda tu ayuda con la microscopía electrónica, especialmente en los últimos meses de mi tesis.

Muchas gracias también a Javier Vitorica y a todo el grupo de la Universidad de Sevilla, por toda la ayuda prestada para completar este trabajo.

Tengo que agradecer a las personas que más espacio y tiempo han compartido conmigo en estos años: mis compañeros de la sala de becarios. Somos desde hace tiempo una "pechá", así que tened en cuenta que los últimos serán primeros, los primeros seguirán siendo primeros y los de en medio, también. Eli, gracias por tu alegría, por estar siempre dispuesta a ayudar en todo; espero que no, pero si alguna vez necesitas que te lleven en silla por el hospital, ya sabes. Laura, gracias por ser para mí un ejemplo a seguir; gracias por estar muchas veces pendiente de mí, sobre todo por tu ayuda en este final de tesis. Juan, gracias por unirte a "La Resistencia"; porque desde que llegaste te considero más amigo que compañero; gracias por ser compi de procrastinación y por tu filosofía del "tó fuera eso". Marina, gracias por tu alegría, tu espontaneidad y tus detalles para con todos; gracias por tus ánimos en los momentos más desesperantes de la tesis: tu kit de supervivencia vino de lujo. Mercedes, mi maestra de laboratorio desde que entré de alumno interno; gracias por todo lo que me has enseñado estos años. Inés, fue un regalo tenerte de tutora de mi estancia; gracias porque disfruté de mi trabajo aquellos meses como un niño, por tu acogida y haber podido disfrutar de tu maravillosa familia. A David, gracias por ser un ejemplo de constancia, de capacidad de trabajo, por tus ganas y la ilusión que transmites por esta profesión. A Laura C y Laura V, por las risas que nos hemos echado y por todo vuestro apoyo desde que llegásteis.

A mis compañeras que desde lejos siguen formando parte del grupo. A Ángela, gracias por tu inestimable ayuda siempre que lo he necesitado, especialmente en la microscopía electrónica, y por tus bombardeos a preguntas sobre Historia y sobre Religión. A Cristina, gracias por ser ejemplo de organización y capacidad de trabajo; por toda tu ayuda, sobretodo en esta última fase de la tesis. Seguro que os va a ir genial en vuestras nuevas aventuras. A Vanessa, por enseñarme todo lo que sé de conducta.

Al Dr. Claudio Soto por acogerme en su laboratorio durante mi estancia en Houston. Gracias a Karina, Miriam y José Mario, Marcelo, Nico, Sandro, Abhi, Carlos, Adam, George, Andrea, Shanu… porque con vosotros no podía habérmelo pasado mejor durante esos tres meses. Gracias a Gloria por toda la ayuda que me prestaste en todas las cuestiones administrativas. Especialmente, gracias a ti, Rubén: mil gracias por tu acogida, por hacer todo lo posible para que me sintiera como en casa, por nuestras salidas por Houston con carreras de tortugas incluidas y los findes a Austin.

A todos los compañeros del departamento de Biología Celular, entre ellas a Maricarmen, Betsaida y Cristina, por las risas que nos echamos cuando voy a visitaros. A otros que pasaron por aquí: Jose (el macho alfa), Alejandra, Kirill, María… gracias por vuestro compañerismo y disponibilidad. Muy especialmente quiero agradecerte a ti, José Manuel: tu amistad y la de Maripi son un regalo del Cielo para

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

mí; gracias por tantos consejos, tantas conversaciones, por nuestros viajes por la Síndone y por vuestro hermoso ejemplo de vida. Agradecer también a don Francisco Ruiz Cantón y a don Tomás Cordero Alcántara por los esfuerzos que han realizado para que pudiera defender mi tesis.

Toca el turno de agradecer a parte de esa miríada de personas que han estado ahí sosteniéndome en la sombra: pocos saben cuántas hay detrás de esta Tesis.

A mis "peludos" Gonzalo, Edgar y Chema. Gracias, porque vuestra amistad no es para nada "estándar" y con vosotros vivo "LA REALIDAD" de una amistad que siempre había esperado; gracias por todo lo que habéis rezado por mí y por nuestros "findes Chewbaccas" que me sacaban del "duriiísssimo" día a día de mi "_ _ _ _ pueblo". A Alvarito, el londinense, por tu enorme amistad desde la distancia y por darme aquél empujón que cambió mi vida. A Carlos ("Carletes"), porque sé que, aunque nos veamos poco, serías capaz de acompañarme hasta el fin del mundo. A mis amigos de la Pastoral Universitaria, por la cantidad de fe vivida y de momentos compartidos.

A don Damián, don José Boira, don Borja y, sobretodo, a mi don Rafael. Gracias, gracias y gracias por sostener mi alma y mi vida cuando más lo necesitaba: que el Señor os pague todo el bien que me habéis hecho. Y Rafaelito, aquí comienza la carrera hacia el Nobel, ya estás tardando en llamarme.

A mi querido médico, Carlos Miguélez, gracias por la ternura que siempre nos mostraste a mí y a mis padres; disfruta del Cielo que bien merecido lo tienes. A Julia, ¡mi Julia! ¡cuánto te debo! No me dará la vida para agradecerte todo lo que me has cuidado estos últimos años, eres otro regalo del Cielo para mí. A mi fisio, Samuel, por apostar a que mi salud podía mejorar con trabajo duro y constante. A mi don Francisco Collado, por sembrar en mí el amor y la pasión por la Biología. A todos esos amigos que seguro me dejo en el tintero y que han estado impulsándome siempre hacia delante, gracias.

A mis hermanos no de sangre (pero como si lo fueran), Adrián, David, Anita y Bea… ¡nada os puedo decir que ya no sepáis! Todas nuestras vidas hacen que las palabras aquí se queden cortas. Antonio, Chari, a mi seño Ana…a ti, Juanpe… Gracias por siempre creer que estoy hecho para algo grande.

Gracias a toda mi familia: a mis tíos Paco e Isa, a mis primos Fran e Isabel, a mis abuelos (a los del Cielo y a los de aquí), a mi tía Ana, a mi familia de Estepona… Gracias: aunque el Alzheimer se hiciese nuestro compañero del día a día, me habéis enseñado que el sufrimiento aquilata nuestro amor y que la mirada sonriente y la risa de una abuela y una madre que ya no recuerda, compensan muchos días no tan buenos. Gracias papá, gracias mamá, gracias Inma; sé que está muy visto aquello de "sin vosotros, no hubiese sido posible", pero sabéis muy bien cuánta realidad esconden esas palabras. ¡Gracias por todo el cariño y el amor que me regala el Señor a través de vosotros! ¡Gracias, por no dejar que me rindiese nunca!

Gracias a mi otra familia, la gaditana. Especialmente a Juan Carlos, Juani y Helena: por vuestro cariño y apoyo incondicionales; os quiero mucho y desde el primer momento que llegué a vuestra casa me sentí como en mi propia familia. Gracias por todos los ánimos, el apoyo y la amistad de mis sanroqueños: Ana Gema, Humberto, Belén, Ale, Virgy, Javi, Gonzalo, Julio, Ana León… ¡Gracias a todos!

Gracias Irene; mi mujer, mi mejor amiga. Porque yo sin ti ya no soy. Porque eres más que todo lo que pude haber soñado. Gracias por ser mi compañera de viaje durante estos años y por querer serlo el resto de mi vida. Gracias por nunca dejarme tirar la toalla, por apoyarme, comprenderme y consolarme tantas veces; porque sin lo que me quieres y sin todo lo que has rezado por mí, yo no habría llegado hasta aquí. Espero ser cada día más ese esposo que te mereces. ¡Te quiero, ahora, y por el resto de mi vida!

Y a Ti… Señor y Padre mío, a Ti. Hay cosas que sólo se pueden saber si las vives… ¡y Tú me has dado a vivir tantas! En estos 5 años (y toda mi vida): ¡cuántas gracias, cuánta misericordia, cuánto consuelo, cuánta alegría, cuánta paz me has regalado! ¡Cuánta felicidad me has dado y me das, Padre! ¿Cómo es posible? Ojalá todos los que me conocen y no Te conocen, supieran cuánto amor y cuánto consuelo todo un Dios puede guardar. Te he encontrado en los demás, delante de los sagrarios y en la soledad de mi habitación. Tú y sólo Tú, eres el que me ha sostenido cuando nadie más podía hacerlo, el que me has hecho sonreír cuando nadie más me sacaba una sonrisa, quien me ha dado fuerza cuando

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

nadie más podía levantarme; me has consolado en lo más profundo de mi ser cuando las palabras de los demás ya no bastaban… Tú das fuerza a mi familia y a las personas que amo para soportar la enfermedad y los golpes de la vida; Tú lloras con nosotros cuando lloramos, ríes cuando reímos, te alegras cuando nos alegramos. Gracias, con toda mi mente, con todo mi corazón, con todo mi ser, ¡gracias! Te ruego que por medio de este trabajo y el de todas las personas que de forma escondida investigan y trabajan en esta y otras enfermedades tan devastadoras, sirvan para encontrar pronto un remedio que alivie el sufrimiento de tantos pacientes y familias. Gracias de corazón a todos ellos por su esfuerzo y tesón. Y a todas aquellas personas y familias que llevan la carga del Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas sobre sus espaldas, y a todos los que soportan estas u otras enfermedades: ¡No tengáis miedo, abrid las puertas a Cristo! ¡Dejaos encontrar y tocar por Él! Acudid a Él con vuestras lágrimas, con vuestros dolores, con vuestra desesperación cuando estéis cansados y agobiados con la vida y veréis que su amor y compañía se convertirá en vuestro alivio y vuestro descanso: porque Él cargará con vuestro yugo y os lo hará más llevadero, Él cogerá vuestras cargas y os las hará ligeras. Acudid a su preciosa Madre, y conoceréis lo que es de verdad la ternura: una mayor que la que habéis vivido en toda vuestra vida.

Absolutamente a todos

¡GRACIAS!

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

A mi familia

A Irene

A mi ángel de la guarda

A mi Madre

A mi Señor

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

"Ante Dios y ante los hombres, atestiguamos que todo ser humano es para nosotros una persona"

Jérôme Lejeune

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Aβ, Abeta: β-amiloide

AD: enfermedad de Alzheimer, del inglés *Alzheimer's disease*

ADEVA: Análisis de la varianza

Al: alveus

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

ApoE: apolipoproteína E

APP: proteína precursora amiloide, del inglés *amyloid precursor protein*

Au: corteza auditiva

BACE: enzima de corte del APP en el sitio β

BSA: albúmina de suero bovino

CA: cuerno o hasta de Ammón

CD45: cúmulo de diferenciación 45, del inglés *cluster of differantiation 45*

CD68: cúmulo de diferenciación 68, del inglés *cluster of diferentiation 68*

Cdk: proteín-quinasa dependiente de ciclina

CE: corteza entorrinal

ChAT: colín-acetil transferasa

Clec7a: miembro A de la familia de dominio lectina tipo C, del inglés *C-type lectin domain family member A*

CLU: clusterina

CX3CR1: receptor 1 de quimioquina CX3C, del inglés *CX3C chemokine receptor 1*. También conocido como receptor de fractalquina

SNC: sistema nervioso central

CSF: líquido cefalorraquídeo, del inglés *Cerebro Spinal Fluid*

CT: tomografía computerizada, del inglés *Computed Tomography*

DAA: astrocitos asociados a enfermedad, del inglés *disease associated astrocytes*

DAB:3-3'diaminobencidina tetrahidroclorhídrico

DABCO: 1,4-diazabiciclo [2.2.2.]-octano

DAM: microglía asociada a enfermedad del inglés *disease-associated microglia*

DDSA: del inglés *DoDenyl Succinic Anhydride*

DN: densidad numérica

DMP-30: 2,4,6 Tris (dimetilaminometil) fenol 95%

DO: densidad óptica

DPX: dibutil ftalato

EA: enfermedad de Alzheimer

ECE: enzima convertidora de endotelina

ELISA: del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

EpoD: epotilona D

FAD: enfermedad de Alzheimer Familiar, del inglés *Familial Alzheimer's Disease*

FTLD: demencia fronto-temporal lobar, del inglés *Fronto-temporal Lobar Dementia*

g: capa granular del giro dentado

GABA: ácido gamma amino butírico

Gal3: galectina 3

GAPDH: del inglés *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

GD: giro dentado

GFAP: proteína glial fibrilar acídica, del inglés, *Glial Fibrillar Acidic Protein*

GSK3-β: quinasa glucógeno sintasa 3

GWAS: estudios de asociación del genoma completo, del inglés *Genome Wide Association Studies*

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

h: hilio del giro dentado

HE: heterocigoto

HMG-CoA: Hidroxi-Metil Glutaril CoEnzima A

HO: homocigoto

HSP: proteína del choque térmico, del inglés *Heat Schok Protein*

hTau: proteína Tau humana

Iba1: molécula adaptadora de unión a iones de calcio, del inglés *Ionized calcium Binding Adapter molecule 1*

ID: índice de discriminación

IDE: enzima degradadora de insulina, del inglés, *Insulin-Degrading Enzyme*

IFN-γ: interferón gamma

Ig: inmunoglobulina

IGF-1: factor de crecimiento insulinotrópico, del inglés *Insuline Growth Factor*

IL: interleuquina

KI: knock-in

KO: knock-out

LAMP: proteína asociada a la membrana de los lisosomas/endosomas, del inglés *Lysosomal-Associated Membrane Protein*

LGALS3: gen que codifica para la galectina 3

LPS: lipopolisacáridos

LTP: potenciación a largo plazo, del inglés *Long Term Potenciation*

m: capa molecular del giro dentado

M1: Microglía clásica

M2: Microglía alternativa

MAP: Proteína asociada a los microtúbulos

MBD: dominio de unión a microtúbulos, del inglés *microtubule binding domain*

MCI: deterioro cognitive leve, del inglés *Mild Cognitive Impairment*

ME: microscopía electrónica

MET: microscopía electrónica de transmisión

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

MT: microtúbulos

MRI: neuroimagen de resonancia magnética, del inglés *Magnetic Resonance Imaging*

MWM: Laberinto acuático de Morris, del inglés *Morris-Water Maze*

NADPH: nicotiamida-adenina dinucleótido fosfato

NEP: neprilisina

NFTs: ovillos neurofibrilares, del inglés *Neurofibrillary tangles*

Ni: níquel

NMDA: ácido N-metil-D-aspártico

NO: óxido nítrico

NOR: test de reconocimiento de objetos, del inglés *Novel Object Recognition*

Ntg: no transgénico

OLT: test de reconocimiento del lugar del objeto, del inglés *Old-Location Test*

OP: test del campo abierto, del inglés *Open Field*

PB: Tampón fosfato

P2RY12: receptor purinérgico Y12, del inglés *Purinergic Receptor Y12*

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos, del inglés *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

PET: tomografía de emisión de positrones, del inglés *Positron emission Tomography*

PHFs: filamentos pareados helicoidales, del inglés *Paired Helicoidal Filaments*

PICALM: proteína de ensamblaje de clatrina de unión a fosfatidil-inositol, del inglés *Phospatidyl Inositol-binding Clathrin Assembly protein*

PLP: Paraformaldehído, L-lisina, Metaperyodato sódico

PrP: Proteína priónica

Prnp: promotor del gen de la proteína priónica

PS1: Presenilina 1

PS2: Presenilina 2

PSD95: complejo de la densidad postsináptica 95, del inglés *Post-Synaptic Density 95*

PV: parvalbúmina

Pyr: corteza piriforme

RE: retículo endoplasmático

ROS: especies reactivas de oxígeno

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

S1: fracción de proteínas soluble aislada bioquímicamente

sAPPα: APP alfa soluble

sAPPβ: APP beta soluble

SD: desviación estándar, del inglés *Standard Deviation*

sl: estrato lúcido

slm: estrato lacunoso-molecular

sm: estrato molecular

SNC: sistema nervioso central

so: estrato oriens

SOD: superóxido dismutasa

SOM: somatostatina

sp: estrato piramidal

sr: estrato radiado

Sub: subículo

SUV: valor medio de retención, del inglés *standarized uptake value*

Swe, S: mutación Swedish de la APP

T: tálamo

TBS: tampón tris salino, del inglés *Tris-Buffered Saline*

TBST: tampón tris salino con Tritón X-100

TCR: receptores de células T

Tg: transgénico

TGF-β: factor de crecimiento transformante beta

TioS: Tioflavina S

TLRs: receptor de tipo Toll, del inglés *Toll Like Receptor*

TMEM119: proteína transmembrana 119, del inglés *transmembrane protein 119*

TNFα: factor de necrosis tumoral alfa

TREM2: receptor de disparo expresado en células mieloides 2, del inglés *Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2*

Tx-100: tritón X-100

TYROBP: proteína de unión a la tirosina quinasa TYRO, del inglés *TYRO protein tyrosine kinase-binding protein.*

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UPS: sistema ubiquitina-proteosoma, del inglés *Ubiquitin-Proteasome System*

V: ventrículo

Veh: vehículo

VGAT: transportador vesicular de ácido gamma aminobutírico

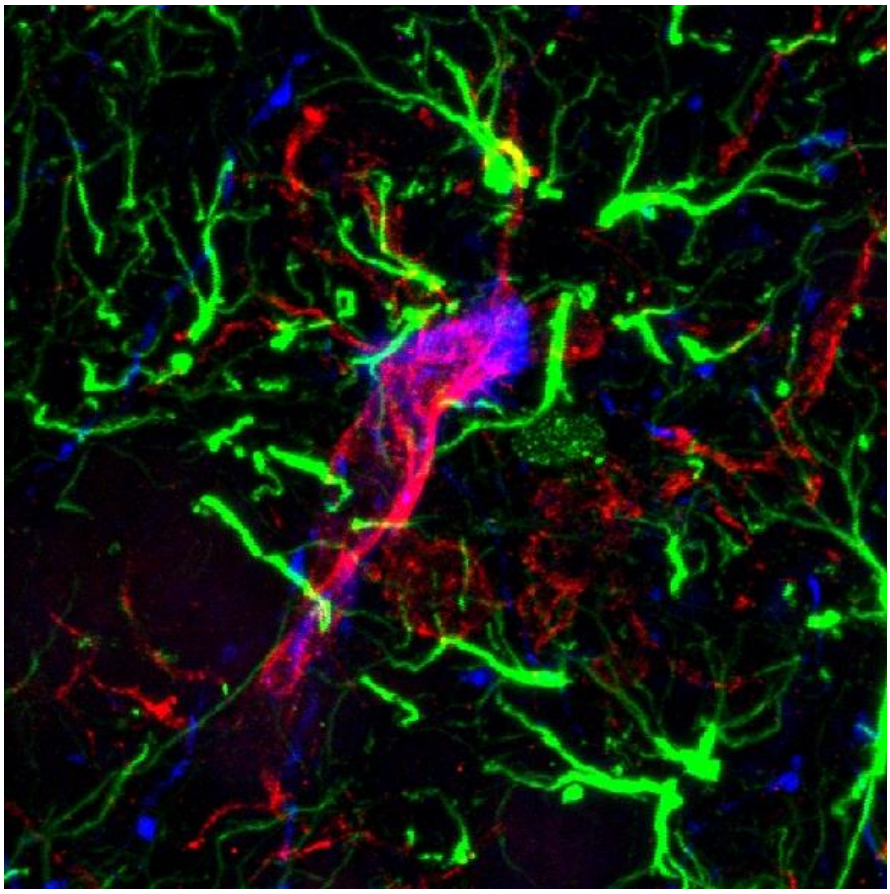
VGLUT-1: transportador vesicular de glutamato-1

WB: western blot

WT: genotipo silvestre, del inglés *Wild Type*

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

ÍNDICES



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. INTRODUCCIÓN 1

1.1. Enfermedad de Alzheimer: contexto general 3
1.2. La proteína tau 5
1.2.1. Gen e isoformas 5
1.2.2. Modificaciones postraduccionales de tau. Fosforilación 7
1.2.3. Funciones fisiológicas de tau 8
1.2.3.1. Funciones canónicas 8
1.2.3.2. Funciones no canónicas 9
1.3. Patología de tau 9
1.3.1. Mutaciones 10
1.3.2. Hiperfosforilación 11
1.3.3. Agregación y toxicidad 12
1.3.4. Propagación 13
1.3.5. Degradación 15
1.4. La proteína tau en la enfermedad de Alzheimer 16
1.4.1. Patología amiloide en la enfermedad de Alzheimer 18
1.4.2. Tau en la hipótesis de la cascada amiloide 19
1.4.3. Papel de tau y Aβ en el daño sináptico 23
1.4.4. Tau y neurodegeneración en la enfermedad de Alzheimer 24
1.5. Respuesta inflamatoria y enfermedad de Alzheimer 24
1.5.1. Microglía 26
1.5.2. Astroglía 31
1.6. Modelos transgénicos de la enfermedad de Alzheimer 34
1.6.1. Modelos transgénicos con patología amiloide 35
1.6.2. Modelos transgénicos con patología tau 36
1.6.3. Modelos transgénicos con patología amiloide y patología tau 37
1.6.4. Modelos animales de las formas esporádicas de la EA 38
1.7. El hipocampo y la enfermedad de Alzheimer 39
1.7.1. La formación hipocampal 39
1.7.2. Tipos celulares en el hipocampo 40
1.7.3. Conexiones hipocampales 40
1.7.3.1. Conexiones intrínsecas 40
1.7.3.2. Aferencias y eferencias hipocampales 41
1.8. Estrategias terapéuticas para la enfermedad de Alzheimer 42
1.8.1. Estrategias basadas en la patología amiloide 43
1.8.2. Estrategias basadas en la patología de tau 44
1.8.3. Estrategias basadas en la neuroinflamación 46
1.9. Planteamiento del trabajo y objetivos 47

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2. MATERIAL Y MÉTODOS 51

2.1. Animales de experimentación 53
2.2. Estudios in vivo 57
2.2.1. Tratamiento con Epotilona D 57
2.2.1.1. Preparación del compuesto y régimen de inyecciones 58
2.2.2. Estudios conductuales 59
2.2.2.1. Grupos de animales analizados 59
2.2.2.2. Prueba de campo abierto 59
2.2.2.3. Prueba de reconocimiento de objetos 60
2.2.2.4. Laberinto en Y 61
2.2.2.5. Laberinto en Y específico de contexto 62
2.2.2.6. Laberinto acuático de Morris 63
2.2.2.7. Rotarod 64
2.2.2.8. Laberinto de Barnes 65
2.3. Procesamiento del tejido 65
2.3.1. Fijación, extracción y conservación del tejido de ratón 65
2.3.2. Extracción de sangre, hígado y riñones 66
2.3.3. Obtención de secciones de cerebro 66
2.3.4. Delimitación anatómica del hipocampo 67
2.4. Microscopía óptica 68
2.4.1. Tinciones histológicas 68
2.4.1.1. Tinción con Tioflavina-S 68
2.4.1.2. Tinción con Rojo Congo 68
2.4.1.3. Tinción con Azul de Toluidina 68
2.4.1.4. Tinción de Gallyas 69
2.4.2. Marcaje inmunohistoquímico para microscopía óptica de campo claro 69
2.4.2.1. Pretratamientos 73
2.4.2.2. Bloqueos 74
2.4.3. Marcaje inmunofluorescente para microscopía confocal 74
2.5. Obtención de imágenes a microscopía óptica 77
2.5.1. Imágenes de microscopía óptica a campo claro 78
2.5.2. Imágenes para microscopía óptica de fluorescencia 77
2.5.3. Procesamiento de las imágenes 78
2.6. Microscopía electrónica de transmisión 78
2.6.1. Fijación, conservación y obtención de cortes 78
2.6.2. Postfijación, deshidratación e inclusión en resina 78
2.6.3. Montaje, tallados y corte 79
2.6.4. Inmuno-oro para microscopía electrónica de transmisión 80
2.6.5. Observación y obtención de imágenes de MET 82

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2.7. Estudios cuantitativos por análisis de imagen 82
2.7.1. Análisis de imagen de la carga amiloide, patología tau, patología neurítica, carga microglial y astroglial 82
2.7.2. Cuantificación del área sinaptofisina-positiva en la capa molecular del giro dentado 83
2.7.3. Análisis estereológico 84
2.7.3.1. Densidad numérica de neuronas y neuritas distróficas 85
2.7.3.2. Estimación del volumen: principio de Cavalieri 86
2.7.3.3. Nucleador: estimación del tamaño de placas 86
2.8. Estudios bioquímicos 87
2.8.1. Aislamiento de ARN y proteínas a partir de muestras cerebrales de hipocampo 87
2.8.1.1. Aislamiento de ARN 88
2.8.1.2. Aislamiento de proteínas totales 88
2.8.2. Comprobación de la integridad del ARN purificado 89
2.8.3. Retrotranscripción 89
2.8.4. RT-PCR en tiempo real 90
2.8.5. Aislamiento de sinaptosomas y fracciones solubles hipocampales de ratón en gradientes de Ficoll PM400 92
2.8.6. Western-Blot (WB) 94
2.8.7. Dot-Blot 95
2.8.8. Determinación de la actividad BACE-1 y γ-secretasa 96
2.9. Estudios *in vitro*:cultivos celulares de neuronas N2a-APP 97
2.10. Tomografía por emisión de positrones (PET) 98
2.11. Análisis estadístico 99
2.12. Apéndice 100
2.12.1. Tampones para inmunohistoquímica 100
2.12.2. Solución fijadora 100
2.12.3. Solución crioprotectora 100
2.12.4. Protocolo de postfijación en PLP y crioprotección con solución de sacarosa 101
2.12.5. Portaobjetos gelatinizados 101
2.12.6. Preparación 3'3-diaminobencidina (DAB) tetrahidro-clorhídrico al 0,05% 101
2.12.7. Solución de revelado DAB 0,05% - Níquel 0,03% 102
2.12.8. Solución de revelado DAB 0,05% 102
2.12.9. Tinciones 102
2.12.10. Protocolo de deshidratación y montaje 103
2.12.11. Medio de montaje DABCO (1,4-diazabiciclo [2.2.2] octano) 103
2.12.12. Agarosa al 3% en H2O destilada 103
2.12.13. Tetróxido de osmio 1% en PB 0,1 M pH 7,4 103
2.12.14. Contrastado en bloque del tejido 104
2.12.15. Resina para la inclusión del tejido (Araldita) 104

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2.12.16. Solución de crioprotección (MET) 104
2.12.17. Solución de bloqueo 1 (diluyente de los anticuerpos MET) 104
2.12.18. Solución de bloqueo 2 (MET) 104
2.12.19. Gel de agarosa para electroforesis 105
2.12.20. Gel de acrilamida 16%-SDS para electroforesis / gel de empaque 3% 105
2.12.21. Gel de acrilamida-SDS-urea 8 M para electroforesis / gel de empaque 3% / gel de carga (Separación isoformas de Aβ) 106
2.12.22. Listado de reactivos 107

3. RESULTADOS 111

3.1. Caracterización y análisis comparativo de la patología tau en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S 116
3.1.1. Estudio de la progresión temporal de la patología de tau en el hipocampo del modelo ThyTau22. Análisis a microscopía óptica y electrónica 118
3.1.2. Estudio de la progresión temporal de la patología de tau en el hipocampo del modelo P301S. Análisis a microscopía óptica y electrónica 130
3.1.3. Estudio longitudinal de la progresión de la patología tau en el modelo P301S mediante análisis de conducta y neuroimagen funcional 132
3.1.3.1. Los ratones P301S presentan alteraciones motoras y déficits cognitivos en la memoria y aprendizaje 139
3.1.3.2. El estudio longitudinal *in vivo* con el trazador de tau ^{18}F-THK-5351 mediante PET mostró una acumulación progresiva de tau patológico en el cerebro del ratón P301S 140
3.1.4. Estudio de los mecanismos proteostáticos de degradación proteica en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S. Comparativa con un modelo amiloidogénico APP/PS1 149
3.2. Estudio de la respuesta neuroinflamatoria asociada a la patología tau en los modelos ThyTau22 y P301S 159
3.2.1. Diferente respuesta microglial en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S 159
3.2.1.1. Elevada expresión de genes microgliales DAM en el modelo P301S en comparación con el modelo ThyTau22 y el modelo amiloidogénico APP 159
3.2.1.2. La progresión de la patología tau va asociada a un notable proceso de activación microglial en el hipocampo del modelo P301S, pero no en el modelo ThyTau22 164
3.2.1.3. Una subpoblación de microglía activada del hipocampo del modelo P301S expresa Galectina-3 183
3.2.2. La microglía activada está implicada en la fagocitosis de fosfo-tau 184

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.2.3. Elevada presencia de microglía tipo rod en el hipocampo del modelo P301S 189
3.2.4. La astroglía reacciona ante la presencia de fosfo-tau de forma diferente en los modelos ThyTau22 y P301S 201
3.2.5. Existe correlación entre la reactividad microglial y astroglial en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S 203
3.2.6. Los astrocitos interactúan estrechamente con neuronas fosfo-tau positivas y presentan tau hiperfosforilado en su interior en los modelos de taupatía 220
3.3. Estudio de la pérdida sináptica y neuronal en los modelos transgénicos ThyTau22 y P301S 231
3.3.1. El hipocampo del modelo ThyTau22 presenta alteraciones sinápticas desde estadios iniciales 231
3.3.2. Pérdida de sinapsis excitatorias en el hipocampo del modelo ThyTau22 233
3.3.3. Pérdida de sinapsis GABAérgicas en el hipocampo del modelo ThyTau22 234
3.3.4. Alteración de la invervación colinérgica en el hipocampo del modelo ThyTau22 235
3.3.5. Pérdida sináptica en el hipocampo del modelo P301S 236
3.3.6. El hipocampo del modelo P301S, pero no el del ThyTau22, presenta pérdida de interneuronas GABAérgicas positivas para parvalbúmina 251
3.3.7. Degeneración colinérgica en el telencéfalo basal de ambos modelos de taupatía 252
3.3.8. Estudio ultraestructural del proceso neurodegenerativo en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S 257
3.4. Efecto de la estabilización microtubular sobre la función cognitiva y el proceso patológico en un modelo amiloidogénico 271
3.4.1. El tratamiento con epotilona-D previene los déficits cognitivos del modelo APP/PS1 271
3.4.1.1. El tratamiento no afecta a la capacidad exploratoria ni locomotora de los animales APP/PS1 272
3.4.1.2. El tratamiento con EpoD protege la memoria de reconocimiento de los animales APP/PS1 272
3.4.1.3. No existen diferencias en la prueba del laberinto en Y entre los animales APP/PS1 y WT a los 6 meses de edad 273
3.4.1.4. Los animales APP/PS1 tratados con EpoD presentan una mejora en la memoria a largo plazo en comparación con el grupo vehículo 274
3.4.1.5. El tratamiento con EpoD tiene un efecto protector sobre las funciones de aprendizaje y memoria espacial del modelo APP/PS1 274
3.4.1.5.1. Fase de adquisición 277

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.4.1.5.2. Fase de retención 277
3.4.1.5.3. Plataforma visible 277
3.4.2. El tratamiento con EpoD mejora la estabilidad microtubular en el hipocampo de los animales transgénicos 283
3.4.3. El tratamiento con EpoD protege de los daños sinápticos/axonales asociados a la patología amiloide 285
3.4.3.1. El tratamiento con EpoD redujo la patología sináptica en el hipocampo de los APP/PS1 285
3.4.3.2. Estudio del efecto de la EpoD sobre la patología neurítica en el hipocampo de los APP/PS1 291
3.4.4. La estabilización microtubular reduce la pérdida de interneuronas GABAérgicas en el hipocampo 293
3.4.5. La EpoD reduce las patologías de tau y Aβ en el modelo APP/PS1 299
3.4.6. Efecto de la EpoD en la producción de Aβ y en el procesamiento de APP 301
3.4.7. El tratamiento con EpoD no atenúa la respuesta microglial en el hipocampo del modelo APP/PS1 313

4. DISCUSIÓN 317

4.1. Las diferencias en la patología tau en los modelos ThyTau22 y P301S indican la formación de distintas cepas de fosfo-tau 320
4.2. Los fallos en los sistemas de degradación proteica contribuyen a la acumulación y agregación de fosfo-tau 325
4.3. La patología tau induce una respuesta glial diferencial en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S 327
4.3.1. La respuesta microglial es dependiente del tipo de patología tau 328
4.3.2. La activación microglial promueve la progresión de la patología tau en el hipocampo del modelo P301S 332
4.3.3. La fuerte activación microglial en el hipocampo del modelo P301S es dependiente de TREM2 333
4.3.4. La microglía sufre un proceso degenerativo en fases avanzadas de la patología tau en el modelo ThyTau22. 336
4.3.5. La microglía activada aumenta su capacidad fagocítica para eliminar formas patológicas de tau 338
4.4. La respuesta astrocitaria frente a fosfo-tau es dependiente de la activación microglial 339
4.4.1. Los astrocitos internalizan fosfo-tau con el posible fin de eliminarlo del parénquima cerebral 342
4.5. Los modelos de taupatía ThyTau22 y P301S presentan pérdida sináptica y neuronal 343
4.5.1. La pérdida sináptica coincide con la progresión espacio-temporal de la patología de tau 344

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

4.5.2. Muerte selectiva de neuronas colinérgicas en los núcleos telencefálicos 346
4.5.3. La vulnerabilidad de las interneuronas parvalbúmina en el hipocampo es dependiente de la patología de tau 347
4.5.4. El estado de agregación de fosfo-tau correlacionacon el daño mitocondrial y la supervivencia neuronal 349
4.5.5. Los contactos microglía-neurona aumentan con el daño mitocondrial y podrían mediar la muerte neuronal en el modelo P301S 351
4.6. La estabilización microtubular previene los déficits cognitivos y disminuye el fenotipo patológico de un modelo amiloidogénico APP/PS1 356

5. CONCLUSIONES **365**

6. SUMMARY **371**

6.1. Abstract 375
6.2. Literature outline 376
6.2.1. Alzheimer's disease 276
6.2.2. Tau protein 277
6.2.3. Microglia and inflammation in Alzheimer's Disease 378
6.2.4. Aims of study 380
6.3. Material and methods 381
6.3.1. Transgenic mice 381
6.3.2. Region of study: hippocampus 382
6.3.3. Tissue preparation 382
6.3.4. Thiflavin-S, Congo Red and Gallyas stainings 382
6.3.5. Light microscopy immunohistochemistry 383
6.3.6. Transmission electron microscopy 384
6.3.7. Quantitative image analysis 384
6.3.8. Stereological analysis 385
6.3.9. Longitudinal PET imaging with 18F-THK5351 tau tracer 386
6.3.10. Retrotranscription and quantitative real-time RT-PCR 386
6.3.11. Total protein extraction and Western Blots 387
6.3.12. Synaptosomes and soluble fractions isolation 387
6.3.13. BACE-1 and gamma-secretase activity 388
6.3.14. *In vitro* studies 388
6.3.15. Behavioral analysis 388
6.3.16. Statistical analysis 390
6.4. Results and discussion 391
6.4.1. Phenotypic characterization of tau pathology in the hippocampus of ThyTau22 and P301S mice during the disease progression 391
6.4.1.1. P301S mice exhibit stronger hippocampal tau pathology than ThyTau22 model, but do not develop NFTs 391

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

6.4.1.2. Longitudinal assessment of tau pathology by *in vivo* PET imaging correlates with behavioral deficits 392
6.4.1.3. P301S and ThyTau22 models exhibit similar alterations in proteostatic systems 393
6.4.2. Distinct microglia responses in P301S and ThyTau22 hippocampus 394
6.4.2.1. Microglial activation is TREM2-dependent and mediates phosphor-tau phagocytosis 395
6.4.2.2. Differential astroglial response may be the consequence of distinct microglial activation profiles 396
6.4.3. Synaptic and neuronal alterations in mouse models of tauopathies 397
6.4.3.1. Synaptic affectation is more severe in P301S mouse hippocampus 397
6.4.3.2. Differential neuronal degeneration of parvalbumin interneurons takes places in old P301S, while cholinergic degeneration is a common process in both models 398
6.4.4. *In vivo* analysis of microtubule-stabilization in an APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease 399
6.4.4.1. EpoD rescues memory deficits in APP/PS1 mice 399
6.4.4.2. EpoD improves microtubular stability in the hippocampus of APP/PS1 400
6.4.4.3. EpoD protects against Aβ-induced synaptic/axonal pathology 400
6.4.4.4. Microtubular stabilization reduces SOM interneurons loss 401
6.4.4.5. EpoD reduces both phospho-tau and Aβ pathology 401

7. BIBLIOGRAFÍA **405**

8. ANEXOS (PUBLICACIONES) **443**

Anexo 1. Fernandez-Valenzuela, JJ. y col., 2020
Anexo 2. Sanchez-Mejias, E. y col., 2019
Anexo 3. Romero-Molina, C. y col., 2018
Anexo 4. Gomez-Arboledas, A. y col., 2018
Anexo 5. Fernández-Valenzuela, JJ. y col., 2018

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

1. INTRODUCCIÓN 1

Figura 1.1. Resumen de los eventos patológicos que tienen lugar a nivel celular en las neuronas en la EA 4
Figura 1.2. El gen MAPT y las isoformas de tau en el cerebro humano 6
Figura 1.3. Esquema de modificaciones postraduccionales identificadas de tau 7
Figura 1.4. Modelo del proceso de agregación de la proteína tau 13
Figura 1.5. Esquema de las posibles vías de propagación transináptica de tau 15
Figura 1.6. Dibujo comparativo de hemisferio cerebral humano sano (izquierda) y hemisferio de paciente de Alzheimer (derecha) 17
Figura 1.7. Patología tau y estadios de Braak I-VI 18
Figura 1.8. Patología en el cerebro de pacientes de Alzheimer 20
Figura 1.9. Hipótesis de la cascada amiloide 21
Figura 1.10. Escenario citotóxico de la activación de las células microgliales y astrogliales en la enfermedad de Alzheimer 26
Figura 1.11. Funciones de la microglía 28
Figura 1.12. Morfología de la microglía homeostática, activada y distrófica 29
Figura 1.13. Activación microglial y fenotipo DAM 30
Figura 1.14. Funciones de los astrocitos en el sistema nervioso central 32
Figura 1.15. Los astrocitos reactivos neurotóxicos son inducidos por microglía activada 33
Figura 1.16. Esquema básico de las conexiones del circuito trisináptico 41
Figura 1.17. Representación esquemática de las estrategias terapéuticas en desarrollo para la enfermedad de Alzheimer 44
Figura 1.18. Dianas terapéuticas de la patología de tau 46

2. MATERIAL Y MÉTODOS 51

Figura 2.1. Localización de las mutaciones contenidas en la proteína tau de los modelos de taupatía P301S y ThyTau22. 54
Figura 2.2. Esquema de las mutaciones que contiene la secuencia aminoacídica de la proteína APP751 humana (hAPP) en los ratones transgénicos APP/PS1 54
Figura 2.3. Mantenimiento de parentales y generación de animales dobles transgénicos APP/PS1 55
Figura 2.4. Estructura molecular de la epotilona D 58
Figura 2.5. Cronología del tratamiento con epotilona D y el análisis de la conducta 58
Figura 2.6. Esquemas representativos de los tests de campo abierto (OF) y de reconocimiento del lugar del objeto (OLT). 60
Figura 2.7. Esquema representativo del test de reconocimiento de un objeto nuevo (NOR). 61
Figura 2.8. Esquema del laberinto en Y 61
Figura 2.9. Esquema de la prueba conductual del laberinto en Y específico de contexto 62

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Figura 2.10. Representación del laberinto de Morris 63
Figura 2.11. Representación del laberinto acuático de Morris visto desde arriba 64
Figura 2.12. Esquemas de distintos niveles de cerebro de ratón en secciones coronales 67
Figura 2.13. Esquema de inmunotinción con peroxidasa para microscopía óptica convencional 70
Figura 2.14. Esquema de inmunofluorescencia triple para microscopía confocal 75
Figura 2.15. Esquema de la técnica inmuno-oro para microscopía electrónica de transmisión 81
Figura 2.16. Estudio del área ocupada por neuritas distróficas (ubiquitina) en la región CA1. Trabajo sobre imágenes binarizadas con el programa de análisis de imagen Visilog 6.3 83
Figura 2.17. Estudio del área inmunorreactiva para sinaptofisina en subcapas del giro dentado con Visilog 6.3 84
Figura 2.18. Imagen y esquema representativo de los componentes del sistema de análisis estereológico computerizado 84
Figura 2.19. Muestreo sistemático. Disector óptico 85
Figura 2.20. Cuantificación del área de las placas mediante el nucleador 87
Figura 2.21. Equipo de escáner para tomografía de emisión de positrones (PET) de la Universidad de Texas Health Science Center (Houston, EEUU) 98
Figura 2.22. Obtención de imágenes mediante tomografía axial computerizada (CT) y tomografía de emisión de positrones (PET) 99

Tabla 2.1. Relación de animales empleados en los estudios inmunohistoquímicos para microscopía óptica, confocal y electrónica 56
Tabla 2.2. Relación de animales APP/PS1 empleados en los estudios conductuales e inmunohistoquímicos para el tratamiendo con estabilizador de microtúbulos EpoD 57
Tabla 2.3. Relación de animales en el estudio longitudinal de la progresión de la patología tau in vivo en el modelo P301S mediante estudio de neuroimagen funcional con PET 57
Tabla 2.4. Marcadores estudiados mediante técnica inmunohistoquímica 70
Tabla 2.5. Anticuerpos primarios empleados en inmunohistoquímica 72
Tabla 2.6. Anticuerpos secundarios biotinilados empleados en inmunohistoquímica para microscopía óptica de campo claro 74
Tabla 2.7. Anticuerpos secundarios para inmunohistoquímica doble y triple a microscopía confocal 76
Tabla 2.8. Anticuerpos secundarios conjugados con oro empleados en inmunomarcaje para microscopía electrónica de transmisión 81
Tabla 2.9. Pasos para la purificación de ARN 88
Tabla 2.10. Reactivos utilizados para la preparación de la mezcla de reacción 2X (Retromix) 90
Tabla 2.11. Marcadores analizados mediante RT-PCR 90

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Tabla 2.12. Relación de los reactivos empleados para la amplificación por PCR a tiempo real empleando sondas Taqman 92
Tabla 2.13. Programa predeterminado de amplificación para PCR a tiempo real 92
Tabla 2.14. Sondas Taqman para RT-PCR 92
Tabla 2.15. Relación de reactivos y volúmenes necesarios para obtener geles de poliacrilamida-SDS (14% de acrilamida) en tampón Tricina 94
Tabla 2.16. Relación de reactivos y volúmenes necesarios para obtener geles de poliacrilamida-SDS (10% de acrilamida) en tampón Glicina 94
Tabla 2.17. Marcadores detectados mediante Western-blot o dot-blot 96

3. RESULTADOS 111

3.1. Caracterización y análisis comparativo de la patología tau en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S

Figura 3.1.1. Expresión diferencial de la proteína tau (total) en el hipocampo de los modelos P301S y ThyTau22 117
Figura 3.1.2. Estudio comparativo de la acumulación de formas hiperfosforiladas de tau (fosfo-tau) en el hipocampo de los modelos P301S y ThyTau22 desde los 2 a los 12 meses de edad 119
Figura 3.1.3. Progresión espacio-temporal de la patología tau en el hipocampo de ThyTau22 121
Figura 3.1.4. Fosfo-tau se acumula en el compartimento somato-dendrítico de las neuronas piramidales en el hipocampo del modelo ThyTau22 122
Figura 3.1.5. Estudio cuantitativo de la progresión temporal de la patología tau en el hipocampo de ratones ThyTau22 123
Figura 3.1.6. Identificación a microscopía electrónica de transmisión de fosfo-tau en el compartimento somatodendrítico de neuronas hipocampales del modelo ThyTau22 124
Figura 3.1.7. Los compartimentos postsinápticos con fosfo-tau establecen contactos sinápticos estructuralmente normales en el modelo ThyTau22 126
Figura 3.1.8. Presencia de fosfo-tau en compartimentos presinápticos y axonales en el hipocampo del modelo ThyTau22 127
Figura 3.1.9. Identificación a microscopía electrónica de transmisión de ovillos neurofibrilares en el soma de neuronas piramidales de CA1 en el modelo ThyTau22 128
Figura 3.1.10. Los ovillos neurofibrilares presentes en el compartimento somatodendrítico de las neuronas piramidales del modelo ThyTau22 son inmunopositivos para AT8 129
Figura 3.1.11. Patrón temporal de aparición de ovillos neurofibrilares intraneuronales (NFTs) en el hipocampo del modelo ThyTau22 133
Figura 3.1.12. Progresión temporal de la patología tau en el hipocampo del modelo P301S 134
Figura 3.1.13. Estudio cuantitativo de la progresión temporal de la patología tau en el hipocampo de ratones P301S 135

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Figura 3.1.14. Comparativa del área AT8-positiva en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S 136
Figura 3.1.15. Localización ultraestructural de fosfo-tau en neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo del modelo P301S 137
Figura 3.1.16. Localización ultraestructural de fosfo-tau en dendritas y sinapsis del hipocampo del modelo transgénico P301S 138
Figura 3.1.17. Caracterización longitudinal de la supervivencia y capacidad motora del modelo P301S 142
Figura 3.1.18. Análisis del aprendizaje y memoria espacial del modelo P301S con el laberinto de Barnes 143
Figura 3.1.19. Estudio in vivo de la unión del trazador de tau 18F-THK-5351 mediante tomografía de emisión de positrones (PET) en animales P301S y WT de 6 meses de edad 144
Figura 3.1.20. Tomografía de emisión de positrones *in vivo* en animales P301S y WT de 8 meses de edad 145
Figura 3.1.21. Tomografía de emisión de positrones (PET) *in vivo* en animales P301S y WT de 10 meses de edad 146
Figura 3.1.22. Tomografía de emisión de positrones (PET) *in vivo* en animales P301S y WT de 12 meses de edad 147
Figura 3.1.23. Análisis histológico de la patología de tau de los animales P301S (6, 8, 9 y 12 meses de edad) 148
Figura 3.1.24. Patrón de inmunomarcaje para ubiquitina en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S con la progresión de la edad 153
Figura 3.1.25. Inmunohistoquímica para ubiquitina en el hipocampo de animales WT y del modelo amiloidogénico APP/PS1 con la progresión de la edad 154
Figura 3.1.26. Estudio inmunohistoquímico del marcador de autofagia LC3b en el hipocampo de animales ThyTau22 y P301S con la progresión de la edad 155
Figura 3.1.27. Estudio inmunohistoquímico del marcador de autofagia LC3b en el hipocampo de animales WT y APP/PS1 con la progresión de la edad 156
Figura 3.1.28. Estudio inmunohistoquímico del marcador lisosomal LAMP2 en el hipocampo de ThyTau22 y P301S con la progresión de la edad 157
Figura 3.1.29. Estudio inmunohistoquímico del marcador lisosomal LAMP2 en el hipocampo de animales WT y APP/PS1 con la progresión de la edad 158

3.2. Estudio de la respuesta neuroinflamatoria asociada a la patología tau en los modelos ThyTau22 y P301S

Figura 3.2.1. Estudio comparativo de la expresión de genes DAM en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S 162
Figura 3.2.2. Estudio comparativo de la expresión de genes microgliales homeostáticos en el hipocampo de modelos transgénicos ThyTau22 y P301S 163
Figura 3.2.3. El hipocampo del modelo P301S muestra una mayor reactividad microglial con el avance de la patología tau que el del modelo ThyTau22 167

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Figura 3.2.4. Estudio comparativo de la respuesta microglial en la región hipocampal CA1 de los modelos ThyTau22 y P301S 168
Figura 3.2.5. Estudio comparativo de la respuesta microglial en el giro dentado de los modelos ThyTau22 y P301S 169
Figura 3.2.6. Cambios en la morfología microglial asociados al proceso de activación durante el avance de la patología tau en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S 170
Figura 3.2.7. Progresión con la edad de la carga microglial (área Iba1-positiva) en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S 171
Figura 3.2.8. Comparación de la carga microglial (área Iba1-positiva) en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S desde los 2 a los 12 meses de edad 172
Figura 3.2.9. Estudio de la correlación entre la progresión temporal de la patología tau (AT8) y la carga microglial (Iba1) en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S 173
Figura 3.2.10. Patrón de activación microglial diferencial en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S 176
Figura 3.2.11. El avance de la patología tau en la región CA1 va acompañado de una marcada activación microglial en el modelo P301S, pero no en el modelo ThyTau22 177
Figura 3.2.12. La progresión de la patología tau en el giro dentado va acompañada de una fuerte activación microglial en el modelo P301S, pero no en el modelo ThyTau22 178
Figura 3.2.13. Estudio cuantitativo de la progresión temporal del área CD45-positiva (carga microglía activada) en el hipocampo del modelo P301S 179
Figura 3.2.14. Estudio de la correlación entre la progresión de la patología tau y la activación microglial en el hipocampo del modelo P301S 180
Figura 3.2.15. La expresión del receptor microglial TREM2 aumenta con la progresión de la patología tau en el hipocampo del modelo P301S 181
Figura 3.2.16. La expresión del receptor microglial TREM2 es mínima o nula en el hipocampo de los animales WT y no experimenta cambios con la progresión de la edad 182
Figura 3.2.17. La microglía activada galectina-3 positiva es más abundante en el hipocampo del modelo P301S que en el de ThyTau22 185
Figura 3.2.18. La microglía galectina-3 positiva es una subpoblación de la microglía activada en el hipocampo del modelo P301S 186
Figura 3.2.19. Aumento de la expresión del marcador fagocítico microglial CD68 en el hipocampo del modelo P301S 187
Figura 3.2.20. La microglía del modelo P301S asociada con estructuras positivas para fosfo-tau tiene gran cantidad de lisosomas 192
Figura 3.2.21. La microglía interacciona con prolongaciones y somas neuronales que contienen fosfo-tau en el hipocampo de los animales ThyTau22 193
Figura 3.2.22. La microglía hipocampal del modelo P301S se relaciona también estrechamente con las neuronas que contienen fosfo-tau 194
Figura 3.2.23. La microglía activada fagocita fosfo-tau en el modelo P301S 195

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Figura 3.2.24. La cantidad de microglía ''rod'' aumenta con la patología tau, siendo más abundante en el hipocampo del modelo P301S 196
Figura 3.2.25. El hipocampo del modelo P301S presenta mayor cantidad de microglía rod galectina-3 positiva que el modelo ThyTau22 197
Figura 3.2.26. Microglía rod a nivel ultraestructural 198
Figura 3.2.27. Presencia de mitocondrias, y vesículas derivadas, en las zonas de contacto microglía-dendrita en los modelos P301S y ThyTau22 199
Figura 3.2.28. En las zonas de contacto soma neuronal-microglía hay concentración de mitocondrias 200
Figura 3.2.29. Patrón temporal de astrogliosis en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S 206
Figura 3.2.30. Aumento de la reactividad astroglial con el avance de la patología tau en la región CA1 del hipocampo de animales ThyTau22 y P301S 207
Figura 3.2.31. Aumento de reactividad astroglial con el avance de la patología tau en el giro dentado de los modelos ThyTau22 y P301S 208
Figura 3.2.32. Reactividad astroglial. Cambios morfológicos de la astroglía con el avance de la patología tau en los modelos ThyTau22 y P301S 209
Figura 3.2.33. Estudio cuantitativo del área GFAP-positiva (carga astroglial) en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S con la edad 210
Figura 3.2.34. Estudio comparativo del área GFAP-positiva (carga astroglial) en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S a diferentes edades 211
Figura 3.2.35. Estudio comparativo de la expresión de GFAP en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S 212
Figura 3.2.36. Estudio de la correlación entre la patología tau y la carga astroglial en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S 213
Figura 3.2.37. La progresión de la patología tau va acompañada de una limitada activación glial en el hipocampo del modelo ThyTau22 214
Figura 3.2.38. La progresión de la patología tau induce una fuerte reactividad astroglial y microglial en el hipocampo del modelo P301S 215
Figura 3.2.39. Existe una fuerte relación entre la activación microglial y la reactividad astroglial en el hipocampo del modelo P301S 216
Figura 3.2.40. Estudio comparativo de la carga microglial (área Iba-1-positiva) y astroglial (área GFAP-positiva) en el hipocampo del modelo ThyTau22 217
Figura 3.2.41. Estudio comparativo de la carga microglial (área Iba-1-positiva) y astroglial (área GFAP-positiva) en el hipocampo del modelo P301S 218
Figura 3.2.42. Estudio comparativo de la carga microglial activada (área CD45-positiva) y astroglial (área GFAP-positiva) en el hipocampo del modelo P301S 219
Figura 3.2.43. Los astrocitos reactivos rodean, envuelven e internalizan agregados de fosfo-tau en el hipocampo de los modelos transgénicos de tau 220
Figura 3.2.44. Identificación ultraestrutural de abundantes estructuras membranosas en el interior de los astrocitos que hacen contacto con dendritas fosfo-tau-positivas en el estrato radiado 223

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Figura 3.2.45. Los astrocitos del hipocampo de animales WT que contactan con dendritas no presentan en el citoplasma estructuras membranosas anómalas como ocurre en los modelos de tau 224
Figura 3.2.46. Los astrocitos presentan gran cantidad de fosfo-tau en el interior de sus prolongaciones, especialmente aquellas asociadas a vasos sanguíneos 225
Figura 3.2.47. Los astrocitos reactivos en el hipocampo del modelo P301S presentan gran cantidad de agregados de fosfo-tau en su interior 226
Figura 3.2.48. Identificación ultraestructural de fosfo-tau en el citoplasma de astrocitos en el hipocampo del modelo ThyTau22 227
Figura 3.2.49. Identificación ultraestructural de agregados de fosfo-tau en los pies perivasculares astrocitarios en el hipocampo del modelo ThyTau22 228
Figura 3.2.50. Localización ultraestructural de fosfo-tau en el citoplasma de los astrocitos del modelo P301S 229
Figura 3.2.51. Identificación ultraestructural de agregados de fosfo-tau en los pies perivasculares astrogliales en el hipocampo del modelo P301S 230

3.3. Estudio de la pérdida sináptica y neuronal en los modelos transgénicos ThyTau22 y P301S

Figura 3.3.1. Disminución de los niveles de la proteína presináptica sinaptofisina en el hipocampo del modelo ThyTau22 237
Figura 3.3.2. Patrón de inmunorreactividad para sinaptofisina en el hipocampo de animales WT y ThyTau22 de 2, 9 y 12 meses de edad 238
Figura 3.3.3. Reducción del área inmunorreactiva para sinaptofisina en el estrato lúcido del modelo ThyTau22 desde los 2 meses de edad 239
Figura 3.3.4. Estudio comparativo de la inmunorreactividad para el marcador presináptico SNAP-25 en el hipocampo de animales WT y ThyTau22 de 2 y 12 meses 240
Figura 3.3.5. Reducción de los niveles del transportador vesicular de glutamato VGLUT-1 en el hipocampo de los animales ThyTau22 241
Figura 3.3.6. Estudio inmunohistoquímico del transportador vesicular de glutamato VGLUT-1 en el hipocampo de animales WT y ThyTau22 de 2, 9 y 12 meses de edad 242
Figura 3.3.7. Alteración de los niveles de la proteína postsináptica PSD95 en el hipocampo de los animales ThyTau22 a edades avanzadas 243
Figura 3.3.8. Reducción de los niveles del transportador vesicular de GABA (VGAT) en el hipocampo de los animales ThyTau22 244
Figura 3.3.9. Patrón de inmunorreactividad para el transportador vesicular VGAT en el hipocampo de animales WT y ThyTau22 de 2, 9 y 12 meses de edad 245
Figura 3.3.10. Disminución de los niveles de la enzima acetilcolina transferasa (ChAT) en el hipocampo del modelo ThyTau22 con la edad 246
Figura 3.3.11. Estudio comparativo de la distribución de las aferencias colinérgicas en el hipocampo de animales WT y ThyTau22 247
Figura 3.3.12. Aumento del inmunomarcaje en el plexo ChAT-positivo de la zona supragranular a del giro dentando del modelo ThyTau22 partir de los 9 meses de edad 248

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Figura 3.3.13. Reducción significativa de marcadores sinápticos en el hipocampo del modelo P301S 249
Figura 3.3.14. Patrón de inmunorreactividad para sinaptofisina en el hipocampo de animales WT y P301S de 2, 9 y 12 meses de edad 250
Figura 3.3.15. La densidad de interneuronas PV-positivas no se encuentra alterada en el hipocampo del modelo ThyTau22 253
Figura 3.3.16. Pérdida de interneuronas PV-positivas en el hipocampo del modelo P301S 254
Figura 3.3.17. Reducción de la población de neuronas ChAT-positivas en el telencéfalo de los modelos ThyTau22 y P301S 255
Figura 3.3.18. Pérdida de neuronas colinérgicas en los núcleos del telencéfalo basal de los modelos ThyTau22 y P301S 256
Figura 3.3.19. Estudio ultraestructural de las neuronas piramidales en el hipocampo del modelo ThyTau22 a los 6 meses de edad 260
Figura 3.3.20. Anormalidades morfológicas en orgánulos de neuronas piramidales del modelo ThyTau22 a los 12 meses 261
Figura 3.3.21. Las indentaciones nucleares son más frecuentes en las neuronas con ovillos neurofibrilares 262
Figura 3.3.22. Presencia de mitocondrias con morfología patológica en las neuronas con fosfo-tau del modelo ThyTau22 263
Figura 3.3.23. Estudio ultraestructural de las neuronas piramidales de CA1 en el modelo P301S 264
Figura 3.3.24. Patología mitocondrial en las neuronas piramidales en el modelo P301S 265
Figura 3.3.25. Las neuronas granulares positivas para AT8 del modelo P301S exhiben patología mitocondrial 266
Figura 3.3.26. Las alteraciones morfológicas mitocondriales son más acusadas en el modelo P301S que en el ThyTau22 267
Figura 3.3.27. El giro dentado del modelo P301S presenta células electroclaras con gran cantidad de mitocondrias con morfología patológica 268
Figura 3.3.28. Las células granulares electroclaras suelen aparecer en estrecho contacto con células microgliales 269
Figura 3.3.29. Las neuronas poco electrodensas son escasas en el giro dentado del modelo ThyTau22 270

3.4. Efecto de la estabilización microtubular sobre la función cognitiva y el proceso patológico en un modelo amiloidogénico

Figura 3.4.1. El modelo APP/PS1 no muestra cambios en las capacidades exploratorias y locomotoras 277
Figura 3.4.2. El tratamiento con EpoD protege la memoria de tipo episódica en el modelo APP/PS1 278
Figura 3.4.3. La memoria de trabajo no se encuentra afectada en los animales APP/PS1 de 6 meses de edad 279

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Figura 3.4.4. El tratamiento con EpoD protege la memoria a largo plazo de los ratones APP/PS1 280
Figura 3.4.5. El tratamiento con EpoD preserva el aprendizaje y la memoria espacial en los animales APP/PS1 281
Figura 3.4.6. Ausencia de alteraciones en la conducta exploratoria en el laberinto acuático de Morris 282
Figura 3.4.7. El tratamiento con EpoD promueve la estabilidad microtubular del hipocampo de los ratones APP/PS1 284
Figura 3.4.8. El tratamiento con EpoD preserva los niveles de la proteína presináptica sinaptofisina en el hipocampo de los animales APP/PS1 287
Figura 3.4.9. El tratamiento con EpoD reduce la patología sináptica en el giro dentado de APP/PS1 288
Figura 3.4.10. Efecto del tratamiento con EpoD sobre los niveles de VGAT y VGLUT-1 en el hipocampo de los animales APP/PS1 289
Figura 3.4.11. El tratamiento con EpoD preserva los niveles de la proteína de la densidad postsináptica PSD95 en el hipocampo de los animales APP/PS1 290
Figura 3.4.12. El tratamiento con EpoD reduce la acumulación de proteínas ubiquitinadas en el hipocampo de los animales APP/PS1 294
Figura 3.4.13. El tratamiento con EpoD reduce la carga de neuritas distróficas ubiquitina-positivas en el hipocampo de APP/PS1 295
Figura 3.4.14. El tratamiento con EpoD no modifica la cantidad de distrofias/placa amiloide en el hipocampo del modelo APP/PS1 296
Figura 3.4.15. El tratamiento con EpoD reduce la carga de neuritas distróficas APP-positivas en el hipocampo de APP/PS1 297
Figura 3.4.16. El tratamiento con EpoD reduce la pérdida de interneuronas SOM-positivas en APP/PS1 298
Figura 3.4.17. El tratamiento con EpoD reduce significativamente la patología tau en el hipocampo del modelo APP/PS1 303
Figura 3.4.18. Reducción del número de neuritas distróficas que contienen fosfo-tau en el hipocampo de los animales APP/PS1 tratados con EpoD 304
Figura 3.4.19. Disminución de la carga amiloide en el hipocampo de los animales tratados con EpoD 305
Figura 3.4.20. El tratamiento con EpoD reduce el tamaño medio de los depósitos de Aβ en el hipocampo de animales APP/PS1 306
Figura 3.4.21. El tratamiento con EpoD reduce la carga amiloide fibrilar en el hipocampo de los animales APP/PS1 307
Figura 3.4.22. El tratamiento con EpoD reduce los niveles de Aβ en el hipocampo y el compartimento sináptico del hipocampo de los animales APP/PS1 308
Figura 3.4.23. El tratamiento con EpoD produce una reducción muy significativa de los niveles de Aβ oligomérico soluble en el hipocampo de APP/PS1 309
Figura 3.4.24. Estudio del efecto de EpoD sobre el procesamiento de APP y la producción de Aβ en un modelo amiloidogénico *in vitro* 310
Figura 3.4.25. El tratamiento con EpoD no afecta el procesamiento de APP 311

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Figura 3.4.26. Efecto del tratamiento con EpoD sobre la actividad de la enzimas β- y γ-secretasa 312

Figura 3.4.27. El tratamiento con EpoD no tuvo efecto sobre la carga microglial en el hipocampo de APP/PS1 314

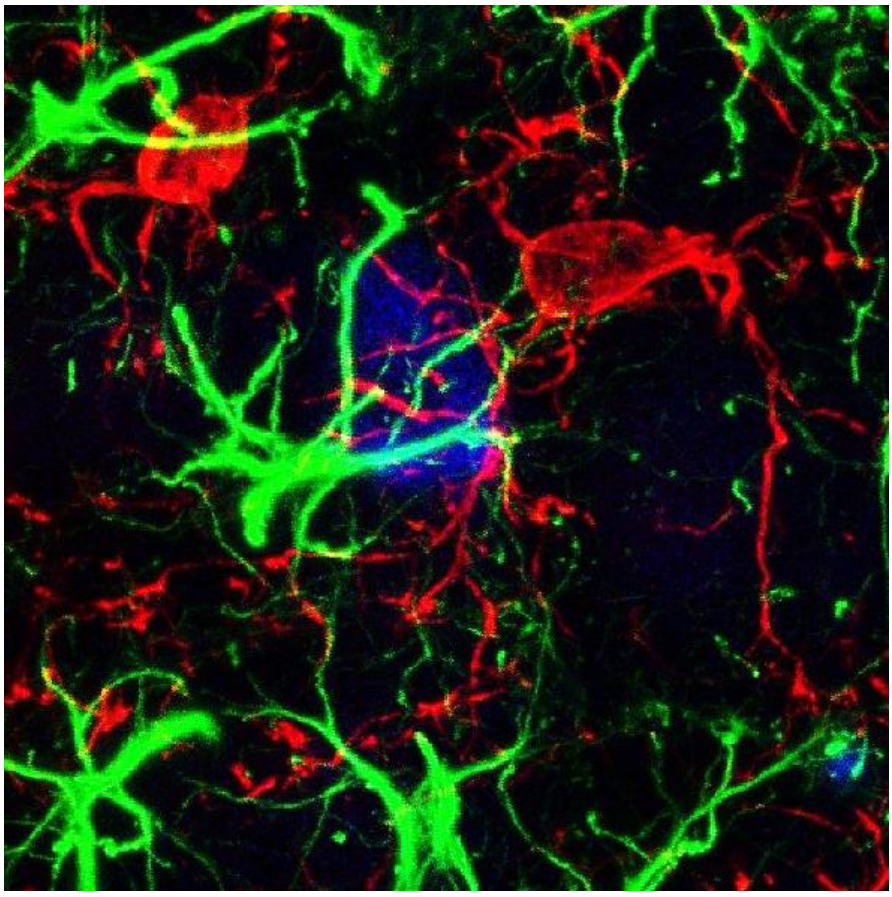
4. DISCUSIÓN 317

Figura 4.1. Patología tau, respuesta glial y alteraciones neuronales en los modelos ThyTau22 y P301S 354

Figura 4.2. Esquema que ilustra el efecto del tratamiento con EpoD sobre la patología axonal/ presináptica y la patología amiloide en el modelo APP/PS1 360

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

1. INTRODUCCIÓN



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1.1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: CONTEXTO GENERAL

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una compleja proteinopatía neurodegenerativa que cursa con deterioro cognitivo progresivo junto con síntomas conductuales y psicológicos, hasta sumir a los pacientes en un estado de demencia y de dependencia total. Esta enfermedad afecta al 10% de la población mayor de 65 años, y a día de hoy no existe ninguna terapia farmacológica capaz de frenar, prevenir o retrasar su evolución. Se estima que el número de afectados a nivel mundial es de unos 50 millones de personas y que, debido al progresivo envejecimiento de la población y a la ausencia de terapias efectivas, aumentará hasta los 152 millones para el año 2050 (World Alzheimer Report, 2019). En España, se contabilizan alrededor de 800.000 casos, aunque es muy probable que esta cifra sea mayor.

El curso de la EA consta de una fase preclínica o asintomática que puede iniciarse hasta 30 años antes de la aparición de los síntomas, seguida de una fase prodrómica en la que se manifiesta deterioro cognitivo leve (MCI, del inglés *mild cognitive impairment*) y, por último, la fase clínica de demencia (Scheltens et al., 2016; Takahashi et al., 2017). Estos déficits cognitivos se deben a daños en regiones cerebrales implicadas en procesos de aprendizaje y memoria como la corteza entorrinal, el hipocampo, la amígdala y zonas neocorticales.

A nivel histopatológico (**Fig. 1.1**), la EA desarrolla una acumulación intraneuronal de agregados de la proteína tau hiperfosforilada (fosfo-tau) en forma de ovillos neurofibrilares (NFTs, del inglés *neurofibrillary tangles*), lo que la define como una taupatía. Además, esta enfermedad se caracteriza por la acumulación extracelular del péptido beta-amiloide (Aβ) formando las placas seniles, siendo por tanto una taupatía de tipo mixto o secundario. La agregación y acumulación de ambas proteínas patogénicas va acompañada de un proceso neuroinflamatorio con activación microglial y astroglial, pérdida sináptica y muerte neuronal (Castellani et al., 2010; Perl, 2010; Karch et al., 2014; Scheltens et al., 2016; Calderon-Garcidueñas and Duyckaerts; 2018; Long and Holtzman, 2019).

Desde que Alois Alzheimer describiera por vez primera en 1907 las características patológicas y clínicas de esta enfermedad muchos han sido los avances científicos en torno a la patología molecular (Alzheimer, 1907). No obstante, aún se desconocen los mecanismos patogénicos implicados, se carece de buenos biomarcadores para un diagnóstico precoz y no existen estrategias terapéuticas eficaces. La mayoría de ensayos clínicos hasta la fecha se han centrado en la patología amiloide y ninguno ha tenido éxito. En consecuencia, es necesario un mayor conocimiento de la patogénesis de esta enfermedad y explorar nuevos enfoques

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

terapéuticos, siendo más que probable que el éxito del tratamiento de la EA dependa de una intervención dirigida a múltiples dianas.

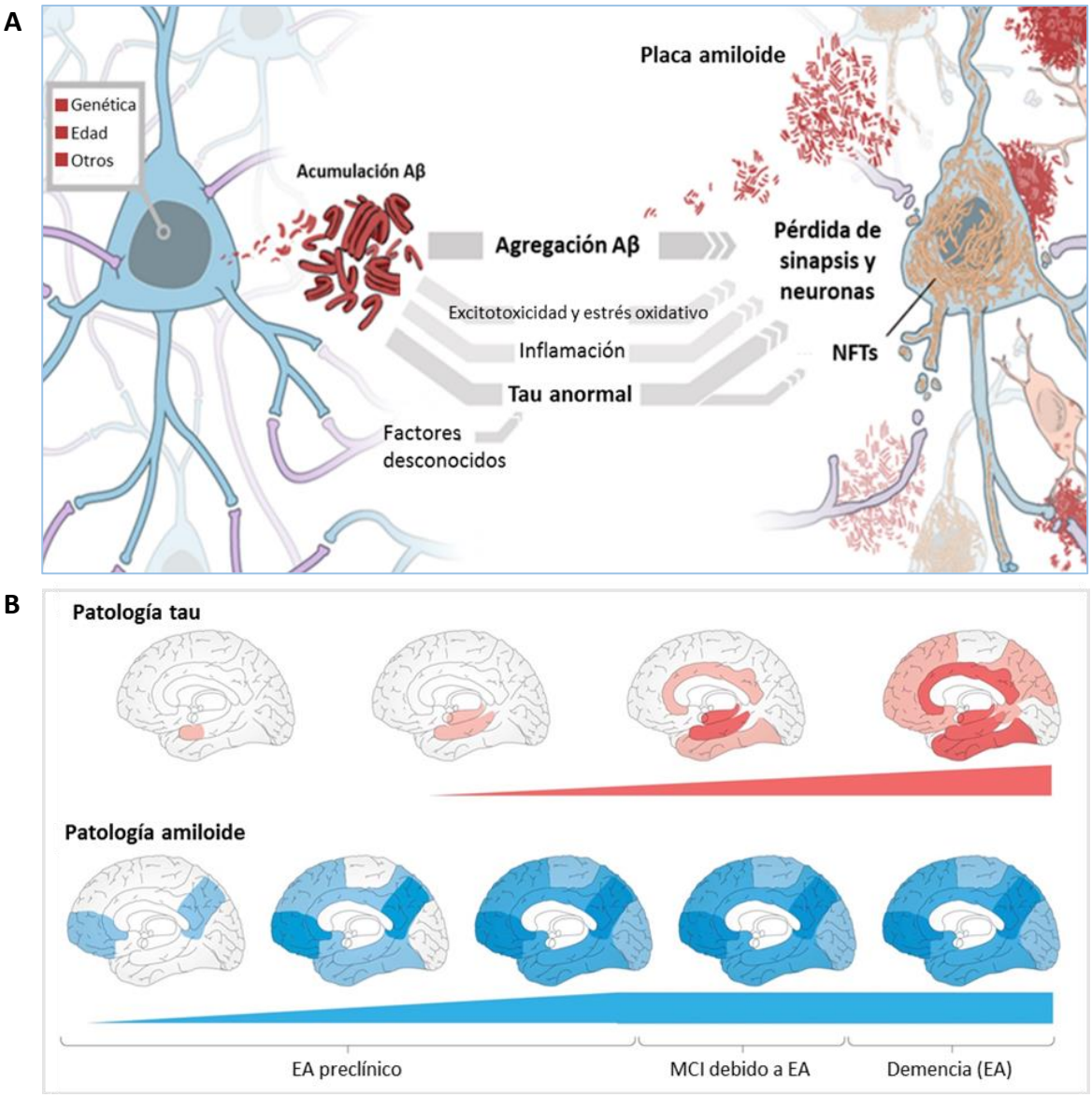


Figura 1.1. Resumen de los eventos patológicos en la EA. (**A**) La acumulación de péptido beta-amiloide (Aβ) y su agregación en placas extracelulares va acompañada de un proceso inflamatorio, la formación intraneuronal de ovillos neurofibrilares (NFTs) constituidos por proteína tau hiperfosforilada y el conjunto de estos factores provoca la pérdida sináptica y neuronal. Tomado y modificado de *http://pre-diagnostics.com/wordpress/?page_id=23.* (**B**) Progresión espacio temporal de la patología tau y la patología amiloide en el curso de la EA. La patología amiloide es extensa desde la fase preclínica, mientras que la patología tau se desarrolla más tarde. Tomado y modificado de van der Kant et al., 2020.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

1.2. LA PROTEÍNA TAU

1.2.1. GEN E ISOFORMAS

Tau es una proteína asociada a microtúbulos (MAP, del inglés *microtubule-associated protein*) que abunda en los axones de las neuronas, donde estabiliza los haces de este elemento del citoesqueleto celular (Hane, 2017; Barbier et al., 2019). Esta proteína se encuentra codificada en el gen *MAPT* (del inglés *MAP Tau*) localizado en humanos en el cromosoma 17, concretamente en la región 17q21.31. Este gen comprende 16 exones y en el sistema nervioso central (SNC) de humanos genera seis isoformas de 352 a 441 aminoácidos (37-46 kDa) por ayuste alternativo de los exones 2, 3 y 10 (**Fig. 1.2**). La proteína tau está constituida por cuatro regiones o dominios (revisado en Wang and Mandelkow, 2016) que tomando como referencia la isoforma más larga (441 aminoácidos) son:

a) Región N-terminal (aminoácidos del 1 al 150). Los exones 2 y 3 (E2 y E3) codifican cada uno un inserto de 29 aminoácidos en la región amino-terminal de tau. El ayuste alternativo produce isoformas de tau que se diferencian por la ausencia o presencia de uno o dos insertos N-terminales (0N, 1N o 2N, respectivamente).
b) PRD (del inglés *proline-rich domain*): dominio rico en prolina (aminoácidos 151-243).
c) MTBD o MTBR (del inglés *microtubule binding domain o microtubule binding repeats*): Los exones 9–12 codifican cuatro repeticiones imperfectas altamente conservadas de 30–31 aminoácidos que comprenden el dominio de unión a microtúbulos. Cada motivo de repetición contiene un dominio conservado KXGS y se encuentran acotados por regiones flanqueantes. La segunda repetición está codificada por el exón 10, cuya presencia o ausencia determina la existencia de tres (3R) o cuatro (4R) repeticiones de unión a microtúbulos en la mitad C-terminal de tau. Las isoformas 4R presentan mayor afinidad por los microtúbulos. En un cerebro adulto humano, la cantidad de isoformas 3R y 4R es similar, sin embargo, en situaciones patológicas como las enfermedades neurodegenerativas esta proporción se ve alterada (Gao et al., 2018).
d) Región C-terminal (aminoácidos 370-441). Aún no han sido bien establecidas ni su función, ni su capacidad de unirse a proteínas, pero se ha sugerido que cambios en esta región pueden influenciar a otros dominios de tau.

Gracias a la distribución asimétrica de las cargas en su cadena polipeptídica, en condiciones fisiológicas, las formas solubles de tau adoptan una estructura o conformación de "clip", donde los dominios N- y C- terminal se pliegan e interaccionan entre sí (Jeganathan et al., 2006). Sin embargo, tau en estado nativo es considerada una proteína sin estructura secundaria, exceptuando algunas zonas concretas con estructuras tipo α-hélice y hoja-β (Avila et al., 2016). Las diferentes isoformas también se diferencian en su funcionalidad. Por tanto, es importante

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

tener en cuenta que la secuencia peptídica y la presencia de ciertos dominios en algunas isoformas las hacen más propensas, por ejemplo, a la agregación en situaciones patológicas. De hecho, las isoformas 1N tienen una mayor tendencia a agregar que las isoformas 2N (Zhong et al., 2012).

La expresión y distribución de las diferentes isoformas en el SNC humano está regulada durante el desarrollo. En el cerebro fetal sólo se expresa la isoforma más corta (0N3R), con menor capacidad de unión a microtúbulos que el resto, propiciando la plasticidad sináptica propia de estas etapas tempranas (Jovanov-Milošević et al., 2012). Las proporciones varían entre especies: en el cerebro de un ratón adulto, aparecen casi exclusivamente las isoformas 4R, mientras que las 3R solo se expresan de forma transitoria en las neuronas de ratones fetales y recién nacidos (Janke et al., 1999). También existen diferencias regionales; por ejemplo, en humanos la cantidad de 0N3R es menor en el cerebelo que en otras porciones cerebrales y los niveles de isoformas 4R son mayores en el globo pálido. Esta variación podría contribuir a la vulnerabilidad diferencial de las regiones del cerebro a la patología tau (McMillan et al., 2008).

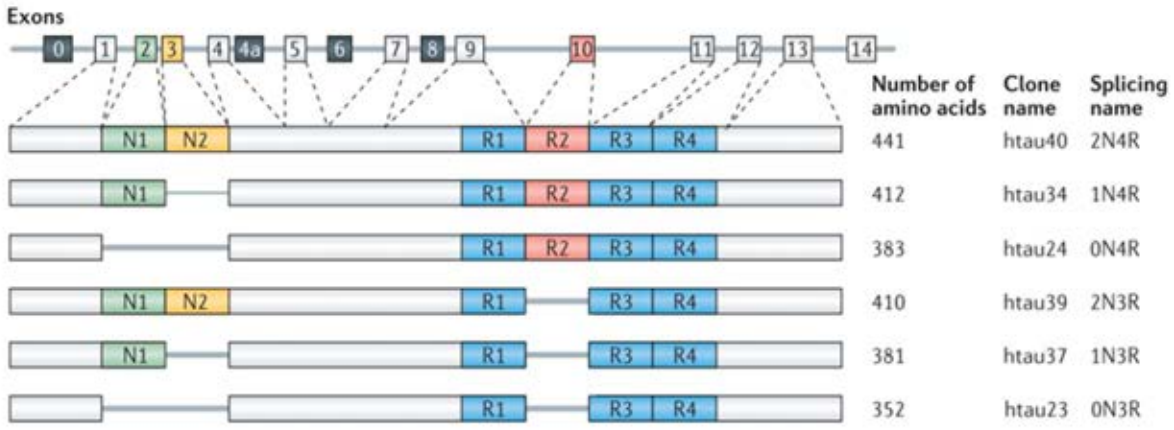


Figura 1.2. El gen *MAPT* y las isoformas de tau en el cerebro humano. El gen *MAPT* contiene 16 exones. Las seis isoformas de tau se generan a través del empalme alternativo de los exones E2, E3 y E10, distinguiéndose por la presencia de 0, 1 ó 2 insertos cerca del terminal amino (0N, 1N o 2N, respectivamente), y la presencia de la repetición R2, dando 3 ó 4 dominios de repetición carboxi-terminales (3R o 4R, respectivamente). En el cerebro adulto se expresan las seis isoformas de tau, mientras que en el fetal solo se encuentra la isoforma 0N3R. Tomado de Wang and Mandelkow, 2016.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

1.2.2. MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE TAU. FOSFORILACIÓN.

La proteína tau puede sufrir diversas modificaciones postraduccionales, incluyendo fosforilación, isomerización, glicación, nitración, adición de N-acetilglucosamina, acetilación, oxidación, poliaminación, sumoilación y ubiquitinación (**Fig. 1.3**). De todas ellas, la fosforilación es con diferencia la más estudiada por ser uno de los mecanismos más importantes de regulación de su actividad. Tau posee hasta 80 residuos (la mayoría alrededor de los MTBD) de serina o treonina, y 5 de tirosina, susceptibles de ser fosforilados (revisado en Guo et al., 2017). En estado fisiológico, existe un equilibrio controlado entre las fosforilaciones y desfosforilaciones de tau para que pueda llevar a cabo sus funciones.

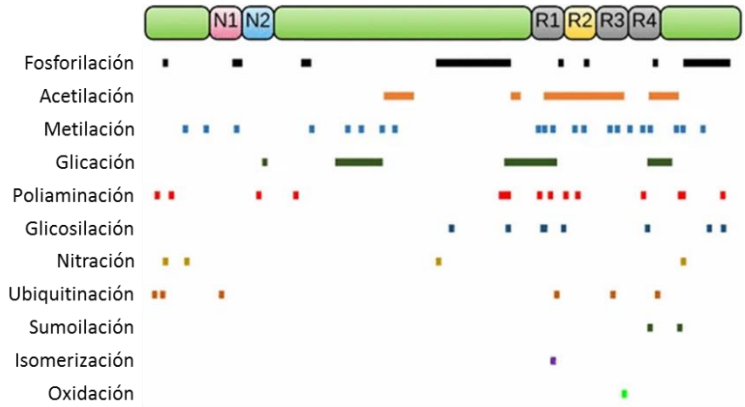


Figura 1.3. Esquema de modificaciones postraduccionales identificadas de tau. Las barras de colores indican los sitios aproximados de cada modificación dentro de la isoforma de tau más grande en el SNC humano (2N4R). Modificado de Guo et al., 2017.

Entre las quinasas más destacadas se encuentran las serina/treonina quinasas dirigidas por prolina, GSK3β (del inglés *Glycogen synthase kinase 3*) y Cdk5 (del inglés *Cyclin dependent kinase 5*) (Blennow et al., 2006; Ballatore et al., 2007; Gendreau and Hall, 2013). Se han propuesto cerca de 40 posibles lugares de fosforilación de tau para la quinasa GSK3β, de los cuales 29 se han encontrado en la EA. Existen otras muchas serina/treonina quinasas implicadas en la fosforilación tales como las MAPKs (del inglés *mitogen-activated protein kinases*), quinasas activadas por estrés, Akt/proteína quinasa B, PKA (del inglés *cAMP-dependent protein kinase A*) o PKC (del inglés *protein kinase C*). Las fosforilaciones en residuos de tirosina también parecen aumentar la capacidad de agregación de la proteína (Hanger et al., 2009), así como las realizadas por quinasas como Src o Fyn (Martin et al., 2013). Por otro lado, existen una serie de fosfatasas encargadas de la desfosforilación de tau, siendo la más importante PP2A (del inglés *protein phosphatase 2A*) (Liu and Götz, 2013; Guo et al., 2017) que constituye el 70% de la actividad fosfatasa del cerebro. En situaciones patológicas, su actividad se ve drásticamente reducida. Esta enzima regula también la actividad de quinasas como GSK3β o Cdk5, las cuales a su vez controlan a PP2A. Esto demuestra la existencia de un delicado equilibrio entre quinasas y fosfatasas que al desestabilizarse puede conducir a la fosforilación aberrante de tau, típica de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

1.2.3. FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE TAU

En condiciones fisiológicas, la proteína tau se localiza principalmente en las neuronas del SNC y, en menor medida, en oligodendrocitos y astrocitos. En las células microgliales se ha encontrado presencia de tau únicamente en condiciones patológicas (Arendt et al., 2016). Dentro de las neuronas, tau se encuentra principalmente en el axón unida a microtúbulos, aunque también se detecta asociada a la membrana celular y en compartimentos somáticos como el núcleo y las mitocondrias. Su presencia en las dendritas es muy baja, condición que cambia radicalmente en situaciones patológicas (revisado en Guo et al., 2017).

1.2.3.1. Funciones canónicas

Los microtúbulos son un constituyente esencial del citoesqueleto, cuya función principal es la de mantener la arquitectura celular, así como dar un soporte estructural al transporte de nutrientes, vesículas y orgánulos. En las neuronas, células extremadamente polarizadas, adquieren un papel fundamental al intervenir también en el crecimiento de axones y generación de espinas dendríticas (Ittner and Ittner, 2018). Estas estructuras dinámicas se controlan de manera específica con proteínas de unión a microtúbulos como tau. La unión de tau a las tubulinas a través de sus MTBD y a otros elementos del citoesqueleto, como fibras de actina y neurofilamentos mediante sus regiones N- y C-terminales, permiten la estabilización de toda la red (revisado en Guo et al., 2017).

Tau también está involucrada en el mantenimiento y regulación del transporte axonal, no sólo por la estabilización directa de la red microtubular, sino también mediante otros mecanismos adicionales como la competición con las quinesinas y dineínas por la unión a los microtúbulos, pudiendo reducir la frecuencia de unión de éstas a los mismos y disminuyendo así el transporte anterógrado y retrógrado (Dixit et al., 2008). De hecho, el fallo en el transporte axonal es una de las causas involucradas en la aparición de varias enfermedades neurodegenerativas (Kneynsberg et al., 2017). Tau también puede activar a la proteína fosfatasa 1 (PP1) y a GSK3β, las cuales controlan la disociación de los cargos de las proteínas motoras, mediante algunos residuos de su dominio N-terminal (Kanaan et al., 2011). Gran parte del conocimiento sobre el papel de tau en el transporte microtubular se ha adquirido a través de estudios *in vitro*, sin embargo, los resultados de estudios de modelos KO para tau han demostrado *in vivo* que existen mecanismos compensatorios mediados por otras MAP que evitan la aparición de numerosos déficits a pesar de la ausencia de esta proteína (revisado en Wang and Mandelkow, 2016; Biundo et al., 2018).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

1.2.3.2. Funciones no canónicas

Se ha descrito que en las dendritas existen pequeñas cantidades de proteína tau en condiciones fisiológicas. Tau interviene en la formación y estabilización de las espinas dendríticas dado que a través de sus dominios de repetición se puede unir a microtúbulos y a F-actina, conectando así la red microtubular con el esqueleto de actina que mantiene a estos elementos sinápticos (Elie et al., 2015). Así, la hiperfosforilación y otras modificaciones que ocurren en las taupatías estarían afectando al mantenimiento del citoesqueleto que sostiene los elementos pre- y post-sinápticos, y por tanto ser causa de la pérdida sináptica que ocurre en estas patologías.

Además, aunque aún no está clara su función, tau parece estar implicada en procesos de regulación sináptica y en fenómenos de potenciación y depresión a largo plazo (LTP y LTD; del inglés *long-term potentiation/depression*, respectivamente) (Wang and Mandelkow, 2016). Se ha demostrado que se asocia con el complejo de la densidad postsináptica (PSD, del inglés *post-synaptic density*), e interviene en la traslocación de la tirosina quinasa Fyn a los compartimentos postsinápticos y en la interacción de Fyn con proteínas asociadas a la membrana plasmática, participando en el acoplamiento de los canales NMDA a PSD95 (Ittner and Ittner, 2018). Es de destacar que la acción sobre Fyn está regulada por su estado de fosforilación. Se han descrito otras funciones de tau, entre las cuales destaca su capacidad de proteger en el núcleo a las moléculas de ARN y ADN de la desnaturalización y del daño producido por la acción de radicales libres (revisado en Violet et al., 2015; Sotiropoulos et al., 2017; Ulrich et al., 2018). Existen estudios que proponen que actúa también como regulador génico y epigenético, describiendo su implicación en la expresión de varios genes (Mano et al., 2017).

1.3. PATOLOGÍA DE TAU

El término taupatía engloba a más de 20 trastornos neurodegenerativos diferentes, cuyo factor común son los agregados de la proteína tau como agente patogénico. En función de si la acumulación de estos agregados es el factor principal que contribuye a la neurodegeneración, o si se encuentra asociada a otras patologías, se subdividen en taupatías primarias o secundarias, respectivamente (revisado en Götz et al., 2019). Dentro de las taupatías consideradas primarias o puras encontramos la demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTLD-17, del inglés *fronto-temporal lobar dementia with parkinsonism 17*), la enfermedad de Pick, la enfermedad de granos argirófilos (AGD, del inglés *argyrophilic grain disease*), la degeneración corticobasal (CBD, del inglés *corticobasal degeneration*) o la parálisis supranuclear progresiva (PSP, del inglés *progressive supranuclear palsy*), entre otras. Aun así, toda esta

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

categorización está sujeta a un mayor conocimiento sobre los mecanismos específicos que subyacen dentro de este grupo de enfermedades tan heterogéneo. Es importante enfatizar que el término "taupatía secundaria" hace referencia a que la patología tau está asociada con otra patología adicional (amiloidosis, en el caso de la enfermedad de Alzheimer), pero no contempla el posible papel de tau sobre esta última (revisado en Kovacs, 2018).

La formación de especies patológicas de tau es un proceso complejo y todavía relativamente desconocido. A continuación, se describen algunos de los aspectos moleculares más importantes relacionados con sus causas y desarrollo.

1.3.1. MUTACIONES

En 1998, se descubrió que las mutaciones autosómicas dominantes en el gen *MAPT* producían FTDP-17, lo que demostró que la disfunción de tau es suficiente para provocar un proceso neurodegenerativo generalizado en el SNC (revisado en Wang and Mandelkow, 2016). La patología de este grupo de enfermedades se caracteriza por la presencia de inclusiones filamentosas de tau en neuronas, y a veces en la glía, de los lóbulos frontales y temporales acompañadas de una severa atrofia, así como de dilatación ventricular.

En la actualidad, se han reportado más de 50 mutaciones patogénicas diferentes para el gen *MAPT* (revisado en Strang et al., 2019) clasificadas en tres grupos: mutaciones sin sentido, mutaciones silenciosas y mutaciones intrónicas. Las mutaciones sin sentido son las que afectan a la secuencia polipeptídica de la proteína. La mayoría de ellas (por ejemplo, mutaciones G272V, N279K, ΔK280, P301L, V337M o R406W) se encuentran bien en los MTBD o en sus proximidades e influyen en la afinidad de tau por los microtúbulos. Los demás tipos de mutaciones afectan a la proporción de isoformas 3R/4R o al ayuste del transcrito del gen (revisado en Iqbal et al., 2016). Existen muchos mecanismos implicados en la pérdida de función de tau como por ejemplo cambios en el ayuste, en la cinética de agregación y en su capacidad de siembra (del inglés *seeding*) similar a la de los priones (Strang et al., 2019).

Aún se desconoce por qué la mayoría de las mutaciones propician la agregación de la proteína tau en el interior celular, pero un posible motivo es que promuevan el aumento de tau libre en el citoplasma, haciéndola más susceptible a la fosforilación por las quinasas (Sengupta et al., 2006). Aunque no se conocen mutaciones en el gen de tau asociadas a la EA, en los últimos años se ha descrito que ciertas variantes aumentan la posibilidad de desencadenar la patología (Coppola et al., 2012). Recientemente, estudios de asociación del genoma completo (GWAS, del inglés *Genome-wide association study*), han desvelado que existen polimorfismos (SNPs, del inglés *single nucleotide polimorphisms*) en el gen *MAPT* asociados a niveles anormales de ARNm de la proteína, y a una mayor atrofia en la región entorrinal e hipocampal en los pacientes con EA y Parkinson (Desikan et al., 2015).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

1.3.2. HIPERFOSFORILACIÓN

En la enfermedad de Alzheimer, como en otras taupatías, la proteína tau exhibe un aumento de las fosforilaciones anormales o patológicas. De hecho, los ovillos neurofibrilares intraneuronales (NFTs), una de las marcas histopatológicas imprescindibles para el diagnóstico de la EA, están constituidos principalmente por proteína tau hiperfosforilada (Iqbal et al., 2016). La hiperfosforilación puede considerarse tanto un aumento del número de residuos fosforilados en la propia secuencia proteica, como un aumento de la cantidad de proteínas de tau fosforilada en algunos residuos concretos. Se han identificado más de 30 residuos fosforilados en las proteínas tau que se encuentran formando parte de NFTs (revisado en Arendt et al., 2016).

Inicialmente, la hiperfosforilación de tau se consideró un paso previo a la formación de NFTs dado que en situaciones patológicas tanto la proteína no agregada como constituyente de agregados presentaban un grado de fosforilación mucho mayor que en condiciones fisiológicas (revisado en Guo et al., 2017). Sin embargo, se ha observado que en condiciones no patológicas (como la hibernación) la hiperfosforilación de tau no propicia su agregación (Su et al., 2008). Por tanto, podría no ser condición necesaria para iniciar la agregación, pero sí para propiciarla, bien por los cambios en la propia estructura o por aumentar la cantidad de tau libre en el citoplasma, convirtiéndola en sustrato más susceptible a la acción de las quinasas. El desequilibrio entre la actividad de las quinasas y fosfatasas puede suceder por diversos motivos: mutaciones, acidosis cerebral, isquemia, hipoxia, estrés oxidativo y otros muchos (revisado en Arendt et al., 2016). En el contexto de la EA, la presencia del péptido Aβ y el estrés oxidativo inducen cambios en las rutas de señalización de quinasas como Cdk5, la cual controla la actividad de GSK3β e incrementa su actividad (Castro-Alvarez et al., 2014). Otros cambios en la homeostasis cerebral (como la hipotermia) afectan especialmente a fosfatasas como PP2A y a la regulación de las vías mTOR/Akt, provocando la sobreactivación de GSK3β y la promiscuidad de otras quinasas (revisado en Mueed et al., 2019).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

1.3.3. AGREGACIÓN Y TOXICIDAD

Como se ha comentado, la proteína tau en condiciones fisiológicas está asociada a los microtúbulos. En condiciones patológicas, una vez desacoplada de los mismos, el paso de un estado soluble a insoluble ocurre en diversas etapas y requiere de la formación de estructuras intermedias (**Fig. 1.4**). En la EA, la patología tau se inicia en estadios presintomáticos con el desarrollo de los pre-ovillos y las fibras neuropílicas o hilos del neuropilo (*neuropile threads*) y posteriormente los NFTs intraneuronales, compuestos fundamentalmente por filamentos helicoidales pareados (PHFs) y, en menor medida, de filamentos rectos (SFs, del inglés *straight filaments*) de proteína tau anormalmente fosforilada (Alonso et al., 2001).

Se sabe que las isoformas 4R tienen mayor propensión a agregarse que las 3R, aunque en la EA coexisten agregados de ambos tipos. Entre las causas que inducen la agregación de tau se incluyen mutaciones en la secuencia (aunque en la EA no se han detectado aún), cortes en las regiones N- y C-terminales (tau "truncada") o modificaciones postraduccionales patológicas (hiperfosforilación, glucosilación, ubiquitinación, poliaminación, glicación y nitración) (revisado en Guo et al., 2017). Todas estas modificaciones cambian la conformación proteica, especialmente de los dominios MTBD. Dos de estos dominios poseen dos motivos hexapeptídicos localizados que presentan una alta capacidad para formar estructura de hoja-β. Los monómeros de proteína tau con conformaciones alternativas, inicialmente forman dímeros que a su vez se asocian en oligómeros. Posteriormente, los oligómeros continúan agregándose formando los protómeros, prefibrillas o filamentos helicoidales pareados y por último los NFTs propios de la enfermedad. Tras la muerte de las neuronas que los contienen, estos acaban recibiendo el nombre de "ovillos fantasmas" (*ghost tangles*) (revisado en Meraz-Ríos et al., 2010).

Muchos estudios sugieren que, al igual que ocurre en la patología de Aβ (Ferreira et al., 2007; Benilova et al., 2012; Kayed and Lasagna-Reeves, 2013; Guerrero-Muñoz et al., 2015; Viola and Klein, 2015; Nortley et al., 2019), las formas oligoméricas de tau serían las que poseen mayor toxicidad. Estos oligómeros potencian el daño neuronal, lo que lleva a la neurodegeneración y la lesión cerebral traumática (Hawkins et al., 2013). En estudios de ratones transgénicos para tau y en experimentos de inoculación de oligómeros en ratones *wild-type* se ha demostrado que estas especies están implicadas en la pérdida sináptica (Clavaguera et al., 2013). En los modelos animales se ha detectado que estos oligómeros inducen que tau endógena adopte un plegamiento alternativo y se propague de las regiones cerebrales afectadas a las sanas, mientras

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

que las fibrillas no lo hacen (Lasagna-Reeves et al., 2012; Shafiei et al., 2017). Estos datos indican que la patología puede progresar a través de un mecanismo similar al de las proteínas priónicas.

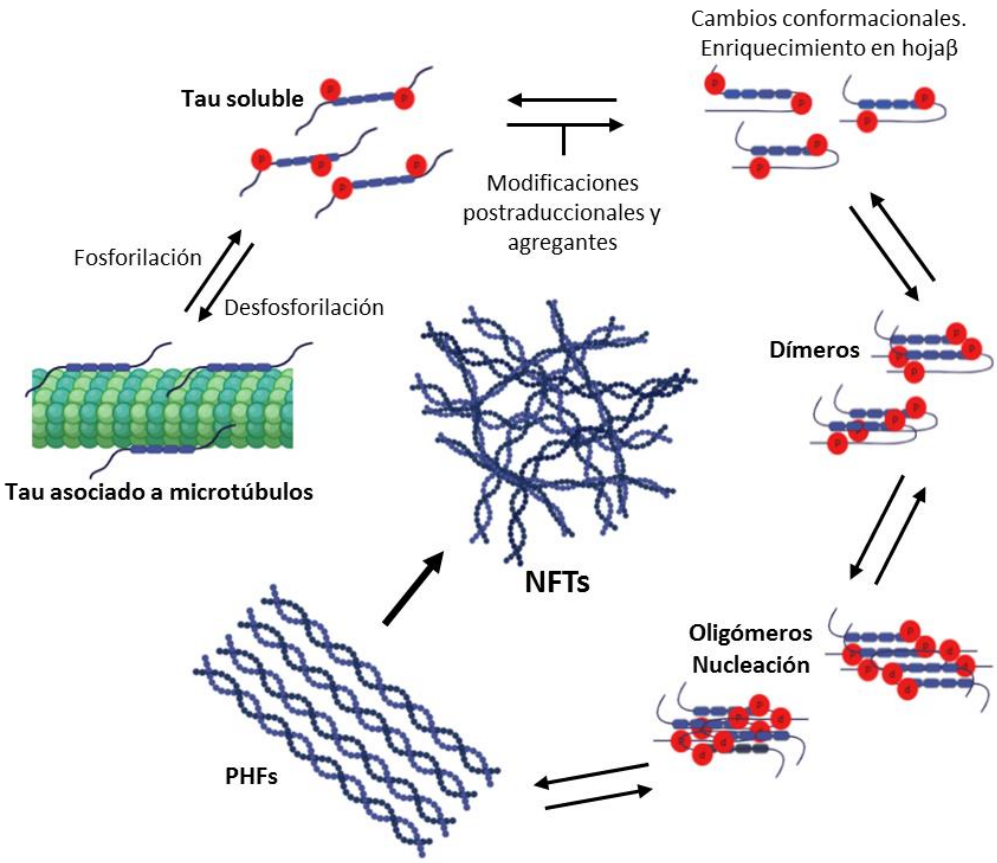


Figura 1.4. Modelo del proceso de agregación de la proteína tau. La separación de tau de los microtúbulos (debido a la hiperfosforilación de tau) incrementa la cantidad de fosfo-tau soluble susceptible de sufrir cambios que aumenten la capacidad agregativa de los monómeros en su conformación nativa. Posteriormente, se conforman los dímeros que irán uniéndose formando oligómeros, protómeros, filamentos helicoidales pares (PHFs) y los ovillos neurofibrilares (NFTs). Imagen tomada de Meraz-Ríos et al., 2010 y modificada con BioRender.com

1.3.4. PROPAGACIÓN

En condiciones fisiológicas tau es secretada al exterior neuronal, como atestiguan los niveles detectados en el líquido cefalorraquídeo (LCR, en inglés *CSF*) y en el parénquima cerebral. Aunque se desconoce su función, la liberación de tau al medio extracelular parece ser dependiente de la actividad neuronal y en situaciones patológicas se vería exacerbada (revisado en Penègre et al., 2019).

Como se ha mencionado, diversos estudios apuntan a que los agregados de tau, podrían comportarse como un prión (revisado en Colin et al., 2020). Los experimentos de transmisión o propagación realizados con modelos animales (Narasimhan et al., 2017; Clavaguera et al., 2020)

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

han demostrado que la patología de tau (al igual que la de Aβ) es capaz de transmitirse de una región cerebral a otra, especialmente entre regiones altamente conectadas entre sí (propagación transináptica) (Long and Holtzman, 2019). Así, en los últimos años, se han propuesto diversos mecanismos de propagación, existiendo cierto consenso en que son las formas oligoméricas las que poseen mayor capacidad de transportarse de una célula a otra (Lasagna-Reeves et al., 2012; Shafiei et al., 2017). Recientemente, se ha demostrado que la internalización y propagación de agregados oligoméricos de tau por parte de la neurona receptora es dependiente de receptores de membrana como LRP1 (Rauch et al., 2020). *In vitro*, diferentes modificaciones postraduccionales en la secuencia proteica de tau o las condiciones de temperatura o pH a la que ocurrió el plegamiento alternativo de la proteína, originan diferentes "cepas" patológicas. Aunque no está claro aún los mecanismos por los que se formarían *in vivo* diferentes cepas, este fenómeno parece darse en las enfermedades de priones, donde la proteína del prión (PrP) se constituye en distintas cepas, resultando algunas de ellas más infecciosas o tóxicas que otras y pudiendo afectar a diferentes regiones cerebrales por su diferente tropismo (revisado en Morales, 2017; Ayers et al., 2018).

Los agregados de tau pueden liberarse como consecuencia de la muerte neuronal y desintegración de la membrana plasmática, pero también es capaz de secretarse al exterior mediante otros mecanismos, lo que facilitaría la propagación de las especies toxicas y con capacidad de nuclear la agregación de otros monómeros con conformación nativa (**Fig. 1.5**) (revisado en Brunello et al., 2019; Pérez et al., 2019; Colin et al., 2020):

1) Secreción de agregados de tau directamente a través de membrana. Implica la agrupación e interacción de tau con ciertos microdominios de membrana con proporciones específicas de colesterol/esfingomielina/inositol.
2) Secreción por exosomas. Los agregados de tau se engloban en exosomas que surgen de la invaginación de la membrana de un endosoma tardío, formándose los cuerpos multivesiculares (MVB, del inglés *multivesicular body*). Así, tau es secretado cuando los exosomas se liberan al exterior.
3) Secreción por ectosomas. Estos se desprenden directamente de la membrana plasmática. Son de mayor tamaño que los exosomas y de composición molecular diferente. Tras liberarse, se comportan igual que los anteriores, llegando hasta la célula receptora donde se produce la fusión de las membranas o son endocitados.
4) Transferencia a través de nanotubos que conectan directamente el citosol de dos células.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Una quinta vía implica a las células gliales en el proceso. La microglía puede fagocitar activamente la proteína tau patogénica desde el exterior. Sin embargo, si la célula no consigue degradarla, las semillas pueden liberarse a través de exosomas, lo que convierte a las células microgliales en agentes activos en la propagación de la patología hacia otras neuronas circundantes (Bolós et al., 2015; Hopp et al., 2018; Španić et al., 2019).

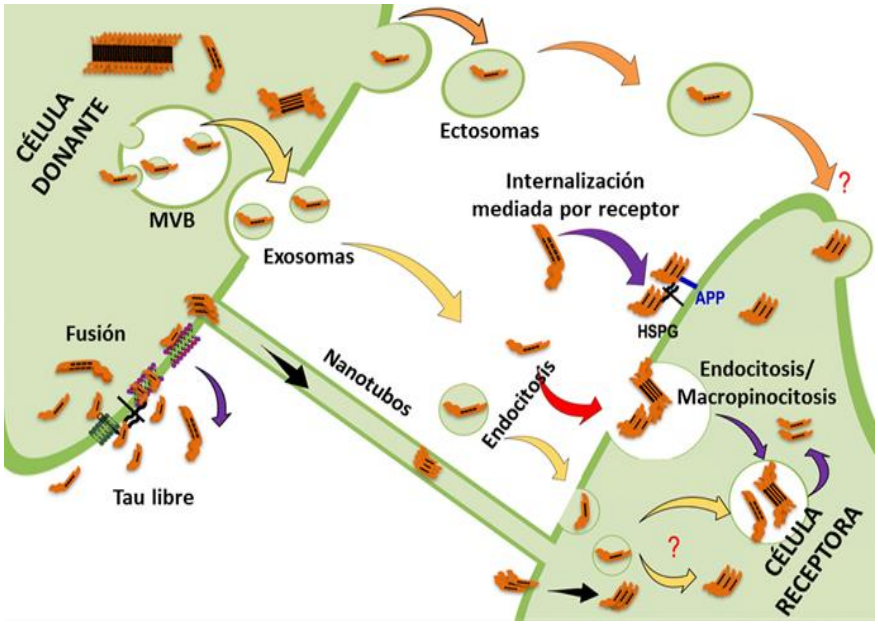


Figura 1.5. Esquema de las posibles vías de propagación transináptica de agregados de tau. La proteína tau patológica podría unirse a microdominios de membrana y traslocarse al espacio extracelular de forma libre; introducirse en cuerpos multivesiculares (MVB) que la secreten asociadas a exosomas; ser secretadas por ectosomas y/o viajar a través de nanotubos que conecten dos células entre sí. Tomado y modificado de Colin et al., 2020.

1.3.5. DEGRADACIÓN

En todas las células existen mecanismos de control sobre el estado de sus proteínas y orgánulos, de manera que componentes defectuosos, o que no sean ya necesarios, pasan a ser eliminados mediante una serie de rutas de degradación. Dichos procesos se encuentran altamente regulados y los fallos pueden desencadenar graves consecuencias como sucede en enfermedades neurodegenerativas como la EA (Nixon and Yang, 2011; Cao et al., 2019).

Las vías implicadas en estos procesos y que se encuentran alteradas en situaciones patológicas corresponden al sistema ubiquitina/proteosoma (UPS, del inglés *ubiquitin-proteosome*) y a la ruta autofágica-lisosomal. El primero, etiqueta con moléculas de ubiquitina aquellas proteínas que son susceptibles de ser degradadas por el complejo del proteosoma, como proteínas mal plegadas o innecesarias. El segundo, se encarga del recambio y reciclaje de material intracelular que incluye no solo proteínas, sino orgánulos y estructuras cuyo tamaño no les permite pasar por el poro del proteosoma. El mal funcionamiento de ambos sistemas

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

propicia el desarrollo de las patologías en las enfermedades neurodegenerativas (revisado en Bustamante et al., 2018).

Tau es sustrato tanto de la vía UPS como de la autofágica-lisosomal (Lee et al., 2013; Cao et al., 2019). La proteína nativa es degradada por el primero, mientras que tau con modificaciones postraduccionales patológicas como la truncación o la hiperfosforilación, o en forma de agregados, es procesada por el sistema de autofagia. La proteostasis de tau puede verse comprometida de diversas formas, ya sea por fallos directos en su síntesis y/o degradación, por plegamientos incorrectos como los mediados por chaperonas o bien por modificaciones de tau que dificulten su eliminación. En la EA, el UPS se satura, aumentando la derivación de tau hacia la vía autofágica (Yamamoto and Yue, 2014; Gorantla and Chinnathambi, 2020). Varias líneas de investigación sostienen que defectos en la autofagia contribuyen significativamente a la patogénesis de la enfermedad (revisado en Guo et al., 2017). De hecho, el flujo autofágico (Nixon and Yang, 2011) depende de varios factores críticos como el tráfico vesicular a través de la red microtubular (dependiente a su vez de tau), así como de la correcta fusión de las vesículas autofágicas con los lisosomas.

1.4. LA PROTEÍNA TAU EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer es la taupatía más prevalente y, dada la naturaleza mixta de sus agregados proteicos, está clasificada como una taupatía secundaría. Uno de los argumentos más sólidos a la hora de considerar a la proteína tau como esencial en el curso de esta enfermedad es que los estudios clínico-patológicos indican que la progresión de la patología tau (ovillos) en el cerebro de los pacientes presenta una correlación sólida con el grado de deterioro cognitivo (Braak and Braak, 1991; Braak et al., 1993; Gómez-Isla et al., 1997; Riley et al., 2002; Braak et al., 2006).

A nivel macroscópico (**Fig. 1.6**), los cerebros de los pacientes con EA se caracterizan por presentar una atrofia de la región cortical causada por una disminución en el grosor de las circunvoluciones, un engrosamiento de los surcos y meninges, y una fuerte dilatación ventricular (Perl, 2010; Scheltens et al., 2016). A nivel microscópico tiene lugar:

1) la acumulación extracelular de péptido beta-amiloide (Aβ) formando las placas seniles, que se depositan en el parénquima cerebral y alrededor de las paredes de los vasos sanguíneos

2) la agregación de proteína tau hiperfosforilada formando los NFTs intraneuronales

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3) pérdida neuronal y sináptica abundante en áreas cerebrales vulnerables, que en muchos casos están implicadas en el procesamiento de la información y memoria

4) presencia de un proceso neuroinflamatorio, con una significativa activación microglial y astroglial

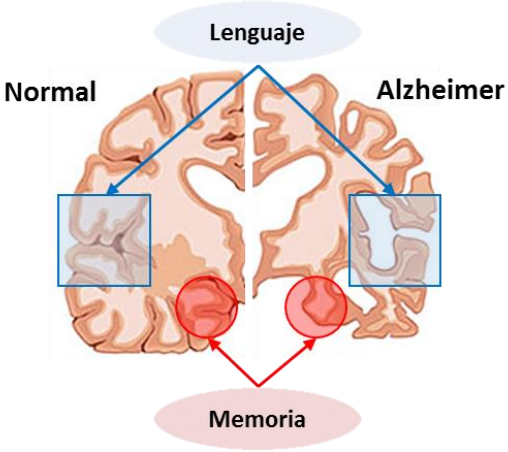


Figura 1.6. Dibujo comparativo de hemisferio cerebral humano sano (izquierda) y hemisferio de paciente de Alzheimer (derecha). El cerebro de un paciente afectado por la EA muestra un volumen inferior al normal con una gran dilatación ventricular. La atrofia afecta a los lóbulos temporales, frontales, parietales y occipitales. Las áreas más afectadas son aquellas implicadas en el lenguaje (área de Broca y de Wernicke) y la memoria (hipocampo, corteza entorrinal). Modificado de http://fcneurology.net.

En la EA, los NFTs están constituidos principalmente por la proteína tau hiperfosforilada y agregada. Pueden encontrarse en tres estadios morfológicos: 1) pre-ovillos (*pre-tangles*), en los que la neurona aún presenta un fenotipo "sano"; 2) NFTs intracelulares, que desplazan el núcleo y orgánulos de las neuronas y que muestran defectos en las dendritas apicales, en el cono axónico y su segmento proximal; y 3) en forma de NFTs extracelulares (*ghost-tangles*) en los cuales los agregados de tau se localizan extracelularmente debido a la muerte de la neurona (revisado en Serrano-Pozo et al., 2011). También se encuentra fosfo-tau en las prolongaciones neuronales en forma de fibras o hilos neuropílicos (NTs, del inglés *neuropil threads*) y en las neuritas distróficas (axones/presinapsis aberrantes) que se localizan alrededor de las placas amiloides.

La distribución topográfica de las lesiones neurofibrilares presenta un patrón de progresión temporal determinado a lo largo de la enfermedad, pudiéndose distinguir seis estadios o etapas, llamados estadios de Braak (Braak and Braak, 1991; Braak et al., 2006) (**Fig. 1.7**). La corteza perirrinal (región transentorrinal) es la primera en presentar NFTs junto con la corteza entorrinal del giro hipocampal (estadio I). Los ovillos aparecen luego en la región CA1 del hipocampo (estadio II), seguido de las regiones límbicas como el subículo (estadio III), la amígdala, el tálamo y el claustro (estadio IV), hasta que, finalmente, se extienden por todas las áreas isocorticales, afectando más temprana y severamente las áreas asociativas (estadio V) que las áreas sensoriales primarias, motoras y visuales (estadio VI). Además, esta degeneración sigue un patrón también laminar dentro de cada región, de manera que se encuentran afectadas

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

primeramente las capas superficiales II, III y IV de la corteza perirrinal y entorrinal, el estrato piramidal de CA1 y subículo, y las capas III y V de las áreas isocorticales (Braak et al., 2006).

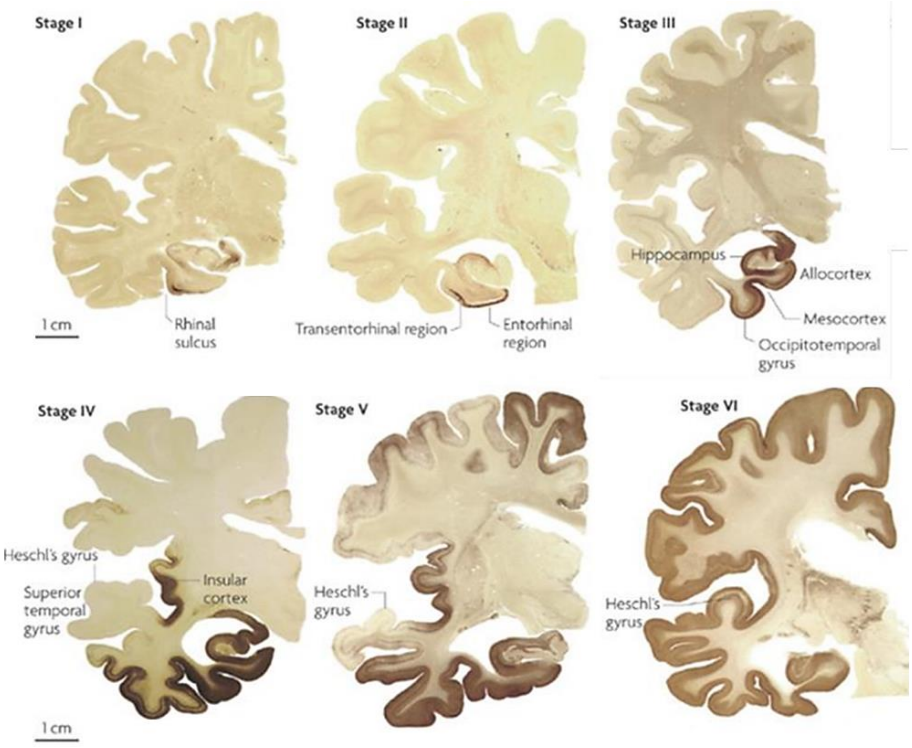


Figura 1.7. Patología tau y estadios de Braak I-VI. Secciones coronales de hemicerebros humanos *post mortem* mostrando los seis estadios en los que progresan los cambios neurofibrilares asociados a la proteína tau hiperfosforilada, detectados mediante inmunotinción para fosfo-tau. Tomado de Braak et al., 2006.

1.4.1. PATOLOGÍA AMILOIDE EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

En la enfermedad de Alzheimer, la patología de tau coexiste con la acumulación y agregación de la proteína β-amiloide. El Aβ es un péptido soluble que se genera por el procesamiento proteolítico de la proteína precursora amiloide (APP, del inglés *amyloid precursor protein*), realizado por la acción secuencial de las enzimas β- y γ-secretasa. APP es una proteína transmembrana localizada en la membrana plasmática y en las membranas de vesículas implicadas en la vía endocítica (Evin and Weidemann, 2002; Zhang et al., 2011; Nguyen, 2015).

La producción de Aβ ocurre en condiciones fisiológicas, sin embargo, en la EA este péptido se acumula de forma incontrolada. En el Alzheimer de tipo familiar o de aparición temprana (antes de los 65 años, 1% de los casos) sucede como consecuencia de mutaciones en los genes de la APP (http://www.alzforum.org/mutations) y presenilinas 1 y 2 (PS1, PS2), que se heredan de forma autosómica dominante (Vetrivel et al., 2006; De Strooper and Annaert, 2010; Bagyinszky et al., 2014). Sin embargo, la mayoría de los casos pertenecen a la forma esporádica de la enfermedad, o de comienzo tardío (a partir de los 65 años), cuyo principal factor de riesgo es la edad. La naturaleza de la forma esporádica parece ser multifactorial, siendo el principal

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

factor genético la presencia del alelo E4 de la apolipoproteína E (ApoE) (Kim et al., 2014; Yamazaki et al., 2019), pero también están involucrados polimorfismos de genes implicados en funciones de distinta naturaleza, destacando el sistema inmune (Heneka et al., 2015; Calsolaro and Edison, 2016; Shi and Holtzman, 2018; Moreno-Grau et al., 2019). Por último, también existe influencia de factores ambientales (Scheltens et al., 2016; Kocahan and Doğan, 2017).

El procesamiento de la APP puede ocurrir a través de varias rutas:

- Ruta no amiloidogénica. Vía no patológica, en la que la acción conjunta de la α-secretasa y γ-secretasa (constituida por PS1, entre otras proteínas) libera fragmentos con funciones neuroprotectoras, neurotróficas (De Strooper, 2010) y de regulación génica (O'Brien and Wong, 2011). Esta ruta no genera péptido Aβ.
- Ruta amiloidogénica. Vía patogénica a través de la cual se produce el péptido Aβ. La acción de la β- y γ-secretasas (Selkoe, 2001; Tomita, 2017; Wilkins and Swerdlow, 2017) produce péptidos Aβ de diferente longitud (Aβ40-42) con gran capacidad de agregación.
- Rutas alternativas o no canónicas. La acción de la δ-secretasa y la η-secretasa, causan un aumento de los niveles de Aβ. No obstante, hasta la fecha su implicación en la patología de la EA sigue bajo discusión (revisado en García-González et al., 2019; Zhang et al., 2020).

1.4.2. TAU EN LA HIPÓTESIS DE LA CASCADA AMILOIDE

Actualmente, la hipótesis de la cascada amiloide es la más aceptada a la hora de explicar la secuencia de eventos patológicos que acontecen en la EA (Hardy and Allsop, 1991; Hardy and Higgins, 1992; Selkoe and Hardy, 2016). Esta hipótesis considera que la acumulación y agregación del péptido Aβ (producidos por cambios metabólicos que favorecerían su sobreproducción y/o problemas en la eliminación) es el evento desencadenante de la patología, de la hiperfosforilación de tau y consecuente formación de los ovillos neurofibrilares, así como de la pérdida sináptica y neuronal que conduce finalmente a la demencia (**Fig. 1.8 y 1.9**).

De acuerdo a esta teoría, el proceso patogénico comienza con el aumento de los niveles de Aβ (**Fig. 1.8 y 1.9**), principalmente de la isoforma Aβ42, con tendencia a agregarse formando oligómeros, y finalmente las placas amiloides extracelulares. La amiloidopatía provoca alteraciones en la función sináptica, así como una respuesta inflamatoria mediada por las células de la microglía y astroglía. El estrés oxidativo va aumentando con el tiempo y acaba afectando a la homeostasis neuronal (Galea et al., 2012). Todos estos eventos inciden sobre determinadas fosfatasas/quinasas que controlar el estado de fosforilación de la proteína tau. Fosfo-tau se desacopla de las tubulinas produciendo la desestabilización de la red microtubular (pérdida de función de tau) con el consiguiente fallo en el transporte axonal. Por otro lado, fosfo-tau se

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

agrega dando lugar a la formación de los NTs y los NFTs (ganancia de toxicidad). El conjunto de los cambios producidos por ambas proteínas, conduce a una muerte neuronal masiva que se manifiesta en un estado progresivo de demencia (Haass and Selkoe, 2007). Esta hipótesis está siendo revisada y discutida ampliamente en los últimos años (Reitz, 2012; Suzhen et al., 2012; Herrup, 2015) debido en gran parte al fracaso continuo en las fases clínicas de tratamientos que tienen por diana la patología amiloide (Herrup et al., 2015).

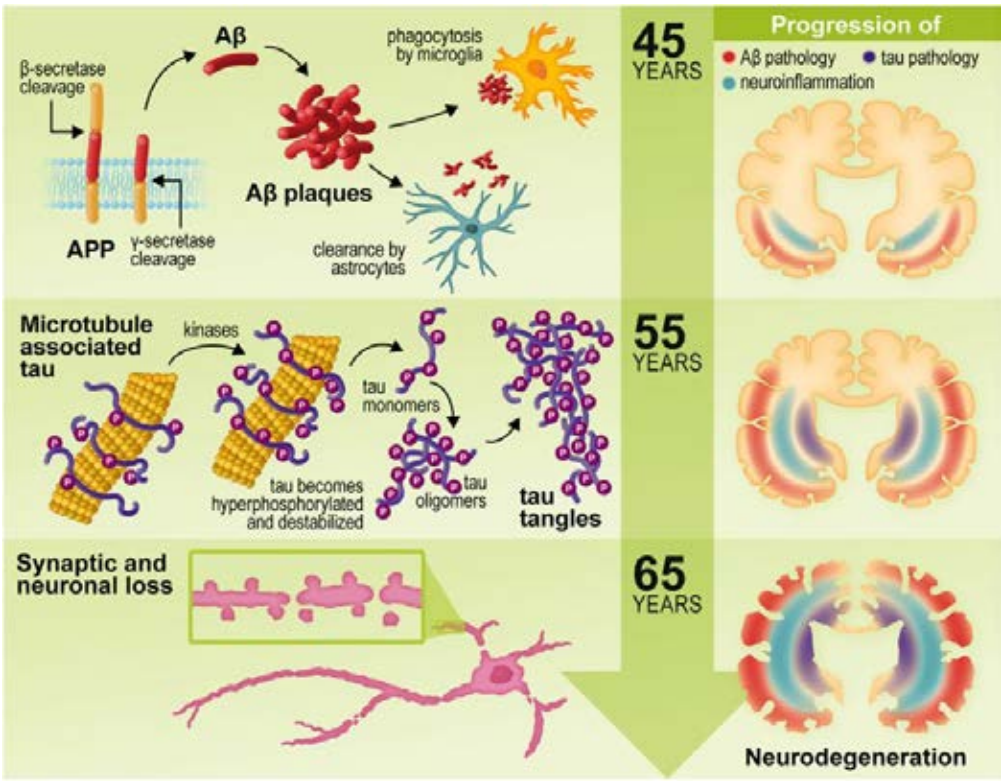


Figura 1.8. Patología en el cerebro de pacientes de Alzheimer. La formación de Aβ ocurre por escisión anormal de la proteína precursora amiloide (APP), y los monómeros se acumulan y agregan en oligómeros y finalmente en placas. El Aβ induce activación de la microglía y astroglía que tratan de promover su eliminación. La acumulación de Aβ induce la fosforilación y desacople microtubular de tau, así como su agregación para finalmente formar los NFTs. La respuesta inflamatoria causa una mayor producción de Aβ. La patología de tau se observa aproximadamente 10 años después del inicio de la agregación de Aβ. El aumento de la agregación de Aβ, la inflamación y la hiperfosforilación de tau conducen a daño sináptico y neuronal en las sinapsis, y el consecuente deterioro cognitivo. Tomado de Newcombe et al., 2018.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

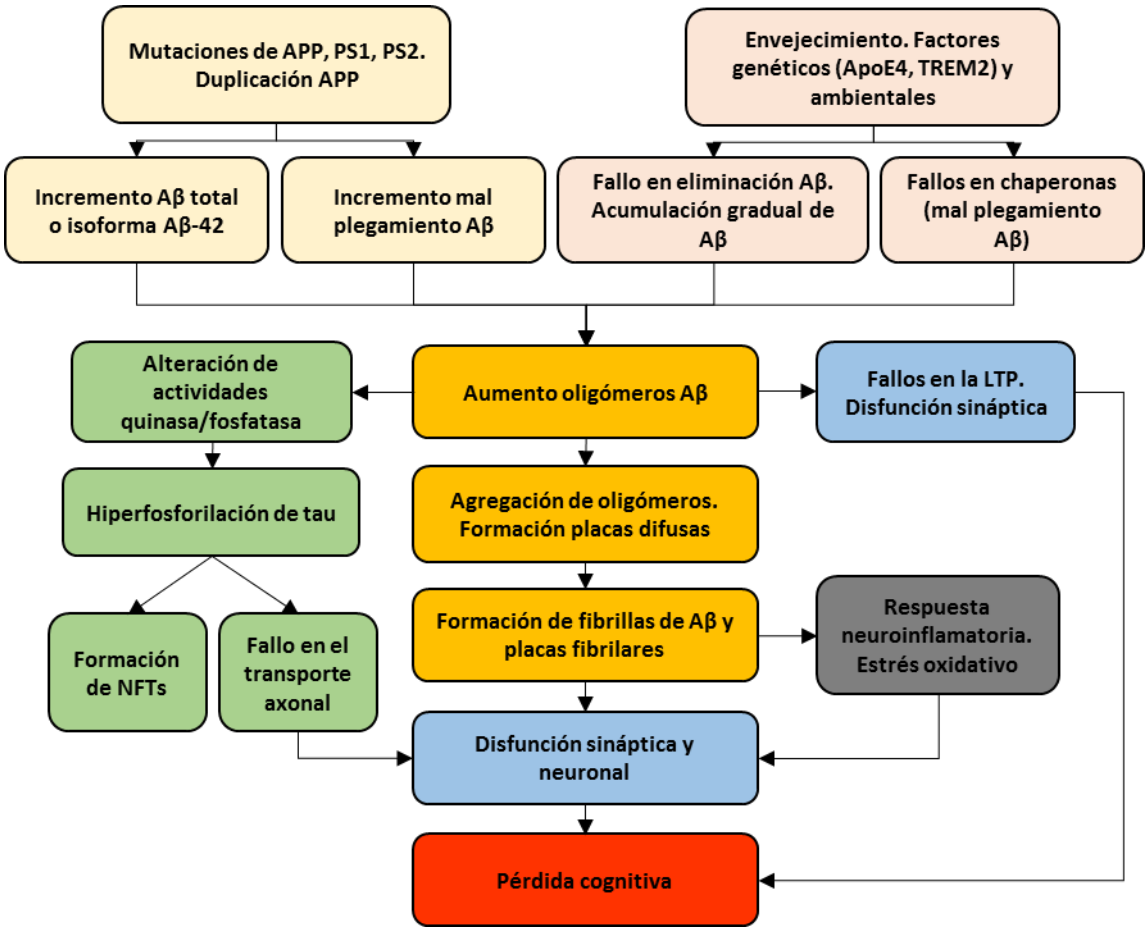


Figura 1.9. Hipótesis de la cascada amiloide. La acumulación del péptido Aβ, ya sea por mutaciones en APP o PS1/2, o por otros factores genéticos y/o ambientales, se sitúa en lo alto de la cascada de eventos patológicos conocido como cascada amiloide. Las placas y los oligómeros de Aβ provocan alteraciones que conllevan una respuesta neuroinflamatoria, hiperfosforilación de proteína tau y formación de NFTs, unido todo a una pérdida sináptica y neuronal, causando un progresivo deterioro cognitivo y demencia. Modificado de Blennow et al., 2010.

A pesar de estos argumentos en su contra, sigue siendo la teoría más ampliamente aceptada por la comunidad científica (Selkoe and Hardy., 2016). Junto con ella, se han propuesto nuevas hipótesis tales como la hipótesis de la cascada mitocondrial, la hipótesis metabólica, la hipótesis inflamatoria o la hipótesis de la neurodegeneración del citoesqueleto neuronal, entre otras (De Strooper and Karran, 2016). En todas ellas se postulan diversos puntos y mecanismos de conexión entre las patologías de Aβ y tau. Uno de ellos es la contemplada por la hipótesis de la cascada amiloide, en la que los oligómeros de Aβ producen la activación de quinasas implicadas en la fosforilación de tau como la GSK3β o Cdk5. Es posible que la sobreactivación de las mismas observada en el cerebro de pacientes y de modelos animales ocurra por la asociación de Aβ con receptores de insulina, vías de señalización Wnt o receptores NMDA, lo cual iniciaría una cascada de señales que concluiría con la activación de las quinasas (revisado en Liu et al., 2019).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Aunque a día de hoy conocemos muchos mecanismos que subyacen a las patologías de Aβ y tau, todavía no está clara la relación que existe entre ambas en la EA (Iaccarino et al., 2018) dado que, por ejemplo, los ovillos y las placas se forman en regiones cerebrales y momentos diferentes (Braak and Braak, 1991; Jucker and Walker, 2011). También existen pacientes que presentan una gran acumulación de placas amiloides, pero que sin embargo no sufren deterioro cognitivo (Perez-Nievas et al., 2013).

Además, los modelos animales transgénicos que portan mutaciones para APP humana no desarrollan toda la patología de la EA, como cabría esperar (Bilkei-Gorzo, 2014). Por otro lado, los estudios iniciales realizados en modelos transgénicos de taupatía (Götz et al., 2001; Lewis et al., 2001) revelaron que las inyecciones de Aβ en los cerebros de estos ratones aumentaban notablemente la cantidad de NFTs en comparación con los animales no inyectados. Estudios posteriores realizados con ratones transgénicos para APP y PS1 y KO para tau, demostraron que Aβ no solo actuaba "aguas arriba" en la patología de tau, sino que la disfunción sináptica y pérdida cognitiva producida por Aβ es dependiente de tau (Bloom, 2014). Actualmente, se contempla la posibilidad de que la acumulación de Aβ en las regiones corticales del cerebro, sea la causante de que la patología de tau traspase las regiones límbicas, donde se suele acumular por el proceso de envejecimiento (van der Kant et al., 2020). No obstante, algunos estudios apuntan que tau se puede encontrar actuando también sobre la patología de Aβ a través de un mecanismo de retroalimentación patológico (Leroy et al., 2012).

Además, es relevante el hecho de que la pérdida de la función de tau desestabiliza la red microtubular, alterando el flujo autofágico. Este hecho contribuiría a la acumulación de material de degradación (como los agregados de tau) y vesicular/autofágico generando neuritas distróficas, disfunción sináptica y muerte neuronal (revisado en Nixon and Yang, 2011; He et al., 2018). Las neuritas distróficas son prolongaciones aberrantes de naturaleza axonal/sináptica, asociadas a placas amiloides compactas o neuríticas, y que contienen en su interior gran cantidad de proteínas, material vesicular y autofágico (Nixon and Yang, 2011; Sanchez-Varo et al., 2012; Torres et al., 2012), constituyendo una de las principales marcas histopatológicas de la EA. Además, son lugares donde se acumula fosfo-tau, precursores y enzimas implicadas en la patología de Aβ como APP, BACE-1 y γ-secretasa. Por ello, las neuritas distróficas se postulan como puntos de generación de péptido amiloide y de posible conexión entre la patología amiloide y tau (Sadleir et al., 2016).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

1.4.3. PAPEL DE TAU Y Aβ EN EL DAÑO SINÁPTICO

La pérdida sináptica se produce principalmente en los estadios intermedios y moderados de la EA, y correlaciona mejor con los déficits cognitivos de los pacientes que con la carga amiloide extracelular o la propia pérdida neuronal (Scheff et al., 2014). Tanto la patología amiloide como la de tau están implicadas en la pérdida sináptica de la EA (Forner et al., 2017). Diversos estudios han demostrado que los oligómeros de Aβ tienen capacidad sinaptotóxica (Lambert et al., 1998; Viola and Klein, 2015; Arbel-Ornath et al., 2017). Además, está descrito que alrededor de las placas seniles se forma un halo de oligómeros que se asocian a las densidades postsinápticas y que produce una pérdida de hasta el 60% de sinapsis excitatorias en su entorno (Koffie et al., 2009).

La patología de tau por sí misma puede ser responsable de sinaptopatía, como se ha observado en pacientes de taupatías puras y modelos transgénicos, los cuales presentan una significativa disfunción y pérdida sináptica en ausencia de patología amiloide (Eckermann et al., 2007; Yoshiyama et al., 2007; Jackson et al., 2017). Lógicamente, la pérdida de la red microtubular por la hiperfosforilación de tau conduce a una disfunción en el transporte de vesículas, mitocondrias, enzimas y demás componentes necesarios para el sostenimiento funcional de la sinapsis. Además, existen mecanismos y rutas específicas que conectan la toxicidad de Aβ a la presencia patológica de tau en las sinapsis siendo uno de esos puntos de conexión la quinasa Fyn (Ittner and Ittner, 2018). Recientemente se ha descubierto que la proteína tau en las dendritas funciona como un traslocador intracelular para Fyn hacia la densidad postsináptica (PSD). Por tanto, la traslocación de tau patológico al compartimento somatodendrítico compromete también la estabilidad de las espinas dendríticas: se produce, entre otras, la internalización de receptores AMPA, y tau recluta gran cantidad de quinasas Fyn que sobreactivarían los receptores NMDA provocando efectos excitotóxicos en las neuronas (revisado en Guerrero-Muñoz et al., 2015; Nygaard, 2018).

En conclusión, hay un buen número de pruebas que demuestran que ambas patologías están conectadas y actúan de forma sinérgica para causar disfunción sináptica y déficits cognitivos (revisado en Jackson et al., 2016; DeVos and Hyman, 2017; Vargas-Caballero et al., 2017; Busche and Hyman, 2020); sin embargo, aún se desconoce gran parte de los mecanismos implicados en esta relación.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

1.4.4. TAU Y NEURODEGENERACIÓN EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La EA se caracteriza por una fuerte y extensa pérdida neuronal (Forner et al., 2017) que tiene lugar especialmente en regiones relacionadas con la memoria y el aprendizaje. Desde la primera vez que se describió la relación entre la progresión espacial de la patología de tau y su correlación con el grado de severidad de la EA (Braak and Braak, 1991), se ha estimado que la formación de NFTs juega un papel fundamental en la neurodegeneración. Sin embargo, esta teoría también se encuentra cuestionada debido a hallazgos tales como la disociación espacial entre la formación de NFTs y la pérdida neuronal observada en pacientes y modelos animales transgénicos (Vogt et al., 1998; Spires et al., 2006). Por otro lado, diversos estudios han demostrado que las neuronas parecen sobrevivir largos periodos incluso después de que tau se comience a agregar en el soma, y que mantienen una conexión integral y funcional con otras neuronas de su misma red (Rudinskiy et al., 2014; D'Orange et al., 2018). Aun así, la presencia de NFTs en el soma neuronal supone un impedimento para la correcta distribución de los orgánulos (como las mitocondrias) y para la conexión entre diferentes porciones subcelulares.

Como se ha apuntado, la proteína tau también está implicada en procesos de hiperexcitabilidad de la neurona en situaciones patológicas (Krüger and Mandelkow, 2016). Además, los oligómeros de tau que son introducidos en neuronas sanas afectan a la cadena respiratoria mitocondrial, y en consecuencia se libera citocromo C que activa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y caspasas que inician el proceso de apoptosis. Tau también desequilibra el balance fisión/fusión mitocondrial, por lo que la maquinaria energética de la neurona se ve seriamente afectada (revisado en Shafiei et al., 2017).

1.5. RESPUESTA INFLAMATORIA Y ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La patología amiloide (placas seniles) y de tau (NFTs) son las principales lesiones cerebrales que definen a la enfermedad de Alzheimer a nivel histopatológico. Sin embargo, la replicación de estas dos alteraciones proteicas en modelos animales transgénicos ha sido poco útil para comprender el proceso neurodegenerativo en pacientes o para desarrollar una terapia protectora que frene o retrase el progreso de la enfermedad. Esto supone que existen otros mecanismos patogénicos aún sin resolver.

En los últimos años, la respuesta neuroinflamatoria (mediada por la activación de las células microgliales y astrogliales) se ha consolidado como un tercer proceso clave en esta enfermedad (Kinney et al., 2018; Hammond Ket al., 2019). De hecho, los estudios genéticos recientes (GWAs) dan un fuerte apoyo a la contribución de la inflamación cerebral y la microglía en el desarrollo de la EA de tipo esporádico (Liddelow, 2019; Andrews et al., 2020). Dada la

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

complejidad de esta respuesta glial existe un debate abierto sobre si es perjudicial y contribuye al proceso neurodegenerativo, o si por el contrario es protectora y ayuda a restringir el daño neuronal; o incluso si tiene una función dual dependiendo de la etapa de la enfermedad. La respuesta glial es probablemente muy heterogénea y compleja, y a día de hoy no se conoce el amplio espectro de cambios gliales (fenotipos) y sus consecuencias funcionales en la EA.

La visión más generalizada sobre la inflamación y activación glial en la EA se ha centrado en la producción de factores proinflamatorios y el daño neurotóxico (**Fig. 1.10**). Esta idea deriva del estudio de modelos transgénicos amiloidogénicos donde la microglía muestra una fuerte activación asociada al progreso de la patología formando agregados alrededor de las placas amiloides (Yin et al., 2017; Hansen et al., 2018; Navarro et al., 2018). La microglía activada de forma crónica libera una variedad de productos proinflamatorios y citotóxicos, incluyendo especies reactivas de oxígeno y de óxido nítrico, así como diversas citoquinas como IL1β, IL6 o TNFα, entre otras. Una respuesta inmune persistente en el cerebro de los pacientes no solo parece estar asociada con la neurodegeneración, sino que también facilita y exacerba las patologías de Aβ y tau. Además, se ha sugerido que la respuesta inflamatoria puede proporcionar un vínculo entre la patología inicial de Aβ y el desarrollo posterior de NFTs. En los pacientes de Alzheimer la respuesta inflamatoria parece estar mucho más limitada que en estos modelos.

En este sentido, nuestro grupo de investigación ha descrito que la activación microglial en el hipocampo de individuos Braak V-VI es comparativamente inferior a la de modelos transgénicos que sobreexpresan Aβ y, más interesante, que la microglía manifiesta un proceso degenerativo con reducción en su densidad numérica y la presencia de signos patológicos como prolongaciones distróficas y fragmentadas, entre otros (Sanchez-Mejias et al., 2016; Gutierrez and Vitorica, 2018; Navarro et al., 2018). Estos cambios degenerativos de la microglía fueron más frecuentes en el hipocampo que en otras regiones del giro parahipocampal, siendo el giro dentado la zona más afectada. Aunque no podemos descartar la existencia de otras causas, los experimentos *in vitro* indican que la toxicidad parece estar asociada a la acumulación de fosfo-tau soluble en los pacientes (Sanchez-Mejias et al., 2016). El hecho de que la microglía sea capaz de fagocitar tau soluble conllevaría su degeneración.

La presencia de fosfo-tau soluble en las células microgliales no es detectable en los modelos amiloidogénicos, explicando el diferente comportamiento de estas células en los modelos. Hasta la fecha se conoce muy poco sobre la respuesta microglial en modelos de patología tau. La idea de una microglía degenerativa o disfuncional como motor conductor de la patología Alzheimer debe ser considerada para desarrollar futuras estrategias terapéuticas. De hecho, es fundamental reproducir en los modelos animales este escenario de patología microglial.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

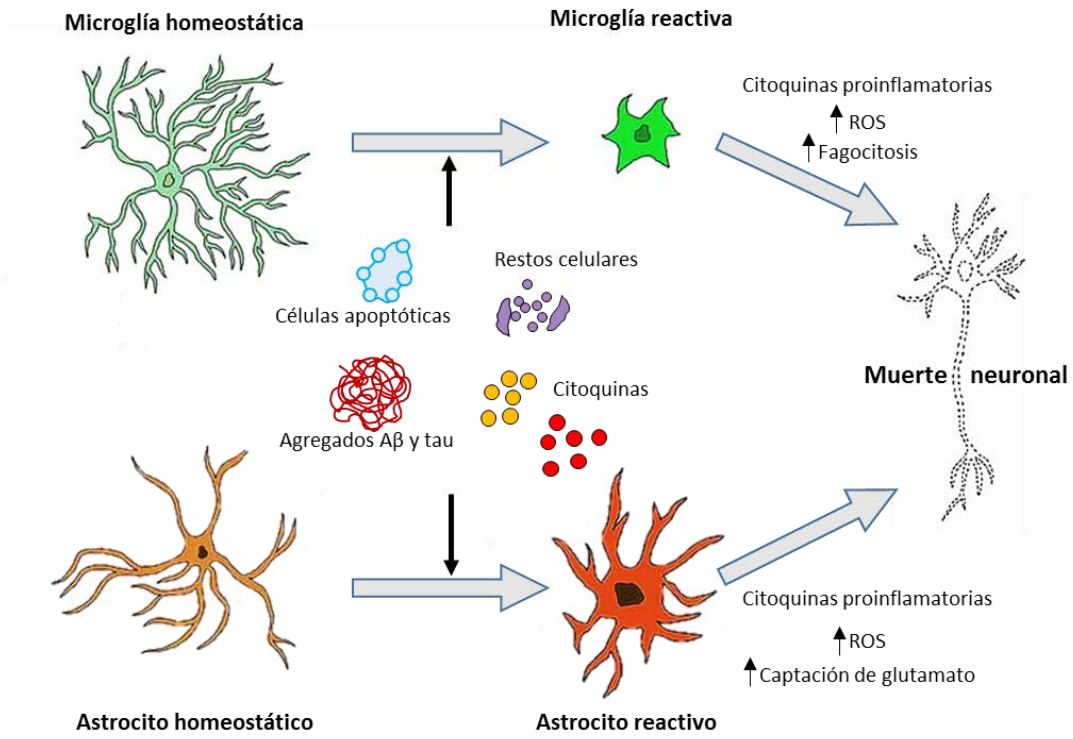


Figura 1.10. Escenario citotóxico de la activación de las células microgliales y astrogliales en la enfermedad de Alzheimer. Ambos tipos celulares se encuentran monitorizando el medio circundante en condiciones fisiológicas. La presencia de células apoptóticas o de restos de degeneración y muerte celular, junto con agregados proteicos anómalos y diversas citoquinas, desencadena la activación de estas células gliales y produce, entre otros efectos, liberación de citoquinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno (ROS), los cuales provocan la muerte neuronal. Tomado y modificado de Palpagama et al., 2019.

1.5.1. MICROGLÍA

La microglía representa el conjunto de las principales células inmunes del cerebro (5-10% del total de células cerebrales). Estas células proceden de la línea mieloide (originarias del saco vitelino), migran al cerebro durante el desarrollo embrionario y se asientan, expanden y se ramifican en todo el parénquima cerebral (Zhang and Jiang, 2014; Butovsky and Weiner, 2018), teniendo mayor presencia en la sustancia blanca que en la gris (Mittelbronn et al., 2001). La microglía constituye una población celular que se mantiene principalmente por autorrenovación, aunque en situaciones patológicas puede suceder que monocitos sanguíneos atraviesen la barrera hematoencefálica y adquieran fenotipo microglial en el parénquima (Ginhoux et al., 2010; Prinz et al., 2011; Karlen et al., 2018; Feng et al., 2019). La identificación de mutaciones/polimorfismos asociados al Alzheimer esporádico en genes microgliales como *TREM2, CD33, HLA-DRB1*, etc., avalan un papel predominante de estas células en la patogénesis de la enfermedad.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

La microglía en condiciones fisiológicas está implicada en multitud de funciones (**Fig. 1.11**), dependiendo del estado de desarrollo del cerebro, de la región cerebral y de las condiciones fisiológicas/patológicas, tales como la neurogénesis (en etapas fetal y adulta), la organización de las redes neuronales, la supervivencia y/o diferenciación neuronal y la inducción de la apoptosis. Consideradas los macrófagos del SNC, las células microgliales se encargan de la fagocitosis y remodelación de sinapsis (junto con los astrocitos), de la retirada de material y células muertas y la eliminación de patógenos invasores y toxinas que afecten a la homeostasis cerebral (revisado en Butovsky and Weiner, 2018; Sierra et al., 2019). La opinión predominante hasta la fecha es que la microglía conforma una única población dotada de una gran plasticidad que le permite realizar todas estas funciones. Sin embargo, esta misma variedad parece no estar definida exclusivamente por el entorno sino por la existencia de múltiples subtipos microgliales cada uno caracterizado por una firma molecular específica (revisado en Stratoulias et al., 2019).

A nivel morfológico es posible distinguir varios fenotipos microgliales (**Fig. 1.12**). En condiciones fisiológicas, la microglía denominada **homeostática** o **vigilante** presenta prolongaciones muy ramificadas y un cuerpo celular pequeño y compacto. En situaciones patológicas como la EA, la microglía pasa a un estado reactivo denominándose **microglía activada**, que se caracteriza por una morfología de tipo ameboide, con retracción y engrosamiento de las prolongaciones junto con un cuerpo celular agrandado. A su vez, estos cambios implican una mayor actividad fagocítica y un aumento de la secreción de diversas citoquinas, quimiocinas y factores tróficos al medio circundante (Li and Barres, 2017).

Con la edad, y de forma más exacerbada en las enfermedades neurodegenerativas, la microglía experimenta senescencia, lo cual resulta en una menor protección inmunológica del parénquima cerebral y por tanto de soporte vital de las neuronas. La **microglía distrófica** presenta alteraciones morfológicas como dilataciones esferoidales, deramificación y prolongaciones tortuosas o fragmentadas (revisado en Streit et al., 2020). La presencia de este tipo de microglía distrófica ha sido descrita en el cerebro de pacientes de Alzheimer (Sanchez-Mejias et al., 2016). A microscopía electrónica de transmisión se ha descrito también un fenotipo microglíal fagocítico y anormalmente electrodenso, asociado a situaciones patológicas y denominado **microglía oscura** (Bisht et al., 2016), que parece tener un papel relevante en la remodelación patológica de los circuitos neuronales al estar asociado a elementos sinápticos.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

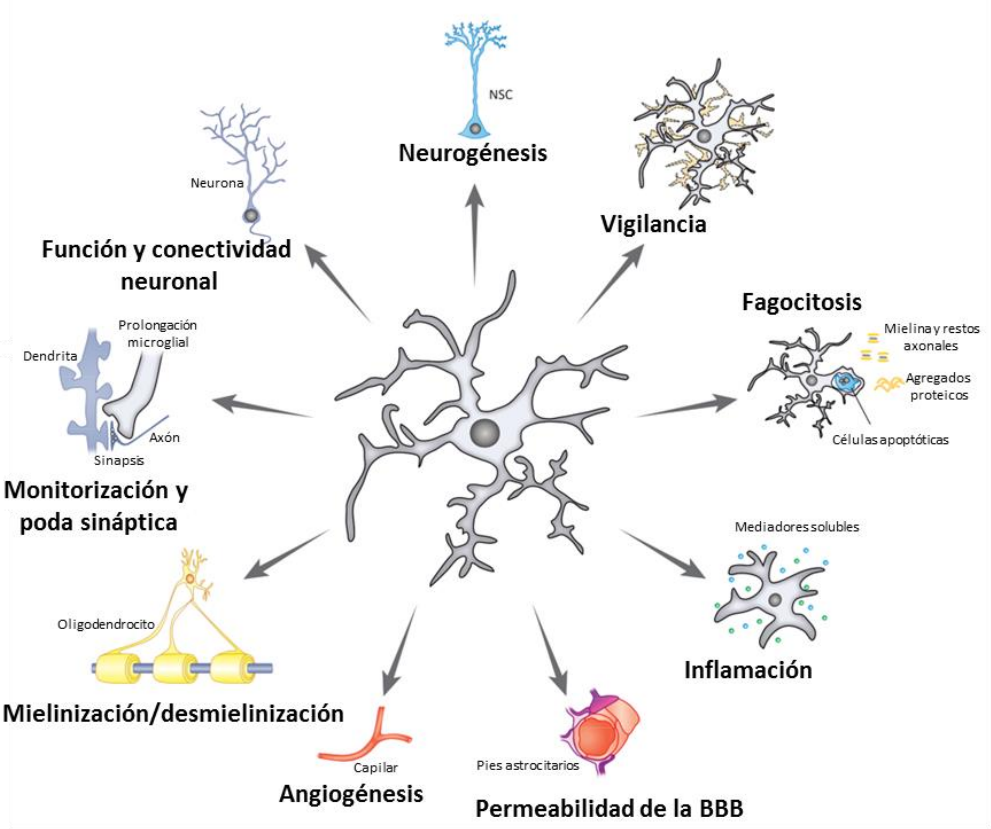


Figura 1.11. Funciones de la microglía. Una característica de la microglía es la motilidad de sus prolongaciones, necesaria para tareas de vigilancia. En condiciones patológicas, la microglía realiza funciones inmunes clásicas, como la liberación de mediadores inflamatorios y la fagocitosis de desechos celulares (células apoptóticas, axones y residuos de mielina). La microglía realiza tareas fisiológicas que pueden verse modificadas en condiciones patológicas, como la monitorización de las sinapsis y la poda sináptica. También pueden interaccionar y modular la actividad de otras células: con neuronas (conectividad); con células madre neurales (NSC; neurogénesis), con oligodendrocitos (mielinización/remielinización), con células endoteliales (procesos de angiogénesis/revascularización) y con astrocitos (permeabilidad de la barrera hematoencefálica; *BBB*). Tomado y modificado de Sierra et al., 2019.

En la EA, la microglía está implicada tanto en la patología de Aβ como en la de tau. Por un lado, los depósitos amiloides se encuentran típicamente rodeados por microglía activada (McGeer et al., 1987; Hashemiaghdam and Mroczek, 2020; Webers et al., 2020), pudiendo funcionar a modo de barrera de contención de la toxicidad de la placa (Yuan et al., 2016; Hansen et al., 2017). Se sabe además que estas células fagocitan formas solubles y oligoméricas de Aβ (D'Andrea et al., 2004; Zuroff et al., 2017). También existe una relación estrecha con la patología de tau. Aún se desconoce en gran medida el papel que juega en la misma, pero los estudios realizados estos últimos años en pacientes y modelos animales para taupatías puras (revisado en Leyns and Holtzman, 2017; van Olst et al., 2020) ponen de manifiesto que la activación de la microglía puede derivar en un aumento de la patología de tau (Yoshiyama et al., 2007; Cherry et al., 2016; Perea et al., 2018; Romero-Molina et al., 2018), al fagocitar fosfo-tau extracelular

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

(Bolós et al. 2015, 2017) e intervenir en su propagación entre diferentes neuronas y regiones a través de exosomas (Asai et al., 2015; Pérez et al., 2019; Busche and Hyman, 2020). La presencia de fosfo-tau en las sinapsis propiciaría su eliminación por parte de la microglía con ayuda del sistema del complemento (Dejanovic et al., 2018), mientras que la formación de PHFs y NFTs en el interior de la neurona induciría la exposición de señales de fagocitosis ("*eat-signals*") en la superficie neuronal para su eliminación (Brelstaff et al., 2018). Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que las formas solubles de tau fosforilado son tóxicas para las células microgliales en cultivo lo que podría explicar la presencia de microglía patológica (distrófica) en el cerebro de pacientes de EA (Sanchez-Mejias et al., 2016).

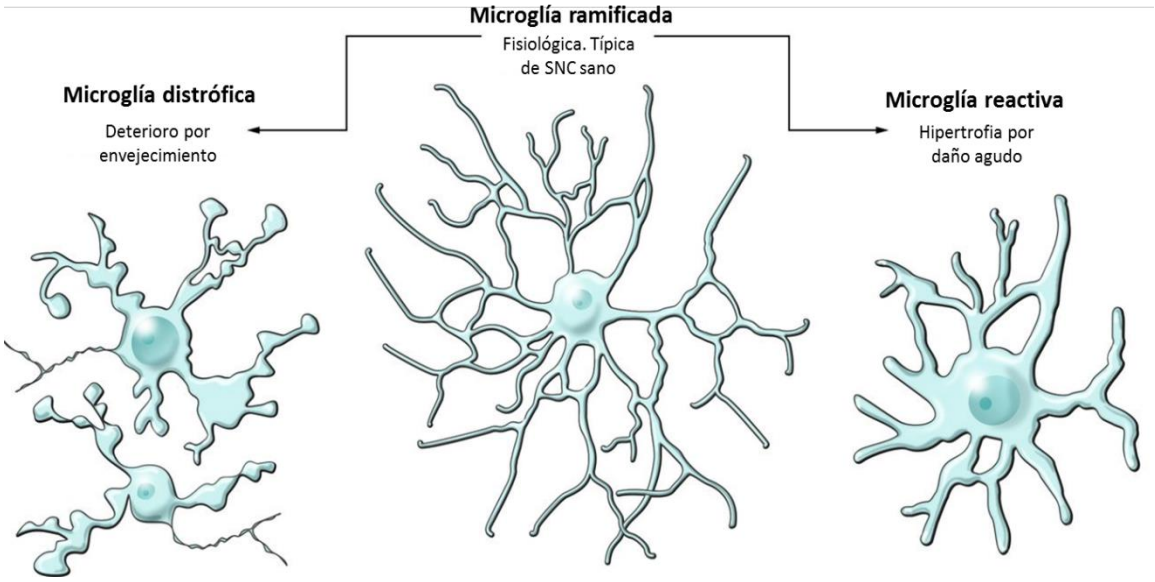


Figura 1.12. Morfología de la microglía homeostática, activada y distrófica. La microglía refleja su respuesta al medio ambiente en parte a través de su morfología. Aunque las variaciones morfológicas no reflejan exactamente la funcionalidad, disfunción o expresión de ARN, muestra que la célula está respondiendo a alteraciones en la homeostasis. El esquema presenta tres estados de morfología microglial: microglía ramificada (fisiológica u homeostática) típica de un SNC sano; microglía reactiva o activada, característica en situaciones de daño cerebral o patologías; y microglía distrófica, como se observa en el envejecimiento del cerebro particularmente en el contexto de la neurodegeneración. Tomado y modificado de Ransohoff, 2016.

Tradicionalmente, y en base a los macrófagos periféricos, se había considerado que la microglía activada puede presentar dos fenotipos funcionales, los denominados M1 (pro-inflamatorio) y M2 (anti-inflamatorio) (Latta et al., 2015; Colonna and Butovsky, 2017). Esta clasificación está lejos de la realidad y no engloba todos los fenotipos potenciales de la microglía activada. Recientemente, los estudios transcriptómicos han identificado un fenotipo microglial con un perfil de expresión génica común en diversos procesos neurodegenerativos y que ha sido denominado con el término **DAM** (del inglés *disease-associated microglia* o microglía asociada

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

a enfermedad) (Keren-Shaul et al., 2017; Song and Colonna, 2018), o también MgND (del inglés *microglia neurodegenerative phenotype*) (Krasemann et al., 2017). La microglía DAM se caracteriza por el aumento de expresión en genes tales como *APOE, TREM2, DAP12, ITGAX, AXL, CLEC7A, LGALS3, CD11C, CST7, SPP1 Y GPNMB* y la disminución en genes propios de la microglía homeostática como *TMEM119, P2RY12 Y CX3CR1* (revisado en Deczkowska et al., 2018; Stratoulias et al., 2019). El principal factor implicado en el paso de la microglía hacia un fenotipo DAM es TREM2 (**Fig. 1.13**). Se trata de un receptor de membrana que se expresa en las células de origen mieloide, como las células microgliales, y que gracias a la unión con su activador DAP12, activaría cascadas de señalización que promueven activación, quimiotaxis, fagocitosis, supervivencia y proliferación celular. El proceso de activación microglial no se conoce aún con detalle, pero sí que consta de dos etapas y que está mediado por los genes TREM2-APOE (Keren-Shaul et al., 2017; Rasmussen et al., 2018; Song and Colonna 2018).

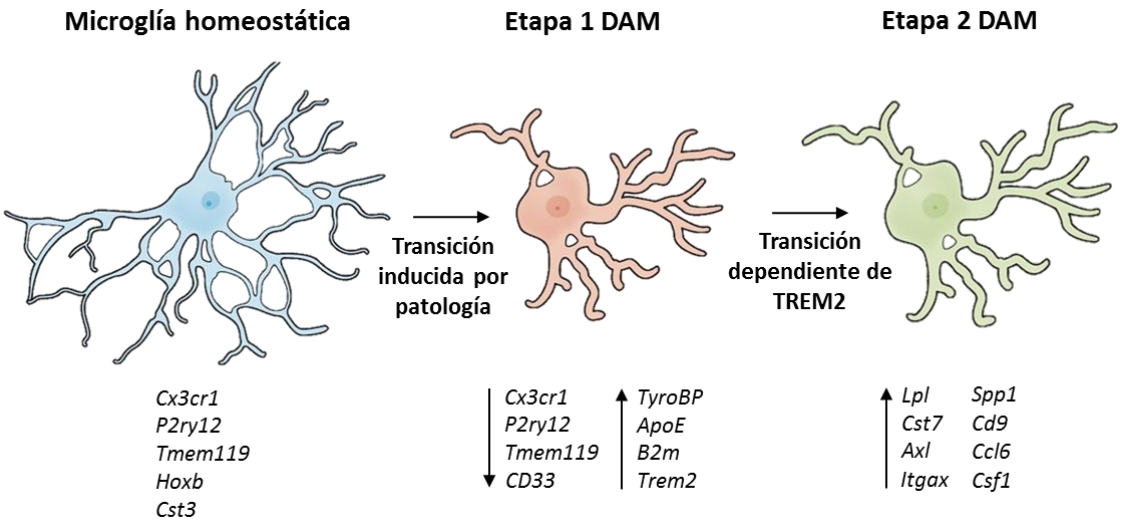


Figura 1.13. Activación microglial y fenotipo DAM. Esquema que ilustra el paso desde microglía homeostática al estado 1 DAM (independiente de Trem2) y posteriormente al estado 2 DAM (dependiente de Trem2) en el contexto patológico de la EA. El perfil génico permite diferenciar la firma molecular que define a los diferentes estados de la activación microglial**.** Modificado de Brown and St George-Hyslop, 2017.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

1.5.2. ASTROGLÍA

Las células astrogliales son el grupo de células gliales más abundantes en el SNC (aproximadamente el 35%) y participan en la respuesta neuroinflamatoria. Tienen su origen en el neuroectodermo y, aunque morfológicamente presentan gran heterogeneidad, en general poseen una forma estrellada con numerosas prolongaciones que conectan vasos sanguíneos, neuronas, microglía, oligodendrocitos y otros astrocitos entre sí, siendo claves en la homeostasis cerebral (Sofroniew and Vinters, 2010; Khakh and Deneen, 2019; Trujillo-Estrada et al., 2019).

Estas células se caracterizan por la expresión de la proteína glial fibrilar acídica (GFAP, del inglés *glial fibrilar acidic protein*) perteneciente al grupo de proteínas del citoesqueleto conocidas como filamentos intermedios (Osborn et al., 2016). En condiciones fisiológicas, las funciones de los astrocitos (**Fig. 1.14**) abarcan desde el mantenimiento de la homeostasis neuronal (proporcionando factores tróficos y otros elementos necesarios para el metabolismo celular), a proteger del estrés oxidativo, mantener el equilibrio salino del parénquima, eliminar residuos y toxinas y participar en la reparación y procesos de cicatrización del SNC (Liu et al., 2014). Los astrocitos intervienen también en la regulación sináptica participando de la sinapsis tripartita (Deemyad et al., 2018); en su membrana presentan transportadores de ácido gamma-aminobutírico (GABA) y de glutamato para retirar el exceso de neurotransmisores del espacio extracelular. Los pies astrocitarios rodean el 90% de los vasos sanguíneos cerebrales, siendo partícipes del mantenimiento y formación de la barrera hematoencefálica (Sofroniew and Vinters, 2010; Herndon et al., 2017; Perez-Nievas and Serrano-Pozo, 2018).

En la EA y otras enfermedades neurodegenerativas los astrocitos se activan al igual que ocurre con la microglía, sufriendo una serie de cambios morfológicos y funcionales (revisado en Perez-Nievas and Serrano-Pozo, 2018; Arranz and De Stropper, 2019). La reactividad astroglial va acompañada de un aumento de proteínas como GFAP, Vimentina y Nestina (Liddelow and Barres, 2017), hipertrofia del cuerpo celular y engrosamiento de las prolongaciones que son dirigidas hacia la zona lesionada. Toda esta activación ocurre gracias a la acción de citoquinas proinflamatorias secretadas por las células microgliales y por los propios astrocitos (Osborn et al., 2016; Liddelow et al., 2017). El concepto actual es que en la EA los astrocitos reactivos adquieren propiedades neurotóxicas, probablemente debido tanto a una ganancia de la función tóxica como a una pérdida de sus efectos neuroprotectores. Sin embargo, la diversidad y complejidad de la reactividad astroglial aún no se conoce, y probablemente será tan heterogénea como la de la microglía.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

La localización de astrocitos reactivos alrededor de las placas amiloides sugiere que el Aβ podría desencadenar activación astroglial y provocar la secreción de citoquinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno con efectos citotóxicos (Medeiros and LaFerla, 2013; Rodríguez-Arellano et al., 2016). Por otro lado, existen estudios que corroboran el papel neuroprotector que realizan estas células (Katsouri et al., 2019), aislando el Aβ y participando en su degradación por fagocitosis y en su drenaje al sistema circulatorio a través de los vasos linfáticos (Domínguez-Prieto et al., 2018). Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que los astrocitos reactivos fagocitan neuritas distróficas (la mayoría, elementos presinápticos aberrantes) localizadas en la periferia de las placas neuríticas (Gomez-Arboledas et al., 2018).

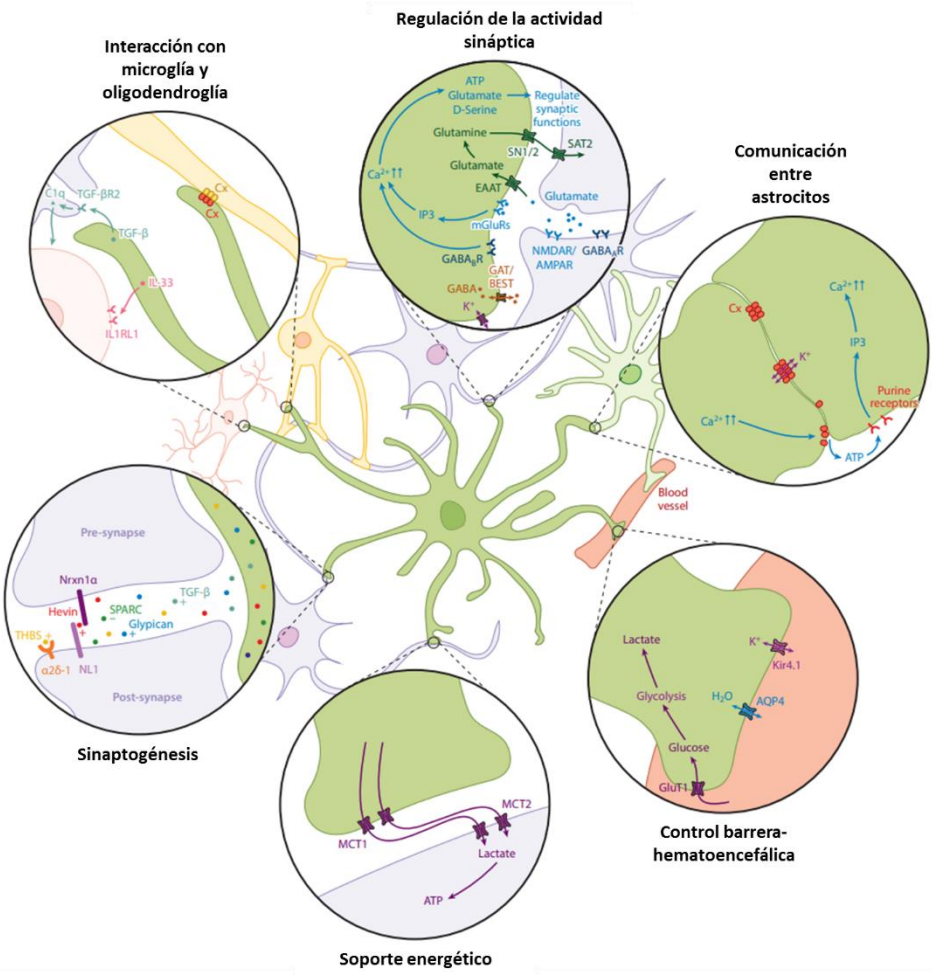


Figura 1.14. Funciones de los astrocitos en el sistema nervioso central. Los astrocitos forman parte de las sinapsis tripartitas e influyen en la actividad sináptica. Además de su interacción y comunicación con las neuronas, los astrocitos se interrelacionan a través de uniones breves, modulan la barrera hematoencefálica, mantienen la homeostasis energética y también interactúan con otros tipos de células del SNC como los oligodendrocitos y las células microgliales. Modificado de Khakh and Deneen, 2019.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

El perfil neurotóxico y/o neuroprotector de los astrocitos reactivos sugiere la existencia de subtipos funcionales, similar a la microglía activada. En este sentido, estudios transcriptómicos recientes han revelado que en un contexto neuroinflamatorio o en condiciones de isquemia los astrocitos reactivos derivan hacia fenotipos funcionales específicos, denominados A1 y A2 (revisado en Liddelow and Barres, 2017, Liddelow et al., 2020, Vainchtein and Molofsky, 2020). Los astrocitos ''A1'', inducidos en situación de choque-séptico, se caracterizan por la expresión de genes de la cascada del complemento asociados con la eliminación de sinapsis siendo catalogados como neurotóxicos. Sin embargo, los astrocitos ''A2'' inducidos en situación de isquemia tienen un programa genético definido por la expresión de factores neurotróficos que promueven la supervivencia y crecimiento de las neuronas, y por tanto se considera un subtipo astroglial neuroprotector. Es destacable que la adquisición del fenotipo A1 depende, en cierta medida, de la interacción con la microglía (Fig. 1.15) y se modula por la presencia de ApoE4 (Shi et al., 2017). Muy probablemente esta división binaria en dos fenotipos astrogliales contrapuestos sea una simplificación y no represente la realidad y complejidad funcional de los astrocitos reactivos. Un reciente estudio determinó que al igual que ocurre con la microglía, existen subpoblaciones astrocitarias asociadas a situaciones patológicas (DAA, del inglés *disease associated astrocytes*) con un perfil molecular y génico característico (Habib et al., 2020).

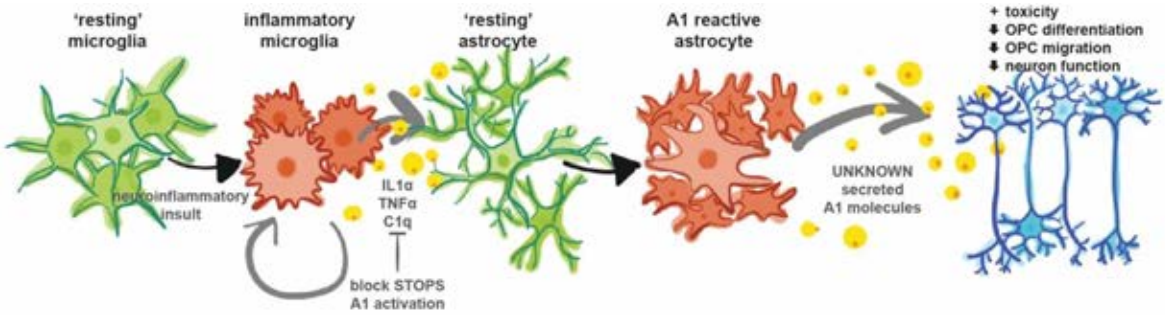


Figura 1.15. Los astrocitos reactivos neurotóxicos son inducidos por microglía activada. En respuesta a una amplia gama de afecciones neuroinflamatorias y genéticas, la microglía libera interleucina-1 alfa (IL1α), factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) y el componente del complemento C1q. Estos tres factores son suficientes y necesarios para conducir a los astrocitos hacia un fenotipo neurotóxico 'A1'. Los astrocitos A1 pierden la mayoría de sus funciones fisiológicas (producción y mantenimiento de sinapsis, poda correcta de sinapsis, etc.), y se vuelven altamente neurotóxicos, matando neuronas y oligodendrocitos maduros. Tomado de *Stanford (University Office of Technology Licensing).*

Con respecto a las taupatías, el plegamiento alternativo de la proteína tau es suficiente para inducir cambios morfológicos en los astrocitos que afecten a su papel fisiológico. Así, adquieren un perfil inflamatorio, como lo indica la regulación positiva de GFAP y la secreción de factores proinflamatorios, que contribuyen a la patogénesis. Los oligómeros de tau colocalizan con los astrocitos reactivos en los cerebros de pacientes y modelos animales (Nilson et al., 2017)

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

y en los modelos de taupatía pura la astrogliosis aumenta proporcionalmente a la presencia de fosfo-tau (revisado en Leyns and Holtzman, 2017; Laurent et al., 2018). Se sabe que los astrocitos tienen capacidad para fagocitar tanto monómeros como oligómeros (Stoica et al., 2018; Perea et al., 2019), pero el envejecimiento y la propia patología causan la aparición de disfunciones que comprometen su función neuroprotectora (Sidoryk-Wegrzynowicz et al., 2017).

Las inclusiones astrocíticas y la agregación de tau en los astrocitos son sellos patológicos de algunas taupatías puras como la PSP y CBD (Guo et al., 2017), provocando la degeneración del astrocito comprometiendo la estabilidad de la barrera hematoencefálica y la entrada al parénquima de más moléculas proinflamatorias que potenciarían la respuesta glial (Matias et al., 2019; Vogels et al., 2019). En general, aún son necesarios más estudios que profundicen en las astrogliopatías asociadas a tau.

1.6. MODELOS TRANSGÉNICOS DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Hasta la fecha se han desarrollado casi 180 modelos transgénicos/*knock-in*/*knock-out* de la enfermedad de Alzheimer (*ALZFORUM Research Models Database; https: //www.alzforum.org/research-models*) que expresan principalmente mutaciones de genes humanos asociados con el desarrollo o con el riesgo de padecer esta enfermedad (*APP, PSEN1, PSEN2, MAPT, TREM2, APOE y BACE1*), solos o en combinación entre sí. Con la excepción de Trem2, receptor de superficie celular presente en la microglía y que regula la respuesta del sistema inmune innato al β-amiloide (Ulrich et al., 2017; Yeh et al., 2017), las mutaciones genéticas introducidas en estos modelos se centran en las dos características histopatológicas principales que definen esta enfermedad fundamentalmente en la patología amiloide, y en mucha menor medida, en la patología tau (revisado en Mullane and Williams, 2013; Amram and Frenkel, 2017; Sasaguri et al., 2017; Myers and McGonigle, 2019; Kosel et al., 2020).

El conocimiento de los mecanismos patogénicos que subyacen a la EA ha progresado notablemente en gran medida gracias al uso de estos modelos animales (LaFerla and Green, 2012). No obstante, ninguno de ellos reproduce todos los rasgos patológicos propios de los pacientes, uno de los motivos del continuo fracaso en la traslación de la investigación preclínica a la clínica humana. Por ello, el avance terapéutico pasa por la generación y caracterización de buenos modelos animales que consigan mimetizar todos los eventos patológicos de la enfermedad para poder identificar biomarcadores y dianas terapéuticas de interés clínico, así como realizar estudios preclínicos de alto valor predictivo. A continuación, se describen algunos de los modelos transgénicos murinos más representativos.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

1.6.1. MODELOS TRANSGÉNICOS CON PATOLOGÍA AMILOIDE

El descubrimiento de las mutaciones implicadas en las formas familiares de la EA permitió la generación de modelos murinos basados en la sobreexpresión de genes humanos portadores de tales mutaciones bajo el control de promotores específicos. El primero de estos modelos fue el PDAPP (Games et al., 1995), portador del transgén humano para APP con la mutación *Indiana* (V717F) bajo el control del promotor PGDF (del inglés *plateled-derived growth factor*). Este modelo desarrolla placas amiloides, neuritas distróficas, pérdida sináptica y respuesta neuroinflamatoria desde los 6 meses. De forma independiente, se generó el modelo Tg2576 que sobreexpresa el transgén APP humano con la mutación *Swedish* (K670N/M671L). Los modelos basados en mutaciones en el gen de la APP desarrollan patología amiloide, aunque suelen ser de inicio tardío y presentan nula o muy escasa muerte neuronal (Elder et al., 2010; Sasaguri et al., 2017).

Al igual que los modelos transgénicos con base en mutaciones en APP, han ido apareciendo otros modelos amiloidogénicos con mutaciones en los genes de las presenilinas. Los ratones transgénicos para PS1 y PS2 muestran altos niveles de Aβ42, pero no desarrollan placas extracelulares ni astrogliosis (Borchelt et al., 1997; Elder et al., 2010). Aún no está claro por qué el Aβ no se agrega como en los modelos de APP o en pacientes, pero posiblemente esté relacionado con las diferentes propiedades de agregación del péptido Aβ murino y humano (Jankowsky and Zheng, 2017). Mediante combinación de modelos monogénicos, surgen los modelos dobles transgénicos (o bigénicos), los cuales presentan dos genes con una o más mutaciones que permiten desencadenar la patología. Uno de los primeros modelos bigénicos descrito fue el modelo APP/PS1 que sobreexpresa las proteínas APP y PS1 mutadas (mutaciones S*wedish* y M146L, respectivamente) (Holcomb et al., 1998). Otro modelo más reciente, y ampliamente utilizado, es el ratón 5xFAD (Oakley et al., 2006) que presenta en total cinco mutaciones, dos en el transgén para PS1 (M146L y L286V) y tres en APP (*Swedish, Florida* y *London*).

En este trabajo, hemos empleado el modelo amiloidogénico doble transgénico APP_{751SL}/$PS1_{M146L}$. Este modelo sobreexpresa el gen humano PS1 con la mutación M146L bajo el control del promotor HMG-CoA reductasa junto con la isoforma 751 de la APP humana con las mutaciones *Swedish* y *London* bajo el control del promotor Thy-1 (Blanchard et al., 2003). Estos ratones desarrollan placas extracelulares de Aβ desde los 3-4 meses de edad, localizándose en mayor medida en las regiones de la corteza entorrinal, subículo e hipocampo (Ramos et al., 2006; Caballero et al., 2007; Moreno-Gonzalez et al., 2009; Trujillo-Estrada et al., 2014). Desarrollan, además, una fuerte respuesta microglial y astroglial desde edades tempranas (4-6 meses) junto con una marcada patología neurítica principalmente de origen presináptico/axonal

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

(Sanchez-Varo et al., 2012; Trujillo-Estrada et al., 2014) y que está acompañada de la alteración de los sistemas de proteólisis intracelular dependientes de lisosomas y proteosoma (Torres et al., 2012). Presenta proteína tau hiperfosforilada en el interior de las neuritas distróficas, pero no formación de NFTs (Jimenez et al., 2008; Moreno-Gonzalez et al., 2009; Trujillo-Estrada et al., 2014). Una de las principales ventajas de este modelo animal es que posee muerte neuronal selectiva (interneuronas GABAérgicas) desde los 4-6 meses de edad, a la par que una pérdida de neuronas piramidales (Ramos et al., 2006; Moreno-Gonzalez et al., 2009; Baglietto-Vargas et al., 2010; Trujillo-Estrada et al., 2014; Sanchez-Mejias et al., 2019). La pérdida neuronal es una de las características más notables de la EA que no es reproducida por la mayoría de modelos actuales. A nivel cognitivo, este modelo presenta también deterioro del aprendizaje, memoria espacial y memoria de trabajo entre los 6-9 meses de edad (Trujillo-Estrada et al., 2013).

1.6.2. MODELOS TRANSGÉNICOS CON PATOLOGÍA TAU

A pesar de ser una taupatía, aún no se han descrito mutaciones de tau directamente asociadas con el desarrollo de la EA, y aunque los modelos de amiloidosis en general presentan fosfo-tau, no llegan a reproducir la formación de NFTs. Por tanto, es evidente la necesidad de emplear modelos de taupatía pura para estudiar este componente de la enfermedad.

La secuencia de la proteína tau murina presenta una alta homología (89-92%) con la proteína humana y su biología es similar (Hernández et al., 2020). Inicialmente, para el estudio de las taupatías se utilizaron modelos transgénicos murinos que expresaban isoformas 4R y 3R humanas. Estos modelos reproducían algunos aspectos de la patología, pero no presentaban NFTs, ni siquiera a edades avanzadas. No fue hasta la identificación de mutaciones de *MAPT* asociadas a la demencia frontotemporal con parkinsonismo (FTDP-17) que se generaron los primeros modelos capaces de formar ovillos. Estos modelos fueron obtenidos gracias a la introducción del transgén de tau humano con la mutación P301L (Götz et al. 2001). Desde entonces se han ido generando diversos modelos, que además de NFTs, presentan neuroinflamación, pérdida sináptica y neuronal y daños cognitivos, junto a frecuentes fallos motores (Jankowsky and Zheng, 2017).

Una de las líneas transgénicas más usadas es PS19, que presenta el transgén de la isoforma 1N/4R de tau humano con la mutación P301S, bajo el control del promotor de la proteína priónica (Prnp). Estos animales desarrollan pérdida neuronal y atrofia cerebral a partir de los 8 meses, principalmente en el hipocampo, pero se extienden a otras regiones del cerebro, incluidas la neocorteza y la corteza entorrinal. Desde edades tempranas muestran agregación de tau hiperfosforilado similar a los NFTs humanos en la neocorteza, la amígdala, el hipocampo, el tronco encefálico y la médula espinal (Yoshiyama et al., 2007). Desde el punto de vista conductual, los ratones PS19 muestran signos de deterioro cognitivo asociado con la edad,

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

incluidos déficits selectivos en el aprendizaje y la memoria espacial detectables con la prueba del laberinto acuático de Morris (Takeuchi et al., 2011). Otras anormalidades conductuales asociadas con la edad incluyen retracción de las extremidades cuando se les levanta por la cola, seguidas de debilitamiento. Estos déficits motores progresan hasta desembocar en parálisis entre los 7-10 meses, asociados con una postura encorvada y dificultades en la alimentación. Aproximadamente, el 80 por ciento de la mortalidad ocurre a los 12 meses en los ratones de fondo mixto, con una supervivencia media de 9 meses (Yoshiyama et al., 2007).

Otro modelo interesante para el estudio de la agregación de la proteína tau es el ratón ThyTau22. Este modelo expresa la isoforma 4R de la proteína tau humana mutada en las posiciones G272V y P301S, cuya expresión se encuentra regulada bajo el promotor Thy1.2 (Schindowski et al. 2006). Presentan fosfo-tau y NFTs desde edades tempranas. Una particularidad es que no desarrolla problemas motores (a diferencia del resto de modelos transgénicos de tau) permitiendo el estudio conductual y la determinación de déficits en el aprendizaje espacial, social y contextual que no se pueden atribuir a una discapacidad neuromotora. En este modelo, la memoria no espacial se encuentra afectada a los 6 meses, mientras que los déficits en memoria espacial aparecen desde los 9 meses (Van der Jeugd et al., 2013). También se ha observado una respuesta del apetito deteriorada (Lo et al., 2013).

En contraste con los estudios sobre la respuesta inflamatoria en modelos amiloidogénicos, la neuroinflamación asociada a la patología tau ha sido poco caracterizada. En el presente trabajo de Tesis Doctoral hemos utilizado estos dos últimos modelos de la patología tau, el P301S (línea PS19) y el ThyTau22, con objeto de profundizar en el análisis de la reactividad microglial y astroglial durante la progresión de la patología.

1.6.3. MODELOS TRANSGÉNICOS CON PATOLOGÍA AMILOIDE Y PATOLOGÍA TAU

En la enfermedad de Alzheimer, las patologías amiloide y tau coexisten y están relacionadas entre sí. Sin embargo, los modelos amiloidogénicos no forman NFTs, y los modelos de taupatía no desarrollan placas amiloides. Por tanto, de ahí surge la necesidad de generar modelos bigénicos (APP/tau) y trigénicos (APP/PS1/tau). Aunque existen algunos modelos bigénicos (Lewis et al., 2001; Ribé et al., 2005; Lippi et al., 2018), son los trigénicos los modelos más utilizados para el estudio de ambas patologías.

El primero y de uso más extendido en la actualidad es el 3xTg-AD (Oddo et al., 2003), con mutaciones en APP (mutación *Swedish* KM670/671NL), PS1 (M146V) y Tau (P301L) y cuya expresión se encuentra regulada por el promotor Thy-1. Se trata del primer modelo capaz de

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

desarrollar tanto patología amiloide como NFTs. Acompañando a la patología proteica, presentan una abundante pérdida sináptica, sin llegar a desarrollar muerte neuronal. Además, a partir de los 3-5 meses de edad, presenta daños cognitivos. Existen otros modelos trigénicos como el PS1xAPPxTau, que expresa APP_{751SL}, $PS1_{M146L}$ y la proteína tau humana no mutada. Este modelo acumula proteína tau en el compartimento somatodendrítico y neuritas distróficas positivas para fosfo-tau, pero sin llegar a formar NFTs (Boutajangout et al., 2004).

1.6.4. MODELOS ANIMALES DE LAS FORMAS ESPORÁDICAS DE LA EA

Más del 97% de los casos de EA son de origen esporádico, siendo la edad el principal factor de riesgo. Se desconocen las causas del inicio y progresión de la EA esporádica, aunque está claro que la patología cerebral comienza 20-30 años antes de la aparición de los primeros síntomas. Es probable que la progresión esté influenciada por factores de riesgo genético (siendo los más importantes APOE4 y Trem2) y por otros asociados con el estilo de vida, principalmente factores de tipo vascular o el sexo (Mauvais-Jarvis et al., 2020). En los últimos años, y con la idea de desarrollar modelos de la forma esporádica de la EA, se han utilizado diversas técnicas para generar un nivel de expresión más realista tanto de APP como de tau, y para evitar la alteración de locus genómicos desconocidos (revisado en Onos et al., 2016). Quizás debido a la falta de sobrexpresión de APP y/o de tau, y de la corta vida media de los ratones, estos modelos han mostrado fenotipos patológicos relativamente leves (Malthankar-Phatak et al., 2012; Iqbal et al., 2013; Saito et al., 2014). En la actualidad se están desarrollando nuevos modelos esporádicos de la EA con objeto de que mimeticen más fielmente la patología de los pacientes (más información en https://www.alzforum.org/news/research-news/building-better-mouse-models-late-onset alzheimers).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

1.7. EL HIPOCAMPO Y LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

El hipocampo es una de las primeras regiones cerebrales afectadas por el proceso neurodegenerativo en la EA. En lo que concierne a la patología de tau, la acumulación de NFTs en esta región (concretamente en CA1) comienza, y se expande, durante los estadios Braak II-III (Braak and Braak, 1991; Braak et al., 2006). A nivel anatómico se encuentra dentro de la formación hipocampal, en el lóbulo temporal medial, y funcionalmente constituye una región fundamental en los procesos de memoria y aprendizaje.

1.7.1. LA FORMACIÓN HIPOCAMPAL

La formación hipocampal se define como el conjunto del hipocampo propio (HP) o *cornu ammonis* (CA1, CA2, CA3 y CA4 (esta última no existe en ratón)), el giro dentado (GD) y el subículo, constituyendo la alocorteza de Brodmann (revisado en Andersen et al., 2007; van der Strien et al., 2009; Mai and Paxinos, 2012). El término hipocampo tradicionalmente se emplea para hacer referencia al conjunto de hipocampo propio y giro dentado, denominación que usaremos en este trabajo. Tanto el hipocampo propio como el giro dentado presentan tres capas bien diferenciadas, lo cual es característico de la arquicorteza (revisado en Andersen et al., 2007; Booker and Vida, 2018): La capa externa del HP tiene dos estratos, en los cuales se sitúan y ramifican las dendritas apicales de las neuronas principales, el estrato radiado (*stratum radiatum,* sr) y el estrato lacunoso-molecular (*stratum lacunoso moleculare,* slm). En el GD, esta capa recibe el nombre de estrato molecular (m), y contiene axones aferentes, así como las dendritas de las células granulares y del hilio. La capa media contiene los somas de las neuronas principales, denominándose estrato piramidal (*stratum piramidale*, sp) en el HP, y capa granular (g) en el GD. Por último, en la capa interna, denominada estrato oriens (*stratum oriens*, so) en el HP, se encuentran las dendritas basales de las neuronas piramidales. En el GD encontramos el hilio (h), también denominada capa polimórfica o multiforme, que contiene los axones de las células granulares y otras neuronas intrínsecas. El *alveus* (al) constituye la parte más interna del hipocampo y es una capa de fibras compuesta por los axones mielínicos de los somas neuronales del hipocampo y del subículo. El alveus se continúa con la fimbria, que luego constituye el fórnix, principal vía de conexión entre el hipocampo y otras estructuras cerebrales. El subículo, área de transición entre el hipocampo y la corteza entorrinal (CE), consta también de tres capas (Witter and Amaral, 2004): La capa molecular (externa), que se continúa con la capa externa de CA1 (slm y sr), la capa media de células piramidales, y la capa interna o polimórfica.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

1.7.2. TIPOS CELULARES EN EL HIPOCAMPO

A grandes rasgos, las neuronas hipocampales pueden ser clasificadas en dos grupos, atendiendo a si liberan glutamato o GABA (revisado en Freund and Buzsáki, 1998; Wheeler et al., 2015): 1) Las neuronas **principales** (glutamatérgicas, de naturaleza excitatoria, proyecciones de largo alcance) representadas por las células piramidales del HP y las células granulares del GD, y 2) las **interneuronas** (GABAérgicas, de naturaleza inhibidora, proyección local), que constituyen una población altamente heterogénea y que pueden clasificarse según distintos factores como su contenido neuroquímico, patrones morfológicos y de inervación, entre otros. Por su interés en el presente trabajo, en base a su relevancia funcional, así como a su vulnerabilidad diferencial en los pacientes de EA, nos referiremos brevemente a dos subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas: aquellas que expresan el neuropéptido Somatostatina (SOM), y las que contienen la proteína ligadora de calcio Parvalbúmina (PV). Las primeras, son células en candelabro que realizan inhibición dendrítica a nivel distal en las neuronas principales, mientras que las que contienen PV (células en cesto) inervan la región perisomática de estas neuronas.

1.7.3. CONEXIONES HIPOCAMPALES

1.7.3.1. Conexiones intrínsecas

La CE es la principal fuente de aferencias corticales al hipocampo (Andersen et al., 2007; van der Strien et al., 2009; Knierim, 2015), siendo especialmente relevantes las conexiones con el GD mediante la vía perforante (**Fig. 1.16**), que constituyen el primer tramo del "circuito trisináptico". Así, este circuito conecta en primer lugar con las neuronas de la capa granular. Estas células forman haces colaterales en el hilio, conocidos como fibras musgosas (*mossy fibers*), que establecen sinapsis con las dendritas proximales de las células piramidales de CA3. La capa donde se dan estas sinapsis, justo en la parte superior de la capa piramidal, se conoce como estrato lúcido (*stratum lucidum*, sl). A su vez, CA3 proyecta hacia la región CA1 a través de la vía colateral de Schaffer. El circuito se cierra con las proyecciones de CA1 que alcanzan la CE, bien directamente, o bien a través del subículo (Andersen et al., 2007). Aunque el circuito se explica con esta secuencia de conexiones básica, lo cierto es que existen varios circuitos solapados. Por ejemplo, los axones de CA3 también envían colaterales que contactan con otras neuronas de CA3 (haz longitudinal de asociación), y existen conexiones directas entre la CE y CA3, haciendo del hipocampo una región mucho más compleja (revisado en van der Strien et al., 2009).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

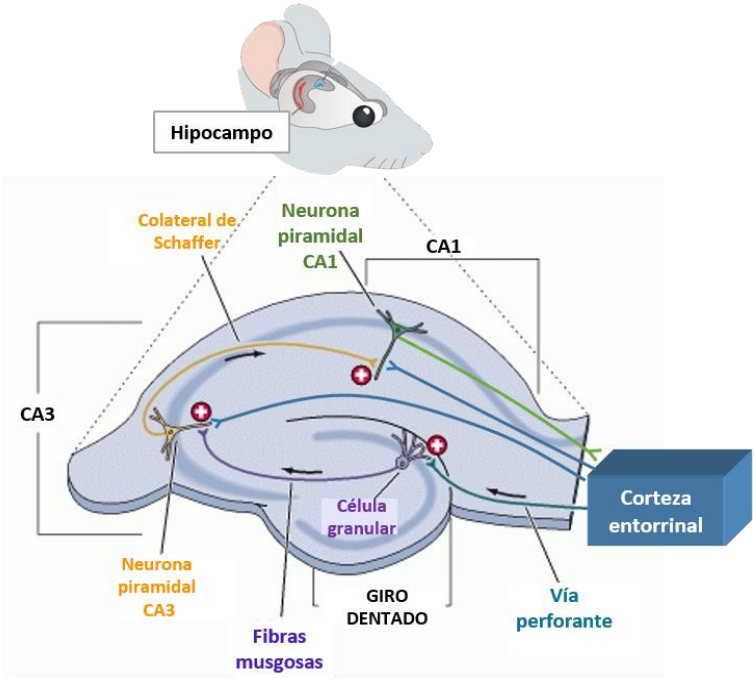


Figura 1.16. Esquema básico del circuito trisináptico. Las neuronas de la capa II de la corteza entorrinal (CE) proyectan al GD y CA3 a través de la vía perforante (azul). Las neuronas de capa III de la CE proyectan hacia CA1 y el subículo a través de la vía perforante y alvear (azul). Las células granulares del GD contactan con CA3 a través de las proyecciones de las fibras musgosas (morado). Las neuronas piramidales de CA3 conectan con CA1 a través de las colaterales de Schaffer (amarillo). Las neuronas piramidales de CA1 mandan proyecciones a la CE directamente o a través del subículo (verde).

1.7.3.2. Aferencias y eferencias hipocampales

Además de la vía perforante, la vía alvear (a través del *alveus*) constituye una importante ruta de conexión de la CE con CA1. Los axones se desvían del *alveus*, atraviesan la capa piramidal y hacen contacto con las neuronas principales en el slm de CA1 y CA3. Dependiendo de si proceden de la corteza entorrinal lateral (CEL) o medial (CEM), las aferencias tendrán una distribución topográfica concreta en el hipocampo. Así, las proyecciones hacia CA1 están segregadas, de manera que la parte de CA1 más cercana al subículo recibe entradas de la CEL. Otras fuentes de entrada de información cortical de relevancia son las cortezas perirrinal y posrinal.

El hipocampo también recibe aferencias de tipo colinérgico de las neuronas del encéfalo basal anterior, que proceden del *septum* y del núcleo vertical de la banda diagonal de Broca (Schäfer et al., 1998). Estas proyecciones regulan la actividad hipocampal desempeñando un papel esencial en los procesos de aprendizaje y memoria (Mesulam, 2004). Por otro lado, el hipocampo recibe conexiones provenientes de la amígdala (Yang and Wang, 2017), así como aferencias catecolaminérgicas de terminales noradrenérgicos provenientes del *locus coeruleus*. La afectación de todas estas vías en la EA está bien documentada (Castellani et al., 2010; Kelly et al., 2017).

Las proyecciones eferentes se originan mayoritariamente en el subículo y, en menor medida, en el HP. Existen eferencias que, partiendo del *alveus* (vía fórnix), se dirigen al hipocampo contralateral, llegando a través de la comisura hipocampal, que es la vía principal de comunicación entre el hipocampo y el resto de regiones cerebrales. La mayor parte de esas

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

proyecciones acaban en el núcleo mamilar medial; otras llegan hasta el hipotálamo y tálamo. Existen más proyecciones desde el subículo que se dirigen a la CE, el *septum* lateral, la corteza cingulada y la amígdala (Andersen, 2007; Mai and Paxinos, 2012; Knierim, 2015; Hannula and Duff, 2017).

1.8. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer, para la que aún no existe cura, es la principal causa de demencia y de discapacidad en personas mayores de 65 años. Esta enfermedad constituye un problema socio-sanitario de extraordinarias dimensiones con más de 50 millones de afectados a nivel mundial. En España, existen unas 800.000 personas diagnosticadas, con unos 3,5 millones de familiares y profesionales de la salud implicados. El cuidado y atención constante que requieren los pacientes recae principalmente sobre los familiares, quienes sufren estrés (75%), depresión (50%) y pérdidas económicas por reducción de la jornada laboral. El progresivo aumento de casos debido al envejecimiento poblacional, junto con la ausencia de terapias farmacológicas efectivas, hacen de esta enfermedad neurodegenerativa uno de los desafíos biomédicos y socioeconómicos más urgentes de nuestra sociedad (Sasaguri et al., 2017; Nichols et al., 2019).

Las terapias farmacológicas disponibles en la actualidad son exclusivamente de carácter sintomático y solo producen una pequeña mejoría temporal a nivel cognitivo, pero no modifican el avance de la patología (revisado en Long and Holtzman, 2019). Existen cuatro fármacos aprobados para el tratamiento de la EA, todos moduladores de sistemas de neurotransmisión: tres de ellos son inhibidores de la colinesterasa (Donepezilo, Rivastigmina y Galantamina) y el cuarto es un antagonista de los receptores de NMDA (N-metil-D-aspártico) de glutamato (Memantina). El cerebro de los pacientes de EA presenta bajos niveles de acetilcolina y pérdida de neuronas colinérgicas (hipótesis colinérgica). Los inhibidores de la colinesterasa, al actuar sobre la degradación de la acetilcolina, restablecen la función colinérgica. Los receptores NMDA se activan de manera excesiva y continua en la EA, lo que puede conducir a trastornos de la memoria mediante mecanismos excitotóxicos. La Memantina suprime esta sobreactivación de la transmisión glutamatérgica y mejora la función cognitiva. Todos los tratamientos descritos tienen asociadas desventajas importantes, ya que producen efectos secundarios mientras que su efecto es solo sintomático y no dura más que algunos meses (Birks, 2006).

Desde el año 2003 no se ha aprobado ningún tratamiento nuevo para la EA. A pesar de la gran cantidad de ensayos clínicos en marcha (revisado en Cummings et al., 2020) no se ha

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

encontrado ningún tratamiento modificador de la patología, es decir, que detenga o retrase el curso de la EA de manera eficaz. Parte del problema viene dado por el elevado número de factores que intervienen, sumado a la propia complejidad del cerebro humano. La falta de modelos animales que recapitulen todos los eventos patológicos de la patología humana y de biomarcadores fiables contribuye también a este fracaso terapéutico. Muchas de las estrategias de tratamiento se han basado en la hipótesis amiloide teniendo como diana farmacológica (de manera directa o indirecta) al propio Aβ, aunque a lo largo de la última década se han empezado a considerar la patología de tau o el proceso inflamatorio, entre otros (**Fig. 1.17**) (revisado en Du et al., 2018).

1.8.1. ESTRATEGIAS BASADAS EN LA PATOLOGÍA AMILOIDE

Los depósitos amiloides han sido considerados durante mucho tiempo como la diana principal para el tratamiento de la EA. Tanto es así, que la hipótesis amiloide ha dominado la investigación en nuevos medicamentos desde hace más de 20 años (Cummings et al., 2020). *A priori*, la forma más sencilla de atacar la patología de Aβ es reduciendo su producción tratando de regular la función de las enzimas secretasas implicadas. Sin embargo, estas dianas presentan problemas de seguridad al ocasionar efectos secundarios importantes, dado que estas secretasas en condiciones fisiológicas son esenciales para otras funciones y cascadas de señalización (como, por ejemplo, Notch). Más importante aún, es que en la mayoría de los casos de Alzheimer esporádico no observamos una sobreproducción de Aβ, y que también el propio péptido cumple funciones esenciales, por ejemplo, en la liberación de neurotransmisores en las sinapsis hipocampales (Abramov et al., 2009).

La eliminación de Aβ por inmunoterapia parece ser la opción alternativa más plausible (Pinheiro and Faustino, 2019; Panza et al., 2019). La primera vacuna activa, aunque en un inicio dio resultados prometedores, se suspendió al ocasionar graves efectos secundarios (Holmes et al., 2008). La inmunización pasiva tampoco ha ofrecido resultados significativos (Du et al., 2018; Nicoll et al., 2019). Al menos, los datos obtenidos de los ensayos enfocados en Aβ han permitido afianzar la hipótesis de la cascada amiloide en cuanto a que el agente iniciador de la enfermedad es el propio péptido. Sin embargo, aunque se postula como factor necesario, no parece ser suficiente para el desarrollo de la patología en etapas tardías (Musiek and Holtzman, 2015). Los ensayos de inmunoterapias en cohortes de individuos en riesgo de desarrollar síntomas de la enfermedad que han sido seleccionados por su avanzada edad, genotipo APOE4 o presencia de amiloide cerebral (Lopez-Lopez et al., 2019), o en grupos de individuos portadores de genes asociados al Alzheimer familiar como en el ensayo clínico DIAN (Bateman et al., 2017) o API (Tariot et al., 2018), son muy prometedores como estrategias preventivas.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

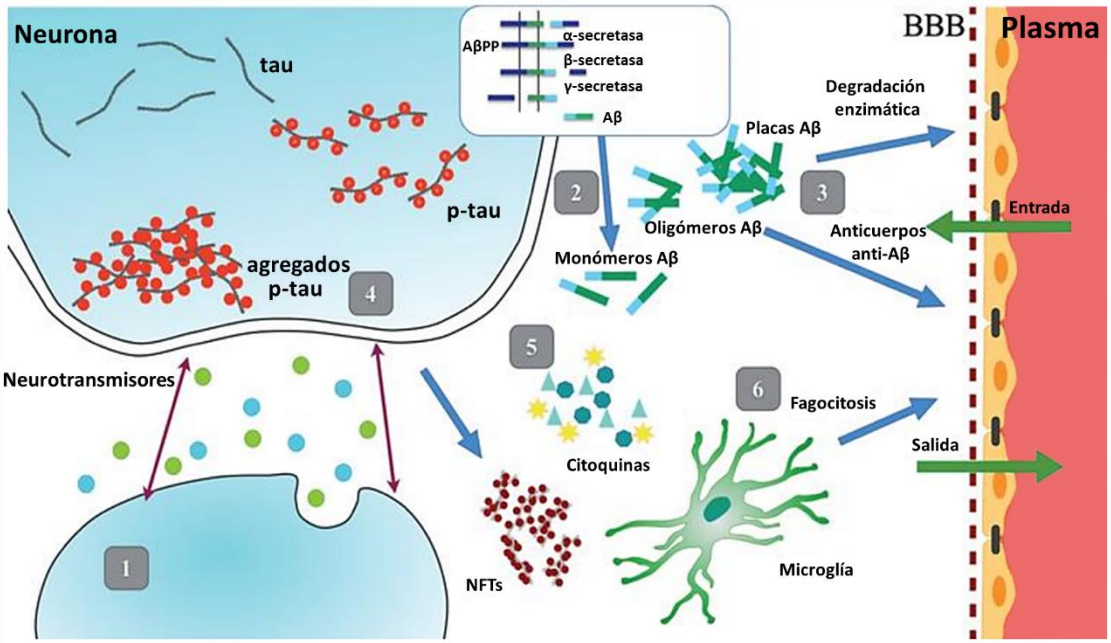


Figura 1.17. Representación esquemática de las estrategias terapéuticas en desarrollo para la enfermedad de Alzheimer. 1) Mejora de la neurotransmisión; 2) Reducción de la producción y agregación de Aβ; 3) Aumento de la eliminación/aclaramiento de Aβ; 4) Prevención de la agregación de tau; 5) Agentes anti-inflamatorios; 6) Estimulación de la fagocitosis microglial. Tomado y modificado de Elmaleh et al., 2019.

Otras estrategias pretenden evitar la agregación de los monómeros, o aumentar la actividad de las enzimas que degradan Aβ como la enzima degradadora de insulina (IDE), la nepresenilina (NEP), la enzima convertidora de endotelina (ECE), la plasmina o las metaloproteasas (revisado en Madav et al., 2019).

1.8.2. ESTRATEGIAS BASADAS EN LA PATOLOGÍA DE TAU

Después de los numerosos fracasos con los tratamientos dirigidos a la patología amiloide, se está prestando atención a la patología de tau como diana terapéutica, gracias a que los estudios de biomarcadores continúan ofreciendo datos acerca de la estrecha relación entre fosfo-tau y la progresión de la EA (Congdon and Sigurdsson, 2018; Iqbal et al., 2018; Medina, 2018; Rösler et al., 2020).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Las terapias dirigidas contra la patología de tau se clasifican en cinco tipos (**Fig. 1.18**; revisado en Wang and Mandelkow 2016):

1) **Reducción de los niveles de tau**. Debido a que los ratones KO para tau no desarrollan patología severa y que la reducción de la proteína nativa alivia la toxicidad dependiente de Aβ, la reducción de la expresión y/o producción de tau se presenta como una posible diana. Esto podría realizarse con microARNs, pequeños ARN interferentes u otros inhibidores transcriptómicos. Aunque esta aproximación no se ha probado en fases clínicas de la EA y otras taupatías, se ha usado en otras patologías como el cáncer (Wittrup and Lieberman, 2015).
2) **Inhibición de modificaciones postraduccionales de tau**. Varias terapias tienen como fin modular la fosforilación de la proteína tau, ya sea interfiriendo en la actividad de quinasas como GSK3β y Cdk5, o potenciando la actividad de fosfatasas como PP2A (Congdon and Sigurdsson, 2019). La acetilación, glicosilación y truncado de tau se barajan también como posibles dianas.
3) **Inhibidores de la agregación de tau**. Las moléculas que más prometen en este campo son el azul de metileno y la cúrcuma. El primero posee propiedades anti-agregantes *in vitro*, con efectos beneficiosos en modelos de taupatía (Panza et al., 2016). La cúrcuma posee propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias, pudiendo unirse a estructuras de hoja β y previniendo su agregación (Teter et al., 2019). Sin embargo, a día de hoy los ensayos clínicos no han arrojado resultados esperanzadores.
4) **Estabilizadores de microtúbulos**. Como ya se ha comentado, la patología de tau conduce a la desestabilización de los microtúbulos y los consecuentes fallos en el transporte axonal. Ambos procesos constituyen una buena diana terapéutica para la EA, pues se postulan como puntos de conexión entre las patologías amiloide y tau (Vossel et al., 2015; Penazzi et al., 2016). Por tanto, el restablecimiento de las funciones de tau en este sentido está en el punto de mira de los investigadores. Dos estabilizadores de microtúbulos empleados actualmente como agentes antifúngicos y antitumorales han entrado en ensayos clínicos en los últimos años: epotilona D (EpoD) y davunetide. En modelos de taupatía se ha comprobado la capacidad de estas moléculas de restablecer la integridad microtubular y disminuir los efectos negativos de la pérdida de función de tau (revisado en Cao et al., 2018; Duggal and Mehan, 2019). En concreto, la EpoD ha demostrado capacidad para reducir la patología axonal, la pérdida sináptica y los daños cognitivos en modelos de taupatía (Brunden et al., 2010; Zhang et al., 2012). Además, este compuesto posee alta capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica y menos toxicidad que sus compañeros taxanos (como el paclitaxel) (Brunden et al., 2010). Sin embargo, un reciente ensayo clínico en fase I (https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01492374) se ha detenido, posiblemente debido a efectos adversos. En cualquier caso, otros ensayos clínicos siguen adelante.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

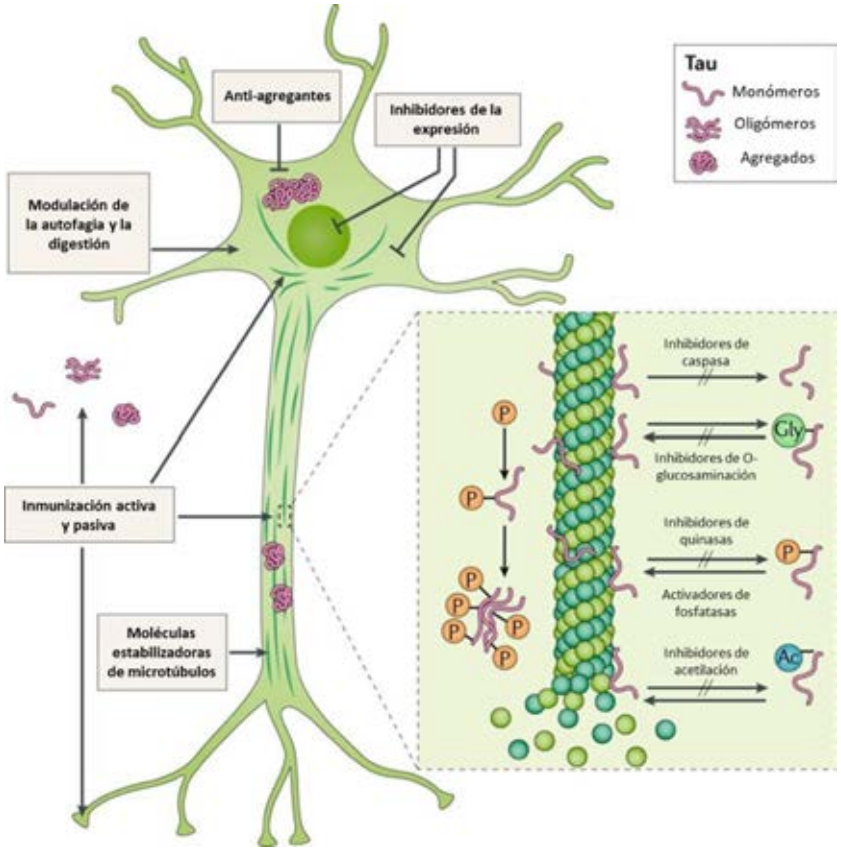


Figura 1.18. Dianas terapéuticas de patología de tau. Los fármacos en el desarrollo preclínico o clínico incluyen inmunoterapias activas y pasivas; inhibidores de la O-desglicosilación, agregación, quinasas, acetilación, caspasas o expresión de tau; activadores de fosfatasa; estabilizadores de microtúbulos; y moduladores de autofagia o degradación proteasómica. Ac, grupo acetilo; Gly, grupo glicosilo; OGA, O-GlcNAcasa; P, fosfato. Tomado de Congdon and Sigurdsson, 2018.

5) **Inmunoterapias.** La utilización de anticuerpos contra fosfo-tau ha emergido como una de las estrategias terapéuticas más prometedoras en los últimos años (revisado Hoskin et al., 2019; Bittar et al., 2020). Tanto la inmunización activa como la pasiva, especialmente esta última, han demostrado su capacidad para eliminar fosfo-tau extracelular e intraneuronal (Congdon and Sigurdsson, 2019; Madav et al., 2019). Los mecanismos que subyacen a la acción de estos anticuerpos continúan bajo estudio.

1.8.3. ESTRATEGIAS BASADAS EN LA NEUROINFLAMACIÓN

La gliosis reactiva y la neuroinflamación son características de la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la EA. El número de estudios que demuestran el papel de la microglía, la astroglía y de moléculas inflamatorias (como el sistema del complemento) como agentes centrales en el desarrollo de la patología continúa en aumento. Sin embargo, los medicamentos antiinflamatorios probados hasta el momento no han demostrado suficientes beneficios (revisado en Du et al., 2018) como para concluir que la respuesta inflamatoria sea perjudicial. Una de las posibles razones del fracaso es que las células microgliales y astrogliales se deterioran durante el proceso de envejecimiento (Dejanovic et al., 2017) y que este proceso degenerativo podría estar promovido por la progresión de la patología en los cerebros de los pacientes de EA (Sanchez-Mejias et al., 2016). Recientemente, se ha

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

demostrado que la regulación positiva de CD22 podría estar implicada en una disfunción de la microglía envejecida; por lo tanto, la inhibición de CD22 podría mejorar la eliminación de Aβ *in vivo* (Pluvinage et al., 2019). Por otro lado, el avance en la comprensión de los mecanismos que subyacen a las funciones homeostáticas y neuroprotectoras de las células microgliales (incluyendo la poda sináptica, neuroplasticidad y neurogénesis), están abriendo nuevas oportunidades terapéuticas. Dirigir esfuerzos para restaurar y modular las funciones de las células gliales constituye un nuevo enfoque terapéutico bastante prometedor.

Finalmente, aunque la acumulación de proteínas patogénicas (Aβ y fosfo-tau) desempeña un papel clave en al EA, la importancia del envejecimiento como factor de riesgo sugiere que otros mecanismos podrían contribuir al desarrollo/progresión de la misma. Estos incluyen alteraciones relacionadas con la proteostasis, inflamación, biogénesis de células madres, función mitocondrial, senescencia celular, daño en el ADN, metabolismo lipídico, señalización de la insulina y problemas vasculares. Por tanto, una terapia combinada con un enfoque múltiple, en consonancia con la medicina personalizada, abre la puerta a un posible tratamiento eficaz contra esta devastadora enfermedad neurodegenerativa.

1.9. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO Y OBJETIVOS

Se estima en 50 millones el número de personas que sufren demencia en todo el mundo, siendo la enfermedad de Alzheimer la causa principal. Debido al progresivo envejecimiento de la población, y a la ausencia de terapias efectivas, la cifra de afectados alcanzará los 152 millones en el año 2050, lo que supone una de las mayores crisis de salud global y social del siglo XXI (www.alz.co.uk/research/world-report-2018).

El continuo fracaso hasta la fecha de las intervenciones terapéuticas, la mayoría con diana en la patología amiloide, pone de manifiesto la necesidad de identificar nuevos mecanismos patogénicos y otras dianas más efectivas, así como desarrollar métodos de diagnóstico precoz. En los últimos años se ha producido un auge en la investigación del papel de la respuesta inflamatoria y la implicación de la activación microglial en la patogénesis de la enfermedad, abriendo la puerta a nuevas aproximaciones farmacológicas que tienen como diana la modulación de la función de la microglía. Si bien esta activación microglial ha sido ampliamente estudiada en la última década en el contexto de la patología amiloide, se conoce muy poco de la contribución de la patología tau a la respuesta inflamatoria mediada por estas células gliales.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Uno de los objetivos actuales de nuestro grupo de investigación, integrante del CIBER de enfermedades neurodegenerativas (CIBERNED) del Instituto de Salud Carlos III y del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), es determinar la función de la respuesta neuroinflamatoria en el proceso patogénico de la enfermedad de Alzheimer. La visión actual que predomina sobre el proceso inflamatorio en la EA deriva de los estudios en modelos transgénicos amiloidogénicos. En este sentido, nuestro grupo ha descrito la existencia de una fuerte activación microglial en el hipocampo del modelo APP_{751SL}/$PS1_{M146L}$ asociada a las placas, y que se extiende a regiones interplaca en fases avanzadas (Jimenez et al., 2008). Este aumento de activación microglial coincide con un incremento de los niveles de Aβ oligomérico soluble y la neurodegeneración de células principales. Recientemente, el grupo ha descrito que en el hipocampo de pacientes de EA la respuesta microglial es muy limitada y que, a diferencia de los modelos amiloidogénicos, existe un proceso degenerativo de la microglía (Sanchez-Mejias et al., 2016; Gutierrez and Vitorica, 2018; Navarro et al., 2018). Esta degeneración microglial parece estar inducida por fosfo-tau soluble, según indica los estudios *in vitro.* Estos datos sugieren que la disfunción microglial y la pérdida de vigilancia inmunológica subyace al proceso neurodegenerativo en pacientes. Sin embargo, la relación entre la patología tau y la respuesta microglial *in vivo* es muy poco conocida.

Asimismo, el papel de la reactividad astroglial en la patología de Alzheimer no ha sido aún descifrada. Nuestro grupo ha contribuido a este aspecto identificando que los astrocitos reactivos que rodean las placas amiloides eliminan neuritas distróficas (presinapsis aberrantes) mediante fagocitosis, siendo este proceso poco eficiente (Gomez-Arboledas et al., 2018). Por tanto, una pérdida funcional de los astrocitos reactivos podría ser clave en el proceso neurodegenerativo en la EA. La contribución de la patología tau a la reactividad/disfunción astroglial no ha sido estudiada. Por otro lado, la relación entre la patología tau, la patología amiloide y la neurodegeneración tampoco ha sido aún esclarecida. La hipótesis amiloide sitúa la acumulación de Aβ oligomérico como agente patogénico inicial de una secuencia que lleva a la aparición de la patología tau y la muerte neuronal. Sin embargo, no se conoce el impacto de la patología tau sobre la patología amiloide.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, el **objetivo general** de esta Tesis doctoral consiste en caracterizar, tanto a nivel celular como subcelular, la contribución de la patología tau al proceso neuroinflamatorio y al daño neuronal en la enfermedad de Alzheimer, así como analizar su relación con la patología amiloide. Para ello se proponen los siguientes objetivos específicos:

Objetivo 1. ***Caracterizar la progresión de la patología tau en el hipocampo de dos modelos animales transgénicos de taupatía pura (P301S y ThyTau22).***

1.1. Determinar la progresión espacio-temporal de acumulación de distintas formas patogénicas de tau.
1.2. Analizar longitudinalmente la progresión de la patología tau *in vivo* mediante estudio de neuroimagen funcional con PET.
1.3. Estudiar si existen alteraciones en los sistemas intracelulares proteolíticos.

Objetivo 2. ***Caracterizar la respuesta neuroinflamatoria durante la progresión de la patología tau en el hipocampo de los modelos P301S y ThyTau22***.

2.1. Analizar el perfil de activación de las células microgliales y astrogliales.
2.2. Analizar la relación entre la activación glial y las neuronas con fosfo-tau.

Objetivo 3. ***Analizar el daño sináptico y neuronal durante la progresión de la patología tau en los modelos P301S y ThyTau22.***

3.1. Analizar la patología sináptica asociada a la progresión de la patología tau.
3.2. Analizar la vulnerabilidad de subpoblaciones neuronales (interneuronas del hipocampo y neuronas colinérgicas) y evaluar daño neuronal a nivel ultraestructural.

Objetivo 4. ***Estudiar in vivo la interrelación entre la patología tau, la patología amiloide y el proceso neurodegenerativo en el hipocampo del modelo amiloidogénico APP/PS1.***

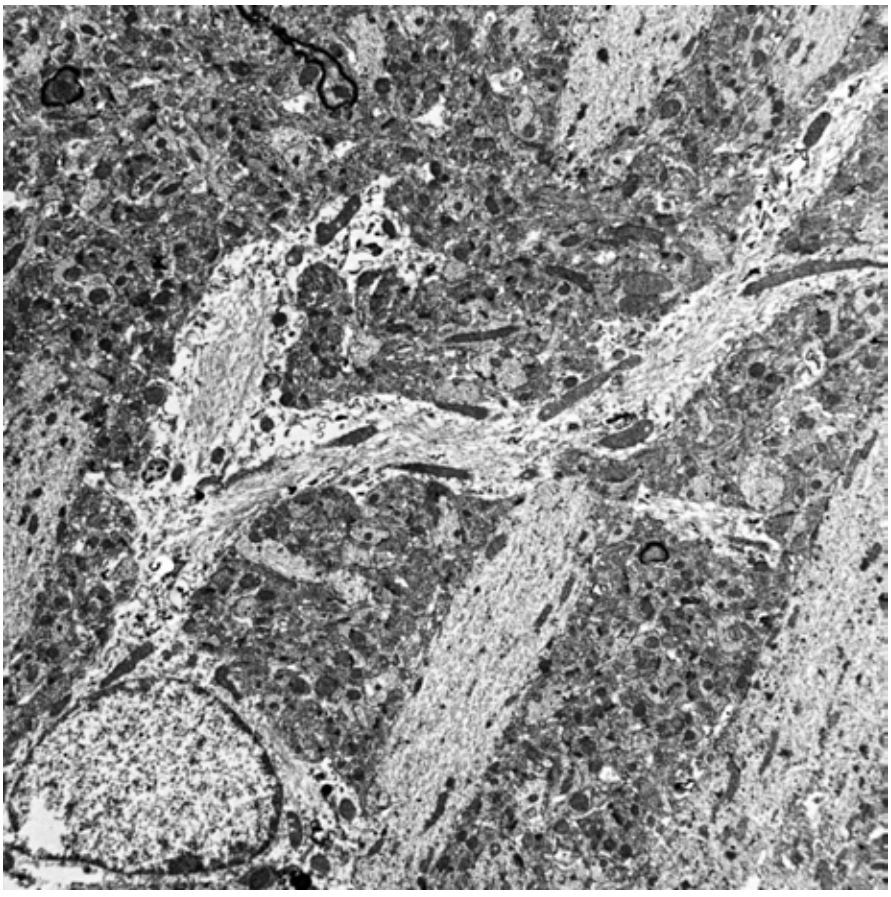
4.1. Determinar el efecto de un estabilizador microtubular (epotilona D) sobre la función cognitiva en un modelo amiloidogénico APP/PS1.
4.2. Analizar el efecto de la estabilización microtubular sobre la patología de tau, el proceso degenerativo (axonal/sináptico) y la muerte neuronal.
4.3. Estudiar el efecto de la estabilización microtubular sobre la patología amiloide.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Para alcanzar estos objetivos se utilizaron estudios *in vivo* (test conductuales y neuroimagen PET), técnicas moleculares (Western-blot, PCR cuantitativa), tinciones histológicas e inmunohistoquímicas (microscopía óptica convencional, láser confocal y microscopía electrónica de transmisión), técnicas estereológicas y análisis de imagen. El objetivo 1.2. se realizó como parte de una estancia predoctoral en el laboratorio del Dr. Claudio Soto en la Universidad *Texas Health Science Center at Houston* (UTHealth; Houston, EEUU).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2. MATERIAL Y MÉTODOS



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

2.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se han utilizado dos modelos murinos transgénicos (tg) para la patología tau, y uno para la patología amiloide:

- Ratones P301S (PS19Vle/J) con fondo genético C57BL/6 x C3H (Yoshiyama et al., 2007; Jackson Laboratory, EEUU). Este modelo de taupatía primaria expresa la isoforma T34 de tau humana de 383 aminoácidos de longitud, con una inserción N-terminal y cuatro dominios de unión a microtúbulos (1N/4R) (**Fig. 2.1 A**). La mutación P301S es la causante de la FTDP-17. El transgén está bajo el control del promotor de la proteína priónica (Prnp). Se han usado animales de 2, 4-6, 8, 9, 10 y 12 meses de edad. Este modelo presenta una alta mortandad a partir del primer año de vida (80%), por lo que no se han utilizado animales de edades más avanzadas.

- Ratones ThyTau22 con fondo genético C57BL/6 (Schindowski et al., 2006; Charles River Laboratories, Francia). Este modelo de taupatía pura sobreexpresa la isoforma humana tau46 de 412 aminoácidos de longitud (1N/4R), con dos mutaciones causantes de FTDP-17: P301S y G272V (**Fig. 2.1 B**). El transgén se expresa bajo el control del promotor Thy1.2. Se han empleado animales de 2, 6, 9, 12 y 18 meses de edad.

- Ratones $APP_{751S}/PS1_{M146L}$ (APP/PS1) con fondo genético C57BL/6 (Blanchard et al., 2003; Charles River Laboratories, Francia). Este modelo amiloidogénico expresa el gen humano de la presenilina 1 con la mutación M146L, bajo el control del promotor de la HMGCoA-reductasa, y el gen humano APP_{751SL}, con las mutaciones *Swedish* y *London* (**Fig. 2.2**) del Alzheimer familiar bajo el control del promotor Thy1. Se han utilizado animales de 2, 4, 6, 12 y 18 meses de edad.

  En este caso, los animales dobles transgénicos APP/PS1 fueron obtenidos mediante cruces de ratones hembra homocigotas para $PS1_{M146L}$ y ratones macho heterocigotos para APP_{751SL} (**Fig. 2.3**) en el Estabulario de los Servicios Centrales de Investigación de la Universidad de Málaga. Nuestro grupo ha realizado una profunda caracterización del presente modelo APP/PS1 (Ramos et al., 2006; Caballero et al., 2007; Jimenez et al., 2008, 2011; Moreno-Gonzalez et al., 2009; Baglietto-Vargas et al., 2010, 2017; Sanchez-Varo et al., 2012; Torres et al., 2012; Trujillo-Estrada et al., 2013, 2014; Gomez-Arboledas et al., 2018; Sanchez-Mejias et al., 2019).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

- Como controles se han empleado ratones no transgénicos (*wildtype*, WT) de la misma edad y fondo genético que los anteriores.
- El número total de animales empleado en este trabajo se refleja en las **tablas 2.1.-2.3.**

Los animales han sido mantenidos en el Estabulario de los Servicios Centrales de Investigación de la Universidad de Málaga bajo condiciones de alimentación *ad libitum*, temperatura controlada (21 ± 1ºC) y un fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 de oscuridad. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con el Real Decreto 1201/2005 del 10 de octubre (BOE 21/10/2005) para el mantenimiento y uso de animales de laboratorio, y de acuerdo con el Real Decreto 53/2013 del 1 de febrero (BOE 8/02/2013) para la protección de los animales utilizados en experimentación. Además, los experimentos fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación de la Universidad de Málaga (CEUMA).

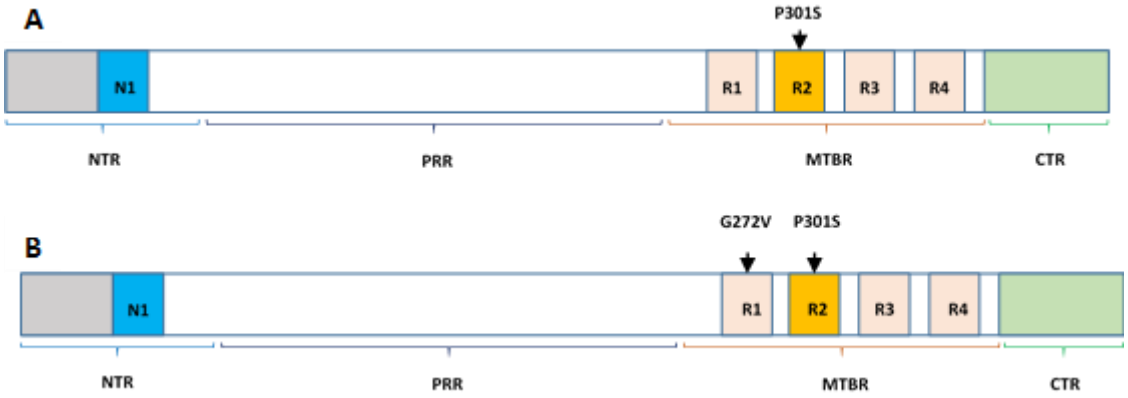


Figura 2.1. Localización de las mutaciones en la proteína tau de los modelos de taupatía (A) P301S y (B) ThyTau22. En la figura se muestran los diferentes dominios de la proteína tau 1N/4R, así como la ubicación dentro de las regiones MTBR de la mutación P301S (en R2) en el modelo transgénico hTau P301S, y las mutaciones G272V (R1) y P301S (R2) en el modelo ThyTau22. NTR, región amino-terminal; PRR, región rica en prolinas; MTBR, región de unión a microtúbulos; CTR, región carboxilo-terminal. Esquema adaptado de Arendt et al., 2016.

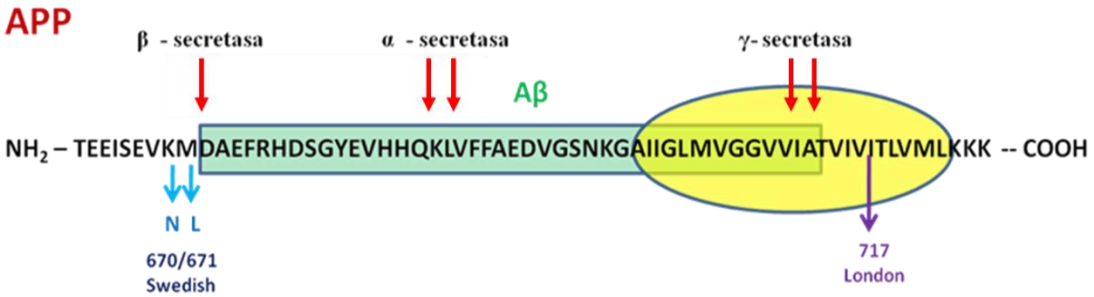


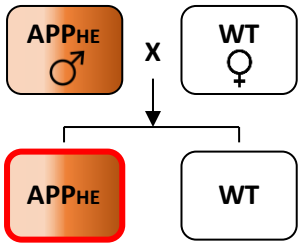
Figura 2.2. Esquema de la secuencia aminoacídica de la proteína APP$_{751}$ humana (hAPP) mutada en los ratones transgénicos APP/PS1. El gen que codifica para la proteína hAPP del modelo amiloidogénico APP/PS1 presenta las mutaciones *Swedish* (azul, K670N y M671L) y *London* (morado, V717I). La zona amarilla representa la porción transmembrana de la proteína. La secuencia sombreada en verde claro representa los aminoácidos que forman el péptido β-amiloide (Aβ) tras el procesamiento proteolítico secuencial de APP por las β- y γ-secretasas. Las flechas rojas indican las zonas de corte de distintas enzimas implicadas en la proteólisis de APP. Por procesamiento alternativo se pueden producir ocho isoformas diferentes de APP, de 677 a 770 aminoácidos, siendo APP$_{751}$ la expresada en este modelo.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

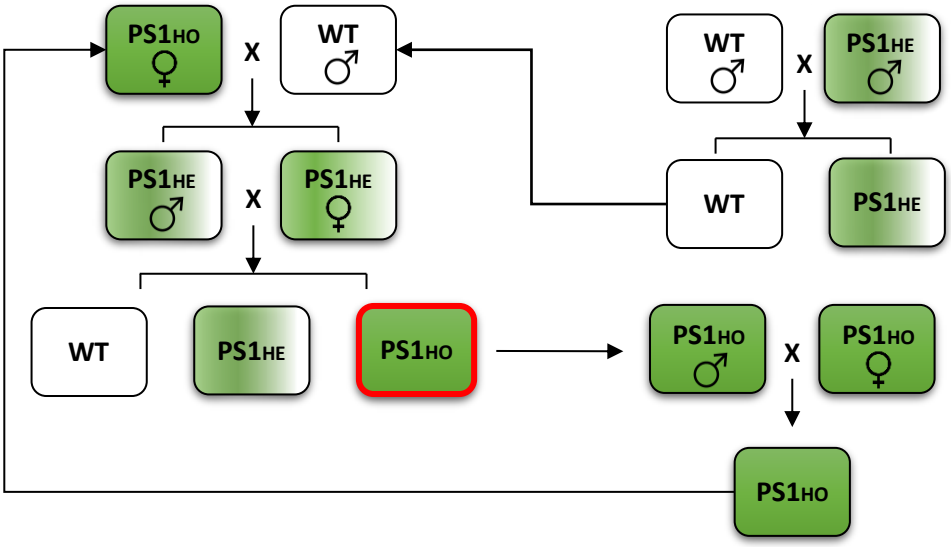
Durante la estancia predoctoral, los animales usados para el estudio de la mortalidad y el estudio longitudinal con el radiotrazador fluorado de tau (^{18}F-THK-5351) se encontraban alojados en grupos de 5, en jaulas ventiladas con comida y bebida *ad libitum*, sometidos a ciclos de 12 horas de luz/oscuridad, manteniéndose una temperatura (21 ± 1 ºC) y humedad constante (37%). El procedimiento experimental fue llevado a cabo por experimentadores ciegos al genotipo del animal. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las regulaciones de la NIH y aprobadas por el Comité de uso de animales para la investigación de *McGovern Medical School* del *Health Science Center* de la Universidad de Texas en Houston.

El número de animales utilizados, así como el estrés y sufrimiento de estos durante la manipulación y experimentación fueron reducidos al máximo, de acuerdo con la ley de las 3R (Reemplazar, Reducir y Refinar).

A. Mantenimiento de parentales heterocigotos para APP (APP$^{+/-}$)



B. Mantenimiento de parentales homocigotos para PS1 (PS1$^{+/+}$)



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

C. Generación de animales dobles transgénicos ($APP^{+/-}/PS1^{+/-}$)

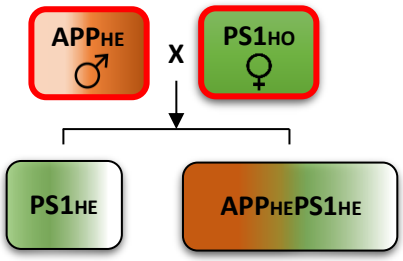


Figura 2.3. Mantenimiento de parentales y generación de animales dobles transgénicos APP/PS1. (**A**) Para el mantenimiento de los progenitores APP heterocigotos (APP_{HE}) basta con la realización de cruces con hembras WT, siendo ½ la descendencia APP_{HE}. (**B**) Sin embargo, el mantenimiento de las progenitoras PS1 requiere de varios cruces sucesivos para recuperar la homocigosis de las mismas (rendimiento de PSI_{HO} a partir de cruces $PS1_{HE}$ x $PS1_{HE}$ = ¼). Además, cada cierto tiempo se requiere la introducción en la cadena de nuevos WT para el mantenimiento del vigor híbrido. (**C**) Por último, para la generación de los animales dobles transgénicos se cruzan machos APP_{HE} con las hembras $PS1_{HO}$ resultantes de los cruces anteriores (recuadrados en rojo), generándose ½ APP/PS1 y el restante ½ $PS1_{HE}$.

Tabla 2.1. Relación de animales empleados en los estudios inmunohistoquímicos para microscopía óptica, confocal y electrónica. Animales empleados en la caracterización de la patología de tau, inflamación, pérdida sináptica y neuronal en el hipocampo de los ratones ThyTau22, P301S y WT. **Total 173 animales.**

Genotipo	2 meses	4-6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	Experimentos
ThyTau22	4	4	4	4	4	Objetivo 1. Caracterizar patología tau. Objetivo 2. Respuesta inflamatoria Objetivo 3. Pérdida subpoblaciones neuronales
P301S	4	5	6	5	-	
WT	4	4	4	4	4	
	2-4 meses		9-12 meses		18 m	
ThyTau22	8		8		-	Objetivo 2. Respuesta inflamatoria. Perfil DAM
P301S	9		9		-	
WT	-		4		-	
APP	-		-		7	
Genotipo	2 meses	4-6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	Experimentos
ThyTau22	10	-	10	10	-	Objetivo 3.1. Patología sináptica
P301S	-	4	-	4	-	
WT	10	-	10	10	-	
TOTAL	66		92		15	173

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Tabla 2.2. Relación de animales APP/PS1 y WT empleados en los estudios conductuales e inmunohistoquímicos para el análisis del tratamiento con el estabilizador de microtúbulos epotilona D (EpoD). Total 27 animales.

Genotipo	6 meses	Experimentos
WT	**12**	**Objetivo 4.1.** Efecto de un estabilizador microtubular sobre la función cognitiva **Objetivo 4.2.** Efecto de un estabilizador microtubular sobre la patología hipocampal
APP/PS1^{Veh}	**7**	
APP/PS1^{EpoD}	**8**	
TOTAL	**27**	

APP/PS1^{Veh} animales tratados con solución vehículo; APP/PS1^{EpoD} animales tratados con epotilona D.

Tabla 2.3. Relación de animales usados en el estudio longitudinal de la progresión de la patología tau *in vivo* en el modelo P301S mediante neuroimagen funcional con PET. Algunos de los animales usados en el análisis histológico fueron empleados para los estudios de supervivencia. **Total 75 animales.**

Genotipo	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses	Experimentos
P301S	45	- - - - - -	- - - - - -	- - - →	**Objetivo 1.2. Estudio de supervivencia**
WT	10	- - - - - -	- - - - - -	- - - →	
TOTAL	**55**	-	-	-	**55**
P301S	10	- - - - - -	- - - - - -	- - - →	**Objetivo 1.2. Estudios conductuales y PET** **Objetivo 1.3. Estudios histológicos**
WT	10	- - - - - -	- - - - - -	- - - →	
TOTAL	**20**				**20**

2.2. ESTUDIOS IN VIVO

2.2.1. TRATAMIENTO CON EPOTILONA D

Las epotilonas son una familia de estabilizadores de microtúbulos, cuyo mecanismo de acción implica su unión a la β-tubulina. Al igual que los taxanos, se emplean como fármacos antitumorales por su acción antimitótica sobre las células cancerosas (Fojo and Menefee, 2007). La epotilona D (EpoD, **Fig. 2.4.**, $C_{27}H_{41}NO_5S$) es uno de estos compuestos, con la ventaja añadida de presentar menor toxicidad, junto con la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica. Por estos motivos, se ha propuesto como un tratamiento potencial para las taupatías (Varidaki et al., 2018).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

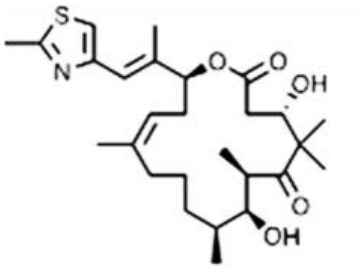


Figura 2.4. Estructura molecular de la epotilona D .Tomado de Brunden et al., 2012.

2.2.1.1. Preparación del compuesto y régimen de inyecciones

La epotilona D (MCE, HY-15278) es un compuesto soluble en disolventes orgánicos, por lo que se empleó dimetilsulfóxido (DMSO) para su disolución. Con el fin de reducir la toxicidad del DMSO, la solución vehículo se compuso de DMSO al 50% en suero salino.

Animales APP/PS1 (machos y hembras) fueron repartidos al azar entre dos grupos: un grupo control al que se administró la solución vehículo (APP/PS1^{veh}, N = 7), y el grupo tratado con epotilona D (APP/PS1^{EpoD}, N = 8). El tratamiento experimental consistió en una inyección intraperitoneal semanal de una dosis de 2 mg EpoD/kg. El volumen a inyectar fue calculado considerando el volumen máximo permitido para una inyección intraperitoneal, siendo en el caso de ratones 1mL/100g de peso (Zúñiga et al., 2011).

Las inyecciones fueron aplicadas desde la semana 14 de edad (3 meses) hasta la semana 28 (6 meses). El tratamiento fue bien tolerado por los animales y no se observaron alteraciones en el peso ni en la tasa de supervivencia de ninguno de los grupos. Los estudios conductuales se realizaron durante las dos últimas semanas de tratamiento (semanas 26 a 28) (Fig. 2.5). Una vez finalizados, se procedió al sacrificio de los animales para la extracción de las muestras.

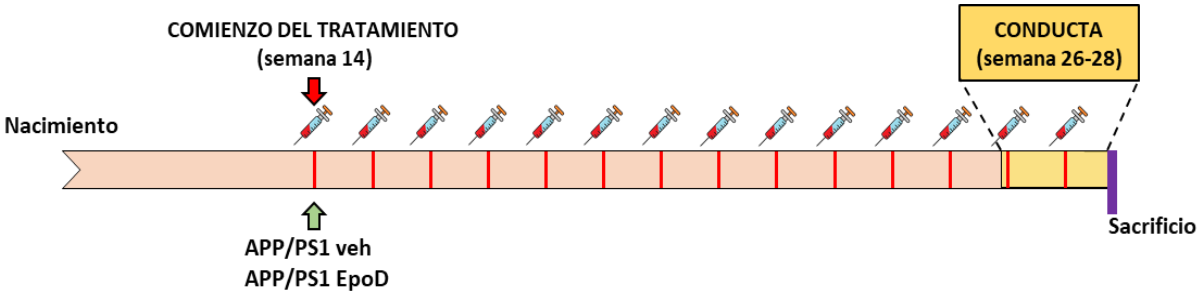


Figura 2.5. Cronología del tratamiento con epotilona D y el análisis de la conducta. Los animales APP/PS1 recibieron inyecciones semanales desde la semana 14 a la 28 con la solución vehículo (Veh) o el tratamiento (EpoD). Los estudios conductuales se realizaron durante las dos últimas semanas de tratamiento.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2.2.2. ESTUDIOS CONDUCTUALES

2.2.2.1. Grupos de animales analizados

Para el estudio del efecto de la **epotilona D**, se realizó el análisis conductual de tres grupos en función de su bagaje genético y/o tratamiento: dos grupos transgénicos experimentales [APP/PS1^{veh} (N = 7) y APP/PS1^{EpoD} (N = 8)] y un grupo control no transgénico (WT, N = 12). Los ratones se encontraban alojados en grupos de 3 o 4 en jaulas de plástico transparente (Eurostandar tipo II L, 36,5 x 20,7 x 14 cm), con comida y bebida *ad libitum*, sometidos al ciclo de luz/oscuridad establecido, manteniéndose una temperatura (21 ± 1 ºC) y humedad constante (37%). Todo el procedimiento experimental tuvo lugar durante la segunda y novena hora de la fase de luz, y fue llevado a cabo por experimentadores ciegos al genotipo/tratamiento del animal. Los animales fueron introducidos en la habitación donde se realizaban los estudios conductuales una hora antes de su comienzo, con el fin de que se habituasen a las condiciones experimentales. Este grupo realizó las siguientes pruebas: Prueba del campo abierto, reconocimiento de objetos, laberinto en Y, laberinto en Y específico de contexto y laberinto acuático de Morris.

El estudio conductual de los animales **P301S** (Rotarod y laberinto de Barnes) fue realizado en el *Mitchell Center Alzheimer´s Disease and Related Brain Disorders*, de la Universidad de Texas *Health Science Center* en Houston (EE. UU.) como parte de una estancia predoctoral en el laboratorio de Neurología de la Dra. Inés Moreno y el Dr. Claudio Soto.

2.2.2.2. Prueba de campo abierto

La prueba del campo abierto (OF, del inglés *open field*) permite habituar a los animales al recinto para las posteriores pruebas cognitivas, y se utilizó para examinar la función motora mediante la medición de la actividad locomotora espontánea (Filali et al., 2012; Laura Trujillo-Estrada et al., 2013), y la conducta exploratoria vertical (*rearings*). En esta prueba, se introdujo al animal durante 5 minutos en un recipiente con forma cuadrada (30 x 30 x 15 cm) y se dejó que explorase libremente toda la superficie (**Fig. 2.6 A**). Inicialmente, el animal fue colocado suavemente en la esquina inferior derecha, procurando que mirase hacia la pared del recipiente. Transcurrido ese tiempo, se retiró al animal y se limpió el recipiente con alcohol al 70%. La actividad locomotora (distancia recorrida y velocidad) se midió con el programa de análisis de imagen Ethovision XT 7 (Noldus, Holanda), mientras que la conducta exploratoria se cuantificó de manera observacional.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2.2.2.3. Prueba de reconocimiento de objetos

La prueba de reconocimiento de objetos se utiliza para analizar la memoria de reconocimiento de los animales de experimentación, siendo un tipo de memoria episódica encuadrada dentro de la memoria declarativa. Esta prueba se basa en la tendencia natural que muestran los roedores a explorar un objeto -conducta exploratoria espontánea- (Ennaceur and Delacour, 1988; Davis et al., 2013). Se aplicaron dos variantes de la prueba: en la primera se examina el reconocimiento del lugar del objeto (OLT, del inglés *object location test*) y en la segunda el reconocimiento de un objeto nuevo (NOR, del inglés *novel object recognition*), de modo que se evalúan la memoria espacial y no espacial dependientes de hipocampo, respectivamente. Ambas tareas constan de dos partes: una fase de muestra (también denominada fase de adquisición) y una fase de discriminación (fase de prueba), de 10 minutos de duración cada una, con un intervalo de 3 horas entre una y otra. Después de cada ensayo se limpió minuciosamente tanto el recipiente como los objetos con alcohol al 70%. Esta prueba se realizó transcurrida una hora después de la prueba de campo abierto.

Reconocimiento del lugar del objeto (OLT)

a. Fase de adquisición: Se colocaron dos objetos idénticos (pelotas de ping-pong) en la base del recipiente, posicionadas en esquinas opuestas (Fig. 2.6 B). Los animales fueron situados en la esquina inferior derecha del recipiente y se les permitió explorar libremente durante el tiempo establecido (10 minutos).

b. Fase de discriminación: Se tomó uno de los objetos situado en la esquina inferior izquierda del recipiente y se colocó en la superior (Fig. 2.6 B), de manera que quedaron los dos objetos en esquinas consecutivas. Se realizó el mismo procedimiento que en la fase de adquisición.

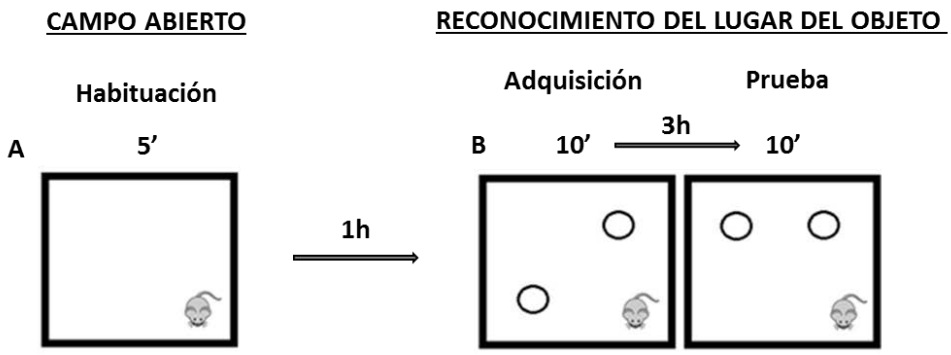


Figura 2.6. Esquemas representativos de los test de campo abierto (OF) y de reconocimiento del lugar del objeto (OLT). (**A**) Representación de la prueba de campo abierto. (**B**) Representación de la prueba OLT, mostrándose a la izquierda la fase de adquisición y a la derecha la de prueba. La prueba de reconocimiento de objetos se realizó 1 hora después que el OF.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Reconocimiento de un objeto nuevo (NOR)

a. Fase de adquisición: A los ratones se les presentaron dos objetos idénticos (botes pequeños de color blanco) adheridos a la base del recipiente y equidistantes a las paredes (Fig. 2.7). Al igual que en el OLT, los animales fueron situados en la esquina inferior derecha del recipiente y se les permitió explorar libremente el tiempo establecido.

b. Fase de discriminación: Se mantuvo uno de los objetos originales y el segundo fue sustituido (Fig. 2.7) por otro con forma, color, tamaño y textura diferentes (tapón de rotulador negro). El procedimiento fue el mismo que el descrito anteriormente.

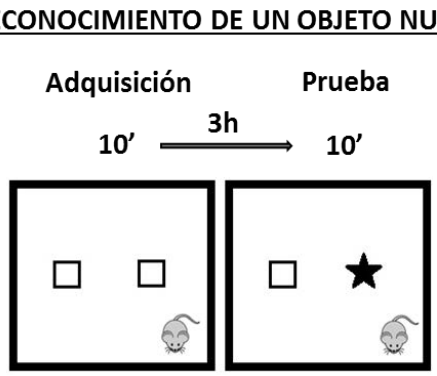


Figura 2.7. Esquema representativo del test de reconocimiento de un objeto nuevo (NOR). A la izquierda se muestra la disposición de los objetos en la fase de adquisición; a la derecha, representación de los objetos y su disposición en la fase de prueba.

Para las dos tareas de reconocimiento de objetos, se analizó de manera observacional el tiempo que el animal transcurrió explorando cada uno de los objetos: se considera que el animal está explorando cuando realiza contacto físico con el objeto a través del hocico. Así, se calculó un índice de discriminación (ID) para cada una de las pruebas: ID de lugar (tiempo explorando el objeto desplazado/tiempo total de exploración) e ID de objeto (tiempo explorando el objeto nuevo/tiempo total de exploración). De esta forma, un ID de 0,5 o inferior indicaría que el animal no recuerda el lugar/objeto de la fase de muestra, mientras que un ID superior a 0,5 implicaría una mayor exploración del objeto desplazado/nuevo y, por tanto, que el animal recordó el lugar/objeto visto previamente.

2.2.2.4. Laberinto en Y

La memoria de trabajo se evaluó a través del comportamiento de alternancia espontánea en el laberinto en "Y" (del inglés *Y-maze*) (Hughes, 2004). El laberinto consta de tres brazos A, B y C de iguales dimensiones (31 x 15 x 7 cm), dispuestos a 120º uno de otro, con un área central triangular (Fig. 2.8). El ratón fue depositado en el extremo de un brazo (brazo A, Fig. 2.8), orientado hacia la pared del laberinto, y se le permitió moverse libremente por el mismo durante 5 minutos. El laberinto se limpió con alcohol al 70% tras cada ensayo. Se consideró que el animal había entrado en un brazo cuando las

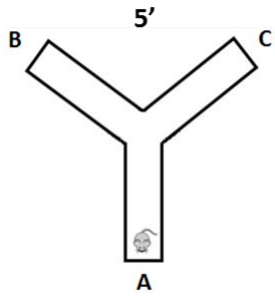


Figura 2.8. Esquema del laberinto en Y. El ratón es depositado inicialmente en el brazo de inicio o salida (brazo A).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

cuatro patas estuvieran dentro del mismo. El comportamiento de alternancia espontánea se define como el número de entradas sucesivas en los tres brazos (Biswas et al., 2014). Como ejemplo ilustrativo, supongamos que el animal realiza la siguiente secuencia de entradas "C, B, A, B, C, B, A, C". Se tienen en cuenta las siguientes alternancias: C-B-A, A-B-C, C-B-A y B-A-C. El índice de memoria viene dado por la fórmula: *nº alternancias/ (nº total de brazos visitados – 2)*. Así, en este caso el índice de alternancia sería de 0,67 [índice de alternancia = 4/ (8-2)]. Las alternancias se evaluaron de manera observacional. Por otro lado, la conducta locomotora (distancia, velocidad, tiempo en cada brazo) se analizó con el programa de análisis de imagen Ethovision XT 7 (Noldus, Holanda).

2.2.2.5. Laberinto en Y específico de contexto

Esta versión del laberinto en Y permite evaluar la memoria a largo plazo teniendo en cuenta lo familiar que le resulte al animal un contexto específico (Hughes, 2004; Karl et al., 2012). El aparato consiste en tres brazos acrílicos (31 x 18 x 32 cm) dispuestos de la misma forma que el anterior. La diferencia radica en que los brazos fueron equipados con diferentes estímulos internos visuales que cubrían las distintas paredes de cada brazo (**Fig. 2.9**) y superficies con diferente rugosidad.

La prueba consistió en dos ensayos (entrenamiento y prueba), con un intervalo entre ambos de 24 horas. La duración del ensayo para el entrenamiento y la prueba fue de 8 y 5 minutos, respectivamente. Durante el entrenamiento, uno de los brazos se mantuvo cerrado con un panel. Los ratones fueron colocados frente al extremo de uno de los dos brazos restantes (brazo A), mirando hacia la pared, y se les dejó explorar ambos brazos durante los 8 minutos. En el ensayo de prueba se retiró el panel que bloqueaba la entrada al tercer brazo (brazo C), de manera que todos los brazos quedaban accesibles. Los ratones fueron colocados en el extremo del brazo de inicio (A) tras lo que se les dejó explorar el aparato libremente durante 5 minutos. El aparato se limpió a fondo con etanol al 70% entre cada ensayo.

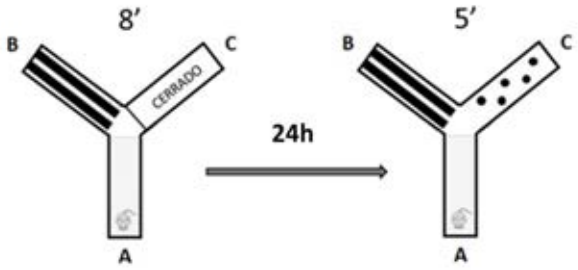


Figura 2.9. Esquema de la prueba conductual del laberinto en Y específico de contexto. Inicialmente se deja al animal explorar 8 minutos dos brazos (imagen de la izquierda). Transcurridas 24 horas, se deja explorar 5 minutos los tres brazos. Cada brazo tiene patrones de rayas y puntos específicos.

En este test se analizó el patrón de exploración de cada animal. Así, se calculó el tiempo que el animal transcurrió en cada uno de los brazos. Igualmente, se analizó también la distancia recorrida (cm) y la velocidad (cm/s) durante la prueba. Para ello se utilizó el programa de análisis de imagen Ethovision XT 7 (Noldus, Holanda).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2.2.2.6. Laberinto acuático de Morris

El laberinto acuático de Morris (MWM, del inglés *Morris Water-Maze*) fue concebido como un método de evaluación de la memoria espacial (Morris, 1984; Navarrete et al., 2008). Esta prueba se realizó en una piscina circular donde los animales tenían que nadar hasta localizar una plataforma que se encontraba sumergida en el agua, guiándose para ello por una serie de claves espaciales contextuales (Fig. 2.10). Esta tarea requiere de la motivación del animal para escapar del agua y encontrar la plataforma lo más rápido posible.

En concreto, los ratones fueron entrenados en una piscina circular (diámetro, 140 cm; altura, 60 cm) llena de agua (21°C ± 1°C) convertida en opaca añadiendo témpera líquida blanca no tóxica (Q-connect). La plataforma de escape (diámetro, 11 cm) se mantuvo a 30 cm del borde de la piscina, y a 1 cm por debajo del nivel del agua en el centro del cuadrante C (Fig. 2.10). Para el estudio, la piscina se divide en cuatro cuadrantes imaginarios (A-D) (Fig. 2.11).

La prueba conductual se prolongó durante ocho días y constó de dos fases principales: Una fase de aprendizaje (fase de adquisición) que se realizó durante siete días, y una fase de retención (prueba de referencia de memoria) que tuvo lugar el séptimo día, transcurridas 1,5 horas después de los últimos ensayos de adquisición. De manera adicional, en el octavo día se llevó a cabo la tarea visual con plataforma variable.

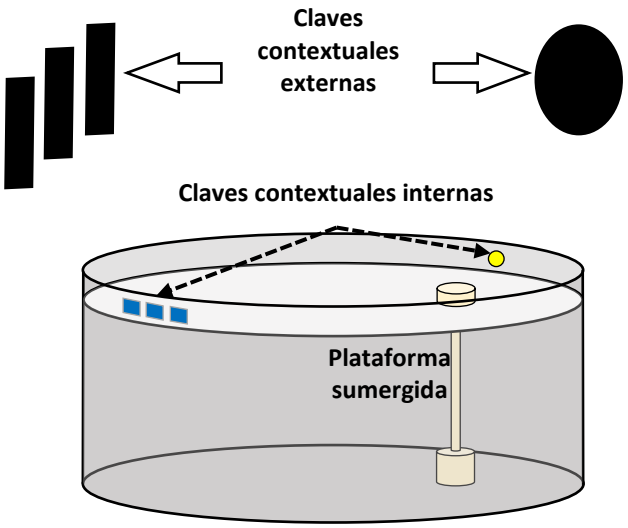


Figura 2.10. Representación del laberinto de Morris. Se muestran las posiciones relativas de las claves contextuales tanto proximales (internas) como distales (externas) con respecto a la piscina y la posición de la plataforma.

Durante la fase de adquisición, la plataforma de escape se mantuvo fija en el cuadrante establecido, y se varió el punto de salida del animal de forma pseudoaleatoria. Se realizaron cuatro ensayos al día (E1-E4), con un intervalo entre ensayos (IEE) de 5 minutos aproximadamente. La duración de cada ensayo fue de 90 segundos (s). Cada ratón fue tomado de su respectiva jaula y se dejó suavemente en uno de los puntos de salida, mirando hacia la pared de la piscina. Si el animal encontraba la plataforma, se le dejaba 20s y a continuación se

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

detenía el ensayo; de no encontrar la plataforma el ensayo se detenía tras los 90s y se guiaba al ratón hacia ella. En la fase de prueba, se realizó un único ensayo: la plataforma se retiró y se permitió al ratón buscarla durante 1 minuto.

Finalmente, se realiza la tarea visual con plataforma variable, con la finalidad de descartar problemas visuales o motivacionales en los animales. Para ello se colocó la plataforma 1 cm por encima del nivel del agua, de manera que fuera visible para el animal, y se remarcó su borde en color negro. Se realizaron cuatro ensayos de plataforma visible, alternando tanto su localización como el lugar de salida del ratón. A cada animal se le permitió nadar durante 1 minuto como máximo, y de alcanzar la plataforma se le dejó permanecer sobre ella 10s antes de recogerlo.

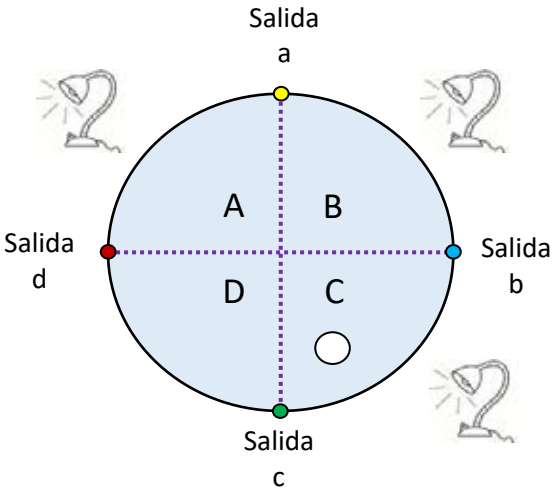


Figura 2.11. Representación del laberinto acuático de Morris visto desde arriba. Esquema en el que se indican los cuatro cuadrantes imaginarios (A-D), los cuatro puntos de salida del animal (a-d) y la disposición de las lámparas de iluminación (15 lux), así como la posición inicial de la plataforma (círculo blanco) en el cuadrante C.

El registro conductual se realizó de forma computarizada mediante el sistema de video-registro Ethovision XT 7 (Noldus, Holanda). El parámetro analizado para los ensayos de adquisición (E1-E4) fue la latencia de escape, es decir, el tiempo que transcurre desde que el ratón es situado en la piscina hasta que alcanza la plataforma. En el caso de la prueba sin plataforma se tuvo en cuenta el tiempo que estuvo el animal nadando en el cuadrante donde estaba originalmente la plataforma (cuadrante diana). Para la tarea visual, los parámetros que se midieron fueron la latencia, así como la distancia total recorrida (cm) y la velocidad de nado (cm/s).

2.2.2.7. Rotarod

La prueba del Rotarod (Med Associates Inc., Vermont) permitió estudiar la actividad y coordinación motoras, la fuerza de agarre y el nivel de fatiga de los animales. Cada ratón fue colocado sobre un cilindro horizontal que rodaba con una aceleración de 4 a 40 rpm, durante un ensayo de 5 minutos. La latencia de caída fue cuantificada durante 3 ensayos diarios, con 2 minutos de descanso entre intervalos. El tiempo máximo permitido sobre el Rotarod fue de 6

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

minutos. Dado que los animales tienen una inclinación natural por agarrarse a la barra giratoria, dos rotaciones consecutivas en las que el ratón se mantuviera aferrado a la misma se consideraron como una caída. Durante el primer ensayo, los animales fueron ayudados durante 30s para evitar comportamientos que puedan dar lugar a falsas interpretaciones como giros, saltos o caídas. Los animales P301S y sus controles fueron analizados longitudinalmente a los 6, 8, 10 y 12 meses, antes de la toma de imágenes por PET (ver **apartado 2.10**).

2.2.2.8. Laberinto de Barnes

El laberinto de Barnes es una tarea dependiente del lóbulo temporal medial que evalúa aprendizaje y memoria espaciales. Este laberinto consiste en una plataforma circular con 40 agujeros de los cuales solo uno constituye una vía de salida de la arena. El animal utiliza claves espaciales para encontrar el agujero de escape en un ensayo de 3 minutos de duración. En la fase de adquisición, los animales fueron entrenados durante el primer día con 2 ensayos, seguidos de 4 ensayos/día durante 4 días. En primer lugar, la fase de adquisición fue realizada por un subgrupo de ratones P301S de 6 meses de edad para establecer un nivel de ejecución en comparación con los WT de la misma edad. A los 7 días, se analizó la memoria a largo plazo, siendo el parámetro empleado la latencia primaria al agujero de salida. Antes del PET, a los 8, 10 y 12 meses de edad, los animales realizaron dos ensayos adicionales (ver **apartado 2.10**). La realización de la tarea fue grabada y analizada utilizando el programa informático TopScan 2.0 (*Clever Sys, Reston, VA*).

2.3. PROCESAMIENTO DEL TEJIDO

2.3.1. FIJACIÓN, EXTRACCIÓN Y CONSERVACIÓN DEL TEJIDO DE RATÓN

Los animales fueron anestesiados intraperitonealmente con pentobarbital sódico (Dolethal®, 60 mg/kg), y perfundidos transcardialmente empleando una bomba de perfusión (Dinko, Modelo D25V). A través del ventrículo izquierdo se introdujo una solución con tampón fosfato salino (PBS, **apéndice 2.11.1**) durante un minuto, para drenar la sangre del sistema circulatorio. A continuación, se perfundió una solución fijadora (PLP) compuesta de paraformaldehído 4%, L-Lisina 75 mM y metaperyodato sódico 10 mM en tampón fosfato (PB) 0,1 M pH 7,4; **apéndice 2.11.2**).

En el caso de los animales cuyo cerebro fue analizado mediante técnicas moleculares, la perfusión solo se realizó con el tampón de lavado PBS 0,1 M. Con respecto a los ratones empleados para el estudio de la EpoD, se llevó a cabo una disección manual del hipocampo y la corteza del hemisferio izquierdo inmediatamente después de la extracción del cerebro. Ambas regiones fueron directamente congeladas con nieve carbónica y almacenadas a -80°C para la

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

realización de estudios bioquímicos/moleculares. El hemisferio derecho de cada cerebro fue fijado por inmersión en la misma solución fijadora (PLP) descrita previamente, durante 5 días a 4°C. Posteriormente, las muestras fijadas fueron crioprotegidas con una solución de sacarosa al 30% (**apéndice 2.11.3** y **2.11.4**) durante 2 días. A continuación, se congelaron con nieve carbónica y se almacenaron a -80°C. Las muestras fijadas fueron empleadas en este trabajo para los estudios histológicos e inmunohistoquímicos.

2.3.2. EXTRACCIÓN DE SANGRE, HÍGADO Y RIÑONES

Con el objetivo de detectar o descartar posibles efectos adversos ocasionados por el tratamiento con EpoD y/o vehículo se realizó la extracción de sangre, hígado y riñones de todos los animales.

Por un lado, la sangre se obtuvo mediante punción de la vena facial, tomándose una cantidad mínima de 100 µL en tubos impregnados con EDTA (anticoagulante). Estas muestras fueron analizadas por un laboratorio de análisis veterinario independiente (Dr. Antonio Rama, Málaga) con el fin de realizar recuentos de los elementos formes sanguíneos. Dicho estudio fue motivado porque uno de los principales efectos secundarios descritos del tratamiento con EpoD es la neutropenia (Brunden et al., 2010). No se detectaron cambios significativos en las series rojas y blancas de los animales.

Por otro lado, con una jeringa se tomaron muestras de sangre directamente de la aurícula derecha para a continuación extraer el suero. Estas muestras se almacenaron y congelaron a -20°C con la finalidad de realizar futuros estudios bioquímicos.

El análisis inicial de los órganos extraídos no reveló diferencias cualitativas ni cuantitativas (peso) entre los distintos grupos. Posteriormente, una porción de los órganos (un riñón y medio hígado) fueron congelados directamente con nieve carbónica y almacenados a -80°C; la otra mitad fue fijada por inmersión en PLP, crioprotegida y congelada del mismo modo que las muestras cerebrales.

2.3.3. OBTENCIÓN DE SECCIONES DE CEREBRO

Con el objetivo de realizar tinciones histológicas e inmunohistoquímicas, los cerebros se cortaron en secciones coronales de 40 µm de grosor con un microtomo de congelación (Leica, CM-1325). Las secciones obtenidas se recogieron secuencialmente en siete series, de tal manera que entre dos cortes consecutivos de cada serie existía una separación de 280 µm. De este modo, en cada serie estaba representado 1/7 del cerebro en toda su extensión rostro-caudal. Los cortes (una serie por pocillo) se recogieron en placas multipocillos que contenían PBS 0,1 M y azida sódica al 0,02% (técnica *free-floating*), y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2.3.4. DELIMITACIÓN ANATÓMICA DEL HIPOCAMPO

La delimitación anatómica de la región del hipocampo se ha realizado siguiendo el atlas para el cerebro de ratón (Paxinos y Franklin, 2012). El hipocampo es una estructura que está presente desde Bregma -0,94 a -4,04 mm (Fig. 2.12). De manera general, se puede decir que el hipocampo limita en su parte más rostral y dorsalmente con el cuerpo calloso; ventralmente contacta con el tálamo dorsal y lateralmente con los ventrículos laterales. Conforme avanzamos hacia regiones caudales del cerebro, el hipocampo se curva y se extiende hacia la zona de la amígdala a la vez que delimita lateralmente con las cortezas entorrinal, perirrinal, ectorrinal, temporal asociativa, temporal auditiva y visual (Cassel et al., 1997).

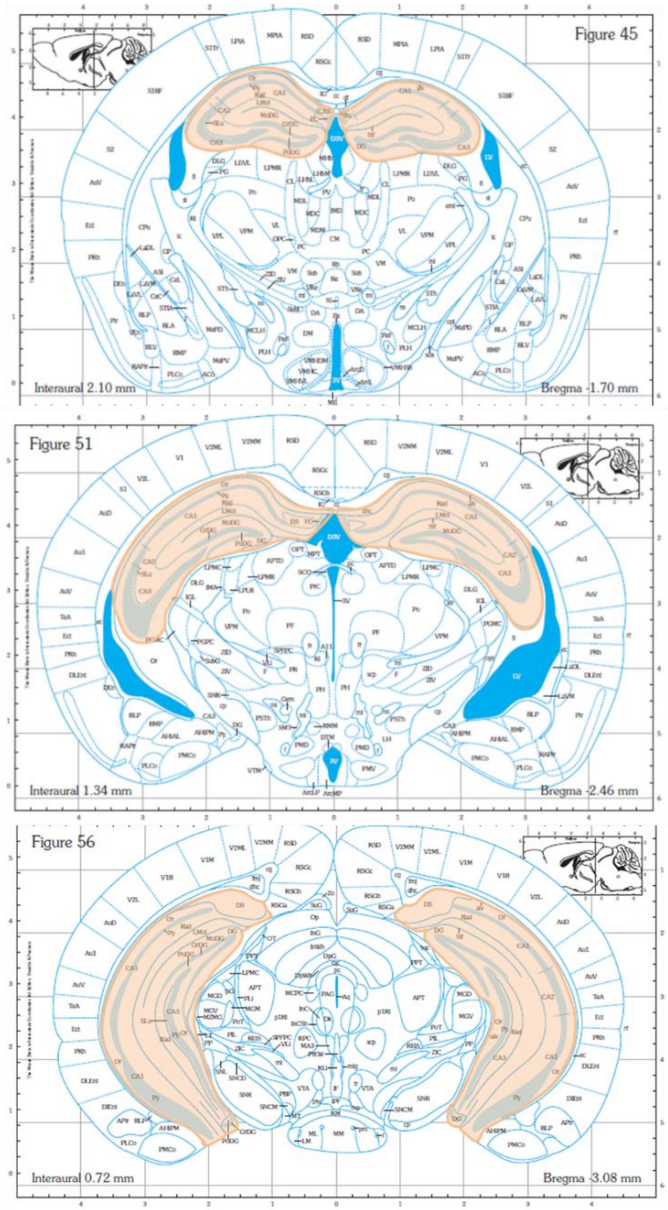


Figura 2.12. Esquemas de distintos niveles de cerebro de ratón en secciones coronales. Se muestran los niveles 45 (Bregma -1,70 mm), 51 (Bregma -2,46 mm) y 56 (Bregma -3,08 mm). En las tres imágenes se marca en color anaranjado el hipocampo. Modificado del Atlas Paxinos y Franklin, 2012.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2.4. MICROSCOPÍA ÓPTICA

2.4.1. TINCIONES HISTOLÓGICAS

2.4.1.1. Tinción con Tioflavina-S

La Tioflavina-S (Tio-S) es una molécula fluorescente verde que se une específicamente a estructuras con una conformación en forma de hoja plegada-β (Bussière et al., 2004). Tales estructuras están presentes tanto en las fibrillas de Aβ que constituyen el núcleo central de las placas amiloides como en los ovillos neurofibrilares (NFTs) formados por la proteína tau hiperfosforilada (fosfo-tau). Esta tinción se observa mediante microscopía de fluorescencia.

El protocolo se llevó a cabo en oscuridad (ver preparación en **apéndice 2.11.9**). Primero se lavaron las secciones (3 lavados de 10 minutos) en PBS 0,1 M. Luego, se incubaron en Tio-S al 0,02% diluida en etanol al 50%. Tras dos lavados de 5 minutos en etanol al 50% y otros dos lavados en PBS, los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados y se colocaron los cubreobjetos con medio de montaje (DABCO, **apéndice 2.11.11**). Los preparados se almacenaron en oscuridad a 4°C.

2.4.1.2. Tinción con Rojo Congo

El rojo congo (RC; $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$) es un colorante que, al igual que la Tio-S, se une a estructuras que presentan conformación de hoja-β (Khurana et al., 2001) permitiendo por tanto visualizar específicamente el núcleo fibrilar de las placas amiloides y los NFTs. La tinción puede observarse tanto a microscopía óptica de campo claro como a microscopía de fluorescencia.

En este trabajo, el RC se ha utilizado como contratinción para delimitar la distribución de neuritas distróficas positivas para APP, ubiquitina y fosfo-tau en relación a las placas congofílicas de Aβ (ver **apartado 2.4.2**). Una vez terminado el protocolo general de inmunohistoquímica, y tras lavar con PBS (3 lavados de 10 minutos), se incubaron las secciones en rojo congo al 20% (**apéndice 2.11.9**) durante 3 minutos. Los cortes se lavaron (3 lavados de 10 minutos) para eliminar el exceso de colorante. Se montaron las secciones en portaobjetos gelatinizados (**apéndice 2.11.5**), se secaron en una estufa a 37°C para su posterior deshidratación (**apéndice 2.11.10**) y por último se colocaron los cubreobjetos con medio de montaje (DPX).

2.4.1.3. Tinción con Azul de Toluidina

El azul de toluidina $[(C_{15}H_{16}ClN_3S)_2ZnCl_2]$ es un colorante básico que tiñe de color azul la heterocromatina y la sustancia de Nissl. Al unirse a los ácidos nucleicos y proteínas, proporciona un color azul a todo el tejido, más intenso en los núcleos celulares.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Este colorante se ha utilizado para teñir los cortes semifinos (1 µm de grosor aproximadamente) durante el corte con el ultramicrotomo (ver apartado 2.6.1) con el fin de facilitar la identificación de detalles estructurales, así como de la región donde se realizarán los cortes ultrafinos para los estudios a microscopía electrónica de transmisión (MET).

El protocolo de tinción con azul de toluidina consiste en montar los cortes semifinos en portaobjetos gelatinizados y dejar secar en estufa a 80-100°C. Se añaden unas gotas de azul de toluidina (ver apéndice 2.11.9) y se deja actuar durante 1 minuto a 80-100°C. A continuación, se lava con agua destilada hasta eliminar el exceso de colorante. Se deja secar y se monta con cubreobjetos y DPX.

2.4.1.4. Tinción de Gallyas

La tinción de Gallyas se utilizó para poner de manifiesto los NFTs en secciones cerebrales del modelo P301S (N=4) en la Universidad de Texas (Houston), de acuerdo al siguiente protocolo:

Se trabajó con secciones de 10 µm de grosor cortadas en un micrótomo de parafina y montadas sobre portaobjetos. Las secciones fueron lavadas con agua destilada durante 1 minuto, y rodeadas con una barrera hecha con un lápiz hidrofóbico. A continuación, se realizó una incubación en 0,25% de permanganato potásico durante 15 minutos, una incubación en ácido oxálico al 2% durante 2 minutos, y otra en ácido periódico al 5% (7,5 minutos), dando lavados con agua destilada de 1 minuto entre cada paso. Luego se dieron dos lavados de 5 minutos en agua destilada, antes de incubar en la solución de ioduro de plata durante 1 minuto, y dos pasos de 5 minutos en ácido acético al 0,5%. Tras un lavado en agua destilada (1 minuto) se incuba en la solución de revelado (ver **apéndice 2.11.9**) hasta un máximo de 30 minutos. Para detener la reacción se empleó ácido acético al 0,5% (2 lavados de 5 minutos), y luego se dio un lavado en agua destilada durante otro minuto antes de deshidratar y montar con DPX.

2.4.2. MARCAJE INMUNOHISTOQUÍMICO PARA MICROSCOPÍA ÓPTICA DE CAMPO CLARO

Se han empleado técnicas inmunohistoquímicas utilizando anticuerpos secundarios acoplados a biotina y el complejo molecular extravidina-peroxidasa (**Fig. 2.13**).

Con el fin de eliminar los restos de azida sódica de las secciones, estas se lavaron con tampón PBS 0,1 M pH 7,4 (3 veces, 10 minutos). Para la inactivación de la peroxidasa endógena se incubó el tejido durante 20 minutos en una solución con peróxido de hidrógeno al 3% y metanol al 10% en PBS. De nuevo, las secciones se lavaron 3 veces con PBS (10 minutos) y se bloquearon la avidina y biotina endógenas, así como proteínas unidas a biotina, empleando un kit de bloqueo avidina-biotina durante 30 minutos en cada una de las dos soluciones, y aplicando

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

un lavado de 10 minutos tras cada una de las incubaciones. A continuación, se incubaron los cortes en el correspondiente anticuerpo primario entre 24 y 72 horas a una concentración y temperatura específicas (ver marcadores, anticuerpos primarios y condiciones usadas en las Tablas 2.4 y 2.5). Los anticuerpos fueron diluidos en tampón PBS 0,1 M pH 7,4 con azida sódica al 0,1% y Tritón X-100 al 0,2 %.

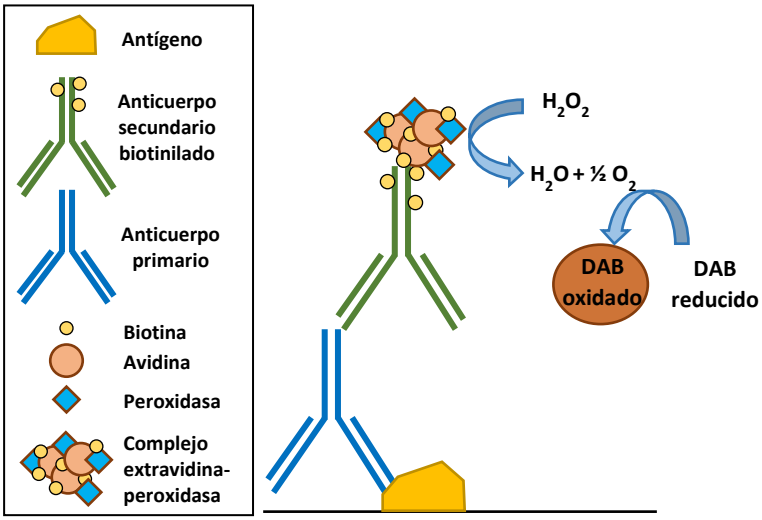


Figura 2.13. Esquema de inmunotinción con peroxidasa para microscopía óptica convencional. En el esquema se muestra la unión antígeno-anticuerpo primario, seguido del correspondiente anticuerpo secundario biotinilado. A continuación, se acopla el complejo extravidina-peroxidasa mediante el cual se genera el precipitado de color marrón (o azul en caso de añadirse la sal de níquel) por la reacción de óxido-reducción generada tras la adición del sustrato, el peróxido de hidrógeno.

Tabla 2.4. Marcadores estudiados mediante técnica inmunohistoquímica

Marcador	Características
β-amiloide	Fragmento peptídico de entre 39 y 43 aminoácidos generado tras el procesamiento del APP. El anticuerpo 6E10 reconoce los primeros 17 residuos aminoacídicos del péptido Aβ, y por tanto también reconoce formas precursoras. El anticuerpo 82E1 reconoce la región N-terminal del péptido tanto en formas solubles como fibrilares.
$A\beta_{42}$	Péptido β-amiloide de 42 aminoácidos. Tiene gran capacidad agregativa. Constituye el principal componente de las placas extracelulares.
APP	*Amyloid precursor protein*. Proteína precursora amiloide, cuyo procesamiento proteolítico llevado a cabo por las β- y γ- secretasas origina diferentes fragmentos amiloides. Marcador de neuritas distróficas.
CD45	Receptor de membrana plasmática expresada por células mieloides. Implicado en la activación de células T. Marcador de macrófagos infiltrados y microglía activada.
CD68	Proteína perteneciente a la familia de las glucoproteínas de membrana asociadas a lisosomas/endosomas (LAMP) y también a la familia de los receptores *scavenger* de los macrófagos (MSR). Se encuentra en los lisosomas, endosomas y superficie celular interviniendo en la fagocitosis y en la activación de macrófagos. Marcador de microglía y macrófagos activados M1.
ChAT	Colina-acetiltransferasa. Enzima implicada en la síntesis de acetilcolina. Marcador de neuronas y terminales colinérgicos.
Galectina-3	Lectina que se une a receptores glicosilados, presente en células del sistema inmune. Promueve la respuesta inflamatoria y la actividad fagocítica. Mayoritariamente sobreexpresada por microglía activada, también puede encontrarse en algunos astrocitos, células dendríticas y, esporádicamente, en neuronas.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

GFAP	*Glial fibrillar acidic protein*. Proteína ácida fibrilar glial que forma los filamentos intermedios de las células de la astroglía. Marcador específico de astrocitos.
Iba-1	*Ionized calcium binding adapter molecule*. Molécula del citoesqueleto de membrana implicada en los cambios morfológicos que se producen en la microglía. Marcador de células microgliales.
LAMP1 y LAMP2	*Lysosomal-associated membrane proteins 1 and 2*. Glicoproteínas de membrana de la familia de proteínas asociadas a la membrana de lisosomas. Presentes en lisosomas/endosomas. Durante la autofagia mediada por chaperonas, las proteínas a degradar son translocadas de forma específica a los lisosomas mediante la unión a LAMP2. Su expresión aumenta alrededor de las placas amiloides.
LC3b	LC3 (*Light chain 3)* es una proteína de unión a microtúbulos (MAP) que se puede presentar en dos estados: LC3a (citosólica, formada por escisión del extremo C-terminal de LC3) o LC3b (asociada a vesículas autofágicas tras la lipidación de LC3a). Marcador de autofagosomas.
MAP2	*Microtubule associated protein-2*. Proteína abundante en el sistema nervioso, que se asocia con la tubulina de los microtúbulos. Interacciona con otros elementos del citoesqueleto como son los neurofilamentos y la actina. Marcador dendrítico.
Sinaptofisina (Syn)	Glicoproteína ácida que se une a Ca^{++}, localizada en la membrana de las vesículas sinápticas. Marcador de terminales presinápticos.
SNAP-25	*Synaptosome-Associated Protein of 25 kDa*. Proteína asociada a la membrana de los terminales presinápticos. Forma parte del complejo SNARE, participa en la fusión de las vesículas sinápticas.
Somatostatina (SOM)	Neuropéptido expresado por una subpoblación de interneuronas GABAérgicas. En el hipocampo, las células O-LM y HIPP (SOM+) inervan las porciones distales de las dendritas apicales de las células principales.
Parvalbúmina (PV)	Proteína ligadora de calcio, presente en una subpoblación de interneuronas GABAérgicas con función inhibitoria de las neuronas principales.
Tau fosforilado	Tau es una proteína estructural de unión a microtúbulos (MAP). En la EA, su forma hiperfosforilada se encuentra formando acúmulos intracelulares (ovillos neurofibrillares). El anticuerpo **AT8** reconoce un epítopo de los filamentos helicoidales pareados de tau sensible a fosforilación (Ser199/Ser202/Thr205), correspondiente a Tau40 humano. El anticuerpo **AT100** reconoce la secuencia de epítopos fosforilados en Ser199, Ser202, Thr205, Thr212 y Ser214. El anticuerpo **MC1** reconoce conformaciones pre-ovillos.
TREM2	*Triggering receptor expressed on myeloid cells 2*. Receptor que se encuentra en células de origen mieloide. Marcador específico de microglía activada con perfil de activación tipo DAM (microglía asociada a daño).
Tubulina acetilada (AcTub)	Las tubulinas (α y β) al ensamblarse como heterodímeros, generan los microtúbulos. Pueden presentar modificaciones postraduccionales que influyen en su estabilidad. En concreto, las formas acetiladas se consideran estabilizadas y se encuentran en microtúbulos de vida media larga.
Ubiquitina	Proteína altamente conservada. Actúa como marcaje de proteínas destinadas a ser degradadas por el proteasoma. Se acumula en neuritas distróficas de pacientes y modelos de EA.
VGAT	Transportador vesicular de GABA. Es una proteína integral de membrana de vesículas sinápticas que contienen neurotransmisores inhibidores, como el GABA. Marcador de terminales presinápticos GABAérgicos.
VGLUT1	Transportador vesicular de Glutamato-1. Proteína encargada del transporte de glutamato al interior de las vesículas sinápticas. Marcador de terminales presinápticos glutamatérgicos.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Tabla 2.5. **Anticuerpos primarios empleados en inmunohistoquímica**

Anticuerpo primario	Dilución de uso	Incubación (tiempo y temperatura)	Animal de obtención	Fuente comercial; Referencia
Anti- $A\beta_{1-17}$ (clon 6E10)	1/5000	24h; 22ºC	Ratón	Covance; SIG-39320
Anti-$A\beta_{42}$	1/5000	24h; 22ºC	Conejo	Abcam; ab39377
Anti-APP	1/20000	24h; 22ºC	Conejo	Sigma; A8717
AT8	1/500	48h; 4ºC	Ratón	Pierce Biotech; MN1020
AT100	1/500	48h; 4ºC	Ratón	Pierce Biotech; MN1060
Anti-CD45	1/1000	48h; 4ºC	Rata	Bio-Rad; IBL-3/16
Anti-CD68	1/5000	24h; 22ºC	Conejo	Abcam; ab125212
Anti-ChAT	1/1000	48h; 22ºC	Cabra	Millipore; AB144P
Anti-Galectina3	1/3000	24h; 22ºC	Cabra	R&D; AF1197
Anti-GFAP	1/2000	24h; 22ºC	Pollo	Chemicon; AB5541
Anti-GFAP	1/10000	24h; 22ºC	Conejo	Dako; Z0334
Anti-Iba1	1/1000	24h; 22ºC	Conejo	Wako Chemicals; 019-19741
Anti-LAMP1	1/500	24h; 22ºC	Rata	Sigma; MABC39
Anti-LAMP2	1/500	24h; 22ºC	Rata	Santa Cruz Biotech.; sc-2004
Anti-LC3b	1/1000	24h; 22ºC	Conejo	Cell Signaling; #2775
Anti-MAP2	1/5000	24h; 22ºC	Conejo	Chemicon; AB5622
Anti-MC1	1/350	24h; 22ºC	Ratón	Cedido por Peter Davies
Anti-PV	1/5000	24h; 22ºC	Conejo	Swant; PV-28
Anti-SNAP-25	1/50000	24h; 22ºC	Conejo	Sigma; S9684
Anti-Syn	1/1000	24h; 22ºC	Conejo	Abcam; ab14692
Anti-SOM (D-20)	1/1000	24h; 22ºC	Cabra	Santa Cruz Biotech.; sc-7819
Anti-TREM2	1/1000	24h; 48ºC	Oveja	R&D; BAF1729
Anti-AcTub	1/50000	24h; 22ºC	Ratón	Sigma; clone 6-11B-1
Anti-Ubiquitina	1/5000	24h; 22ºC	Conejo	Dako; Z0458
Anti-VGAT	1/5000	24h; 22ºC	Conejo	Calbiochem; 676780
Anti-VGLUT1	1/10000	24h; 22ºC	Cobaya	Synaptic Systems; 131003

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Pasado el tiempo de incubación en el anticuerpo primario, las secciones se lavaron con PBS (3 veces, 10 minutos) y se incubaron en el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente durante 70 minutos a temperatura ambiente (ver **Tabla 2.6**). Seguidamente, se lavaron las secciones (PBS, 3 veces, 10 minutos) y se incubaron en una solución con el complejo estreptavidina-peroxidasa de rábano (Extravidin®) a una dilución 1/2000 en tampón PBS con Tritón al 0,2% durante 90 minutos a temperatura ambiente. El producto de la inmunorreacción se visualizó incubando el tejido en una solución de 3-3'-diaminobencidina tetrahidro-clorhídrico (DAB) al 0,05% en tampón Tris clorhídrico (Trizma®), conteniendo 0,03% de sulfato amónico de níquel para intensificar el producto de la reacción de la peroxidasa (formándose un precipitado de color azul oscuro) y 0,03% de peróxido de hidrógeno como sustrato de la enzima. El tiempo de revelado varió en función del anticuerpo utilizado a fin de conseguir la intensidad del inmunomarcaje deseada, monitorizándose en todo momento bajo el microscopio.

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

Para poder conservar y estudiar posteriormente el tejido, las secciones se lavaron con tampón PBS y se montaron en portaobjetos gelatinizados, dejándolos secar durante una noche en una estufa a 37°C. A continuación, las secciones se deshidrataron en etanol de gradación creciente (**apéndice 2.11.10**) hasta aclarar las secciones con xileno y colocar un cubreobjetos empleando DPX como medio de montaje.

2.4.2.1. Pretratamientos

En algunos casos, resulta preferible aplicar uno o varios tratamientos previos al protocolo general de inmunohistoquímica, ya que incrementan la exposición de determinados epítopos en el tejido, mejorando así la unión de los anticuerpos primarios y dando lugar a una mayor señal de reacción.

Permeabilización con detergente (Tx-100): Se incuba el tejido en un tampón con PBS 0,1M, Tx-100 0,2% y azida sódica al 0,1%, a 4°C, la noche previa al protocolo básico de inmunohistoquímica. Útil para marcadores subcelulares en los que el anticuerpo ha de penetrar varias membranas como LC3b (autofagosomas) o LAMP2 (lisosomas).

Tratamiento con calor (anticuerpos como AT8, anti-ChAT, anti-LC3b): Tras hacer los lavados en PBS 0,1 M para eliminar los restos de azida sódica del tejido, se realiza una incubación en tampón citrato sódico 50 mM a pH 6 (**apéndice 2.11.1**) a 80°C durante 30

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

minutos en un baño termostático (Unitronic, 320 UR; *Selecta*). Luego se deja atemperar durante 10 minutos, y se aplica un lavado de 10 minutos con PBS 0,1 M.

2.4.2.2. Bloqueos

Para aumentar la especificidad de unión de los anticuerpos a sus antígenos correspondientes, en algunas ocasiones se realizaron incubaciones del tejido en una disolución de bloqueo durante 1 hora, previa a la incubación en los anticuerpos primarios correspondientes. Estas disoluciones se realizan utilizando sueros de animales (cabra, bovino o caballo) de la misma especie a la del origen del anticuerpo secundario, a una dilución de 1/20 en PBS 0,1 M.

Tabla 2.6. Anticuerpos secundarios biotinilados empleados en inmunohistoquímica para microscopía óptica de campo claro

Anticuerpo secundario	Dilución de uso	Incubación (tiempo y temperatura)	Animal de obtención	Fuente comercial; Referencia
Anti-IgG de cabra	1/500	70 min; 22ºC	Caballo	Vector Lab.; BA-9500
Anti-IgG de cobaya	1/500	70 min; 22ºC	Cabra	Vector Lab.; BA-7000
Anti-IgG de conejo	1/500	70 min; 22ºC	Cabra	Vector Lab.; BA-1000
Anti-IgG de oveja	1/500	70 min; 22ºC	Caballo	Vector Lab.; BA-6000
Anti-IgG de pollo	1/500	70 min; 22ºC	Cabra	Vector Lab.; BA-9010
Anti-IgG de rata	1/500	70 min; 22ºC	Cabra	Vector Lab.; BA-9400
Anti-IgG de ratón	1/500	70 min; 22ºC	Cabra	Vector Lab.; BA-9200

2.4.3. MARCAJE INMUNOFLUORESCENTE PARA MICROSCOPÍA CONFOCAL

La microscopía confocal posibilita la realización de estudios de colocalización de diferentes marcadores usando combinaciones de anticuerpos primarios. Posteriormente, los marcajes se ponen de manifiesto mediante el uso de anticuerpos secundarios y/o estreptavidinas acopladas a diversos fluorocromos (Fig. 2.14).

El protocolo utilizado es similar al descrito para la microscopía óptica a campo claro, pero no requiere un sistema de revelado acoplado a la enzima peroxidasa. Por tanto, tras lavar las secciones con tampón PBS, las secciones fueron incubadas en los anticuerpos primarios. Previamente, cuando fue necesario, se aplicaron pretratamientos para incrementar la

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

antigenicidad del tejido y/o el bloqueo con el suero correspondiente. Los anticuerpos primarios se incubaron en días consecutivos, realizando 3 lavados de PBS (10 minutos) entre cada uno. Cada anticuerpo primario se incubó a las condiciones de tiempo, concentración y temperatura correspondientes (ver Tabla 2.5).

Las uniones de los anticuerpos primarios a sus antígenos fueron detectadas incubando los cortes secuencialmente en los anticuerpos secundarios correspondientes Alexa Fluor®568 y Alexa Fluor®488 (acoplados directamente a un fluorocromo que emite luz en rojo, rojo-lejano o verde, respectivamente; ver Tabla 2.7). Ambos se diluyeron en tampón PBS con 0,2% de Tritón X-100 a una concentración de 1/1000 durante 75 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Entre las incubaciones el tejido fue lavado en PBS (3 veces, 10 minutos).

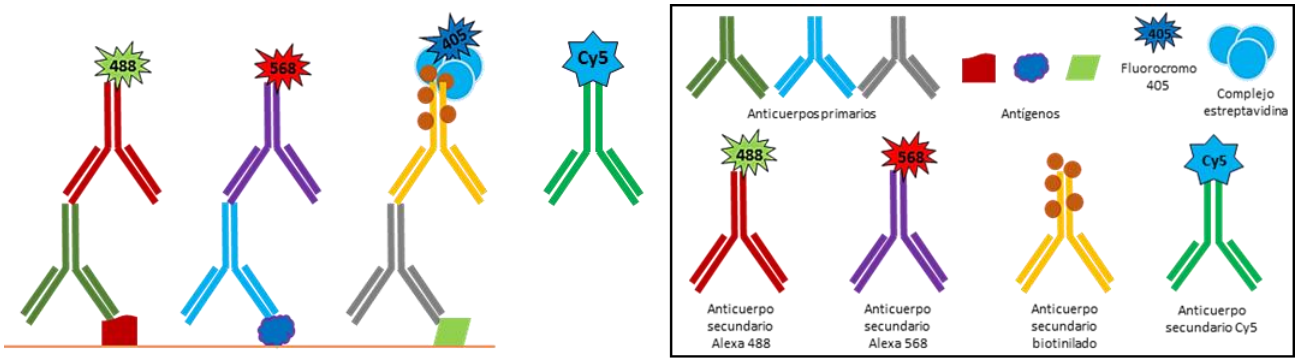


Figura 2.14. Esquema de inmunofluorescencia triple para microscopía confocal. En el esquema se muestra el proceso de identificación de diversos marcadores en una inmunofluorescencia triple mediante anticuerpos secundarios acoplados a diferentes fluorocromos.

En el caso de incluir la localización de un tercer antígeno (triple inmunofluorescencia), se empleó en algunos casos un anticuerpo secundario biotinilado, seguido de una estreptavidina conjugada con un fluorocromo que emite en color azul (Alexa Fluor®405) durante 90 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, y en otros casos anticuerpo secundario con el fluorocromo Cy5.

Para eliminar la autofluorescencia de las secciones cerebrales (especialmente en animales de edad avanzada ya que acumulan gránulos de lipofucsina autofluorescentes), estas se incubaron en una solución comercial (Autofluorescence Eliminator Reagent; 2160, Merck-Millipore). Para ello, las secciones fueron montadas sobre portaobjetos gelatinizados, y se continuó con el protocolo en gota en una cámara húmeda. Las secciones se lavaron con alcohol al 70% durante 5 minutos; seguidamente, se incubó en el kit de eliminación de autofluorescencia otros 5 minutos y se realizaron varios lavados en etanol 70° para eliminar el exceso de producto.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Finalmente, las secciones se cubrieron mediante un medio de montaje específico para mantener la fluorescencia de las muestras (PBS 0,1M y glicerina a una proporción 1:1, más el 3% de 1,4-diazabiciclo [2.2.2.]-octano o DABCO) (ver **apéndice 2.11.9**).

Tabla 2.7. Anticuerpos secundarios para inmunohistoquímica doble y triple a microscopía confocal

Anticuerpo secundario	Fluorocromo	Dilución de uso	Incubación (tiempo y temperatura)	Animal de obtención	Fuente comercial /Referencia
Anti-IgG de conejo	Alexa Fluor®488[1]	1/1000	75 min; 22ºC	Burro	Molecular Probes; A21206
Anti-IgG de conejo	Alexa Fluor®488[1]	1/1000	75 min; 22ºC	Cabra	Molecular Probes; A11008
Anti-IgG de ratón	Alexa Fluor®488[1]	1/1000	75 min; 22ºC	Burro	Molecular Probes; A21202
Anti-IgG de cabra	Alexa Fluor®488[1]	1/1000	75 min; 22ºC	Burro	Molecular Probes; A11055
Anti-IgG de pollo	Alexa Fluor®488[1]	1/1000	75 min; 22ºC	Cabra	Molecular Probes; A11039
Anti-IgG de conejo	Alexa Fluor®568[2]	1/1000	75 min; 22ºC	Burro	Molecular Probes; A10042
Anti-IgG de conejo	Alexa Fluor®568[2]	1/1000	75 min; 22ºC	Cabra	Molecular Probes; A11011
Anti-IgG de ratón	Alexa Fluor®568[2]	1/1000	75 min; 22ºC	Burro	Molecular Probes; A10037
Anti-IgG de cabra	Alexa Fluor®568[2]	1/1000	75 min 22ºC	Burro	Molecular Probes; A11057
Anti-IgG de conejo	Cy5®	1/1000	75 min 22ºC	Cabra	Molecular Probes; A10523
Estreptavidina	Alexa Fluor®405[3]	1/1000	90 min; 22ºC	-	Molecular Probes; S32351

Alexa Fluor® 488*[1], la longitud de onda de absorción es de 495 nm y la de emisión de 519 nm (verde); Alexa Fluor®568*[2], la longitud de onda de absorción es de 578 nm y la de emisión de 603 nm (rojo); Cy5®, rojo lejano, cuyo máximo de absorción se sitúa entre las longitudes de onda 650 nm y 667 nm; Alexa Fluor®405*[3], la longitud de onda de absorción es de 402 nm y la de emisión es de 421 nm (UV).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2.5. OBTENCIÓN DE IMÁGENES A MICROSCOPÍA ÓPTICA

2.5.1. IMÁGENES DE MICROSCOPÍA ÓPTICA A CAMPO CLARO

Los preparados fueron escaneados mediante un sistema de microscopía virtual Olympus VS120 acoplado a un sistema óptico (Olympus BX61VS), a dos cámaras (Olympus VC50, color; Olympus VS-XM10, monocromo) y a un ordenador que ejecuta el programa VS (Olympus). Con este sistema se consiguió disponer de una base de datos de preparaciones virtuales con una resolución de 0,17µ/píxel (objetivo 40X) con acceso remoto desde el servidor NetImage Server SQL (Olympus) y desde cualquier ordenador que tuviese instalado el programa Olyvia 2.6 (Olympus), empleado para el visionado de las muestras y la toma de imágenes (formato .vsi o .jpg con tamaño de 1786 x 877).

De manera complementaria, las muestras marcadas mediante inmunohistoquímica se observaron y fotografiaron con un microscopio óptico Nikon Eclipse 80i acoplado a una cámara fotográfica digital Nikon DS-5M de 5 megapíxeles. La cámara estaba conectada a un ordenador, que mediante el programa ACT-2U (Auto Camera Tame To You, Imaging software, Nikon Corporation 2004) permitió tomar imágenes digitales de las secciones. Las imágenes fueron tomadas con un tamaño de 2560x1920 píxeles y en formato .jpg.

Las imágenes digitales obtenidas mediante los procedimientos señalados fueron montadas en láminas con la aplicación Power Point de Microsoft Office 2010 (Microsoft), realizando ajustes en el tamaño y el brillo/contraste de las imágenes completas cuando se estimó necesario.

2.5.2. IMÁGENES PARA MICROSCOPÍA ÓPTICA DE FLUORESCENCIA

Las imágenes de **epifluorescencia** para las secciones teñidas con Tioflavina-S fueron tomadas con un microscopio Olympus BX61, que posee una fuente de fluorescencia (Olympus U-RFL-T) con filtros FITC (verde), empleando el programa de captura de imágenes Cell-A (Olympus). Las imágenes se tomaron a un tamaño de 1024x1024 en formato .tiff.

Las imágenes de fluorescencia a **microscopía confocal** fueron obtenidas con los microscopios láser confocal Leica SP5 y SP8 (Servicios Centrales de Ayuda a la Investigación de la Universidad de Málaga), conectado a un ordenador que ejecutaba el programa Leica TCS-NT.

Estas imágenes fueron procesadas con el programa informático LAS AF Lite (Leica), y guardadas en formato .tiff para su posterior análisis. Se obtuvieron tanto imágenes correspondientes a un solo plano focal, como proyecciones de intensidad máxima de cada Z-stack. Para el análisis específico de colocalización intracelular se obtuvieron planos ortogonales en los ejes YZ y XZ de cada una de las imágenes. La reconstrucción en volumen de las secciones

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

recogidas en el Z-stack se realizó empleando el complemento *volume viewer* del programa de análisis de imagen FIJI (http://fiji.sc/Fiji).

2.5.3. PROCESAMIENTO DE LAS IMÁGENES

Para el procesamiento de las imágenes digitales (tamaño, brillo, contraste) se utilizó el programa informático Adobe PhotoShop CS2 (Adobe) y se montaron con el programa Microsoft Office PowerPoint 2010 (Microsoft).

2.6. MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

2.6.1. FIJACIÓN, CONSERVACIÓN Y OBTENCIÓN DE CORTES

El protocolo para la **fijación** del tejido destinado a microscopía electrónica de transmisión (MET) es el indicado en el **apartado 2.3.1**. Una vez que los cerebros fueron postfijados con PLP y lavados con tampón PBS 0,1 M, se dejaron en PBS con 0,02% de azida sódica y se almacenaron a 4°C hasta su posterior uso.

Para la **obtención de secciones coronales**, los cerebros fueron encastrados en bloques de agarosa al 3% (ver **apéndice 2.11.12**), y cortados en un vibratomo (Leica, VT1000S). Las secciones cerebrales fueron recogidas en placas multipocillo con PBS 0,1 M y 0,02% de azida sódica y almacenadas a 4°C. Las secciones destinadas a microscopía electrónica convencional se obtuvieron a un grosor de 250 µm, mientras que las secciones destinadas a inmunomarcaje con oro coloidal (inmuno-oro) fueron cortadas a 50 µm.

2.6.2. POSTFIJACIÓN, DESHIDRATACIÓN E INCLUSIÓN EN RESINA

Para MET fue necesario realizar una postfijación de las muestras, así como deshidratarlas e incluirlas en resina, para darles la consistencia necesaria para poder obtener cortes ultrafinos. Se seleccionaron aquellos cortes que contuviesen diferentes niveles hipocampales. En el caso de las secciones empleadas para la técnica inmuno-oro para MET, el protocolo de postfijación, deshidratación e inclusión en resina se llevó a cabo una vez realizado el inmunomarcaje (ver **apartado 2.6.4**).

Con el fin de eliminar los restos de azida sódica de las secciones, estas se lavaron en tampón PBS 0,1 M pH 7,4 (3 veces, 10 minutos). La **postfijación** se realizó con tetróxido de osmio (ver **apéndice 2.11.13**) al 1% en PB 0,1 M en oscuridad a 4°C. Para las secciones de 250 µm (MET convencional), el tiempo de incubación duró 1 hora y 30 minutos. En el caso de las secciones de 50 µm (inmuno-oro), la incubación fue de 20 minutos. De nuevo, las secciones se lavaron 3 veces con PBS (10 minutos). A continuación, se realizó la **deshidratación** en acetona y contraste en bloque. Para ello, las secciones se sumergieron en concentraciones crecientes de acetona, comenzando con acetona al 30% seguido de acetona al 50% (tiempo de incubación en cada paso:

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

30 minutos para las secciones de 250 µm; 15 minutos para las de 50 µm). El siguiente paso consistió en el **contraste (apéndice 2.11.14)** del tejido empleando acetona al 70% con acetato de uranilo al 1% durante 1 hora (secciones de 250 µm) o 30 minutos (secciones de 50 µm). A continuación, las secciones se incubaron en acetona al 80% y al 90% durante 30 minutos (secciones de 250 µm) o 15 minutos (secciones de 50 µm). Finalmente, se realizaron dos pasos en acetona al 100% (2 pasos de 30 minutos para las secciones de 250 µm; 2 pasos de 15 minutos para las secciones de 50 µm).

Para la **inclusión en resina**, las secciones se infiltraron con una mezcla de acetona al 100% con resina (1:1), durante 1 hora **(ver apéndice 2.11.15)**. Seguidamente, se realizó la infiltración de las secciones en resina pura durante 2 horas a temperatura ambiente. Por último, se realizó la inclusión en plano: se colocaron las piezas de tejido entre dos portaobjetos forrados con papel aluminio, se añadió una pequeña cantidad de resina pura y se presionaron los dos portaobjetos con cuidado para eliminar burbujas. Los portaobjetos se colocaron en una estufa a 60°C durante 48 horas para la polimerización de la resina.

2.6.3. MONTAJE, TALLADOS Y CORTE

Tras la polimerización de la resina, se separaron los dos portaobjetos, obteniéndose una lámina fina de resina donde el tejido se encuentra incluido. Con unas tijeras, se cortó y se realizó el **montaje** de la zona de tejido de interés. Para ello se adhirió con pegamento de secado rápido sobre un bloque de resina polimerizada. Una vez secado el pegamento, se montó todo en el soporte del ultramicrotomo para llevar a cabo el **tallado** con una cuchilla muy afilada. En este proceso, se retiraron poco a poco porciones tanto de resina como de tejido sin interés para nuestro estudio. Finalmente, se obtuvo una pirámide truncada en cuya cara superior se situaba la región de interés. El tamaño de esta superficie depende del tipo de cortes que vayan a realizarse, semifinos para microscopía óptica o ultrafinos para MET. En el caso de las secciones ultrafinas, el área tallada tiene un tamaño de aproximadamente 0,5 mm^2.

Una vez que los bloques de resina estaban montados y tallados, se realizaron **cortes semifinos y ultrafinos** empleando un ultramicrotomo (modelo Ultracut E, Reichert-Jung). Primero se realizaron cortes semifinos (1 µm de grosor), que se tiñen con azul de toluidina tal y como se indica en el **apartado 2.4.1.3**. Estas secciones se observaron en el microscopio óptico y nos permitió definir nuestra área de interés para volver a tallar un área más pequeña antes de realizar cortes ultrafinos. Tras el retallado, se realizaron cortes ultrafinos (50-90 nm de grosor), que fueron colocados en rejillas de níquel de 150 agujeros.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2.6.4. INMUNO-ORO PARA MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Inicialmente, las secciones se lavaron con tampón PBS 0,1 M pH 7,4 (3 veces, 10 minutos). En caso de que el anticuerpo primario así lo requiriera, se realizó un pretratamiento con calor. Para favorecer la penetración de los anticuerpos es preferible romper los grupos aldehídos de la solución fijadora mediante incubación en una solución con glicina 50 mM en PBS 0,1 M a temperatura ambiente durante 5 minutos. De nuevo, las secciones se lavaron 3 veces con PBS (10 minutos). A continuación, para aumentar la penetración del anticuerpo en el tejido se realizó un proceso de permeabilización mediante congelación/descongelación. Este proceso permite permeabilizar las membranas celulares sin alterar ultraestructuralmente la morfología de la célula. Para ello, primero se incubaron las secciones en una solución crioprotectora (**ver apéndice 2.11.16**) al 100% a temperatura ambiente durante 20 minutos. A continuación, se incubaron en la misma solución a -80°C durante 20 minutos. Tras dejar que se atemperasen, las secciones se incubaron en solución crioprotectora de concentración decreciente (100%, 70%, 50%, 30%) diluidas en PBS 0,1 M (10 minutos en cada paso). Se realizaron 3 pasos de 10 minutos en PBS 0,1 M antes de incubar los cortes en la solución de bloqueo 1 (ver **apéndice 2.11.17 y 2.11.18**) durante 30 minutos. Finalmente, las secciones se incubaron en el correspondiente anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo 1 (ver **apéndice 2.11.17**) durante 48 horas a una concentración y temperatura determinadas para cada uno de los anticuerpos (ver marcadores, anticuerpos primarios y condiciones usadas en las **tablas 2.4 y 2.5**).

Al siguiente día, se realizaron 3 lavados en PBS 0,1 M (10 minutos), y seguidamente se incubaron las secciones en la solución de bloqueo 2 (ver **apéndice 2.11.18)** durante 30 minutos. A continuación, se procedió a la incubación en anticuerpo secundario conjugado con partículas de oro de 1,4 nm (Nanogold) a una dilución 1:100 en solución de bloqueo a temperatura ambiente durante una noche (ver **tabla 2.8**). Se aplicaron 3 lavados en solución de bloqueo 2 (5 minutos cada uno), seguidos de 3 lavados en PBS 0,1 M (5 minutos cada uno). A continuación, se realizó un paso de **postfijación** con glutaraldehído al 2% en PBS 0,1 M durante 10 minutos, seguido de 2 lavados con agua destilada (3 minutos cada uno) y 3 lavados con citrato sódico 0,02 M pH 7 (5 minutos cada uno). Para el **revelado** con plata se utilizó el kit HQ Silver™ que permite intensificar la señal. Siguiendo las instrucciones del fabricante, se empleó la misma cantidad de los tres componentes del kit (1:1:1). Primero, se mezclaron la solución iniciadora y la moderadora, y, a continuación, la solución activadora. El revelado tarda un tiempo variable en función de la temperatura (a mayor temperatura, mayor velocidad de obtención del precipitado). Este tiempo de revelado fue de entre 5 y 10 minutos.

Una vez reveladas nuestras muestras, se realizaron 2 lavados con agua destilada (3 minutos cada uno) y un lavado en PB 0,1 M (10 minutos). A continuación, se realizó el proceso

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

de **virado al oro (*gold toning*)**, en el que las partículas de oro sustituyen a las partículas de plata (ver Fig. 2.15), que se alteran con el tetróxido de osmio necesario para la postfijación. Por lo tanto, este paso se incorpora para mantener la amplificación de la señal. Para el virado al oro, primero se incubó en solución de cloruro de oro al 0,05% en agua destilada y, seguidamente, se incubó en tiosulfato sódico al 0,3% en agua destilada. Ambas incubaciones se realizaron a 4°C en oscuridad (10 minutos cada una). Por último, se realizaron 3 lavados en PB 0,1 M (10 minutos) previos a la **postfijación** con tetróxido de osmio al 1% en PB 0,1 M a 4°C y en oscuridad durante 20 minutos. El protocolo de postfijación, deshidratación e inclusión en resina continuó como se indica en el **apartado 2.6.2**.

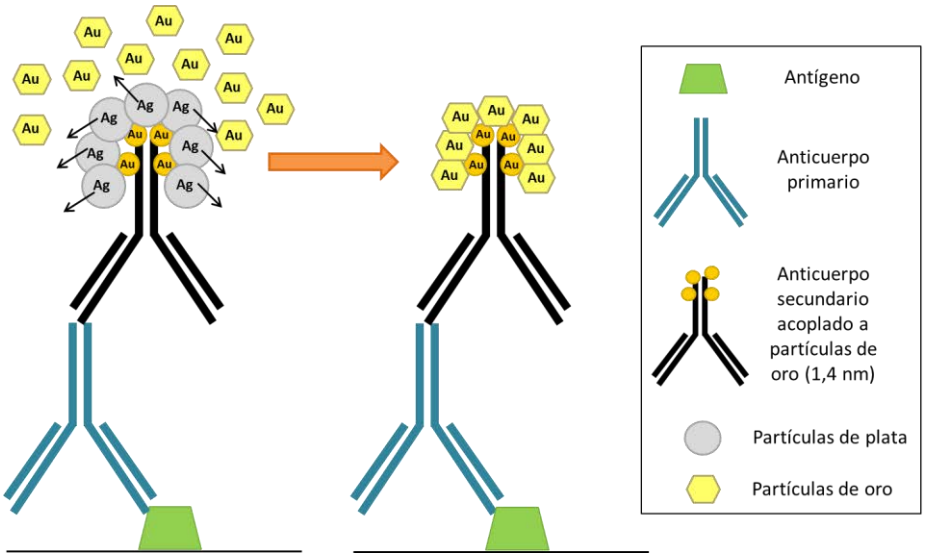


Figura 2.15. Esquema de la técnica inmuno-oro para microscopía electrónica de transmisión. El antígeno es reconocido de forma específica por el anticuerpo primario, y éste a su vez por el anticuerpo secundario acoplado a partículas de oro de 1,4 nm. La señal se amplifica gracias a la unión de partículas de plata, que son posteriormente reemplazadas por partículas de oro (viraje al oro).

Tabla 2.8. Anticuerpos secundarios conjugados con oro empleados en inmunomarcaje para microscopía electrónica de transmisión

Anticuerpo secundario	Dilución de uso	Incubación (tiempo y temperatura)	Animal de obtención	Fuente comercial; Referencia
Anti-IgG de cabra	1/100	24h; 22°C	Conejo	Nanoprobes; 2005
Anti-IgG de conejo	1/100	24h; 22°C	Cabra	Nanoprobes; 2004
Anti-IgG de rata	1/100	24h; 22°C	Cabra	Nanoprobes; 2007
Anti-IgG de ratón	1/100	24h; 22°C	Cabra	Nanoprobes; 2001

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2.6.5. OBSERVACIÓN Y OBTENCIÓN DE IMÁGENES DE MET

Para la observación de los cortes ultrafinos se empleó un microscopio electrónico de transmisión (JEOL JEM-1400) (Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Málaga). En este microscopio se tomaron fotografías en formato .tiff, con un tamaño de 1336 x 1336 píxeles. Del mismo modo que las imágenes de microscopía óptica, estas imágenes fueron procesadas mediante el programa Adobe Photoshop CS2 (tamaño, brillo, contraste) y montadas en láminas empleando el software Microsoft Office PowerPoint 2010.

2.7. ESTUDIOS CUANTITATIVOS POR ANÁLISIS DE IMAGEN

2.7.1. Análisis de imagen de la carga amiloide, patología tau, patología neurítica, carga microglial y astroglial

Las secciones teñidas con Tioflavina-S (placas fibrilares u ovillos neurofibrilares) fueron fotografiadas utilizando un microscopio Olympus BX61 y el programa Cell-A (Olympus). En el caso de las secciones inmunomarcadas con anti-Aβ42 (patología amiloide), AT8, MC1 y Gallyas (patología tau), anti-ubiquitina o anti-APP (patología neurítica), Iba1 o CD45 (carga microglial), o GFAP (astroglial) se empleó el microscopio Nikon modelo Eclipse 80i con el programa ACT-2U (ver **apartados 2.5.1 y 2.5.2**). Las imágenes se tomaron con el objetivo de 4x y/o 10x y manteniendo constantes las condiciones en la intensidad de luz para cada experimento. Se analizaron una media de 5 secciones por animal de cada uno de los grupos (APP/PS1^{EpoD}, N=7; APP/PS1^{Veh}, N=4; P301S, N=3-4/edad; ThyTau22, N=3-4/edad; WT, N=3-4/edad).

Las imágenes seleccionadas fueron calibradas en el programa Visilog 6.3 (Noesis, Francia) y convertidas a escala de grises. A continuación, se delimitó la región de interés a cuantificar (área total). La imagen se binarizó estableciendo un umbral que se mantuvo a lo largo del estudio, con un valor comprendido entre 0 y 255, de manera que solo aparecen visibles en la pantalla las zonas inmunoteñidas determinadas por el experimentador, siendo así cuantificables (**Fig. 2.16 A**).

Para conocer el porcentaje de área ocupada por placas amiloides fibrilares (TioS-positivas), placas totales (Aβ42-positiva), patología tau (AT8, MC1 y Gallyas-positiva) microglía total (Iba1-positiva), microglía activada (CD45-positiva) o astroglía (GFAP-positiva) se calcula la relación entre el área total (100%) y la inmunomarcada obtenida tras la binarización. Esta medida permite establecer comparaciones entre individuos. Por tanto:

Carga amiloide/tau/glial (%) = (área de la región ocupada por marca inmunorreactiva/área total de la región) x 100

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Para estudiar el área ocupada por las neuritas distróficas (APP-positivas o Ubiquitina-positivas), la región de estudio (CA1) se delimitó manualmente, y las capas de somas inmunorreactivos presentes en dicha área (estrato piramidal) fueron eliminados también manualmente para evitar falsos positivos (**Fig. 2.16 B**). El resultado muestra las distrofias inmunopositivas para el marcador bajo estudio que ocupan nuestra región de interés (**Fig. 2.16 D**). Se representa el porcentaje del área total de la región que estaba ocupada por las distrofias. De manera que:

Área de distrofia en CA1 (%) = (área ocupada por las distrofias/área de CA1) x 100

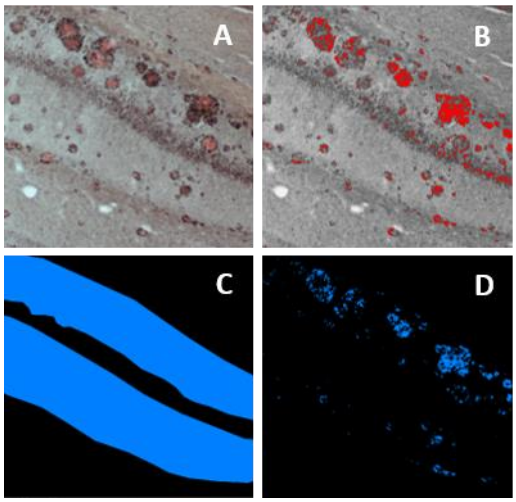


Figura 2.16. Estudio del área ocupada por neuritas distróficas (ubiquitina) en la región CA1. Trabajo sobre imágenes binarizadas con el programa de análisis de imagen Visilog 6.3. (**A**) Imagen original. (**B**) Una vez que se establece el umbral, se obtiene una imagen binarizada en la que solo aparece el objeto de estudio, en este caso las neuritas distróficas positivas para el marcador ubiquitina. (**C**) Después se dibuja la región de interés (en este caso CA1 sin la capa piramidal) y se binariza la imagen. (**D**) Finalmente, se combinan ambas imágenes anteriores y se genera una tercera que corresponde a las distrofias presentes únicamente en la región deseada.

2.7.2. CUANTIFICACIÓN DEL ÁREA SINAPTOFISINA-POSITIVA EN LA CAPA MOLECULAR DEL GIRO DENTADO

El marcaje para la proteína presináptica sinaptofisina (Syn) se caracteriza por presentar una mayor inmunorreactividad en zonas específicas del hipocampo propio y giro dentado. Aprovechando las características de la inmunotinción, se comparó el área sinaptofisina-positiva de la capa molecular (interna y externa) del giro dentado y el estrato lúcido de animales WT (N=4), APP/PS1^{EpoD} (N=7) y APP/PS1^{Veh} (N=4). Para ello, se empleó el programa Visilog 6.3, el cual permite calcular el área de una región delimitada manualmente (**Fig. 2.17**, ejemplo en el giro dentado). Del mismo modo se operó para la cuantificación de la inmunorreactividad con ChAT. Para el cálculo se tomaron imágenes del giro dentado a 10x utilizando un microscopio Nikon Eclipse 80i.

Área Syn/ChaT-positiva (%) = (área capa inmunorreactiva/área total capa molecular) x 100

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

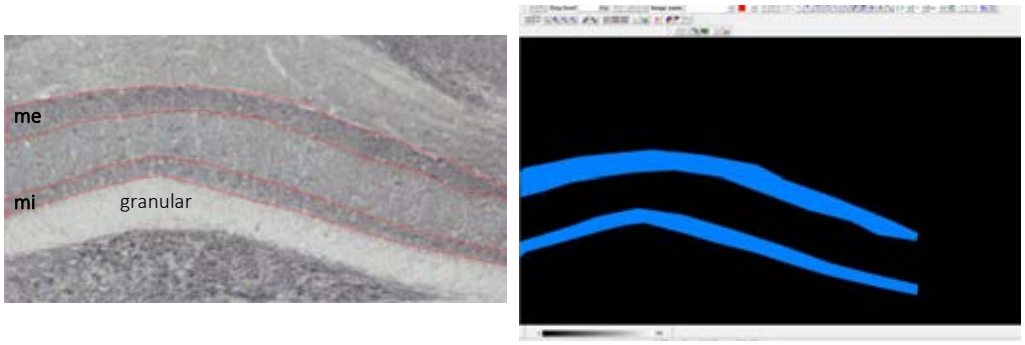


Figura 2.17. Estudio del área inmunorreactiva para sinaptofisina en subcapas del giro dentado con Visilog 6.3. Delimitación de áreas inmunorreactivas en las capa molecular externa (me) e interna (mi).

2.7.3. ANÁLISIS ESTEREOLÓGICO

La estereología es una rama de la morfometría que permite inferir información tridimensional y cuantitativa a partir de imágenes bidimensionales (como los cortes histológicos). Para ello, esta técnica combina la probabilidad geométrica y la estadística para cuantificar las propiedades geométricas de objetos de interés, utilizando información adecuadamente muestreada, y basándose en principios generales de análisis sencillos (Howard and Reed, 1998; 2004). En este trabajo, las técnicas estereológicas se han realizado con un sistema de análisis estereológico computerizado (Fig. 2.18) que comprende un microscopio convencional (Olympus BX61), una videocámara digital a color (Olympus DT71), el programa informático de estereología New CAST (*Computer Assisted Stereological Tollbox*, Olympus) con el sistema VIS 2.61.1.0. (*Visiopharm Integrator System*, Visiopharm®) y un microcator (Prior ProScan MT12) que monitoriza los movimientos del eje z con una resolución de 0,5 µm.

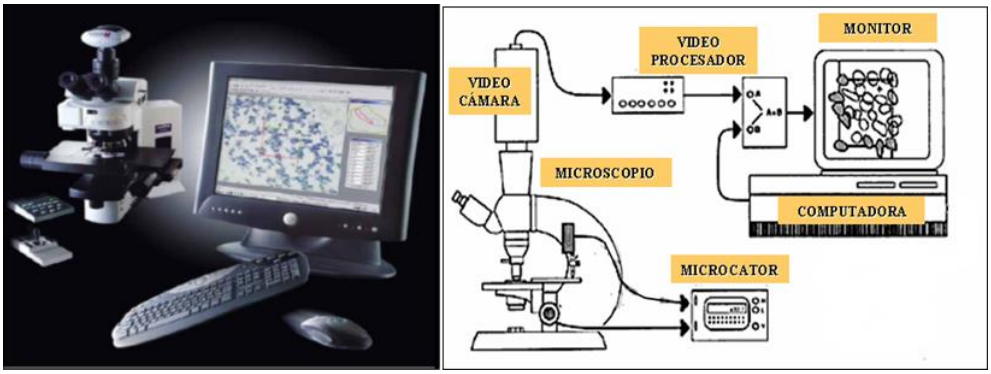


Figura 2.18. Imagen y esquema representativo de los componentes del sistema de análisis estereológico computerizado. Comprende un microscopio convencional, una videocámara digital a color, un programa informático de estereología y un microcator que monitoriza con precisión los movimientos en el eje Z (altura del disector, h).

Un requisito de esta técnica es que los objetos de interés (células, por ejemplo) sean muestreados de manera uniforme, es decir, que en un área determinada cada objeto debe tener la misma probabilidad de ser contado. Se delimita el área de la región de interés, y se determina

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

el porcentaje de la muestra a estudiar (entre el 20 y el 50%) para que el programa realice un muestreo de la zona, y seleccione aleatoriamente el primer punto. Así, los puntos de muestreos consecutivos, equidistantes, también habrán sido seleccionados al azar, mediante un muestreo en forma de meandro (del inglés *meander sampling*). Generalmente, la región cerebral de interés se selecciona manualmente con el objetivo de 2x o 4x, y el muestreo se realiza con objetivos de mayores aumentos (40x o 100x). En la presente tesis doctoral esta herramienta se ha empleado para la cuantificación de subpoblaciones neuronales, el estudio de la densidad de la patología neurítica, y para determinar el área de las placas amiloides.

La técnica estereológica del disector óptico (**Fig. 2.19**) permite estimar el número de sujetos de estudio por volumen (células/mm^3) o densidades numéricas, y está considerada como el mejor método de muestreo para una estimación precisa. Para la cuantificación de diferentes poblaciones pueden utilizarse dos aproximaciones estereológicas: el fraccionador óptico que permite obtener una estimación del número total de entidades de una estructura y, por otra parte, la determinación de la densidad con el disector óptico. La utilización de este estimador conlleva la determinación del factor de encogimiento que presenta la región a estudiar.

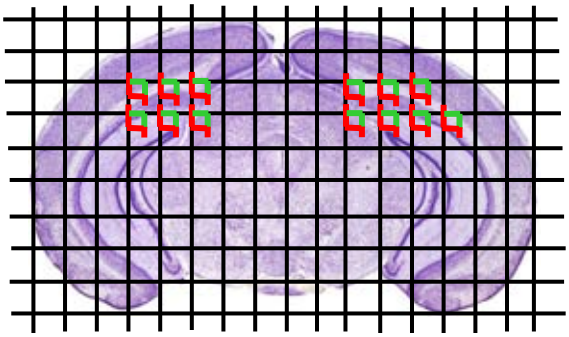


Figura 2.19. Muestreo sistemático. Disector óptico. En el muestreo sistemático, la cuantificación no se realiza en todo el tejido, sino que se contarán el número de partículas que se encuentren contenidas en disectores ópticos (áreas específicas de tejido), que se hayan distribuidos sistemáticamente en una plantilla previamente diseñada (Howard and Reed, 2004).

2.7.3.1. Densidad numérica de neuronas y neuritas distróficas

Para estimar la densidad numérica (DN; células/mm^3), el programa emplea disectores, cuadrículas o ventanas de conteo con un área conocida que, al multiplicarla por el grosor del corte, nos da el volumen de referencia necesario para la estimación del número de eventos mediante el método del disector óptico.

Para la cuantificación de interneuronas GABAérgicas (SOM y PV) en el hipocampo, y de neuronas colinérgicas (ChAT) en el teléncefalo basal, la región correspondiente de los animales de experimentación se estudió a lo largo de todo el eje rostro-caudal, con una media de 7 secciones por animal, distanciadas por 280 µm (fracción de 1/7 x 40 µm de grosor). Para la cuantificación de las neuronas se realizó un escaneo del 30% de la muestra, con una ventana de conteo de 1154,3 µm^2 y una distancia de paso de 62,03 µm. Para la cuantificación de las neuritas distróficas (SOM-positivas y AT8-positivas) se utilizó una ventana de conteo de 1874,2 µm^2 con una distancia de paso de 68,45 µm. Finalmente, teniendo en cuenta el área de la región

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

seleccionada, el grosor del corte y el número de eventos contados, se puede determinar la densidad numérica (DN), según la ecuación:

$$DN= \Sigma Q / \Sigma A \times h$$

donde ΣQ es el número de perfiles somáticos o de neuritas, ΣA es el sumatorio de las áreas (área de la ventana multiplicado por el número de ventanas cuantificadas), y h es la altura del disector (10 µm). Así se obtuvo la DN de cada una de las secciones, y la media de las secciones se utilizó para obtener calcular el valor medio correspondiente del sujeto, y finalmente el del grupo.

2.7.3.2. Estimación del volumen: Principio de Cavalieri

Para poder estimar el número total de células a partir de la DN, se calculó el volumen total de la región de interés (CA1). Para ello, empleamos el principio de Cavalieri (Cavalieri, 1635) junto con una malla de puntos que el software NewCAST coloca sobre nuestra área de estudio, delimitada manualmente. Así, podemos realizar un muestreo aleatorio y sistemático, de manera similar a lo mostrado en la **Figura. 2.19**. Cada uno de estos puntos tiene un área asociada, de modo que podemos determinar el volumen *V* de nuestra región utilizando la siguiente fórmula:

$$V=T.\ a(p).\ \Sigma P$$

siendo *a(p)* el área asociada a cada punto; *T*, la distancia media entre dos secciones consecutivas y *ΣP* es la suma de los puntos contados.

Finalmente, al multiplicar la *DN* previamente estimada (células/mm^3) por este factor *V* (mm^3), obtendremos una estimación del número de eventos (células PV) en esa estructura.

2.7.3.3. Nucleador: Estimación del tamaño de placas

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

El nucleador (Gundersen, 1988) se basa en la generación de rayos isotrópicos desde un punto fijo definible (no arbitrario) interior del objeto a medir (por ejemplo, una célula o un depósito amiloide). Si las secciones son IUR, entonces las direcciones de los rayos deben ser isotrópicas en 2 dimensiones (2D). La orientación de una línea viene dada por el ángulo ω que forma relativo a un eje predeterminado y, por lo tanto, por el punto en que corta a una circunferencia imaginaria, que a su vez representa un ángulo. Es preciso que todos los ángulos

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

tengan igual probabilidad de ocurrir. De modo que para lograr la isotropía en 2D hay que generar al azar un número de ángulos uniformemente distribuido entre 0° y 180° (Fig. 2.20).

En este trabajo, el nucleador se ha utilizado para determinar el tamaño (área) de las placas amiloides hipocampales inmunomarcadas para Aβ42 en los animales APP/PS1 tratados con EpoD o con la solución vehículo. En este caso, se realizó un muestreo al azar de la región CA1 hipocampal (escaneo del 20%) con el objetivo de 40x. Cada vez que la ventana de conteo (6022,08 μm^2) localizaba una placa amiloide, su área era determinada usando la aplicación n*ucleador* IUR 2D (NewCast, Visiopharm) de la siguiente manera: Tras indicarle al programa cuál es el punto central del objeto a estudiar, esta herramienta produce una malla radial sobre el mismo que garantiza las condiciones necesarias para la IUR, y nos permite establecer los puntos de corte de la malla con el objeto, definiéndose así el área a cuantificar. El número de radios isotrópicos a utilizar será determinado por el usuario (N=5 en este estudio) (Fig. 2.20).

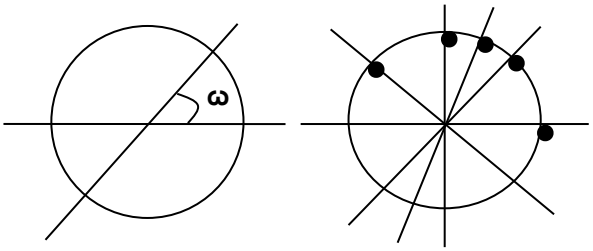


Figura 2.20. Cuantificación del área de las placas mediante el nucleador. Principio de isotropía en el que se basa la técnica del nucleador. Mediante esta metodología, se cuantifican las placas incluidas en los disectores. Para la medida del área se marca el centro de la placa y el punto de corte de los 5 radios con el borde de la misma.

2.8. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS

Todos los estudios bioquímicos se realizaron en colaboración con el grupo del Dr. Javier Vitorica (IBIS/Universidad de Sevilla).

2.8.1. AISLAMIENTO DE ARN Y PROTEÍNAS

Los hipocampos utilizados para realizar estudios bioquímicos fueron diseccionados manualmente a partir de cerebros extraídos a animales perfundidos únicamente con PBS 0,1 M. Las muestras se conservaron a -80°C hasta su posterior uso. El aislamiento de ARN y proteínas se basa en la diferente solubilidad de las distintas biomoléculas (ARN, ADN, proteínas y lípidos) en disolventes orgánicos como el fenol y el cloroformo. El procedimiento comenzó con el pesaje de las muestras, a las cuales se le añadió 1 ml de Tripure® (tiocianato de guanidina, un agente caotrópico que desnaturaliza las proteínas, incluyendo proteasas, ADNasas y ARNasas, y que rompen las membranas) por cada 50-100 mg de tejido. La muestra se homogeneizó con un *polytron* durante 20 segundos. Con objeto de disociar completamente los complejos núcleo-proteínas, el homogeneizado se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se añadieron 0,2 ml de cloroformo por cada ml de Tripure® empleado. La mezcla se agitó e

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugó a 12000g durante 15 minutos, a 4°C. El resultado es una solución con tres fases bien diferenciadas: fase superior acuosa en la que se encontraba el ARN, una interfase en la que encontramos el ADN y fase inferior que contenía las proteínas.

2.8.1.1. Aislamiento de ARN

En el proceso de extracción del ARN es imprescindible que el material de trabajo y los reactivos estén libres de ARNasas, por lo que el agua fue tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) al 0,1% (p/v) (Fedorcsák and Ehrenberg, 1966) y posteriormente autoclavada para eliminar el DEPC (que por carboximetilación puede inactivar al ARN). Con la finalidad de aislar el ARN, se extrajo la fase superior, de la cual se recuperó por precipitación con isopropanol (0,5 ml de isopropanol por mL inicial de *Tripure®*) durante 10 minutos. Por último, el ARN precipitado se purificó usando el sistema *ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation* (Applied Biosystems). Este sistema es capaz de purificar hasta 96 muestras simultáneamente y consiste en una bomba de vacío que aspira las muestras haciéndolas pasar por unos filtros en los que el ARN queda retenido. Finalmente, éste se disolvió con agua libre de ARNasas. La purificación del ARN y su posterior recuperación usando este sistema se llevó a cabo según los pasos que se indican en la Tabla 2.9. La cuantificación del ARN purificado se realizó posteriormente mediante el uso de un espectofotómetro. Una vez purificado y cuantificado, el ARN fue almacenado a -80°C hasta su posterior uso.

Tabla 2.9. **Pasos para la purificación de ARN** usando el sistema ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation. Se indican el tiempo y volumen de reactivo utilizados.

Paso	Acción	Volumen	Tiempo	Vacío	Posición
-	Humedecer pocillos con agua DEPC	40 µl	-	-	-
1	Cargar muestras	0,5 ml	180 s	80%	Desechar
2	Añadir etanol absoluto 4˚C	0,5 ml	180 s	80%	Desechar
3	Añadir etanol absoluto 4˚C	0,4 ml	180 s	80%	Desechar
4	Añadir etanol absoluto 4˚C	0,3 ml	120 s	60%	Desechar
5	Añadir etanol absoluto 4˚C	0,3 ml	120 s	60%	Desechar
6	Aplicar vacío pre-elución	-	300 s	90%	Desechar
7	Suave agitación de la placa	-	-	-	Desechar
8	Eluir con agua con DEPC	150 µl	120 s	40%	Eluir
9	Suave agitación de la placa	-	-	-	Eluir

2.8.1.2. Aislamiento de proteínas totales

A partir de la interfase y la fase orgánica obtenidas durante la homogenización con el reactivo *Tripure®,* se extrajeron las proteínas totales para los estudios de Western-blot (WB).

En primer lugar, se precipitó el ADN añadiendo etanol al 100% (0,3 ml de etanol por ml de *Tripure®* usado), durante 3 minutos a temperatura ambiente. Después, la muestra se

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

centrifugó a 2000 g durante 5 minutos a 4°C. A continuación, se retiró el sobrenadante y se pasó a un tubo nuevo donde las proteínas fueron precipitadas con isopropanol (1,5 ml de isopropanol por cada ml de *Tripure®*). La mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos a 4°C. El precipitado de proteínas se lavó con guanidina 0,3 M en 95% (v/v) etanol (2 ml de guanidina por cada ml de reactivo *Tripure®*) y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente, para después centrifugar a 7500 g durante 5 minutos a 4°C. Este proceso se repitió dos veces más. Para eliminar los restos de guanidina, se realizó un último lavado con 2 ml de etanol absoluto. Finalmente, el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente hasta que se evaporó todo el alcohol.

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

2.8.2. COMPROBACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ARN PURIFICADO

Para comprobar la integridad del ARN purificado se utilizó el *Agilent RNA 600 Nano Kit* como soporte electroforético y *Agilent 2100 Bioanalyzer* como instrumento de detección y análisis. Este sistema origina un electroferograma (fluorescencia/tiempo) que permite conocer la calidad del ARN generado mediante el software especializado RIN (*RNA Integrity Number*). Este programa establece una clasificación numérica de la calidad del ARN (del 1-10), siendo 1 un ARN totalmente degradado y 10 un ARN perfectamente conservado.

2.8.3. RETROTRANSCRIPCIÓN

El ARN es una biomolécula altamente inestable debido dada la alta afinidad que poseen las ARNAasas por su sustrato. Por ello, se obtuvo ADNc a partir de ARN, mediante un proceso de retrotranscripción mediado por la enzima transcriptasa inversa, capaz de sintetizar una hebra de ADN complementaria a un molde de ARN en presencia de un cebador complementario. Se obtuvo así un híbrido ARN-ADN que, tras degradar el ARN, quedará como ADN monocatenario.

En este trabajo se ha empleado el kit *High-Capacity cDNA Archive* de retrotranscripción (Applied Biosystems). La combinación de los reactivos del kit dio lugar a una mezcla de reacción 2X (Retromix, detallada en la **Tabla 2.10**) que se mezcló con nuestra muestra en proporción 1:1. Preparada la mezcla de reacción 2X, se prepararon 4 µg de ARN en un volumen final de 50 µl de agua tratada con DEPC al 0,1% (p/v). A continuación, se desnaturalizó el ARN a 65°C durante 10 minutos, y se dejó enfriar en hielo para evitar la renaturalización. Por último, añadimos 50 µl de la mezcla de reacción 2X (proporción 1:1 mezcla:muestra) a cada tubo de reacción, y se llevó al termociclador (MasterCycler Gradient, Eppfendorf; Hamburgo, Alemania) para efectuar un ciclo

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

de temperatura a 25°C durante 10 minutos (para permitir el apareamiento de los cebadores con sus secuencias complementarias), seguido de 2 horas a 37°C (para que la retrotranscriptasa sintetice el ADNc) y un calentamiento final a 85°C durante 30 segundos (para favorecer la degradación de las hebras de ARN). El ADNc así obtenido se conserva a -40 °C hasta su uso.

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

Tabla 2.10. Reactivos utilizados para la preparación de la mezcla de reacción 2X (Retromix).

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

2.8.4. RT-PCR EN TIEMPO REAL

Se denomina RT-PCR (*reverse-transcription PCR*) ya que el proceso parte de ADN obtenido a partir de ARNm mediante retrotranscripción. En la PCR a tiempo real, a diferencia de otras técnicas de PCR, el análisis de las muestras amplificadas se produce durante la misma reacción, monitorizando una señal fluorescente asociada al producto de PCR. En este trabajo hemos utilizado el termociclador *ABI 7900 HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). En la **Tabla 2.11** se muestran los marcadores analizados mediante esta técnica.

Tabla 2.11. Marcadores analizados mediante RT-PCR.

Marcadores analizados	Descripción
CD45	Receptor de membrana plasmática expresada por linfocitos, macrófagos y microglía. Implicado en la activación de células T. Marcador de macrófagos infiltrados y microglía activada.
CD68	Proteína perteneciente a la familia de las glucoproteínas de membrana asociadas a lisosomas/endosomas (LAMP) y también a la familia de los receptores *scavenger* de los macrófagos (MSR). Se encuentra en los lisosomas, endosomas y superficie celular interviniendo en la fagocitosis y en la activación de macrófagos. Marcador de microglía y macrófagos activados M1.
CX3CR1	Receptor de la proteína fractalquina, proteína transmembrana y quimiocina implicada en la adhesión y migración de macrófagos y células microgliales. Marcador de microglía.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Iba-1	*Ionized calcium binding adapter molecule*. Molécula del citoesqueleto de membrana implicada en los cambios morfológicos que se producen en la microglía. Marcador de microglía.
P2ry12	Receptor purinérgico expresado por las células microgliales. Marcador específico de microglía.
TREM2	*Triggering receptor expressed on myeloid cells 2.* Receptor expresado en células mieloides 2. Proteína transmembrana expresada por células de origen mieloide. Marcador de células microgliales activadas con fenotipo asociado a daño (DAM microglía).
Clec7a	*C-type lectin domain family 7 member A*. Receptor de membrana que reconoce patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y es necesario para la respuesta inflamatoria mediada por TLR2. Marcador de DAM microglía.
Igf1	*Insulin-like growth factor-1.* Modula la respuesta neuroinflamatoria y los fenotipos microgliales y astrocíticos. Microglía perfil DAM.
Tmem119	*Transmembrane protein 119.* Marcador de células microgliales residentes, que no aumenta su expresión ante la activación en situaciones de inflamación.

Durante el transcurso de este trabajo hemos empleado el método para detectar el producto específico amplificado por fluorescencia mediante *Taqman Gene Expression Assay® Mix 20X* (denominado comúnmente como Sondas Taqman). El procedimiento a seguir para preparar la PCR a tiempo real es ligeramente diferente en función de qué método usemos para detectar la amplificación de la diana estudiada. En el caso de usar Sondas Taqman, suministradas por Applied Biosystems, han pasado previamente controles pertinentes que garantizan tanto su especificidad como la eficiencia de amplificación para la diana en el ciclo *threshold*. El detalle de los componentes de esta reacción se especifica en la **Tabla 2.12**.

Tabla 2.12. Relación de los reactivos empleados para la amplificación por PCR a tiempo real empleando sondas Taqman. Se indican los componentes y las cantidades necesarias de cada uno.

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

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

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Tabla 2.13. Programa predeterminado de amplificación para PCR a tiempo real (Applied Biosystems).

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

Tabla 2.14. Sondas Taqman para RT-PCR. Se indican las sondas Taqman (Applied Biosystems), con su referencia, utilizadas para el análisis de expresión de ARNm mediante RT-PCR a tiempo real.

SONDA	REFERENCIA
CD45	Mm01293577_m1
CD68	Mm03047340_m1
Clec7	Mm01183349_m1
CX3CR1	Mm02620111_s1
GADPH	Mm99999915_g1
Iba-1	Mm00479862_g1
IGF-1	Mm00439560_m1
P2ry12	Mm01950543_s1
TMEM119	Mm00525305_m1
TREM2	Mm0420944_g1

Para comprobar que durante el proceso de amplificación con sondas Taqman no se habían producido dímeros de cebadores, que la secuencia amplificada era la correcta y que existía una cantidad detectable, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (**apéndice 2.11.19**). Una vez en la cubeta de electroforesis que contiene el tampón TBE 10x, se cargaron las muestras junto con tampón de carga y un marcador de 100 pares de bases (10 ng/ml; Superladder-low 100bp ladder, Gensura Laboratories INC.) como patrón. Se cargaron 8 µl de patrón junto con 4 µl de tampón de carga, así como 5 µl de muestra y 5 µl de tampón de carga y se inició la electroforesis a un voltaje constante de 190 V. Finalmente, los geles fueron visualizados bajo la luz ultravioleta y se fotografiaron con una cámara Polaroid®.

2.8.5. AISLAMIENTO DE SINAPTOSOMAS Y FRACCIONES SOLUBLES HIPOCAMPALES DE RATÓN EN GRADIENTES DE FICOLL PM400

Los sinaptosomas aislados son ampliamente utilizados para el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la patología sináptica en la EA (Castegna et al., 2004; Fein et al., 2008; Gong et al., 2009). En este trabajo se han utilizado para detectar péptidos Aβ mediante WB (ver Tabla 2.17). El método seguido para aislar sinaptosomas de los animales WT y transgénicos de 6 meses (N=4/grupo) está basado en el descrito por Booth y Clark en 1978 (Vitorica y Satrustegui, 1986), y ha sido realizado por el grupo del Dr. Javier Vitorica de la Universidad de Sevilla: los sinaptosomas formados durante el proceso de homogenización precipitan a 12000 x g a 4°C, y se aíslan por flotación en un gradiente discontinuo de Ficoll

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

PM400, que consta de tres fases: 13%, 7% y 0% (p/v). Los sinaptosomas se diferencian en la interfase entre el 13% y el 7% (p/v).

El protocolo consta de los siguientes pasos: el hipocampo de los animales fue descongelado, pesado y homogeneizado (homogeneizador Dounce's, Wheaton) en 2 ml de solución de trabajo isotónica (0,32 M sacarosa, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA en tampón Tris-CLH pH 7,4) a 4°C, junto con inhibidores de proteasas y fosfatasas, utilizando 50 pases del pistilo con menor diámetro (paso de luz: 0,089-0,14mm), y 20 pases del que tiene mayor diámetro (paso de luz: 0,025-0,076 mm). Este homogeneizado fue centrifugado a 1500g durante 10 minutos a 4°C, y el sobrenadante postnuclear se volvió a centrifugar a 12600g durante 20 minutos a 4°C, obteniéndose un pellet (fracción mitocondrial cruda: contiene las mitocondrias libres y englobadas en sinaptosomas), y un sobrenadante en el que estaban las membranas microsomales y las proteínas solubles del citosol/medio extracelular. A partir del pellet se obtuvo la fracción sinaptosomal, y del sobrenadante las fracciones microsomal y soluble (S1). Se resuspendió el pellet producto de la centrifugación a 12600 x g en 0,65 ml de Ficoll al 16% (p/v) en tampón de trabajo isotónico a 4°C, y se llevó hasta un volumen final de 0,8 ml para conseguir una fase de Ficoll al 13% (p/v).

Para formar el gradiente discontinuo de Ficoll, se depositó sobre esta fase otra de 0,8 ml de Ficoll al 7% (p/v), y una más de 0,4 ml de la solución isotónica de trabajo sin Ficoll. Este gradiente se centrifugó durante 45 minutos a 100000 g, a 4°C. Se aspiró la interfase del 13 al 7% Ficoll (fracción sinaptosomal), y se diluyó con 12 ml más de la solución de trabajo isotónica a 4°C, para conseguir que los sinaptosomas precipitaran por centrifugación. Para ello se centrifugó a 12600 g durante 20 minutos a 4°C, se lavó el pellet de sinaptosomas y se resuspendió en 150 µl de la solución de trabajo isotónica con inhibidores de proteasas/fosfatasas (2x). A continuación, se centrifugó el sobrenadante (procedente de la centrifugación a 12600 g) a 100.000 g durante 45 minutos a 4°C en un rotor TLA-110 (Beckman-Coulter) obteniéndose un nuevo sobrenadante (fracción de proteínas solubles a la que hemos denominado S1) y un pellet, correspondiente a la fracción microsomal (orgánulos celulares, excepto mitocondrias). Este pellet se lavó en solución de trabajo isotónica, y se resuspendió en 150 µl del mismo tampón de trabajo con inhibidores de proteasas/fosfatasas (2x). Tras determinar la cantidad de proteína mediante micro-Lowry, todas las fracciones obtenidas siguiendo este protocolo se alicuotaron y congelaron a -80°C hasta su uso.

Como control interno de la eficiencia del asilamiento de sinaptosomas se empleó la detección por WB de la enzima ATP-sintetasa-β mitocondrial. Las mitocondrias libres no pueden flotar en Ficoll al 13% (p/v), por lo que la detección de este marcador en la interfase del 13% al 7% (p/v) Ficoll indica la presencia e integridad de los sinaptosomas aislados. Esta enzima no fue

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

encontrada en la fracción microsomal, lo que indica que prácticamente la totalidad de las mitocondrias fueron precipitadas.

2.8.6. WESTERN-BLOT

Esta técnica permite la cuantificación de proteínas específicas presentes en el tejido. Comienza con la electroforesis de las proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-SDS (**apéndice 2.11.20**) o poliacrilamida-SDS-Urea (**apéndice 2.11.21**), para separarlas en relación su movilidad electroforética. Dicha separación depende del tamaño de la proteína en cuestión: las proteínas de mayor peso molecular migran una menor distancia que aquellas con menor peso molecular, y se separan entre ellas más o menos dependiendo de la concentración de acrilamida del gel de corrido. La realización del gel será diferente en función del tamaño de la proteína a visualizar, de manera que para proteínas de gran peso molecular se utilizará un porcentaje bajo de poliacrilamida (el gel poseerá poros de mayor tamaño) y viceversa. Los geles de poliacrilamida-SDS usados en el presente trabajo han variado del 10-14% de acrilamida. El gel de poliacrilamida-SDS puede realizarse en tampón glicina o en tampón tricina, en función del peso molecular de las proteínas a separar. En este trabajo se han utilizado geles de tricina al 14% y geles de glicina al 10%. Las cantidades de reactivos utilizados para preparar dichos geles se especifican en la Tabla 2.15 y en la Tabla 2.16.

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

Reactivos	Gel de Corrido (*Running*)	Gel de Empaque (*Stacking*)
Acrilamida + Bisacrilamida (49,5%)	1,52 ml	202 µl
Tris-HCl 2,5M pH 8,45	1,8 ml	620 µl
Agua	1,72 ml	1,64 ml
SDS (10%)	47 µl	30 µl
TEMED	10 µl	5 µl
Persulfato Amónico (50%)	10 µl	15 µl

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

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

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

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

Una vez terminada la electroforesis, se transfirieron las proteínas desde el gel hasta una membrana de nitrocelulosa o PVDF (si la electroforesis es con gel SDS-Urea). La transferencia se llevó a cabo usando el sistema en sándwich (Bio-Rad), en una cubeta de tampón de transferencia, durante 90 minutos a 310 mA. Una vez terminada la transferencia, lavamos la membrana con PBS, y bloqueamos con leche al 5% en 0,1% (v/v) de Tween-20 en PBS 0,1 M (TPBS) pH 7,4 durante 30 minutos. Las proteínas transferidas a la membrana se observaron mediante tinción con rojo Ponceau's al 0,1% en ácido acético 5%. A continuación, incubamos la membrana con el anticuerpo primario (en TPBS-leche al 1,5%) durante toda la noche a 4°C. La relación de los anticuerpos empleados y sus características más relevantes se detallan en la **Tabla 2.17**. Terminada la incubación, lavamos la membrana con TPBS (3 x 5 minutos) e incubamos en el anticuerpo secundario acoplado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP), capaz de procesar un sustrato (ECL-plus) originando un producto quimioluminiscente cuya señal será proporcional a la cantidad de proteína específica de la muestra. La señal quimioluminiscente obtenida se revela en cuarto oscuro utilizando películas fotográficas (Hyperfil-ECL, Amersham; revelador y fijador Kodad). Todos los anticuerpos secundarios se incubaron como mínimo durante 1 hora a temperatura ambiente en TPBS. La señal quimioluminiscente fue recogida con el sistema de captación IQ LAS 4000 mini gold. Finalmente, la intensidad de las bandas de las películas se determinó utilizando el *software* PCBAS v2.0 sobre las imágenes escaneadas (Epson 3200). Los resultados obtenidos fueron normalizados con respecto a su correspondiente banda de β-actina.

2.8.7. DOT-BLOT

La técnica dot-blot se empleó para detectar la presencia de formas específicas de Aβ en las fracciones solubles, sin separarlas por su tamaño. Se colocó una gota de muestra con una cantidad conocida de proteínas (3 µg) sobre la membrana de nitrocelulosa y se dejó secar durante 30 minutos. La membrana se lavó con TBS-T durante 10 minutos seguido de tampón de bloqueo (BSA al 5% en TBS-T) durante una hora. A continuación, se incubó en el anticuerpo primario correspondiente (**Tabla 2.17**) diluido en BSA 5% en TBS-T, durante una noche a 4°C. Después, se siguieron los mismos pasos que para el WB. Lavamos la membrana 3 veces con TBS-T, y seguidamente se incubó en el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a la peroxidasa de rábano, diluido en BSA 5% en TBS-T, durante 1 hora. A continuación, se realizaron

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

4 lavados con TBS-T y la membrana fue incubada en el líquido de revelado (SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate) durante 5 minutos, en oscuridad. La señal se reveló en películas de rayos X (Premium Clear Blue X-ray Film) usando el sistema de captación AFP Mini Med X-Ray Film Processor (AFP manufacturing).

Tabla 2.17. Marcadores detectados mediante WB o dot-blot. Se indica la proteína o antígeno diana reconocido por el anticuerpo, su dilución de uso, el tamaño de la banda reconocida, el animal de obtención y la a la casa comercial.

PROTEÍNA/ ANTÍGENO DIANA y ANTICUERPO	DILUCIÓN ANTICUERPO	BANDA RECONOCIDA	ANIMAL DE OBTENCIÓN	CASA COMERCIAL; REFERENCIA
Aβ (clon 6E10)	1/5000	4,5 kDa (1 mer)	Ratón	Signet, 6E10
Aβ (clon 82E1)	1/500	4,5 kDa (1 mer)	Ratón	IBL; 82E1
Aβ oligomérico prefibrilar (OC)	1/1000	Dot-blot	Conejo	Millipore, ref. AB2286
Aβ oligomérico soluble (A11)	1/500	Dot-blot	Conejo	Cedido por Dr. C. G. Gable
β-actina	1/5000	43 kDa	Ratón	Sigma; A5316
APP C-terminal	1/6000	6-11 kDa	Conejo	Calbiochem; 751-770
Fosfo-tau, Ser199/202-Thr205 (clon AT8)	1/1000	79 kDa	Ratón	Thermo-Fisher; MN1020
Fosfo-tau, Thr212-Ser214 (clon AT100)	1/1000	79 kDa	Ratón	Thermo-Fisher; MN1060
Fosfo-tau, Thr231 (clon AT180)	1/1000	79 kDa	Ratón	Thermo-Fisher; MN1040
ChAT	1/1000	75 kDa	Cabra	Millipore; AB144
PSD95 (proteína de densidad postsináptica 95)	1/2000	95 kDa	Conejo	Cell Signaling; #2507
Sinaptofisina	1/1000	50 kDa	Conejo	Synaptic systems; 101002
Tau12 (Tau total; extremo N-terminal)	1/1000	50 kDa	Ratón	Millipore; MAB2241
Tau46 (Tau total, extremo C-terminal)	1/1000	50 kDa	Ratón	Cell Signaling; 4019S
Ubiquitina	1/1000	66 kDa	Conejo	Dako; z0458
VGAT	1/5000	50-60 kDa	Conejo	Synaptic Systems; 131003
VGLUT1	1/2000	50-60 kDa	Conejo	Synaptic systems; 135302

2.8.8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE BACE-1 Y γ-SECRETASA

La actividad de BACE-1 se determinó utilizando un kit comercial (R&D Systems, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante (Torres et al., 2012). Membranas frescas procedentes del hipocampo de animales APP/PS1 fueron solubilizadas en el tampón suministrado por el fabricante, se centrifugaron a 10.000xg (15 min a 4 ° C) y el sobrenadante (100-200 µg de proteína) se usó para el ensayo de BACE-1. La determinación de la actividad se realizó usando los sustratos suministrados por el fabricante. Para el ensayo enzimático, la intensidad de fluorescencia se determinó cada 15 minutos (desde la adición de sustrato) para un tiempo final de incubación de 1-2 horas. Se usó un lector de microplacas Synergy HT Multi-mode (Biotek). La actividad fue calculada teniendo en cuenta la máxima pendiente de la

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

intensidad de fluorescencia con respecto al tiempo y corregida posteriormente en función de la cantidad de proteína añadida.

La actividad de la γ-secretasa se determinó siguiendo un protocolo previamente descrito con algunas modificaciones (Tamboli et al., 2011). En primer lugar, las membranas de la corteza cerebral de animales APP/PS1 fueron aisladas y resuspendidas (a 3 mg de proteína por ml) en tampón citrato 150 mM, pH 6,4, que contiene inhibidores de proteasa (Roche). Se usaron alícuotas de 150 µg de proteínas para cada ensayo. Las muestras fueron incubadas, a 37 °C con agitación orbital, durante 2 horas en ausencia (solución vehículo) o presencia de EpoD (100 nM). Después de la incubación, las membranas fueron sonicadas a 80 W durante 30 segundos, y centrifugadas a 30.000xg (30 minutos, 4 °C). Los sobrenadantes se usaron para determinar la producción de AICD mediante WB usando el anticuerpo anti-APP C-terminal. Como control negativo, las membranas se mantuvieron en hielo (4 °C) y se trataron como se ha descrito anteriormente.

2.9. ESTUDIOS *IN VITRO:* CULTIVOS CELULARES DE NEURONAS N2A-APP

Para los estudios *in vitro* del efecto de la EpoD sobre el procesamiento proteolítico de APP y la producción de Aβ, se utilizaron células de neuroblastoma de ratón transfectadas de manera estable con el gen humano APP con la mutación *Swedish* que fueron generosamente donadas por el Dr. Gopal Thinakaran (Universidad de Chicago). Las células N2aAPPswe se cultivaron siguiendo un protocolo preestablecido (Vetrivel et al., 2005) en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium) al 45% y Opti-MEM (Invitrogen) al 50%, suplementado con 5% de suero bovino fetal. Para el tratamiento se diluyó una solución inicial de EpoD, pasada por un filtro de 0,2 µm, en el mismo medio a una concentración final de 100 nM. Este medio se mantuvo durante 12 o 24 horas antes de recolectar las células y aislar el ARN y las proteínas como se describió anteriormente (**Apartado 2.8.1**).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2.10. TOMOGRAFÍA POR EMISIÓN DE POSITRONES (PET)

El radiotrazador fluorado de tau (^{18}F-THK-5351) fue inyectado en animales P301S y sus correspondientes controles en un estudio longitudinal, desde los 6 hasta los 12 meses de edad (N=10/grupo), con la idea de validar este ligando como herramienta de seguimiento *in vivo* de la progresión de la patología tau. Este experimento fue realizado durante una estancia predoctoral en el laboratorio de Neurología dirigido por la Dra. Inés Moreno y el Dr. Claudio Soto, en el *Mitchell Center Alzheimer´s Disease and Related Brain Disorders* de la Universidad de Texas *Health Science Center* en Houston (EEUU). Para el PET, los animales fueron transportados al *M.D. Anderson Cancer Center* (MDACC) de la Universidad de Texas.

Los ratones fueron analizados a la edad de 6, 8, 10 y 12 meses de edad longitudinalmente. Para ello, fueron anestesiados usando isofluorano al 2%, y a continuación se les introdujo un catéter en la vena de la cola. Los animales anestesiados fueron colocados en el escáner PET/SPECT/CT (**Fig. 2.21**; Bruker Biospin Corp., Billerica, MA, USA). A través del catéter, se les inyectó una infusión intravenosa de aproximadamente 150 µCi del trazador radiactivo (^{18}F-THK5351), seguido de un enjuague con suero salino. El protocolo de adquisición de imágenes consistió en 20 minutos de PET, seguido de 3 minutos de CT (Tomografía computerizada; 400 µA, 45 kV, 120 proyecciones) que permite obtener imágenes que sirven de referencia anatómica (**Fig. 2.22**). Los datos del PET fueron adquiridos como un listado que se representó gráficamente en 22 intervalos de tiempo (15x20s, 5x60s, 2x300s). Las imágenes fueron reconstruidas usando el método MLEM (Maximum Likelihood Expectation Maximixation) con 12 iteraciones.

Figura 2.21. Equipo de escáner para tomografía de emisión de positrones (PET) de la Universidad de Texas Health Science Center (Houston, EE. UU.).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

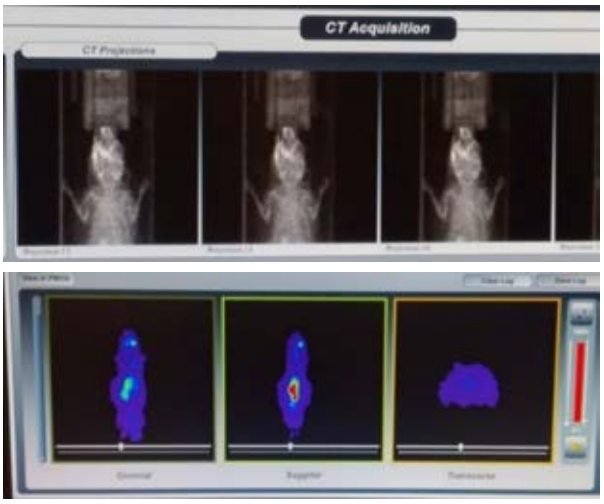


Figura 2.22. Obtención de imágenes mediante tomografía axial computerizada (CT) y tomografía de emisión de positrones (PET). En la imagen superior se muestran las imágenes adquiridas mediante CT, que una vez superpuestas con las del PET, permitirán ubicar anatómicamente la señal del radioligando. La imagen inferior muestra la localización del trazador en secciones digitales (coronal, sagital y transversal) del animal con el programa PMOD. Se observa mayor intensidad de señal en el hígado (en color rojo en la sección sagital), por ser el órgano de metabolización del contraste, y en otros órganos altamente irrigados, como los ojos (color celeste/verde claro).

Se aplicaron las correcciones necesarias sobre dispersión, atenuación y coincidencias azarosas de la señal. El análisis fue realizado con el programa informático PMOD (PMOD Technologies Ltd., Zürich, Switzerland). El SUV-bw (g/ml) (valor de retención estandarizado basado en el peso corporal, del inglés *standarized uptake value based on body weight*) de cada región cerebral, así como el del tejido muscular normal, fue obtenido durante el escaneo. A efectos de normalización de la señal, se calculó una relación entre el tejido cerebral y muscular.

2.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo empleando los programas SigmaStat 3.5 (SPSS Inc., Chicago, USA) y GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, California, USA). En general, en los estudios histológicos, los valores han sido representados como la media del grupo ± la desviación standard (SD), salvo que se especifique lo contrario. Se aplicó el análisis de la varianza (ADEVA) de una vía, y para las pruebas post-hoc se aplicaron T de Student, Bonferroni, Tukey o la prueba U de Mann-Whitney (datos no paramétricos). Para los experimentos conductuales, las diferencias significativas entre los grupos se evaluaron mediante el análisis de varianza (ADEVA) de una vía (OF, OLT, NOR, laberinto en Y, laberinto en Y específico de contexto y fase de retención del MWM) o de dos vías (fase de adquisición y prueba de plataforma visible del MWM, Barnes y PET), seguidos de las pruebas a posteriori para múltiples comparaciones (Tukey, Sidak o según procediera). Asimismo, se ha utilizado estadística no paramétrica (Kruskal-Wallis) cuando los datos no han cumplido los criterios de normalidad y homogeneidad de las varianzas. Para los análisis de correlación entre variables se empleó el coeficiente de *Pearson* (muestras paramétricas). El nivel de significación en las pruebas es de $p<0,05$, señalado con una estrella (*), $p<0,01$ señalado con dos estrellas (**), $p<0,001$ señalado con tres (***) y $p<0,0001$ señalado con cuatro (****).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2.12. APÉNDICE

2.12.1. TAMPONES PARA INMUNOHISTOQUÍMICA

Tampón fosfato (PB) 0,4 M pH 7,4

Dihidrógenofosfato sódico ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)	13,8 g
Hidrógenofosfato disódico ($NaHPO_4 \cdot 2\ H_2O$)	53,4 g
H_2O desionizada (H_2Od)	hasta 1000 mL

Disolver, ajustar pH 7,4 empleando NaOH y enrasar.

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

Cloruro sódico NaCl	9 g
PB 0,4 M pH 7,4	250 mL
H_2Od	hasta 1000 mL

Disolver, ajustar el pH a 7,4 y enrasar.

Tampón Citrato sódico 50 mM, pH 6

Citrato Sódico	1,47 g

Una vez ajustado el pH a 6 con NaOH, enrasar con H_2Od hasta volumen final de 100 mL.

2.12.2. SOLUCIÓN FIJADORA

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

Paraformaldehído $(CH_2O)n$	8 g
L-lisina monoclorhidrato $C_6H_{15}ClN_2O_2$	2,74 g
Metaperyodato sódico $INaO_4$	0,428 g
PB 0,4 M, pH 7,4	50 mL
H_2Od	150 mL

1. Disolver 8 g de paraformaldehído en 100 mL de agua destilada a una temperatura de 60°C. Añadir unas gotas de NaOH hasta que el paraformaldehído se haya disuelto totalmente.
2. Filtrar y dejar enfriar.
3. Por otro lado, en 50 mL de PB 0,2 M pH 7,4, disolver la L-lisina y el metaperyodato sódico. Filtrar y mezclar con la solución de paraformaldehído.

Enrasar hasta 200 mL con agua destilada.

2.12.3. SOLUCIÓN CRIOPROTECTORA

Sacarosa al 30%

Sacarosa $C_{12}H_{22}O_{11}$ (Panreac)	90 g
Azida sódica al 10% (Panreac)	60 µl
PBS 0,1 M hasta	300 mL

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2.12.4. PROTOCOLO DE POSTFIJACIÓN EN PLP Y CRIOPROTECCIÓN CON SOLUCIÓN DE SACAROSA

1. Tras la extracción, el órgano se coloca en un bote de cristal que contiene PLP (fijador).
2. Se realiza un cambio de solución fijadora recién preparada, al día siguiente de la perfusión y extracción.
3. A las 24 horas, el órgano se pasa a solución crioprotectora (**ver 2.11.3**). Se mantiene a 4°C y se deja hasta que se hunda completamente (72 horas).
4. Congelación de los órganos pertinentes en nieve carbónica y almacenaje a -80°C hasta el corte de las secciones.

2.12.5. PORTAOBJETOS GELATINIZADOS

Solución de gelatina

Gelatina oro	1 g
Alumbre de cromo ($KCr(SO_4)_2 \cdot 12\ H_2O$)	0,1 g
H_2Od	200 mL

1. Disolver gelatina en H_2Od a 60°C.
2. Añadir alumbre de cromo.
3. Filtrar solución.

Gelatinizado de portaobjetos

1. Desengrasar los portaobjetos en una solución de alcohol absoluto: éter (1:1) (Panreac) durante al menos 24 horas.
2. Secar los portaobjetos.
3. Sumergirlos en solución de gelatina recién preparada durante 10 segundos.
4. Sumergirlos 10 veces seguidas en la solución de gelatina y escurrir brevemente el exceso de gelatina inclinando los portaobjetos por su lado esmerilado.
5. Dejar secar en la estufa a 37°C durante un día. Los portaobjetos gelatinizados mediante este procedimiento son viables durante al menos dos meses desde el momento de su preparación.

2.12.6. PREPARACIÓN 3'3-DIAMINOBENCIDINA (DAB) TETRAHIDRO-CLORHÍDRICO AL 0,05%

Tampón Tris-Clorhídrico 0,1 M, pH 7,4

Tris 50 mM	0,06 g
H_2Od	50 mL
Ajustar pH con ácido clorhídrico	
Disolver DAB	0,3 g

Una vez filtrado, el DAB-Tris 0,05% se almacenó en alícuotas de 500 µl a -20°C hasta su uso.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2.12.7. SOLUCIÓN DE REVELADO DAB 0,05% - NÍQUEL 0,03%

Níquel Sulfato amónico	0,012 g
PBS 0,1 M, pH 7,4	15 mL
DAB-Tris 0,05%	500 µl

Primero se diluye el níquel en el tampón PBS. Luego se añade el DAB-Tris ya descongelado y finalmente se filtra. Para que la reacción comience, es necesario añadir peróxido de hidrógeno al 0,01% en PBS 0,1 M.

2.12.8. SOLUCIÓN DE REVELADO DAB 0,05%

Se prepara de igual manera que la solución de revelado anterior, pero sin añadir níquel.

2.12.9. TINCIONES

Tioflavina-S 0,02 %

Tioflavina S	0,02 g
Etanol 50º	10 mL

Mantener en oscuridad

Rojo congo

Rojo congo (Stock al 1% en H_2Od)	2 mL
NaCl	0,3 g
Etanol 100º	8 mL

Filtrar antes de usar

Azul de toluidina

Azul de Toluidina	0,5 g
Tetraborato sódico decahidratado ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$)	0,5 g
H_2Od	100 ml

En primer lugar, disolver, por un lado, el colorante azul de toluidina en 50 ml de agua destilada y, por otro, el tetraborato sódico en 50 ml de agua destilada. A continuación, mezclar ambas disoluciones a partes iguales y filtrar.

Tinción de Gallyas

- Ácido periódico al 5%: 50 g ácido periódico en 1 L de H_2Od

- Nitrato de plata al 1%: 2 g nitrato de plata en 200 mL H_2Od (oscuridad)

- Solución de ioduro de plata:

Hidróxido sódico	12 g en 150 mL H_2Od
Ioduro potásico	30 g
Nitrato de plata 1%	10,5 mL
H_2Od	hasta 300 mL

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

- Solución de revelado: 200 mL A + 100 mL B + 100 mL C
- Solución de revelado A: 50 g carbonato de sodio en 1L H_2Od

- Solución de revelado B:

Nitrato de amonio	1,9 g
Nitrato de plata	2 g
Ácido tungstosilícico	10 g
H_2Od	1 L

- Solución de revelado C:

Nitrato de amonio	1,9 g
Nitrato de plata	2 g
Ácido tungstosilícico	10 g
Formaldehído al 37%	7,6 mL
Enrasar hasta 1 L H_2Od	

2.12.10. PROTOCOLO DE DESHIDRATACIÓN Y MONTAJE

H_2O desionizada	15 minutos
Etanol 50º	10 minutos
Etanol 70º	10 minutos
Etanol 96º	10 minutos
Etanol 100º	10 minutos
Disolvente natural (Xileno)	15 minutos
Montaje con DPX	

2.12.11. MEDIO DE MONTAJE DABCO (1,4-DIAZABICICLO [2.2.2] OCTANO)

1. Preparar una mezcla en proporción (1:1) de PBS 0,1 M pH 7,4 y Glicerol.
2. Diluir 3% de DABCO en la mezcla preparada.
3. Guardar el DABCO a 4°C y en oscuridad.

2.12.12. AGAROSA AL 3% EN H_2O DESTILADA

3 g de Agarosa en 100 mL de H_2Od

1. Añadir la agarosa al agua destilada previamente calentada y agitar de manera constante hasta conseguir su solubilización.
2. Verter la agarosa en el molde y dejar enfriar unos segundos antes de introducir el tejido fijado a encastrar.

2.12.13. TETRÓXIDO DE OSMIO 1% EN PB 0,1 M PH 7,4

Tetróxido de osmio al 4% y PB 0,1 M.

Mezclar ambos compuestos en una proporción 1:3, respectivamente.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2.12.14. CONTRASTADO EN BLOQUE DEL TEJIDO

Acetona al 70 %
Uranilo al 1%

Ambos compuestos se mezclan por agitación, en la cantidad que se necesite e inmediatamente antes de su uso. Este proceso debe realizarse con material de plástico desechable y en el servicio de radioisótopos de los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Málaga.

2.12.15. RESINA PARA LA INCLUSIÓN DEL TEJIDO (ARALDITA)

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

Para la preparación de la resina, que debe realizarse en el momento de su uso, se añade primero la araldita y seguidamente el DDSA, y se mezclan bien ambos con una varilla de vidrio hasta que queden perfectamente mezclados y sin burbujas. Por último, se añade el acelerador DMP-30 y se mezcla igual que los compuestos anteriores.

2.11.16. SOLUCIÓN DE CRIOPROTECCIÓN (MET)

H_2O destilada	77,5 ml
Azida sódica al 10%	200 µl
Glicerol	10 ml
PB 0,1M	12,5 ml
Sacarosa	25 g

2.11.17. SOLUCIÓN DE BLOQUEO 1 (DILUYENTE DE LOS ANTICUERPOS MET)

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

2.11.18. SOLUCIÓN DE BLOQUEO 2 (MET)

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

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2.11.19. GEL DE AGAROSA PARA ELECTROFORESIS

Tampón TBE 10x

Tris	108 g
Ácido bórico	54 g
EDTA	40 ml

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

Gel agarosa 1,5%

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

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

Tampón de carga

Azul de bromofenol	25 mg
Tris 500 mM pH 7,4	1 ml
Glicerol al 87%	10 ml
H_2Od hasta 50 ml	

2.11.20. GEL DE ACRILAMIDA 16%-SDS PARA ELECTROFORESIS / GEL DE EMPAQUE 3%

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

1. Para preparar el gel de poliacrilamida (*running-gel*) se combinan los reactivos y se vierte la mezcla entre los cristales del molde (Bio-Rad) compatibles con el sistema de electroforesis Mini-Protean 3.
2. Una vez polimerizado el gel, preparar el gel de empaque (*staking-gel*), verter sobre el gel de corrido e introducir los peines molde.
3. Cuando el gel de empaque ha polimerizado, retirar los peines y acoplar los geles al sistema de electroforesis. Añadir a la cubeta el tampón para electroforesis, asegurando el contacto de los geles con dicho tampón.

a. Tampón gel corrido (4x): SDS al 0,4% en 1,5 M Tris-HCl pH 8,8
b. 0,25 M Tris-HCl pH 6,8

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2.11.21. GEL DE ACRILAMIDA-SDS-UREA 8 M PARA ELECTROFORESIS / GEL DE EMPAQUE 3% / GEL DE CARGA (SEPARACIÓN ISOFORMAS DE AB)

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

1. Preparar el gel de corrido (10 ml, 2 geles grosor 0,75 mm): 8 M Urea-9,5% acrilamida y 0,5% bisacrilamida (10% T 5%C), 0,25% SDS en tampón Tris-H_2SO_4 pH 8,1. Para la construcción de este gel combinamos los reactivos en las proporciones detalladas, sin añadir persulfato amónico (PSA) ni TEMED, para evitar la polimerización. Agitamos la mezcla durante 30 minutos hasta que la urea quede disuelta, añadimos los catalizadores, vertemos 5 ml entre los cristales y esperamos la polimerización durante 30 minutos.
2. Una vez finalizada la polimerización del gel de corrido, preparamos el gel de empaque (4 ml, 8-10 geles de groso 0,75 mm): 5,8% acrilamida y 0,2% bis-acrilamida (6% T 3% C), 0,25% SDS en un medio Bis-tris- H_2SO_4 pH 6,7 siguiendo las combinaciones descritas. Vertemos 350 µl de la mezcla entre los cristales y esperamos 30 minutos hasta que polimerice. A diferencia de los geles de poliacrilamida-SDS, en este caso, además de un gel de empaque, también debemos preparar un gel de carga, donde se introduce el peine molde adecuado para conseguir las hendiduras donde cargar las muestras.
3. La composición del gel de carga (4 ml, 8-10 geles de grosor 0,75 mm): 5,8% acrilamida y 0,2% bis-acrilamida (6% T 3% C), 0,25% SDS en un medio Bis-Tris-Bicina pH 7,7. Una vez preparado el gel, pasamos a mezclar la cantidad de muestra necesaria con tampón de carga en una proporción 1:1. Para los geles de urea siempre se ha utilizado voltaje constante (100 V) durante 1 hora y 40 minutos.
    a. Tampón gel corrido (4x): 0,4 M ácido sulfúrico y 1,6 M Tris, pH 8,1.
    b. Tampón gel empaque (2x): Solución 0,8 M Bis-Tris y 0,2% ácido sulfúrico, pH 6,7.
    c. Tampón gel de carga "*well-buffer*" (2x): Solución 0,72 M Bis-Tris y 0,32 Bicina, pH 7,7.
    d. Tampón de electroforesis para el ánodo: 200 mM Tris y 50 mM ácido sulfúrico, pH 8,1.
    e. Tampón de electroforesis para el cátodo: 200 mM Bicina, SDS y 100 mM NaOH, pH8,2.
    f. Tampón de carga para muestras (2x): 0,72 M Bis-Tris, 0,32 Bicina, 30% sacarosa, 2% SDS y 0,015% azul de bromofenol.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2.11.22. LISTADO DE REACTIVOS

Acetato de uranilo al 1% (Idistec, Ref. #22400)
Acetona (Panreac, Ref. 141007.1211)
Ácido acético glacial (Panreac, Ref. 141008.1611)
Acrilamida (Serva, Ref. 10675)
Agarosa (electroforesis) (Ecogen, Ref. AG-120)
Agarosa (Gellyphor, Ref. EMR010100)
Alumbre de cromo (Panreac, Ref. 141284)
Araldita 502 kit (Electron Microscopic Sciences, Ref. 13900)
Azida sódica (Panreac, Ref. 122712.1608)
Azul de bromofenol (Sigma, Ref. B0126)
Azul de toluidina (Farmitalia Carlo Erba, Ref. 429282)
Bicina (Sigma, Ref. B3876)
Bisacrilamida (Sigma, Ref. M7256)
Bromuro de Etidio (Amresco, Ref. E406)
BSA (Sigma-Aldrich, Ref. A7906)
Buprenorfina 0'3 mg/ml (Divasa-Farmavic)
Citrato sódico (Panreac, Ref. 131655)
Cloruro de oro (Sigma-Aldrich, Ref. HT1004-100ML)
Cloruro potásico KCl (Panreac, Ref. 141494)
Cloruro sódico (NaCl) (Panreac, Ref. 131659)
DAB, 3,3'-diaminobencidina tetrahidroclorhídrico (Sigma-Aldrich, Ref. D5637)
DABCO (Sigma-Aldrich, Ref. D-2522)
DDSA (Dodecenyl succinic anhydride) (Idistec, Ref. #13700)
DEPC (dietilpirocarbonato) (Sigma, Ref. D5758)
Dihidrógenofosfato sódico (Merck, Ref. 1.06346)
DMP-30 (Tri D-Metilaminoetilfenol) (Electron Microscopy Science, Ref. 13600)
DNAsaI (Roche, Ref. 03 539 121 103)
Durcupan (Sigma-Aldrich, Ref. 44610)
DPX medio de montaje (Sigma-Aldrich, Ref. 06522)
EDTA (Ácido EtilenDiaminoTetraAcético) (Sigma, Ref. E9884).
Etanol absoluto parcialmente desnaturalizado (Panreac, Ref. 212801.1214)
Etanol absoluto deshidratado (Merck, Ref. 1.00983.1000)
Éter dietílico (Panreac, Ref. 212770.0311)
ExtrAvidin® (Sigma Aldrich, Ref. E-2886)
FastStart SYBR-Green Master Mix 2x (Roche)
Filtro de nylon diámetro 100 µm (Fisher Scientific)
Gelatina oro (Panreac, Ref. 251336)
Gelatina de pescado (Sigma-Aldrich, Ref. G7041-100G
Glicerol (Panreac, Ref. 141339)
Glicina (Applichem, Ref. A1377)
Glutaraldehído 25% (Electron Microscopy Science, Ref. 16210)
Hidróxido sódico NaOH (Acros Organics)
Inhibidores de fosfatasas (ThermoFisher Scientific, Ref. 78420)

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

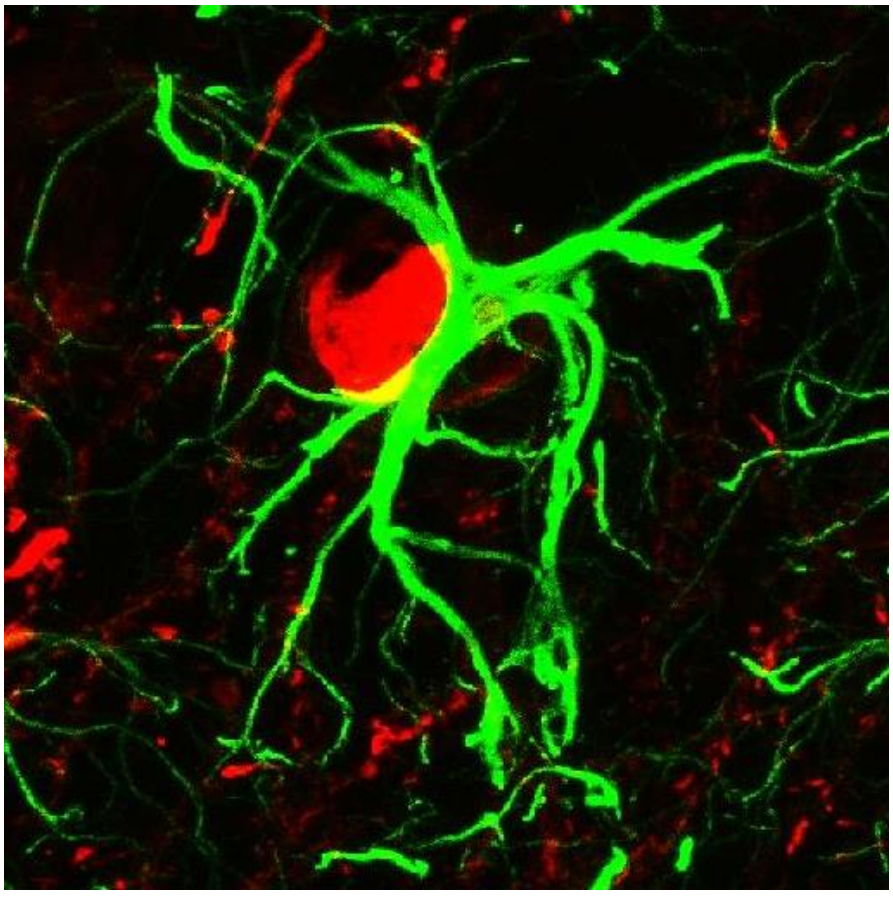
Inhibidores de proteasas (Roche, Ref. 4693116001)
Kit Actividad BACE-1 (Merck, 565785-1)
Kit bloqueo Avidina/Biotina (Vector Labs, Ref. SP-2001)
Kit de eliminación de autofluorescencia (Millipore, Ref. 2160)
Kit HQ SILVER™ (Nanoprobes, Ref. 2012)
L-Lisina monoclorhidrato (Merck, Ref. 1.05700)
Membranas de nitrocelulosa dot blot, 0,2 µm, 8cm x 8cm (ThermoFisher, Ref. 88024)
Membranas de nitrocelulosa western blot, iBlot 2 Transfer Stacks (Invitrogen, Ref. IB23001)
Metanol (Panreac, Ref. 141091.1211)
Níquel sulfato amónico (Farmitalia Carlo Erba, Ref. 464545)
Paraformaldehído (Merck, Ref. 1.04005)
PBS (Sigma, Ref. P4417)
Pentobarbital sódico 20% (Dolethal®, Vetequinol S.A.)
Percoll (Sigma, Ref. P1644)
Peróxido de hidrógeno 30% (Panreac, Ref. 107210.0250)
Rojo congo (Sigma-Aldrich, Ref. C6277)
Tetróxido de osmio 1% (Electron Microscopic Sciences, Ref. 19150)
Tioflavina-S (Sigma-Aldrich, Ref. T1892)
Tiosulfato sódico (Panreac, Ref. 141721)
Tris-clorhídrico (Tris-HCl) (Panreac, Ref. A3981)
Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, Ref. T9284)
Xileno (Panreac, Ref. 141769.2711)

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

3. RESULTADOS



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

La mayoría de las estrategias terapéuticas dirigidas a paliar la enfermedad de Alzheimer típicamente han fijado como diana a la patología amiloide. Los repetidos fracasos siguiendo este enfoque han desviado la atención hacia otros agentes involucrados en el proceso patológico: la proteína tau y la neuroinflamación. No obstante, aún se desconocen gran parte de los mecanismos que subyacen y conectan a estos dos aspectos de la patología y menos aún la relación que se establece entre ellos, así como su conexión con la patología amiloide y con la pérdida sináptica, neuronal y cognitiva de los pacientes.

La finalidad principal de este trabajo de Tesis Doctoral ha sido profundizar desde una perspectiva molecular, celular y subcelular en la patología de tau utilizando los modelos murinos transgénicos ThyTau22 y P301S (línea PS19). Nos hemos centrado esencialmente en el análisis de la progresión espacio-temporal de la patología tau en la región del hipocampo, su relación con la respuesta glial (microglial y astroglial), así como la pérdida sináptica, neuronal y cognitiva. Una de las líneas de investigación de nuestro grupo, perteneciente al CIBERNED y a IBIMA, ha sido la caracterización de modelos animales transgénicos de la EA dirigida a la búsqueda de nuevos biomarcadores y posibles dianas terapéuticas de interés para su posterior uso en ensayos clínicos de potenciales fármacos. Especial interés despiertan los aspectos relacionados con la vulnerabilidad neuronal, la degeneración axonal y sináptica, así como las alteraciones de la proteostasis celular y su relación con el metabolismo de APP y la producción de Aβ. No obstante, otra de las líneas destacadas es la validación de los resultados obtenidos en modelos en las muestras humanas *postmortem* de pacientes de Alzheimer, con especial atención a la respuesta neuroinflamatoria. En este sentido, nuestra reciente identificación de un proceso degenerativo de la microglía mediado por fosfo-tau ha sentado las bases para dilucidar en mayor detalle la contribución de la patología tau a la patogénesis de esta enfermedad.

El bloque de Resultados se ha dividido en cuatro capítulos: El primero (3.1.), recoge los resultados relacionados con la caracterización de la patología de tau en los modelos ThyTau22 (desde los 2 hasta los 18 meses de edad) y P301S (desde los 2 hasta los 12 meses de edad), incluyendo los efectos que tiene esta misma patología en la proteostasis de la región hipocampal; además, este capítulo incluye un estudio longitudinal (cognitivo e histopatológico) de la patología del modelo P301S realizado durante la estancia predoctoral en el Texas Medical Center de la Universidad de Texas (UTHealth). El segundo apartado (3.2) engloba los resultados sobre la caracterización de la respuesta microglial y astroglial ante la patología de tau en ambos modelos murinos. Parte de los resultados de los capítulos 3.1 y 3.2 se han publicado en un artículo en la revista Frontiers Cellular Neuroscience (Romero-Molina et al., 2018). El tercero (3.3), incluye los resultados obtenidos con relación a la pérdida sináptica y neuronal asociada a la patología de ambos modelos animales, junto con un estudio ultraestructural de los daños neuronales causados por la acumulación de fosfo-tau; estos resultados se están preparando

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

actualmente para publicación. El cuarto y último bloque (3.4), recoge los resultados obtenidos del tratamiento con el estabilizador de microtúbulos epotilona D (EpoD) en el modelo amiloidogénico APP/PS1 y que han sido publicados en la revista Scientific Reports (Fernandez-Valenzuela et al., 2020), y en un capítulo de libro (Fernandez-Valenzuela et al., 2018).

A continuación, se describen brevemente los principales resultados ya publicados, así como los de otros trabajos del grupo en los que he colaborado activamente durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral y que han sido primordiales para plantear el estudio aquí presentado. Al final de cada apartado se indican las referencias donde se han publicado.

1. Hemos analizado la respuesta microglial en dos modelos de taupatía (ThyTau22 y P301S). Mientras el hipocampo de ThyTau22 manifestó una activación microglial leve, en el de P301S hubo una fuerte respuesta microglial junto con una alta acumulación de fosfo-tau. La expresión diferencial de fosfo-tau podría explicar la diferente respuesta microglial. Las fracciones cerebrales solubles (S1) de ThyTau22 presentaron un contenido relativamente alto de fosfo-tau y fueron altamente tóxicas para las células microgliales *in vitro*, en cambio en P301S los niveles de fosfo-tau soluble fueron bajos y no tóxicos. Por lo tanto, no solo los niveles de expresión sino la agregación de fosfo-tau difiere entre ambos modelos. Concluimos que diferentes factores como las mutaciones tau, la acumulación, la fosforilación y/o la agregación podrían explicar las distinta respuesta microglial en estos dos modelos transgénicos. Por tanto, identificar las especies tóxicas de tau para las células microgliales podría ser un enfoque terapéutico prometedor para restaurar la deficiente protección inmunológica observada en el hipocampo de pacientes. Publicado en *Romero-Molina et al*., *Front Cell Neurosci 12:421, 2018. doi: 10.3389/fncel.2018.00421.*

2. Hemos estudiado la respuesta astroglial en un modelo amiloidogénico APP/PS1. El proceso neuroinflamatorio no solo implica activación microglial, sino también una fuerte reactividad astroglial. Si bien la microglía ha sido foco de numerosos estudios en el contexto de la patología Alzheimer, se conoce muy poco del papel de los astrocitos en esta enfermedad. Los astrocitos reactivos se localizan rodeando las placas amiloides tanto en pacientes de Alzheimer como en modelos amiloidogénicos. Hemos demostrado que la astroglía reactiva fagocita neuritas distróficas, en su mayoría elementos presinápticos aberrantes, localizadas en la periferia de las placas. Este proceso de fagocitosis presenta una baja eficiencia y los astrocitos muestran un fenotipo disfuncional. Esta actividad fagocítica podría estar dirigida a eliminar sinapsis disfuncionales en un intento de restaurar los circuitos neuronales defectuosos, así como a reducir la respuesta inflamatoria asociada. Por tanto, potenciar la función

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

astroglial sería una diana de interés en el desarrollo de nuevas terapias para la enfermedad de Alzheimer. Publicado en *Gomez-Arboledas et al., Glia 66(3):637- 653, 2018. doi: 10.1002/glia.23270.*

3. La pérdida sináptica y la muerte neuronal son responsables del deterioro cognitivo y la demencia manifestada por los pacientes de Alzheimer, respectivamente. Una de las poblaciones neuronales vulnerables en esta enfermedad son las interneuronas GABAérgicas. En este trabajo hemos demostrado una vulnerabilidad distinta en la corteza perirrinal del modelo amiloidogénico APP/PS1 y pacientes con Alzheimer. Las neuronas somatostatina (SOM)-positivas fueron notablemente sensibles en APP/PS1 y en pacientes. Sin embargo, las neuronas parvalbúmina (PV)-positivas no se vieron afectadas en APP/PS1 mientras que en pacientes hubo una pérdida pronunciada y significativa de esta población. Por tanto, la muerte de interneuronas PV parece estar asociada a la patología tau presente en pacientes, pero no en los modelos amiloidogénicos. La pérdida de interneuronas SOM y PV podría contribuir a la alteración de los ritmos cerebrales, y por tanto, al deterioro cognitivo en las fases iniciales de esta enfermedad. Publicado en *Sánchez-Mejias et al., Brain Pathology 30(2):345-363, 2019 doi: 10.1111/bpa.12785.*

4. Por último, hemos estudiado la conexión entre las patologías tau y amiloide analizando el efecto de un estabilizador de microtúbulos (epotilona D) en el hipocampo del modelo amiloidogénico APP/PS1. El tratamiento no solo evitó la pérdida sináptica, sino también la muerte de interneuronas SOM, una de las poblaciones neuronales hipocampales más vulnerables en el Alzheimer. Este efecto neuroprotector se vio asociado a una reducción de la patología distrófica, así como de la carga amiloide extracelular. Es importante destacar la disminución de los niveles de oligómeros solubles de Aβ, conocidos como los principales agentes sinaptotóxicos. Como consecuencia, la función cognitiva de este modelo fue protegida por la EpoD. Por tanto, la desestabilización de los microtúbulos supone un punto clave en las patologías amiloide y tau y podría representar una diana terapéutica prometedora para el tratamiento de esta enfermedad. Publicado en *Fernandez-Valenzuela et al., Sci Rep 10: 1–17, 2020 doi: 10.1038/s41598-020-71767-4 y en Fernandez-Valenzuela et al., Metabolic Reprogramming as a Target for Cancer and Other Diseases. UMA editorial pag. 221-234, 2018. ISBN: 978-84-17449-55-1.*

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.1. CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA PATOLOGÍA TAU EN EL HIPOCAMPO DE LOS MODELOS THYTAU22 Y P301S

La EA se clasifica como una taupatía mixta o secundaria, en base a que los cerebros de los pacientes exhiben la acumulación patológica de dos proteínas diferentes: la proteína tau hiperfosforilada (característica que *per se* define a esta enfermedad como taupatía) constituyendo los ovillos neurofibrilares intraneuronales (NFTs), y el péptido Aβ formando los depósitos extracelulares denominados placas. Con la idea de dilucidar el efecto deletéreo provocado específicamente por la patología de tau en esta enfermedad, hemos analizado la progresión temporal de esta proteinopatía, y su consecuencia a nivel de la respuesta inflamatoria asociada y el daño sináptico/neuronal en dos modelos animales transgénicos. Dado que no existe ninguna mutación de tau que desencadene la EA, para este trabajo de Tesis doctoral se han utilizado dos modelos murinos de taupatía pura que expresan un transgén de tau humano mutado: el modelo ThyTau22 (mutaciones P301S y G272V) y el modelo de la línea PS19 (con la mutación P301S). Del primero se analizaron edades comprendidas entre los 2 y los 18 meses de edad. El estudio de los animales P301S solo abarcó hasta los 12 meses, debido a que este modelo desarrolla parálisis de las extremidades inferiores desde los 7-10 meses, y a partir de esa edad su tasa de supervivencia comienza a decaer progresivamente, presentando atrofia cerebral y una alta tasa de mortalidad en torno al primer año de vida (Yoshiyama et al., 2007; ver Fig. 3.17A). En concreto, en este estudio nos hemos centrado en el hipocampo, por ser una de las primeras regiones cerebrales afectadas por la patología de tau durante el desarrollo de la EA (Braak II-III) (Braak and Braak, 1991; Braak et al., 2006).

En primer lugar, se determinaron los niveles de la proteína tau humana en ambos modelos a los 9 meses de edad mediante Western-Blot (WB; **Fig. 3.1.1**). Para ello se usaron los anticuerpos T46 y T12, que reconocen las regiones carboxilo- y amino-terminal de la proteína tau (tau total), respectivamente. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que a esa edad, los niveles de proteína tau humana total en el modelo P301S eran significativamente mayores (2,36 ± 1,18 veces para T46; 1,51 ± 0,12 veces para T12; $p<0,05$) que los presentados por el modelo ThyTau22.

Una de las modificaciones postraduccionales de tau con mayor relevancia patológica es la hiperfosforilación, que la conduce a un cambio conformacional irreversible. En consecuencia, tau se desacopla de los microtúbulos, y adquiere capacidad de agregación y toxicidad.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

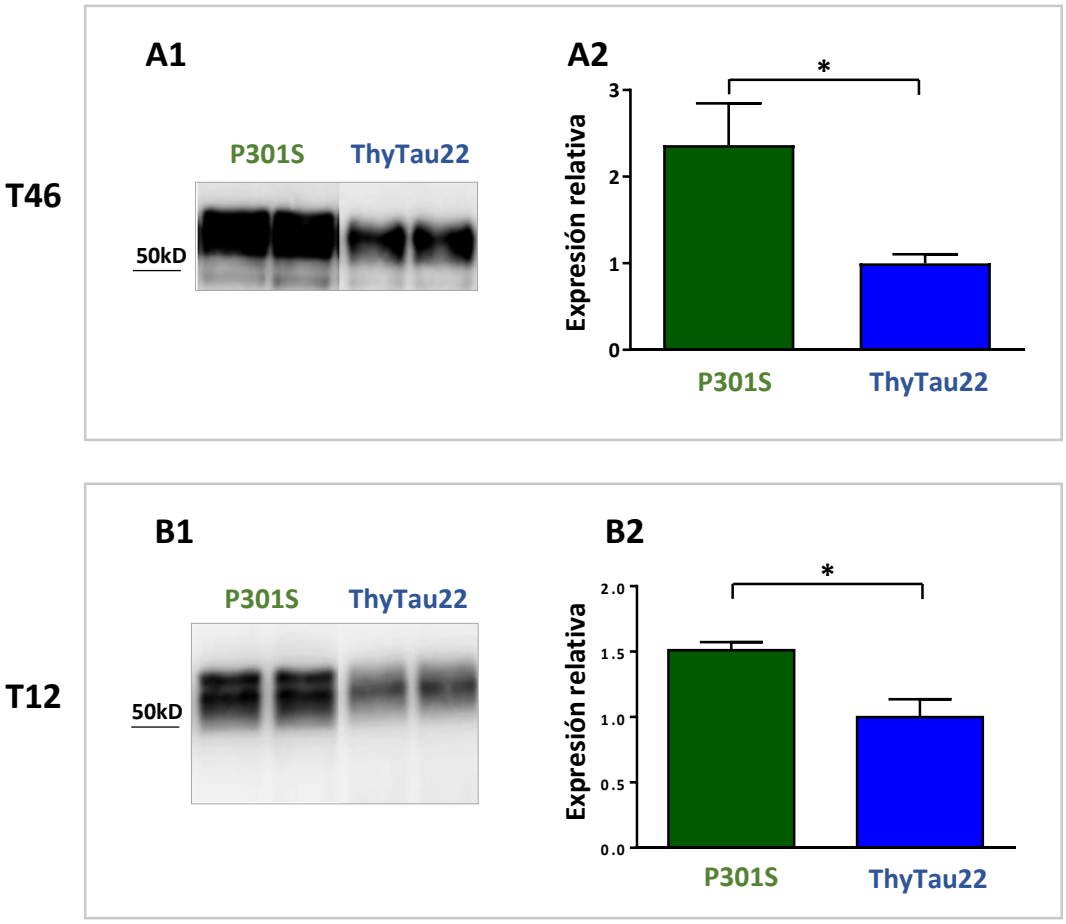


Figura 3.1.1. Expresión diferencial de la proteína tau (total) en el hipocampo de los modelos P301S y ThyTau22. Los niveles de la proteína tau (total) en el hipocampo son mayores en el modelo P301S en comparación con el modelo ThyTau22**.** Western-blots (**A1, B1**) representativos y cuantificación (**A2, B2**) de los niveles de tau total con los anticuerpos Tau46 (C- terminal) y Tau12 (N-terminal) en el hipocampo de ratones P301S y ThyTau22 de 9 meses de edad. La cantidad de proteína tau total fue significativamente superior en el hipocampo del modelo P301S en ambos casos (n=4-6; t-test *p<0,05). (*Romero-Molina et al., 2018*).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Dado que tau suele sufrir fosforilaciones de manera secuencial, se analizaron diferentes formas fosforiladas de esta proteína (fosfo-tau) en el hipocampo de ambos modelos desde los 2 a los 12 meses de edad mediante WB (**Fig. 3.1.2**). Para ello se emplearon anticuerpos monoclonales (AT180, AT8 y AT100) que reconocen las fosforilaciones en diferentes residuos: AT180 (Thr231), AT8 (Ser202 y Thr205) y AT100 (Thr212 y Ser214). El epítopo reconocido por AT180 corresponde a una fosforilación que ocurre de forma temprana en el curso de la patología, seguido de AT8 y finalmente de AT100, el cual implica un nivel superior en la agregación de tau (Luna-Muñoz et al., 2007). Los niveles de fosfo-tau (**Fig.3.1.2 B**) resultaron ser muy bajos (por debajo de los límites de detección) en los animales más jóvenes (2-4 meses), existiendo un importante aumento a edades avanzadas (9-12 meses). Este incremento de la carga de fosfo-tau con el tiempo fue especialmente significativo en el modelo P301S. Así, en consonancia con los datos obtenidos con tau total, los niveles de AT8 (**Fig. 3.1.2 B1**), AT100 (**Fig.3.1.2 B2**) y AT180 (**Fig. 3.1.2 B3**) a edades avanzadas fueron significativamente más altos en P301S (5,16 ± 2,22 veces; 2,10 ± 0,52 veces; 11,17 ± 4,25 veces, respectivamente; $p<0,05$) que en ThyTau22. En el modelo P301S, la diferencia asociada a la edad fue más pronunciada en las formas que más temprano son fosforiladas (AT180, 11,17 ± 4,2 veces; seguida de AT8, 20,25 ± 10,8 veces; $p<0,05$). Sin embargo, en el modelo ThyTau22, fueron las formas más tardías (AT100; **Fig.3.1.2 B2**) y por tanto, con mayor nivel de agregación, las que presentaron el incremento más significativo con la edad (9,72 ± 5,01 veces; $p<0,05$).

3.1.1. ESTUDIO DE LA PROGRESIÓN TEMPORAL DE LA PATOLOGÍA DE TAU EN EL HIPOCAMPO DEL MODELO THYTAU22. ANÁLISIS A MICROSCOPÍA ÓPTICA Y ELECTRÓNICA

En los pacientes de EA, la acumulación patológica de tau surge en regiones cerebrales concretas y se va extendiendo al resto conforme a lo descrito en los estadios de Braak (Braak and Braak, 1991; Braak et al., 2006). Así, se procedió al estudio de la progresión espacio-temporal de la patología de tau en estos modelos, usando secciones cerebrales coronales que contienen hipocampo. En primer lugar, se realizó una tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo AT8 para detectar fosfo-tau en los animales ThyTau22 a diferentes edades (2, 6, 9, 12 y 18 meses de edad). En este modelo, la inmunorreactividad aparece a los 2 meses de edad (**Fig. 3.1.3 A1**) en el subículo, hipocampo propio (regiones CA1-CA3), giro dentado, fimbria, amígdala, y en distintas regiones de la neocorteza como por ejemplo, las capas profundas de la corteza entorrinal. Con la edad, la intensidad del marcaje aumentó en todas estas zonas, y se extendió a otras porciones cerebrales como las regiones talámicas o la corteza visual (**Fig. 3.1.3 A2 y A3**).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

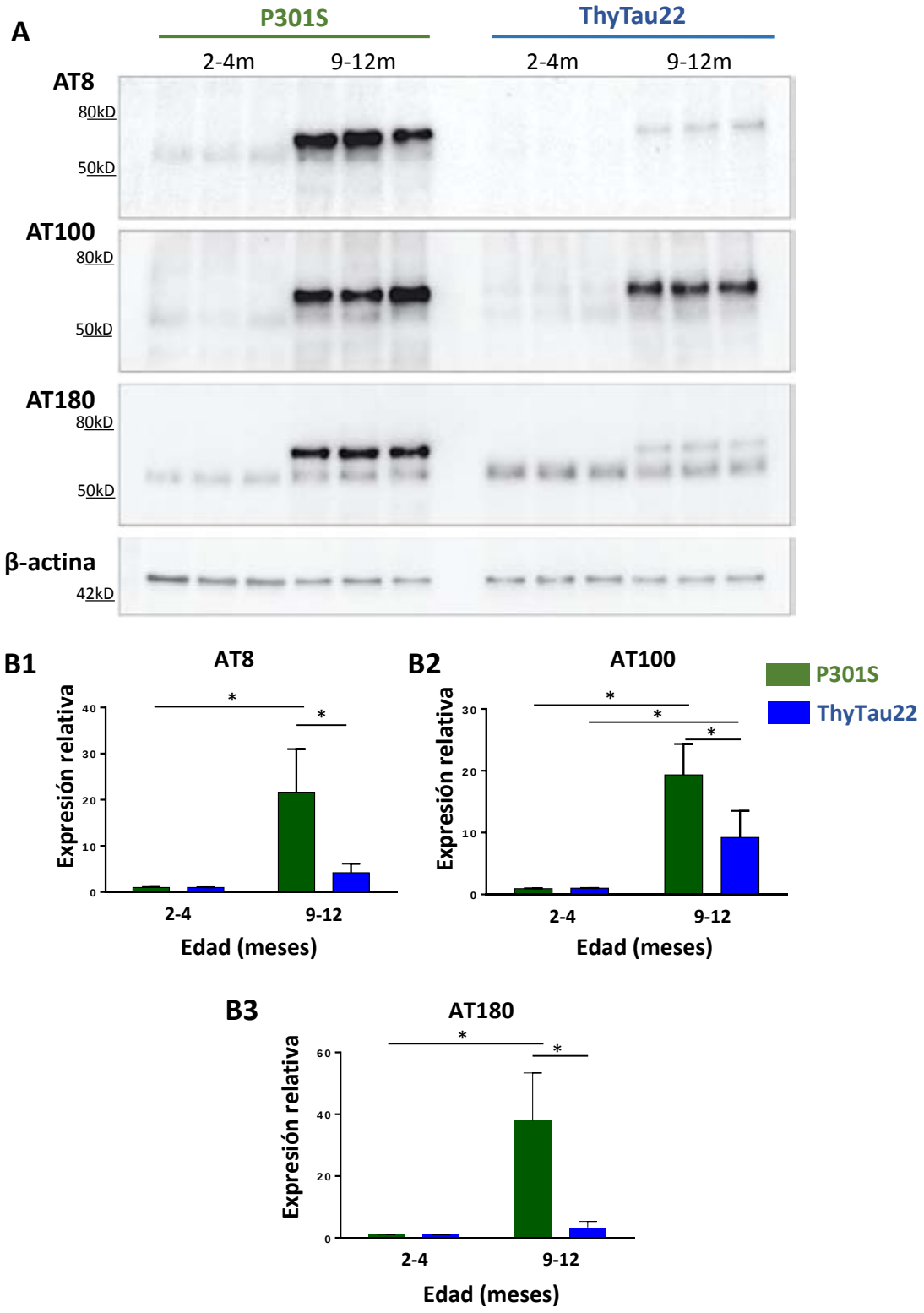


Figura 3.1.2. Estudio comparativo de la acumulación de formas hiperfosforiladas de tau (fosfo-tau) en el hipocampo de los modelos P301S y ThyTau22 desde los 2 a los 12 meses de edad. Western-blots representativos **(A)** y cuantificación **(B1-B3)** de los niveles de fosfo-tau con los anticuerpos AT8, AT100 y AT180 en hipocampo de ratones P301S y ThyTau22. A 2-4 meses de edad, la cantidad de fosfo-tau detectable con cualquiera de estos anticuerpos fue escasa en ambos modelos. A 9-12 meses de edad, los niveles se encontraban bastante aumentados, siendo significativamente superiores en el modelo P301S que en ThyTau22 (N=6/edad/genotipo; t-test *p<0,05). (*Romero-Molina et al., 2018*).

UNIVERSIDAD DE MALAGA

Analizando con detalle el hipocampo propio, desde los 2 meses de edad (**Fig. 3.1.3 B1**) se observó que el inmunomarcaje se encontraba restringido inicialmente a algunos cuerpos neuronales de la capa piramidal de la porción de la región CA1 más próxima al subículo, en sus dendritas apicales (estratos radiado y lacunoso-molecular), y también en el neuropilo de CA3 (fibras musgosas). En el giro dentado, un marcaje tenue aparecía a los 2 meses en el hilio (**Fig. 3.1.3 C1**). Una de las consecuencias de la hiperfosforilación de tau es su traslocación desde el compartimento axonal al somatodendrítico (insertos en **Fig. 3.1.3 B3 y C3**). Así, mediante inmunofluorescencia doble para fosfo-tau (AT8) y la proteína dendrítica MAP2 se confirmó la localización de fosfo-tau tanto en el soma como en porciones dendríticas de las neuronas principales. Se muestran largos tramos de dendritas apicales de la región del estrato radiado de CA1, en las que el marcaje para fosfo-tau en los animales transgénicos colocalizaba con MAP2 (**Fig. 3.1.4**).

Con la edad, el número de somas AT8-positivos aumentó progresivamente, extendiéndose por el subículo e hipocampo propio (CA1 y CA3) (**Fig. 3.1.3 A1-A3 y B1-B4**). A partir de 6 meses (**Fig. 3.1.3 B2 y C2**), el marcaje involucraba las dendritas basales de las neuronas piramidales en el estrato oriens. En el giro dentado aparecieron los primeros somas positivos para AT8 en la capa granular, así como marcaje en la capa molecular interna. La cantidad de cuerpos y prolongaciones neuronales AT8-positivos continuó aumentando progresivamente a los 12 y 18 meses (**Fig. 3.1.3 C3 y C4**).

A continuación, se realizó un estudio cuantitativo de la evolución temporal (de 2 a 18 meses) de la patología mediante análisis de imagen. Se determinó la proporción de área hipocampal (CA1 y giro dentado) inmunoteñida para AT8 (**Fig. 3.1.5**). Existía un incremento progresivo y significativo del porcentaje del área AT8-positiva con la edad en ambas regiones ($F(9,28) = 21{,}56$; $P < 0{,}0001$), alcanzando su máximo a los 18 meses (5,51 ± 1,3 veces en CA1 y 5,92 ± 1,78 veces en giro dentado, con respecto a 2 meses). Este parámetro fue significativamente mayor en CA1 que en el giro dentado, siendo la diferencia especialmente notable a los 18 meses (2,94 ± 0,69 veces, $p<0{,}0001$). En CA1, de 2 a 6 meses aumentó notablemente la patología, mientras que en el giro dentado ocurrió entre los 6-9 meses. Tras este repunte, la acumulación de fosfo-tau con la edad fue más evidente en CA1 que en giro dentado, donde las diferencias entre los 9 y 18 meses fueron menos acusadas. Se completó el estudio con un análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). En la **Figura 3.1.6**, se muestran imágenes representativas del inmunomarcaje con oro coloidal (inmuno-oro) para AT8 en el hipocampo de animales de 12 meses. De nuevo, la marca AT8-positiva se detectó en el citoplasma de los somas de neuronas piramidales (**Fig. 3.1.6 A y B**) y sus dendritas apicales (**Fig. 3.1.6 C y D**). Fue recurrente que el marcaje en las dendritas se distribuyese en la proximidad de la membrana plasmática (**Fig. 3.1.6 D**).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

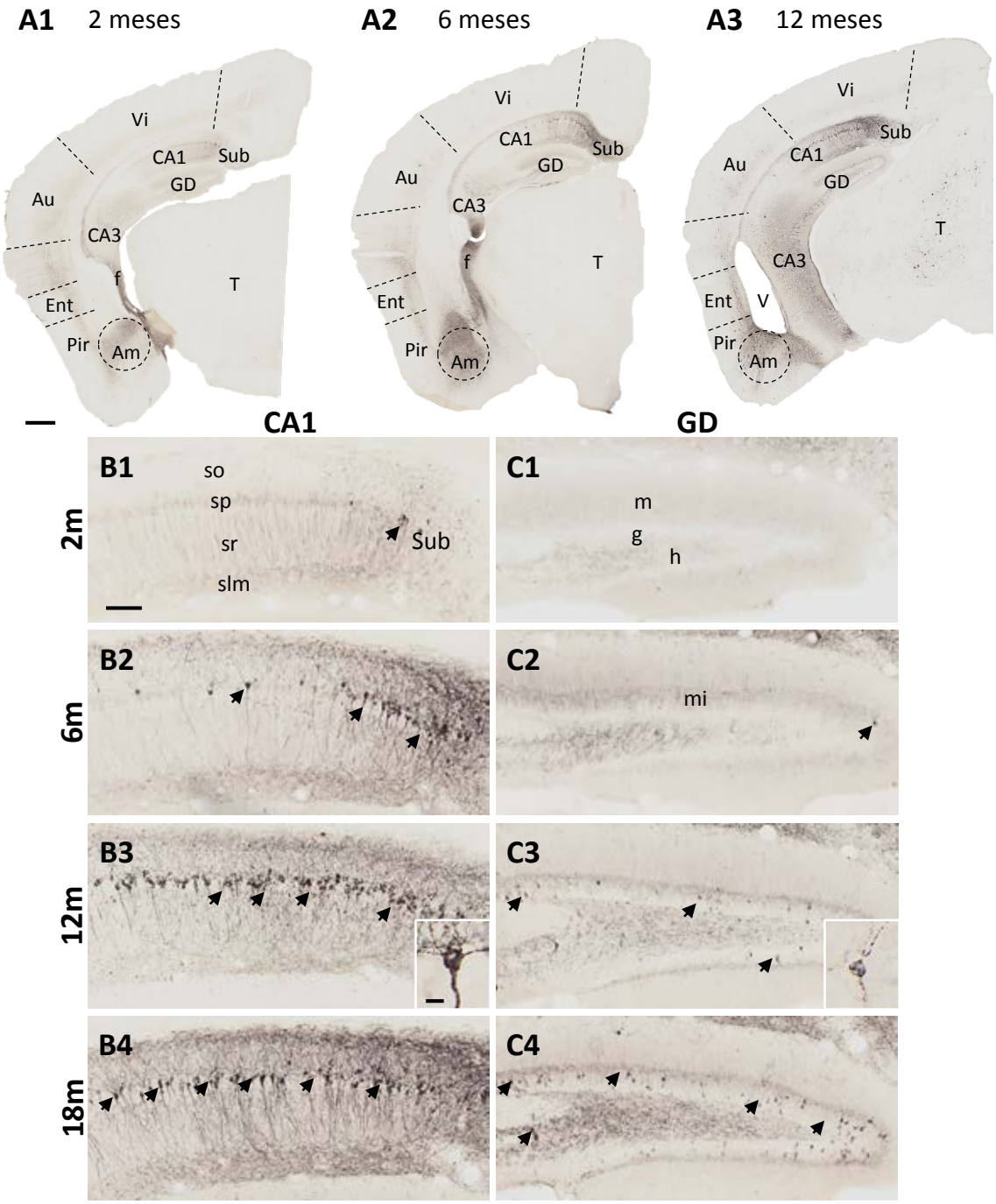


Figura 3.1.3. Progresión espacio-temporal de la patología tau en el hipocampo de ThyTau22. Inmunohistoquímica para AT8 (fosfo-tau) a 2 (**A1-C1**), 6 (**A2-C2**), 12 (**A3-C3**) y 18 (**B4-C4**) meses de edad. (**A1-A3**), panorámicas de hemisecciones cerebrales coronales mostrando el inmunomarcaje en el hipocampo y otras regiones como la amígdala, corteza entorrinal, corteza auditiva y visual y tálamo. (**B, C**) Detalles de la inmunotinción en el hipocampo (CA1 y giro dentado). (**B1**) A los 2 meses, los agregados de fosfo-tau aparecen en somas (flechas) de neuronas piramidales en la región de transición CA1-subiculum. (**B2-B4**) Con la edad aumenta la cantidad de somas positivos y la intensidad de tinción del neuropilo. Detalle del marcaje de una neurona principal de CA1 (inserto **B3**) y GD (inserto **C3**). (**C1-C4**) En el giro dentado la patología tau se hace patente desde los 6 meses (**C2**) en la capa molecular interna y el hilio. Posteriormente aparecen somas positivos para AT8 en la capa granular (flechas negras). *Am: amígdala; Au: corteza auditiva; CA1-CA3: regiones del asta de Ammon; Ent: corteza entorrinal; f: fimbria; g: capa granular; GD: giro dentado; h: hilio; m: capa molecular; mi: molecular interna; Pir: corteza piriforme; slm: estrato lacunoso-molecular; so: estrato oriens; sp: estrato piramidal; sr: estrato radiado; Sub: subículo; T: tálamo; V: ventrículo; Vi: corteza visual*. Barras de escala: A1-A3: 500 µm; B1-C4: 100 µm; insertos: 20 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

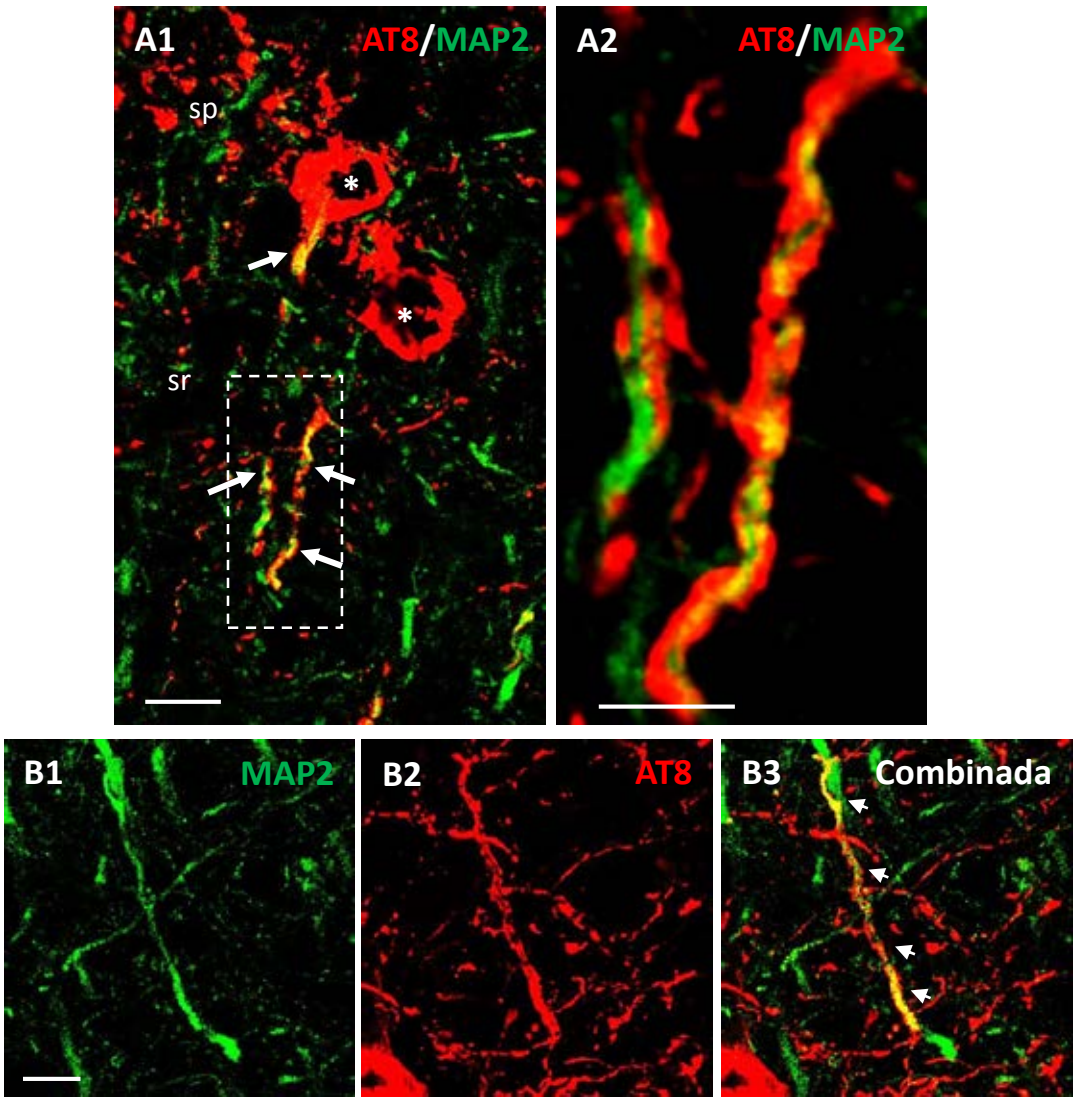
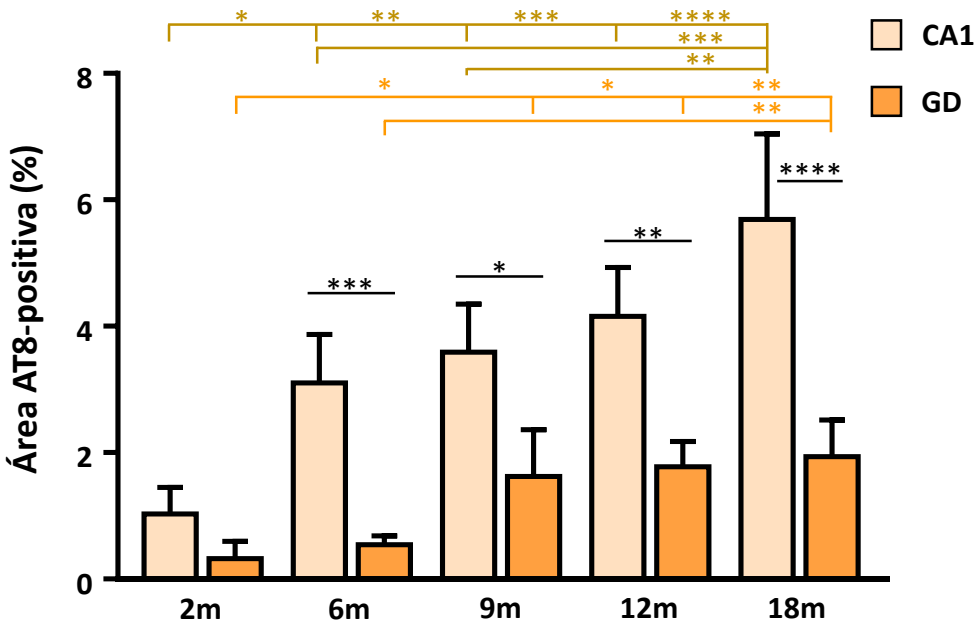


Figura 3.1.4. Fosfo-tau se acumula en el compartimento somato-dendrítico de las neuronas piramidales en el hipocampo del modelo ThyTau22. Inmunofluorescencia doble para fosfo-tau (AT8, rojo) y el marcador de dendritas MAP2 (verde) a microscopia confocal. (**A1**) Imagen representativa de neuronas piramidales cuyos cuerpos (asteriscos) y dendritas apicales son inmunopositivos para AT8 (flechas). (**A2**) Detalle de localización de fosfo-tau en porciones dendríticas cercanas al soma (amarillo). (**B1-B3**) Colocalización de MAP2 y AT8 en una dendrita apical (flechas en **B3**). *sp: estrato piramidal; sr: estrato radiado.* Barras de escala: A: 5 µm; B: 6 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



N= 4/edad. ADEVA de una vía F (9,28) = 21,56, P < 0,0001
*Tukey *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001*

Figura 3.1.5. Estudio cuantitativo de la progresión temporal de la patología tau en el hipocampo de ratones ThyTau22. Tanto en la región CA1 como en el giro dentado existe un incremento significativo del porcentaje de área inmunorreactiva para AT8 (fosfo-tau-positiva) con la progresión de la edad en este modelo animal. La proporción de área afectada por la patología tau es mayor en la región CA1 que en el giro dentado a todas las edades analizadas. *CA1, región 1 del Asta de Ammon; GD, giro dentado*.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

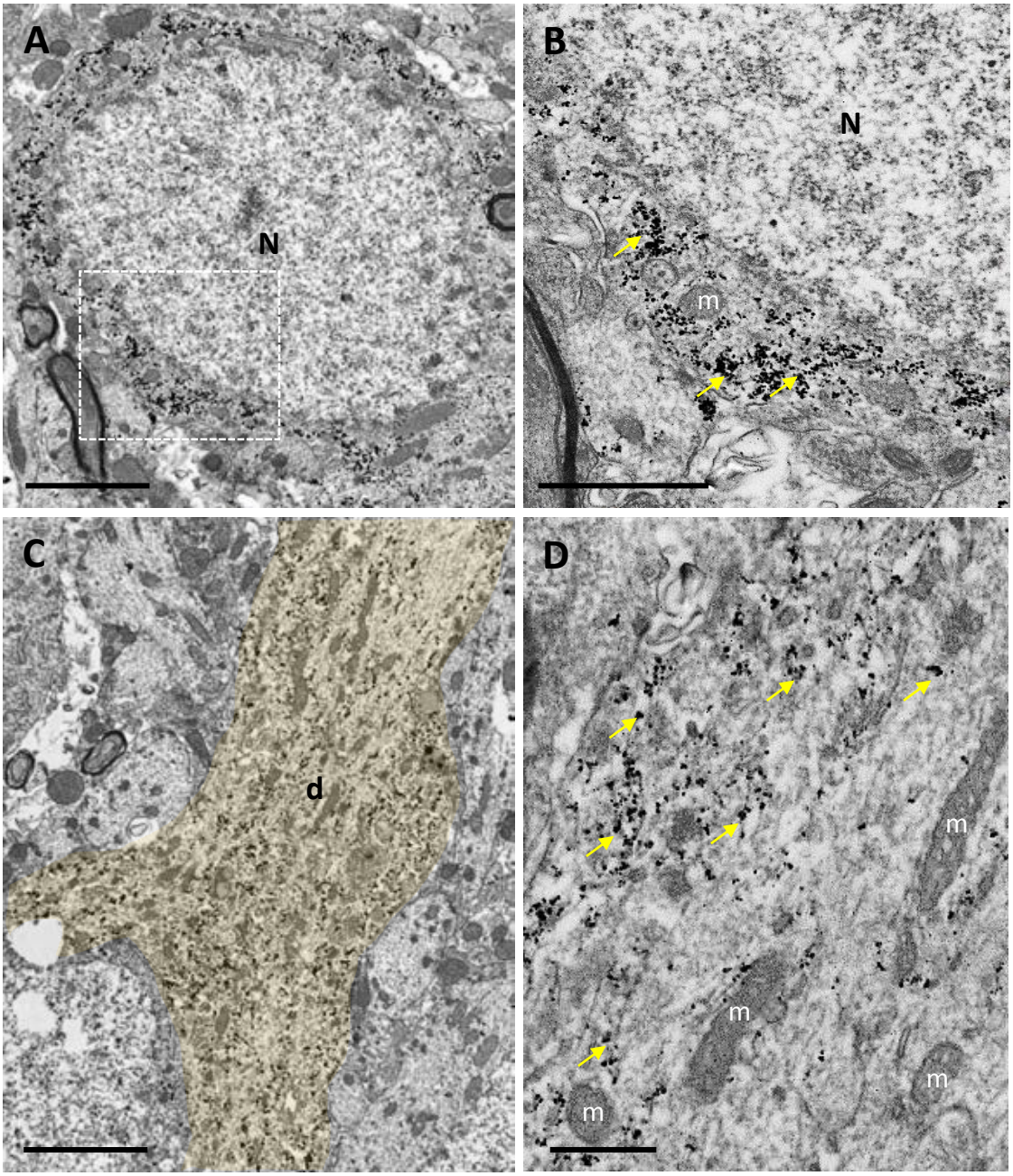


Figura 3.1.6. Identificación a microscopía electrónica de transmisión de fosfo-tau en el compartimento somato-dendrítico de neuronas hipocampales del modelo ThyTau22. Inmuno-oro con el anticuerpo AT8 en animales de 12 meses de edad. (**A, B**) Soma neuronal de la región CA1 con marcaje para AT8 (flechas en la imagen de detalle en **B**). (**C, D**) Porciones de dendritas apicales (citoplasma coloreado de amarillo en **C**) inmunopositivas para AT8 (flechas amarillas en la imagen **D**) procedentes de neuronas piramidales en el estrato radiado de CA1. *d: dendrita; m: mitocondria; N: núcleo*. Barras de escala: A y C: 2 µm; B: 1 µm; D: 0,5 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Así, se encontró abundante marca immunopositiva para AT8 en dendritas (**Fig. 3.1.7 A-E**) y espinas dendríticas (**Fig. 3.1.7 C-E**) que establecían contacto sinápticos con terminales axónicos. La presencia de estructuras fosfo-tau positivas en contacto con elementos presinápticos SNAP25-positivos (proteína que interviene en la fusión de las vesículas de neurotransmisores situada en la membrana del terminal presináptico) se visualizó también mediante inmunofluorescencia doble a microscopía confocal (**Fig. 3.1.7 F1-F3).**

La presencia de fosfo-tau fue también identificada en elementos presinápticos a microscopía confocal y microscopía electrónica en los ThyTau22 (**Fig. 3.1.8).** La inmunofluorescencia doble para sinaptofisina y fosfo-tau reveló cierta colocalización entre ambos marcadores (**Fig. 3.1.8 A1-A3**). La inmuno-oro para AT8 a microscopía electrónica también mostró la presencia de fosfo-tau en terminales presinápticos (**Fig. 3.1.8 B**), así como en axones mielínicos (**Fig. 3.1.8 C**). De nuevo, los elementos presinápticos eran aparentemente funcionales, como atestigua la presencia de vesículas sinápticas y densidades postsinápticas en las espinas correspondientes.

El estudio a MET en los ThyTau22 también puso de manifiesto la existencia de inclusiones filamentosas patológicas fosfo-tau positivas, que se encontraron principalmente en los somas neuronales y dendritas apicales de la región CA1. La forma y disposición de la mayoría de los filamentos inmunorreactivos, que al agruparse en los somas constituían los NFTs, concordaba con la conformación ultraestructural conocida como filamentos rectos (SFs, del inglés *straight filaments*) (**Fig. 3.1.9 y Fig. 3.1.10**). Típicamente estas estructuras ocupaban el citoplasma neuronal, desplazando al resto de orgánulos bien hacia la periferia o bien hacia el interior, junto al núcleo. De este modo, en los somas podían encontrarse agrupaciones de orgánulos, como las mitocondrias, entre el núcleo y los NFTs. Los NFTs siempre guardaban cierta distancia con la envoltura del núcleo (**Fig. 3.1.9 B y Fig. 3.1.10 B**), que no parecía verse alterado morfológicamente por la presencia de las inclusiones fibrilares de tau. La inmuno-oro para AT8 (**Fig. 3.1.10**) confirmó que, al igual que lo descrito en pacientes de EA, estos agregados estaban compuestos en parte por tau hiperfosforilada en los residuos Ser202 y Thr205. Estos agregados fibrilares se caracterizaban por tener forma irregular, longitud variable y estar constituidos por pequeñas fibras entrelazadas de fosfo-tau de un diámetro aproximado de 10-20 nm (SFs) (**Fig. 3.1.10 C y D**).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

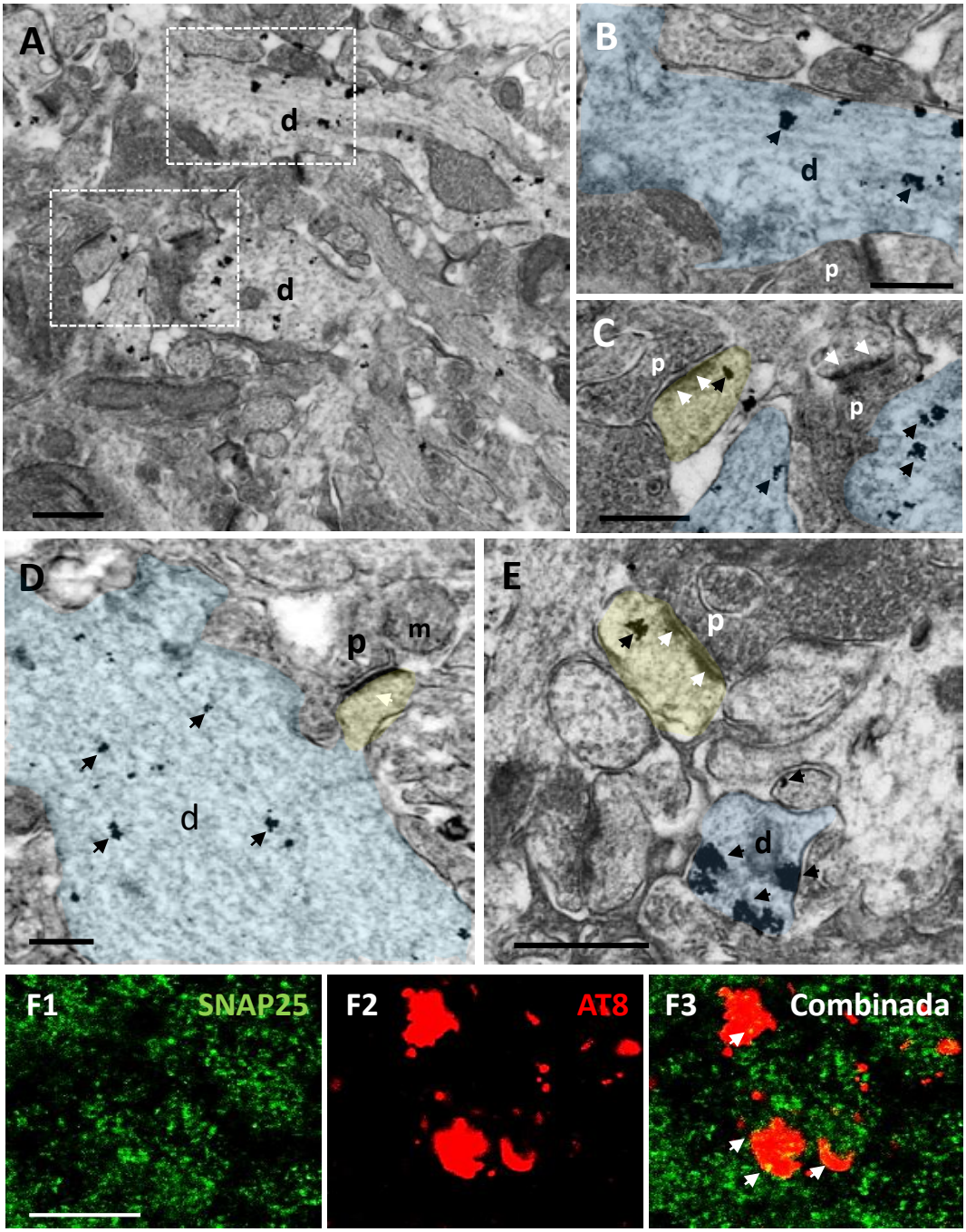


Figura 3.1.7. Los compartimentos postsinápticos con fosfo-tau establecen contactos sinápticos estructuralmente normales en el modelo ThyTau22. (**A-E**) Inmuno-oro con AT8 a microscopía electrónica de transmisión. Neuropilo de la región CA1 de un animal ThyTau22 de 12 meses de edad. (**A**) Imagen en la que aparecen varias dendritas marcadas con partículas de oro (flechas negras). (**B-E**) Detalles a mayores aumentos de porciones dendríticas (azul), y de espinas (amarillo, **C-E**) que establecen contactos sinápticos con terminales presinápticos (flechas blancas señalan densidades postsinápticas), todas positivas para AT8. (**F**) Inmunofluorescencia doble para fosfo-tau (AT8, rojo) y el marcador presináptico SNAP25 (verde) a microscopía confocal. Las imágenes muestran la interacción entre terminales presinápticos con porciones del neuropilo que contienen fosfo-tau. d*: dendrita; m: mitocondria; p: terminal presináptico*. Barras de escala: A, E: 0,5 µm; B-D: 0,2 µm; F: 4 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

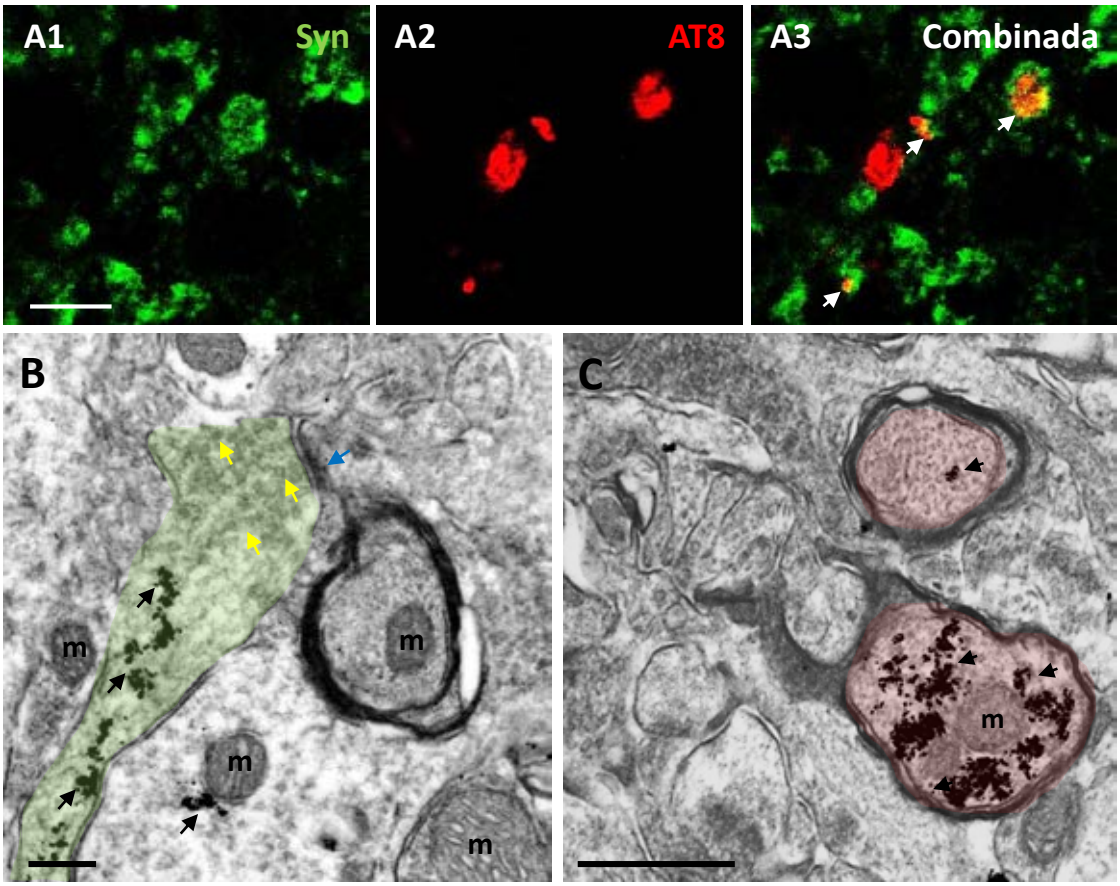


Figura 3.1.8. Presencia de fosfo-tau en compartimentos presinápticos y axonales en el hipocampo del modelo ThyTau22. (**A1-A3**) Inmunofluorescencia doble para el marcador presináptico sinaptofisina (Syn, verde) y fosfo-tau (AT8, rojo) a microscopía confocal. La imagen combinada muestra la colocalización (flechas blancas) de sinaptofisina con fosfo-tau. (**B-C**) Imágenes a microscopía electrónica de transmisión con inmuno-oro para AT8. Las partículas de oro (flechas negras) aparecen en algunos terminales presinápticos (verde, **B**) estableciendo contacto con espinas (flecha azul señala densidad postsináptica), y en axones mielínicos (rojo, **C**). Las flechas amarillas señalan vesículas presinápticas. *d: dendrita; m: mitocondria.* Barras de escala: A: 5 µm; B-C: 0,2 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

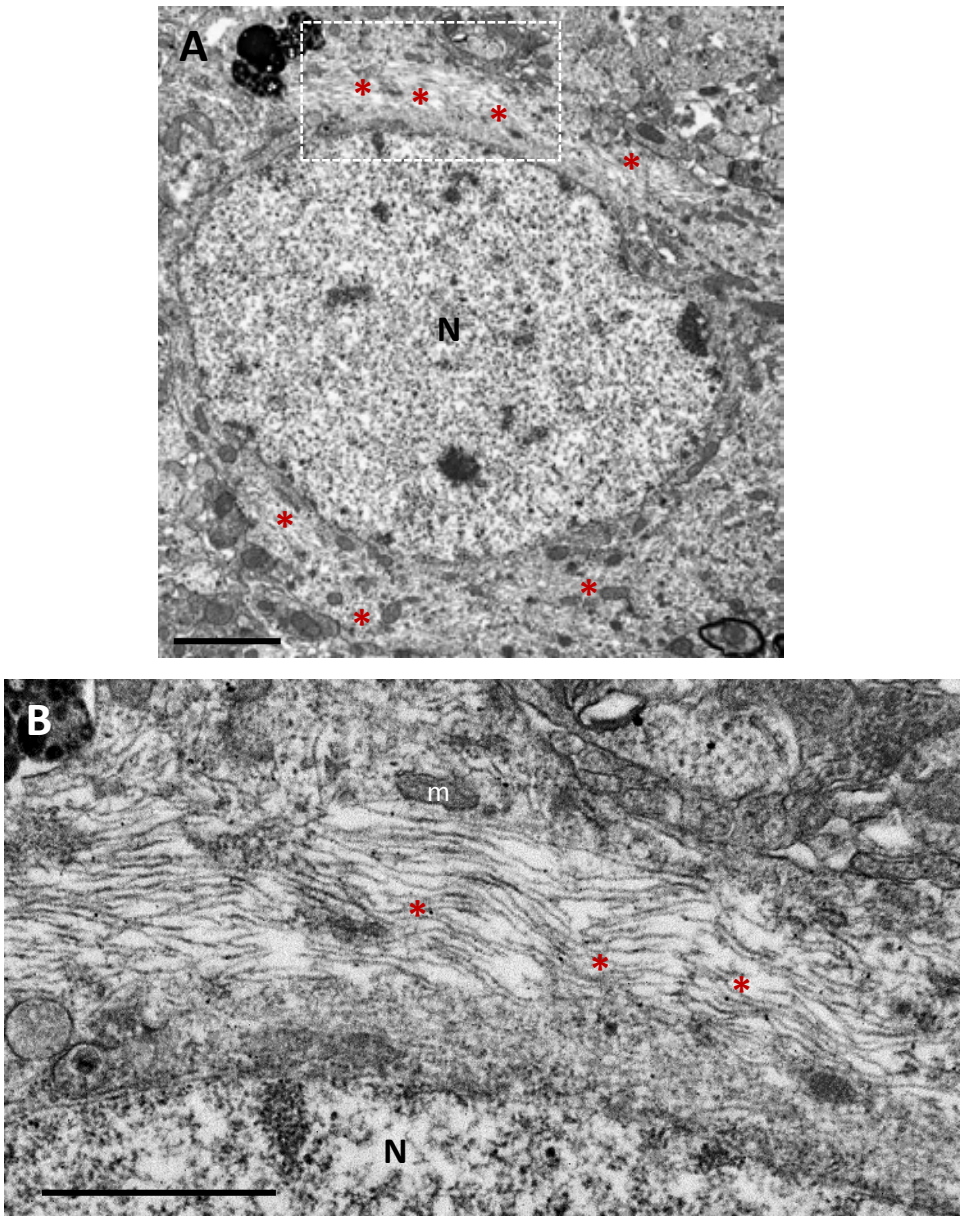


Figura 3.1.9. Identificación a microscopía electrónica de transmisión de ovillos neurofibrilares en el soma de neuronas piramidales de CA1 en el modelo ThyTau22. (**A**) Soma de neurona piramidal de la región CA1 de un animal de 18 meses de edad, en cuyo citoplasma se aprecian NFTs de naturaleza filamentosa (asteriscos rojos). (**B**) Detalle mostrando la separación entre el ovillo y el núcleo, y el desplazamiento de los orgánulos próximos a los ovillos hacia la periferia del soma. *m: mitocondria; N: núcleo*. Barra de escala A: 2 µm; B: 1 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

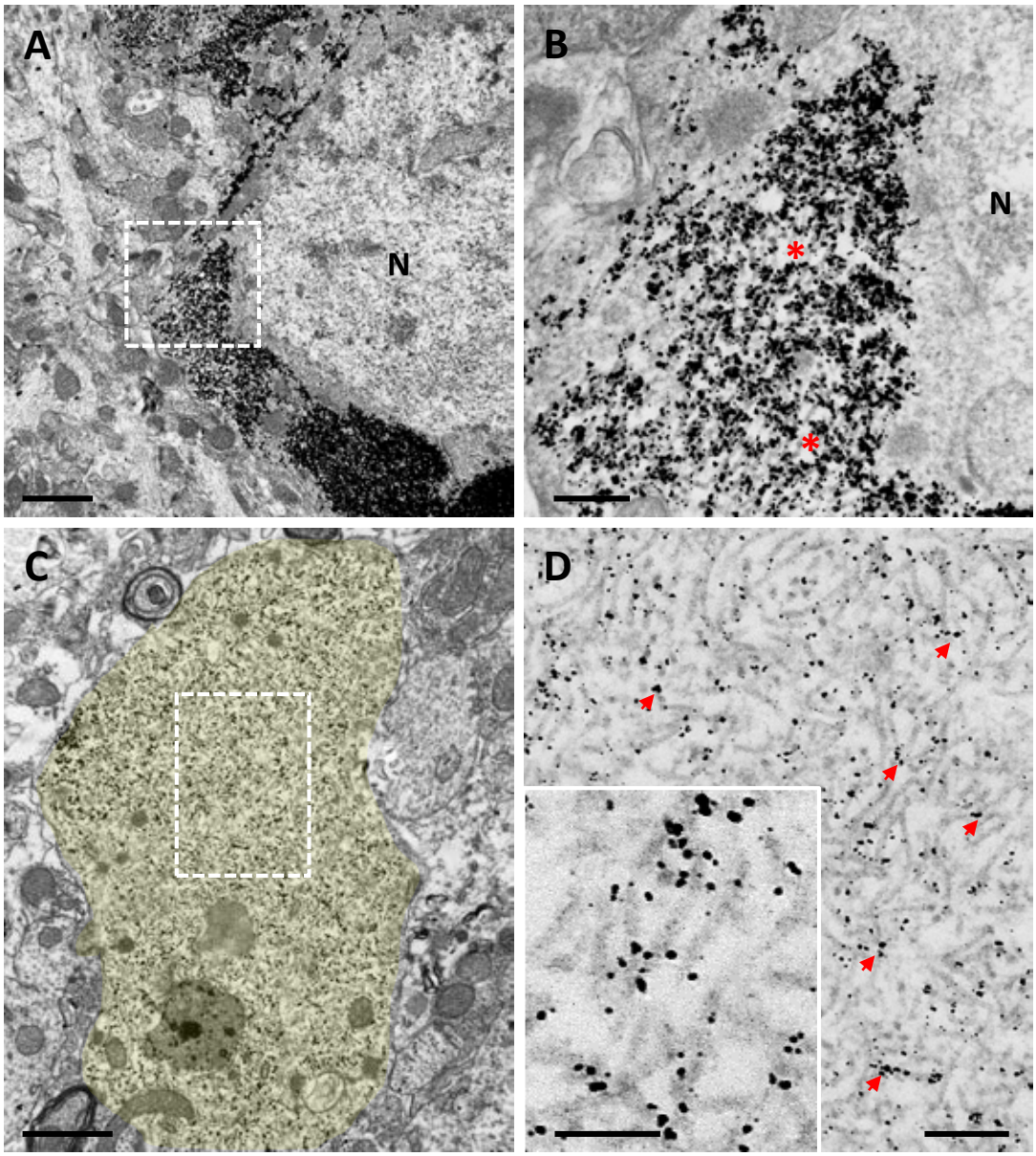


Figura 3.1.10. Los ovillos neurofibrilares presentes en el compartimento somato-dendrítico de las neuronas piramidales del modelo ThyTau22 son inmunopositivos para AT8. Inmuno- oro para fosfo-tau (AT8) en el hipocampo de un animal de 18 meses. (**A, B**) Panorámica y detalle del soma de una neurona piramidal de CA1 con NFTs formados por estructuras filamentosas en su interior (asteriscos rojos) marcados con el anticuerpo AT8. (**C, D**) Panorámica y detalle de otra neurona con NFT positivo para AT8 (flechas rojas; detalle inserto en **D**) en su citoplasma. Los ovillos están constituidos en su mayoría por filamentos rectos (SF) que consisten en pequeñas fibras de tau entrelazadas, de un diámetro aproximado de 10-20 nm. *N: núcleo*. Barra de escala A, C: 1 µm; B: 0,5 µm; D: 0,2 µm; inserto en D: 0,1 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

A continuación, se estudió la formación de ovillos neurofibrilares en el hipocampo de los animales ThyTau22 de 2 a 18 meses de edad utilizando el colorante Tioflavina-S (TioS) (**Fig. 3.1.11**). La presencia de ovillos TioS-positivos resultó ser más abundante en las porciones caudales del hipocampo que en las rostrales. Al igual que la presencia de somas fosfo-tau-inmunopositivos, los NFTs TioS-positivos comenzaron a detectarse a los 2 meses de edad en la capa piramidal de CA1, principalmente en la región de transición CA1-subículo (**Fig. 3.1.11 A1**). Con la edad, el número de NFTs positivos para TioS (ver inserto en **Fig. 3.1.11 A3**) aumentó en esta región y se extendió por la capa piramidal, apareciendo en otras porciones del hipocampo propio como CA3 (no mostrado). No se detectaron NFTs positivos para TioS en el giro dentado de estos animales a ninguna de las edades analizadas (**Fig. 3.1.11 B1-B4**).

El estudio cuantitativo del porcentaje de área de CA1 teñida para TioS (**Fig. 3.1.11 C**) mostró que existía un incremento significativo ($F(4,15) = 53,3$; $P < 0,0001$) de la presencia de NFTs entre los 2 y 6 meses de edad (34,63 ± 9,02 veces; $p<0,0001$) que continuó progresando durante todo el envejecimiento. A edades avanzadas (18 meses), el área ocupada por los NFTs era significativamente mayor que al resto de edades analizadas (18m vs. 2m, 66 ± 2,57 veces mayor, $p<0,0001$; 18m vs. 6 meses, 1,91 ± 0,07 veces, $p<0,0001$; 18m vs. 9 meses, 1,5 ± 0,05 veces, $p<0,01$; 18m vs. 12 meses, 1,33 ± 0,05 veces, $p<0,05$).

3.1.2. ESTUDIO DE LA PROGRESIÓN TEMPORAL DE LA PATOLOGÍA DE TAU EN EL HIPOCAMPO DEL MODELO P301S. ANÁLISIS A MICROSCOPÍA ÓPTICA Y ELECTRÓNICA.

A continuación, se procedió a caracterizar la evolución de la patología tau en el modelo transgénico P301S. La inmunohistoquímica con el anticuerpo AT8 (**Fig. 3.1.12**) mostró a edades tempranas (2 meses, **Fig.3.1.12 A1**) un ligero marcaje en el neuropilo de la región CA3 del hipocampo propio, giro dentado, amígdala, corteza entorrinal y algunas regiones de la neocorteza. Con la edad, la inmunotinción aumentó de intensidad en todas estas regiones (**Fig. 3.1.12 A2-A3;** 6 y 12 meses, respectivamente). Como se aprecia en la **Figura 3.1.12 A3**, a los 12 meses, el marcaje de AT8 es mucho más amplio en todas las regiones corticales que el observado en el modelo ThyTau22. Es importante destacar que una elevada proporción de los animales de 12 meses exhibía hidrocefalia (dilatación ventricular; **Fig. 3.1.11 A3;** V), que en algunos casos produjo una atrofia hipocampal severa.

En un análisis más detallado de la región hipocampal (**Fig. 3.1.12 B y C**), la inmunotinción para AT8 apareció inicialmente (2 meses) en el neuropilo de la capa molecular interna del giro dentado, así como en algunos somas de la capa granular (**Fig. 3.1.12 C1**). También, el inmunomarcaje se extendió ligeramente por el neuropilo del estrato lúcido de CA3 (no mostrado). Con el avance de la edad, la cantidad de somas y neuropilo positivo para AT8 en el

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

giro dentado aumentó considerablemente (**Fig. 3.1.12 C2 y C3**). No obstante, a diferencia de lo descrito para el modelo ThyTau22, no se observó marcaje en CA1 hasta los 4-6 meses de edad (**Fig. 3.1.12 B2**), momento en el que el modelo ya mostraba una cantidad de fosfo-tau considerable, sobre todo en el giro dentado (**Fig. 3.1.12 C2**), abarcando tanto la molecular interna como en la externa. A edades avanzadas (12 meses, **Fig. 3.1.12 B3 y C3**), el marcaje para AT8 ocupa todo el parénquima hipocampal, superando a lo observado en ThyTau22, tanto en CA1 como en el giro dentado. El estudio cuantitativo (**Fig. 3.1.13**; 2, 6 y 12 meses; 4-6 animales/edad) confirmó que existía un incremento significativo del porcentaje de área inmunomarcada con la edad ($F(5,22)=27,17$; $P < 0,0001$) en ambas regiones hipocampales, que fue especialmente significativo a los 12 meses (207 ± 57,7 veces en CA1; 104,07 ± 37,6 veces en giro dentado, con respecto a 2 meses). Al contrario que lo descrito para el modelo ThyTau22, el porcentaje de área AT8-positiva en el giro dentado fue mayor que el de CA1 a todas las edades analizadas (2 meses, 3,14 ± 1,64 veces; 6 meses, 2,39 ± 0,37 veces; y 12 meses, 2,28 ± 1,65 veces mayor, y de manera más significativa a los 12 meses ($p<0,0001$).

Al comparar el área inmunopositiva para AT8 en la región CA1 y giro dentado de ambos modelos (**Fig. 3.1.14**) se confirmó que la progresión de la patología de tau en los animales ThyTau22 y P301S es muy diferente. Los datos mostraron que a los 6 meses el modelo ThyTau22 presentó una mayor cantidad de área fosfo-tau positiva en CA1 que el modelo P301S. Por el contrario, los animales P301S tenían una mayor área AT8-positiva que los ThyTau22 en el giro dentado a esa misma edad. A los 12 meses, tanto en CA1 ($F(3,15) = 20,5$; $P < 0,0001$), como en giro dentado ($F(3,13) = 24,95$; $P < 0,0001$) el área fue significativamente mayor en el modelo P301S en comparación con el ThyTau22 (CA1, 1,77 ± 0,49 veces, $p<0,01$; GD, 7,11 ± 2,57 veces; $p<0,0001$). Por tanto, los resultados muestran que la acumulación de tau hiperfosforilado es mucho mayor en el hipocampo de animales P301S que en el de ThyTau22, y que presenta distintos patrones espaciales de progresión. En el caso de ThyTau22, la patología tau comenzó a aparecer en el estrato piramidal de CA1 y neuropilo de giro dentado y CA3 (no mostrado), extendiéndose hacia CA3 con el tiempo, y aumentando en menor medida el marcaje en giro dentado. Por el contrario, la patología tau en el hipocampo de P301S se inició en la región del giro, y progresó posteriormente hacia el hipocampo propio (primero CA3, y luego CA1).

El estudio ultraestructural mediante MET de la región CA1 hipocampal con inmuno-oro para AT8 mostró que la localización de fosfo-tau en este modelo fue también fundamentalmente somatodendrítica (**Fig. 3.1.15 y 3.1.16**). En la **Figura 3.1.15** se muestran panorámicas y detalles de somas de neuronas piramidales inmunopositivos para AT8. Es de destacar que la marca inmunorreactiva solía encontrarse dispersa por el citoplasma de los somas y dendritas apicales de estas neuronas. En la **Figura 3.1.16** se muestra el marcaje en el neuropilo: en el citoplasma de las dendritas (**Fig. 3.1.16 A-C**) y en las sinapsis (**Fig. 3.1.16 D**), tanto en

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

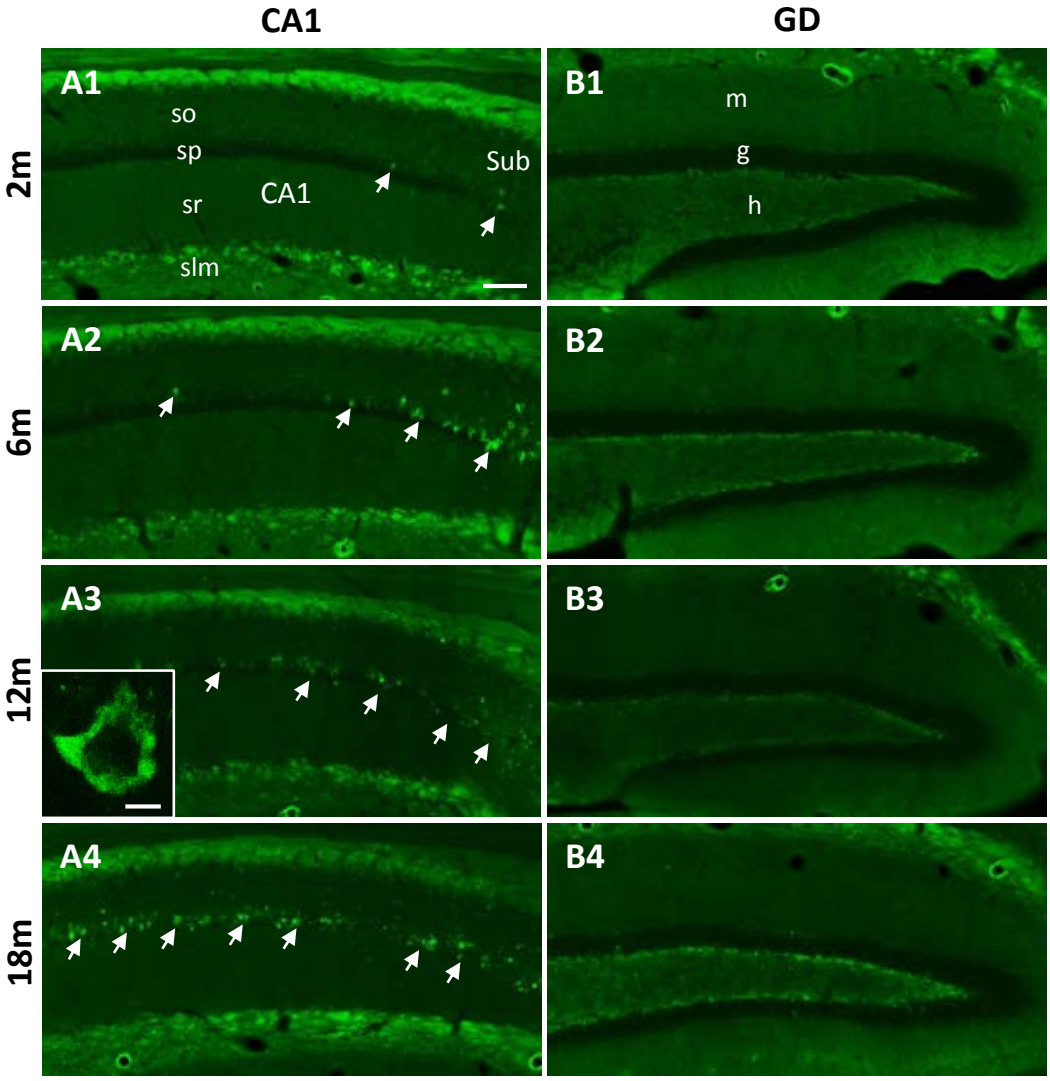
elementos pre- como post- sinápticos. Al igual que en el modelo ThyTau22, la marca se localizó con mayor frecuencia en los compartimentos postsinápticos, y las sinapsis con partículas de oro no mostraban alteraciones estructurales. Sin embargo, no se observó ninguna neurona con inclusiones fibrilares de tipo PHF/SF o NFT. De hecho, no fue posible visualizar ninguna estructura positiva para Tioflavina-S a microscopía de fluorescencia en el hipocampo en ninguna de las edades analizadas (no mostrado).

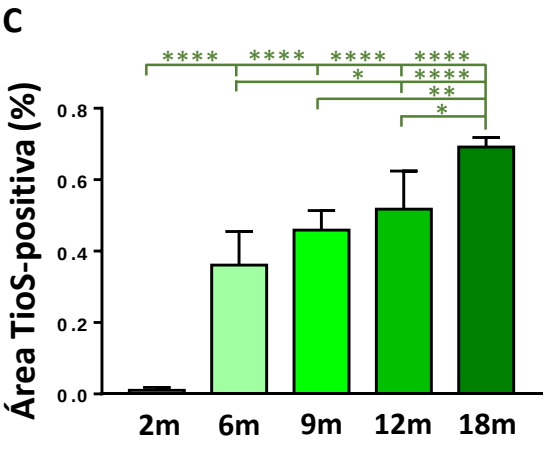
3.1.3. ESTUDIO LONGITUDINAL DE LA PROGRESIÓN DE LA PATOLOGÍA TAU EN EL MODELO P301S MEDIANTE ANÁLISIS DE CONDUCTA Y NEUROIMAGEN FUNCIONAL.

Durante la estancia de investigación predoctoral realizada en el laboratorio de Neurología dirigido por los Drs. Inés Moreno y Claudio Soto en el *Mitchell Center Alzheimer´s Disease and Related Brain Disorders,* de la Universidad de Texas Health Science Center en Houston (EEUU), se continuó con la caracterización del modelo murino de taupatía P301S. En concreto, se realizó un análisis longitudinal de los signos clínicos, tanto del deterioro cognitivo como motor de estos animales, en paralelo a la caracterización de la progresión de la patología tau *in vivo* mediante un estudio de neuroimagen funcional con PET (tomografía por emisión de positrones, del inglés *positron emission tomography*) desde los 6 a los 12 meses de edad (*Objetivo 1.2*). Para ello, se empleó un nuevo radiotrazador fluorado de tau (^{18}F-THK-5351) en proceso de validación en este mismo laboratorio. Actualmente, no existe un buen radiotrazador PET adecuado para neuroimágenes de la patología de tau, imprescindible ya que esta patología es la que mejor correlaciona con el deterioro cognitivo. Sin embargo, los radioligandos tipo 18F-THK, similares al ^{18}F-THK-5351 empleado en este estudio, se unen selectivamente a NFT en pacientes con la EA y modelos animales de la enfermedad (Okamura et al., 2013, 2014).

Como controles de esta técnica se emplearon animales de genotipo silvestre (WT, del inglés *wild type*) de la misma edad y fondo genético.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA





*N= 4/edad. ADEVA de una vía (F (4,15) = 53,3, P<0,0001 Tukey *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001*

Figura 3.1.11. Patrón temporal de aparición de ovillos neurofibrilares intraneuronales (NFTs) en el hipocampo del modelo ThyTau22. Tinción con Tioflavina-S; microscopía de epifluorescencia. Los NFTs (flechas blancas) aparecen desde los 2 meses en la región de transición CA1-Subículo y en el estrato piramidal de CA1 (**A1**). Con la edad (**A2-A4**) los NFTs se extienden por el resto de esta capa (detalle de neurona con ovillo, inserto **A3**). (**B**) En el GD no se observan NFTs a ninguna edad. *CA1: región del asta de Ammon; g: granular; GD: giro dentado; h: hilio; m: molecular; slm: estrato lacunoso-molecular; Sub: subículo; so: estrato oriens; sp: estrato piramidal; sr: estrato radiado*. Barras de escala: A, B: 100 µm; inserto A3: 20 µm. (**C**) **Estudio cuantitativo del área TioS-positiva en la región CA1**. Existe un incremento significativo y progresivo del área ocupada por Tio-S asociado a la edad.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

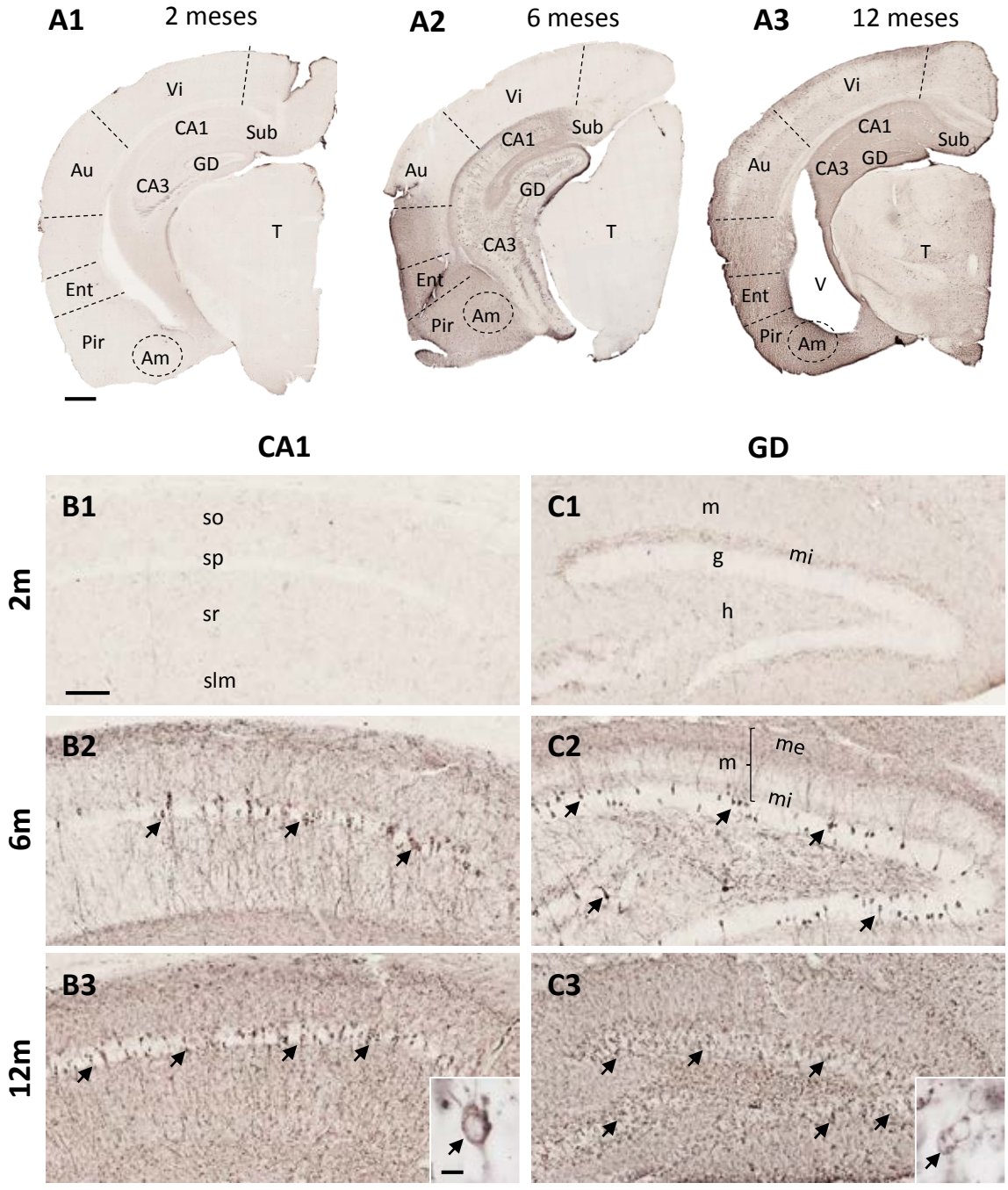
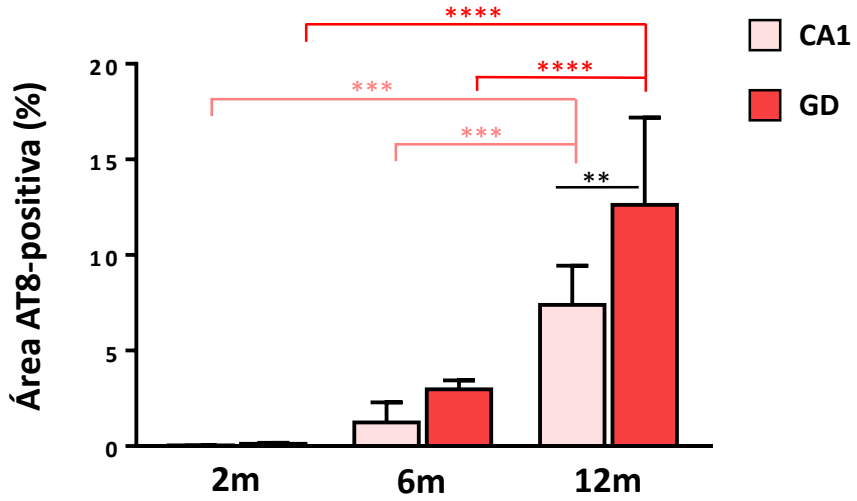


Figura 3.1.12. Progresión temporal de la patología tau en el hipocampo del modelo P301S. Inmunohistoquímica para microscopía de campo claro con el anticuerpo AT8 (fosfo-tau) a 2 (**A1-C1**), 6 **(A2-C2)** y 12 **(A3-C3)** meses de edad. (**A1-A3)** El inmunomarcaje aparece primero en CA3 y giro dentado. La patología aumenta progresivamente con la edad. A los 2 meses (**B1, C1**) se observa marcaje en la capa molecular interna del giro dentado. A los 6 meses, (**B2, C2**) la patología se expande por CA1 y GD con numerosos cuerpos neuronales (flechas) y dendritas marcados. Detalles del marcaje somatodendrítico de neurona principal de CA1 (inserto **B3**) y giro dentado (inserto **C3**). A los 12 meses (**B3, 3**) hay una elevada cantidad de fosfo-tau por todo el parénquima. *Am: amígdala; Au: corteza auditiva; CA1-CA3: regiones del asta de Ammon; Ent: corteza entorrinal; g: capa granular; GD: giro dentado; h: hilio; m: capa molecular; me, molecular externa; mi: molecular interna; Pir: corteza piriforme; slm: estrato lacunoso-molecular; so: estrato oriens; sp: estrato piramidal; sr: estrato radiado; Sub: subículo; T: tálamo; V: ventrículo; Vi: corteza visual*. Barras de escala: A1-A3: 500 µm; B1-C3: 100 µm; insertos: 20 µm.

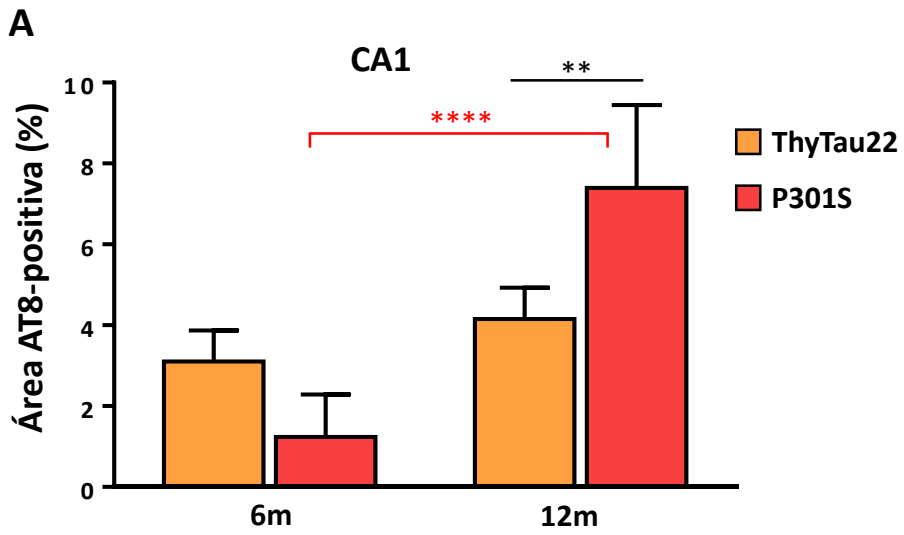
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



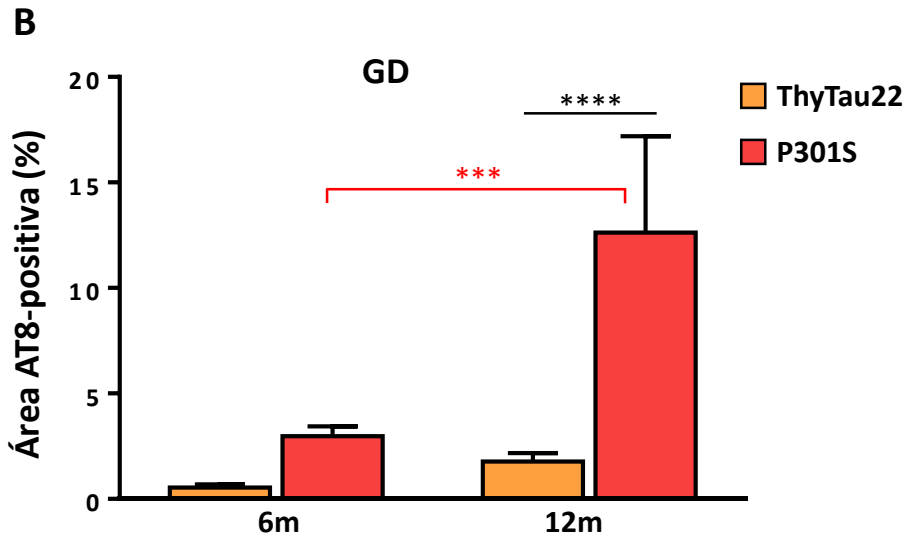
N= 4-6/edad. ADEVA de una vía F (5, 22) = 27,17, P < 0,0001
*Tukey, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001*

Figura 3.1.13. Estudio cuantitativo de la progresión temporal de la patología tau en el hipocampo de ratones P301S. El área AT8-positiva aumenta significativamente en el hipocampo (CA1 y giro dentado) de este modelo con la edad. El porcentaje de área inmunorreactiva para fosfo-tau en el giro dentado (GD) es mayor que en CA1 a todas las edades analizadas, siendo significativa esta diferencia a los 12 meses de edad.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



N = 4-6/edad/genotipo. ADEVA de una vía F (3, 15) = 20,5, P < 0,0001
*Tukey **p<0,01, ****p<0,0001*



N= 3-5/edad/genotipo. ADEVA de una vía F (3, 13) = 24,95, P < 0,0001
*Tukey ***p<0,001 ****p<0,0001*

Figura 3.1.14. Comparativa del área AT8-positiva en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S. En ambas regiones hipocampales analizadas, CA1 **(A)** y giro dentado **(B)**, la patología tau aumenta significativamente desde los 6 a los 12 meses de edad en el modelo P301S, mientras que el incremento es mucho más leve en los ThyTay22 en ese intervalo de edad. Destaca que la patología tau es mucho más acusada en el modelo P301S que en el ThyTau22 en ambas regiones.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

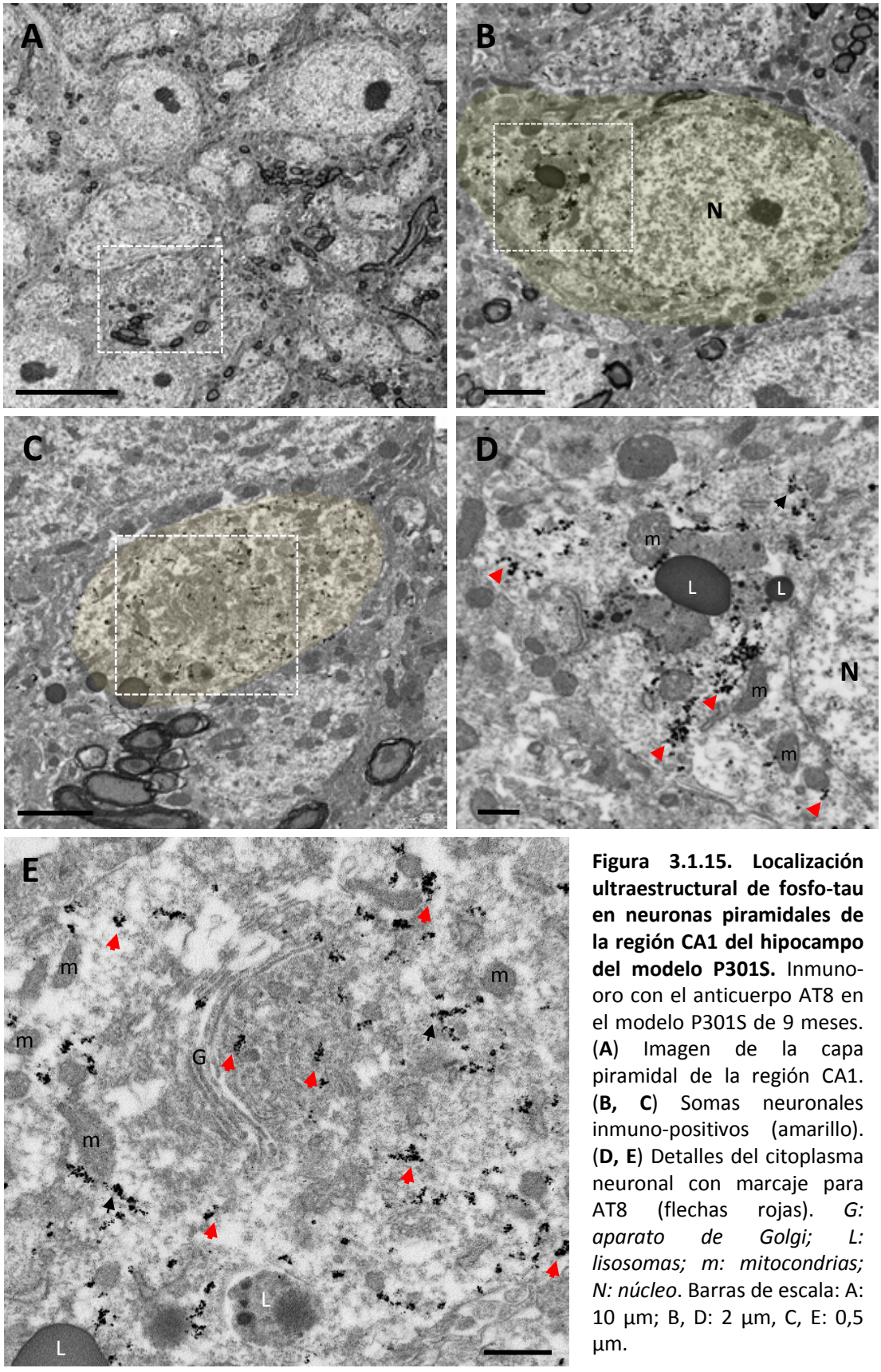


Figura 3.1.15. Localización ultraestructural de fosfo-tau en neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo del modelo P301S. Inmuno-oro con el anticuerpo AT8 en el modelo P301S de 9 meses. (**A**) Imagen de la capa piramidal de la región CA1. (**B, C**) Somas neuronales inmuno-positivos (amarillo). (**D, E**) Detalles del citoplasma neuronal con marcaje para AT8 (flechas rojas). *G: aparato de Golgi; L: lisosomas; m: mitocondrias; N: núcleo*. Barras de escala: A: 10 µm; B, D: 2 µm, C, E: 0,5 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

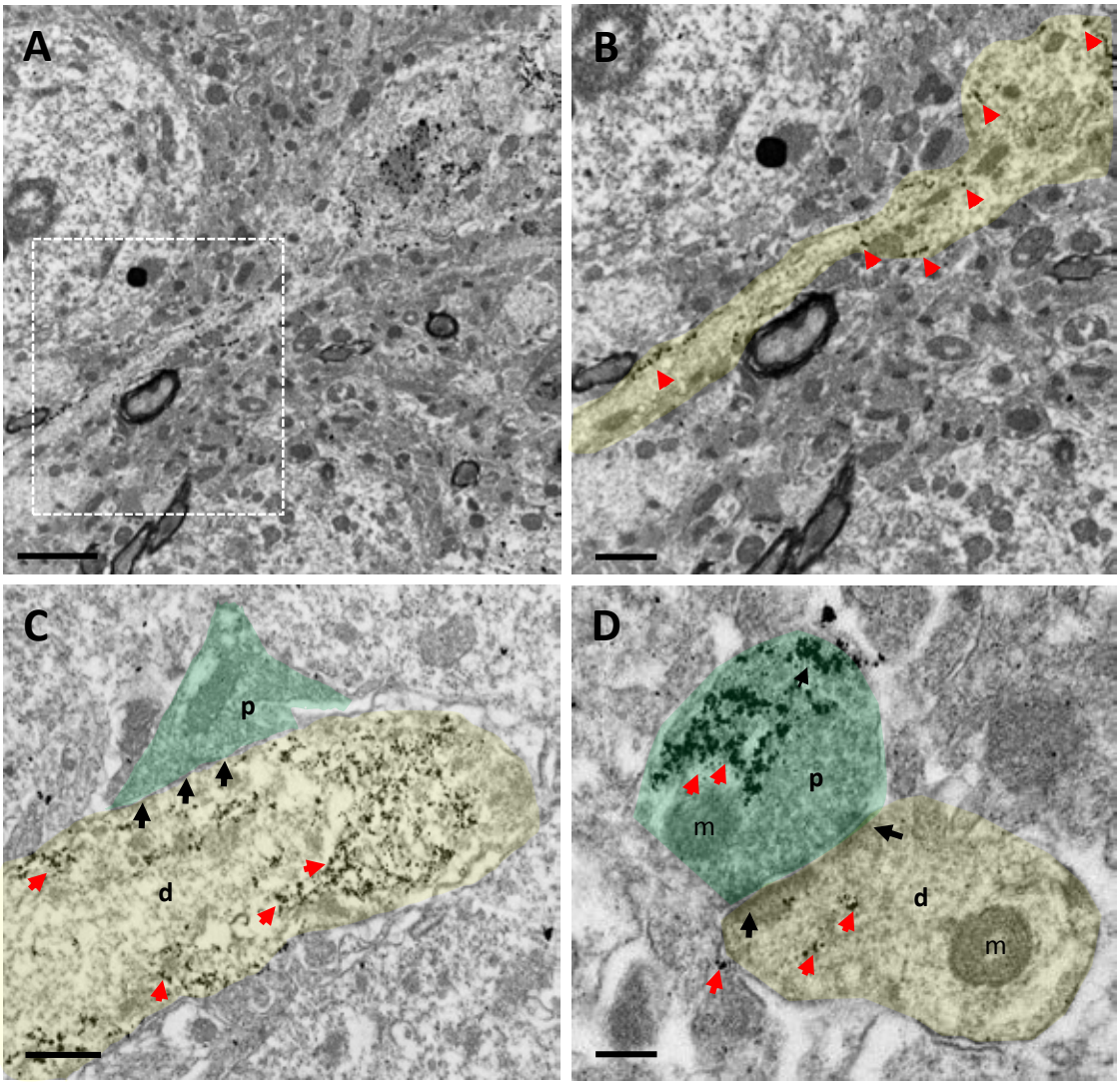


Figura 3.1.16. Localización ultraestructural de fosfo-tau en dendritas y sinapsis del hipocampo del modelo transgénico P301S. Inmuno-oro con AT8 a microscopía electrónica de transmisión. (**A, B**) Panorámica del neuropilo hipocampal y detalle de dendrita apical (amarillo) de neurona piramidal de un animal de 9 meses (flechas rojas indican inmunomarcaje). (**C**) Sinapsis simétrica entre un terminal presináptico (verde) y una dendrita (amarillo) que presenta marcaje inmmunorreactivo (flechas rojas). (**D**) Sinapsis asimétrica entre un terminal presináptico (verde) y una espina dendrítica (amarillo; flechas negras señalan la densidad postsináptica). Ambos elementos sinápticos presentan inmunomarcaje para AT8 (flechas rojas). *d: dendrita; G: aparato de Golgi; m: mitocondria; p: terminal presináptico*. Barras de escala: A-C: 10 µm; D: 2 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.1.3.1. Los ratones P301S presentan alteraciones motoras y déficits cognitivos en la memoria y aprendizaje

Se realizó un estudio longitudinal de las capacidades motoras y cognitivas de los animales transgénicos P301S y WT a los 6, 8, 10 y 12 meses (N = 10/grupo). En efecto, se observó que los ratones P301S presentaban las típicas anormalidades motoras ya descritas en este modelo durante el envejecimiento (Yoshiyama et al., 2007), incluyendo la retracción de las extremidades posteriores y parálisis progresiva, induciendo una mortalidad mayor en comparación con los animales WT debido a la imposibilidad de movimiento, acceso de comida y otras implicaciones. Esto se tradujo en un incremento en la tasa de mortalidad súbita a partir de los 8 meses de edad, especialmente en aquellos en la franja de 8,3 a 9,1 meses. A partir de esta edad, la mortalidad de los P301S comenzó a aumentar progresivamente, habiendo diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de ambos genotipos ($p<0,0001$), con una tasa de supervivencia de en torno al 50% a los 11 meses y 20% a los 12 meses de edad (**Fig. 3.1.17 A**). Debido a la gran mortalidad de estos animales a los 12 meses, no se pudieron evaluar en las posteriores pruebas de coordinación motora, memoria, aprendizaje ni neuroimagen ya que, de un número inicial de 10 animales positivos, sólo 2 de ellos (20%) alcanzaron la edad de 12 meses, imposibilitando el análisis estadístico de esta población altamente afectada por la patología.

La actividad y coordinación motora fueron testadas mediante el RotaRod. Los animales más jóvenes (6 meses) no mostraron diferencias con respecto a sus controles durante la ejecución del test (**Fig. 3.1.17 B**). Sin embargo, las alteraciones motoras comenzaron a ser evidentes a partir de los 8 meses y progresaron a lo largo del envejecimiento de los animales, siendo estadísticamente significativas a partir de los 10 meses de edad ($p<0,01$ a los 10 meses vs. los correspondientes WT) mientras que, como era de esperar, los animales WT no presentaron deficiencias motoras a esta edad.

A continuación, se evaluó el aprendizaje y la memoria espacial utilizando el laberinto de Barnes. A los 6 y 8 meses de edad, todos los grupos mostraron reducciones significativas en las latencias de escape durante la fase de aprendizaje (**Fig. 3.1.18 A y B**; $F(4,28) = 14,25$ $P < 0,0001$ y $F(1,10) = 34,02$ $P < 0,001$, respectivamente). Las primeras diferencias estadísticamente significativas entre las curvas de aprendizaje de ambos genotipos se dieron a los 8 meses (**Fig. 3.1.18 B**, $p<0,05$). A esta edad, los ratones P301S ya mostraron más dificultad a la hora de encontrar el agujero de escape que sus controles (**Fig. 3.1.18 B**, $p<0,0001$). Una vez terminada la fase de entrenamiento, se realizaron ensayos adicionales a los 8 y 10 meses de edad para continuar con el análisis longitudinal de la memoria de navegación espacial, siempre antes de realizar el estudio de neuroimagen mediante PET a la edad indicada. Los animales P301S presentaron alteraciones en la navegación espacial en comparación con sus controles desde los

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

8 meses ($p<0,01$), que continuaron a los 10 meses ($p<0,05$) (**Fig. 3.1.18 C**). Aquellos animales que presentaron retracción de las patas traseras fueron excluidos del estudio en el laberinto de Barnes. No se encontraron diferencias en la velocidad media (mm/s) entre los animales analizados, indicando que en el momento de realización de la prueba no tenían problemas motores (ADEVA de doble vía, P = 0,42, no mostrado).

Por tanto, existe una diferencia significativa tanto en la ejecución motora como en el aprendizaje y memoria espaciales de los animales P301S desde los 8 meses de edad.

3.1.3.2. El estudio longitudinal *in vivo* con el trazador de tau ^{18}F-THK-5351 mediante PET mostró una acumulación progresiva de tau patológico en el cerebro del ratón P301S

La patología tau de los animales P301S fue evaluada *in vivo* mediante un estudio de neuroimagen funcional usando una combinación de PET cerebral y tomografía axial computerizada (CT, del inglés *computed tomography*) de manera continuada desde los 6 a los 12 meses (N = 10/grupo) (**Fig. 3.1.19** a **3.1.22**). Como controles se emplearon animales WT de la misma edad. Para ello, se inyectó el radiotrazador fluorado ^{18}F-THK-5351 en la vena de la cola y el sumatorio de las emisiones dinámicas de cada animal se registró en un atlas de cerebro de ratón obtenido por microscopía de resonancia magnética (LONI USC). El valor medio de retención (SUV, del inglés *standarized uptake value*) del radiotrazador, fue analizado en las siguientes regiones cerebrales: estriado (STR), corteza (CTX), hipocampo (HP), tálamo (TH), cerebelo (CB), prosencéfalo y septum (BFS), hipotálamo (HY), amígdala (AMY), tronco encefálico (BS), giro cingulado (CG), colículo superior (SC), bulbo olfatorio (OF), mesencéfalo (MID), y colículo inferior (IC).

Las imágenes mostradas en las **Figuras 3.1.19 A, 3.1.20 A, 3.1.21 A y 3.1.22 A** representan proyecciones adquiridas mediante CT superpuestas con la señal del trazador detectada con PET, lo que permite la localización anatómica de la señal del radioligando. Las imágenes obtenidas permiten una visualización del cerebro en secciones coronales, sagitales y horizontales, aunque la resolución de las regiones cerebrales del cerebro de ratón es bastante inferior que en humanos. Así, en los ratones P301S de 6 meses, no se detectaron diferencias significativas en los valores de SUV del cerebro completo, ni de ninguna de las regiones de interés analizada de manera individual (**Fig. 3.1.19 A y B**) con respecto a sus controles. Prosiguiendo con el estudio longitudinal, se volvió a realizar el PET a estos animales a los 8 meses de edad, justo después de la realización de los estudios de comportamiento y coordinación motora mostrados anteriormente. En las imágenes se observa que existe una mayor acumulación del radiotrazador en el cerebro de los ratones transgénicos que en los WT (**Fig. 3.1.20 A**). El análisis estadístico mostró que las diferencias entre genotipos en el SUV medio

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

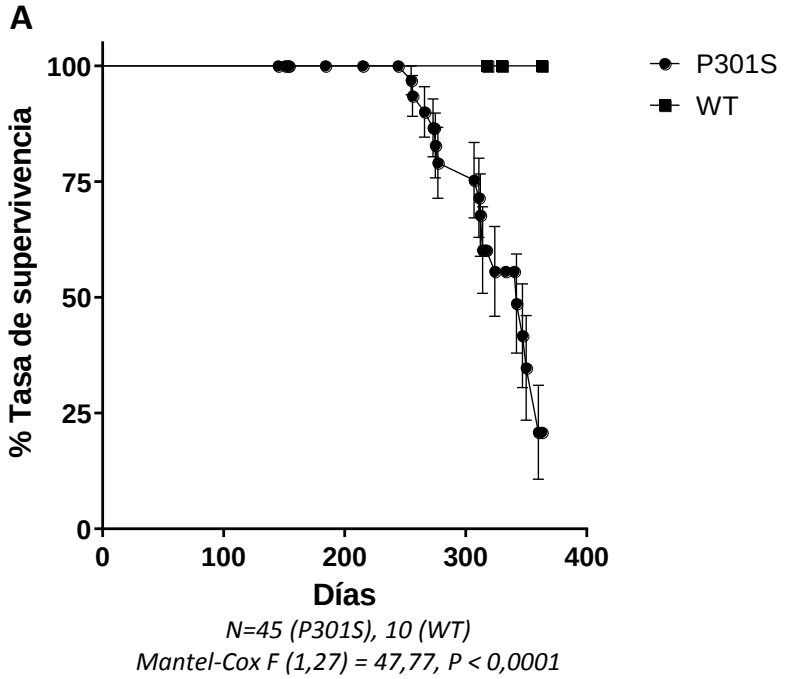
fueron significativas en el cerebro completo (p<0,001), pero no en las distintas regiones cerebrales (**Fig. 3.1.20. B**). A los 10 meses de edad, la detección de tau patológico fue más robusta en los P301S (**Fig. 3.1.21 A**), y los valores de SUV cerebrales fueron de nuevo estadísticamente superiores a los de los WT (p<0,0001) pero no los de las regiones de manera individualizada. Por último, se volvió a realizar el estudio de neuroimagen sobre los mismos animales a los 12 meses de edad (**Fig. 3.1.22**). Aunque esta vez el tamaño muestral se vio reducido a consecuencia de parálisis y muertes espontáneas (ver **Fig. 3.1.17 A**), los cerebros de los animales P301S restantes presentaron una elevada retención del trazador en comparación con los controles, aunque no se realizaron estudios estadísticos debido al bajo número de animales P301S que sobrevivieron hasta esta edad. La comparación de las imágenes representativas de neuroimagen de forma longitudinal (**Fig. 3.1.22 B**) permite observar el incremento con la edad del marcaje con el radioligando, especialmente prominente a los 10 meses de edad.

En resumen, el estudio longitudinal *in vivo* por PET mostró que el cerebro de los ratones P301S de 8 a 12 meses de edad presentó una mayor afinidad por el radiotrazador de tau ^{18}F-THK-5351 que los animales WT de la misma edad.

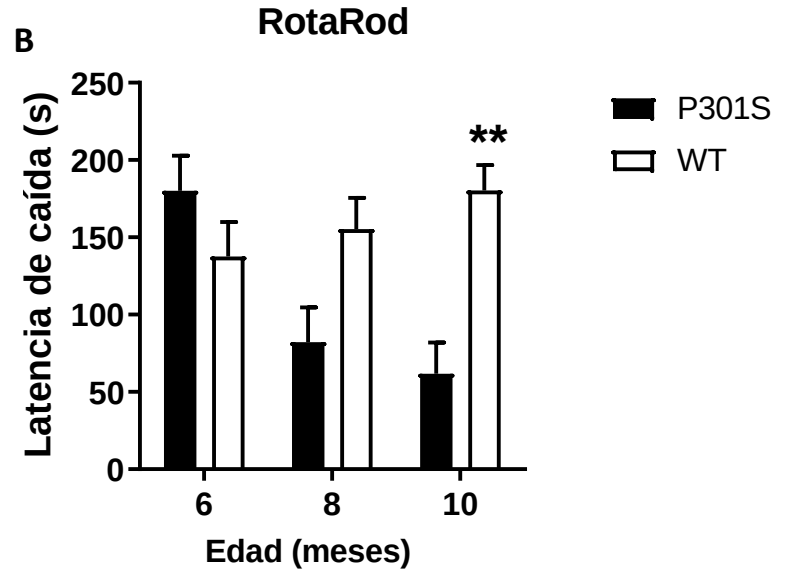
Por último, se realizó un estudio histológico en el cerebro de un grupo de animales P301S y WT, a los 6, 8, 10 y 12 meses (**Fig. 3.1.23**; N=4-5/edad/grupo) para confirmar la relación entre los resultados obtenidos por neuroimagen y la presencia de patología de tau. Para ello se realizaron tinciones inmunohistoquímicas en secciones cerebrales coronales con los anticuerpos AT8 (fosfo-tau**; Fig. 3.1.23 A**) y MC1 (conformaciones de fosfo-tau pre-NFTs, **Fig. 3.1.23. B**), así como la clásica tinción de Gallyas que permite detectar los NFTs (**Fig. 3.1.23 C**). En todos los casos, se observó un incremento progresivo asociado a la edad de la fosforilación y agregación de tau en los ratones transgénicos (se muestran cortes de corteza entorrinal a los 6, 8, 10 y 12 meses). No se detectó ninguna reacción histológica en los animales WT (no mostrado). La cuantificación por análisis de imagen (**Fig. 3.1.23 D**) de las tres tinciones mostró un incremento estadísticamente significativo en la carga de AT8 (**Fig. 3.1.23 D1**; 6 vs. 12 meses, p<0,05), MC1 (**Fig. 3.1.23 D2,** 6 vs. 12 m, p<0,05) y Gallyas (**Fig. 3.1.23 D3**; 6 vs. 12 m, p<0,05) con el avance de la edad.

En definitiva, existe un paralelismo en la evolución de los distintos parámetros analizados (conductuales, neuroimagen e histológicos) en los animales P301S, mostrando un incremento progresivo de la patología tau con la edad. Por tanto, el compuesto ^{18}F-THK5351 podría constituir un buen radiotrazador a emplear en estudios de taupatías *in vivo*.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



N=45 (P301S), 10 (WT)
Mantel-Cox F (1,27) = 47,77, P < 0,0001



N = 4-11/edad/genotipo
ADEVA de dos vías F(2, 20) = 6,72, P < 0,05
*Sidak **p < 0,01*

Figura 3.1.17. Caracterización longitudinal de la supervivencia y capacidad motora del modelo P301S. (A) Curva de supervivencia representativa. Los ratones P301S presentan parálisis de las extremidades inferiores a partir de los 8 meses de edad, momento en que la tasa de supervivencia comienza a decaer hasta alcanzar el 20% en los animales de 12 meses. En comparación con los WT, la prueba de rango logarítmico (Mantel-Cox) establece que existen diferencias significativas (p<0,0001) entre ambos genotipos. (**B)** Evaluación del fenotipo motor con el RotaRod. Los animales P301S presentan daños motores significativos a partir de los 10 meses en comparación con los WT.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

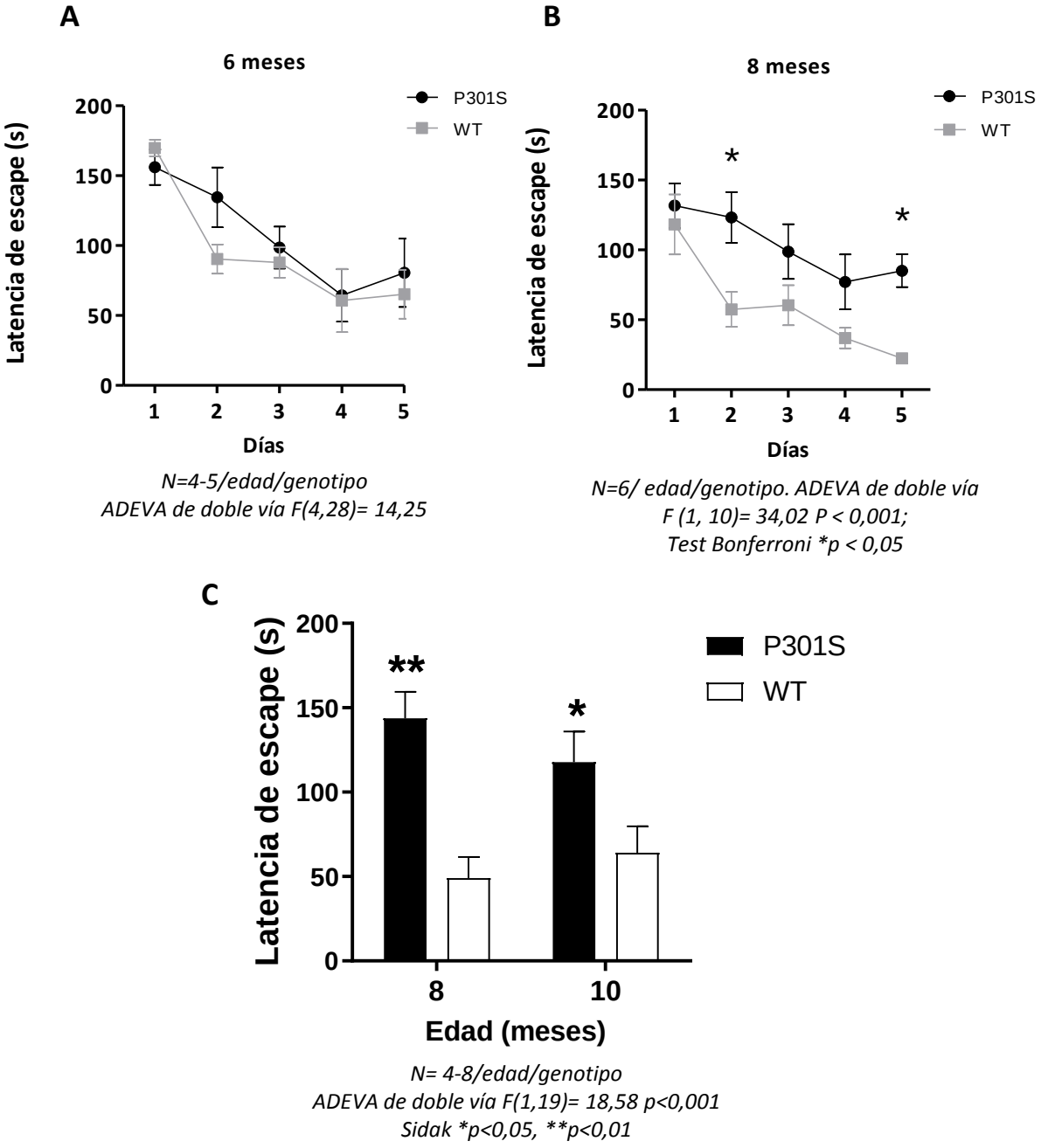
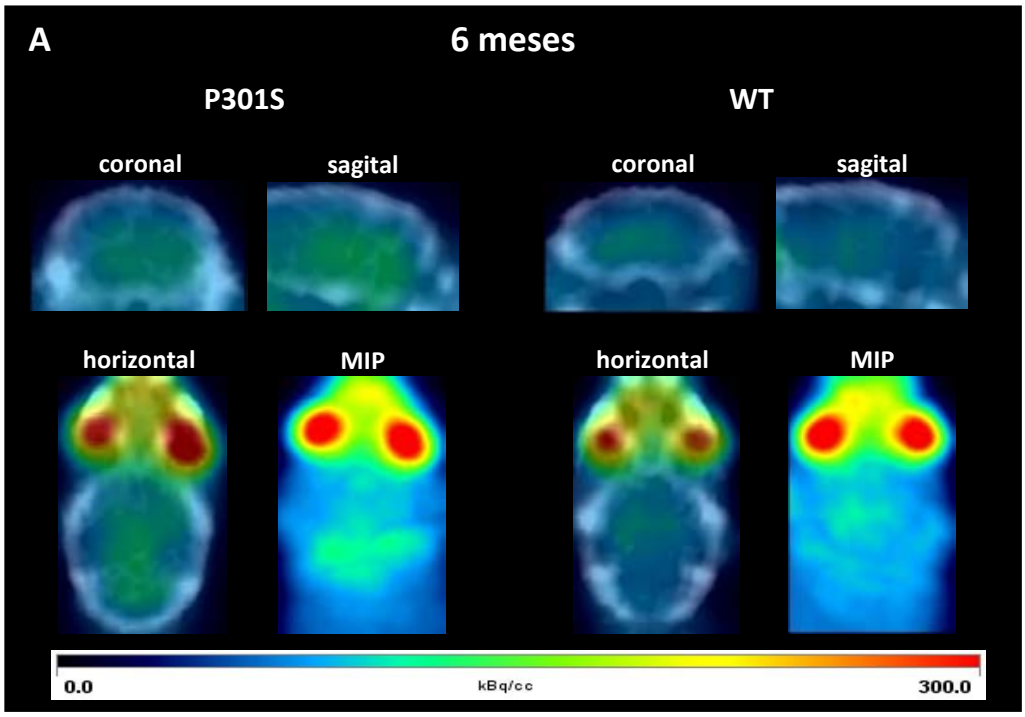
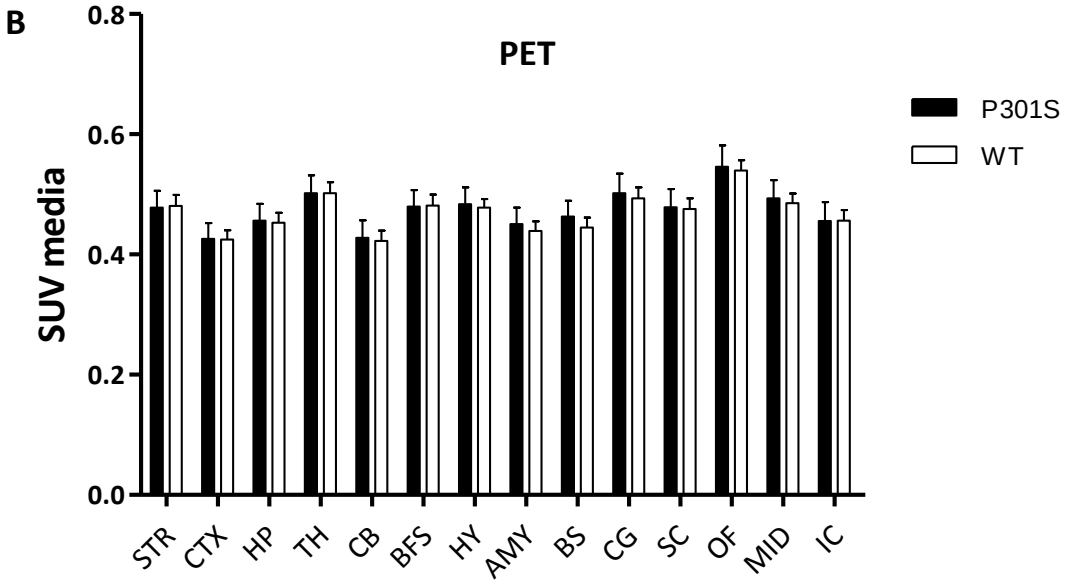


Figura 3.1.18. Análisis del aprendizaje y memoria espacial del modelo P301S con el laberinto de Barnes. (A, B) Tanto a los 6 como a los 8 meses de edad, los animales P301S y WT fueron disminuyendo la latencia de escape a lo largo de los días. Se encontraron diferencias significativas entre las curvas de aprendizaje de ambos genotipos a los 8 meses. (**C**) Fase de prueba: memoria a largo plazo. Los animales P301S presentaron una latencia de escape significativamente superior a la de sus controles, y por tanto daño en la memoria espacial, a los 8 y 10 meses de edad.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

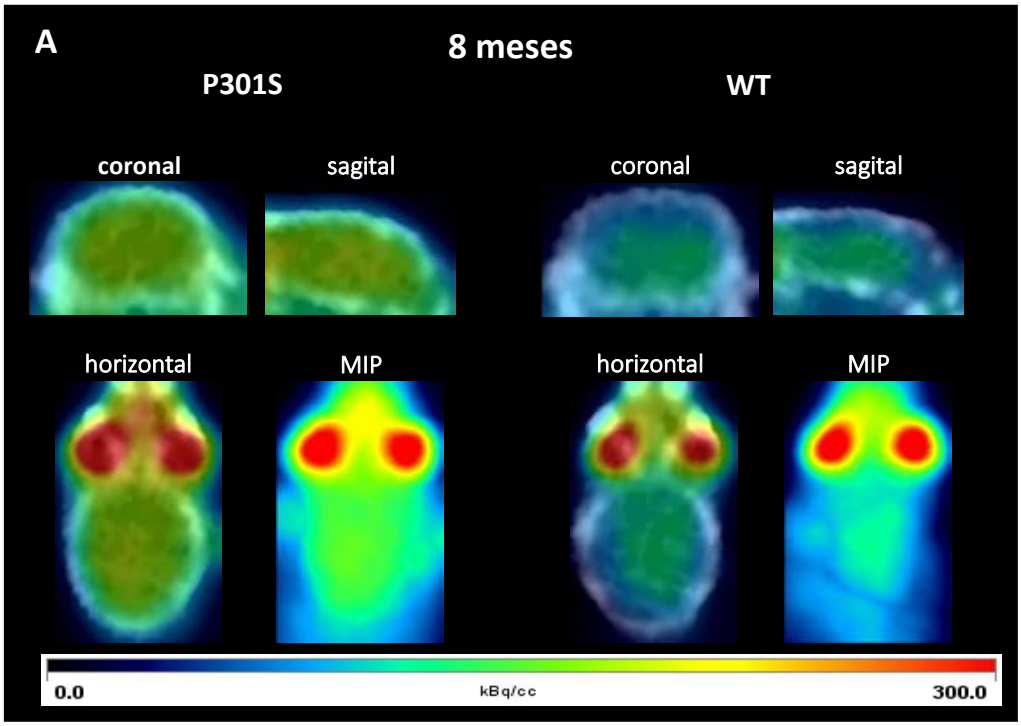


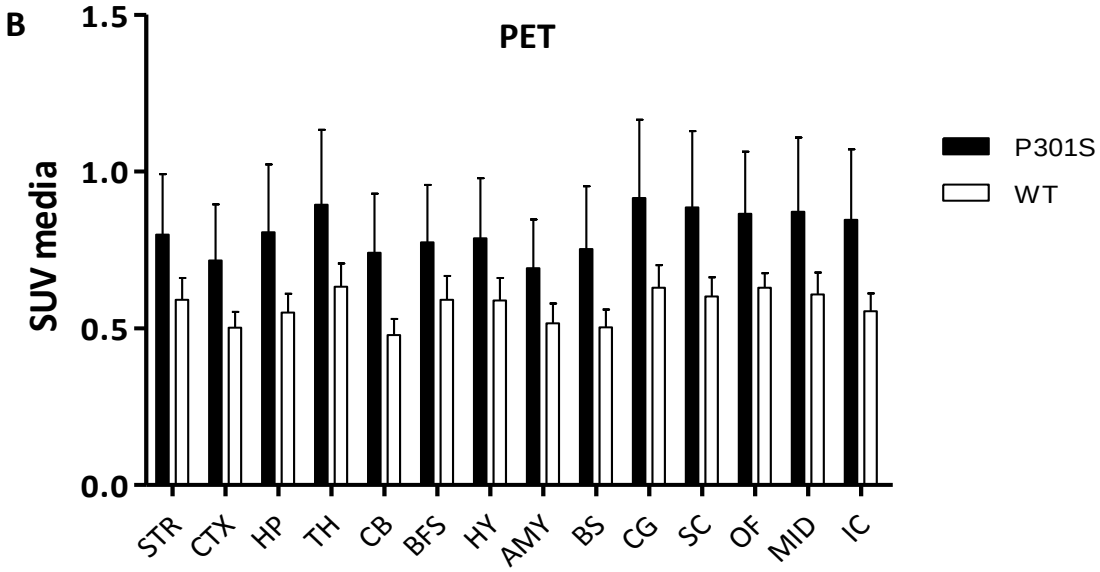


N = 10/genotipo. ADEVA de doble vía F (1, 252)= 0,28; P = 0,59
Bonferroni p > 0,05

Figura 3.1.19. Estudio *in vivo* de la unión del trazador de tau ^{18}F-THK-5351 mediante tomografía de emisión de positrones (PET) en animales P301S y WT de 6 meses de edad. (**A**) Imágenes representativas de la retención regional media del radiotrazador en ratones P301S (panel izquierdo) y WT (panel derecho) a los 6 meses de edad. Las imágenes provienen de la superposición de imágenes PET con imágenes de cráneo obtenidas mediante tomografía computerizada (CT). (**B**) Las imágenes fueron ajustadas a las regiones de interés y la unión del radioligando fue determinada usando el SUV medio. No se encontraron diferencias significativas entre las distintas zonas cerebrales de los P301S y los WT a esta edad. MIP: proyección de intensidad máxima. *Estriado (STR), cortex (CTX), hipocampo (HP), tálamo (TH), cerebelo (CB), prosencéfalo y septum (BFS), hipotálamo (HY), amígdala (AMY), tronco encefálico (BS), giro cingulado (CG), colículo superior (SC), bulbo olfatorio (OF), mesencéfalo (MID), colículo inferior (IC).*

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

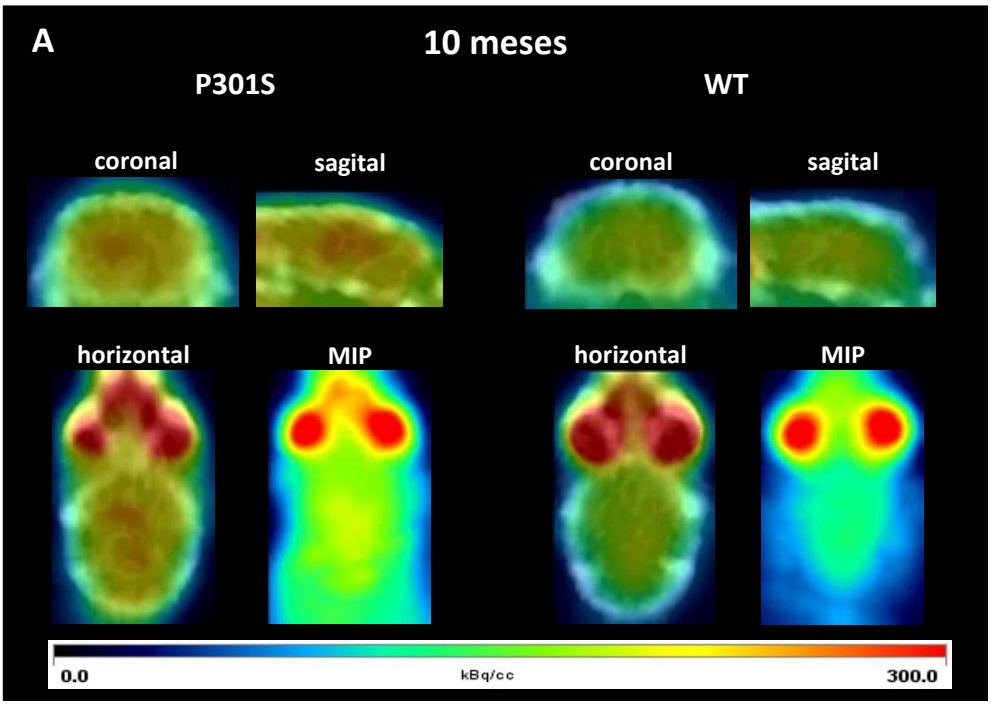


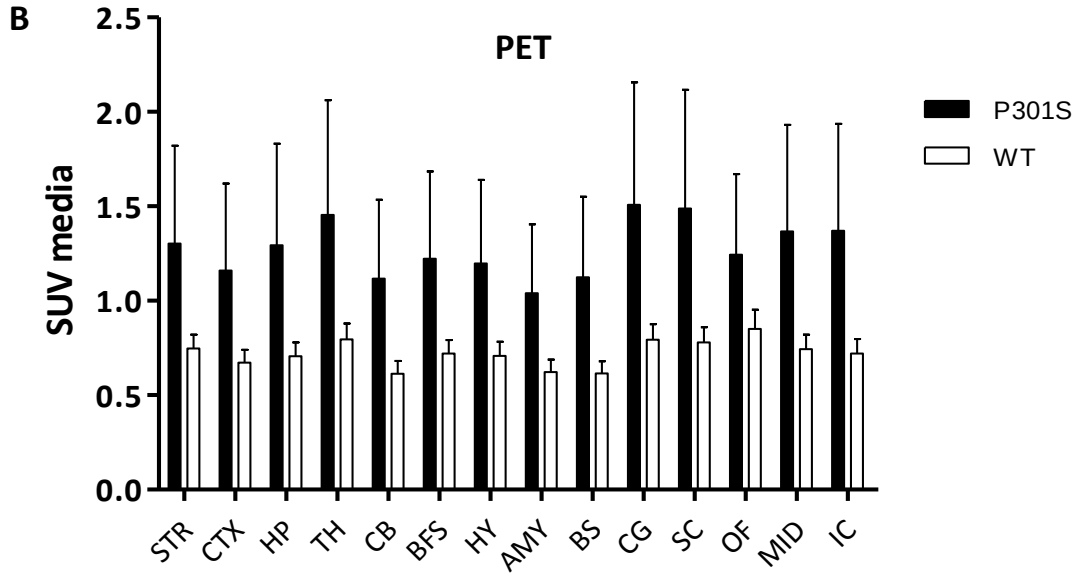


N = 8-10/genotipo. ADEVA de doble vía F (1, 224)= 13,90; P = 0,0002
Bonferroni p < 0,001

Figura 3.1.20. Tomografía de emisión de positrones *in vivo* en animales P301S y WT de 8 meses de edad. (**A**) Imágenes representativas de la retención del trazador de tau 18F-THK-5351 en ratones P301S (panel izquierdo) y WT (panel derecho) a los 8 meses de edad. Las imágenes provienen de la superposición de imágenes PET con imágenes CT. (**B**) Las imágenes fueron ajustadas a las regiones de interés, y la unión del radioligando fue determinada usando el SUV medio. El ADEVA de doble vía mostró que existen diferencias significativas (p<0,001) entre el cerebro de los P301S y los WT a esta edad. MIP: proyección de intensidad máxima. *Estriado (STR), cortex (CTX), hipocampo (HP), tálamo (TH), cerebelo (CB), prosencéfalo y septum (BFS), hipotálamo (HY), amígdala (AMY), tronco encefálico (BS), giro cingulado (CG), colículo superior (SC), bulbo olfatorio (OF), mesencéfalo (MID), colículo inferior (IC).*

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

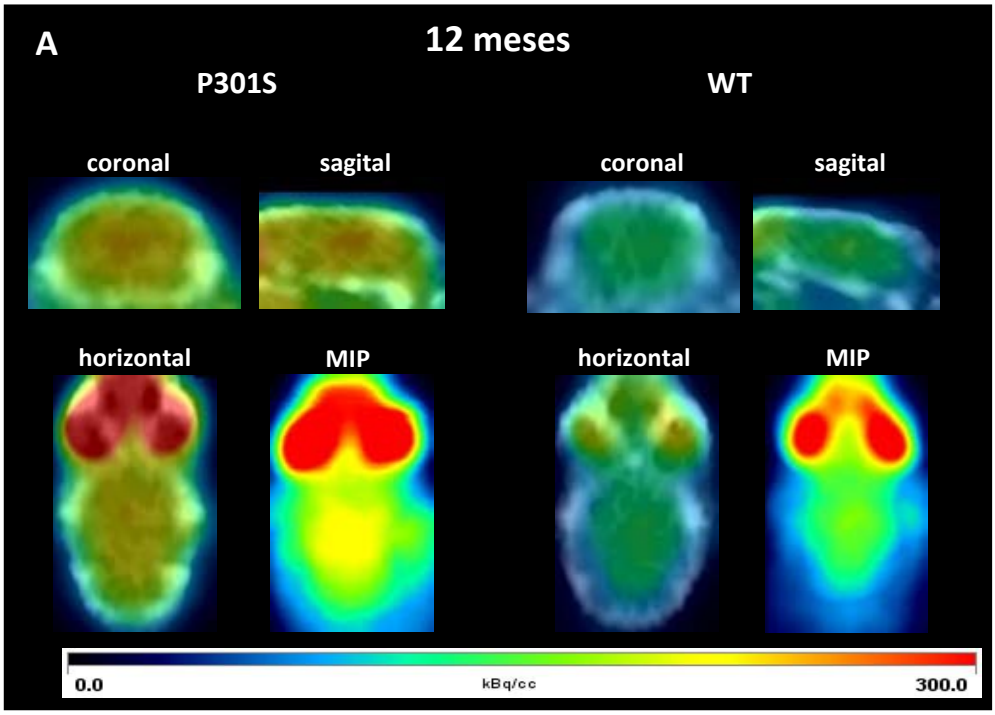




N=5-7/genotipo. ADEVA de doble vía F (1, 140)= 23,09; P<0,0001
Bonferroni p < 0,0001

Figura 3.1.21. Tomografía de emisión de positrones (PET) *in vivo* en animales P301S y WT de 10 meses de edad. (**A**) Imágenes representativas de la retención de 18F-THK-5351 en animales P301S (panel izquierdo) y WT (panel derecho) de 10 meses (PET + CT). (**B**) La gráfica muestra el SUV medio en las regiones de interés. La ADEVA de doble vía mostró que existen diferencias significativas (p<0,0001) entre el cerebro de los P301S y los WT a esta edad. MIP: Proyección de intensidad máxima. *Estriado (STR), cortex (CTX), hipocampo (HP), tálamo (TH), cerebelo (CB), prosencéfalo y septum (BFS), hipotálamo (HY), amígdala (AMY), tronco encefálico (BS), giro cingulado (CG), colículo superior (SC), bulbo olfatorio (OF), mesencéfalo (MID), colículo inferior (IC).*

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



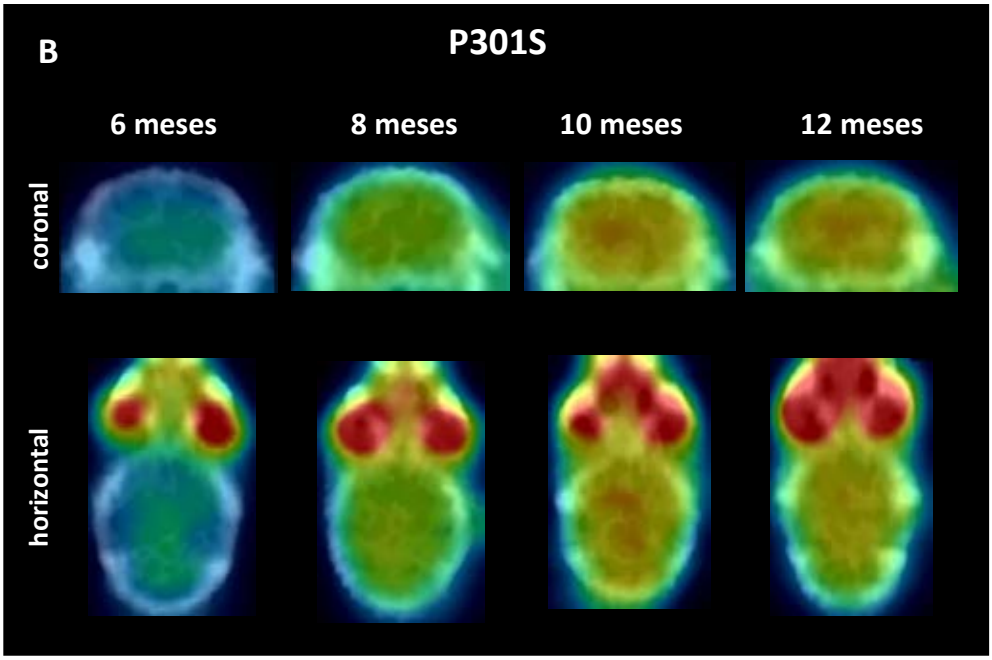
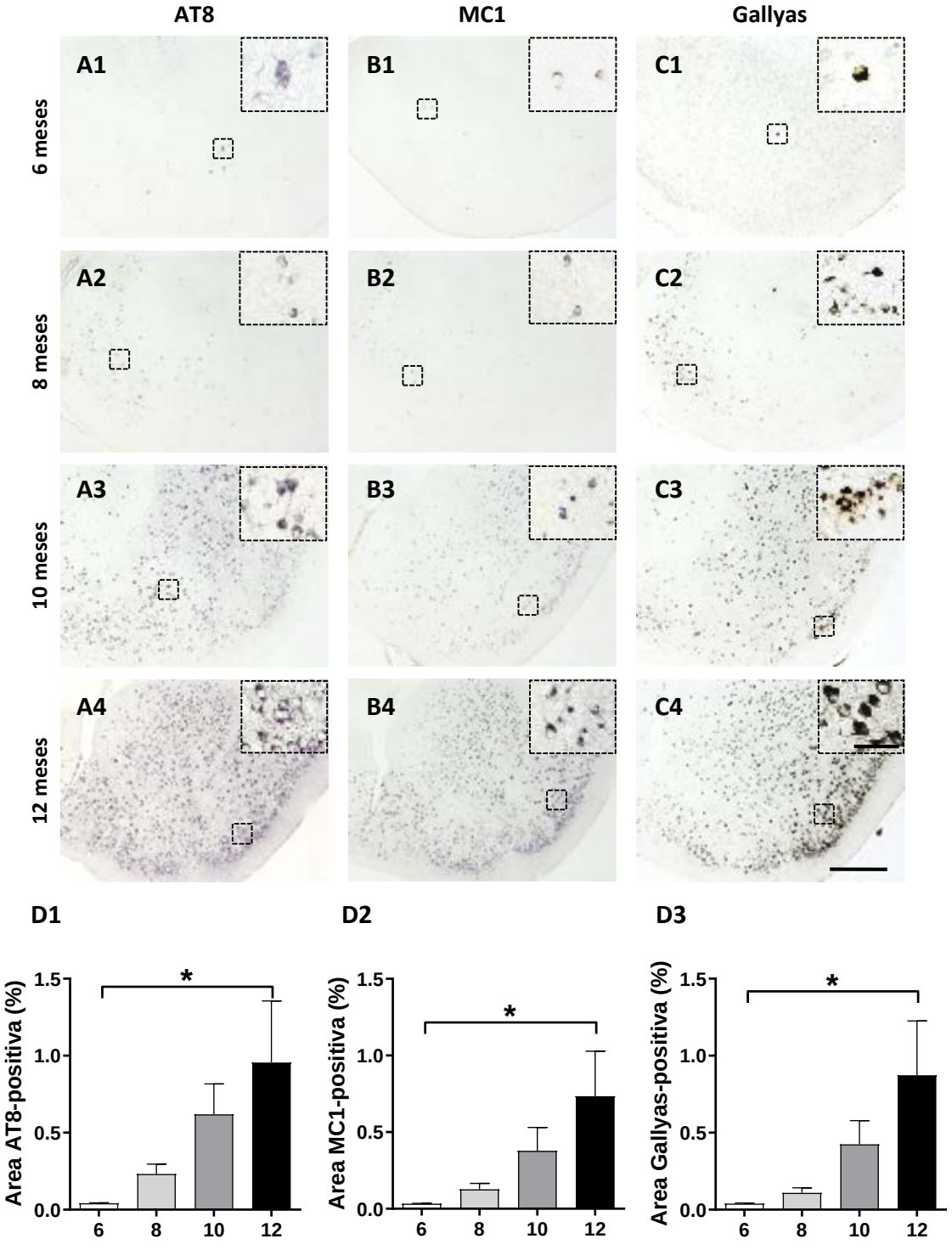


Figura 3.1.22. Tomografía de emisión de positrones (PET) *in vivo* en animales P301S y WT de 12 meses de edad. (**A**) Imágenes representativas de la retención del trazador en ratones P301S (panel izquierdo) y WT (panel derecho) de 12 meses (PET + CT). (**B**) Análisis longitudinal de los estudios de neuroimagen en el ratón P301S. Imágenes representativas PET-CT de los animales transgénicos desde los 6 a los 12 meses de edad en secciones coronales y horizontales.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



N=4-5/edad. *F (3,13) = 3,855, P<0,05. Tukey *p<0,05*

N=4-5/edad. *F (3,12) = 3,57, P < 0,05 Tukey *p<0,05*

N=4-5/edad. *F (3,12) = 3,898, P<0,05.Tukey *p<0,05*

Figura 3.1.23. Análisis histológico de la patología de tau de los animales P301S (6, 8, 10 y 12 meses de edad) Imágenes representativas de la inmunotinción para los anticuerpos (**A**) AT8 (fosfo-tau) y (**B**) MC1 (estado conformación pre-ovillos), junto con (**C**) la tinción de Gallyas (para NFTs) en la corteza entorrinal del modelo P301S. (**D**) El análisis cuantitativo (ADEVA de una vía; n=4-5/grupo) mostró un aumento significativo asociado a la edad en la inmunotinción con AT8 (**D1**), MC1 (**D2**) así como en la tinción de Gallyas (**D3**). Barra de escala: 300 µm, inserto 100 µm.

UNIVERSIDAD DE MALAGA

3.1.4. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS PROTEOSTÁTICOS DE DEGRADACIÓN PROTEICA EN EL HIPOCAMPO DE LOS MODELOS THYTAU22 Y P301S. COMPARATIVA CON UN MODELO AMILOIDOGÉNICO APP/PS1.

La acumulación y agregación de fosfo-tau es debida, al menos parcialmente, a diversas alteraciones patológicas, por ejemplo, en los mecanismos que controlan y realizan su fosforilación. Sin embargo, también hay que considerar los fallos en los mecanismos que intervienen en su homeostasis. Como cualquier proteína, tau es susceptible de ser degradada a través de los sistemas de proteólisis celulares. Se sabe que el sistema ubiquitina-proteosoma (UPS) y la vía autofágica-lisosomal son mecanismos proteolíticos que participan en la degradación de tau y fosfo-tau, y que ambos sistemas se encuentran afectados en diversas taupatías neurodegenerativas, entre ellas la EA (Lee et al., 2013; Gong et al., 2016; Cao et al., 2019). No obstante, la relación entre los fallos en estos sistemas de degradación intracelular y la acumulación patológica de fosfo-tau aún no es bien conocida. La ubiquitinación de fosfo-tau también ocurre en estadios intermedios de la formación de NFTs, y se ha descrito que estos se encuentran formados por proteína tau altamente ubiquitinada (Lasagna-Reeves et al., 2012). La vía autofágica-lisosomal trataría de eliminar aquellos agregados de fosfo-tau que, debido a su gran tamaño, no pueden ser eliminados por el proteosoma. Por tanto, decidimos hacer un análisis comparativo de dichas vías proteolíticas en ambos modelos de taupatía pura a lo largo del envejecimiento, y contrastarlo con un modelo amiloidogénico, el ratón doble transgénico APP/PS1 y sus correspondientes controles (WT).

Para estudiar la presencia de proteínas ubiquitinadas en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S, se realizó una tinción inmunohistoquímica a campo claro usando un anticuerpo anti-ubiquitina (**Fig. 3.1.24 y Fig. 3.1.25**). La ubiquitina es una proteína ubicua, y por tanto, el marcaje aparece en todos los somas neuronales definiendo de manera clara las capas de las neuronas principales del hipocampo (estratos piramidal y granular). En el caso del modelo ThyTau22 (**Fig. 3.1.24 A**), desde los 2 meses de edad, aparecieron algunos somas del estrato piramidal de CA1 más inmunorreactivos que el resto de esta misma capa (inserto en **Fig. 3.1.24 A1**), localizados en la región de transición CA1-subículo. Con la edad, la cantidad de estos somas fue en aumento progresivamente, y extendiéndose por todo el estrato (**Fig. 3.1.24 A1-A4**). A edades avanzadas (18 meses, **Fig. 3.1.24 A4**) además de los somas con fuerte marcaje repartidos a lo largo de toda la capa piramidal de CA1, aparecieron zonas con un marcaje granulado en las capas del neuropilo del hipocampo propio (estratos oriens, radiado y lacunoso-molecular) (detalle del estrato radiado en el inserto de **Fig. 3.1.24 A4**). En el giro dentado no se detectaron somas con inmunorreactividad diferencial a ninguna de las edades analizadas.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

En el modelo P301S, (**Fig. 3.1.24 B**) la presencia de somas con más intensidad de marcaje para ubiquitina comenzó a ser detectable a los 9 meses en la capa granular del giro dentado (**Fig. 3.1.24 B1-B3,** detalle en inserto) que fue acompañada de un aumento de la intensidad del marcaje en el hilio (neuropilo). A edades avanzadas (12 meses, **Fig. 3.1.24 B4**), los somas diferencialmente marcados se extendían por todas las regiones del hipocampo (CA1-CA3 y giro dentado), y el hilio exhibía gran cantidad de marcaje para ubiquitina de tipo granular (ver inserto en **Fig. 3.1.24 B4**).

Los animales de genotipo silvestre no presentaron somas con inmunotinción diferencial para ubiquitina a ninguna de las edades analizadas (**Fig. 3.1.25 A1-A3**). A la edad más avanzada (18 meses, **Fig. 3.1.25 A3**) sí que se observaron agrupaciones de gránulos positivos para ubiquitina en el estrato radiado de CA1 y en la capa molecular del giro (ver inserto en **Fig. 3.1.25 A3**). Por último, se realizó una comparativa con el modelo APP/PS1 (**Fig. 3.1.25 B**), que presenta placas amiloides extracelulares de tipo neurítico (rodeadas de neuritas distróficas) en el hipocampo desde los 3-4 meses de edad. Además del típico marcaje asociado a las capas de cuerpos neuronales, desde el momento en que se inició la acumulación extracelular de β-amiloide, las placas aparecieron rodeadas por neuritas distróficas altamente inmunorreactivas para ubiquitina (ver detalle en inserto en **Fig. 3.1.25 B3**) tanto en CA1 como en el giro dentado. La acumulación de ubiquitina periplaca aumentaba con la edad en paralelo a la cantidad de depósitos amiloides, siempre asociada a ellos, y siendo especialmente abundante a edades avanzadas (18 meses) en el estrato oriens de CA1 y el hilio del giro (**Fig. 3.1.25 B3**). En este modelo no se observó que ningún cuerpo neuronal mostrase un marcaje diferencial a ninguna de las edades estudiadas.

A continuación, se analizó el sistema autofágico-lisosomal en ambos modelos de tau mediante el inmunomarcaje para la proteína LC3b (**Fig. 3.1.26**). Este marcador es una proteína de unión a microtúbulos (MAP), que también se encuentra anclada a la membrana de los autofagosomas, y se utiliza frecuentemente como biomarcador del flujo autofágico. Como se observa en la **Figura 3.1.26**, el marcaje en el hipocampo presenta un patrón característico, localizándose esta proteína principalmente en los somas y dendritas apicales de las neuronas principales del hipocampo propio (inserto en **Fig. 3.1.26 A1**) y del giro dentado. No existía variación significativa del marcaje entre los animales ThyTau22 y P301S (**Fig. 3.1.26 A y B**, respectivamente) a ninguna de las edades estudiadas (desde los 2 a 12/18 meses) ni en la localización ni en la intensidad de la tinción. Además, el hipocampo de ambos modelos presentó un patrón de marcaje similar al existente en animales no transgénicos de la misma edad (**Fig. 3.1.27 A**).

Por el contrario, en el modelo amiloidogénico (APP/PS1, **Fig. 3.1.27 B**) existía un aumento anómalo del marcaje para LC3b que se localizaba en torno a las placas extracelulares

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

desde edades muy tempranas (**Fig. 3.1.27 B1**; 4 meses). Como en el caso anterior, la tinción estaba asociada a las neuritas distróficas periplaca (ver inserto en **Fig. 3.1.27 B3**) y se incrementaba de forma proporcional a la carga amiloide, concentrándose inicialmente en el estrato oriens y el hilio, y llegando a aparecer por todas las capas del hipocampo a edades muy avanzadas (18 meses, **Fig. 3.1.27 B3**).

Por último, dado que los lisosomas son elementos esenciales en esta vía de degradación, se realizó un estudio mediante inmunomarcaje para la proteína LAMP2, situada en la membrana de los lisosomas. A edades tempranas, el hipocampo de ambos modelos de taupatía pura (**Fig. 3.1.28**) presentó un inmunomarcaje más intenso en el alveus y la fimbria, así como en el estrato lacunoso-molecular de CA1, y en menor medida en la capa molecular del giro dentado (**Fig. 3.1.28 A1 y B1**), destacando la capa molecular interna (la más cercana a la capa granular). Esta inmunotinción diferencial a nivel espacial también se observaba en los animales WT y APP/PS1 (**Fig. 3.1.29 A y B**), lo que indica la presencia de mayor cantidad de esta proteína lisosomal en estas regiones en condiciones fisiológicas. Aunque los ratones ThyTau22 mantuvieron este patrón de marcaje, a partir de los 6 meses (**Fig. 3.1.28 B2**) comenzaron a mostrar una inmunorreactividad adicional específica en la región CA1, en porciones del estrato oriens y radiado adosadas a la capa piramidal, coincidiendo con las zonas de inicio de la patología de tau en este modelo. Este marcaje fue en aumento con la edad, extendiéndose en torno a la capa piramidal de CA1 inicialmente, llegando después a teñir otras partes del estrato radiado y hasta capas del giro (molecular e hilio) a edades avanzadas (18 meses, **Fig. 3.1.28 A3**). En el modelo P301S, el marcaje empezó a extenderse de manera difusa por todo el giro dentado a partir de los 6 meses y aumentando progresivamente con la edad (**Fig. 3.1.28 B2 y B3**), hasta que a edades avanzadas (12 meses, **Fig. 3.1.28 B3**) ya cubría prácticamente todas las capas del hipocampo propio (con la excepción de las capas de neuronas principales), coincidiendo así con el patrón de desarrollo de la patología de tau observada en este modelo.

Los animales APP/PS1 (**Fig. 3.1.29 B**), al igual que lo descrito con los otros dos marcadores, presentaron un aumento de la inmunotinción para LAMP2 asociada a las placas amiloides desde edades tempranas (4 meses; **Fig. 3.1.29 B1**). Inicialmente, el marcaje estaba exclusivamente asociado a las neuritas distróficas periplaca y aumentaba en paralelo a la extensión de la patología amiloide extracelular, si bien llegó a cubrir todo el parénquima del hipocampo (y el subículo ya desde los 6 meses; **Fig. 3.1.29 B2**) a edades avanzadas (18 meses), con la excepción de los estratos de los somas de las neuronas principales (CA1-CA3 y del giro) (**Fig. 3.1.29 B3**).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Los animales no transgénicos (**Fig. 3.1.29 A**) no mostraron ningún cambio significativo en el inmunomarcaje para esta proteína lisosomal LAMP2 con el avance de la edad, lo que demuestra que, tanto en los modelos de tau como en los amiloidogénicos, el aumento de carga lisosomal está asociado a sus respectivas patologías.

En resumen, los resultados de este bloque muestran que el hipocampo de los dos modelos de taupatía presentan acumulación tanto de ubiquitina como de LAMP2, con importantes diferencias cuantitativas, especialmente en el caso del marcador lisosomal. Además, se encontraron variaciones cualitativas en comparación con los animales APP/PS1 en todos los marcadores, no existiendo alteraciones en el marcaje para LC3b en ninguno de los ratones transgénicos de tau. Por tanto, parece existir cierta especificidad en cuanto a los fallos en los mecanismos proteostáticos en cada uno de los modelos analizados.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

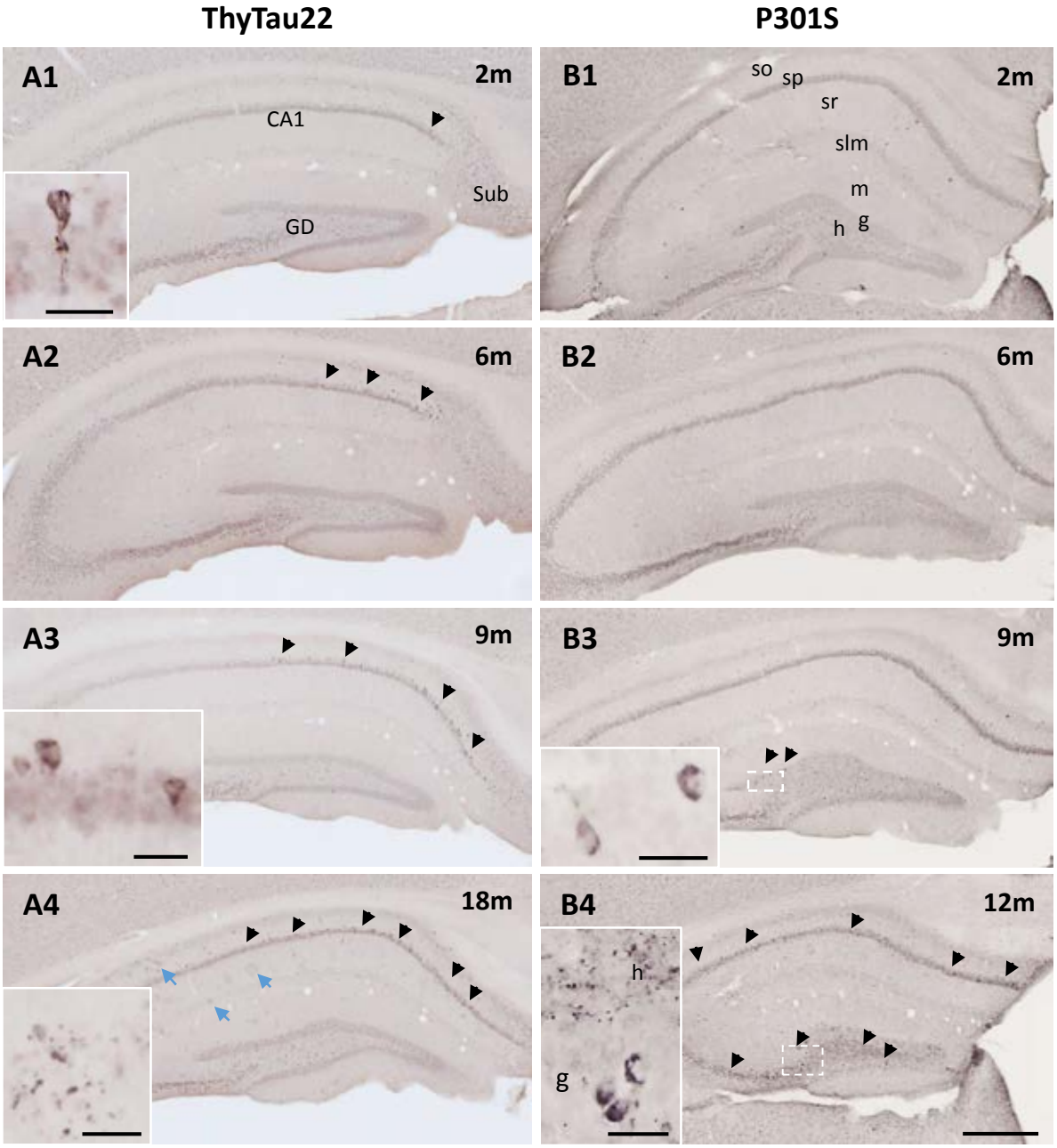


Figura 3.1.24. Patrón de inmunomarcaje para ubiquitina en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S con la progresión de la edad. La inmunotinción se concentra en los somas de las neuronas principales en el hipocampo propio (CA1-3) y giro dentado en ambos modelos. (**A1-A4**) En ThyTau22 se observan algunos cuerpos de neuronas piramidales en CA1 con fuerte inmunomarcaje (cabezas de flecha, detalles en insertos en **A1** y **A3**), cuyo número va en aumento con la edad. A los 18 meses (**A4**) existe marcaje granulado en el neuropilo de CA1 (flechas azules, detalle en inserto). (**B1-B4**) En P301S, a partir de los 9 meses aparecen algunos somas de neuronas granulares más intensamente marcados. El número incrementa con la edad y se extiende al resto de regiones (cabezas de flecha, detalles en insertos en **B3** y **B4**) así como la inmunotinción en el neuropilo. *CA1-CA3: regiones del hipocampo propio; g: capa granular; GD: giro dentado; h: hilio; m: capa molecular; slm: estrato lacunoso-molecular; so: estrato oriens; sp: capa piramidal; sr: estrato radiado; Sub: subículo*. Barra de escala: A-B: 400 µm; insertos: 20 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

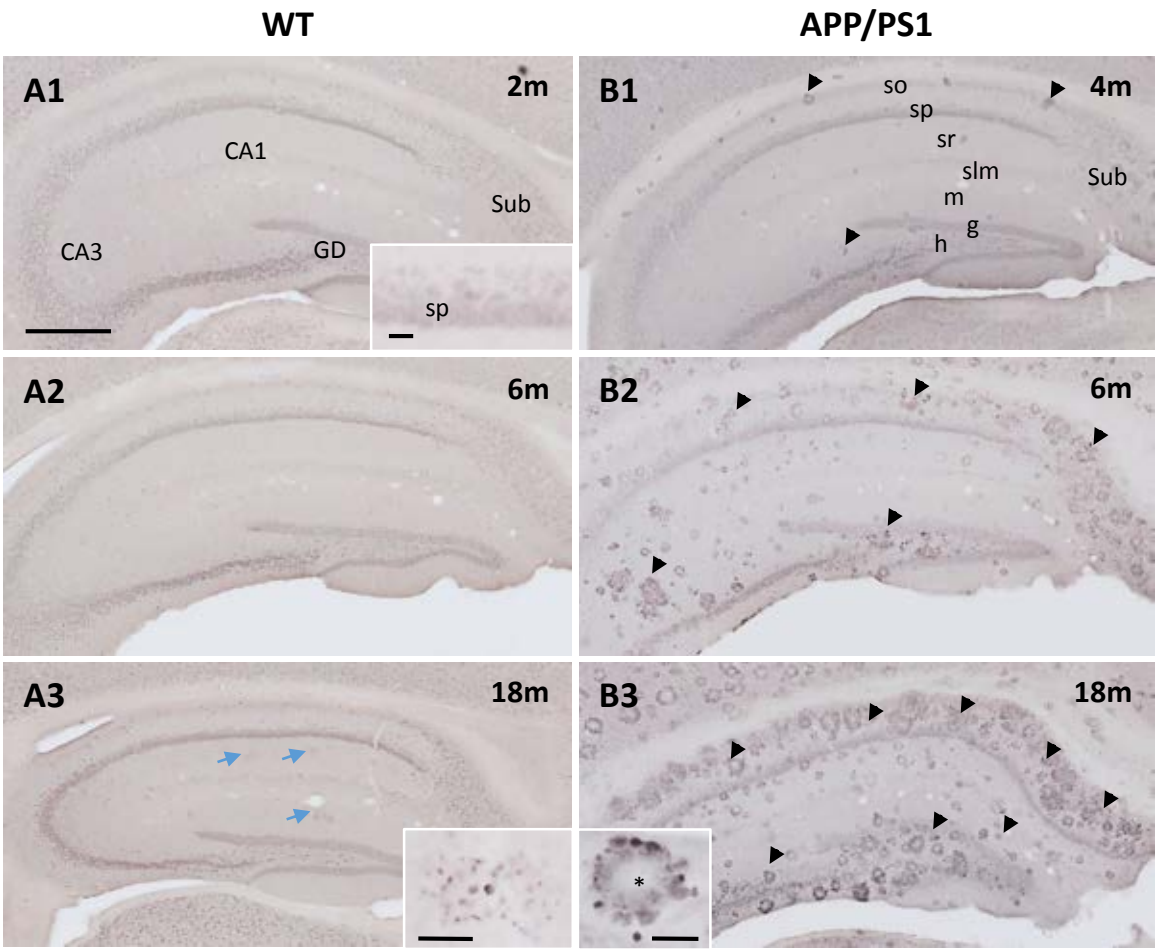


Figura 3.1.25. Inmunohistoquímica para ubiquitina en el hipocampo de animales WT y del modelo amiloidogénico APP/PS1 con la progresión de la edad. (**A1-A3**), en WT el patrón de expresión de ubiquitina define las capas de somas de las neuronas principales a todas las edades (detalle inserto en **A1**). A los 18 meses (**A3**) se aprecia marcaje granular en el neuropilo (flechas azules, detalle en inserto). (**B1-B3**) En APP/PS1 la ubiquitina se observa fundamentalmente en el neuropilo asociado a las placas de Aβ (inserto en **B3**, asterisco indica posición de placa), e incrementa progresivamente y en paralelo con la patología amiloide, expandiéndose a las distintas regiones del hipocampo. *CA1-CA3: regiones del hipocampo propio; g: capa granular; GD: giro dentado; h: hilio; m: capa molecular; slm: estrato lacunoso-molecular; so: estrato oriens; sp: capa piramidal; sr: estrato radiado; Sub: subículo*. Barra de escala: A, B: 400 µm; insertos: 20 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

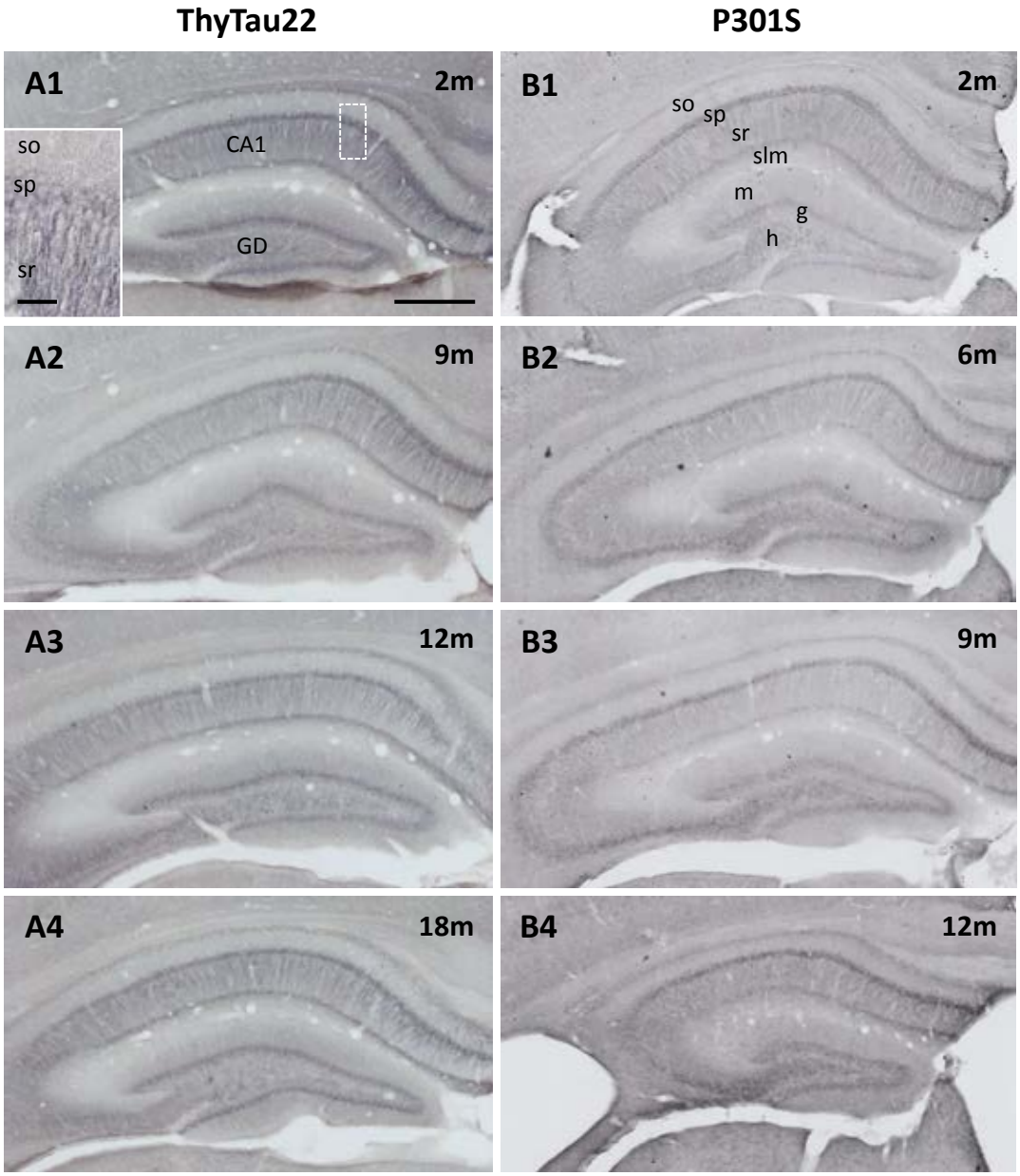


Figura 3.1.26. Estudio inmunohistoquímico del marcador de autofagia LC3b en el hipocampo de animales ThyTau22 y P301S con la progresión de la edad. En ambos modelos, LC3b se localiza en el soma y dendritas apicales de las neuronas principales (detalle en inserto en **A1**), sin que se aprecien cambios significativos durante el envejecimiento de ninguno de los genotipos. *CA1-CA3: regiones del hipocampo propio; g: capa granular; GD: giro dentado; h: hilio; m: capa molecular; slm: estrato lacunoso-molecular; so: estrato oriens; sp: capa piramidal; sr: estrato radiado*. Barras de escala: A, B: 400 µm; inserto: 20 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

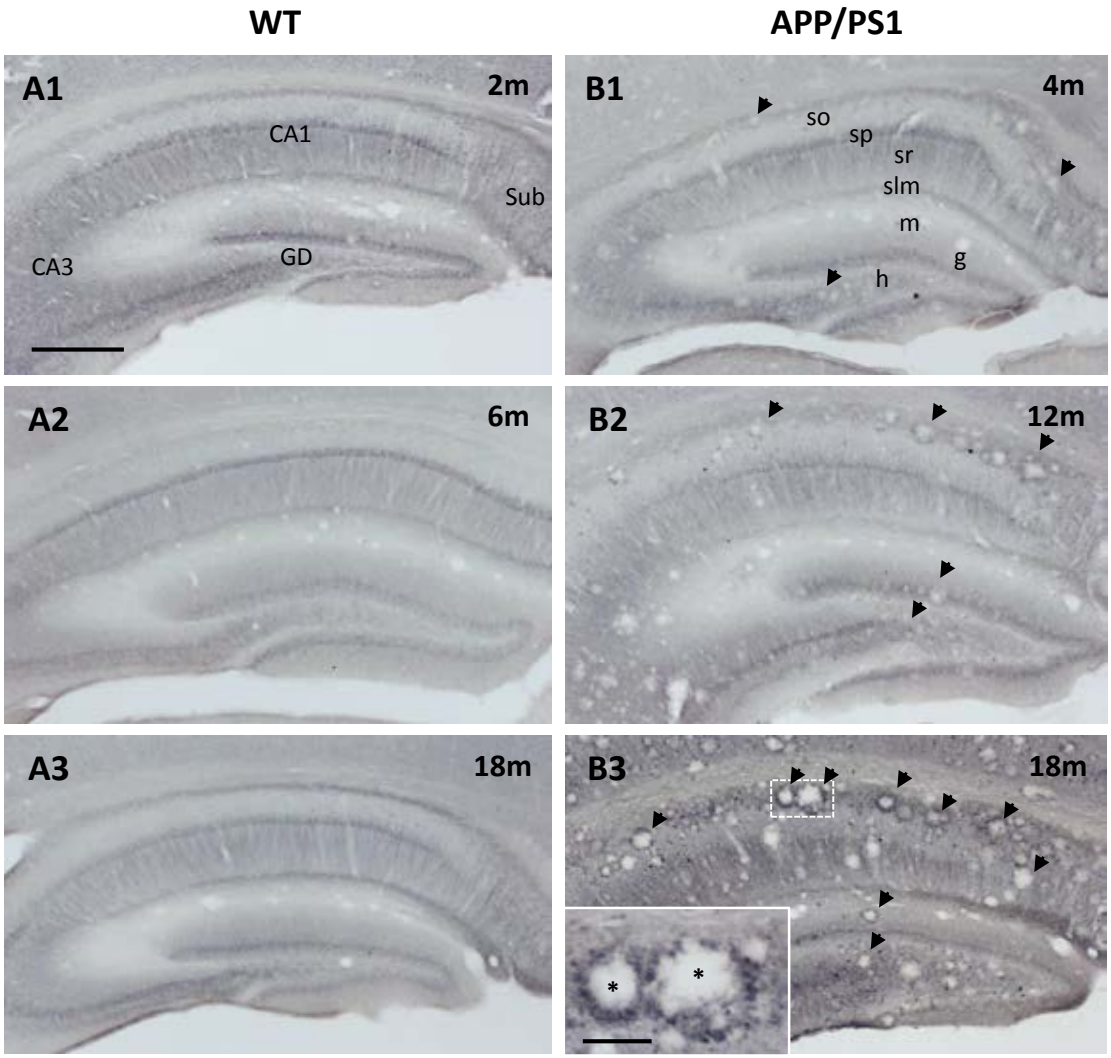


Figura 3.1.27. Estudio inmunohistoquímico del marcador de autofagia LC3b en el hipocampo de animales WT y APP/PS1 con la progresión de la edad. Los animales WT muestran un marcaje abundante en el soma y dendritas apicales de las neuronas principales, a todas las edades. En el modelo APP/PS1, la acumulación de LC3b aparece asociada a los depósitos de Aβ (puntas de flecha), y se va extendiendo por el hipocampo en paralelo a la patología amiloide. Inserto en **B3**, muestra detalles de neuritas distróficas positivas para LC3b alrededor de placas de Aβ (*). *CA1-CA3: regiones del hipocampo propio; g: capa granular; GD: giro dentado; h: hilio; m: capa molecular; slm: estrato lacunoso-molecular; so: estrato oriens; sp: capa piramidal; sr: estrato radiado; Sub: subículo*. Barras de escala: A, B: 400 µm; inserto: 20 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

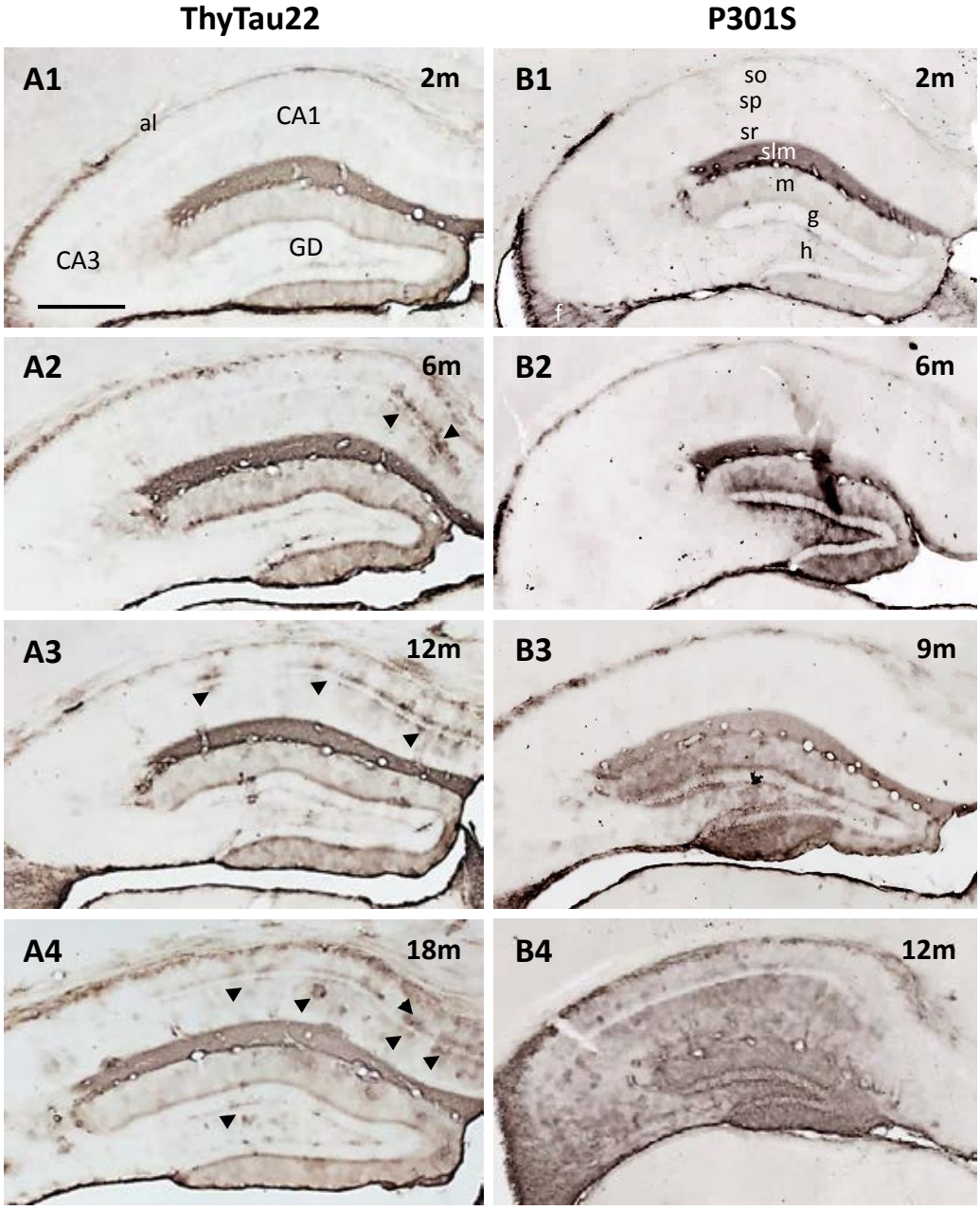


Figura 3.1.28. Estudio inmunohistoquímico del marcador lisosomal LAMP2 en el hipocampo de ThyTau22 y P301S con la progresión de la edad. LAMP2 presenta un marcaje característico en los estratos lacunoso-molecular y molecular. En el modelo ThyTau22, a partir de los 6 meses aparecen zonas positivas alrededor de la capa piramidal (cabezas de flecha), que se van extendiendo por el resto de CA1 con la edad. En el modelo P301S, a partir de los 4-6 meses aparecen zonas inmunoteñidas en torno a la capa granular que se van extendiendo por el giro dentado y finalmente por todo el hipocampo. al: alveus; *CA1-CA3: regiones del hipocampo propio; f: fimbria; g: capa granular; GD: giro dentado; h: hilio; m: capa molecular; slm: estrato lacunoso-molecular; so: estrato oriens; sp: capa piramidal; sr: estrato radiado*. Barras de escala: A, B: 400 µm; insertos: 20 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

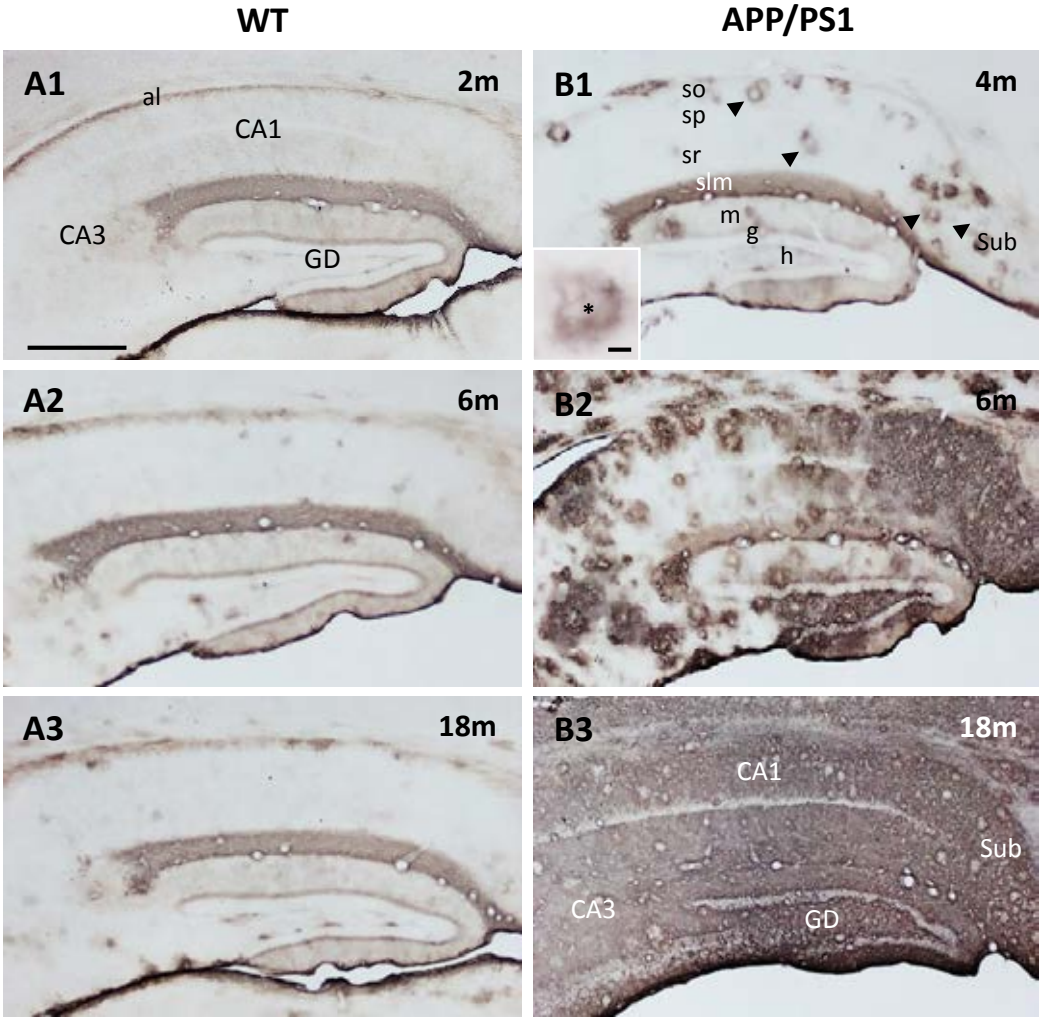


Figura 3.1.29. Estudio inmunohistoquímico del marcador lisosomal LAMP2 en el hipocampo de animales WT y APP/PS1 con la progresión de la edad. En los animales WT, LAMP2 muestra inmunorreactividad diferencial en los estratos lacunoso-molecular y molecular. En el modelo APP/PS1, la acumulación de LAMP2 está asociada a los depósitos de Aβ (inserto en **B1**; asterisco indica posición de una placa), y se extiende en paralelo a la patología amiloide ocupando a los 18 meses prácticamente todo el parénquima excepto las capas de somas neuronales. Al: alveus; *CA1-CA3: regiones del hipocampo propio; g: capa granular; GD: giro dentado; h: hilio; m: capa molecular; slm: estrato lacunoso-molecular; so: estrato oriens; sp: capa piramidal; sr: estrato radiado; Sub: subículo.* Barras de escala: A, B: 400 µm; insertos: 20 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.2. ESTUDIO DE LA RESPUESTA NEUROINFLAMATORIA ASOCIADA A LA PATOLOGÍA TAU EN LOS MODELOS THYTAU22 Y P301S

La acumulación y agregación de proteínas patogénicas, β-amiloide y fosfo-tau, en la enfermedad de Alzheimer induce una respuesta neuroinflamatoria mediada por la activación microglial y astroglial (Ransohoff, 2016; Cuello, 2017; Scheiblich et al., 2020). El descubrimiento de que diversos genes microgliales están asociados a un mayor riesgo de desarrollar Alzheimer esporádico (Efthymiou and Goate, 2017) sitúa al proceso neuroinflamatorio como un factor clave en la patogénesis de la enfermedad. La respuesta microglial y astroglial ha sido objeto de numerosos estudios en los últimos años en el contexto de la patología amiloide (Frigerio et al., 2019), sin embargo, su relación con la patología de tau es más desconocida. Recientemente, nuestro grupo de investigación ha demostrado que las formas solubles de fosfo-tau extraídas del cerebro de pacientes y del modelo ThyTau22 son tóxicas para la microglía en cultivo, pero no para la astroglía, y que la presencia de microglía degenerativa en el hipocampo de los pacientes estaría relacionada con la patología de tau (Sánchez-Mejias et al., 2015; Gutierrez and Vitorica, 2018; Navarro et al., 2018). Por este motivo, en este trabajo de Tesis doctoral se ha planteado profundizar en la relación de la microglía y la astroglía con la progresión de la patología en los modelos transgénicos para tau ThyTau22 y P301S.

3.2.1. DIFERENTE RESPUESTA MICROGLIAL EN EL HIPOCAMPO DE LOS MODELOS THYTAU22 Y P301S

El análisis de la respuesta microglial en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S se ha realizado mediante una aproximación molecular (estudios qPCR), celular (inmunomarcaje a microscopía óptica y confocal) y subcelular (microscopía electrónica).

3.2.1.1. Elevada expresión de genes microgliales DAM en el modelo P301S en comparación con el modelo ThyTau22 y el modelo amiloidogénico APP

En primer lugar, se ha analizado el perfil molecular de la microglía en el hipocampo de ambos modelos de taupatía. En los últimos años se ha identificado un fenotipo de microglía activada en modelos animales de neurodegeneración denominado microglía DAM (del inglés *disease associated microglía*) y caracterizado por una firma molecular específica (Keren-Shaul et al., 2017; Deczkowska et al., 2018). Los modelos amiloidogénicos de la enfermedad de Alzheimer exhiben este fenotipo microglial y probablemente refleje una función protectora (Wang et al., 2016). Con el fin de evaluar la contribución de la patología de tau a la inducción del perfil DAM de la microglía, y en colaboración con el grupo del Dr. Javier Vitorica (IBIS, Sevilla),

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

se ha analizado mediante qPCR la expresión de una serie de genes (*cd45*, *trem2*, *cd68*, *clec7*a e *igf-1*) en el hipocampo (**Fig. 3.2.1**) de los modelos ThyTau22 (N=4-8/edad) y P301S (N=5-9/edad) en fases iniciales de la patología (2-4 meses) y fases avanzadas (9-12 meses). Como control se analizó la expresión de estos genes en animales WT de 9 meses (N = 4/edad) y en un modelo amiloidogénico (APP) a edades comprendidas entre los 9-18 meses (N = 4-7/edad).

Se analizó la expresión del gen *cd45* (del inglés, *cluster of differantiation 45*) que codifica para una proteína membranal, de función tirosina-fosfatasa, la cual modula la activación microglial. Las células microgliales aumentan la expresión de *cd45* cuando se encuentran en estado activado. Como era de esperar (**Fig. 3.2.1 A;** $F(5, 28) = 31{,}72$; $P < 0{,}0001$), los niveles en los animales APP de 9-18 meses de edad fueron significativamente más altos que los del grupo WT ($p<0{,}05$) y ligeramente mayores que los del grupo ThyTau22 a los 9-12 meses. Sin embargo, los resultados revelaron que en el modelo P301S los niveles de expresión de este gen aumentaban considerablemente a la edad de 9-12 meses con respecto a los 2-4 meses (10,35 ± 2,69 veces; $p < 0{,}0001$). Además, resultó ser significativamente mayor que la expresión en los animales ThyTau22 de 9-12 meses (3,32 ± 0,86 veces; $p<0{,}0001$) y que los WT (10,48 ± 2,73 veces; $p<0{,}0001$). Es destacable que la expresión de *cd45* en P301S fue significativamente más alta que la del modelo amiloidogénico (2,5 ± 0,65 veces mayor; $p<0{,}0001$). Aunque de manera más leve, la expresión de *cd45* también tendía a incrementarse en los ThyTau22 durante el envejecimiento.

Lo mismo sucedió con la expresión del gen *trem2* (**Fig. 3.2.1 B**). Trem2 es un receptor de membrana expresado en células mieloides, y en el cerebro lo expresa la microglía regulando la quimiotaxis, fagocitosis, activación, supervivencia y proliferación de esta población glial. En los últimos años, variantes de este gen han sido relacionadas con el riesgo de padecer Alzheimer de tipo esporádico (Yeh et al., 2016). Se ha observado también su influencia en la patología de tau en modelos (Jiang et al., 2016; Leyns et al., 2019). En este caso, los niveles de expresión difirieron entre los distintos grupos ($F(5, 25) = 35{,}11$; $P < 0{,}0001$). Los animales P301S a los 9-12 meses, mostraron un aumento de la expresión de *trem2* con la edad (8,81 ± 2,29 veces con respecto a 2-4 meses; $p < 0{,}0001$) y niveles de expresión mucho mayores que los ThyTau22 (3,81 ± 0,99 veces; $p<0{,}0001$) y que los APP (2,26 ± 0,58 veces; $p<0{,}0001$) de edades similares.

El gen *cd68* codifica para una proteína que pertenece a la familia de proteínas asociadas a los lisosomas (Song and Schindler, 2011) y endosomas tardíos (Ramprasad et al., 1995; Jiang et al., 1998). Supone un indicador del aumento de la capacidad fagocítica en los macrófagos y también sirve como marcador de microglía activada, ya que se sabe que ante la presencia de Aβ y/o fosfo-tau, estas células aumentan su actividad fagocítica (Koenigsknecht-Talboo and Landreth, 2005). La expresión del gen para CD68 se vio muy incrementada (**Fig. 3.2.1 C;** $F(5, 36) = 34{,}16$; $P < 0{,}0001$) en los animales P301S de 9-12 meses de edad (10,01 ± 3,89 veces vs. 2-4

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

meses; p < 0,0001) y superaba los niveles presentados por los animales APP (1,68 ± 0,65 veces mayor; p<0,05) y ThyTau22 (6,1 ± 2,37 veces; p<0,0001).

Los genes *clec7a* (del inglés *C-type lectin domain family 7 member A*) e *igf-1* (del inglés *insulin-growth factor 1*) forman parte también del perfil DAM microglial (Krasemann et al., 2017; Navarro et al., 2018). Clec7a es un receptor de membrana que reconoce patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y es necesario para la respuesta inflamatoria mediada por TLR2. Al igual que sucedía con los anteriores marcadores, los niveles de expresión de ambos genes (F (5, 36) = 34,16; P < 0,0001 para *clec7a*; F (5, 37) = 14,59; P < 0,0001 para *igf1*) en los P301S de 9-12 meses se encontraban muy por encima de los APP y ThyTau22 de la misma edad.

De otro lado, la activación microglial va acompañada de un descenso en la expresión de ciertos genes homeostáticos (Keren-Shaul et al., 2017). En este caso, se decidió estudiar la expresión de varios de estos genes: *p2ry12* (del inglés *purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 12*), *tmem119* (del inglés *transmembrane protein 119*), *cx3cr1* (del inglés *CX3C chemokine receptor 1*) y el gen *iba-1* (del inglés *ionized calcium binding adapter molecule 1*). El gen *p2ry12* (**Fig. 3.2.2**), no varió significativamente su expresión en ninguna de las edades y modelos analizados (test de Kruskal-Wallis; P = 0,124), aunque el modelo ThyTau22 sí presentó una fuerte tendencia a disminuir su expresión con la edad y avance de la patología tau. En el caso del gen *tmem119* (**Fig. 3.2.2 B**), los animales P301S de 9-12 meses y los APP de 9-18 meses, mostraron (sin llegar a ser significativos estadísticamente; F (5, 38) = 1,764; P = 0,1437) una clara tendencia a incrementar los niveles de expresión de este gen. A continuación, se analizó la expresión de los genes *cx3cr1* (**Fig. 3.2.2 C;** F (5, 25) = 13,38; P < 0,0001) e *iba-1* (**Fig. 3.2.2 D**; F (5, 36) = 8,46; P < 0,0001). La expresión se vio significativamente aumentada en el hipocampo del modelo P301S de 9-12 meses con respecto a 2-4 meses (3,84 ± 1,01 veces y 2,87 ± 1,76 veces mayor para *cx3cr1* e *iba-1*, respectivamente). En ambos casos, también presentaban un incremento considerable con respecto a los animales ThyTau22 de 9-12 meses (4,49 ± 1,92 veces y 2,36 ± 1,45 veces mayor para *cx3cr1* e *iba-1*, respectivamente). Los niveles de expresión de ambos genes fueron similares a los detectados en el modelo APP a los 9-18 meses de edad. Estos resultados, sugieren que puede estar ocurriendo una alta proliferación de células microgliales tras la activación.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

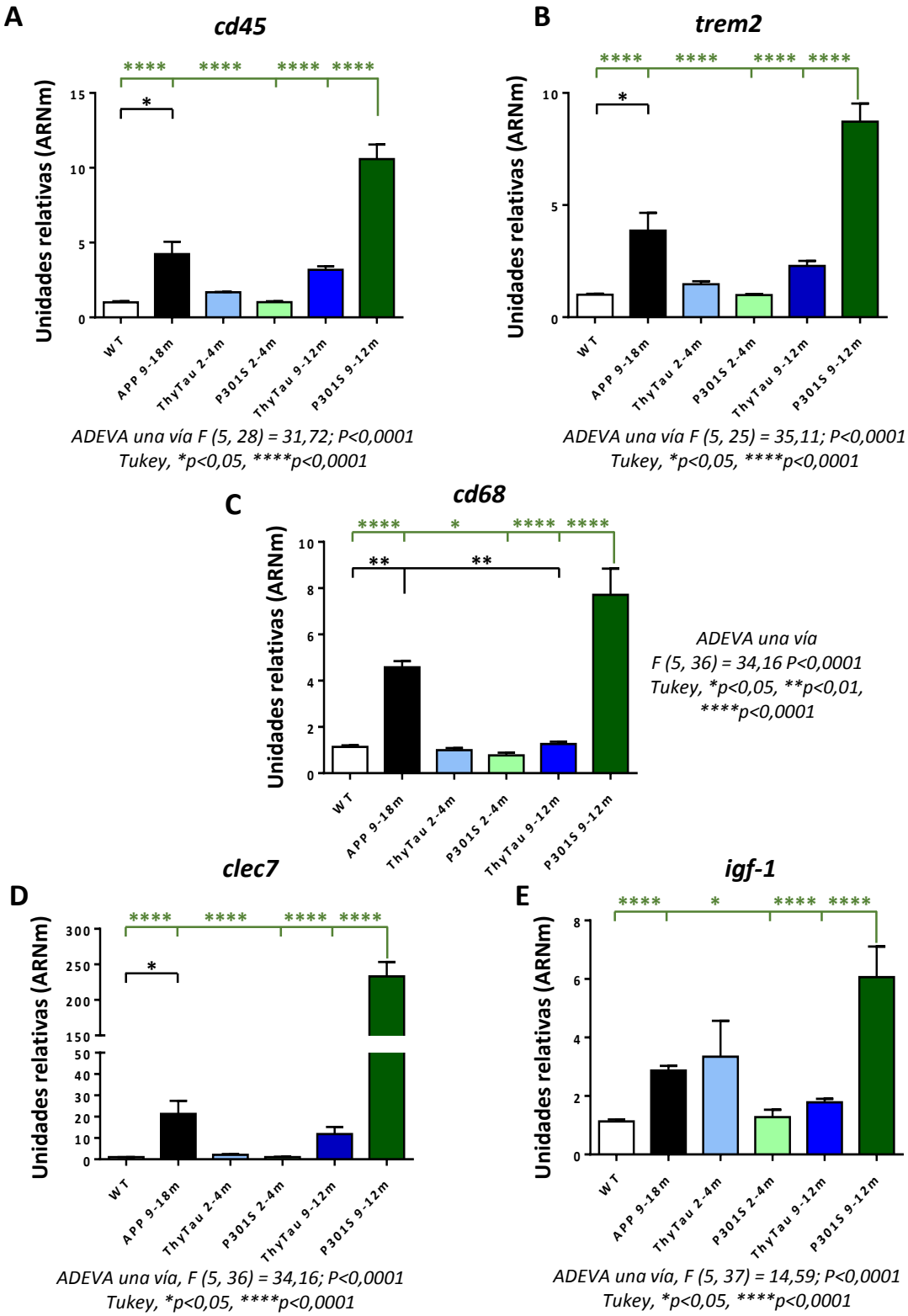


Figura 3.2.1. Estudio comparativo de la expresión de genes DAM en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S. Niveles de expresión (RT-qPCR) de genes DAM (*cd45, trem2, cd68, clec7* e *igf-1*) en los modelos ThyTau22 (N=4-8/grupo) y P301S (N=5-9/grupo) en fases tempranas (2-4 meses) y avanzadas (9-12 meses) de la patología tau. Como controles se usan animales WT de 9 meses (N=4) y APP de 9-18 meses (N=4-7). La expresión de todos estos genes del perfil DAM es significativamente mayor en los animales P301S de 9-12 meses que en los ThyTau22, y muy superior además a la del modelo amiloidogénico APP. Los niveles de expresión, normalizados usando GAPDH, se referenciaron a los WT. *Romero-Molina et al., 2018.*

UNIVERSIDAD DE MALAGA

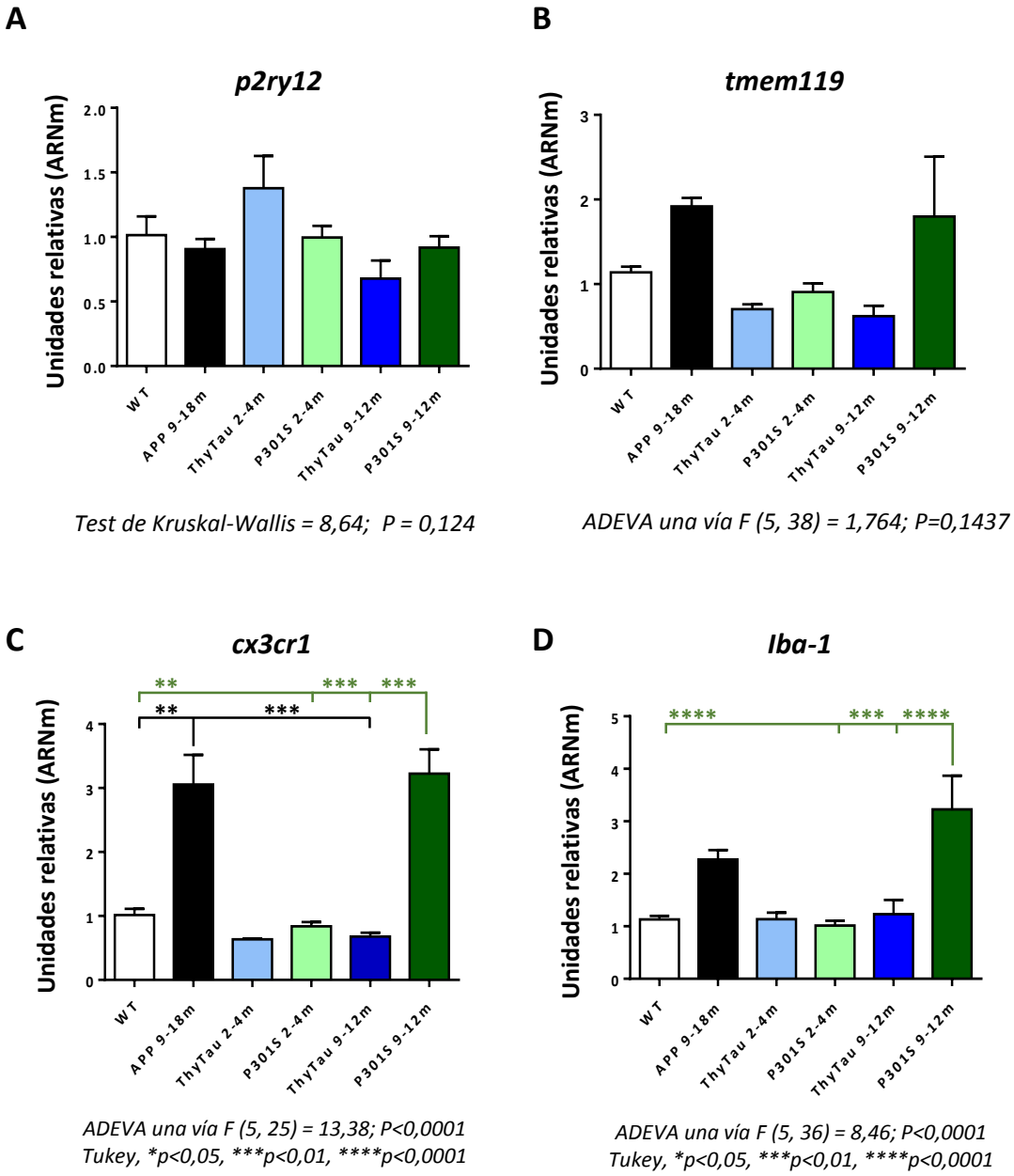


Figura 3.2.2. Estudio comparativo de la expresión de genes microgliales homeostáticos en el hipocampo de modelos transgénicos ThyTau22 y P301S. Niveles de expresión (RT-qPCR) de genes de la microglía homeostática en el modelo Thytau22 (N=4-8/grupo) y P301S (N=5-9/grupo) en una fase temprana (2-4 meses edad) y avanzada (9-12 meses edad) de la patología tau. Los niveles de *p2ry12* (**A**) y *tmem119* (**B**) no varían significativamente con la edad en ninguno de los modelos de tau, aunque *tmem119* presenta una fuerte incremento a los 9-12 meses en P301S. La expresión de los genes *cx3cr1* (**C**) e *Iba-1* (**D**) se ven significativamente aumentados en los animales P301S. Los niveles de expresión, normalizados usando GAPDH, se referenciaron a ratones WT (9 meses; N=4). Los ratones APP (9-18 meses; N= 4-7) también se incluyeron como control positivo. *Romero-Molina et al., 2018.*

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Todos estos datos indican que la respuesta microglial en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S es muy diferente, siendo bastante intensa en P301S y muy débil en ThyTau22. Además, el modelo P301S llega a presentar niveles de expresión de genes DAM muy superiores en comparación con un modelo amiloidogénico. El proceso neuroinflamatorio no ocurre de forma homogénea ni al mismo tiempo en todas las regiones del cerebro de los pacientes con EA ni tampoco en el de los modelos murinos, sino que se relaciona estrechamente con la patología proteica y su patrón de desarrollo. Por ello, se consideró la necesidad de realizar un estudio detallado de la progresión espacio-temporal de la respuesta microglial a nivel tisular en secciones de hipocampo de estos modelos.

3.2.1.2. La progresión de la patología tau va asociada a un notable proceso de activación microglial en el hipocampo del modelo P301S, pero no en el modelo ThyTau22

A continuación, se analizó la población microglial en secciones de hipocampo de los modelos ThyTau22 (2, 6, 9, 12 y 18 meses de edad) y P301S (2, 6, 9 y 12 meses de edad) mediante inmunohistoquímica con el marcador Iba-1 (**Fig. 3.2.3**). Este marcador permite visualizar a las células microgliales tanto homeostáticas como activadas. En el modelo ThyTau22 las células microgliales Iba-1 positivas presentaban en general una morfología homeostática (aspecto ramificado), y se distribuían de forma homogénea por todo el hipocampo a todas las edades analizadas. No se observaron grandes cambios en el inmunomarcaje para Iba-1 con la progresión de la patología tau (**Fig. 3.2.3 A1-A4**). De hecho, el patrón de inmunotinción no difería apenas del que presentaba un animal WT de 9 meses de edad (**Fig. 3.2.3 C**). En el modelo P301S el inmunomarcaje a edades tempranas (2 meses, prepatología) fue similar al del ThyTau22. Sin embargo, este marcaje aumentó ligeramente a partir de los 9 meses (**Fig. 3.2.3 B2**), y de forma abrupta a edades avanzadas (12 meses, **Fig. 3.2.3 B3**), siendo considerablemente mayor que en los ThyTau22.

El análisis con mayor detalle de la región CA1 (**Fig. 3.2.4**) permitió identificar que, a los 2 meses de edad, ambos modelos mostraban microglía Iba-1 positiva con fenotipo homeostático, caracterizado por un cuerpo celular pequeño y numerosas prolongaciones largas y ramificadas. En los animales ThyTau22, se apreció un ligero aumento del inmunomarcaje a los 9 meses de edad (**Fig. 3.2.4 A2**), manteniéndose a los 12 meses (**Fig. 3.2.4 A3**), que iba acompañado de cambios morfológicos en algunas células microgliales. Estas células que presentaban un fenotipo ligeramente activado se situaban frecuentemente adosadas al estrato piramidal, donde se sitúan los somas de las neuronas principales de CA1 (y que suelen presentar patología tau; ver apartado 3.1). También, el marcaje fue ligeramente más intenso que en animales WT de edad similar (9 meses, **Fig. 3.2.4 C**). A edades avanzadas (18 meses, **Fig. 3.2.4**

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

A4), el marcaje en los ThyTau22 disminuyó con respecto a edades anteriores, llegando a niveles parecidos a los de 2 meses de edad. El modelo P301S mostró un patrón de inmunomarcaje muy diferente. A los 9 meses de edad (**Fig. 3.2.4 B2**), se apreciaban numerosas células con fenotipo morfológico aparentemente activado (cuerpo más hipertrófico y prolongaciones gruesas y menos ramificadas). A los 12 meses, cuando la patología tau está avanzada, este modelo mostró una gran cantidad de microglía con fenotipo activado en todo CA1 (**Fig. 3.2.4 B3**).

De la misma forma, se realizó un estudio en mayor detalle de las células Iba-1 positivas en la región del giro dentado (**Fig. 3.2.5**). En el modelo ThyTau22 no se obtuvieron cambios significativos a ninguna de las edades analizadas, la microglía mostró un fenotipo morfológico homeostático desde los 2 meses de edad (**Fig. 3.2.5 A1**) hasta los 18 meses (**Fig. 3.2.5 A4**), que no difería del presentado por los animales WT de 9 meses de edad (**Fig. 3.2.5 C**). De nuevo, en el modelo P301S se observó que a partir de los 9 meses (**Fig. 3.2.5 B2**) la microglía se marcó más intensamente y presentaba un fenotipo activado por todo el giro dentado en comparación con edades anteriores (**Fig. 3.2.5 B1**). Este incremento de la microglía activada se hizo más evidente a la edad de 12 meses (**Fig. 3.2.5 B3**).

El patrón de cambios morfológicos de la microglía se muestra en la **Figura 3.2.6**. A los 2 meses de edad, la microglía presentaba el fenotipo típicamente homeostático en ambos modelos de la patología tau (**Fig. 3.2.6 A1, A4, B1 y B4**). En los ThyTau22, a 9 y 12 meses de edad se observaron ligeros cambios en las células microgliales de la región CA1 (especialmente en la transición CA1-Sub y cerca de la capa piramidal), que incluían retracción de algunas prolongaciones y ligero engrosamiento del cuerpo celular (**Fig. 3.2.6 A2**). Sin embargo, estos cambios morfológicos no eran patentes en la microglía del giro dentado (**Fig. 3.2.6 A4-A6**). Como se describió anteriormente, la microglía del modelo P301S sí que mostró un fenotipo de activación muy acusado. Desde los 9 meses de edad, los cambios morfológicos en la microglía de ambas regiones fueron evidentes. Es más, en el giro dentado, a esta edad (**Fig. 3.2.6 B5**) la microglía presentó un aspecto más ameboide (activado) que en la región CA1 (**Fig. 3.2.6 B2**). A la edad de 12 meses, toda la microglía del hipocampo del modelo P301S presentó una morfología activada muy marcada (**Fig. 3.2.6 B3 y B6**).

Para cuantificar la evolución temporal de la reactividad microglial con la progresión de la patología tau en ambos modelos transgénicos se realizó un estudio del área Iba-1 positiva (carga microglial) en dos regiones hipocampales (CA1 y giro dentado) mediante análisis de imagen. La cuantificación en los animales ThyTau22 demostró que existía un aumento significativo del área Iba-1 positiva en la región CA1 (**Fig. 3.2.7 A**; $F(9,30) = 15,85$; $P < 0,0001$) desde la edad de 6 meses (2,17 ± 0,55 veces con respecto a 2 meses; $p < 0,01$) y se mantuvo a 9 meses (2,12 ± 0,33 veces; $p < 0,01$) alcanzando un máximo a los 12 meses (2,69 ± 0,54 veces mayor que 2 meses; $p < 0,001$). También el área inmunomarcada fue significativamente mayor

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

en CA1 comparado con el giro dentado a los 6 meses (2,61 ± 0,67 veces; p<0,001), 9 meses (2,31 ± 0,36 veces; p < 0,001) y 12 meses (2,23 ± 0,45 veces; p<0,001). Es de destacar que a edades muy avanzadas (18 meses) el área Iba-1 positiva en CA1 descendió considerablemente con respecto a los 12 meses (48,95 ± 18,28% menor, p<0,0001). Por último, en la región del giro dentado en este modelo, y como se observó en el estudio cualitativo, la carga microglial no presentó variación con la edad. La cuantificación del área Iba-1 positiva en el hipocampo de los animales P301S (**Fig. 3.2.7 B**; Test de Kruskal-Wallis = 30,24; P < 0,0001) demostró que el área Iba1-positiva comenzó a ser mucho mayor a la edad de 9 meses y se hizo significativo a los 12 tanto en CA1 (5,01 ± 1,82 veces, p<0,05) como en giro dentado (3,78 ± 0,8 veces, p < 0,05) con respecto a los 2 meses. Por último, se analizaron comparativamente los modelos ThyTau22 y P301S a 2, 9 y 12 meses en ambas regiones (**Fig. 3.2.8**). Se utilizaron animales WT como referencia. Los datos determinaron que tanto para CA1 (**Fig. 3.2.8 A**; F (8, 28) = 12,15; P < 0,0001) como para el giro dentado (**Fig. 3.2.8 B**; F (8, 27) = 27,22; P < 0,0001) el modelo P301S presentaba una mayor área inmunomarcada desde los 9 meses de edad en comparación con los animales ThyTau22 y WT. Esta diferencia fue significativa a los 12 meses en CA1 (6,24 ± 2,27 veces con respecto a WT; y 2,2 ± 0,8 veces mayor con respecto a ThyTau22; p<0,0001). En el giro dentado estas diferencias fueron significativas desde los 9 meses (2,27 ± 0,58 veces con respecto a WT; y 2,36 ± 0,61 veces mayor con respecto a ThyTau22; p<0,01) y máximas a los 12 meses (4,43 ± 0,81 veces con respecto a WT; y 3,42 ± 0,68 veces mayor con respecto a ThyTau22; p<0,0001). El aumento de carga microglial descrito en los ThyTau22 solo difería de manera significativa del mostrado por el grupo WT a los 12 meses de edad (2,83 ± 0,57 veces; p<0,01).

Podemos concluir que el aumento de la carga microglial en el hipocampo ocurre en paralelo con la progresión de la patología de tau en ambos modelos transgénicos, siendo significativamente mayor en el modelo P301S que en el modelo ThyTau22. Los datos de análisis de correlación de la carga microglial (Iba1-positiva) y la carga fosfo-tau (AT8-positiva) en las regiones CA1 y giro dentado apoyan estos resultados (**Fig. 3.2.9**). Existe una correlación positiva significativa entre ambos parámetros en el modelo P301S mientras que esto ocurre en el modelo ThyTau22 únicamente en CA1 entre los 2 y 12 meses de edad; si se consideran las edades comprendidas entre los 2 y los 18 meses o la región del giro dentado, esta correlación no existe.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

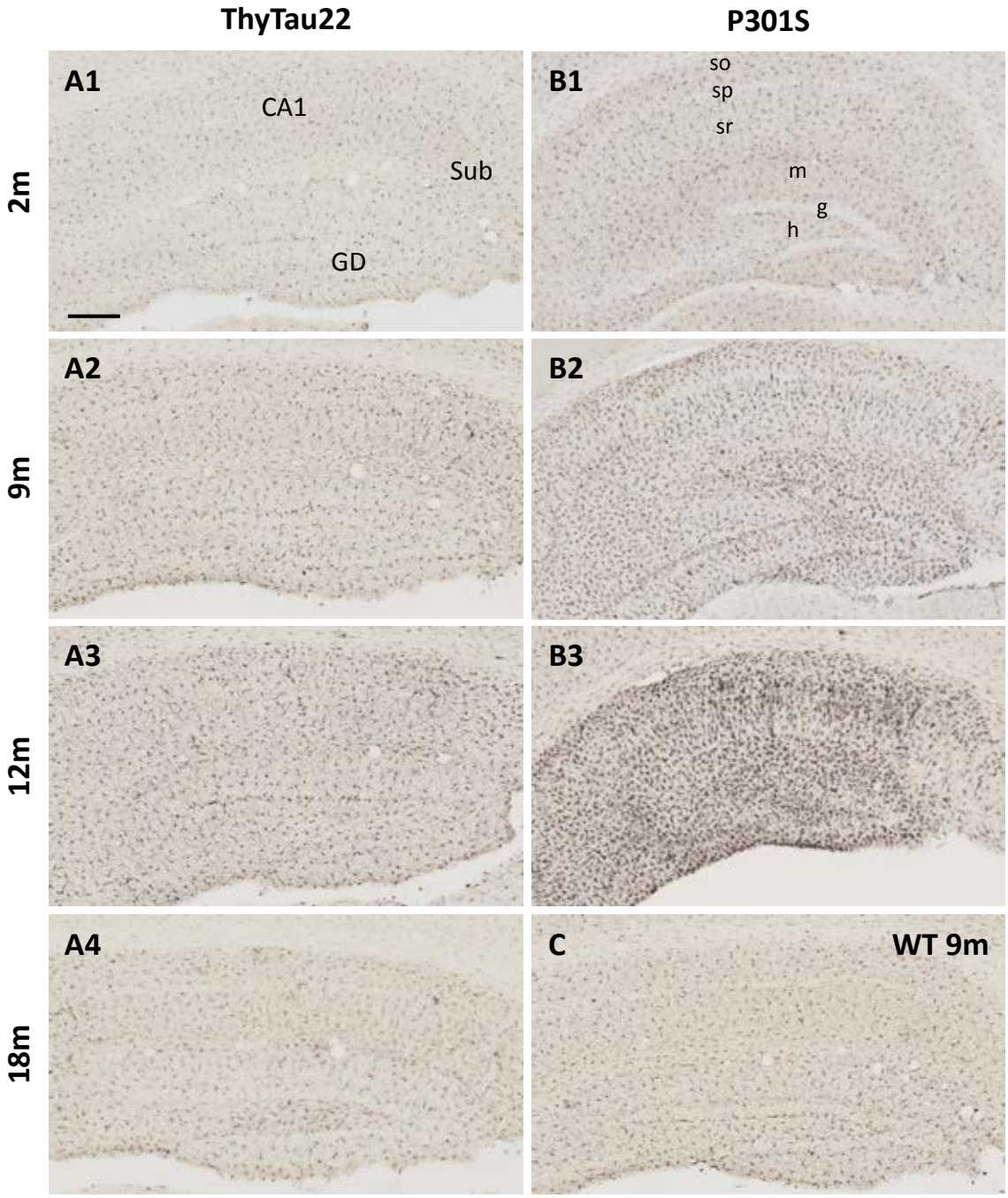


Figura 3.2.3. El hipocampo del modelo P301S muestra una mayor reactividad microglial con el avance de la patología tau que el del modelo ThyTau22. Imágenes panorámicas de la imunotinción para el marcador microglial Iba-1 a microscopía de campo claro en el hipocampo de animales ThyTau22 (**A1-A4**) y P301S (**B1-B3**) desde los 2 a los 12-18 meses de edad. Como control se muestra WT de 9 meses (**C**). En el modelo ThyTau22 se observa escasa reactividad microglial con el avance de la edad, sin embargo, el modelo P301S muestra un marcado aumento en la activación microglial en todo el hipocampo con la edad y progresión de la patología tau. *CA1: región del asta de Ammon; GD: giro dentado; g: granular; h: hilio; m: molecular. so: estrato oriens; sp: estrato piramidal; sr: estrato radiado; Sub: subículo.* Barra de escala: 200 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

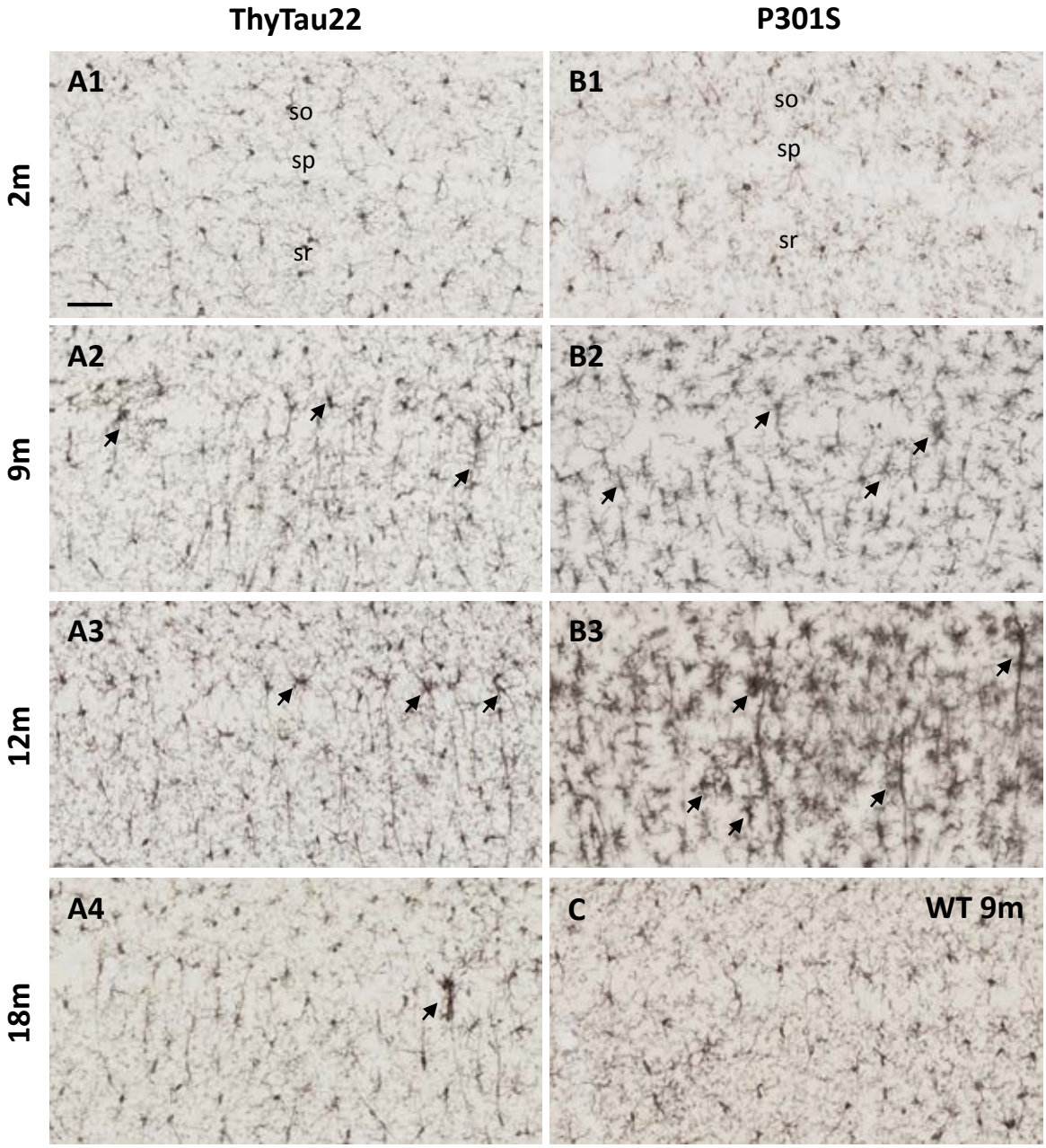


Figura 3.2.4. Estudio comparativo de la respuesta microglial en la región hipocampal CA1 de los modelos ThyTau22 y P301S. Inmunohistoquímica para Iba-1 a microscopía de campo claro. En el modelo ThyTau22 **(A1-A4)** se detecta escasa microglía activada (fechas) con el avance de la edad y la patología tau. Por el contrario, en el modelo P301S **(B1-B3)** existe una fuerte activación microglial a los 9 meses, y mucho mayor aún a los 12 meses de edad. Como control se muestra un animal WT de 9 meses de edad (**C**). *so: estrato oriens; sp: estrato piramidal; sr: estrato radiado*. Barra de escala: 50 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

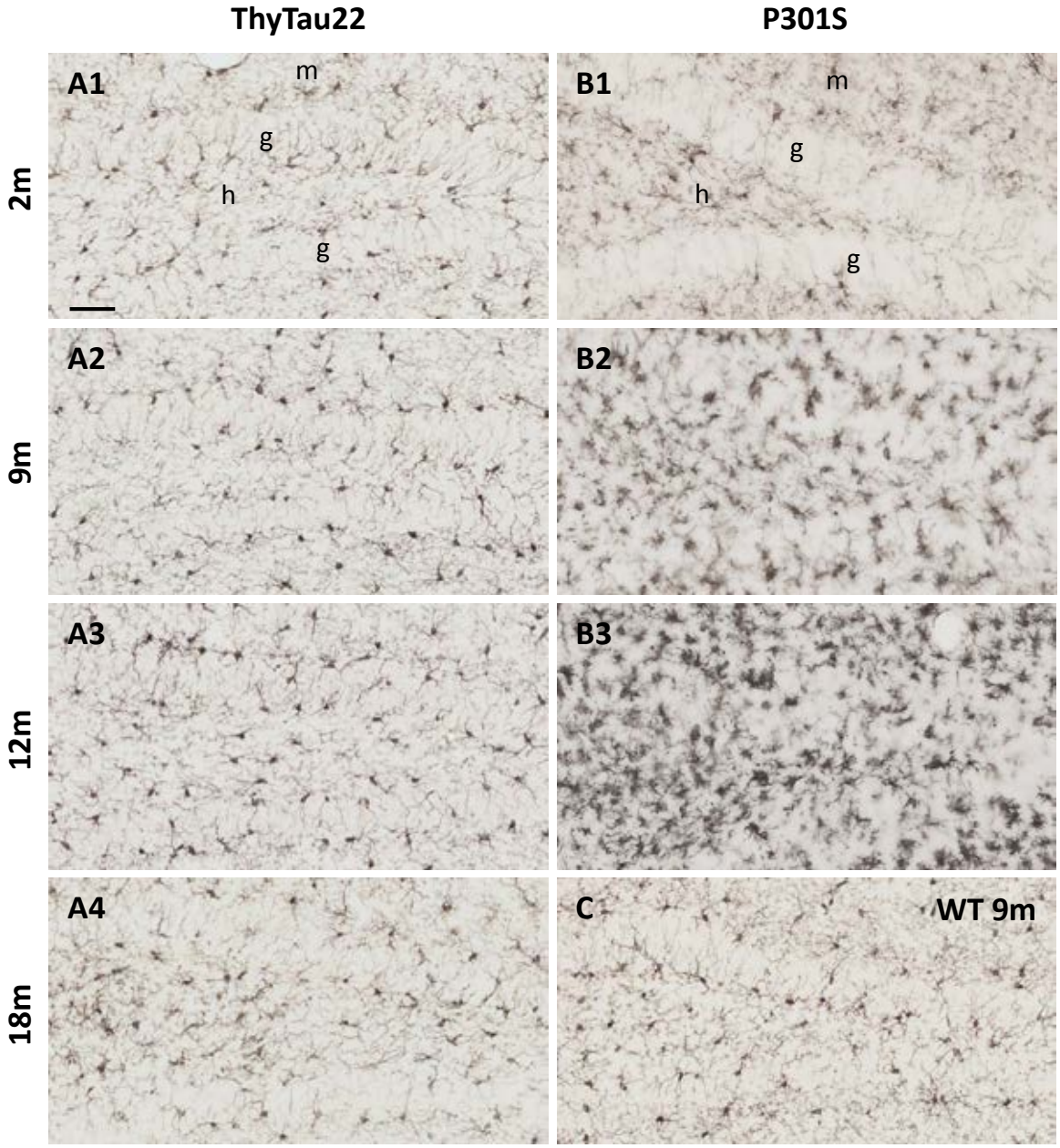


Figura 3.2.5. Estudio comparativo de la respuesta microglial en el giro dentado de los modelos ThyTau22 y P301S. Inmunohistoquímica para Iba-1 a microscopía de campo claro. En el modelo ThyTau22 **(A1-A4)** apenas se detecta microglía activada con el avance de la edad y patología tau. Por el contrario, en el modelo P301S **(B1-B3)** existe una fuerte activación microglial en esta región hipocampal a los 9 meses, y mucho mayor aún a los 12 meses de edad. Como control se muestra un animal WT de 9 meses de edad (**C**). *g: granular; h: hilio; m: molecular.* Barra de escala: 50 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

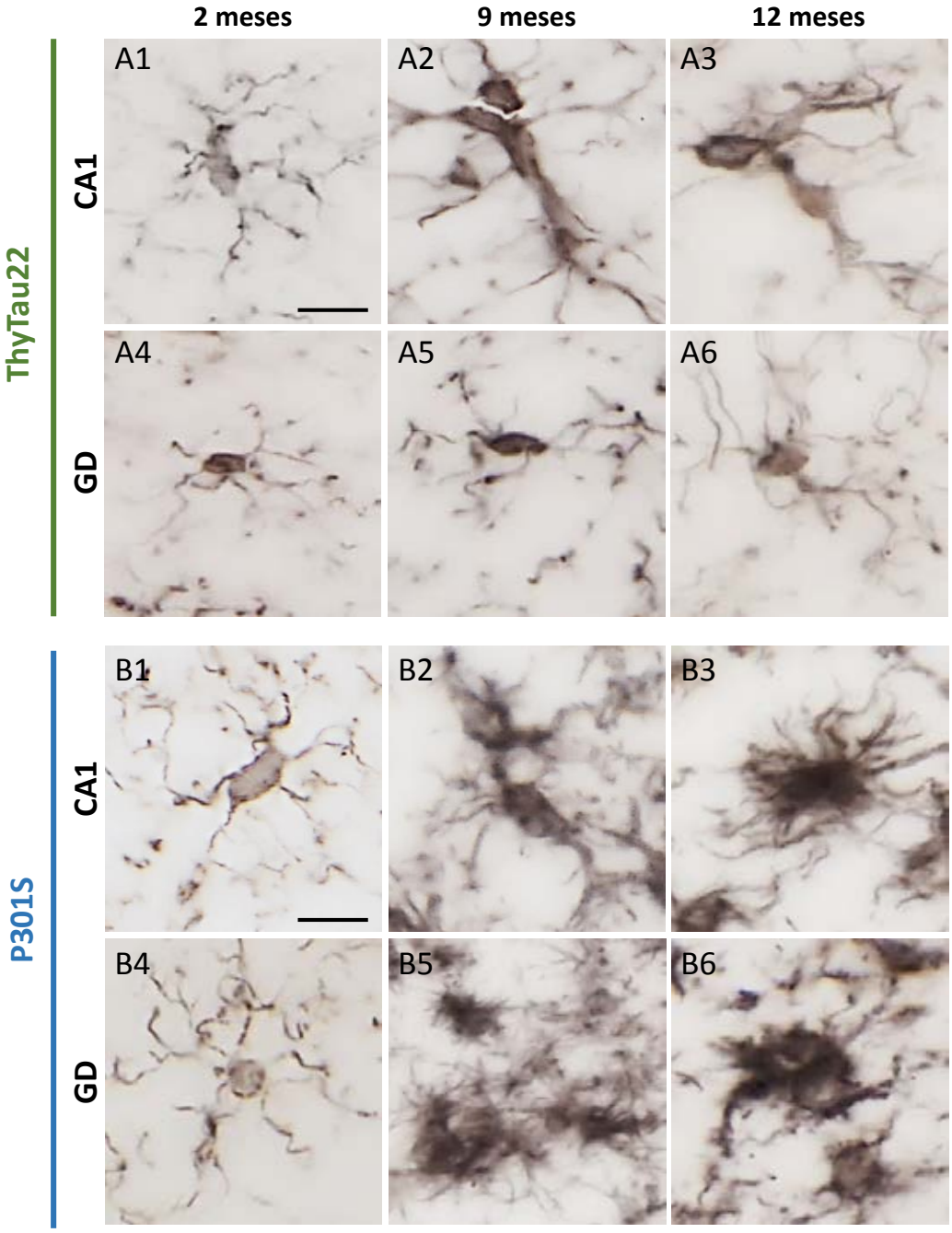
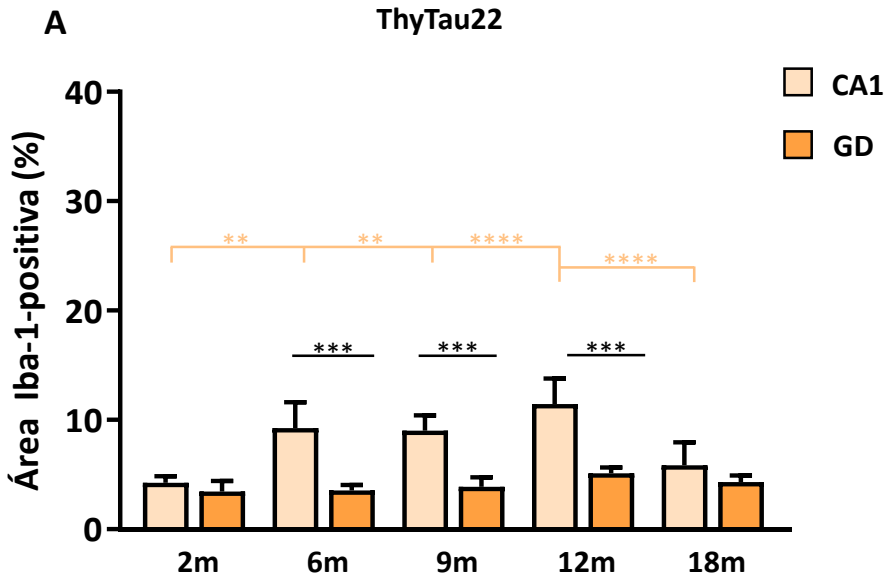
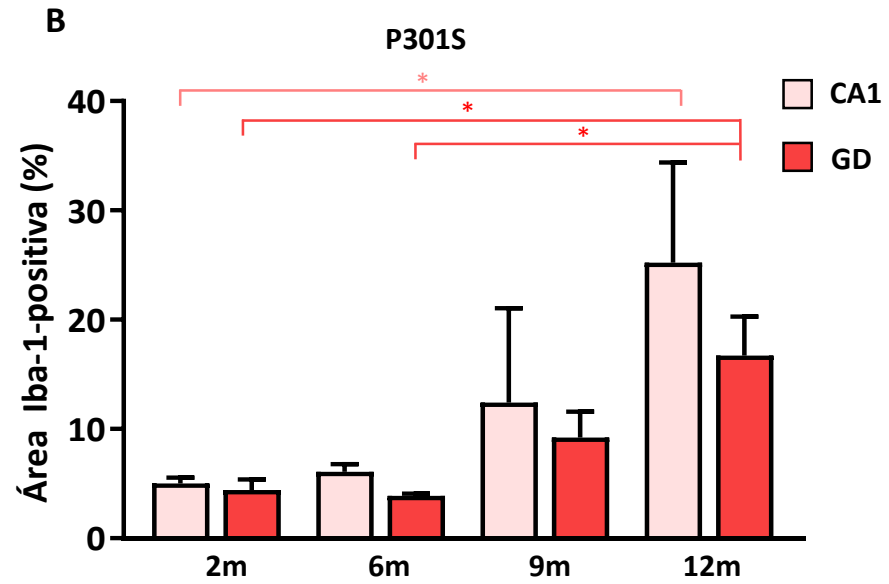


Figura 3.2.6. Cambios en la morfología microglial asociados al proceso de activación durante el avance de la patología tau en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S. Células microgliales inmunoteñidas para Iba-1 en las regiones de CA1 y giro dentado del modelo ThyTau22 **(A1-A6)** y P301S **(B1-B6)** a 2, 9 y 12 meses de edad. A los 2 meses de edad, en ambos modelos y regiones, la microglía muestra un fenotipo morfológico homeostático, con un cuerpo celular pequeño y numerosas prolongaciones largas y ramificadas. A los 9 y 12 meses de edad, en el modelo ThyTau22 la microglía experimenta ligeros cambios morfológicos asociados a signos de activación. Sin embargo, en el modelo P301S la microglía se activa profusamente a partir de los 9 meses de edad mostrando un cuerpo celular hipertrófico con retracción y engrosamiento de las prolongaciones. Barras de escala: 20 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



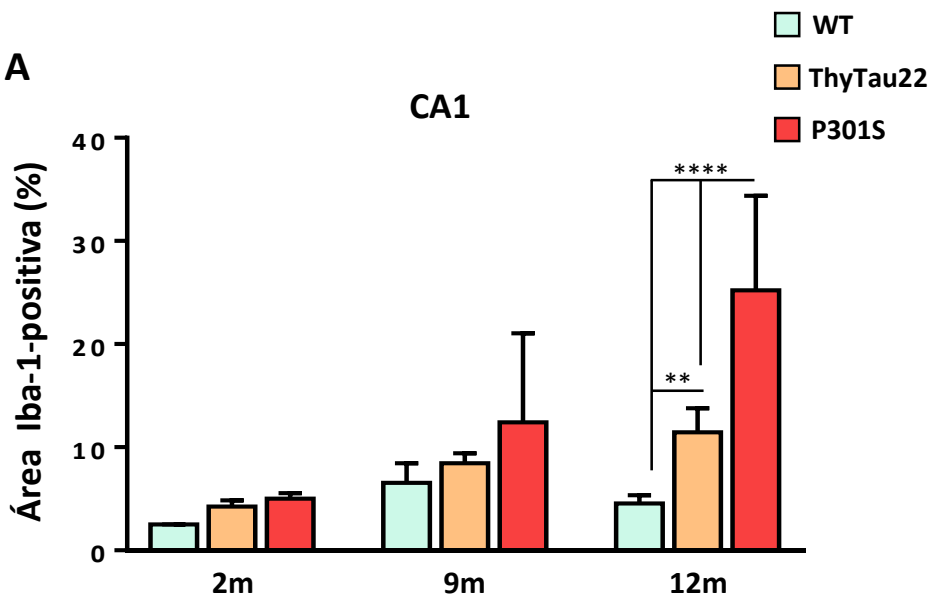
N= 4/edad. ADEVA de una vía, F (9,30) = 15,85; P < 0,0001
*Tukey, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001*



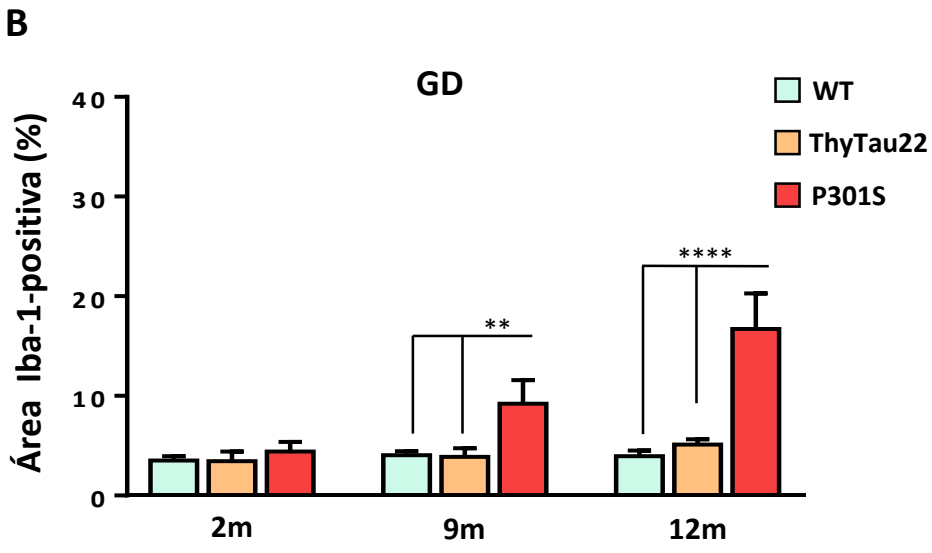
N= 3-5/edad. Test de Kruskal-Wallis = 30,24; P < 0,0001
*Tukey, *p<0,05*

Figura 3.2.7. Progresión con la edad de la carga microglial (área Iba-1-positiva) en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S. (A) Estudio cuantitativo del área positiva para Iba-1 en el hipocampo de animales ThyTau22 desde los 2 a los 18 meses de edad. La región CA1 presenta un aumento significativo de la carga microglial desde los 6 meses de edad, siendo máxima a los 12 meses. Existe una disminución significativa a los 18 meses. El área Iba-1 positiva en el giro dentado es significativamente inferior que en CA1. (**B)** Estudio cuantitativo del área Iba1-positiva en el hipocampo del modelo P301S desde los 2 a los 12 meses de edad. Ambas regiones estudiadas, CA1 y giro dentado, presentan un aumento progresivo del área Iba-1-positiva, estando significativamente elevado a los 12 meses de edad.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



N= 3-5/edad/genotipo. ADEVA de una vía, F (8, 28) = 12,15; P < 0,0001
*Tukey, **p<0,01, ****p<0,0001*



N= 3-5/edad/genotipo. ADEVA de una vía F (8, 27) = 27,22; P < 0,0001
*Tukey, ***p<0,001, ****p<0,0001*

Figura 3.2.8. Comparación de la carga microglial (área Iba-1-positiva) en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S desde los 2 a los 12 meses de edad. **(A)** La carga microglial en la región CA1 del modelo P301S a los 12 meses de edad es significativamente superior a la de los animales ThyTau22 y WT. (**B)** En el giro dentado el área Iba-1-positiva en P301S comienza a ser significativamente mayor que en ThyTau22 y WT desde los 9 meses. La diferencia, de nuevo, es máxima a edades avanzadas (12 meses).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

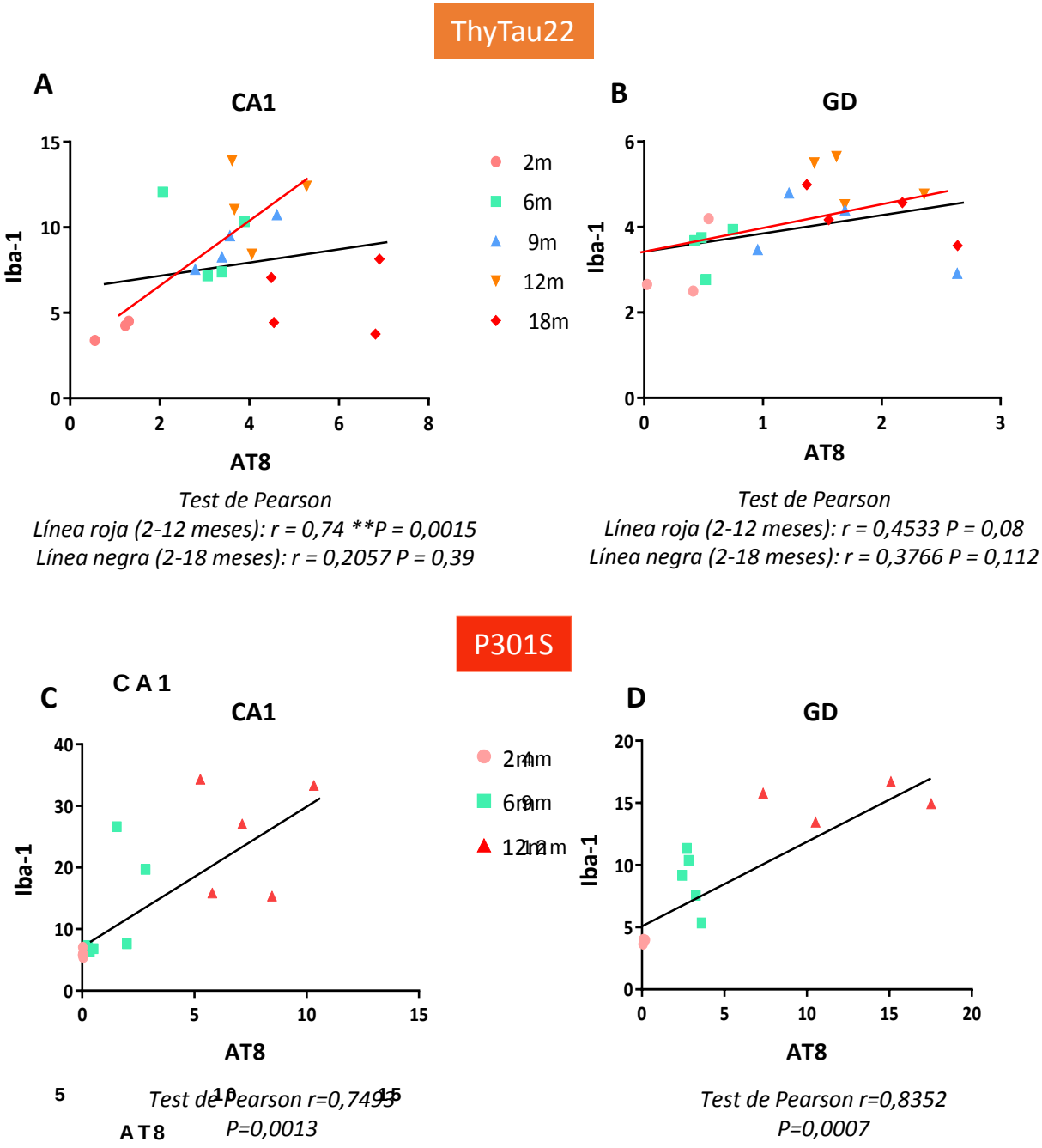


Figura 3.2.9. Estudio de la correlación entre la progresión temporal de la patología tau (AT8) y la carga microglial (Iba1) en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S. Existe una correlación positiva entre la carga de fosfo-tau y la carga microglial tanto en la región CA1 (**C**) como en el giro dentado (**D**) del modelo P301S. En el caso del modelo ThyTau22, tal correlación existe en CA1 hasta los 12 meses (línea roja), pero no hasta los 18 meses (línea negra, **A**), ni tampoco en el giro dentado (líneas roja y negra en **B**).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Como se comentó anteriormente, la proteína Iba-1 se expresa tanto en microglía activada como en la homeostática. Por tanto, para estudiar a la población microglial activada mediante inmunohistoquímica se utilizaron marcadores propios de este fenotipo microglial, como CD45. La inmunotinción (**Fig. 3.2.10**) reveló de nuevo grandes diferencias en el hipocampo de los modelos ThyTau22 (a 2, 9, 12 y 18 meses; 6 meses no mostrado) y P301S (a 2, 9 y 12 meses; 6 meses no mostrado). Como control se muestra el marcaje para un WT de 9 meses. En primer lugar, en el hipocampo del modelo ThyTau22 apenas se detectaron células CD45-positivas a ninguna de las edades analizadas, como demuestran las imágenes de la **Fig. 3.2.10 A**. De hecho, el marcaje no se diferenciaba del mostrado por los animales WT (9 meses, **Fig. 3.2.10 C**), exceptuando escasas células microgliales a los 9 y 12 meses (**Fig. 3.2.10 B2 y B3**, respectivamente). Especialmente llamativo fue que aparecieran a los 18 meses células de morfología redondeada positivas para CD45 por todo el hipocampo. Estas células se corresponden con monocitos/linfocitos que se infiltran desde los vasos sanguíneos al parénquima, algo previamente descrito en este modelo (Laurent et al., 2017). Por el contrario, en el modelo P301S (**Fig. 3.2.10 B**) a partir de los 9 meses (**Fig. 3.2.10 B2**) se detectó una fuerte inmunorreactividad para CD45 por todo el parénquima hipocampal. Las regiones de giro dentado y CA3 aparecieron más marcadas que CA1. La intensidad de inmunotinción a los 12 meses fue muy superior (**Fig. 3.2.10 B3**), extendiéndose hacia CA1 y subículo. Esto demuestra que en el hipocampo de los animales P301S existe una fuerte activación microglial que aumenta con la edad, a diferencia de los ThyTau22.

A continuación, se estudió con mayor detalle el inmunomarcaje para CD45 en la región CA1 de ambos modelos transgénicos (**Fig. 3.2.11**). A edades tempranas (2 meses) se observó una tinción relativamente homogénea por toda la región, donde las células microgliales de ambos modelos presentaban un inmunomarcaje muy tenue, apenas perceptible (ver detalles en **Fig. 3.2.11 D1 y E1**). En el caso de los ThyTau22, el marcaje no varió a con la edad, a excepción de algunas células más marcadas a los 12 y 18 meses (flechas en **Fig. 3.2.11 A3 y A4**). Como ya se indicó anteriormente, la infiltración de células linfocitarias (**Fig. 3.2.11 D2**) aumentaba también con la edad. Por otro lado, el marcaje en los animales P301S se incrementó significativamente con la edad (**Fig. 3.2.11 B2**) y de forma muy superior a los ThyTau22. A los 12 meses gran cantidad de células microgliales (**Fig. 3.2.11 B3**) mostraron un marcaje intenso para CD45 y morfología activada (ver **Fig. 3.2.11 E2**). La infiltración linfocitaria en este modelo fue mucho mayor que la observada en el modelo ThyTau22 (**Fig. 3.2.11 B2 y B3**; detalle en **E3**). La región del giro dentado en los ThyTau22 no presentó células microgliales CD45-positivas a ninguna edad (**Fig. 3.2.12 A**; detalle en **D1**). De nuevo, a partir de los 12 meses, fue habitual encontrar linfocitos infiltrados en el parénquima con marcaje intenso para CD45 (**Fig. 3.2.12 A3 y A4,** ver detalles en **D2**). Desde los 2 meses los animales P301S (**Fig. 3.2.12 B**) presentaron un marcaje ligeramente mayor que los ThyTau22 especialmente en la zona del hilio. A los 9 meses

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

fue significativamente intensa la inmunotinción para CD45 con bastante infiltración linfocitaria (**Fig. 3.2.12 B2**; detalle en **E2**), y más aún a los 12 meses (**Fig. 3.2.12 B3**). Estas células microgliales presentaban una morfología activada muy marcada (**Fig. 3.2.12 E1**).

La cuantificación por análisis de imagen del área CD45-positiva (carga de microglía activada) en el hipocampo del modelo P301S (**Fig. 3.2.13**) confirmó un aumento significativo con la edad ($F(7,31) = 30,1$; $P < 0,0001$) tanto en CA1 como en giro dentado. En CA1 comenzó a aumentar a partir de los 9 meses, pero no fue hasta los 12 meses que el incremento fue estadísticamente significativo (74,37 ± 17,35 veces mayor respecto a 2 meses; $p<0,0001$; 3,03 ± 0,7 veces mayor respecto a 9 meses; $p < 0,001$). La carga microglial activada en el giro dentado aumentó significativamente desde los 9 meses con respecto a los niveles iniciales (67,46 ± 26,85 veces mayor respecto a 2 meses; $p<0,01$). Además, resultó ser significativamente mayor que la de CA1 (2,14 ± 0,99 veces mayor; $p<0,001$). A los 12 meses, la carga microglial CD45-positiva era 135,68 ± 43,98 veces mayor que la inicial a los 2 meses ($p<0,0001$) y 2,02 ± 1,63 veces mayor que a 9 meses ($p<0,001$). A los 12 meses, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambas regiones analizadas. El estudio de correlación (test de Pearson) entre la carga microglial CD45-positiva y la carga de fosfo-tau (área AT8-positiva) con el avance de la edad en el modelo P301S presentó una correlación positiva significativa tanto en CA1 como en giro dentado (**Fig. 3.2.14**).

El receptor TREM2 es un regulador clave de la activación microglial hacia un fenotipo DAM. Se confirmó mediante inmunohistoquímica que la expresión de TREM2 aumenta con el avance de la patología tau en el hipocampo del modelo P301S (**Fig. 3.2.15**). A los 12 meses de edad se detectaron numerosas células microgliales inmunomarcadas por todo el hipocampo de este modelo (**Fig. 3.2.15 B**), en consonancia con los resultados obtenidos con el marcador de activación microglial CD45. Apenas se detectó inmunotinción para TREM2 en el hipocampo de los animales ThyTau22 (no mostrado) y WT de la misma edad (**Fig. 3.2.16**). La inmunohistoquímica doble para microscopía confocal, confirmó que, efectivamente, la microglía positiva para TREM2, es a su vez microglía activada (CD45-positiva) (**Fig. 3.2.15 C**).

En resumen, el aumento de la patología de tau en el hipocampo va acompañado de un aumento significativo de la activación microglial en el modelo P301S, pero no en el modelo ThyTau22. La activación microglial que ocurre en P301S sigue un patrón de progresión espacio-temporal similar al de la patología de tau, comenzando por el giro dentado, siguiendo por CA3 y, por último, CA1. En ambos modelos transgénicos tiene lugar una importante infiltración linfocitaria en el parénquima hipocampal con la edad.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

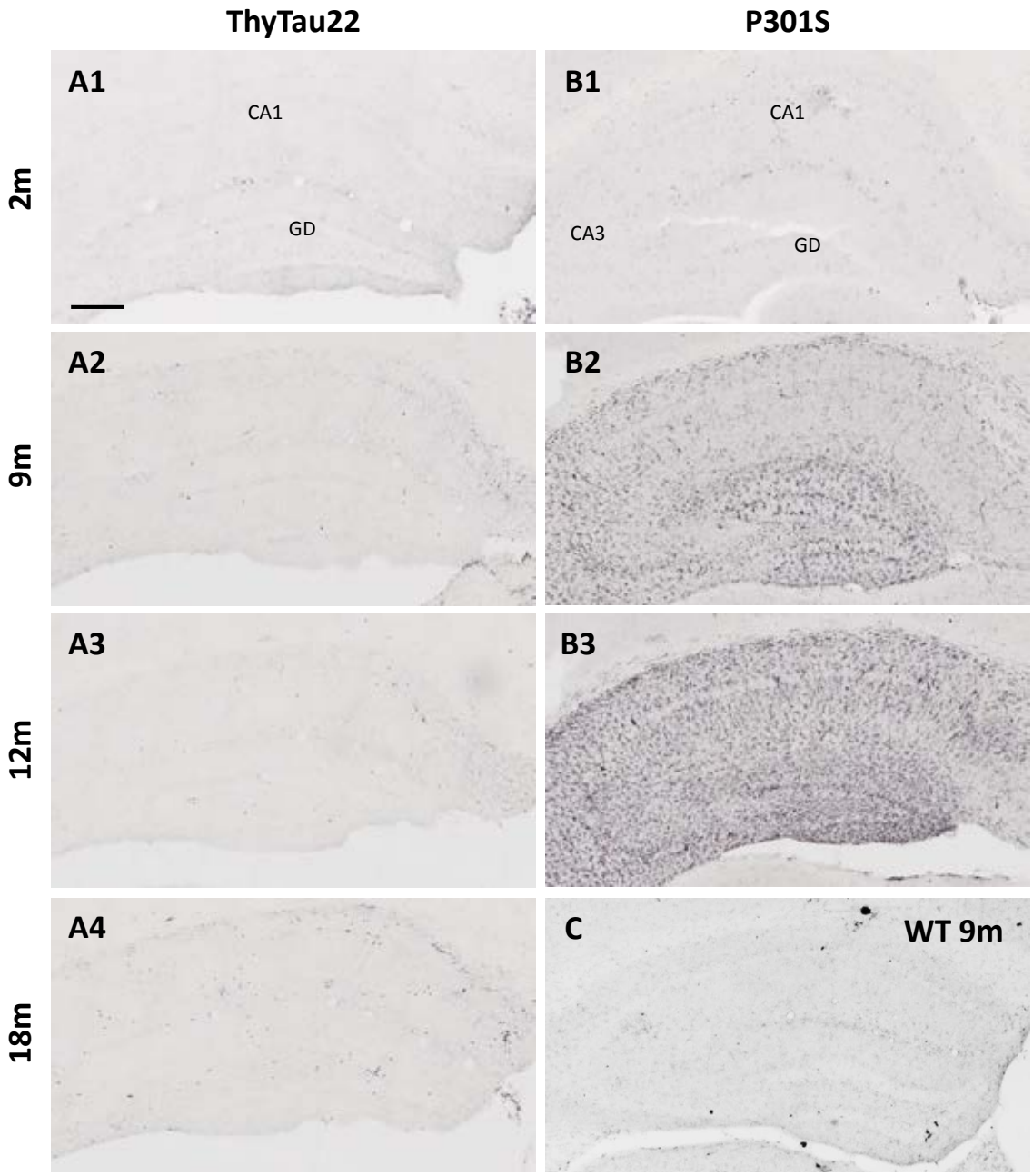


Figura 3.2.10. Patrón de activación microglial diferencial en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S. Imágenes panorámicas a microscopía de campo claro mostrando la tinción inmunohistoquímica para el marcador de microglía activada CD45 en el hipocampo de animales ThyTau22 (**A1-A4**) y P301S (**B1-B3**) desde los 2 a los 12/18 meses de edad. Como control se muestra WT de 9 meses de edad (**C**). El modelo ThyTau22 apenas presenta marcaje para CD45 a todas las edades analizadas. Sin embargo, se observa una marcada reactividad microglial (CD45-positiva) en el hipocampo del modelo P301S tanto a los 9 (**B2**) como a los 12 (**B3**) meses de edad. *CA1: región del asta de Ammón; GD: giro dentado; Sub: subículo*. Barra de escala: 200 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

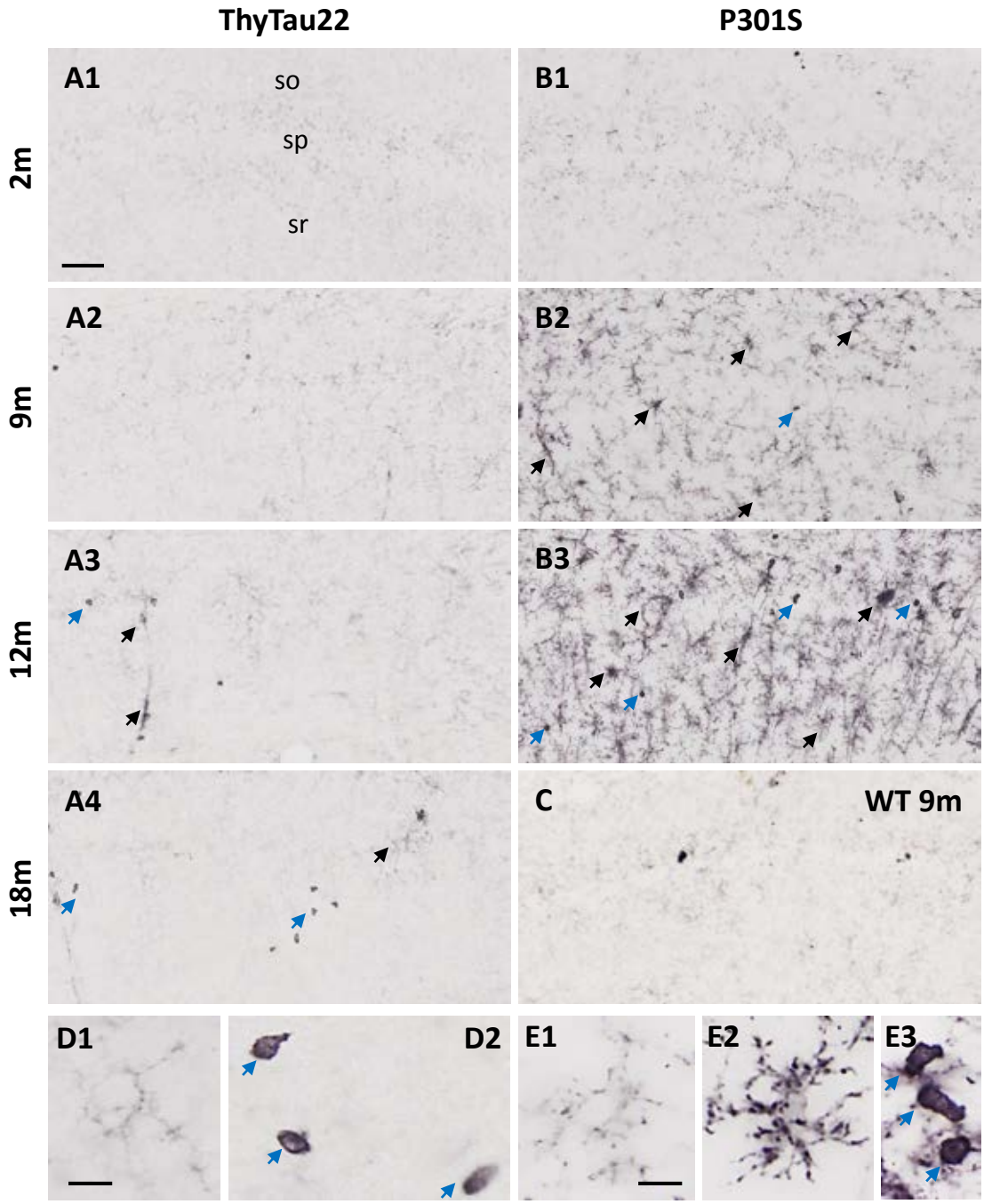


Figura 3.2.11. El avance de la patología tau en la región CA1 va acompañado de una marcada activación microglial en el modelo P301S pero no en el modelo ThyTau22. Inmunohistoquímica para CD45 en la región hipocampal CA1 de los modelos ThyTau22 y P301S desde los 2 a los 12/18 meses de edad. La inmunorreactividad para CD45 en los animales ThyTau22 es muy escasa a todas las edades (**A1-A4**). La activación microglial en el caso de los P301S es muy destacada, especialmente a los 9-12 meses (**B2, B3**). (**C**) Comparativa con animales WT 9 meses. (**D**) Detalle de la escasa expresión de CD45 en la microglía de ThyTau22 a 12 meses (**D1**) e infiltración de linfocitos CD45-positivos en el parénquima (**D2**). La infiltración de células monocito-linfocito (flechas azules) en CA1 con la edad es mucho mayor en el modelo P301S (**B3**) que en el ThyTau22 (**A4**). (**E**) Detalles representativos del marcaje en microglía a 2 meses (**E1**) y a 12 (**E2**) meses en el P301S y linfocitos infiltrados (**E3**). *so: estrato oriens; sp: estrato piramidal; sr: estrato radiado.* Barra de escala: 50 µm; D, E: 20 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

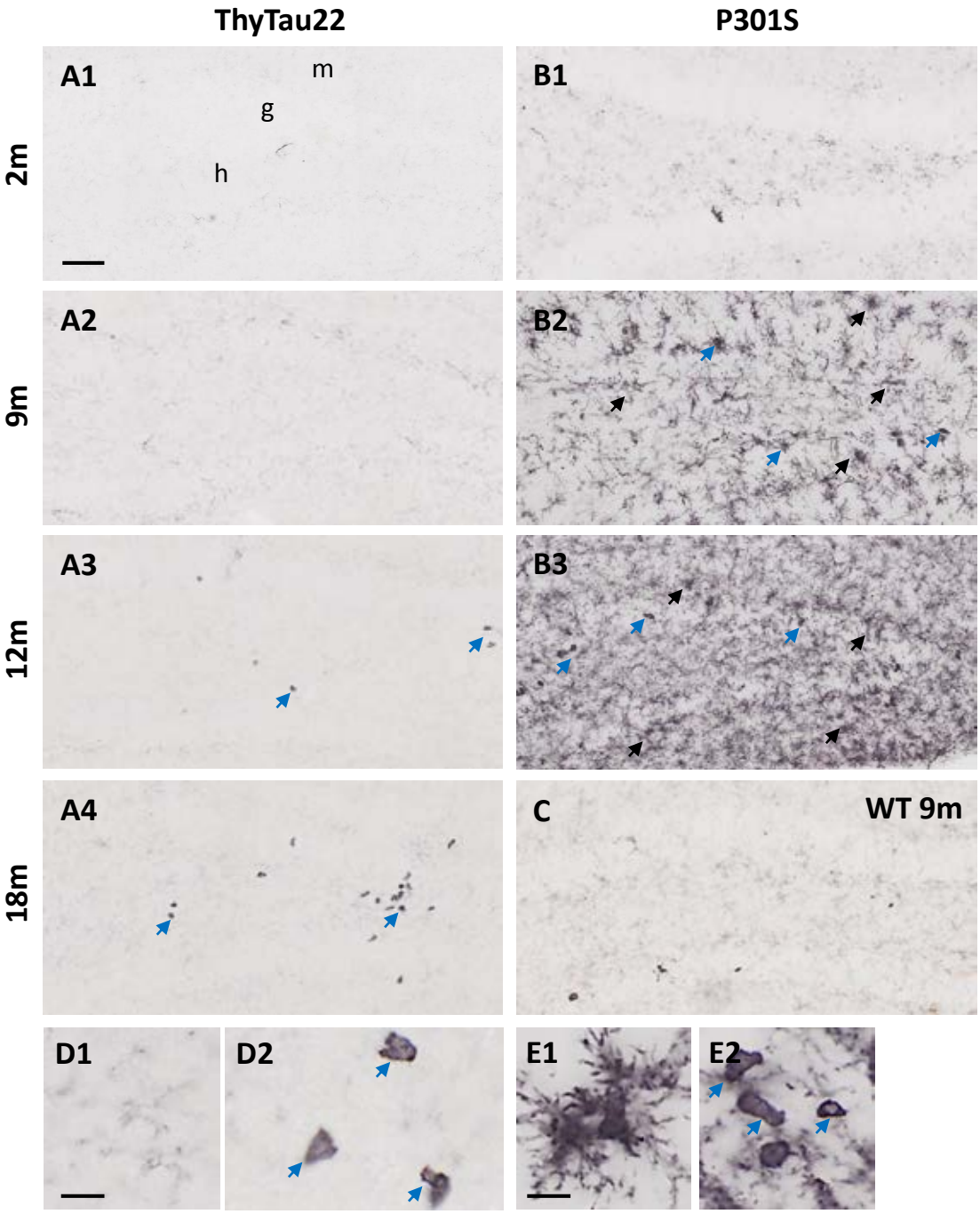
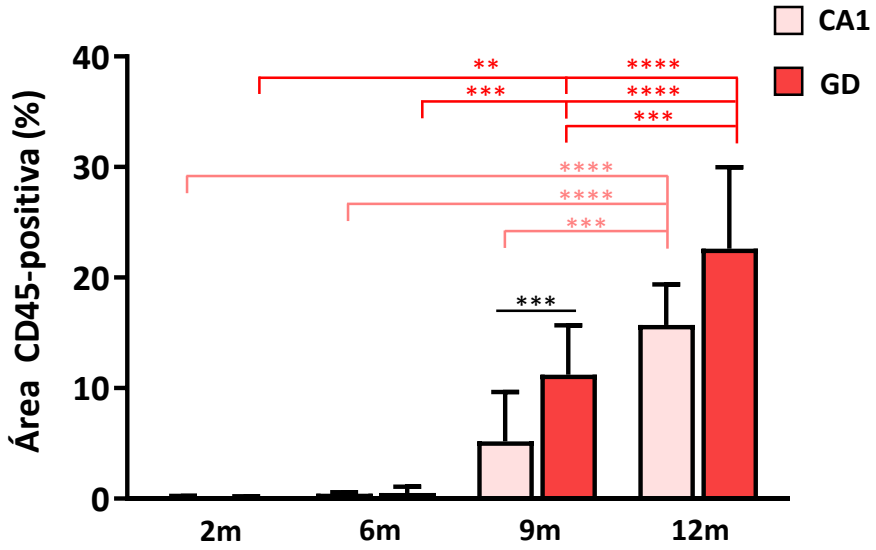


Figura 3.2.12. La progresión del a patología tau en el giro dentado va acompañada de una fuerte activación microglial en el modelo P301S, pero no en el modelo ThyTau22. Inmunohistoquímica para CD45 en el giro dentado de los modelos ThyTau22 y P301S desde los 2 a las 12/18 meses de edad. **(A1-A4**) En los animales ThyTau22 no se observa activación microglial en esta región. (**B1-B3**) en el modelo P301S se observa una fuerte inmunorreactividad microglial para CD45, especialmente a los 9-12 meses. (**D**) Imágenes representativas del marcaje de CD45 en la microglía de ThyTau22 (**D1**) y de linfocitos infiltrados en el modelo ThyTau22 (**D2**). (**E**) Imágenes representativas de microglía activada CD45-positiva en P301S (**E1**) y de linfocitos infiltrados CD45 positivos (**E2**). La infiltración de células monocito-linfocito (flechas azules) en CA1 con la edad es mucho mayor en el modelo P301S que en el ThyTau22 . (**C**) animales controles WT de 9 meses de edad. *m: molecular; g: granular; h: hilio.* Barras de escala: 50 µm; D, E: 20 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



N= 3-5/edad. ADEVA de una vía (F (7,31) = 30,1; P < 0,0001
*Tukey, *p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001*

Figura 3.2.13. Estudio cuantitativo de la progresión temporal del área CD45-positiva (carga microglía activada) en el hipocampo del modelo P301S. En CA1 y giro dentado, el modelo P301S presenta a partir de los 9 meses de edad un incremento significativo del área ocupada por la inmunotinción para CD45. Es significativamente alta a los 12 meses de edad con respecto a todas las edades anteriores analizadas.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

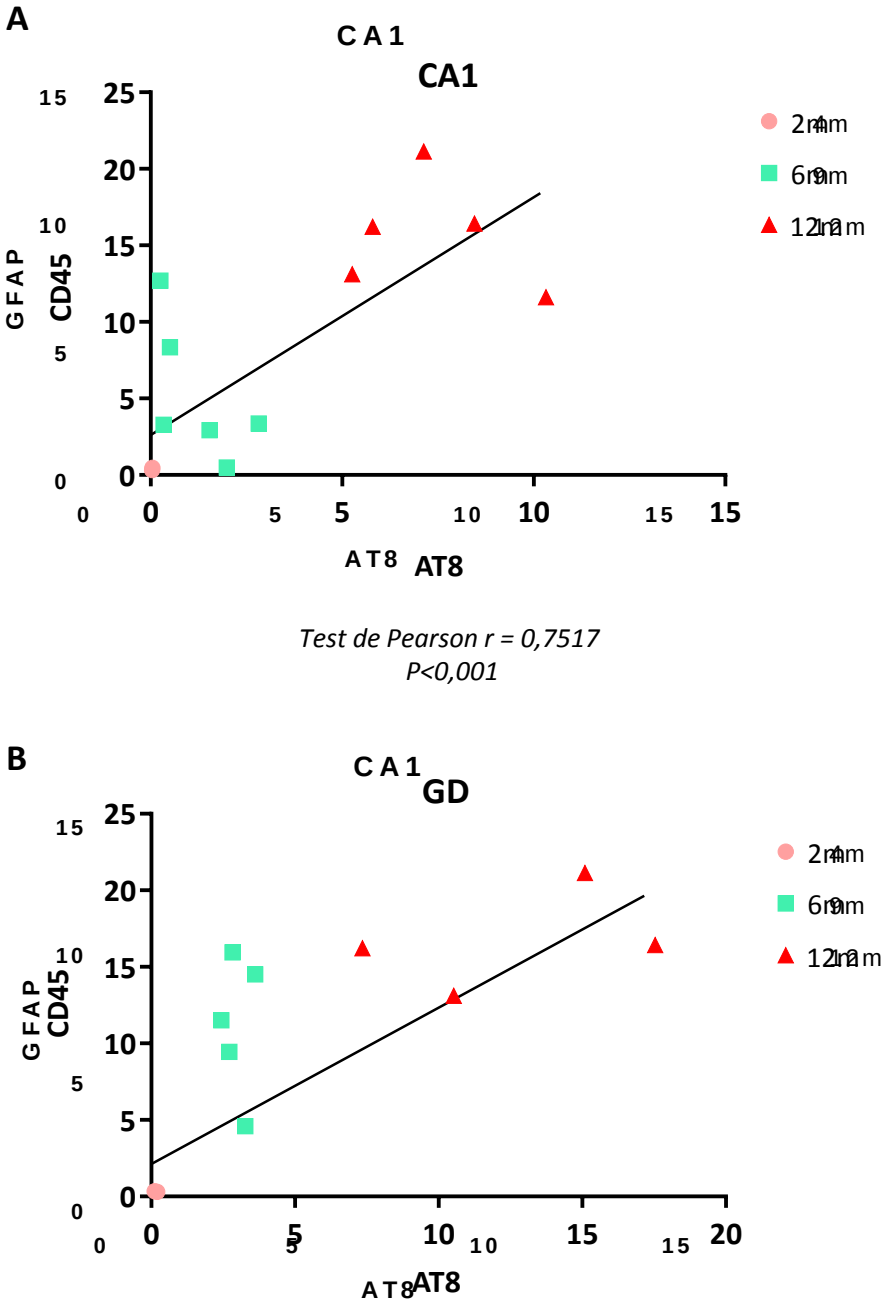


Figura 3.2.14. Estudio de la correlación entre la progresión de la patología tau y la activación microglial en el hipocampo del modelo P301S. Existe una correlación positiva entre la carga de tau hiperfosforilada (AT8) y la activación microglial (CD45) tanto en la región CA1 (**A**) como en el giro dentado (**B**) del modelo P301S con el avance de la edad.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

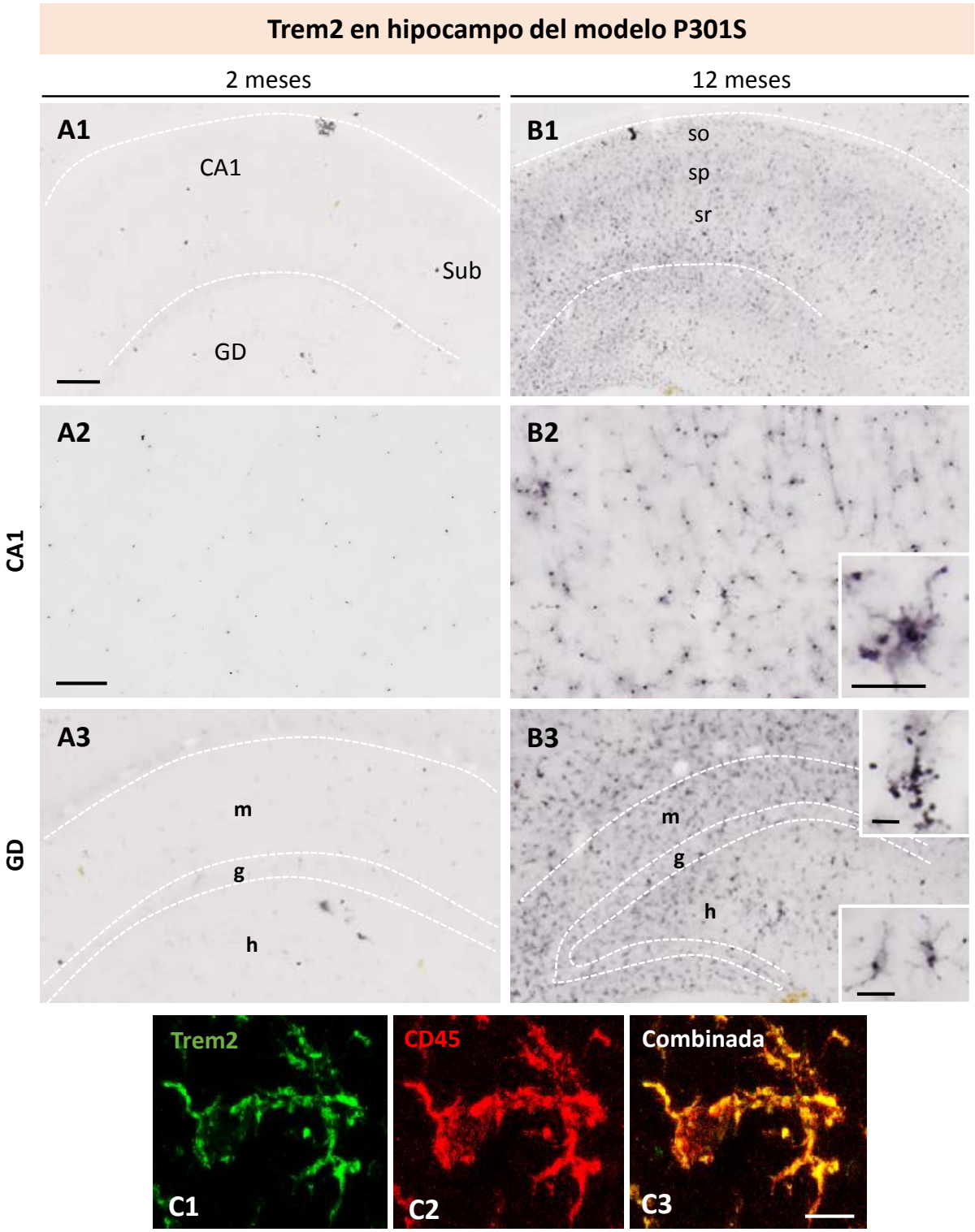


Figura 3.2.15. La expresión del receptor microglial TREM2 aumenta con la progresión de la patología tau en el hipocampo del modelo P301S. (**A, B**) Inmunohistoquímica para TREM2 a microscopía de campo claro en el hipocampo de P301S a 4 (**A1-A3**) y 12 (**B1-B3**) meses de edad. A los 12 meses, numerosas células microgliales expresan TREM2 por todo el hipocampo (ver detalles en insertos de B2 y B3). (**C1-C3**) Inmunofluorescencia doble Trem2/CD45 a microscopía confocal demostrando que las células Trem2-positivas son microglía activada (CD45-positiva). *CA1: región del asta de Ammon; GD: giro dentado; g: granular; h: hilio; m: molecular. so: estrato oriens; sp: estrato piramidal; sr: estrato radiado; Sub: subículo.* Barras de escala: A1, B1: 200 µm; A2, A3, B2 y B3: 50 µm; Inserto en B2: 20 µm; inserto superior en B3: 10 µm; inserto inferior en B3: 20 µm; C1-C3:10 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

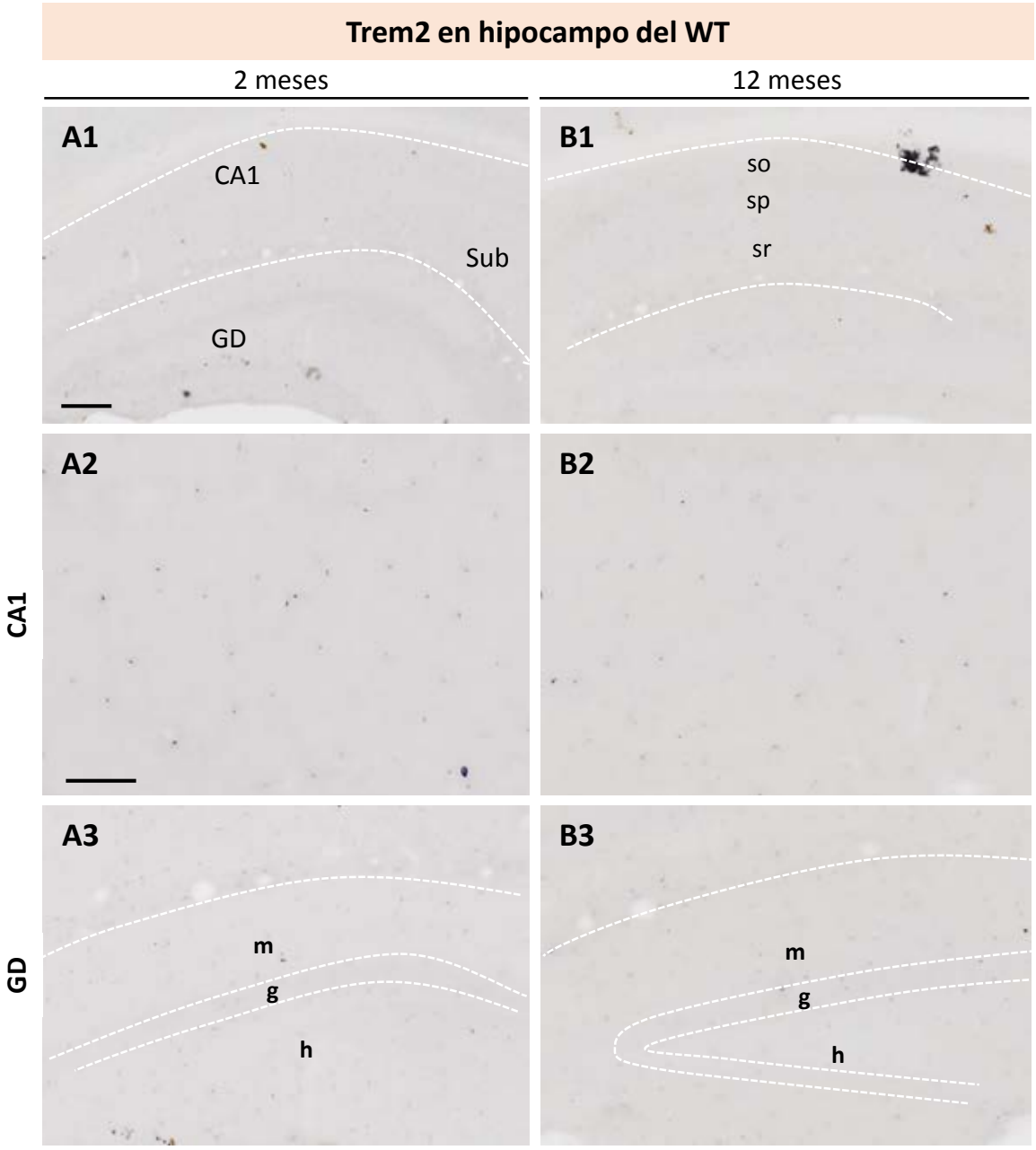


Figura 3.2.16. La expresión del receptor microglial TREM2 es mínima o nula en el hipocampo de los animales WT y no experimenta cambios con la progresión de la edad. Inmunohistoquímica para TREM2 a microscopía de campo claro en el hipocampo de animales WT a 4 (A1-A3) y 12 (B1-B3) meses de edad. No se detecta microglía significativamente inmunoteñida, solo se aprecia un marcaje muy residual en los cuerpos microgliales. No se observan cambios con la edad. *CA1: región del asta de Ammon; GD: giro dentado; g: granular; h: hilio; m: molecular. so: estrato oriens; sp: estrato piramidal; sr: estrato radiado; Sub: subículo.* Barras de escala: A1, B1: 200 µm; A2, A3, B2 y B3: 50 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.2.1.3. Una subpoblación de la microglía activada del hipocampo del modelo P301S expresa Galectina-3

La galectina-3 (Gal3) es una lectina de unión a carbohidratos sin actividad catalítica que es expresada y secretada en el tejido nervioso principalmente por la microglía. En la EA, se ha demostrado que Gal3 dirige la activación proinflamatoria de la microglía (Boza-Serrano et al., 2019). Esta lectina se sobreexpresa en la microglía activada y forma parte de la firma molecular DAM, y entre diversas funciones parece participar en el proceso de agregación de proteínas patogénicas como β-amiloide. Además, se ha demostrado su papel como ligando de los receptores microgliales TLR4 y TREM2 (Burguillos et al., 2015; Boza-Serrano et al., 2019), pero apenas se conoce nada sobre su papel en la patología de tau.

En este trabajo se ha analizado mediante inmunohistoquímica el patrón de expresión de Gal3 en secciones de hipocampo de animales P301S de 9 meses de edad, en paralelo con animales ThyTau22 y WT de la misma edad (**Fig. 3.2.17**). La cantidad de células microgliales inmunomarcadas para Gal3 fue mucho mayor en los animales P301S que en los ThyTau22. La mayoría de las células Gal3-positivas correspondieron con células de la microglía, marcándose excepcionalmente algunos astrocitos y raramente alguna neurona (no mostrado). En el caso de los animales WT, se detectó la presencia puntual de células microgliales Gal3-positivas tanto en CA1 como en giro dentado (**Fig. 3.2.17 A2 y A3**, respectivamente). En el hipocampo del modelo ThyTau22 solo se localizaron algunas células Gal3-positivas en CA1, la mayoría adosadas o muy próximas a la capa piramidal (**Fig. 3.2.17 B2**). Esta microglía Gal3-positiva en ThyTau22 presentaba una morfología poco activada, con escasa retracción y engrosamiento de sus prolongaciones (**Fig. 3.2.17 B2** y detalle en **D**). En el giro dentado apenas se detectaron células positivas para este marcador (**Fig. 3.2.17 B3**). A diferencia de lo observado en los WT y en los ThyTau22, los animales P301S a los 9 meses presentaron numerosas células microgliales Gal3 inmunopositivas en el hipocampo (**Fig. 3.2.17 C1**). La cantidad de microglía inmunoteñida fue mucho más abundante en el giro dentado que en CA1, sobre todo cerca de la capa granular y en el hilio (**Fig. 3.2.17 C3**). En CA1 también se observaron numerosas células microgliales Gal3-positivas adosadas en su mayoría al estrato piramidal, la zona del estrato radiado más proximal a este, y en el estrato lacunoso-molecular. Además, la región del alveus aparecía intensamente marcada (**Fig. 3.2.17 C1**). La morfología de las células Gal3-positivas en los P301S presentó un fenotipo de activado con prolongaciones retraídas y muy engrosadas (**Fig. 3.2.17 E**). Se confirmó que las células microgliales Gal3-positivas eran células activadas mediante inmunofluorescencia doble Gal3/CD45 a microscopía confocal (**Fig. 3.2.17 F1-F3**). Es más, se determinó mediante inmunofluorescencia triple para Iba-1, CD45 y Gal3 que la microglía Gal3-positiva representaba una subpoblación de microglía activada CD45-positiva (**Fig. 3.2.18**).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.2.2. LA MICROGLÍA ACTIVADA ESTÁ IMPLICADA EN LA FAGOCITOSIS DE FOSFO-TAU

Las células microgliales son los macrófagos residentes del sistema nervioso central y contribuyen significativamente a la homeostasis cerebral durante el desarrollo, la vida adulta y en situaciones patológicas. En la enfermedad de Alzheimer y taupatías puras se ha descrito que existe un aumento de la fagocitosis de elementos sinápticos y neuronas apoptóticas por parte de las células microgliales (revisado en Galloway et al., 2019). Además, se ha descrito que la microglía tiene capacidad de fagocitar péptido Aβ (D'Andrea et al., 2004; Zuroff et al., 2017) y tau patológico (Bolós et al., 2015; Sanchez-Mejias et al., 2016; Das et al., 2020). En este trabajo se ha analizado a nivel celular y subcelular la relación entre la microglía activada y las neuronas que contienen fosfo-tau en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S.

En el estudio previo de expresión de marcadores de activación asociados con la firma molecular DAM de la microglía activada (ver **Figura 3.2.1**) se obtuvo que los niveles de expresión del gen microglial *cd68* aumentaban considerablemente en el modelo P301S a edades avanzadas, mientras que en ThyTau22 los niveles no variaban respecto al WT, incluso a 9-12 meses de edad. Por tanto, se ha realizado un estudio inmunohistoquímico para este marcador microglial lisosomal en el hipocampo de animales P301S de 9 meses de edad (**Fig. 3.2.19**), en paralelo con animales ThyTau22 y WT de la misma edad. Al ser una proteína constitutiva de los lisosomas y endosomas tardíos de la microglía, los animales WT (**Fig. 3.2.19 A**) mostraron un marcaje basal para CD68 en toda la población microglial (de morfología homeostática) en las que se apreciaban pequeños puntos inmmunorreactivos de diferentes tamaños en el cuerpo celular y las prolongaciones (**Fig. 3.2.19 D**), correspondientes a estructuras lisosomales/endosomales. Para los animales ThyTau22 el marcaje fue similar al WT (**Fig. 3.2.19 B y E**), a excepción de alguna célula microglial con mayor inmunotinción (**Fig. 3.2.19 B2**). La situación fue muy diferente en el hipocampo de los animales P301S (**Fig. 3.2.19 C**). En este modelo el inmunomarcaje para CD68 fue bastante notable y superior a lo observado en animales ThyTau22 y WT, tanto en CA1 (**Fig. 3.2.19 C2**; ver detalle en **F**) como en giro dentado (**Fig. 3.2.19 C3**). Es de destacar, que la región del giro dentado mostró mayor inmunorreactividad en comparación con CA1. Las células microgliales adosadas a la capa granular o en la zona del hilio, contenían gran cantidad de lisosomas/endosomas que formaban acúmulos de gran tamaño (**Fig. 3.2.19 G**). Los resultados inmunohistoquímicos confirmaron, por tanto, los datos obtenidos mediante qPCR para este marcador fagocítico microglial.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

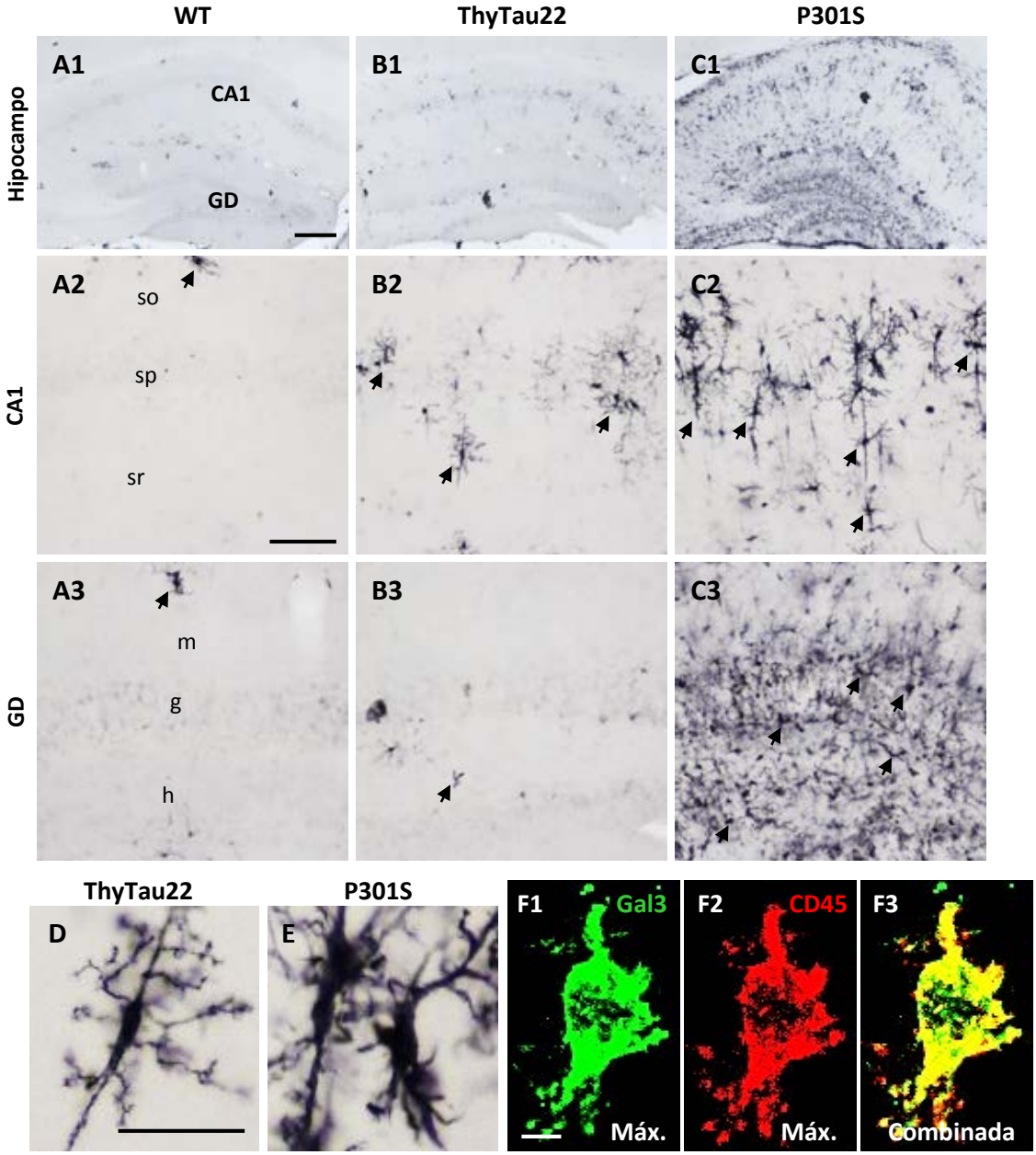


Figura 3.2.17. La microglía activada galectina-3 positiva es más abundante en el hipocampo del modelo P301S que en el del ThyTau22. Imágenes del inmunomarcaje para galectina-3 en el hipocampo de ThyTau22 (**B**) y P301S (**C**) a los 9 meses de edad. (**A**) Como control se muestra el marcaje en WT de la misma edad. Los dos modelos transgénicos muestran mayor reactividad para galectina-3 en comparación con los WT. La población de microglía activada positiva para galectina-3 en el hipocampo del modelo P301S es significativamente mayor que en los ThyTau22. (**D, E**) Detalles a mayores aumentos de células galectina-3 positivas en los dos modelos transgénicos. (**F**) Inmunofluorescencia doble para galectina-3 (verde) y CD45 (rojo) a microscopía confocal. Las imágenes (proyecciones máximas) muestran cómo la microglía galectina-3 positiva lo es también para CD45. *CA1: región del asta de Ammón; GD: giro dentado; m: molecular; g: granular; h: hilio; so: estrato oriens; sp: estrato piramidal; sr: estrato radiado.* Barra de escala: A: 200 µm; B: 150 µm; D, E: 20 µm; F: 4 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

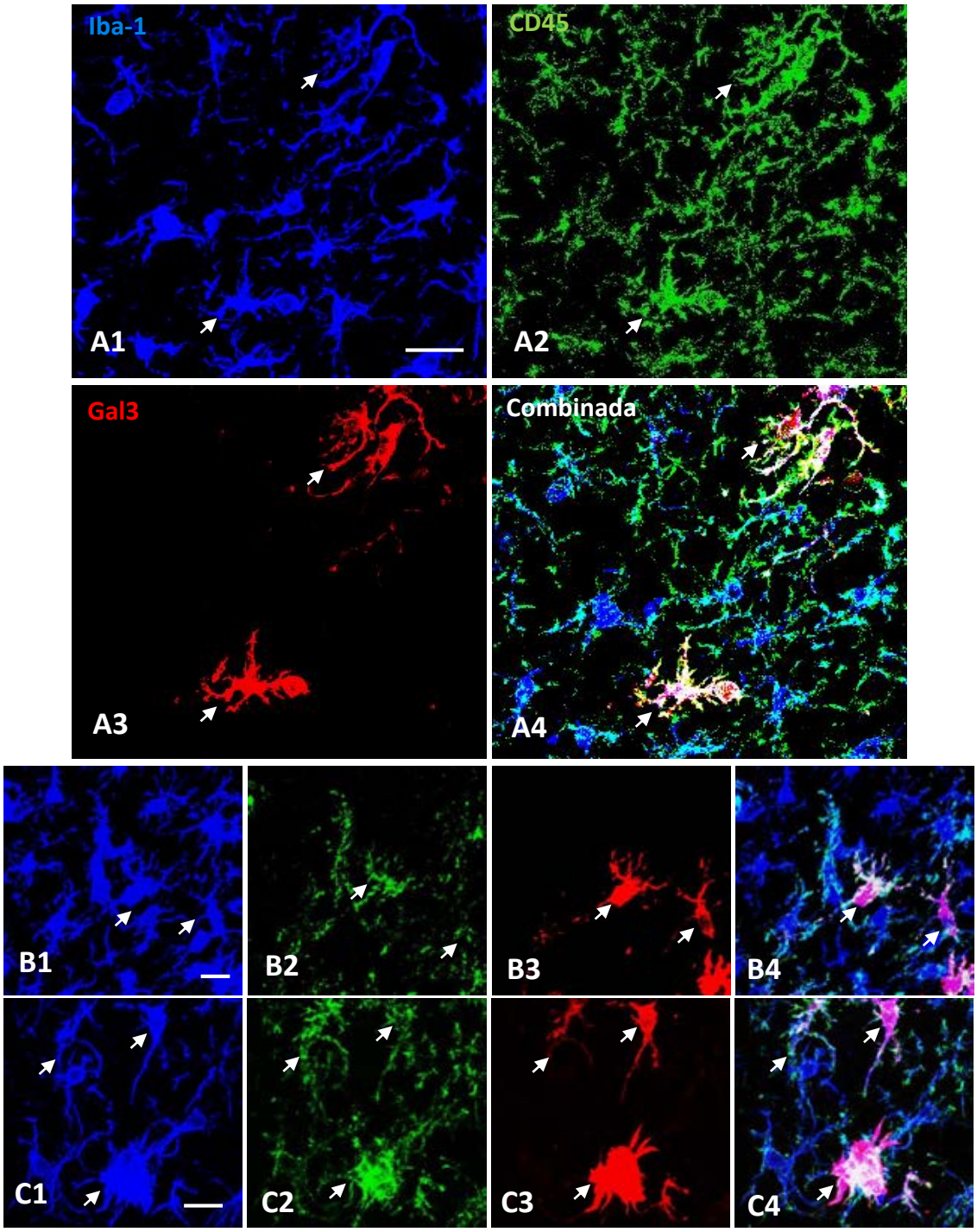


Figura 3.2.18. La microglía galectina-3 positiva es una subpoblación de la microglía activada en el hipocampo del modelo P301S. Inmunofluorescencia triple para los marcadores Iba-1 (azul), CD45 (verde) y galectina-3 (rojo) a microscopía láser confocal. (**A**) Las imágenes son proyecciones máximas de varios planos focales mostrando células microgliales Iba-1 (**A1**) y CD45 (**A2**) positivas y de las cuales solo algunas son Gal3 positivas (flechas en **A3**). En la imagen combinada (**A4**) se observa que las células que expresan galectina-3 corresponden a un grupo pequeño de las CD45-positivas. (**B, C**) Las series de imágenes (proyecciones máximas) muestran más ejemplos de que las células positivas para galectina-3 (flechas) son un subgrupo dentro de la población microglial. Barras de escala: A: 20 µm; B: 10 µm; C: 16 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

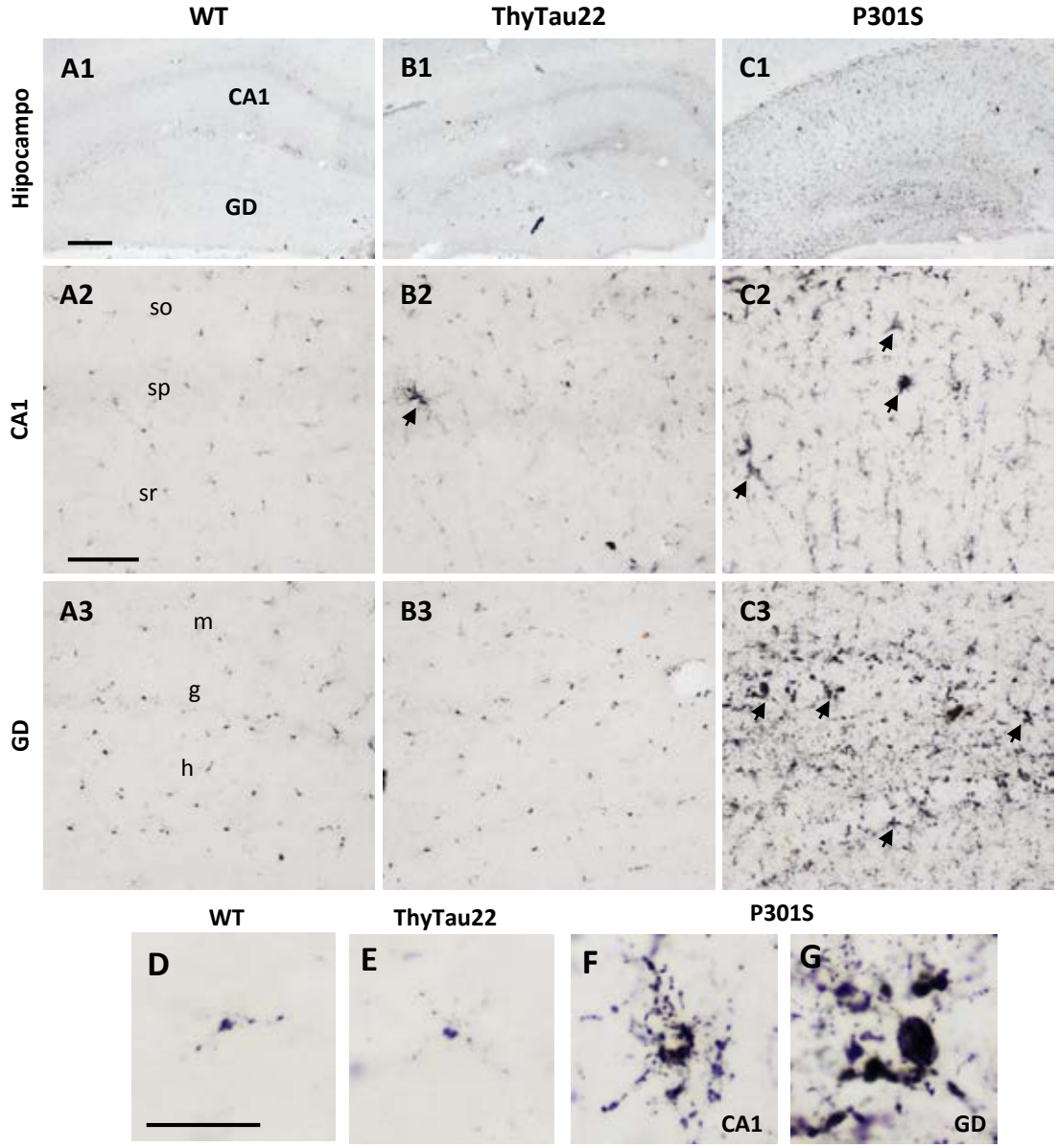


Figura 3.2.19. Aumento de la expresión del marcador fagocítico microglial CD68 en el hipocampo del modelo P301S. Inmunohistoquímica a microscopía a campo claro para el marcador de microglía fagocítica CD68 en animales ThyTau22 (**B**) y P301S (**C**) a los 9 meses de edad. (**A**) Como referencia se muestra el marcaje en el caso de animales WT de la misma edad. El modelo ThyTau22 presenta escasas células microgliales con gran cantidad de lisosomas (flecha) en la región de CA1, mientras que en P301S la cantidad de microglía marcada es mucho mayor especialmente en el GD (**C3**). (**D-G**) Detalles de células microgliales CD68-positivas en WT, ThyTau22 y P301S. Obsérvese como la cantidad de inmunomarcaje para lisosomas es mucho mayor en la microglía del modelo P301S (**F, G**). *CA1: región del asta de Ammón; GD: giro dentado; m: molecular; g: granular; h: hilio; so: estrato oriens; sp: estrato piramidal; sr: estrato radiado.* Barra de escala: A: 200 µm; B: 150 µm; D-G: 20 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Para comprobar si este aparente aumento de la capacidad fagocítica de la microglía activada en el modelo P301S coincidía con una alta cantidad de fosfo-tau en el medio circundante, se realizó una inmunofluorescencia triple para los marcadores de fosfo-tau (AT8), microglía (Iba-1) y lisosomas (LAMP1, del inglés *Lysosomal-associated membrane protein 1*) a los 12 meses de edad (**Fig. 3.2.20**). Como era de esperar, las células microgliales en regiones con gran cantidad de patología tau como el giro dentado (**Fig. 3.2.20**) presentaban una elevada expresión de LAMP1. La microglía, además, tenía prolongaciones que contactaban en ocasiones con somas y prolongaciones neuronales AT8-positivos (**Fig. 3.2.20 B2 y B3**). Para comparar, analizamos también CA1 en el modelo ThyTau22 a 12 meses, región que a esta edad poseía mucha patología fosfo-tau. La microglía mostró también algunos contactos de prolongaciones con neuronas AT8-positivas **Fig. 3.2.20 A2 y A3**), pero fue menos frecuente. El marcaje para LAMP1 fue inferior en los ThyTau22 en comparación con los animales P301S. Estos resultados sugieren la posibilidad que la activación microglial y el aumento de la capacidad fagocítica de estas células guarde una estrecha relación con la presencia de neuronas con fosfo-tau en su interior.

A continuación, se llevó a cabo un estudio a mayor detalle de la relación entre los agregados de fosfo-tau y las células microgliales en ambos modelos transgénicos mediante inmunofluorescencia doble para diversos marcadores microgliales (Iba-1, CD45, Galectina-3 y CD68) con fosfo-tau (AT8). Como se ha descrito a ME en este trabajo fosfo-tau se localiza en el interior de los somas neuronales y sus prolongaciones (dendritas y axones) incluyendo las sinapsis (ver **Fig. 3.1.6 y 3.1.7**). Aunque no hemos detectado presencia de fosfo-tau en el exterior celular en los estudios a microscopía óptica u electrónica, si se ha determinado mediante estudios de western blots su presencia en fracciones solubles (S1) de hipocampo (ver Romero-Molina et al., 2018).

En el modelo ThyTau22 se detectó que la microglía en zonas de neuropilo como el estrato oriens (**Fig. 3.2.21 A**) contactaba con algunas prolongaciones que contenían agregados de fosfo-tau en su interior. Aunque en este modelo la cantidad de microglía activada (CD45-positiva o Gal3-positiva) fue muy escasa, la mayoría de estas células se encontraron asociadas a somas neuronales con alto contenido en fosfo-tau (**Fig. 3.2.21 B**). Estas células podían contactar con estas neuronas en múltiples puntos (**Fig. 3.2.21 C**). Aunque las neuritas apicales del estrato radiado contenían gran cantidad de marca para AT8, no se detectó apenas microglía Gal3-positiva asociada a ellas en este modelo de tau. Por otro lado, en los animales P301S el contacto entre las células microgliales y las neuritas y somas con fosfo-tau fue mucho más frecuente (**Fig. 3.2.22**). En el giro dentado, donde la patología de tau es muy elevada a partir de 9 meses, se encontró que la microglía no sólo contactaba con pequeños agregados (**Fig. 3.2.22 A**), sino que fue habitual detectar prolongaciones microgliales que estaban polarizadas hacia las neuronas

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

de la capa granular, llegando a rodearlas en gran medida (**Fig. 3.2.22 B**), algo que se muestra claramente mediante el marcaje para CD45 y fosfo-tau (**Fig. 3.2.22 C**). Las células microgliales activadas Gal3-positivas presentes en CA1 también aparecían en gran cantidad adosadas al estrato piramidal al igual que ocurría en el modelo ThyTau22, donde contactaban gran cantidad de somas con fosfo-tau. A diferencia de los ThyTau22, estos contactos también resultaron frecuentes a lo largo de las zonas del radiado con abundante marcaje para AT8, adoptando la morfología tipo "rod" (**Fig. 3.2.23 A**). Analizando con más detalle, fue frecuente que sobre todo en zonas de neuropilo como el hilio del giro dentado (**Fig. 3.2.23 B**), la microglía activada Gal3-positiva internalizara agregados de fosfo-tau. La presencia de fosfo-tau en el interior de los lisosomas microgliales quedó demostrada con la inmunofluorescencia doble para CD68 y AT8 (ver flechas en **Fig. 3.2.23 C**).

De esta forma, la microglía activada en el modelo P301S parece estar implicada en la fagocitosis de fosfo-tau intraneuronal, aunque no podemos descartar que también internalice fosfo-tau extracelular.

3.2.3. ELEVADA PRESENCIA DE MICROGLÍA TIPO ROD EN EL HIPOCAMPO DEL MODELO P301S

Las células microgliales, de manera dinámica, sufren cambios morfológicos que están asociados con su actividad funcional. Como se ha comentado previamente, en situación homeostática (vigilancia) la microglía presenta un cuerpo celular pequeño con prolongaciones ramificadas y dinámicas con las que monitoriza el medio ambiente, mientras que en estado de activación la microglía es altamente móvil y se caracteriza por tener prolongaciones retraídas y engrosadas junto con un cuerpo celular hipertrófico. De agudizarse el estado de activación, la célula microglial adquiere un fenotipo ameboide. No obstante, existe otro tipo morfológico, cuyas propiedades moleculares y funcionales son poco conocidas, la microglía "rod". Se ha descrito que este tipo de microglía es altamente proliferativo y con capacidad fagocítica (Tam and Ma, 2014). Se encuentra principalmente asociado a la sustancia blanca (tractos axonales mielinizados), pero se ha descrito que con la edad aparecen en diversas zonas de la sustancia gris, especialmente en corteza e hipocampo. En humanos, se sabe que la cantidad de microglía rod aumenta con el proceso de envejecimiento y que se encuentra relacionada con procesos de daño neuronal y enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y otras patologías (revisado en Holloway et al., 2019). Muy poco se sabe de la microglía rod en las taupatías y en sus modelos animales, aunque se ha descrito que este tipo microglial suele verse asociado en el hipocampo a los PHFs en muestras *post mortem* de pacientes con EA (Bachstetter et al., 2015, 2017).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Mediante inmunohistoquímica para Iba-1 se detectó la presencia de microglía rod en el hipocampo de ambos modelos transgénicos para tau (**Fig. 3.2.24**). La microglía rod aparecía casi en su totalidad en el estrato radiado, donde se sitúan las dendritas apicales de las neuronas principales de CA1-CA3. Las células microgliales adoptaban una morfología alargada y se localizaban orientadas de forma paralela a las dendritas apicales (**Fig. 3.2.24 C y D**) y en muchas ocasiones se asociaban entre sí formando trenes de varias células alineadas. La cantidad de microglía rod aumentaba con la patología tau en ambos modelos. En el caso de los ThyTau22, a edades tempranas como los 6 meses (**Fig. 3.2.24 A1**) se detectaban solo algunas células con morfología rod, mientras que su número aumentó a los 12 meses (**Fig. 3.2.24 A2**). Comparativamente, en el modelo P301S existe una cantidad mucho mayor de microglía rod con respecto a losThyTau22 de la misma edad (**Fig. 3.2.24 B2**). Por tanto, la microglía rod está muy relacionada con la presencia y el grado de patología tau en el hipocampo de estos animales.

Para comprobar si estas células microgliales contactan directamente con las dendritas del estrato radiado, se realizó un estudio mediante inmunofluorescencia doble para los marcadores MAP2 (marcador de dendritas) e Iba-1. Las imágenes mostraron que las células microgliales tipo rod Iba-1-positivas del estrato radiado de los P301S a los 12 meses se situaban de forma paralela a las dendritas (**Fig. 3.2.25 A1 y A2**) y contactaban con ellas estrechamente en largas porciones (**Fig. 3.2.25 A2**). No sólo eso, mediante inmunofluorescencia doble MAP2/Gal3 era frecuente observar a la microglía rod abrazando a las dendritas apicales de estas neuronas. Sin embargo, en los animales ThyTau22 fueron pocas las células microgliales tipo rod Gal3-positivas en el estrato radiado (**Fig. 3.2.25 B y C**).

A continuación, se realizó un estudio ultraestructural mediante MET de la microglía rod en el hipocampo de ambos modelos transgénicos. Esta microglía se caracterizaba por presentar un citoplasma electrodenso y una forma alargada bipolar con núcleo también alargado y bastante heterocromático. Las imágenes mostradas en la **Figura 3.2.26** ponen de manifiesto que estas células microgliales se disponen en paralelo a las dendritas y contactan directamente durante tramos largos. Estudiando con mayor detalle estas zonas de contacto, se comprobó que era bastante frecuente encontrar en el citoplasma de las dendritas agrupaciones de mitocondrias y de vesículas derivadas de mitocondrias y otras, adosadas a la membrana plasmática (**Fig. 3.2.27**). También en muchas ocasiones, las células microgliales presentaban en su citoplasma, conjuntos de mitocondrias y sistemas de membranas (retículo endoplasmático) que se disponían cerca de la zona de contacto con la dendrita (ver **Fig. 3.2.27 A y C**). Curiosamente, estos conjuntos de mitocondrias no solo eran frecuentes en los contactos microglía-dendrita apical, sino que también resultaron ser bastante habituales en los contactos microglía-soma neuronal tanto en las neuronas del estrato piramidal de CA1 (**Fig. 3.2.28 A**) como en las granulares del giro dentado (**Fig. 3.2.28 B y C**).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Por tanto, la presencia y/o cantidad de microglía rod está estrechamente relacionada con la patología de tau. Además, el estudio ultraestructural reveló que en las zonas de contacto microglía-dendrita y microglía-soma neuronal existía una concentración de mitocondrias y vesículas relacionadas, que podrían estar cumpliendo un papel esencial en la formación de este tipo morfológico microglial y en la relación neurona-microglía.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

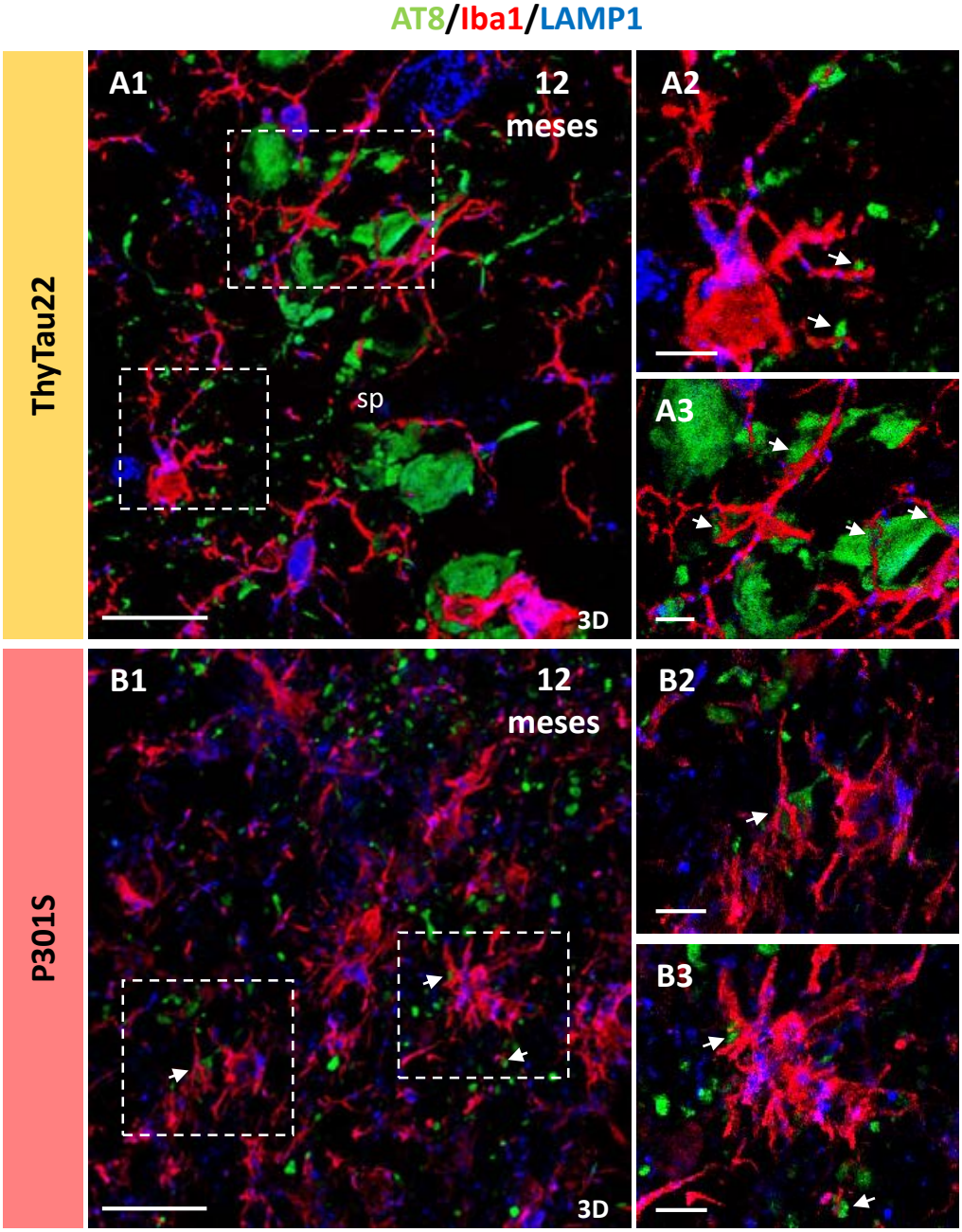


Figura 3.2.20. La microglía del modelo P301S asociada con estructuras positivas para fosfo-tau tiene gran cantidad de lisosomas. Inmunofluorescencia triple para los marcadores fosfo-tau (AT8, verde), Iba-1 (rojo) y LAMP1 (azul). (**A1-A3**) Las neuronas de la capa piramidal AT8-positivas del modelo ThyTau22 presentan microglía asociada con abundantes lisosomas. (**B**) Se muestra la región del giro dentado en P301S. El marcaje para LAMP1 es mucho más predominante que en ThyTau22. Estas células microgliales también muestran prolongaciones en contacto con agregados de fosfo-tau. Barras de escala: A1, B1: 20 µm; A2, A3: 5 µm; B2, B3: 5 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

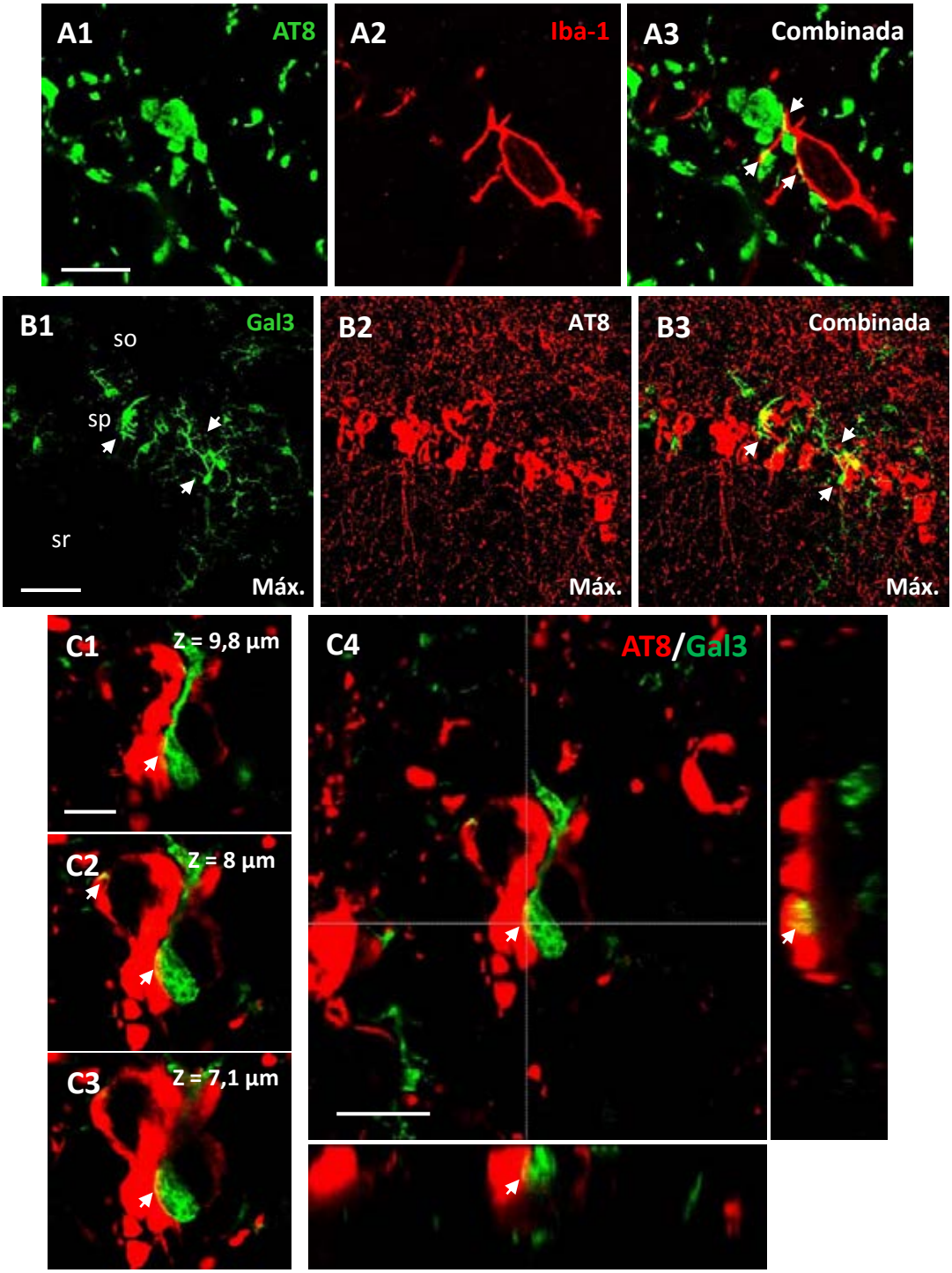


Figura 3.2.21. La microglía interacciona con prolongaciones y somas neuronales que contienen fosfo-tau en el hipocampo de los animales ThyTau22. (**A1-A3**) Inmunofluorescencia doble para fosfo-tau (AT8, verde) e Iba-1 (rojo) en el estrato oriens de ThyTau22 de 12 meses de edad; célula microglial con prolongaciones que contactan con agregados de fosfo-tau (flechas). (**B1-B3**) Inmunofluorescencia doble para galectina-3 (Gal3, verde) y fosfo-tau (AT8, rojo); las imágenes son proyecciones máximas mostrando agregados de fosfo-tau en somas del estrato piramidal en contacto con microglía Gal3-positiva (flechas). (**C1-C3**) Diferentes planos focales de una neurona piramidal AT8-positiva en estrecho contacto con una célula microglial Gal3-positiva (flechas). La imagen **C4** muestra los planos ortogonales donde se señala la zona de íntimo contacto microglia-neurona (flechas). Microscopía confocal. Barras de escala: A, C: 16 µm; B: 100 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

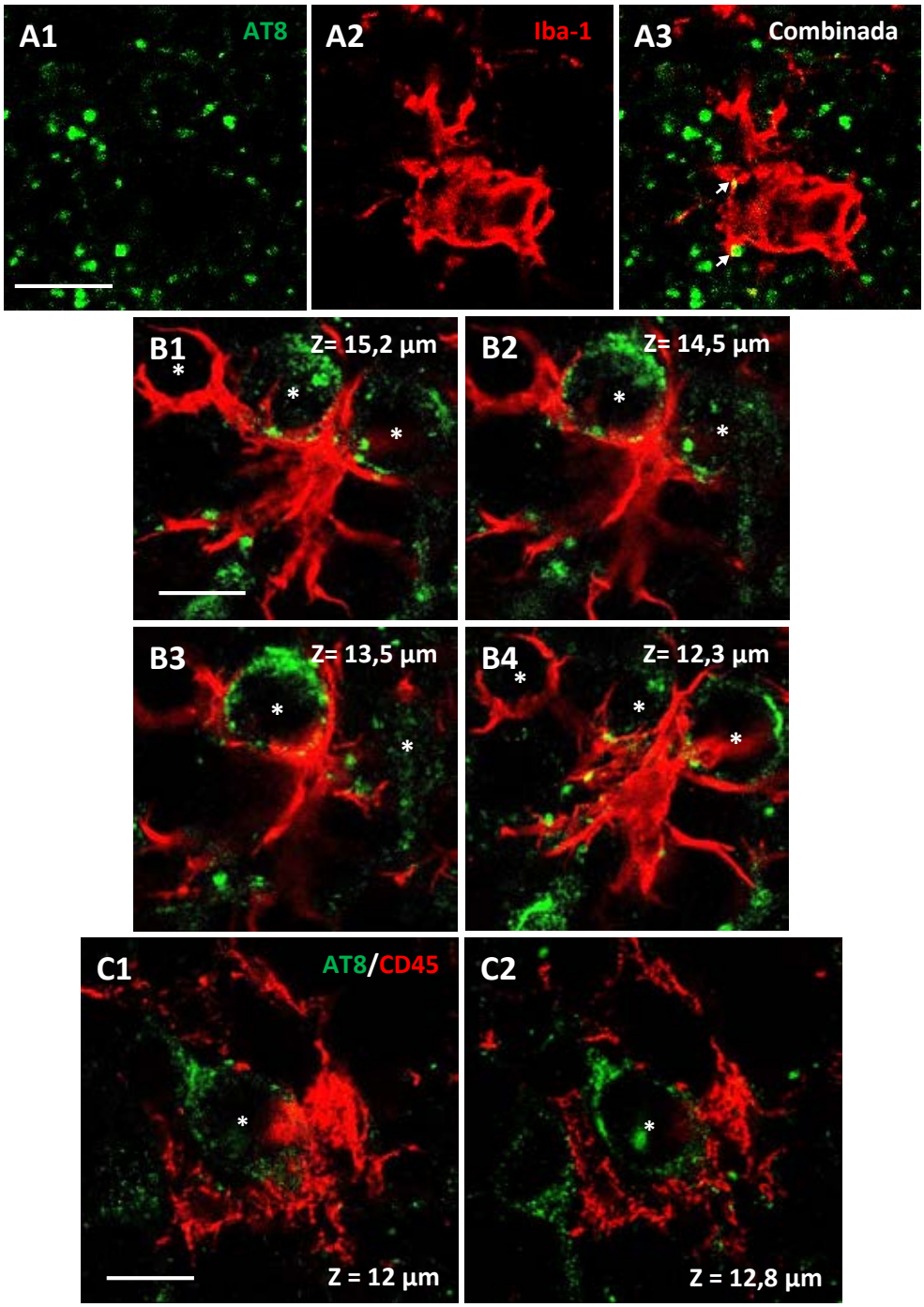


Figura 3.2.22. La microglía hipocampal del modelo P301S también se relaciona estrechamente con las neuronas que contienen fosfo-tau. (**A**) Inmunofluorescencia doble a microscopía láser confocal para los marcadores Iba-1 (rojo) y fosfo-tau (AT8, verde). La serie de imágenes A1-A3 muestra pequeños agregados de fosfo-tau en estrecho contacto con una célula microglial (flechas). **(B)** La microglía (Iba-1, rojo) engloba con sus prolongaciones gran cantidad de somas neuronales (asteriscos) fosfo-tau positivos (AT8, verde). (**C**) Imágenes de dos planos focales representativos de microglía activada (CD45, rojo) rodeando somas (asteriscos) con fosfo-tau en su interior. Barras de escala: A1-A3, 12 µm; B, C: 10 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

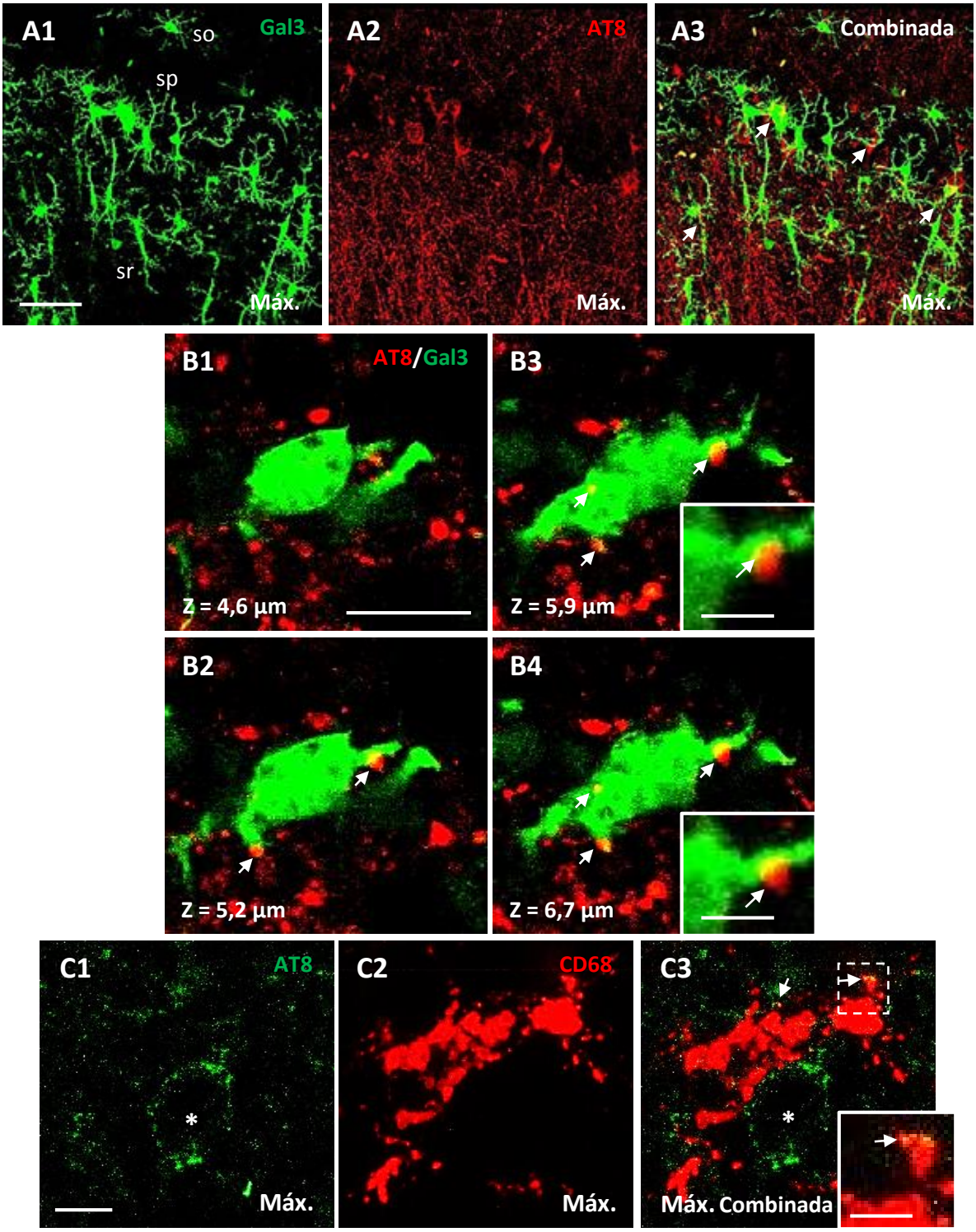


Figura 3.2.23. La microglía activada fagocita fosfo-tau en el modelo P301S. (**A, B**) Inmunofluorescencia doble para galectina-3 positiva (Gal3, verde) y fosfo-tau (AT8, rojo). (**A1-A3**) Proyecciones máximas de varios planos focales de CA1. Las células microgliales Gal3-positivas se asocian a somas y prolongaciones con AT8 en todo CA1 (flechas). (**B1-B3**) Serie de imágenes de diferentes planos focales de microglía contactando e internalizando agregados de fosfo-tau (flechas). (**C1-C3**) Inmunofluorescencia doble para los marcadores fosfo-tau (AT8, verde) y CD68 (rojo). Las imágenes muestran proyección máxima de una célula microglial fagocítica (CD68-positiva) rodeando somas neuronales con fosfo-tau en su interior (asterisco) y zonas de colocalización de ambos marcadores (flechas). Barras de escala: A: 100 µm; B: 12 µm; C: 7 µm; insertos en B: 4 µm; inserto em C: 3 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

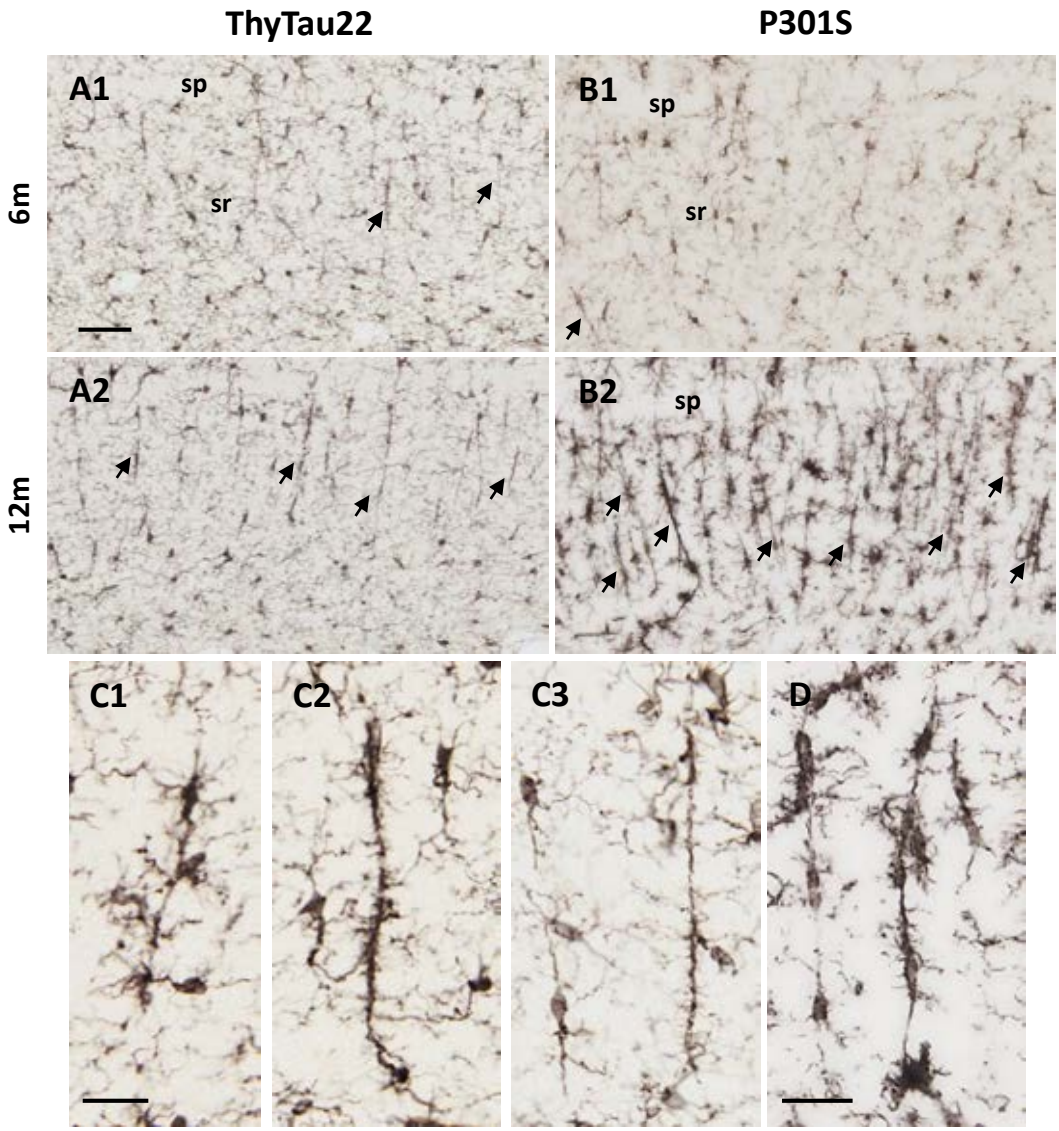


Figura 3.2.24. La cantidad de microglía ''rod'' aumenta con la patología tau, siendo más abundante en el hipocampo del modelo P301S. Inmunohistoquímica para el marcador Iba-1. Imágenes del estrato radiado de CA1 en animales ThyTau22 (**A, C**) y P301S (**B, D**). (**A, B**) Imágenes representativas de microglía ''rod'' en la región hipocampal CA1 de animales ThyTau22 y P301S de 6 meses (**A1, B1**) y 12 meses (**A2, B2**). Véase cómo la cantidad de microglía rod (flechas) aumenta con la edad y lo hace en mayor medida en los animales P301S. (**C, D**) Detalles de microglía rod en ThyTau22 (**C**) y P301S (**D**). *sp: estrato piramidal; sr: estrato radiado*. Barras de escala: A, B: 50 µm; C, D: 20 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

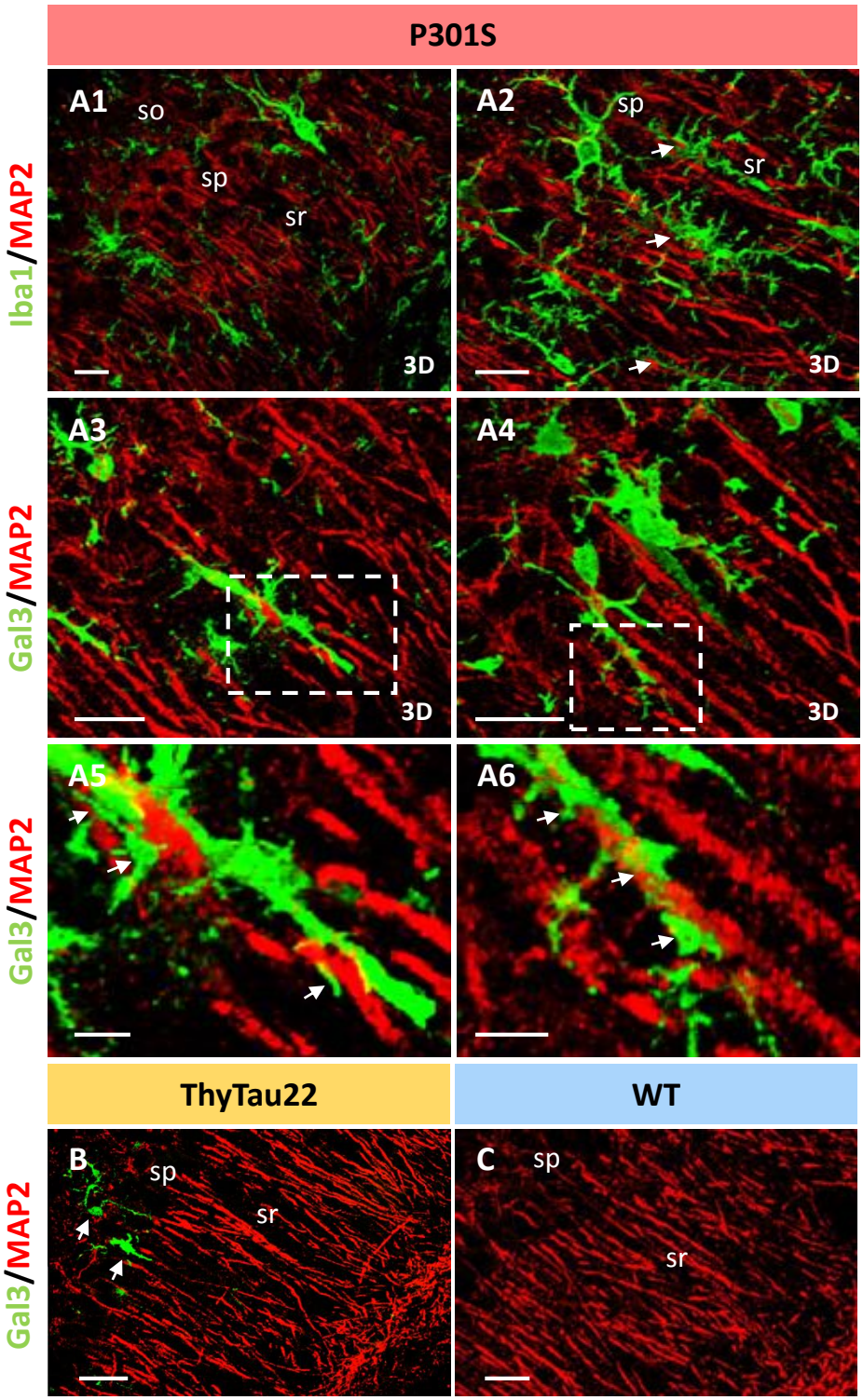


Figura 3.2.25. El hipocampo del modelo P301S presenta mayor cantidad de microglía rod galectina-3 positiva que el modelo ThyTau22. Inmunofluorescencia doble para Iba-1 (verde, **A1, A2**) y galectina-3 (verde**, A3-A6**) con el marcador de dendritas MAP2 (rojo). Las flechas indican células y prolongaciones microgliales con morfología tipo rod contactando y envolviendo las dendritas apicales de neuronas piramidales de CA1. La presencia de microglía rod Gal3-positiva en el modelo ThyTau22 (**B**) es mucho menor que en P301S (**A3, A4**). En el caso de los WT no aparecen (**C**). *Gal3: galectina-3; so: estrato oriens; sp: estrato piramidal; sr: estrato radiado.* Barras de escala: 20 µm; A5, A6: 5 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

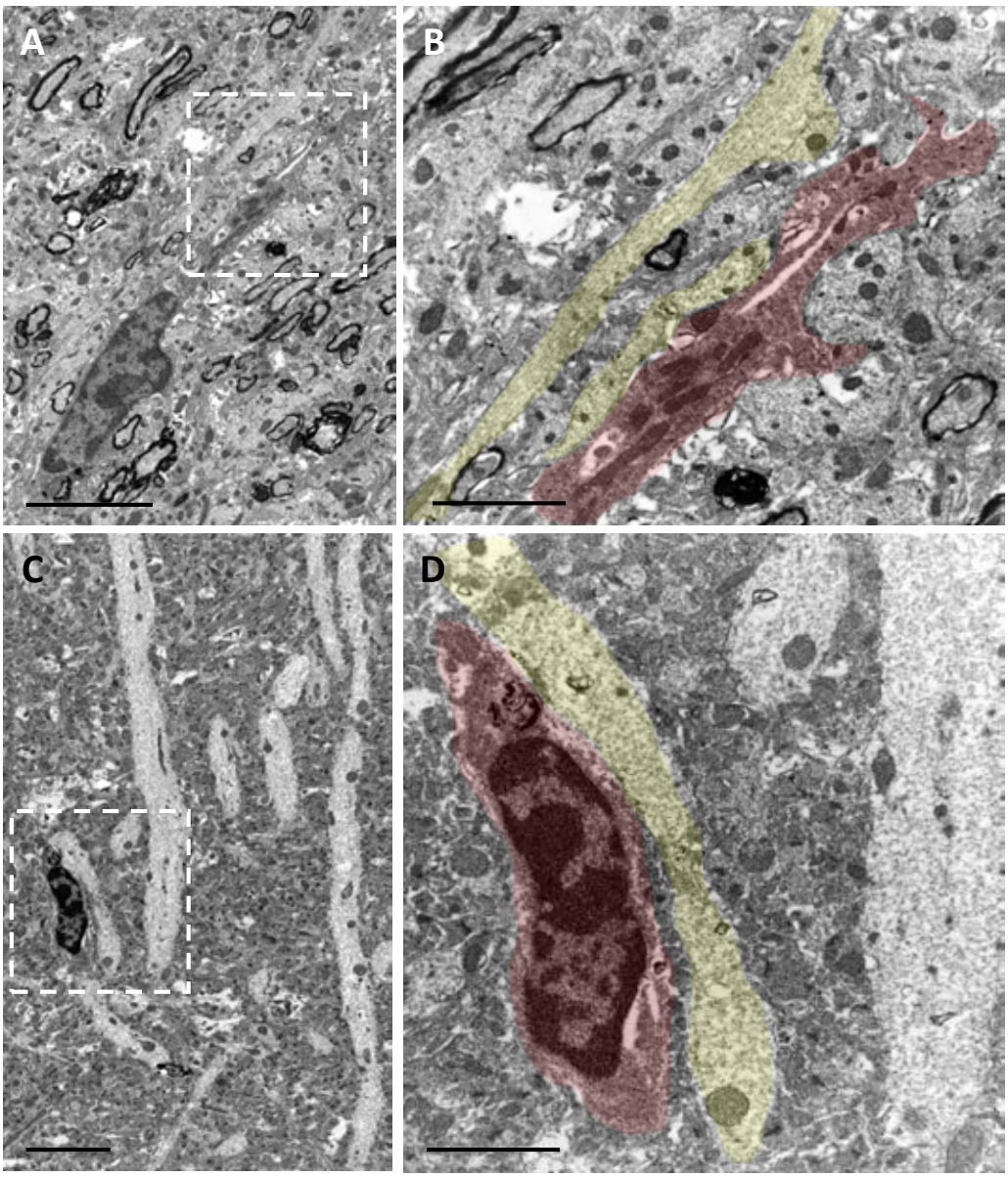


Figura 3.2.26. Microglía rod a nivel ultraestructural. Imágenes representativas de microglía rod a microscopía electrónica de transmisión en el hipocampo del modelo P301S (**A, B**) y ThyTau22 (**C, D**). A nivel ultraestructural la microglía rod se observa contactando con las dendritas apicales de neuronas piramidales localizadas en el estrato radiado (**A,** y detalle en **C**). La célula microglial (rojo) se coloca de forma paralela a la dendrita (amarillo) contactando a lo largo de esta en algunos tramos (**B,** y detalle en **D**). Barras de escala: A, C: 5 µm; B, D: 2 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

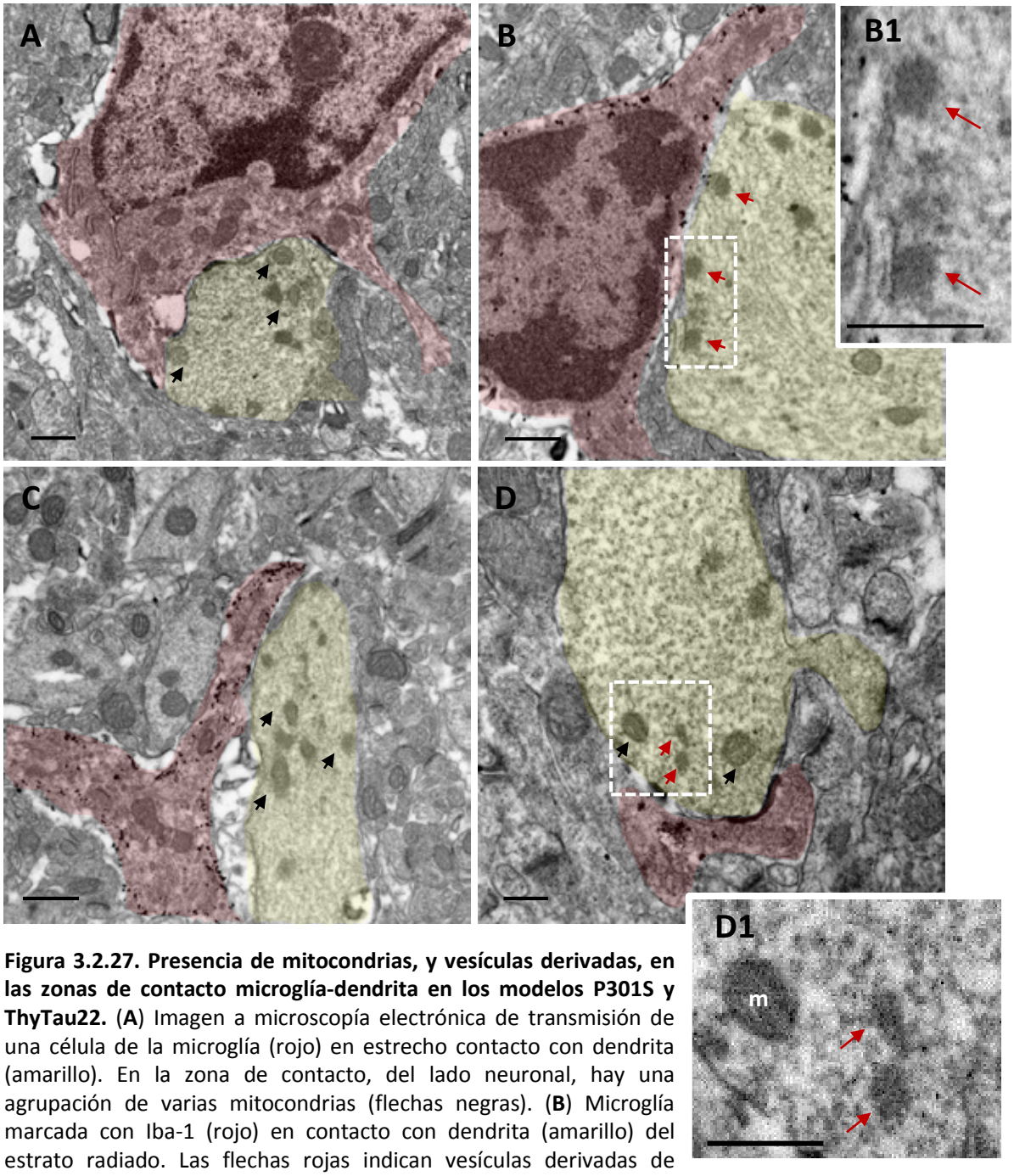


Figura 3.2.27. Presencia de mitocondrias, y vesículas derivadas, en las zonas de contacto microglía-dendrita en los modelos P301S y ThyTau22. (**A**) Imagen a microscopía electrónica de transmisión de una célula de la microglía (rojo) en estrecho contacto con dendrita (amarillo). En la zona de contacto, del lado neuronal, hay una agrupación de varias mitocondrias (flechas negras). (**B**) Microglía marcada con Iba-1 (rojo) en contacto con dendrita (amarillo) del estrato radiado. Las flechas rojas indican vesículas derivadas de mitocondria (detalle en **B1**). (**C, D**) Prolongaciones microgliales marcadas con Iba-1 (rojo) en contacto con dendritas (amarillo). Obsérvese que en las zonas de contacto vuelven a aparecer mitocondrias y vesículas derivadas de mitocondria (flechas rojas; detalle en **D1**) en el lado neuronal. m: mitocondria. Barras de escala: A-C: 0,5 µm; D, D1: 0,2 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

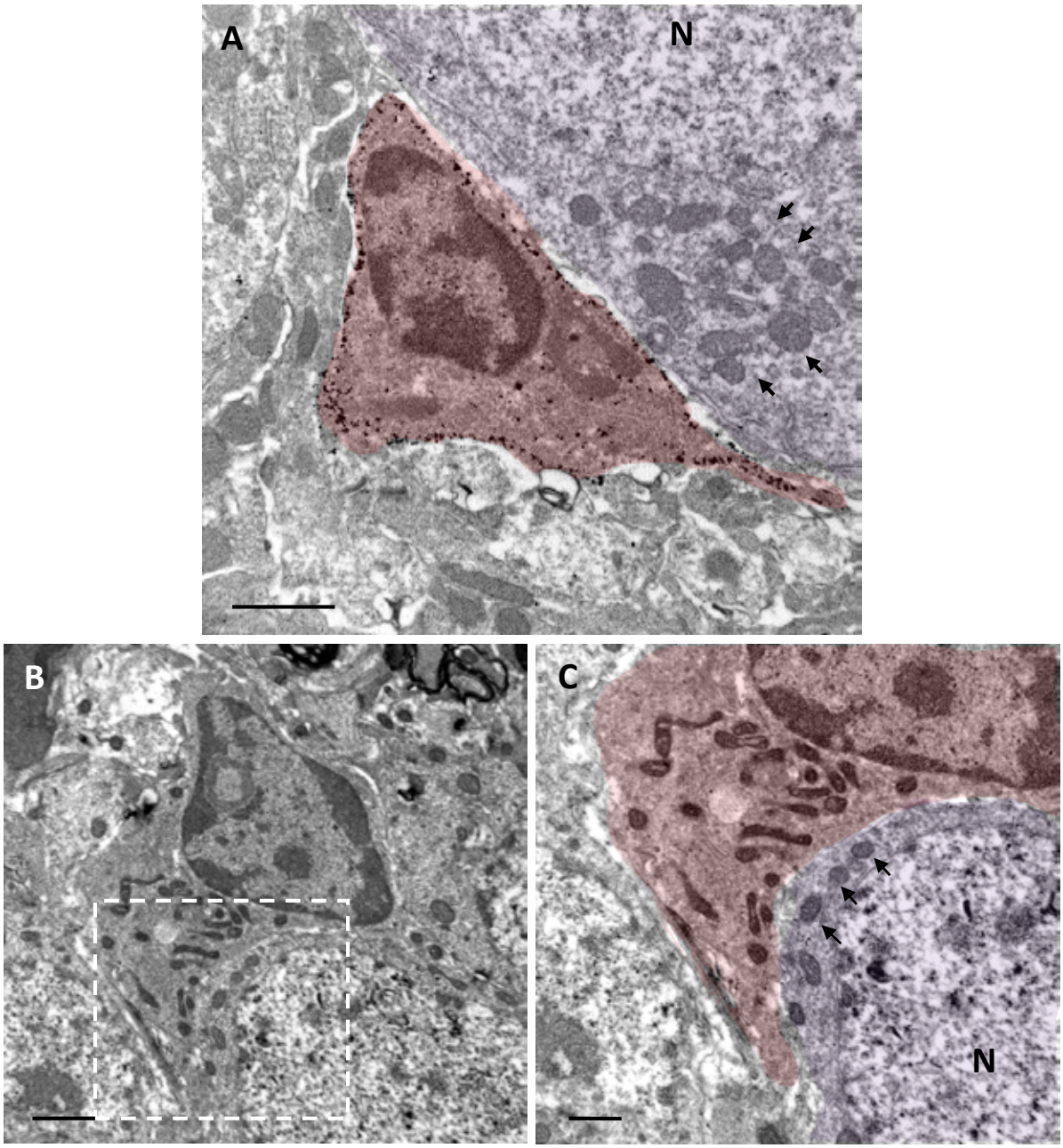


Figura 3.2.28. En las zonas de contacto soma neuronal-microglía hay concentración de mitocondrias. (**A**) Imagen a microscopía electrónica de transmisión de célula microglial (rojo) marcada con inmuno-oro para Iba-1 en contacto con soma de neurona piramidal (morado). Las flechas indican la agrupación de mitocondrias en la proximidad de la zona de contacto entre ambas células. (**B, C**) Célula microglial (rojo) contactando con soma neuronal (morado) de la capa granular del giro dentado. Las flechas indican mitocondrias cercanas a la zona de contacto con la microglía. Imágenes tomadas en el modelo P301S. Barras de escala: A, B: 1 µm; C: 0,5 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.2.4. LA ASTROGLÍA REACCIONA ANTE LA PRESENCIA DE FOSFO-TAU DE FORMA DIFERENTE EN LOS MODELOS THYTAU22 Y P301S

Las células astrogliales adquieren un fenotipo reactivo en el cerebro de pacientes de Alzheimer y en los modelos amiloidogénicos, y se localizan alrededor de las placas de Aβ, aunque su papel en esta patología aún no es conocido. Recientemente, nuestro grupo ha demostrado la capacidad de los astrocitos reactivos de fagocitar neuritas distróficas situadas en el entorno de las placas amiloides (Gomez-Arboledas et al., 2018). No obstante, la relación de estas células gliales con la patología tau es muy desconocida tanto en pacientes como en modelos animales.

Para analizar la respuesta astroglial en el hipocampo de los modelos transgénicos para tau, se realizó un estudio inmunohistoquímico para el marcador astroglial GFAP. Se trata de una proteína perteneciente a la familia de los filamentos intermedios que se expresa específicamente en las células astrogliales, y su cantidad aumenta cuando estas células adquieren un fenotipo reactivo. La inmunotinción se realizó en secciones de hipocampo (**Fig. 3.2.29**) de animales ThyTau22 y WT de 2, 6, 9, 12 y 18 meses (ThyTau22 de 6 meses no mostrado, WT solo a 9 meses) y P301S a 2, 6, 9 y 12 meses (6 meses no mostrado). El inmunomarcaje para GFAP mostró que los astrocitos se distribuían homogéneamente por todo el hipocampo, a excepción de las capas de células principales de CA1-CA3 y giro dentado. Los animales WT (**Fig. 3.2.29 C**) presentaron un ligero aumento de inmunorreactividad para GFAP en el hipocampo con la edad. En el caso del modelo ThyTau22 se detectó un ligero aumento de expresión de GFAP a medida que progresa la patología tau (**Fig. 3.2.29 A**), llegando a ser máximo a la edad de 18 meses (**Fig. 3.2.29 A4**). Por el contrario, en el modelo P301S (**Fig. 3.2.29 B**), el inmunomarcaje para GFAP aumentó considerablemente con el avance de la edad y patología tau, sobre todo a partir de los 9 meses (**Fig. 3.2.29 B2**), siendo mucho mayor al que presentaba el modelo ThyTau22.

En las **Figuras 3.2.30** y **3.2.31**, se muestran imágenes de CA1 y giro dentado para un análisis en mayor detalle de la inmunorreactividad para GFAP en ambos modelos transgénicos de tau. El modelo P301S mostró mayor astrogliosis con el avance de la patología tau en comparación con el modelo ThyTau22 en ambas regiones hipocampales.

Los cambios morfológicos de los astrocitos en los modelos de tau se ilustran en la Figura **Fig. 3.2.32**. A los 2 meses de edad, los astrocitos de ambos modelos transgénicos se caracterizaban por tener una morfología no activada tanto en CA1 como en giro dentado. A partir de los 9 meses, los astrocitos de ThyTau22 (**Fig. 3.2.32 A y B**) comenzaban a engrosar ligeramente sus prolongaciones y el cuerpo celular, pero no de forma muy diferente a la que se apreciaba en los animales WT (**Fig. 3.2.32 E**). En cambio, los astrocitos de los P301S (**Fig. 3.2.32 C y D**) presentaban prolongaciones y cuerpos celulares más engrosados en comparación con los

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

ThyTau22 de la misma edad, sobre todo en el giro dentado (**Fig. 3.2.32 D2**). A los 12 meses, en los P301S el fenotipo morfológico reactivo de estas células fue muy marcado tanto en CA1 como giro dentado (**Fig. 3.2.32 C3 y D3**).

Seguidamente, se cuantificó el área GFAP-positiva (carga astroglial) en el hipocampo mediante análisis de imagen en ambas regiones (CA1 y giro dentado) con el avance de la edad y progresión de la patología tau. La cuantificación en el hipocampo de los ThyTau22 demostró que el área inmunomarcada se incrementaba significativamente con la edad (**Fig. 3.2.33 A**; $F(9, 28) = 6{,}552$; $P < 0{,}0001$). Tanto en CA1 como en giro, se detectó una ligera tendencia a aumentar la carga astroglial desde los 9 meses de edad, aunque este aumento no resultó ser significativo hasta alcanzar los 18 meses. A esta avanzada edad, la carga astroglial de CA1 fue significativamente mayor con respecto a edades jóvenes (2 meses; 1,89 ± 0,61 veces; $p<0{,}05$). En el caso del giro dentado, la carga astroglial fue significativamente más alta que en el resto de las edades analizadas (2 meses; 1,78 ± 0,28 veces; 6 meses, 1,73 ± 0,33 veces; 9 meses, 1,85 ± 0,3 veces y a 12 meses, 1,31 ± 0,21 veces; $p < 0{,}05$).

La cuantificación de la carga astroglial en el hipocampo de los P301S (**Fig. 3.2.33 B**; $F(7, 26) = 17{,}2$; $P < 0{,}0001$) demostró que esta aumentaba significativamente con la edad tanto en CA1 como giro dentado. Este aumento empezaba a ser significativo desde los 9 meses (2,69 ± 0,42 veces respecto a 2 meses; 2,25 ± 0,35 veces respecto a 6 meses; $p<0{,}05$). A los 12 meses, la carga astroglial presentaba un aumento muy significativo con respecto a los 2 meses (4,42 ± 1,63 veces; $p<0{,}0001$) y mayor incluso que a los 9 meses (1,64 ± 0,6 veces; $p<0{,}01$). También en CA1, el área GFAP-positiva fue mucho mayor que en el resto de edades estudiadas (2 meses, 3,29 ± 0,59 veces; $p<0{,}0001$; 6 meses, 3,06 ± 0,55 veces; $p<0{,}0001$; 9 meses, 2,03 ± 0,36 veces; $p<0{,}01$). No se obtuvieron diferencias significativas entre CA1 y giro dentado a ninguna de las edades.

Por último, se comparó la evolución de la carga astroglial entre los animales ThyTau22 y P301S a 2, 9 y 12 meses en CA1 y giro dentado (**Fig. 3.2.34**). Se utilizaron animales WT como referencia. Los resultados mostraron que tanto para CA1 (**Fig. 3.2.34 A**; $F(8, 24) = 13{,}88$; $P < 0{,}0001$) como para el giro dentado (**Fig. 3.2.34 B**; $F(8, 24) = 10{,}34$; $P < 0{,}0001$) el modelo P301S presentaba una mayor área GFAP-positiva con la edad que los ThyTau22 y WT. En el caso de CA1, las diferencias fueron significativas a la edad de 12 meses (2,58 ± 0,46 veces con respecto a WT; $p<0{,}0001$; y 1,57 ± 0,82 veces mayor con respecto a ThyTau22; $p<0{,}01$). Los ThyTau22 de 12 meses presentaban una carga astroglial ligeramente superior a los WT de misma edad, pero no significativa ($p > 0{,}05$). En el giro dentado desde los 9 meses, aunque no significativamente, se observó un incremento en la carga astroglial en los P301S mayor que en los otros dos grupos. De nuevo a los 12 meses, ésta fue muy superior a la de los ThyTau22 y WT (1,97 ± 2,27 veces

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

con respecto a WT; y 1,23 ± 0,82 veces mayor con respecto a ThyTau22; p<0,001). Esta mayor astrogliosis en el modelo P301S respecto a ThyTau22 se ha confirmado también mediante estudios de qPCR (**Fig. 3.2.35**). Los niveles de expresión de GFAP fueron significativamente mayores a los 9-12 meses en el modelo P301S no sólo respecto a ThyTau22 sino también respecto al modelo amiloidogénico APP de la misma edad.

Para comprobar si la reactividad astroglial estaba asociada a la progresión de la patología tau, se realizó un estudio de correlación de la carga astroglial y la carga de fosfo-tau en ambos modelos transgénicos. Los resultados revelaron una correlación positiva de la reactividad astroglial con la progresión de la patología tau en el hipocampo de ambos modelos, siendo más destacada esta correlación en el caso de la región CA1 del modelo P301S (**Fig. 3.2.36**).

En resumen, existe una marcada diferencia en la reactividad astroglial entre ambos modelos transgénicos de tau, al igual que se describió anteriormente para la respuesta microglial. La distinta respuesta microglial y astroglial que exhiben estos modelos transgénicos probablemente reflejan diferencias en las especies tóxicas agregadas de tau que se generan y acumulan intra- y/o extracelularmente.

3.2.5. EXISTE CORRELACIÓN ENTRE LA REACTIVIDAD MICROGLIAL Y ASTROGLIAL EN EL HIPOCAMPO DE LOS MODELOS THYTAU22 Y P301S

Recientes estudios transcriptómicos han revelado que en un contexto neuroinflamatorio agudo los astrocitos reactivos pueden polarizarse hacia fenotipos denominados A1 y A2 (revisado en Liddelow and Barres, 2017). Los astrocitos ‘’A1’’ (inducidos por choque séptico mediante LPS) activan un programa génico asociado con actividad neurotóxica; mientras que los astrocitos ‘’A2’’ (inducidos por isquemia) son considerados neuroprotectores. Parece ser que la adquisición del fenotipo A1 depende, en cierta medida, de la interacción con células microgliales activadas (Shi et al., 2017). Aunque en el contexto de enfermedades crónicas como las neurodegenerativas esta división en astrocitos reactivos A1 o A2 no se ha demostrado que exista, es interesante la posible interacción entre ambos tipos celulares. Con relación a esto en este trabajo se ha ilustrado de forma conjunta la respuesta astroglial y microglial con la progresión de la patología tau mediante inmunofluorescencia triple para fosfo-tau (AT8), microglía (Iba-1) y astroglía (GFAP) en los modelos ThyTau22 (**Fig. 3.2.37**) y P301S (**Fig. 3.2.38**).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

En un primer momento, para comprobar si la reactividad astroglial estaba asociada a un aumento de la microglial, se realizó un estudio comparativo y de correlación de los niveles de expresión en el hipocampo de algunos genes microgliales relacionados con el perfil microglial general (*iba-1*) y de activación (*cd45, trem2*) frente al gen astroglial, *gfap*, en ambos modelos de taupatía. Las gráficas comparativas en las **figuras 3.2.39 A, C y E** y **figura 3.2.40 A, C y E**, muestran que, en todos los casos, los niveles de expresión de *gfap* tienden a ser mayores a edades avanzadas (9-12 meses) que los microgliales. En el caso de del modelo ThyTau22, no existía correlación entre niveles de expresión de los genes *iba-1 y gfap* (r = 0,04; P = 0,9). Se observó correlación entre los genes *trem2* y *gfap*, aunque no llegó a ser significativa (P = 0,06). Como se describió anteriormente, la respuesta microglial y astroglial en el hipocampo de los animales P301S es muy superior a la observada en los ThyTau22. En este caso, para los animales P301S, no se observó correlación entre los genes *iba-1* y *gfap* (**Fig. 3.2.39 B**). No obstante, correlacionaron fuertemente los niveles de expresión de *gfap* tanto con los del gen *cd45* (**Fig. 3.2.39 D**) como con los de *trem2* (**Fig. 3.2.39 F**).

Seguidamente, se realizó un estudio comparativo y de correlación de la carga microglial y astroglial en el hipocampo de los modelos de taupatía (**Fig. 3.2.40** y **Fig. 3.2.41**). En el caso de ThyTau22, la gráfica de la **Figura 3.2.40 A** muestra cómo la carga microglial se incrementó a partir de los 6 meses, mientras que la astroglial comenzó a hacerlo a edades más tardías (a los 9 meses). Los estudios de correlación mostraron que en el modelo ThyTau22 existía correlación positiva entre la carga astroglial y la microglial (**Fig. 3.2.40 B**) en la región de CA1 entre las edades de 2 a 12 meses, mientras que esta correlación desaparecía al incluir las edades de 18 meses. Recordemos que a tal edad existía un descenso de la carga microglial, debido posiblemente a un proceso degenerativo, algo que no pasaba con la astroglía. En el giro dentado existía correlación positiva entre ambos parámetros, aunque, al igual que para CA1, ésta fuese bastante leve (**Fig. 3.2.40 D**).

Por otro lado, en los animales P301S se observó un aumento de la carga microglial Iba-1-positiva que coincidía en el tiempo con el aumento de la carga astroglial. En este sentido, a los 9 meses de edad el aumento de la carga microglial fue en paralelo con un incremento de la carga astroglial. Existía, además, una correlación positiva mucho mayor entre ambas que la observada en los ThyTau22, tanto para la región de CA1 (**Fig. 3.2.41 B**) como para GD (**Fig. 3.2.41 D**). Para determinar la relación con la activación microglial, realizamos un estudio comparativo de la carga de microglía activada (CD45-positiva) y la reactividad astroglial (GFAP). Las **Figuras 3.2.42 A y C**, muestran que a la edad a la que ocurría la activación microglial (a partir de los 9 meses), también lo hacía la astroglía. Realizado el análisis de correlación entre la carga de microglía activada y la astroglial, los resultados determinaron que existía una fuerte correlación entre ambas en la región de CA1 (**Fig. 3.2.42 B**) y algo menor en el giro dentado (**Fig. 3.2.42 D**).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Estos resultados apuntan a que la reactividad astroglial es dependiente, en cierta medida, de la activación microglial en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S, ya que la primera no se dispara hasta que no lo hace la segunda. Además, la mayor reactividad astrocitaria presente en los P301S tendría su explicación, no sólo en la mayor patología de tau, sino en que la fuerte activación microglial induciría una respuesta astroglial mayor, al contrario de lo que ocurre en los ThyTau22.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

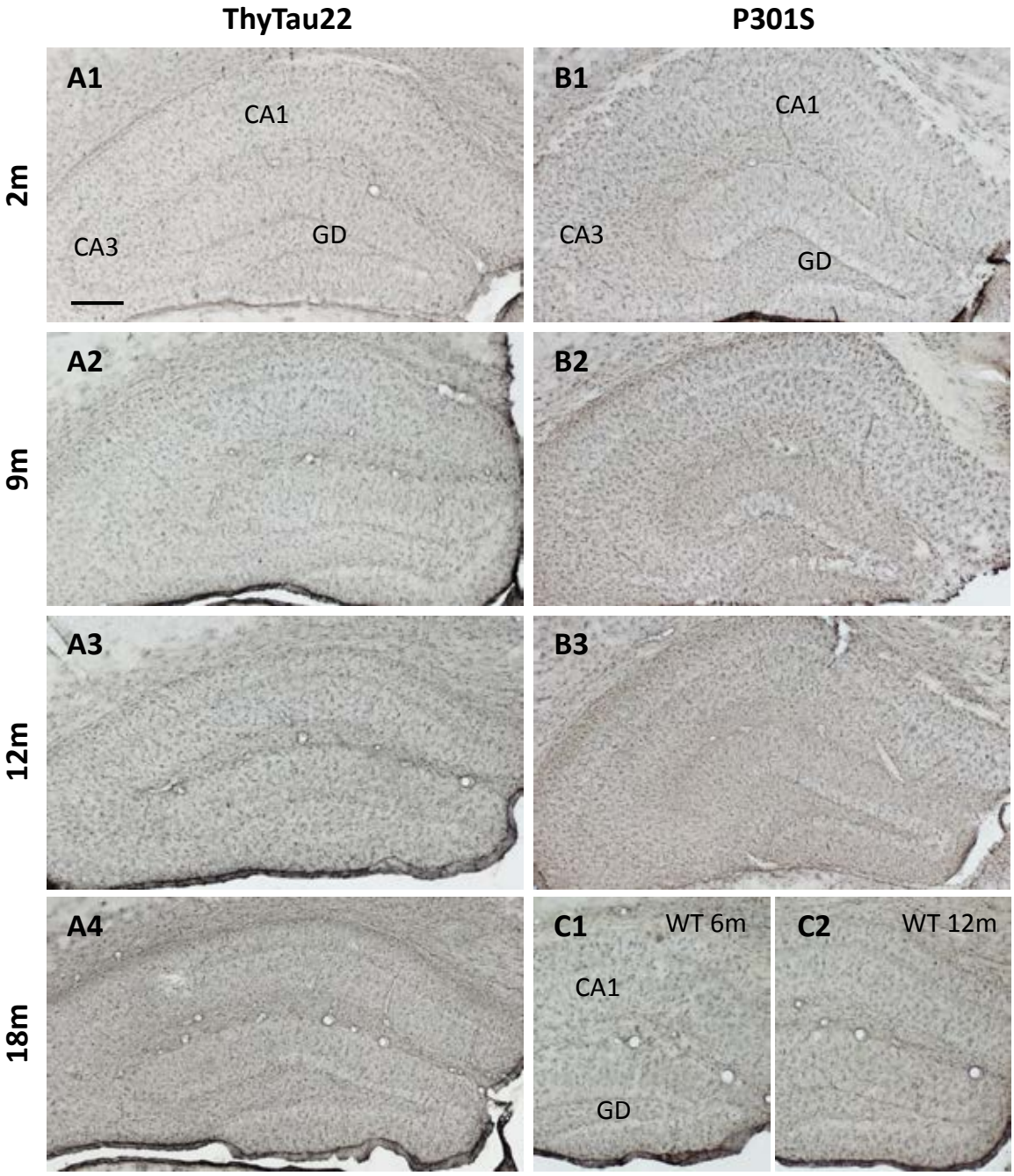


Figura 3.2.29. Patrón temporal de astrogliosis en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S. Inmunohistoquímica para GFAP en animales ThyTau22 (**A**) y P301S (**B**) desde los 2 a los 12/18 meses de edad. Imágenes panorámicas del hipocampo. (**C**) Como control se muestran animales WT de 6 (**C1**) y 12 (**C2**) meses de edad. Se observa que en el hipocampo de ambos modelos transgénicos de tau existe un aumento de la reactividad astroglial con respecto a la edad. *CA1-CA3: regiones del asta de Ammón; GD: giro dentado.* Barra de escala: 200 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

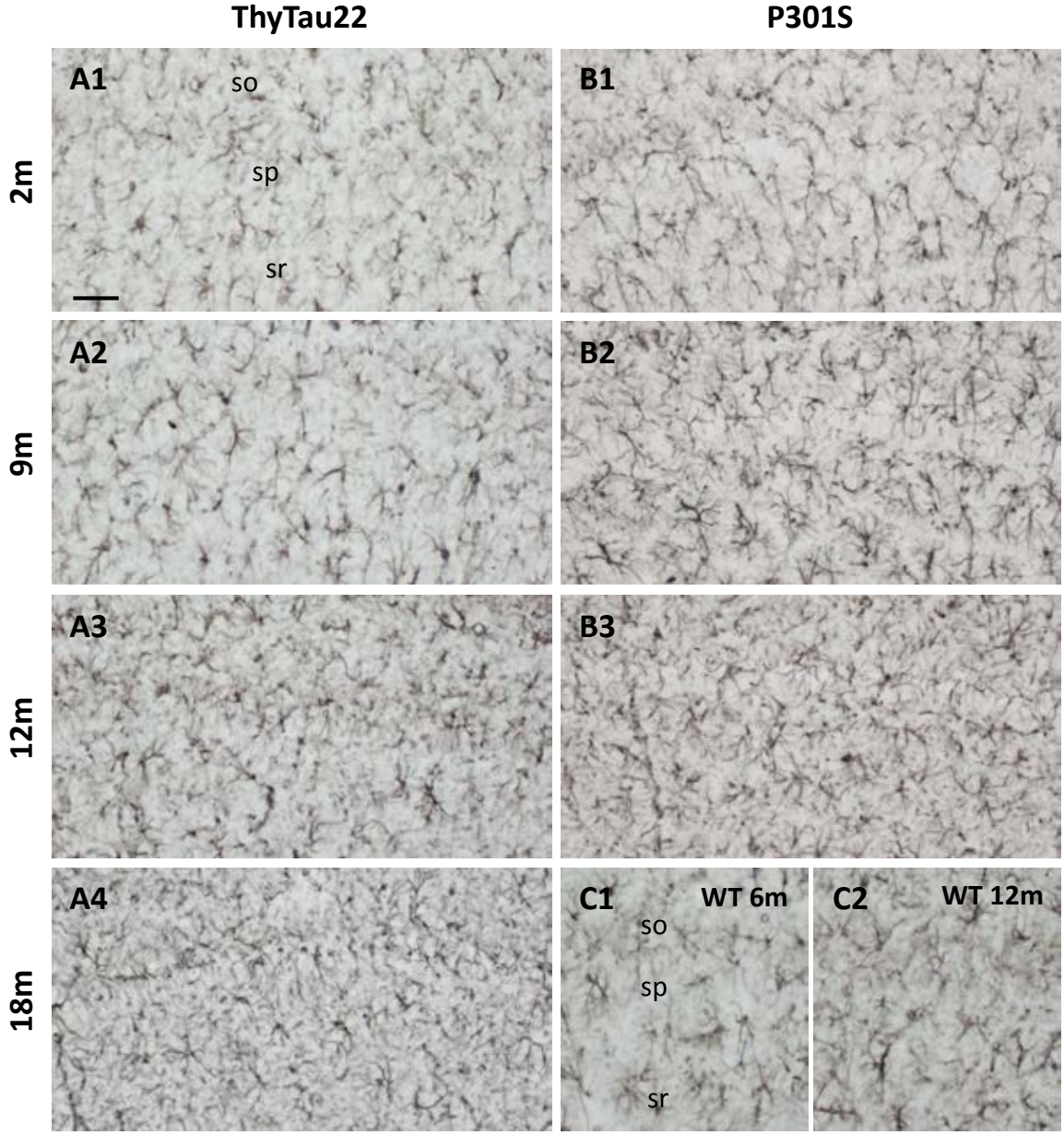


Figura 3.2.30. Aumento de la reactividad astroglial con el avance de la patología tau en la región CA1 del hipocampo de animales ThyTau22 y P301S. La inmunohistoquímica para GFAP revela un aumento de la reactividad astroglial en CA1 con la edad en los animales ThyTau22 (**A**) y P301S (**B**), así como en WT (**C**). Destaca la mayor astrogliosis de los animales transgénicos de avanzada edad (**A3-A4 y B2-B3**) con respecto a los WT de 12 meses (**C2**). *so: estrato oriens; sp: estrato piramidal; sr: estrato radiado.* Barra de escala: 50 µm; insertos: 20 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

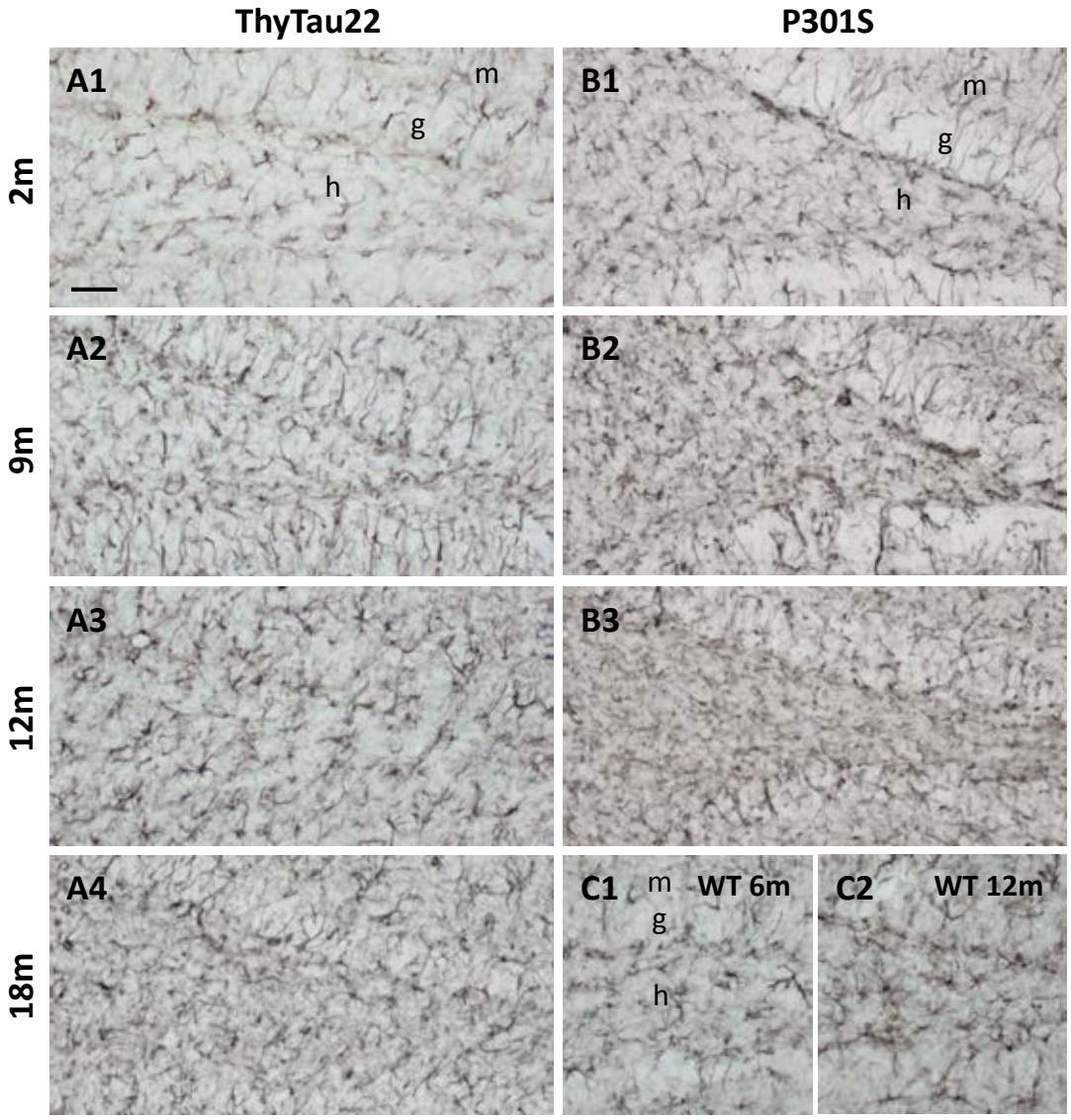


Figura 3.2.31. Aumento de reactividad astroglial con el avance de la patología tau en en el giro dentado de los modelos ThyTau22 y P301S. La inmunohistoquímica para GFAP revela un aumento de la reactividad astroglial en esta región hipocampal con la edad. Destaca la mayor astrogliosis de los animales transgénicos tanto ThyTau22 (**A3, A4**) como P301S (**B2, B3**) con respecto a los WT (**C**). Se observa que es ligeramente superior en el modelo P301S que en los ThyTau22. *m: molecular; g: granular; h: hilio.* Barra de escala: 50 µm; insertos: 20 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

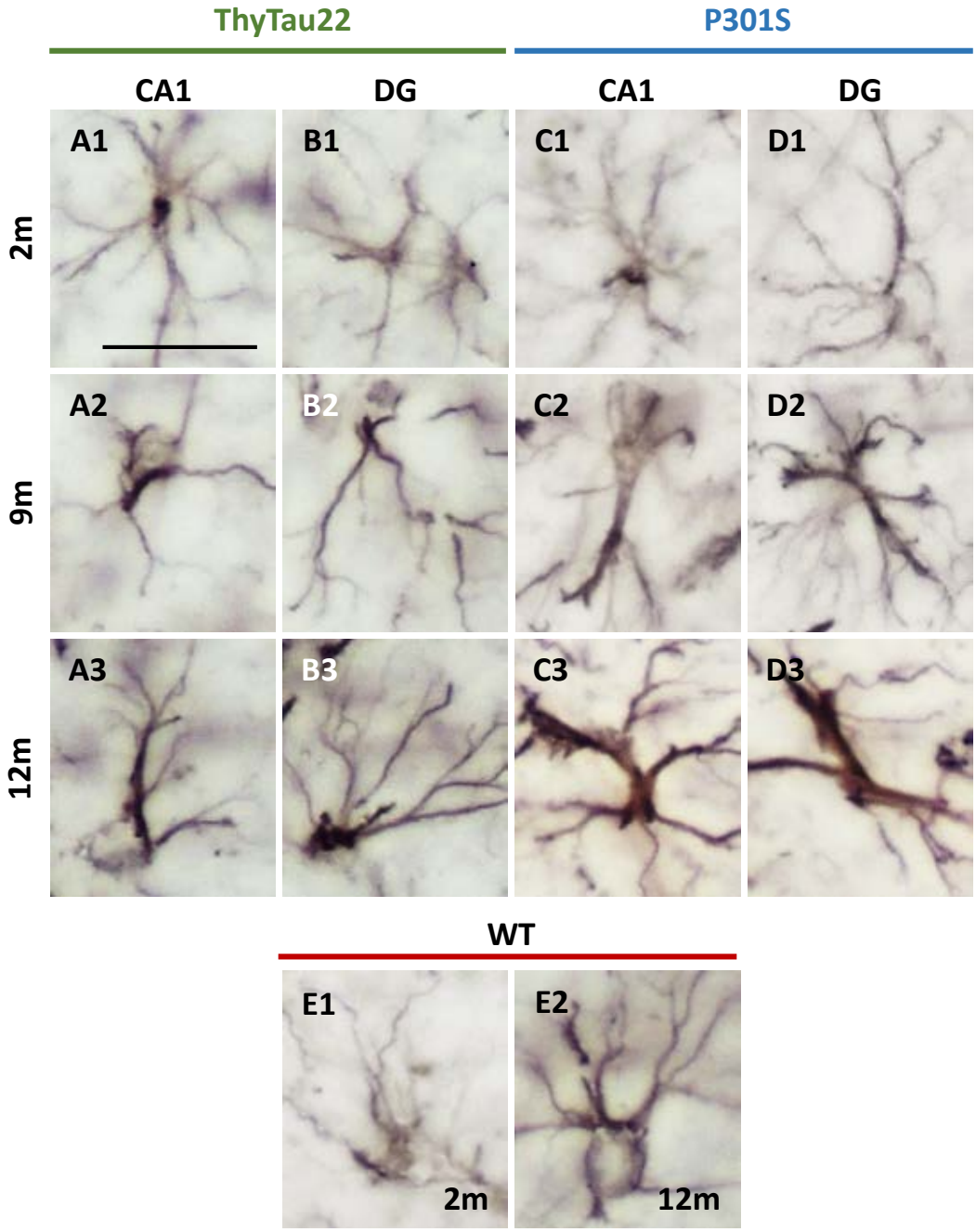


Figura 3.2.32. Reactividad astroglial. Cambios morfológicos de la astroglía con el avance de la patología tau en los modelos ThyTau22 y P301S. Se muestran astrocitos inmunomarcados con anti-GFAP de las regiones de CA1 y giro dentado. (**A, B**) Imágenes representativas de los cambios en la morfología astrocitaria e intensidad de inmunotinción en el hipocampo de los animales ThyTau22 con la progresión de la edad y patología tau. A edades avanzadas la activación astroglial no se diferenciaba en gran medida del aumento de reactividad propio de la edad en los WT (**E**). (**C, D**) Imágenes representativas de los cambios observados en los astrocitos del modelo P301S. En este modelo el fenotipo morfológico de activación resulta más evidente, especialmente a la edad de 12 meses (engrosamiento de prolongaciones y del cuerpo celular). Barra de escala: 20 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

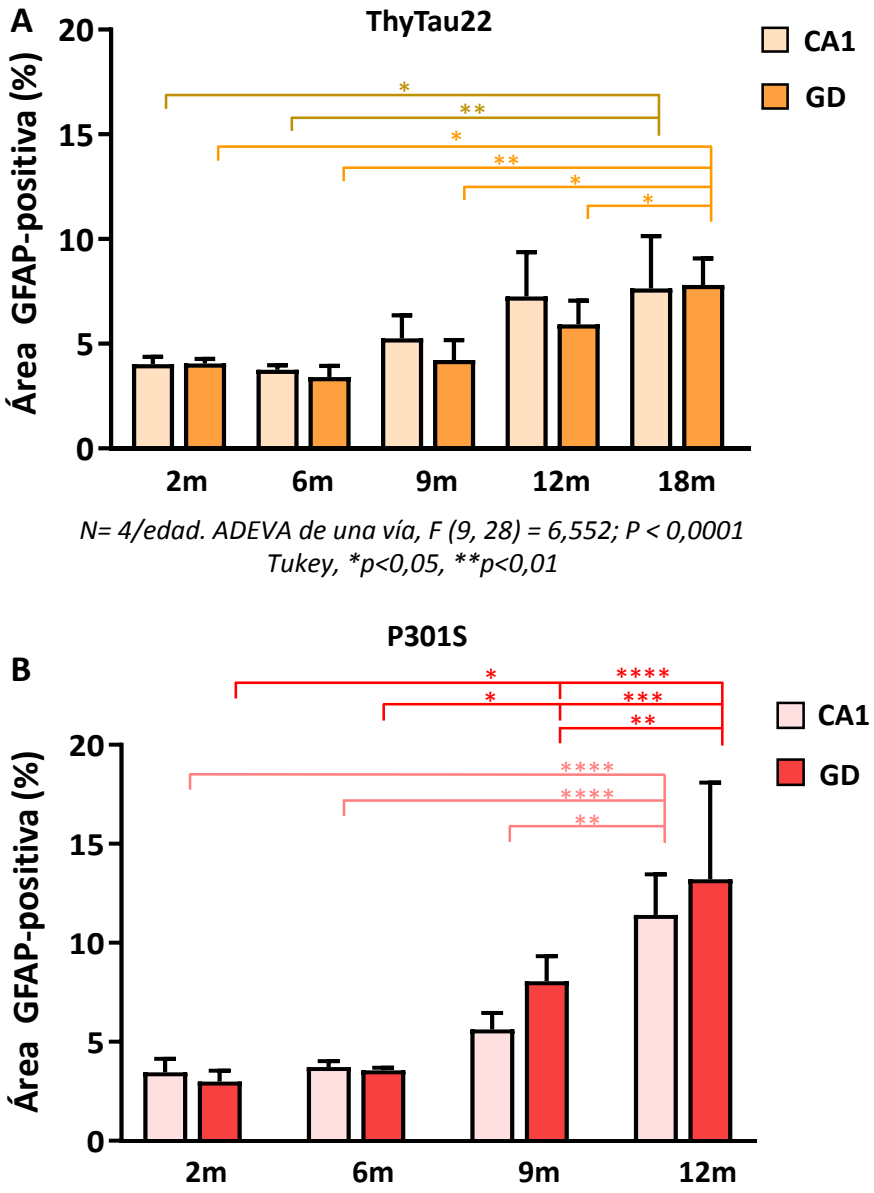
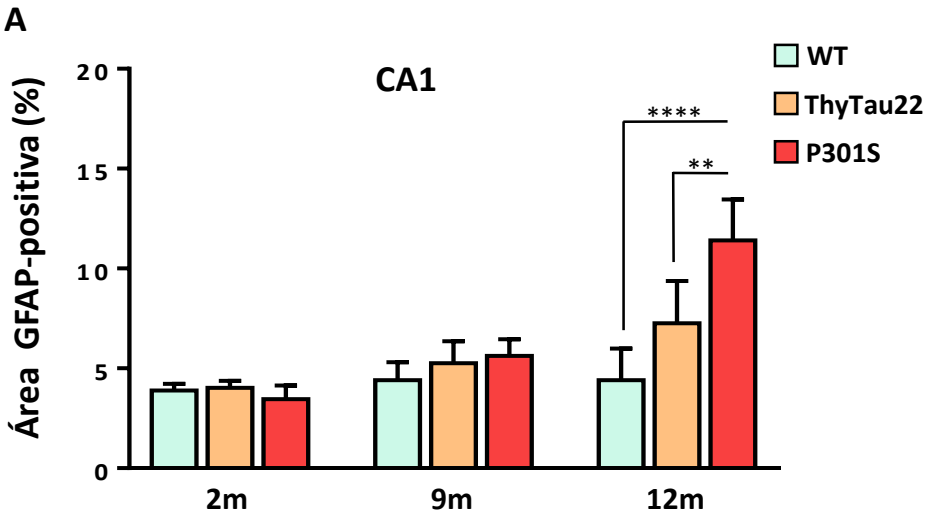
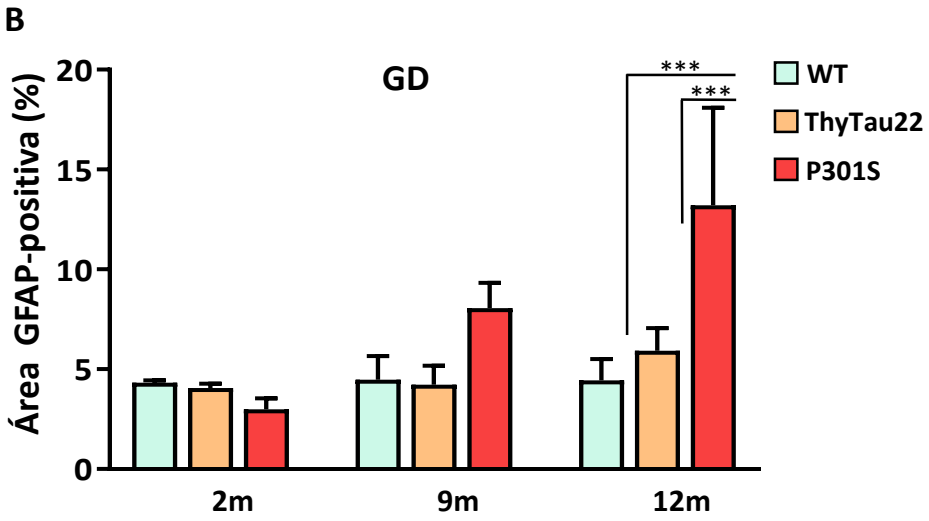


Figura 3.2.33. Estudio cuantitativo del área GFAP-positiva (carga astroglial) en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S con la edad. (A) En el modelo ThyTau22 la región de CA1 presenta un aumento significativo del área immunorreactiva para GFAP, alcanzando un máximo a los 18 meses. No existen diferencias significativas entre CA1 y giro dentado a ninguna edad analizada. **(B)** En el modelo P301S ambas regiones estudiadas, CA1 y giro dentado, presentan un aumento progresivo y significativo del área GFAP-positiva. No existen diferencias notables entre regiones, aunque a partir de 9 meses el giro dentado presenta un ligero aumento del marcaje con respecto a CA1.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



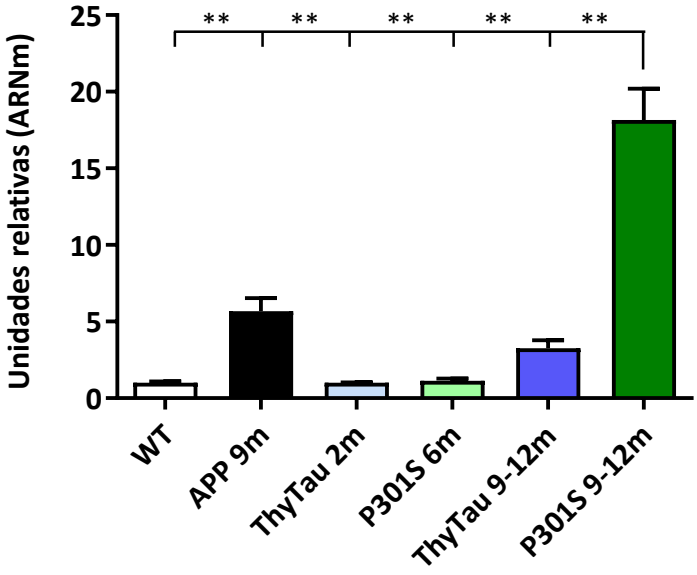
N= 4/edad/genotipo. ADEVA de una vía, F (8, 24) = 13,88; P < 0,0001
*Tukey, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001*



N= 4/edad/genotipo. ADEVA de una vía, F (8, 24) = 10,34; P < 0,0001
*Tukey, ***p<0,001*

Figura 3.2.34. Estudio comparativo del área GFAP-positiva (carga astroglial) en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S a diferentes edades. (A) La comparativa para CA1 muestra que la carga astroglial en el modelo P301S a los 12 meses de edad es muy superior al observado en los animales ThyTau22 y WT. **(B)** Comparativa para el giro dentado en ambos modelos y WT. De nuevo a los 9 meses en el modelo P301S el área GFAP-positiva es mayor en el modelo P301S que en los ThyTau22 y WT, siendo esta diferencia significativa a los 12 meses. Para ambas regiones, el incremento observado anteriormente en el modelo ThyTau22 no difiere significativamente del observado en el grupo WT.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



N = 4/edad/genotipo
Kruskal-Wallis = 22,88; P = 0,0004
*Test de Dunn ** p < 0,01*

Figura 3.2.35. Estudio comparativo de la expresión de GFAP en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S. Niveles de expresión de GFAP (RT-qPCR) en la astroglía en el modelo Thytau22 y P301S en una fase temprana (2-6 meses edad) y avanzada (9-12 meses edad) de la patología tau. Los niveles de expresión en los animales P301S a edades avanzadas son muy superiores a los de otros modelos y edades, incluido modelo amiloigdogénico (APP). Los niveles de expresión, normalizados usando GAPDH, se referenciaron a ratones WT (9 meses). Los ratones APP (9 meses) también se incluyeron como control positivo. *Datos obtenidos en colaboración con el grupo del Dr. Vitorica.*

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

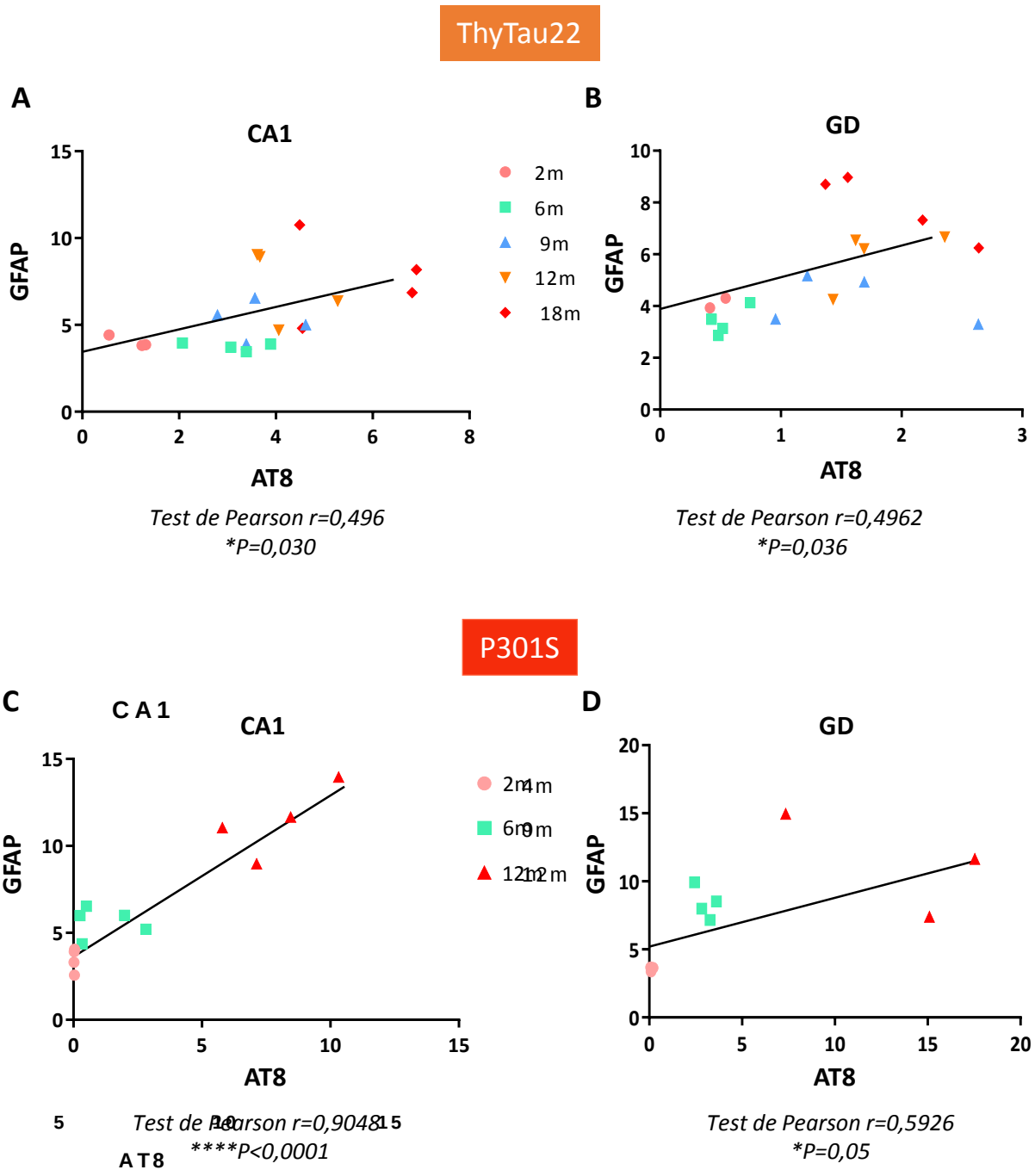


Figura 3.2.36. Estudio de la correlación entre la patología tau y la carga astroglial en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S. (**A, B**) En el hipocampo del modelo ThyTau22 existe una correlación positiva entre la carga de tau hiperfosforilada (área AT8-positiva) y la reacción astroglial (área GFAP-positiva). (**C, D**) En el modelo P301S, destaca una fuerte correlación entre la patología tau y la carga astroglial en la región CA1 (**C**), que fue más suave en el giro dentado (**D**).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

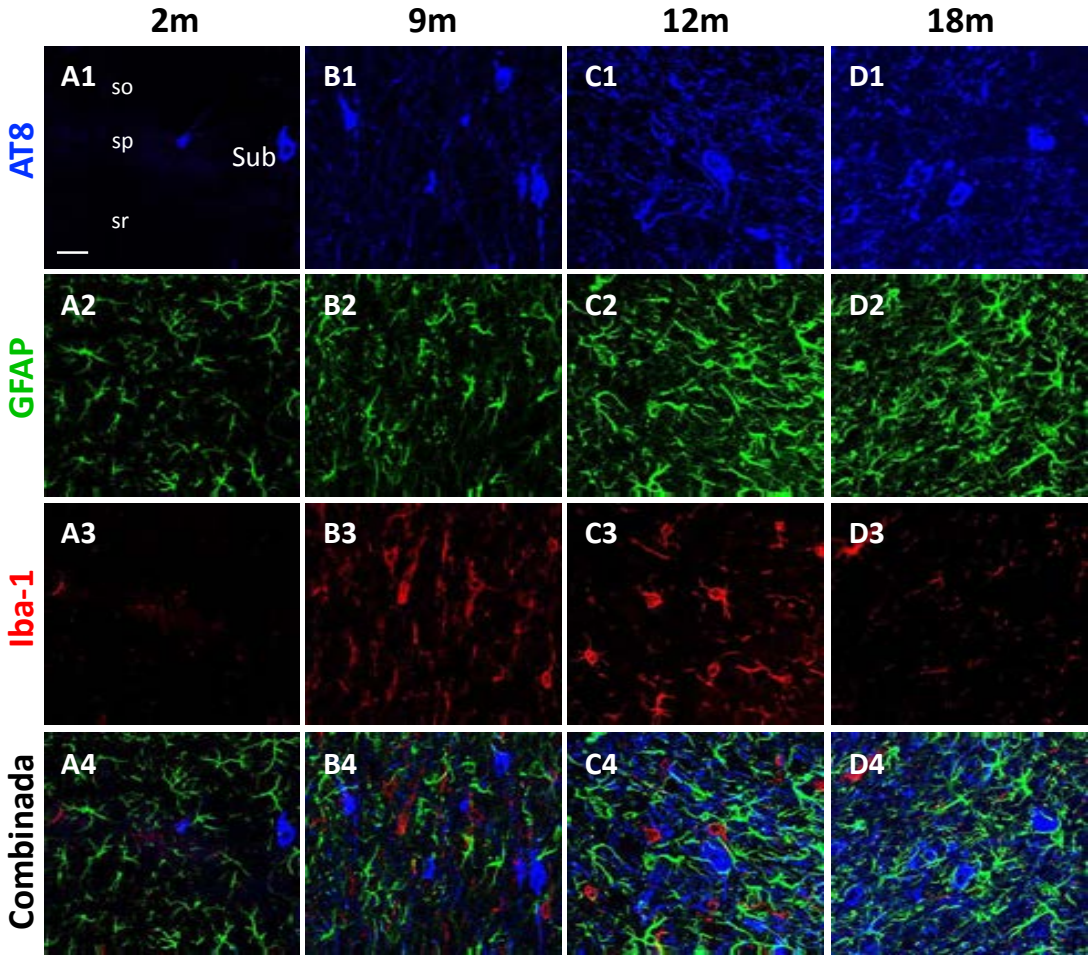


Figura 3.2.37. La progresión de la patología tau va acompañada de una limitada activación glial en el hipocampo del modelo ThyTau22. Inmunofluorescencia triple a microscopía láser confocal para Iba1 (microglía; rojo), GFAP (astroglía; verde) y fosfo-tau (AT8, azul) en el modelo ThyTau22 a 2 (**A**), 9 (**B**), 12 (**C**) y 18 (**D**) meses de edad. La serie de imágenes (proyecciones máximas) muestra la acumulación de fosfo-tau y activación glial en la región de transición CA1-subículo en el modelo ThyTau22. A los 18 meses la presencia de microglía activada (**D3**) decae comparada con edades anteriores (**A3, B3, C3**) mientras que la activación astroglial aumenta (**B2**) y se mantiene a edades avanzadas (**C2, D2**). *so: estrato oriens; sp: estrato piramidal; sr: estrato radiado; Sub: subículo.* Barras de escala: 20,5 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

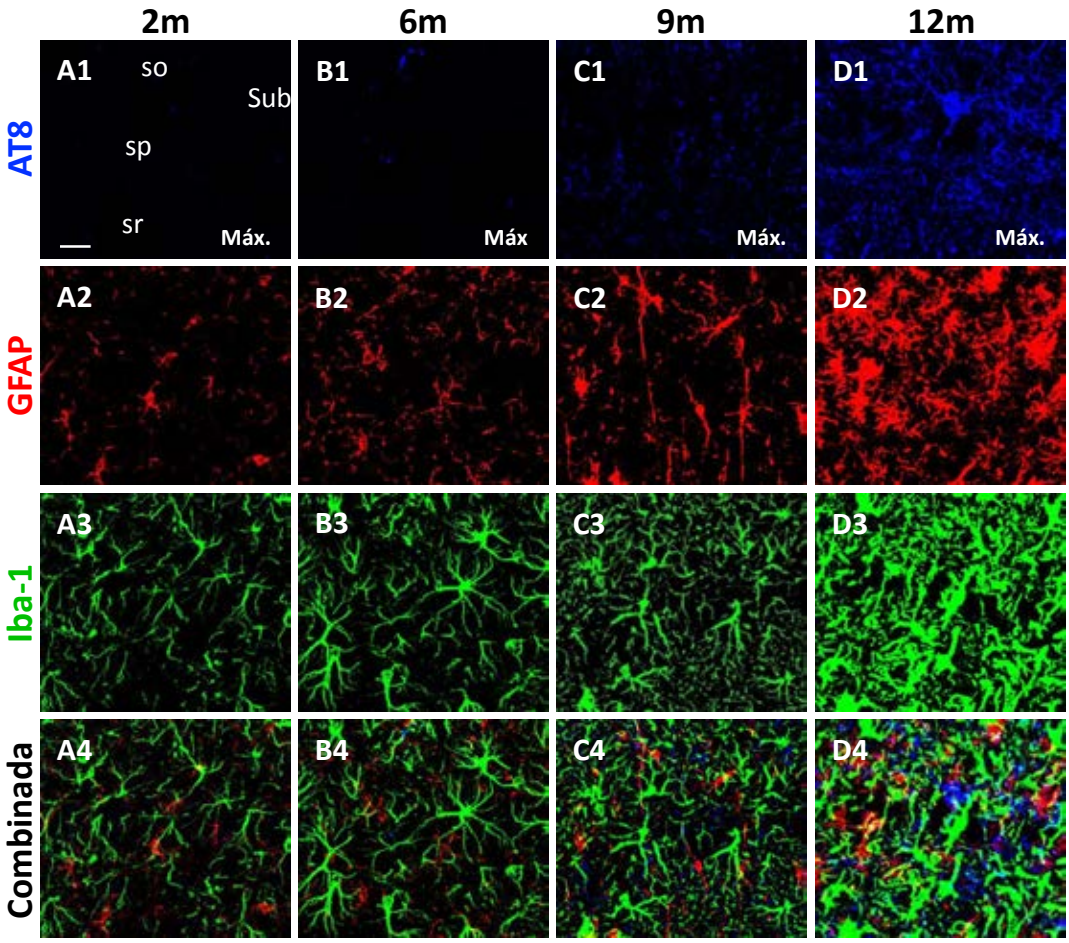


Figura 3.2.38. La progresión de la patología tau induce una fuerte reactividad astroglial y microglial en el hipocampo del modelo P301S. Inmunofluorescencia triple a microscopía láser confocal para Iba-1 (microglía, rojo), GFAP (astroglía, verde) y fosfo-tau (AT8, azul) en el modelo P301S a 2 (**A**), 6 (**B**), 9 (**C**) y 12 (**D**) meses de edad. La serie de imágenes muestra la acumulación de fosfo-tau y activación glial en la región de transición CA1-subículo con el avance de la edad y patología tau. El marcaje de microglía y astroglía aumenta a los 9 meses (**C**) y es máximo a edades avanzadas (12 meses, **D**). *so: estrato oriens; sp: estrato piramidal; sr: estrato radiado; Sub: subículo.* Barras de escala: 20,5 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

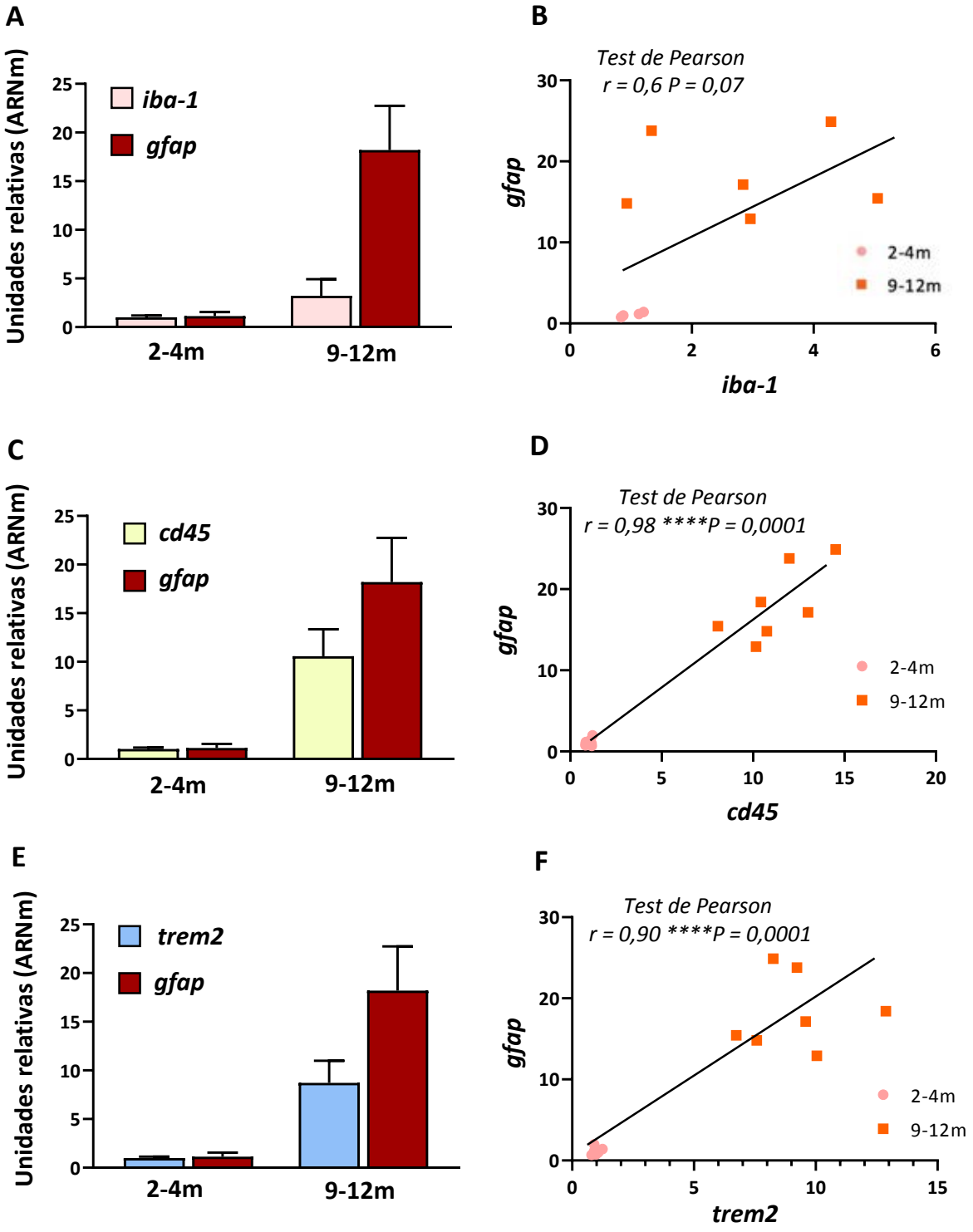


Figura 3.2.39. Existe una fuerte relación entre la activación microglial y la reactividad astroglial en el hipocampo del modelo P301S. (**A, C, E**) Estudio comparativo de los niveles de expresión (RT-qPCR) de genes microgliales generales (*iba-1*) y de activación (*cd45 y trem2*) con el gen astroglial *gfap* en el hipocampo del modelo P301S en fases tempranas (2-4 meses) y avanzadas (9-12 meses) de la patología tau. (**B, D, F**) Los estudios de correlación demuestran una relación significativa entre la activación microglial (*cd45* y *trem2)* y la reactividad astroglial (*gfap)*.

UNIVERSIDAD DE MALAGA

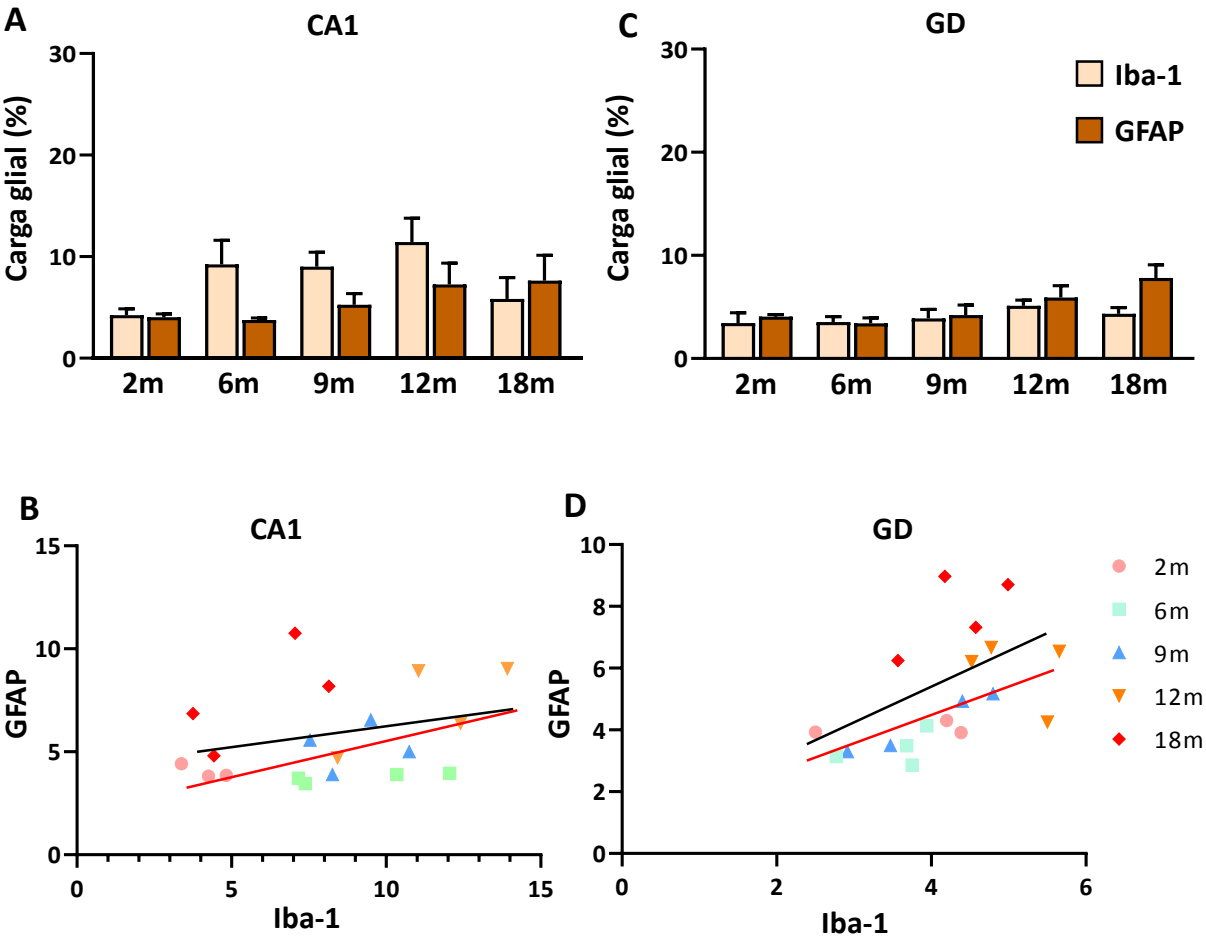


Figura 3.2.40. Estudio comparativo de la carga microglial (área Iba-1-positiva) y astroglial (área GFAP-positiva) en el hipocampo del modelo ThyTau22. La comparativa para CA1 (**A**) y giro dentado (GD) (**C**) muestra que la carga microglial Iba-1-positiva aumenta a partir de los 6 meses hasta los 12 meses, para descender a los 18 meses, mientras que la carga astroglial GFAP-positiva aumenta ligeramente a partir de los 9 meses y se mantiene hasta los 18 meses. En el GD apenas se observan cambios con la edad. (**B, D**) En el hipocampo del modelo ThyTau22 existe una correlación positiva a lo largo del envejecimiento entre la carga microglial y la reactividad astroglial tanto en CA1 (**B**, hasta los 12 meses) como en el GD (**D**).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

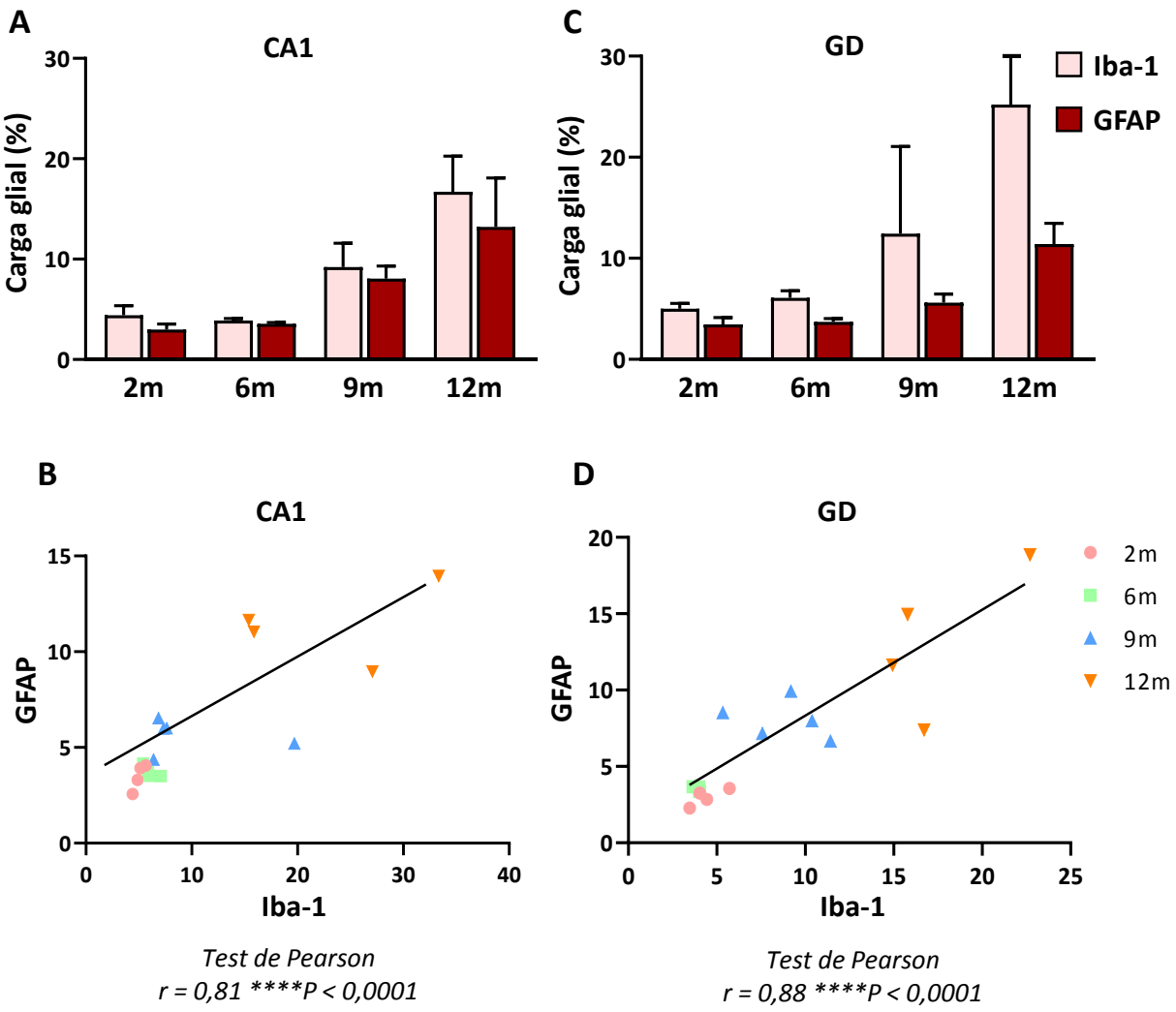


Figura 3.2.41. Estudio comparativo de la carga microglial (área Iba-1-positiva) y astroglial (área GFAP-positiva) en el hipocampo del modelo P301S. La comparativa para CA1 (**A**) y giro dentado (GD) (**C**) muestra que la carga microglial y astroglial aumentan de forma paralela a partir de los 9 meses hasta los 12 meses. En el GD la carga microglial tiende a aumentar a partir de los 9 meses; la astroglial es notable a los 12 meses. (**B, D**) Existe una fuerte correlación positiva entre la carga microglial (área Iba-1-positiva) y la astroglial (área GFAP-positiva) en ambas regiones del hipocampo del modelo P301S.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

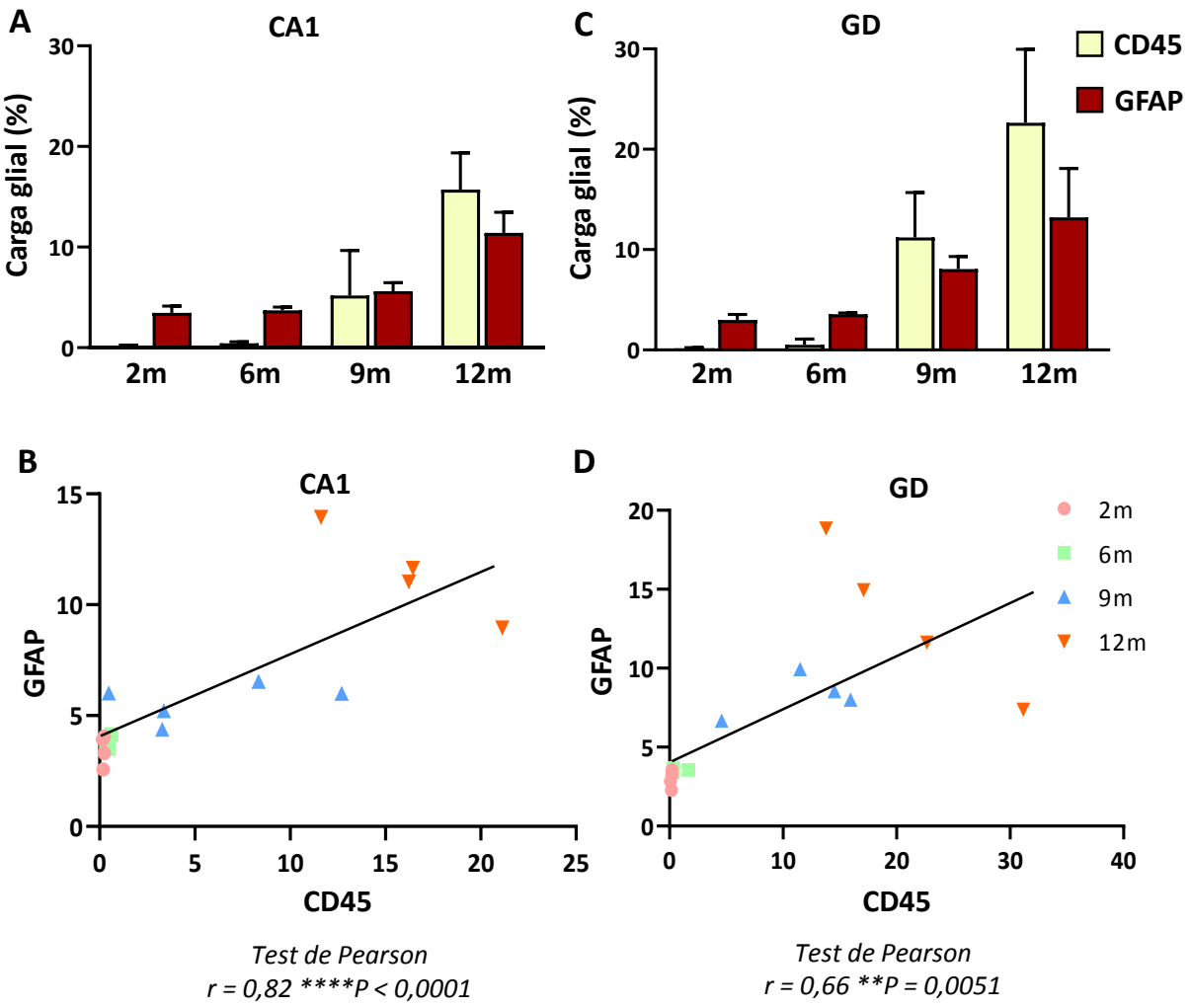


Figura 3.2.42. Estudio comparativo de la carga microglial activada (área CD45-positiva) y astroglial (área GFAP-positiva) en el hipocampo del modelo P301S. Tanto en CA1 (**A**) como en el giro dentado (GD) (**C**) muestra que la carga de microglía activada y la carga astroglial aumentan casi de forma paralela a partir de los 9 meses hasta los 12 meses. En el GD la carga microglial activada tiende a aumentar a partir de los 9 meses; la carga astroglial es notable a los 12 meses. (**B, D**) Existe una fuerte correlación positiva en el hipocampo del modelo P301S a lo largo del envejecimiento entre la carga microglial activada (área CD45-positiva) y carga astroglial (área GFAP-positiva) en CA1 (**B**). Esta correlación es más suave en el GD (**D**).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.2.6. LOS ASTROCITOS INTERACTÚAN ESTRECHAMENTE CON NEURONAS FOSFO-TAU POSITIVAS Y PRESENTAN TAU HIPERFOSFORILADO EN SU INTERIOR EN LOS MODELOS DE TAUPATÍA

Poco se sabe sobre la relación existente entre las neuronas que presentan tau patológico en su interior y las células astrogliales cercanas. Por ello, se estudió a nivel celular y subcelular la interacción entre los astrocitos hipocampales con los agregados de fosfo-tau presentes en las neuronas y sus prolongaciones en los modelos de taupatía ThyTau22 y P301S.

En primer lugar, se estudió esta relación mediante inmunofluorescencia doble para los marcadores de fosfo-tau (AT8) y astroglía (GFAP). En el hipocampo de los modelos de taupatía las neuronas con fosfo-tau en su interior establecían estrecho contacto y estaban rodeadas por varias prolongaciones astrocitarias (**Fig. 3.2.43**). Los astrocitos a MET se identifican como células con un citoplasma poco electrodenso y la presencia de filamentos intermedios en su interior y un núcleo bastante eucromático. El estudio ultraestructural reveló que numerosos astrocitos contactaban con sus prolongaciones las dendritas apicales del estrato radiado con marcaje para AT8 en su interior (**Fig. 3.2.44**). De forma habitual, a edades avanzadas, se observó que los astrocitos del estrato radiado se encontraban emitiendo prolongaciones perpendiculares a las dendritas apicales contactando con muchas de ellas. Es de destacar, que mediante inmuno-oro para AT8, se determinó que en aquellos casos en que la dendrita presentaba marcaje para fosfo-tau en su interior, la prolongación astrocitaria en contacto con ella presentaba en su citoplasma gran cantidad de material membranoso (**Fig. 3.2.44 B y D**). En muchas ocasiones, no se conseguía distinguir la separación entre astrocito y dendrita (**Fig. 3.2.44 B**). Estos acúmulos membranales en el astrocito no se observaron en astrocitos de animales WT ni siquiera a edades avanzadas (**Fig. 3.2.45**).

El marcaje mediante inmunofluorescencia doble para AT8 y GFAP evidenció la presencia de pequeños agregados de fosfo-tau en el interior de las prolongaciones de los astrocitos, en especial aquellas asociadas a los vasos sanguíneos (**Fig. 3.2.46**). En el modelo P301S fue frecuente identificar en el interior de las células astrogliales numerosos puntos AT8-positivos (**Fig. 3.2.47**). El estudio ultraestructural en mayor detalle de la inmuno-oro para AT8 en el hipocampo de los modelos de tau confirmó la presencia de fosfo-tau en el interior de las células astrogliales, tanto en los astrocitos de los ThyTau22 (**Fig. 3.2.48**) como de P301S (**Fig. 3.2.50**). El marcaje se presentaba como grupos de partículas de oro coloidal que aparecían de forma libre en el citoplasma astroglial, sin estar localizados en estructuras subcelulares definidas, aunque

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

era frecuente verlos adosados a la membrana plasmática o a estructuras proteicas como los filamentos de GFAP (asteriscos en **Fig. 3.2.48 B y D**).

La relación entre prolongaciones astrogliales conteniendo fosfo-tau y los vasos sanguíneos quedó confirmada a nivel ultraestructural. Tanto en el modelo ThyTau22 (**Fig. 3.2.48 y 49**) como en el P301S (**Fig. 3.2.50 y 51**), la cantidad de inmunomarcaje para fosfo-tau en estas prolongaciones perivasculares astrogliales fue particularmente alta, y tal vez sea reflejo de un intento de la astroglía por eliminar a través de la barrera hematoencefálica a esta proteína patogénica.

Estos resultados sugieren que la astroglía en los modelos de taupatía se encuentra estrechamente relacionada con las neuronas que acumulan fosfo-tau, y que podrían fagocitarla e internalizarla para su posterior eliminación, como un mecanismo de protección para reducir su efecto tóxico.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

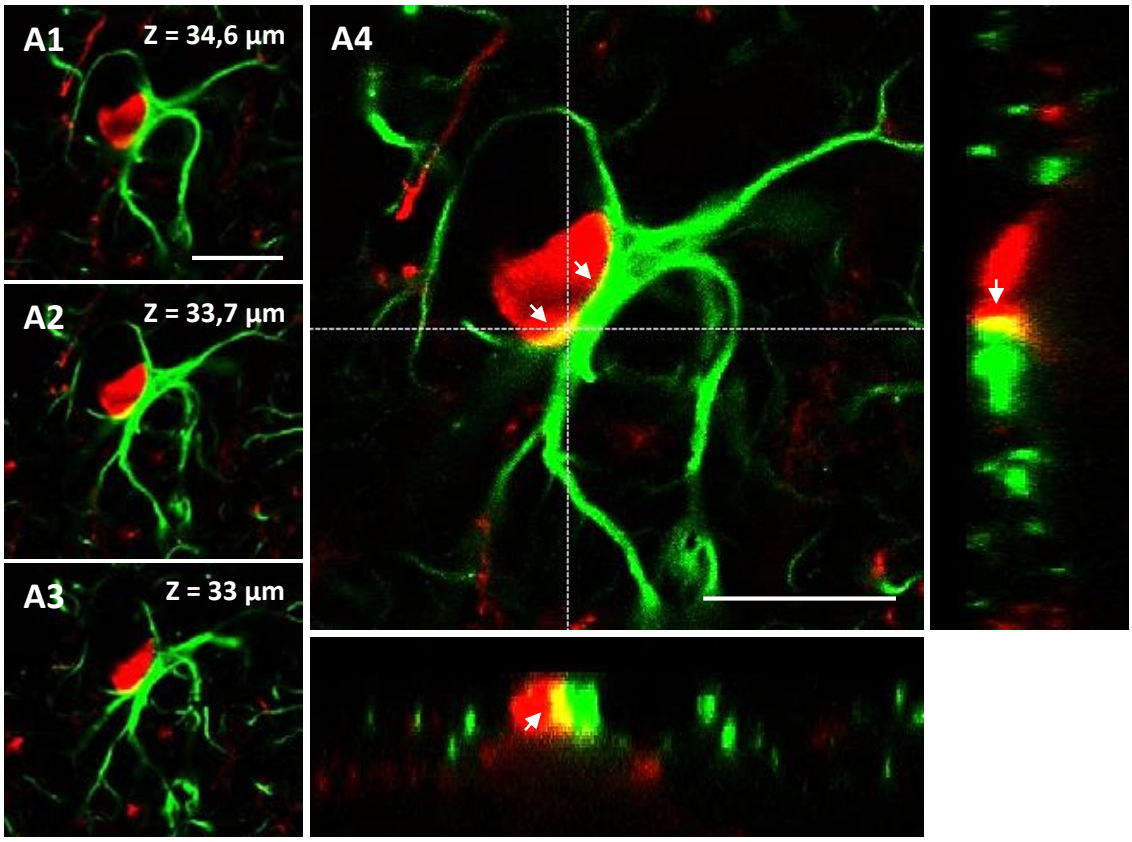


Figura 3.2.43. Los astrocitos reactivos rodean, envuelven e internalizan agregados de fosfo-tau en el hipocampo de los modelos transgénicos de tau. Inmunofluorescencia doble a microscopía láser confocal para los marcadores GFAP (verde) y fosfo-tau (AT8, rojo) en el hipocampo de ThyTau22 de 12 meses de edad. **(A1-A3)** imágenes de varios planos confocales de un astrocito reactivo asociado a un agregado de fosfo-tau. En la imagen **A4** se aprecia la colocalización (color amarillo) entre la prolongación astrocitaria y el agregado de tau (flechas blancas en A4); en los planos ortogonales se aprecia la presencia de fosfo-tau en el interior del astrocito. Barras de escala: 14,5 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

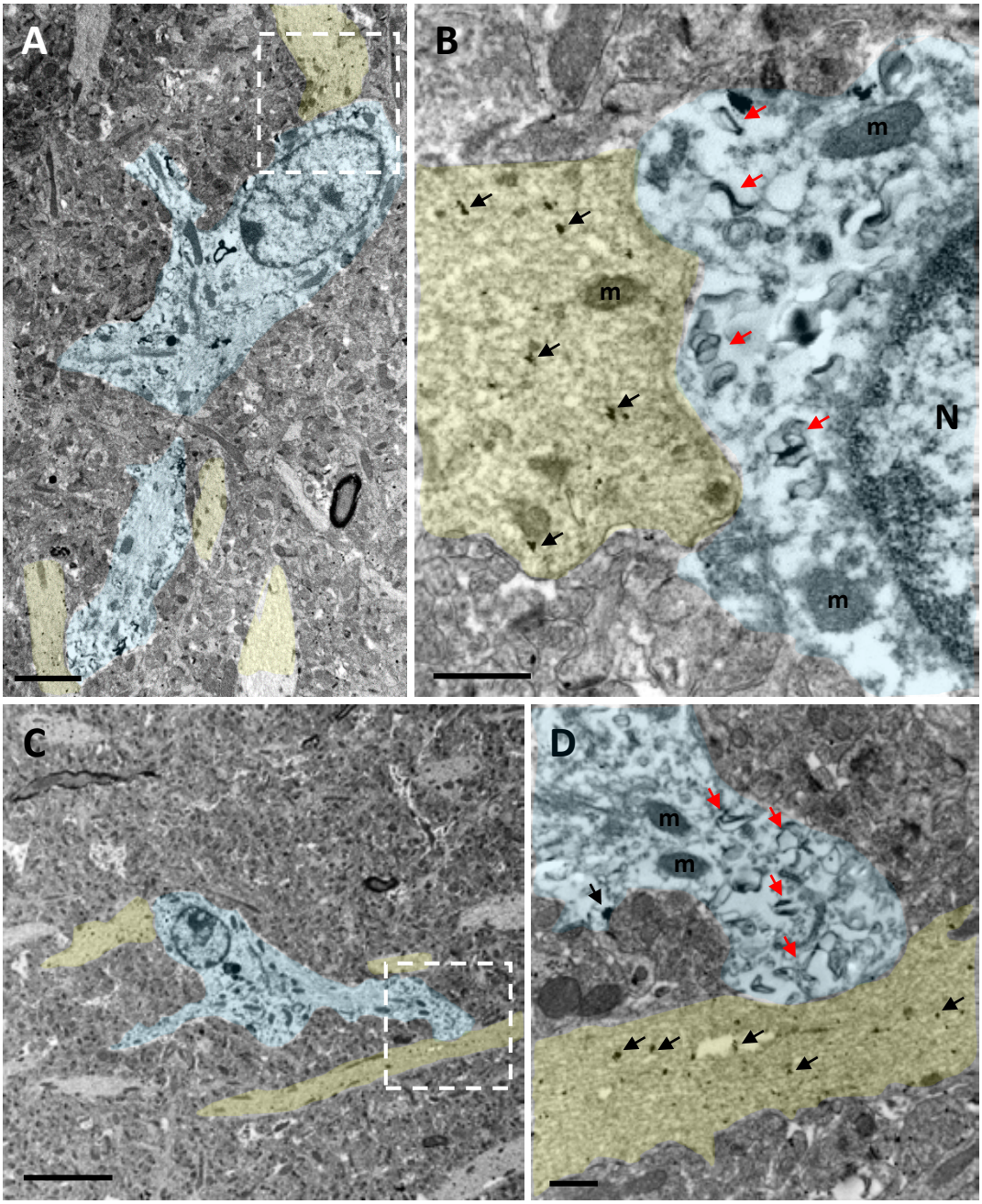


Figura 3.2.44. Identificación ultraestrutural de abundantes estructuras membranosas en el interior de los astrocitos que contactan con dendritas fosfo-tau-positivas en el estrato radiado. Inmuno-oro para AT8 a microscopía electrónica de transmisión. Las imágenes muestran astrocitos (azul) en contacto con varias dendritas apicales (amarillo) del estrato radiado en animales ThyTau22 (**A, B**) y P301S (**C, D**) de 12 meses de edad. Las dendritas poseen inmunomarcaje para fosfo-tau (AT8, flechas negras). Las prolongaciones astrocitarias tienen gran cantidad de material membranal en su interior (flechas rojas). (**D**) Obsérvese que se detecta marca para fosfo-tau en el interior de la dendrita y también de la prolongación astrocitaria**.** *N: núcleo, m: mitocondria.* Barras de escala: A: 2 µm; B, D: 0,5 µm; C: 5 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

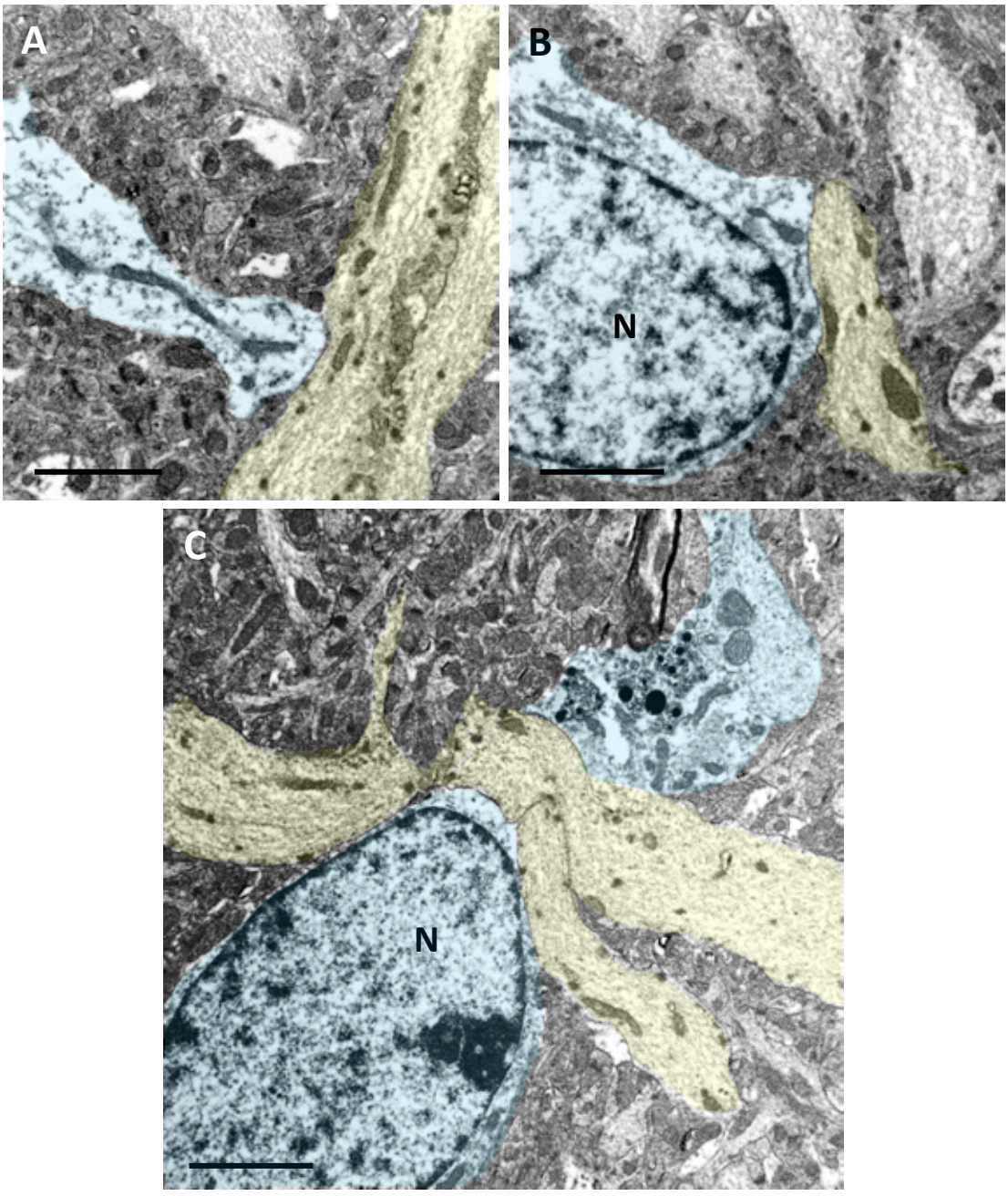


Figura 3.2.45. Los astrocitos del hipocampo de animales WT que contactan con dendritas no presentan en el citoplasma estructuras membranosas anómalas como ocurre en los modelos de tau. Microscopía electrónica de transmisión**.** Imágenes representativas de astrocitos (azul) de animales WT de 12 meses de edad. Véase que a pesar del íntimo contacto con las dendritas (amarillo) de neuronas piramidales del estrato radiado no se observa gran cantidad de material membranal en el interior. Barras de escala: 2 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

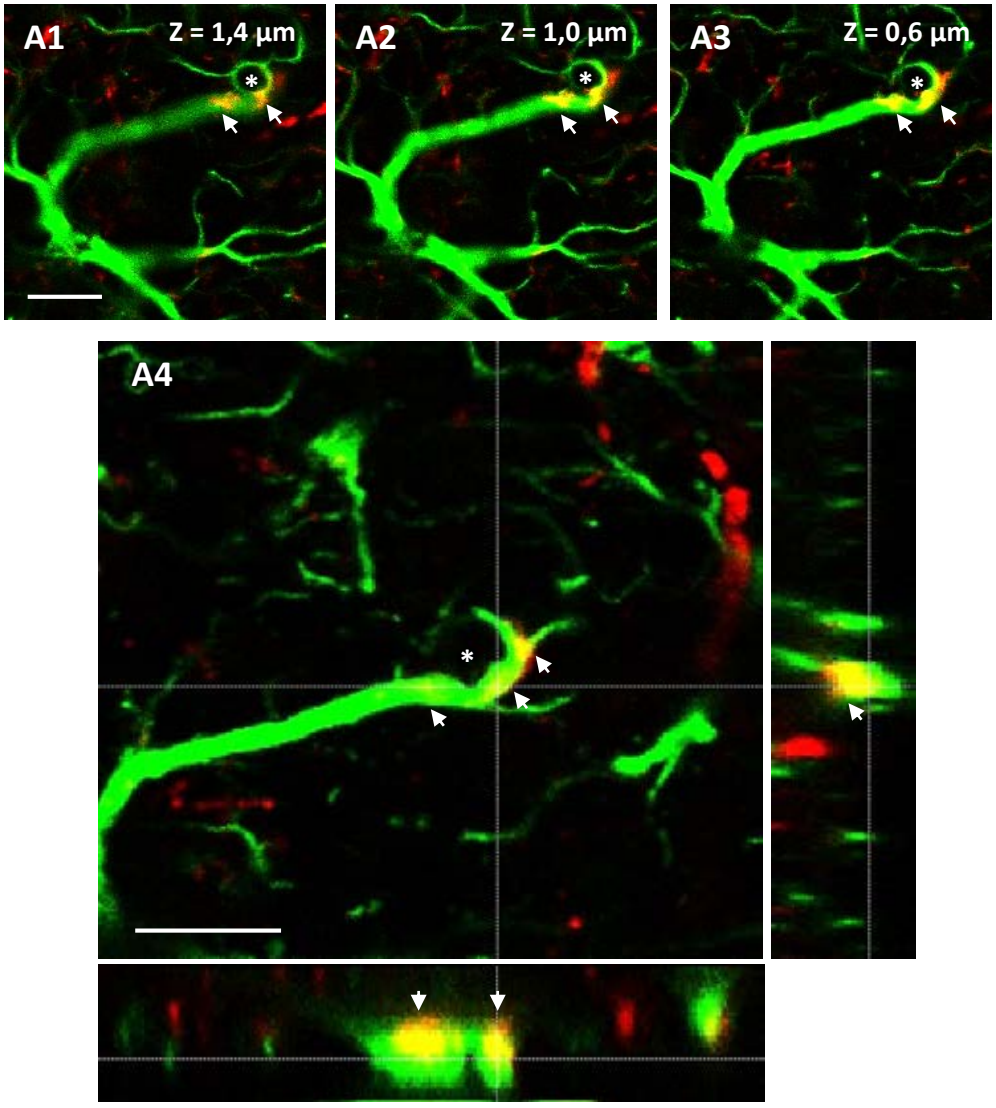


Figura 3.2.46. Los astrocitos presentan fosfo-tau en el interior de sus prolongaciones, especialmente de aquellas asociadas a vasos sanguíneos. Inmunofluorescencia doble a microscopía láser confocal para GFAP (verde) y fosfo-tau (AT8, rojo) en el hipocampo del modelo ThyTau22 de 12 meses. (**A1-A3**) Imágenes de varios planos focales de un astrocito con agregados de fosfo-tau (flechas blancas) en el interior de una de sus prolongaciones, que rodea a un vaso sanguíneo (asterisco). En la imagen **A4** y los planos ortogonales se muestra la colocalización de la prolongación astrocitaria con los agregados de fosfo-tau (flechas blancas en **A4**). Barras de escala: 6 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

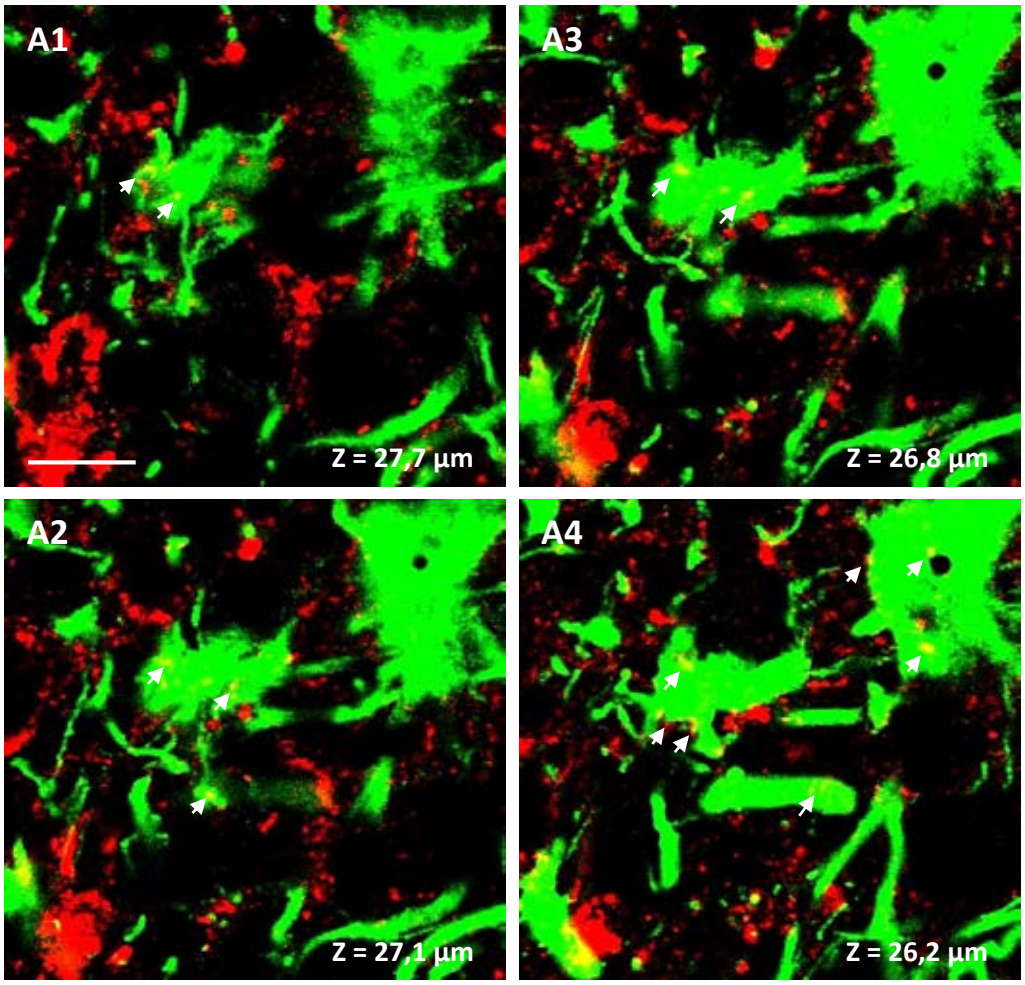


Figura 3.2.47. Los astrocitos reactivos en el hipocampo del modelo P301S presentan gran cantidad de agregados de fosfo-tau en su interior. Inmunofluorescencia doble a microscopía láser confocal para GFAP (verde) y fosfo-tau (AT8, rojo) en el hipocampo del modelo P301S de 9 meses. La serie de imágenes **A1-A4** muestra varios agregados de fosfo-tau internalizados por parte de los astrocitos (flechas blancas). Barra de escala: 10 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

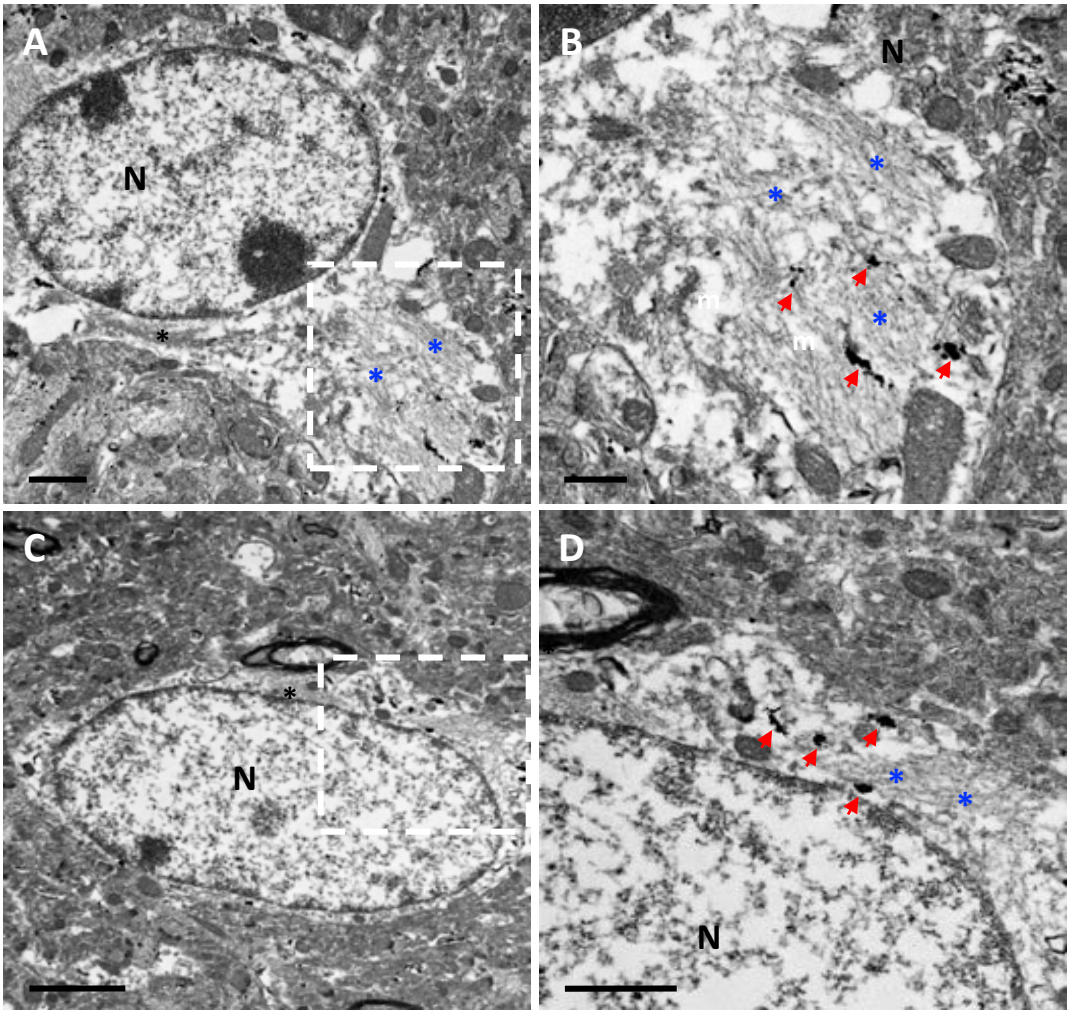


Figura 3.2.48. Identificación ultraestructural de fosfo-tau en el citoplasma de astrocitos en el hipocampo del modelo ThyTau22. Inmuno-oro con el anticuerpo AT8 a microscopía electrónica de transmisión en el hipocampo de ThyTau22 de 12 meses**.** (**A-D**) Panorámicas y detalles de células astrogliales con marca AT8 positiva en su interior (flechas rojas). Los agregados de fosfo-tau no aparecen rodeados de elementos membranosos ni asociados a otras estructuras. Filamentos intermedios del astrocito marcados con asteriscos azules. *N: núcleo*. Barras de escala: A: 1 µm; C: 2 µm; B: 0, 5 µm; D: 1 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

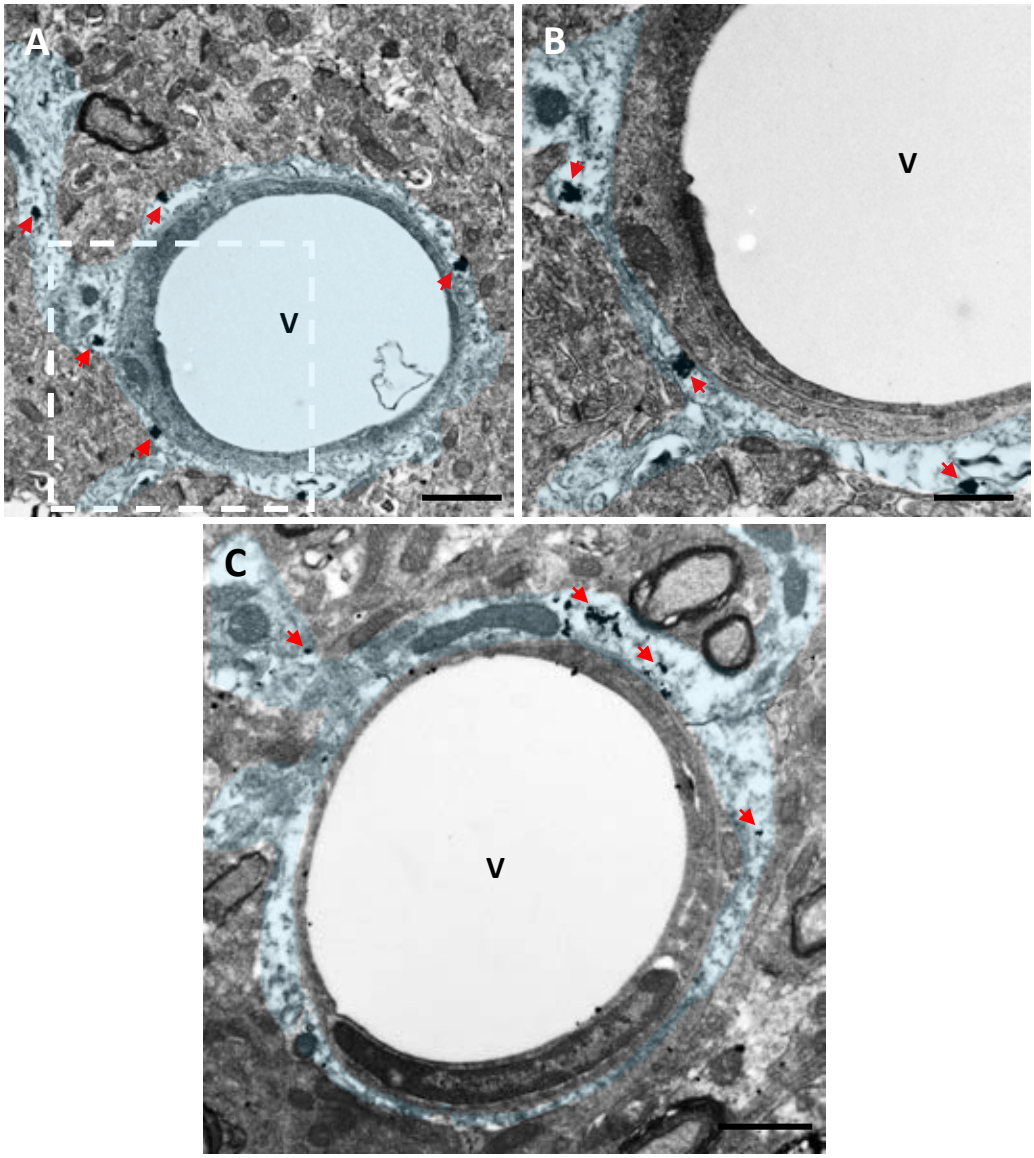


Figura 3.2.49. Identificación ultraestructural de agregados de fosfo-tau en los pies perivasculares astrocitarios en el hipocampo del modelo ThyTau22. Inmuno-oro con el anticuerpo AT8 a microscopía electrónica de transmisión en el hipocampo de ThyTau22 a 12 meses de edad**.** (**A, B**) Imagen y detalle de prolongación astrocitaria (azul) rodeando un vaso sanguíneo. Observamos en su interior agregados de fosfo-tau (flechas). (**C**) Detalle de célula astroglial rodeando vaso sanguíneo y con agregados AT8 positivos (flechas) en la prolongación en contacto con el endotelio. *V: luz de vaso sanguíneo*. Barras de escala: A: 2 µm; B: 0,5 µm; C: 1 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

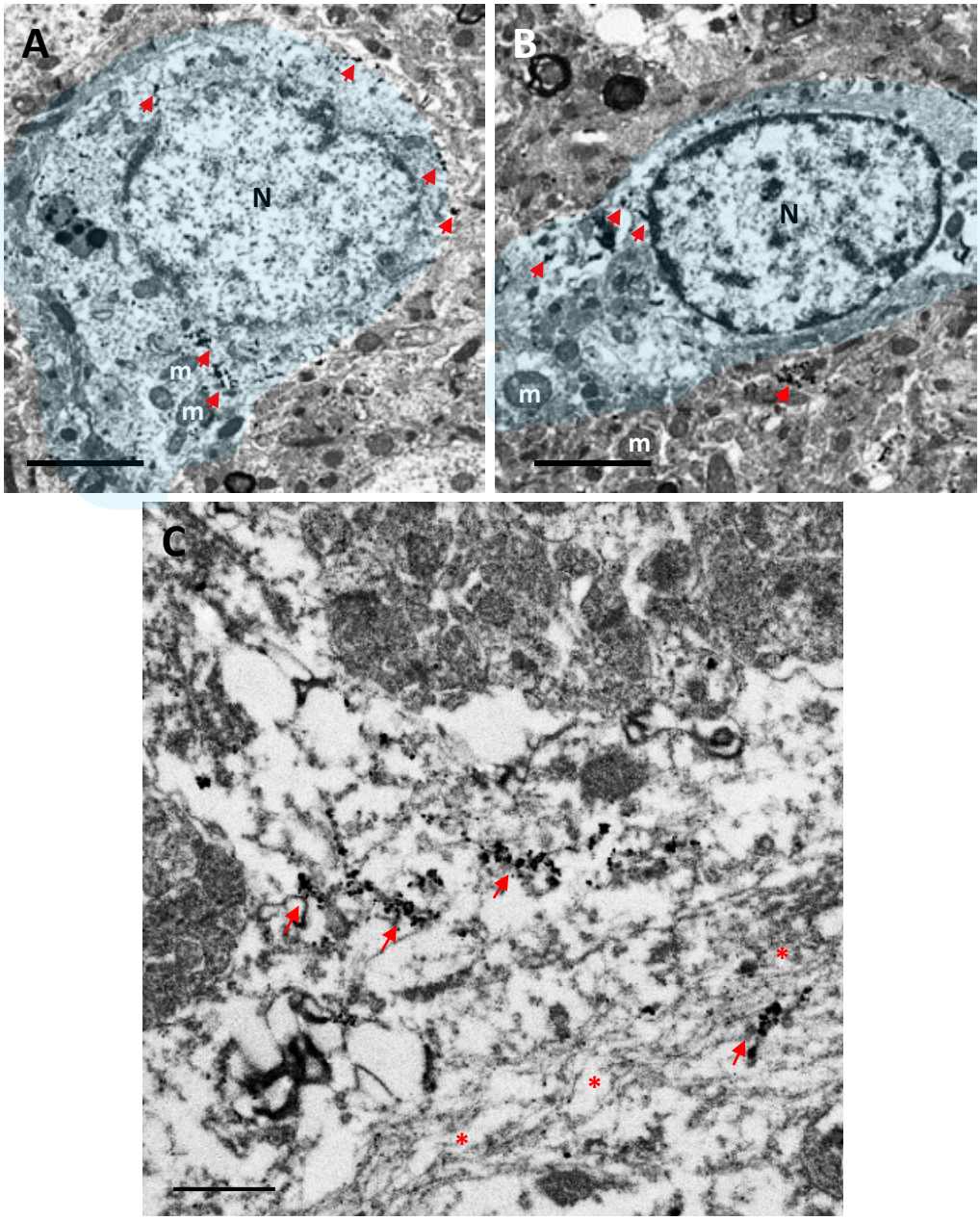


Figura 3.2.50. Localización ultraestructural de fosfo-tau en el citoplasma de los astrocitos del modelo P301S. Inmuno-oro a microscopía electrónica de transmisión con el anticuerpo AT8 en el hipocampo de P301S de 9 meses de edad**.** (**A, B**) Astrocitos (azul) con agregados AT8-positivos en su interior (flechas). (**C**) Prolongación astrocitaria en cuyo interior se observan acúmulos de fosfo-tau (flechas). Filamentos intermedios astrogliales indicados con asteriscos*. m: mitocondria, N: núcleo.* Barras de escala: A, B: 2 µm; C: 0,5 µm; D: 1 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

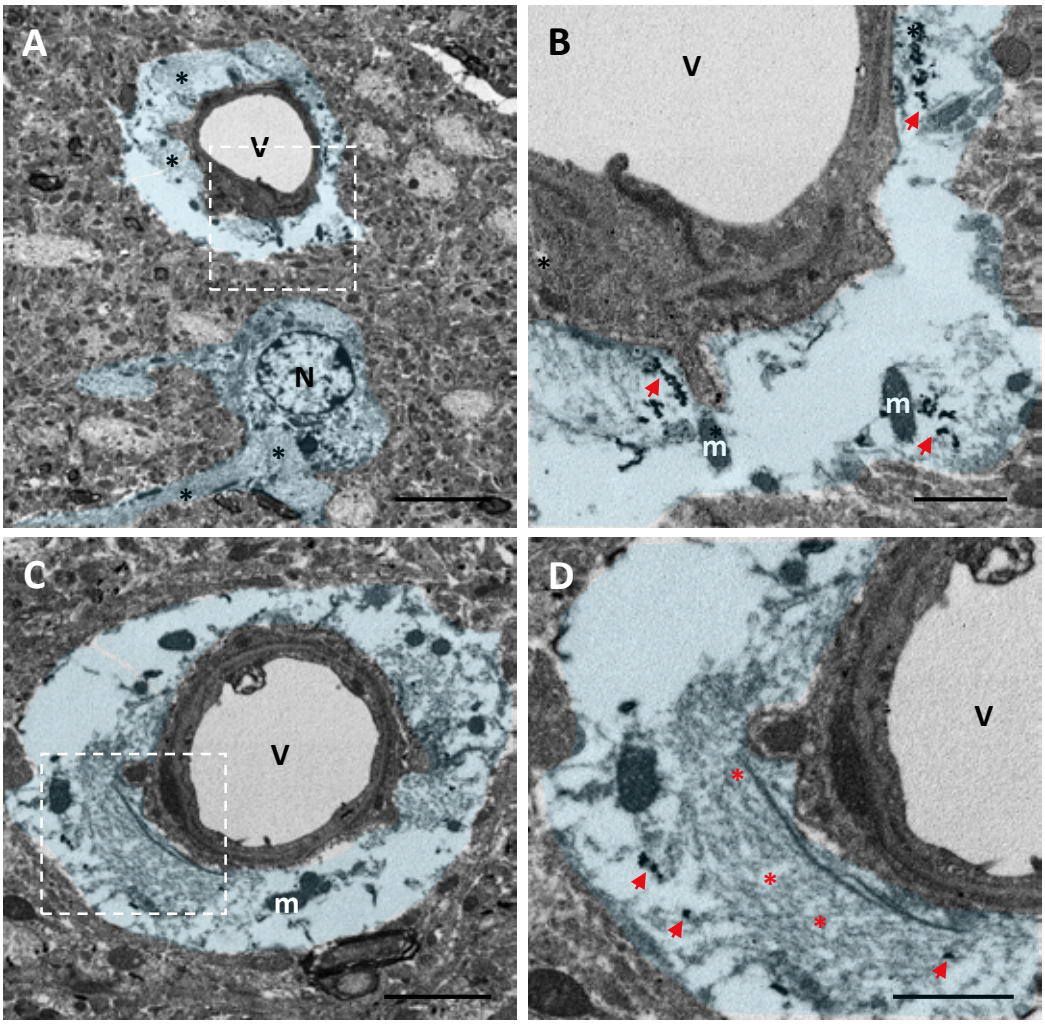


Figura 3.2.51. Identificación ultraestructural de agregados de fosfo-tau en los pies perivasculares astrogliales en el hipocampo del modelo P301S. Inmuno-oro a microscopía electrónica de transmisión con el anticuerpo AT8 en el hipocampo de P301S de 9 meses. (**A, B**) Panorámica y detalle de vaso sanguíneo rodeado de prolongación astrocitaria (azul) en cuyo citoplasma se observa marca AT8 positiva (flechas rojas). (**C**) Vaso sanguíneo rodeado por prolongación astrocitaria (azul). (**D**) Detalle de prolongación astroglial asociada a vaso sanguíneo con marca para fosfo-tau en su interior (flechas). Los asteriscos indican conjuntos de filamentos intermedios. *m: mitocondria, N: núcleo, v: luz de vaso sanguíneo.* Barras de escala: A: 5 µm; B-D: 1 µm; C: 2 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.3. ESTUDIO DE LA PÉRDIDA SINÁPTICA Y NEURONAL EN LOS MODELOS TRANSGÉNICOS THYTAU22 y P301S

La pérdida sináptica es uno de los eventos patológicos que mejor correlaciona con el deterioro cognitivo característico de la EA, siendo además anterior a la muerte neuronal. En este sentido, es relevante que tanto Aβ como tau realizan funciones fisiológicas que de algún modo se relacionan con la actividad sináptica. Por ejemplo, Aβ interviene en la regulación de la liberación de neurotransmisores en las sinapsis hipocampales (Abramov et al., 2009). Por su parte, tau es importante para los procesos dependientes del flujo axonal (incluyendo el mantenimiento y funcionamiento de las sinapsis), así como para la estabilidad de las espinas dendríticas (revisado en (Guerrero-Muñoz et al., 2015; Ittner and Ittner, 2018). Por tanto, las alteraciones en las funciones/niveles de ambas proteínas y su interacción patológica redundan en la disfunción/daño sináptico (revisado en Forner et al., 2017), ya sea de modo directo o indirecto. Sin embargo, el efecto sinaptotóxico de Aβ ha sido bastante mejor caracterizado que el de fosfo-tau. Por este motivo, en este trabajo hemos realizado una caracterización del estado de distintas subpoblaciones sinápticas y neuronales en sendos modelos de taupatía, ThyTau22 y P301S.

3.3.1. EL HIPOCAMPO DEL MODELO THYTAU22 PRESENTA ALTERACIONES SINÁPTICAS DESDE ESTADIOS INICIALES

Para determinar si existe una afectación sináptica relacionada con la patología tau en el hipocampo del modelo ThyTau22, se ha realizado un estudio del marcador presináptico sinaptofisina (Syn). Esta proteína se localiza en la membrana de las vesículas sinápticas, independientemente de la naturaleza neuroquímica del terminal en el que se encuentre, por lo que constituye un marcador idóneo para hacer una primera aproximación sobre el estado sináptico general.

En primer lugar, los niveles de Syn fueron cuantificados mediante WB en el hipocampo de animales ThyTau22 y WT de 2, 9 y 12 meses de edad (**Fig. 3.3.1**). En el modelo transgénico, la cantidad de Syn disminuyó paulatinamente y de manera significativa con la edad ($F(5, 52) = 6{,}886$, $P < 0{,}0001$). Se detectaron ciertas diferencias, aunque no significativas, entre los animales más jóvenes y sus controles (-22 ± 13,87% vs. WT 2 meses). Esta disminución llegó a ser significativa a los 9 meses (-24,01 ± 13,15% vs. 2 meses; $p<0{,}01$; -35,8 ± 12,05% vs. WT 9 meses; $p<0{,}01$) y se mantuvo en niveles similares a los 12 meses (-20,66 ± 16,89% vs. 2 meses; $p<0{,}001$; -20,06 ± 16,47% vs. WT 12 meses).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Posteriormente, se realizó una tinción inmunohistoquímica para Syn en secciones con hipocampo en los animales ThyTau22 y WT de 2, 9 y 12 meses (**Fig. 3.3.2**). De forma general, en ambos genotipos se reveló un patrón difuso por todo el neuropilo, con diferencias regionales en la intensidad del marcaje de acuerdo con las aferencias recibidas en cada zona. Así, en el hipocampo propio (CA1-CA3), la intensidad es similar en los estratos oriens y radiado, siendo mucho más tenue en el estrato lacunoso-molecular. El estrato lúcido de la región CA3 se encontraba intensamente teñido. En el giro dentado se detectó un bandeado trilaminar específico, que delimita las capas molecular externa (colindante con la fisura hipocampal), molecular media y molecular interna (junto a la capa granular). Típicamente, las zonas externa e interna de la capa molecular presentan mayor inmunorreactividad que la zona intermedia. Las capas que contienen los cuerpos de las neuronas principales (estrato piramidal y granular) aparecen sin teñir. Ya desde edades muy tempranas (2 meses) se observaron algunas diferencias en el estrato lúcido, cuyo grosor inmunomarcado parecía ser inferior en el modelo transgénico (**Fig. 3.3.2 B1**, detalle en **3.3.3 B1**) que en los controles de su edad (**Fig. 3.3.2 A1**, detalle en **3.3.3 A1**). También a partir de los 9 meses, se hizo notable que el marcaje en la región del subículo fue menor en los ThyTau22 en comparación con los WT (**Fig. 3.3.2 A2 y B2,** detalles en **3.3.3 A2 y B2**). Esta región coincide con la zona de aparición inicial de la patología de fosfo-tau en este modelo. A los 12 meses, ambas diferencias seguían siendo evidentes en los ThyTau22 (**Fig. 3.3.2 A3 y B3,** detalles en **3.3.3 A3 y B3**).

La cuantificación del área ocupada por el estrato lúcido (área inmunopositiva para Syn) demostró que efectivamente esta región era significativamente más pequeña ($F(5,50) = 39,88$ $P < 0,0001$) desde los 2 meses (**Fig. 3.3.3 C**) en los ratones ThyTau22 en comparación con los WT de la misma edad (-26,56 ± 5,77% vs. WT 2 meses; $p<0,0001$), y continuó reduciéndose ligeramente hasta los 12 meses (-31,02 ± 7,06% vs. WT 12 meses; $p<0,0001$). Sin embargo, no hubo variaciones estadísticamente significativas con la edad en el espesor del estrato lúcido. Por tanto, las diferencias en los niveles de Syn inicialmente detectadas mediante WB podrían ser explicadas parcialmente por el reducido tamaño de este estrato.

Para confirmar los resultados obtenidos con la inmunotinción para Syn en el estrato lúcido del modelo ThyTau22, y establecer si es consecuencia de una pérdida de aferencias sinápticas en esta región, utilizamos otro marcador presináptico, SNAP-25. En este caso se trata de una proteína que se encuentra asociada a la propia membrana plasmática de los terminales presinápticos, formando parte del complejo SNARE. El patrón de marcaje con el anticuerpo para SNAP-25 (**Fig. 3.3.4 A1 y B1,** 2 meses) es muy similar al de Syn, con la excepción del bandeado visible en la capa molecular del giro dentado, que esta vez define a la zona intermedia de manera más intensa que al resto. Como era de esperar, la inmunotinción mostró nuevamente un tamaño

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

reducido del estrato lúcido en los animales transgénicos en comparación con los WT, bastante acusado a los 12 meses de edad (**Fig. 3.3.4 A2 y B2**, y detalle en **Fig. 3.3.4 A3 y B3**).

El modelo ThyTau22, por tanto, parece presentar una pérdida de terminales presinápticos en el hipocampo. Este proceso se inicia desde edades muy tempranas (2 meses) y progresa con la edad. Esta reducción parece ser fruto del avance de la patología de los propios animales, asociado con ciertas diferencias específicas en determinadas regiones con gran cantidad de contactos sinápticos, como el estrato lúcido o el subículo. Este último punto sugiere que también puede existir un defecto inicial en el fenotipo del modelo.

Dado que los sistemas de neurotransmisión glutamatérgicos y GABAérgicos están afectados en la EA (Paula-Lima et al., 2013; Giovannetti and Fuhrmann, 2019; Sanchez-Mejias et al., 2019) y también en taupatías puras (Crescenzi et al., 2017; Levenga et al., 2014) se decidió determinar la contribución diferencial de alteraciones en algunos de estos sistemas a la pérdida de Syn. Para ello, analizamos marcadores específicos de sinapsis glutamatérgicas (VGLUT-1, del inglés *vesicular glutamate transporter 1*) y GABAérgicas (VGAT, del inglés *Vesicular GABA Transporter*).

3.3.2. PÉRDIDA DE SINAPSIS EXCITATORIAS EN EL HIPOCAMPO DEL MODELO THYTAU22

El transportador vesicular de glutamato VGLUT-1 se sitúa en la membrana de las vesículas sinápticas glutamatérgicas, y transporta el glutamato desde el citoplasma hacia su interior. Las sinapsis glutamatérgicas corresponden a la mayoría de las sinapsis excitatorias del SNC (Niciu et al., 2012). El análisis por WB (**Fig. 3.3.5**) determinó que existía una disminución progresiva ($F(5, 48) = 8{,}361$; $P < 0{,}0001$) de VGLUT-1 en el hipocampo de los ratones transgénicos desde los 9 meses (-20,86 ± 17,6% vs. 9m WT), que se volvió estadísticamente significativa a los 12 meses con respecto a sus respectivos controles (-39 ± 20,88% vs. WT 12m; $p<0{,}01$). Además, el modelo ThyTau22 presentó un acusado descenso de los niveles de VGLUT-1 asociado con el avance de la edad, que fue significativo a los 12 meses (-40,08 ± 20,8%, 12m vs. 2m; $p<0{,}001$).

Mediante tinción inmunohistoquímica se realizó una aproximación histológica sobre la expresión de este marcador glutamatérgico (**Fig. 3.3.6**). El patrón de marcaje del neuropilo fue similar al obtenido para la proteína Syn (ver **Fig. 3.3.2**). De nuevo, destacaron el estrato lúcido de CA3 y la disposición trilaminar en la capa molecular del giro dentado. Como era de esperar, el grosor del estrato lúcido inmunomarcado también se encontraba reducido en los ThyTau22, de forma especialmente evidente a los 12 meses (**Fig. 3.3.6 A3 y B3**). Además, existía una disminución de la intensidad de inmunotinción en el subículo y prosubículo (ProS, región de

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

transición del subículo y CA1), que aparecieron algo menos inmunorreactivos desde edades tempranas (**Fig. 3.3.6 A2**) en los animales transgénicos comparados con los correspondientes WT, y que se fue acentuando con la edad de los animales. Por tanto, existe una afectación significativa de las sinapsis glutamatérgicas en el hipocampo de los ratones ThyTau22 de los 12 meses de edad.

Las espinas dendríticas son sitios de contactos sinápticos de tipo mayoritariamente excitatorio (Yuste, 2015; Sorra and Harris, 2000), constituyendo un buen indicador de la densidad sináptica excitatoria. En consecuencia, para complementar los resultados obtenidos para VGLUT-1, decidimos estudiar los elementos postsinápticos excitatorios en el modelo ThyTau22 usando el marcador PSD95. Esta proteína se sitúa en la densidad postsináptica de las espinas, y su función principal consiste en servir de anclaje entre diversos elementos del citoesqueleto y proteínas de la membrana postsináptica, incluyendo receptores de glutamato. Se analizaron los niveles hipocampales de esta proteína en animales WT y ThyTau22 a los 2, 9 y 12 meses de edad mediante WB (**Fig. 3.3.7 A**). La cuantificación (**Fig. 3.3.7 B**) mostró que existían variaciones significativas en los niveles de PSD95 con la edad entre ambos grupos ($F(5, 41) = 4{,}67$ $P = 0{,}0018$). Inicialmente no se detectaron cambios entre los dos genotipos; sin embargo, a los 12 meses de edad, el grupo ThyTau22 mostró un aumento significativo de la cantidad de PSD95 con respecto los WT de la misma edad (+40,88 ± 20,22%; $p<0{,}01$) y con respecto a los ThyTau22 de 9 meses (+38,56 ± 21,13%; $p<0{,}05$). Este incremento podría ser un mecanismo compensatorio ante la pérdida significativa de estimulación glutamatérgica observada a los 12 meses de edad.

3.3.3. PÉRDIDA DE SINÁPSIS GABAÉRGICAS EN EL HIPOCAMPO DEL MODELO THYTAU22

A continuación, para evaluar la posible afectación de los terminales presinápticos de naturaleza inhibitoria, se analizó el transportador vesicular de GABA, VGAT. Esta proteína, situada en las vesículas sinápticas de los terminales gabaérgicos, se encarga de introducir en ellas GABA y glicina. La cuantificación mediante WB (**Fig. 3.3.8**) evidenció una disminución significativa de VGAT en el hipocampo de los animales ThyTau22 ($F(5, 54) = 10{,}66$ $P<0{,}0001$) desde los 9 meses de edad (-31,8 ± 21,5% vs. WT 9m; $p<0{,}05$), que se acentuaba a los 12 meses (-43,8 ± 11,99% vs. WT 12m; $p = 0{,}0001$). Las diferencias fueron progresivas a lo largo del envejecimiento (-31,87 ± 23,3% 9m vs. 2m; $p<0{,}0001$; -42,46 ± 11,99% 12m vs. 2m; $p<0{,}0001$).

El marcaje inmunohistoquímico para VGAT (**Fig. 3.3.9**) puso de manifiesto un patrón de marcaje específico en el hipocampo. Concretamente, el estrato lacunoso-molecular, y la capa externa de la molecular del giro dentado presentaron un marcaje destacado. Además, se observó un marcaje muy intenso en torno a las capas de neuronas principales (piramidal y

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

granular) y en el subículo, correspondiente a los plexos inhibidores que inervan a estas células. Se apreció una ligera disminución de la inmunorreactividad en los animales transgénicos (**Fig. 3.3.9 B**) con respecto a los controles (**Fig. 3.3.9 A**), que fue más evidente en el prosubículo, desde edades tempranas (2 meses, **Fig. 3.3.9 B1**). La disminución de la intensidad de inmunorreactividad y del tamaño del área inmunomarcada en el subículo y ProS fue evidente a los 9 y 12 meses de edad (**Fig. 3.3.9 B2 y B3**, respectivamente).

Por tanto, el modelo ThyTau22 exhibe, no solo una pérdida de contactos sinápticos de naturaleza excitatoria, sino también pérdida de sinapsis inhibitorias en la formación hipocampal, desde edades tempranas y con cierta progresión asociada a la edad.

3.3.4. ALTERACIÓN DE LA INERVACIÓN COLINÉRGICA EN EL HIPOCAMPO DEL MODELO THYTAU22

El sistema colinérgico es uno de los más afectados durante la patología de la EA (Kása et al., 1997; Pepeu and Giovannini, 2017; Hampel et al., 2018). De hecho, la disfunción colinérgica sucede desde los estadios tempranos de la enfermedad (Craig et al., 2011). Los niveles de la enzima que se encarga de la síntesis de acetilcolina (acetilcolina transferasa; ChAT, del inglés *choline acetyl transferase*) están reducidos en el hipocampo de los pacientes de EA (Rinne et al., 1988). Por este motivo, se ha analizado el estado de la inervación colinérgica en el hipocampo del modelo ThyTau22 a los 2, 9 y 12 meses de edad determinando los niveles de ChAT mediante WB (**Fig. 3.3.10**). El estudio cuantitativo determinó que existen diferencias significativas entre los animales transgénicos y sus respectivos controles (WT) con el avance de la edad y patología tau ($F(5,53) = 10,34$; $P < 0,0001$). La pérdida de ChAT fue estadísticamente significativa en los ThyTau22 a partir de los 9 meses (-33,61 ± 11,34%; ThyTau22 vs. WT 9m; $p<0,0001$; -27,83 ± 13,32%; ThyTau22 vs. WT 12m; $p<0,05$). Además, los niveles de ChAT se fueron reduciendo progresivamente con la edad en el modelo, y a los 12 meses esta diferencia fue significativa con respecto a los animales más jóvenes (-28,01 ± 13,11 % vs. 2m; $p<0,05$).

La tinción inmunohistoquímica para ChAT en la región hipocampal (**Fig. 3.3.11**) evidenció fibras inmunorreactivas en todas las capas, presentando una intensidad más débil en el estrato oriens, estrato radiado y el hilio, junto a una intensidad media en el estrato lacunoso-molecular y capa molecular. La densidad de fibras colinérgicas destacaba en la porción del estrato oriens adyacente a la capa piramidal (plexo yuxtapiramidal) y la porción de la capa molecular interna adyacente a la capa granular (plexo supragranular) del giro dentado. Asimismo, el subículo y sobre todo la región del prosubículo aparecieron intensamente marcadas. Al hacer la comparativa entre los animales transgénicos y los WT destacaron diferencias en dos regiones: la capa supragranular del giro dentado y otra en el área prosubicular.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

El incremento de la inmunorreactividad para ChAT del plexo supragranular de los animales ThyTau22 fue detectado a los 9 meses de edad, y continuaba a los 12 meses (**Fig. 3.3.12 B2 y B3**). Este fenómeno no se encontró en los ThyTau22 de 2 meses (**Fig. 3.3.12 B1**) ni en los animales WT (**Fig. 3.3.12 A1-A3**). La proporción del área inmunorreactiva para ChAT del plexo supragranular con respecto a la superficie de toda la capa molecular (**Fig. 3.3.12 C**) mostró diferencias significativas ($F(5, 52) = 53{,}62$; $P<0{,}0001$) en este estudio. Así, los ratones transgénicos de 9 y 12 meses presentaron un aumento significativo de este parámetro en comparación con los WT de la misma edad (4,13 ± 1,03 veces a los 9m; $p<0{,}0001$; 3,38 ± 0,77 veces a los 12m; $p<0{,}0001$), así como con respecto a los ThyTau22 de 2 meses (2,73 ± 0,68 veces a 9m; $p<0{,}0001$; 2,41 ± 0,58 veces a los 12m; $p<0{,}0001$).

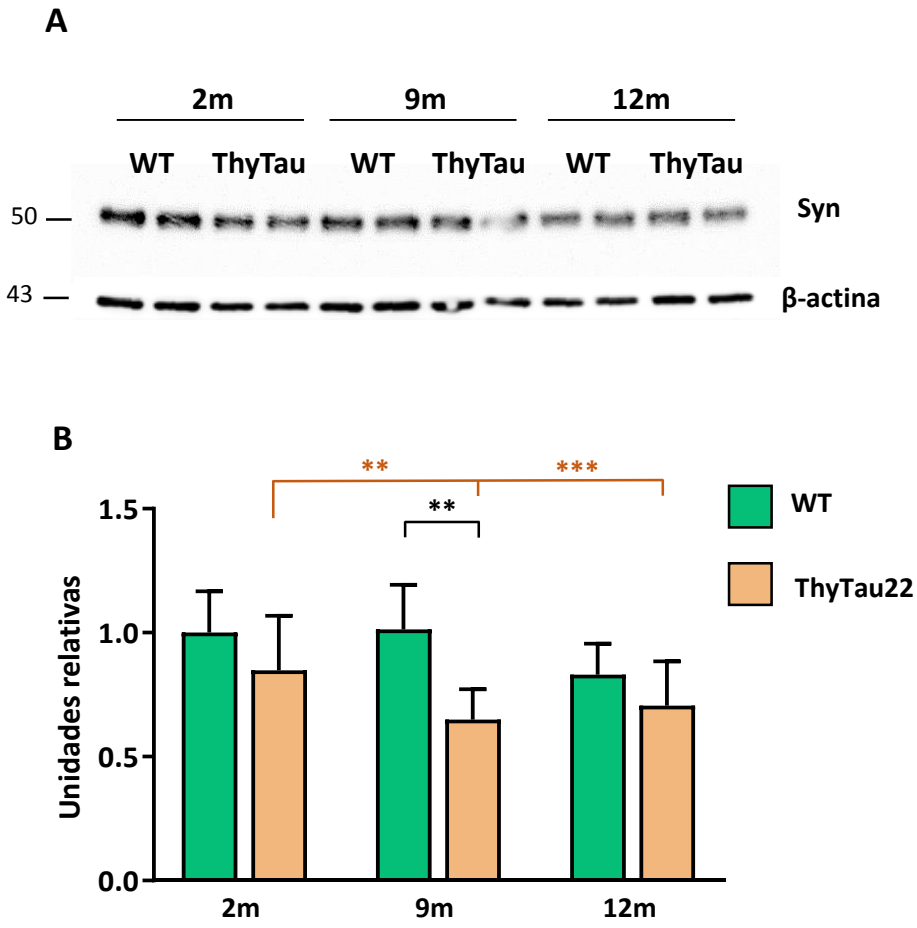
Por tanto, el modelo ThyTau22 exhibe una reducción general de inervación colinérgica hipocampal (**Fig. 3.3.10**) acompañada en contraste por intensificaciones anormales de plexos ChAT-positivos en regiones específicas.

3.3.5. PÉRDIDA SINÁPTICA EN EL HIPOCAMPO DEL MODELO P301S

A continuación, se analizaron los niveles de marcadores presinápticos Syn (marcador general) y VGLUT-1 (marcador de terminales glutamatérgicos) en el hipocampo del modelo P301S. Mediante WB, como una primera aproximación, se analizó la expresión de estos marcadores a los 4 y 12 meses de edad (**Fig. 3.3.13 A**). Los resultados mostraron que tanto los niveles de Syn (**Fig. 3.3.13 B**) y de VGLUT-1 (**Fig. 3.3.13 C**) descendían significativamente (-54,40 ± 18,27%; $p<0{,}05$ para Syn; -49,84 ± 9,7%, $p<0{,}05$ para VGLUT-1) en los animales de 12 meses con respecto a los de 4 meses.

En efecto, la tinción inmunohistoquímica para el marcador general Syn (**Fig. 3.3.14**) mostró una reducción generalizada del marcaje en el hipocampo a partir de los 9 meses de edad (**Fig. 3.3.14 B2**) con respecto a los individuos de 2 meses (**Fig. 3.3.14 B1**) y también en comparación con los controles de la misma edad (**Fig. 3.3.14 A2**). No se apreciaron alteraciones de la inmunorreactividad en la región del subículo. El patrón bandeado de la inmunotinción en la capa molecular interna del giro dentado parecía haber perdido definición. En el modelo P301S a los 12 meses de edad (**Fig. 3.3.14 B3**) existía una acusada atrofia hipocampal que dificultó el seguimiento de la progresión de la patología sináptica. Por tanto, los resultados obtenidos a nivel histológico están en consonancia con los obtenidos por técnicas moleculares. Sería necesario completar el estudio en el hipocampo de este modelo con marcadores sinápticos GABAérgicos y colinérgicos.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



N= 9-12/edad/genotipo. ADEVA de una vía F (5, 52) = 6,886, P<0,0001
*Tukey *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001*

Figura 3.3.1. Disminución de los niveles de la proteína presináptica sinaptofisina en el hipocampo del modelo ThyTau22. (A) Western-blot representativo y (**B**) cuantificación de los niveles de la proteína sinaptofisina (Syn) en el hipocampo de ratones ThyTau22 y WT a 2, 9 y 12 meses de edad. Los niveles de esta proteína son significativamente más bajos en el modelo transgénico para tau a partir de los 9 meses de edad que en los controles. Los valores están referidos con respecto a los animales WT de 2 meses.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

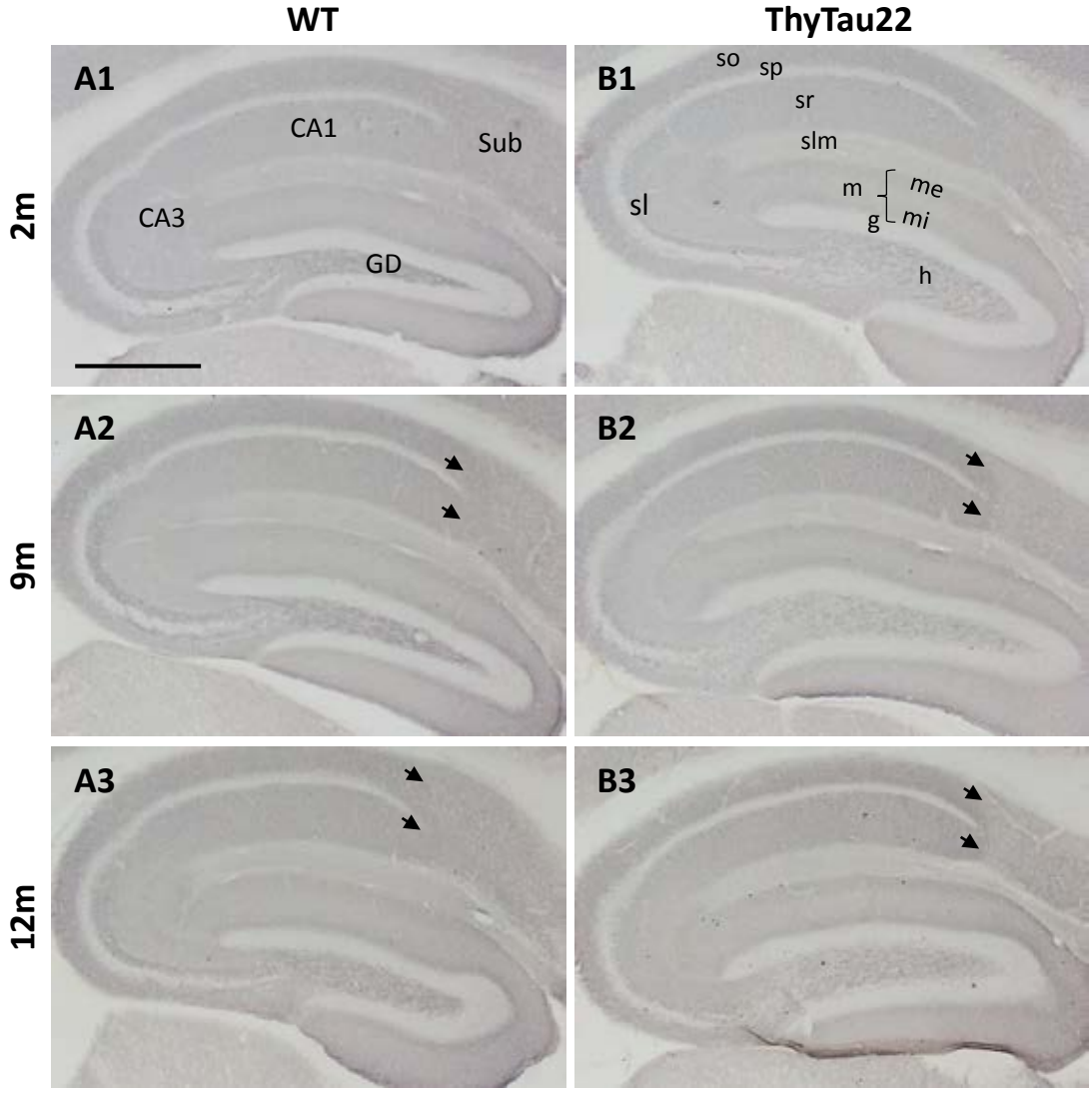
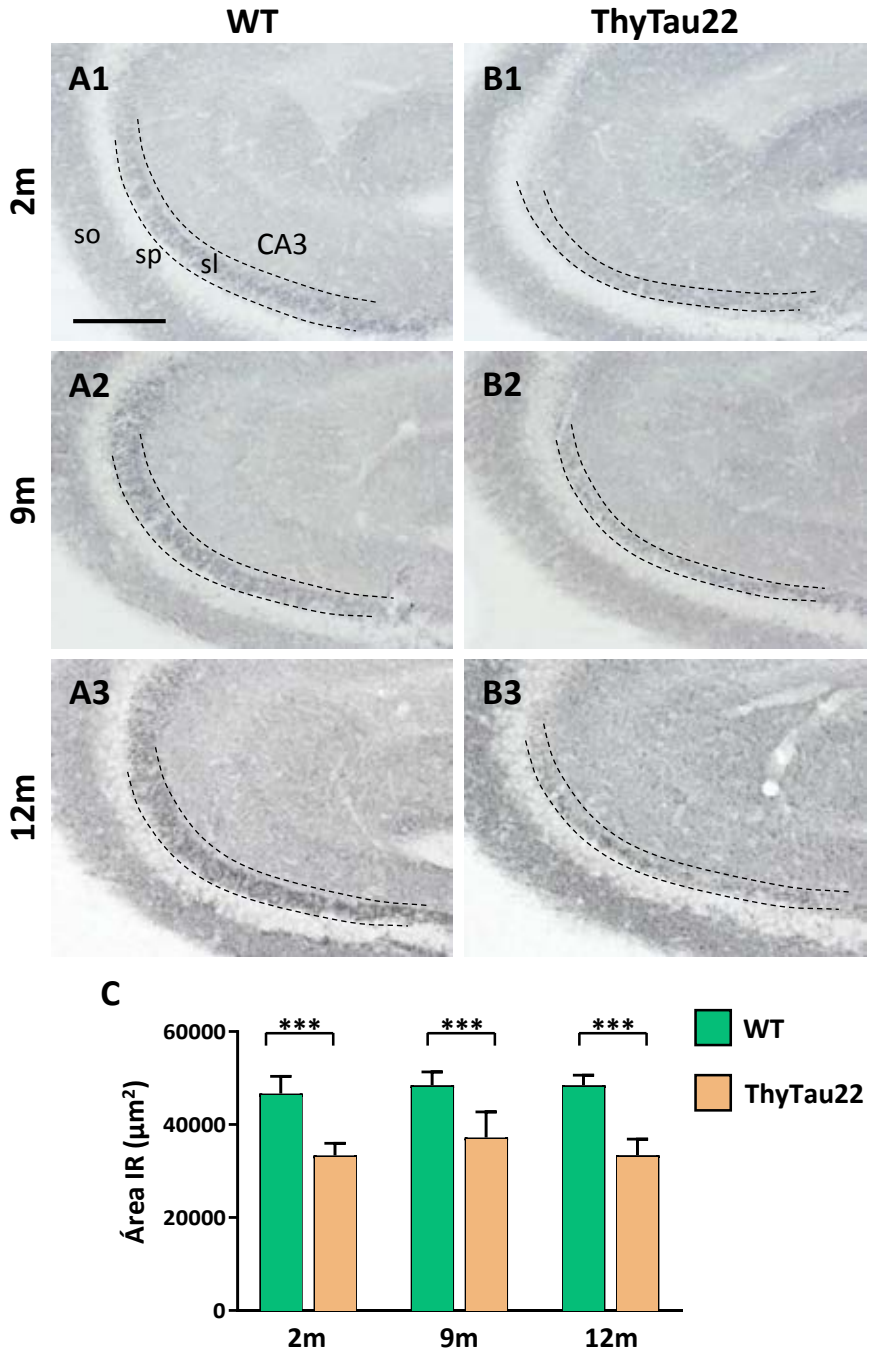


Figura 3.3.2. Patrón de inmunorreactividad para sinaptofisina en el hipocampo de animales WT y ThyTau22 de 2, 9 y 12 meses de edad. El inmunomarcaje para la proteína presináptica sinaptofisina en el hipocampo muestra un patrón laminado similar en ambos genotipos, con mayor intensidad en los estratos oriens, radiado y lúcido, así como en las zonas externa e interna de la capa molecular. En el modelo ThyTau22 se observa una menor inmunorreactividad en el estrato lúcido y en el subículo (flechas) comparado con los WT, especialmente a partir de los 9 meses. *CA: cuerno de Ammón; GD: giro dentado; g: capa granular; h: hilio; m: capa molecular; me: capa molecular externa; mi: capa molecular interna; sl: estrato lúcido; slm: estrato lacunoso-molecular; so: estrato oriens; sp: estrato piramidal; sr: estrato radiado; Sub: subículo*. Barra de escala: 500 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



N= 9-10/edad/genotipo.
ADEVA de una vía F (5,50) = 39,88 P<0,0001.
*Tukey ***p<0,0001*

Figura 3.3.3. Reducción del área inmunorreactiva para sinaptofisina en el estrato lúcido del modelo ThyTau22 desde los 2 meses de edad. Inmunohistoquímica para sinaptofisina en el hipocampo de animales WT (**A1-A3**) y transgénicos de tau (**B1-B3**)**.** En las imágenes se muestra la región CA3 del hipocampo, donde se sitúa el estrato lúcido. Desde edades muy tempranas (2 meses) el espesor de esta capa inmunoteñida es menor en los animales ThyTau22 (**B1**) en comparación con los WT (**A1**). Esta diferencia se mantuvo a los 9 (**A2, B2**) y 12 meses de edad (**A3, B3**). (**C**) Cuantificación del área ocupada por el estrato lúcido inmunomarcado para sinaptofisina. Existen diferencias significativas entre los WT y los ThyTau22 a todas las edades analizadas. *sl: estrato lúcido; so: estrato oriens; sp: estrato piramidal; sr: estrato radiado*. Barra de escala: 200 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

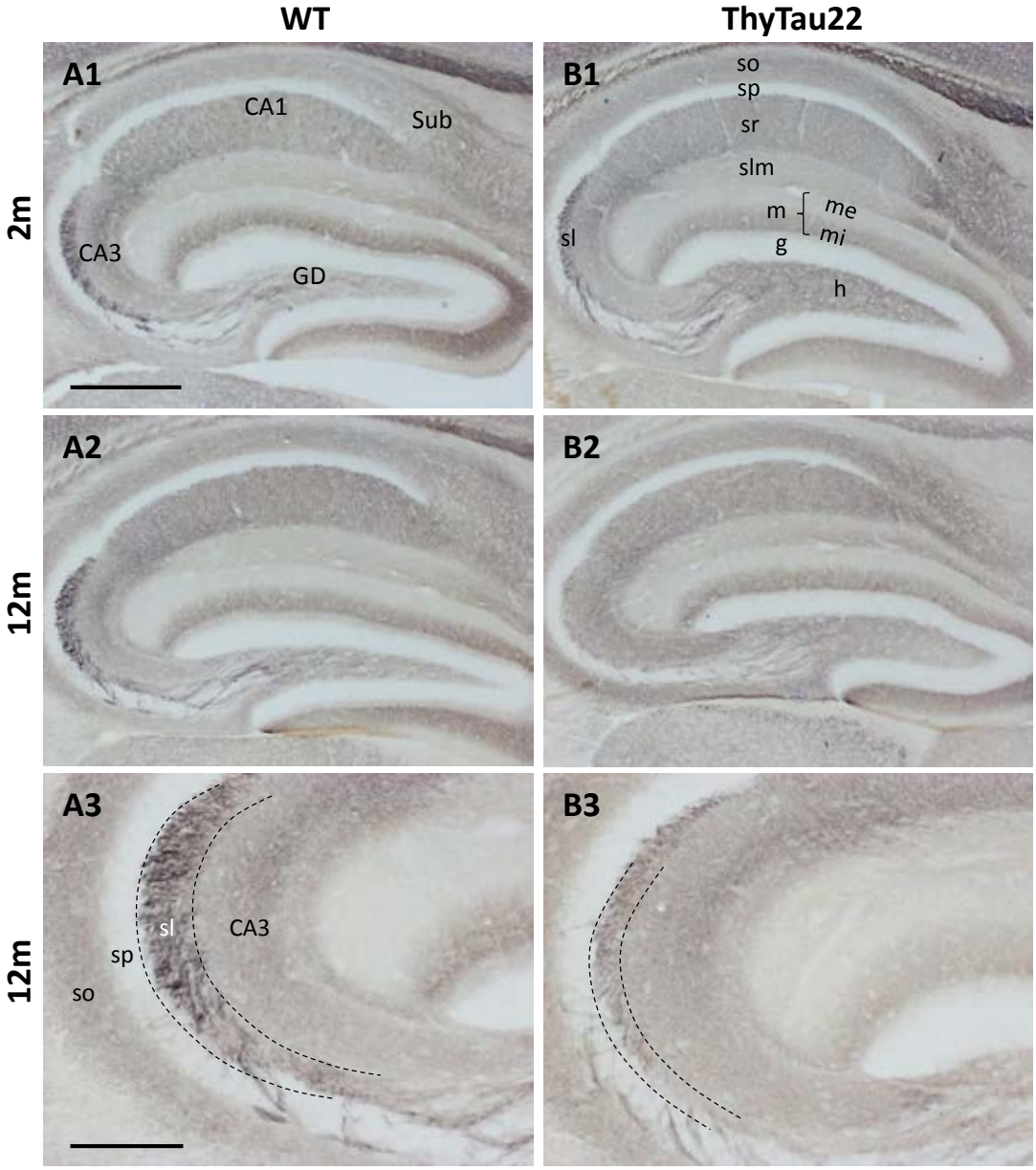
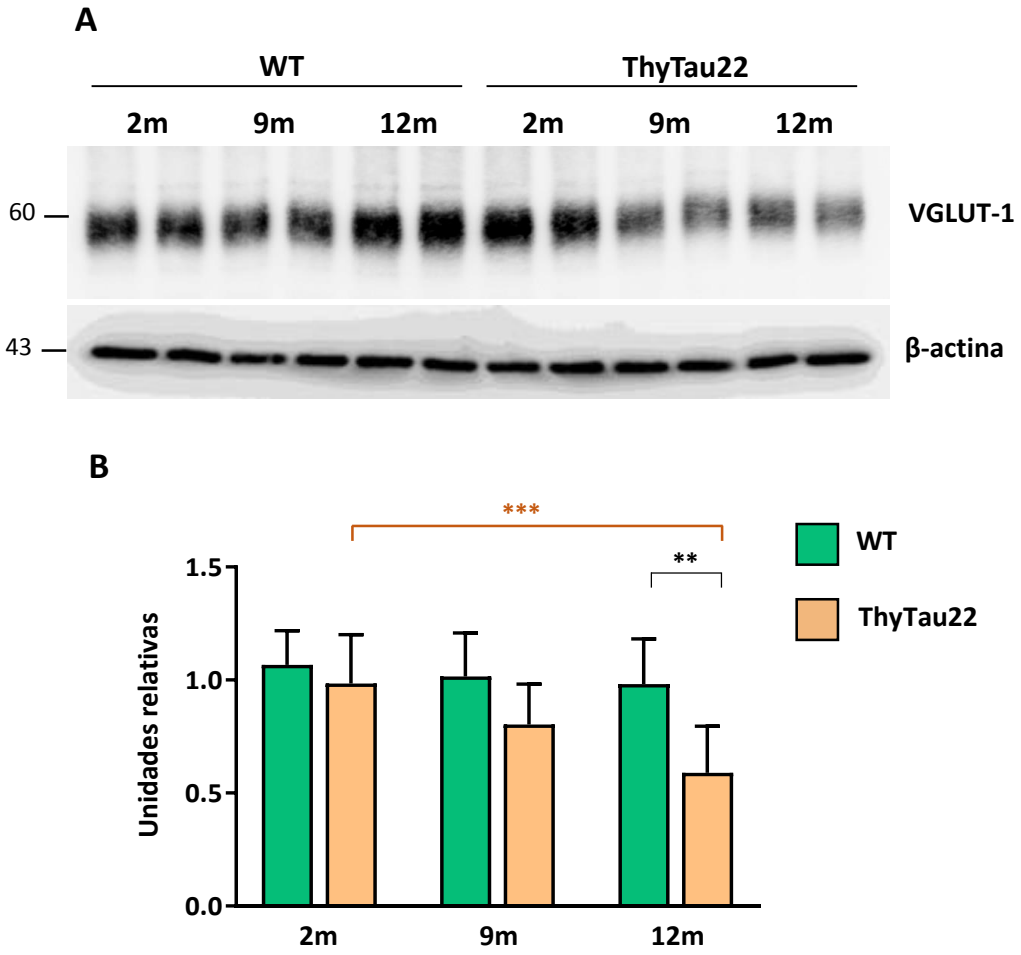


Figura 3.3.4. Estudio comparativo de la inmunorreactividad para el marcador presináptico SNAP-25 en el hipocampo de animales WT y ThyTau22 de 2 y 12 meses. El inmunomarcaje para esta proteína presináptica muestra un típico patrón laminado similar en ambos genotipos, con mayor intensidad en los estratos oriens y radiado de CA1-CA3, en el estrato lúcido de CA3, así como en la zona intermedia de la capa molecular del giro dentado. (**A1, B1**) Imágenes representativas del hipocampo de animales WT y ThyTau22 a 2 meses. El grosor del estrato lúcido (SNAP-25 positivo) se encuentra reducido en los animales ThyTau22 con respecto a los WT de la misma edad. Esta diferencia se mantuvo con el avance de la edad (**A2, B2**). (**A3, B3**) Detalle de la región CA3 de animales de 12 meses donde se delimita el estrato lúcido. *CA: cuerno de Ammón; GD: giro dentado; g: capa granular, h: hilio; m: capa molecular; me: capa molecular externa; mi: capa molecular interna; sl: estrato lúcido; slm: estrato lacunoso-molecular; so: estrato oriens; sp: estrato piramidal; sr: estrato radiado; Sub: subículo*. Barra de escala: 500 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



N = 9-10/edad/genotipo. ANOVA de una vía F (5, 48) = 8,361 P<0,0001
*Tukey **p<0,01, ***p<0,001*

Figura 3.3.5. Reducción de los niveles del transportador vesicular de glutamato VGLUT-1 en el hipocampo de los animales ThyTau22. (**A**) Western-blot representativo y (**B**) cuantificación de los niveles totales de la proteína de terminales presinápticos excitatorios VGLUT-1 en el hipocampo de ratones ThyTau22 y WT a los 2, 9 y 12 meses de edad. A partir de los 9 meses se aprecia una tendencia a la reducción de los niveles de esta proteína en este modelo de taupatía, que finalmente alcanza la significancia estadística a los 12 meses. Los valores están referidos con respecto a los animales WT de 2 meses.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

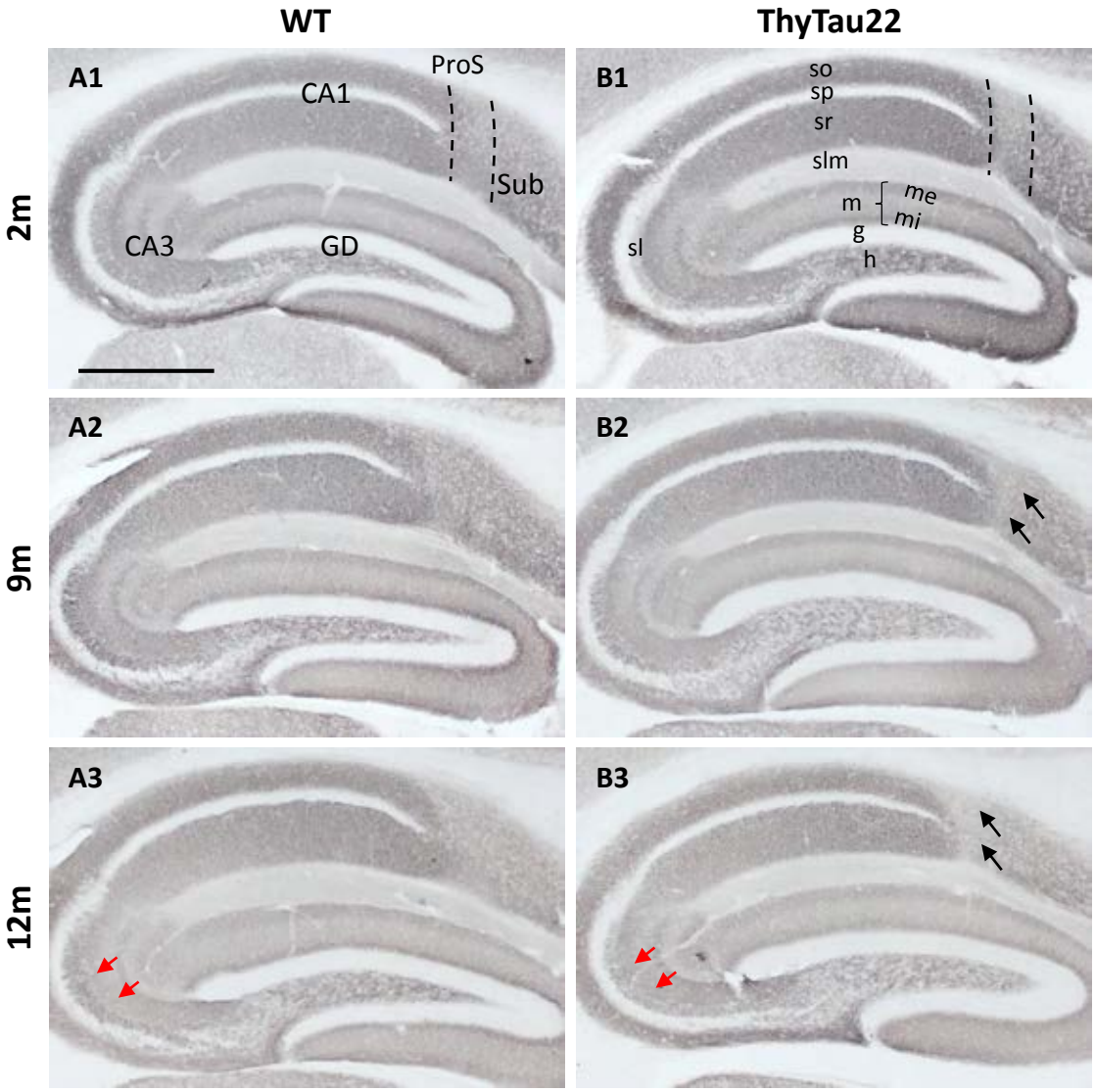
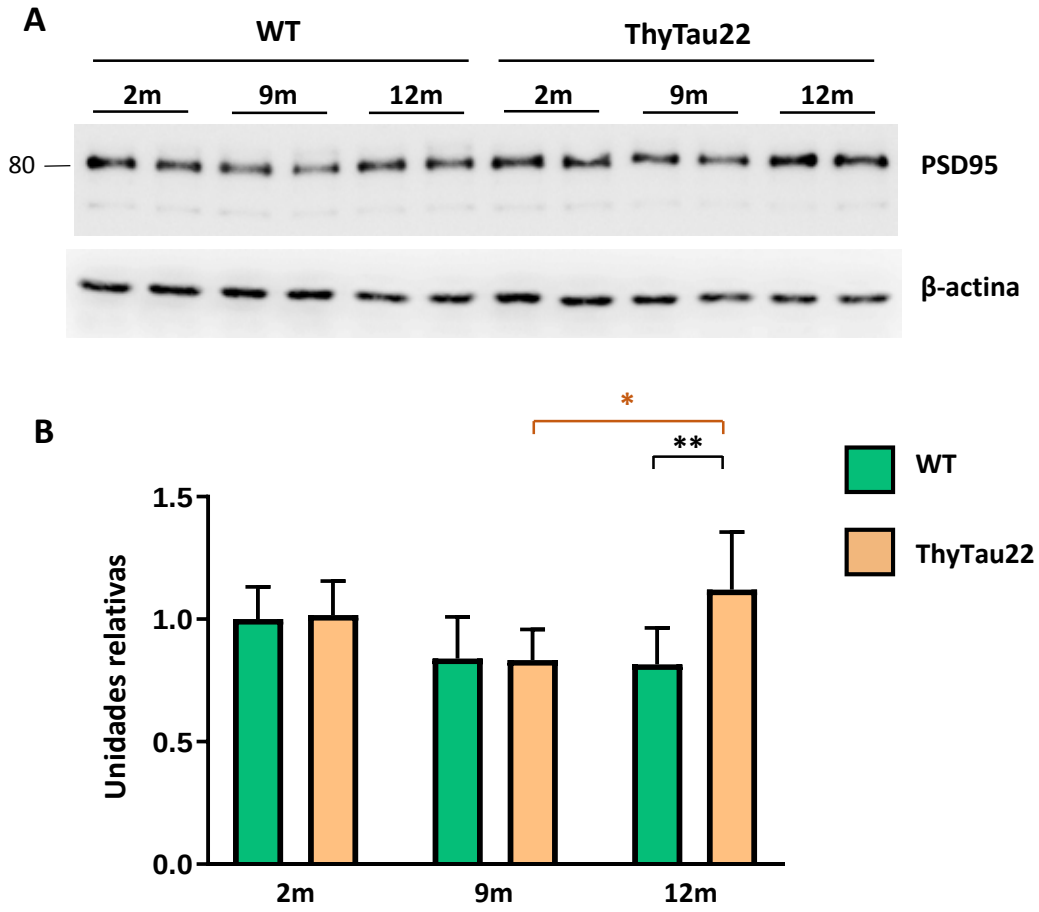


Figura 3.3.6. Estudio inmunohistoquímico del transportador vesicular de glutamato VGLUT-1 en el hipocampo de animales WT y ThyTau22 de 2, 9 y 12 meses de edad. El inmunomarcaje para esta proteína presináptica muestra un típico patrón laminado en el hipocampo, similar en ambos genotipos. Existe una ligera y progresiva disminución en la intensidad del marcaje en todo el hipocampo de los transgénicos comparados con los WT. Se aprecia una reducción específica y progresiva de inmunorreactividad en el prosubículo (flechas negras) a los 2 (**B1**) y 9 meses de edad (**B2**), así como en el estrato lúcido de CA3 (flechas rojas), especialmente a los 12 meses (**B3**). *CA: cuerno de Ammón; GD: giro dentado; g: capa granular, h: hilio; m: capa molecular; me: capa molecular externa; mi: capa molecular interna; ProS: prosubículo; sl: estrato lúcido; slm: estrato lacunoso-molecular; so: estrato oriens; sp: estrato piramidal; sr: estrato radiado; Sub: subículo*. Barra de escala: 500 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



N = 8/edad/genotipo. ADEVA de una vía F (5, 41) = 4,67 P=0,0018
*Tukey *p<0,05, **p<0,01*

Figura 3.3.7. Alteración de los niveles de la proteína postsináptica PSD95 en el hipocampo de los animales ThyTau22 a edades avanzadas. (**A**) Western-blot representativo y (**B**) cuantificación de los niveles de la proteína PSD95 en el hipocampo de ratones ThyTau22 y WT a los 2, 9 y 12 meses de edad. No se observan cambios a edades tempranas entre ambos grupos. A los 12 meses existe un aumento significativo de los niveles de esta proteína en los animales ThyTau22 con respecto a los WT de 12 meses y ThyTau22 de 9 meses. Los valores están referidos con respecto a los animales WT de 2 meses.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

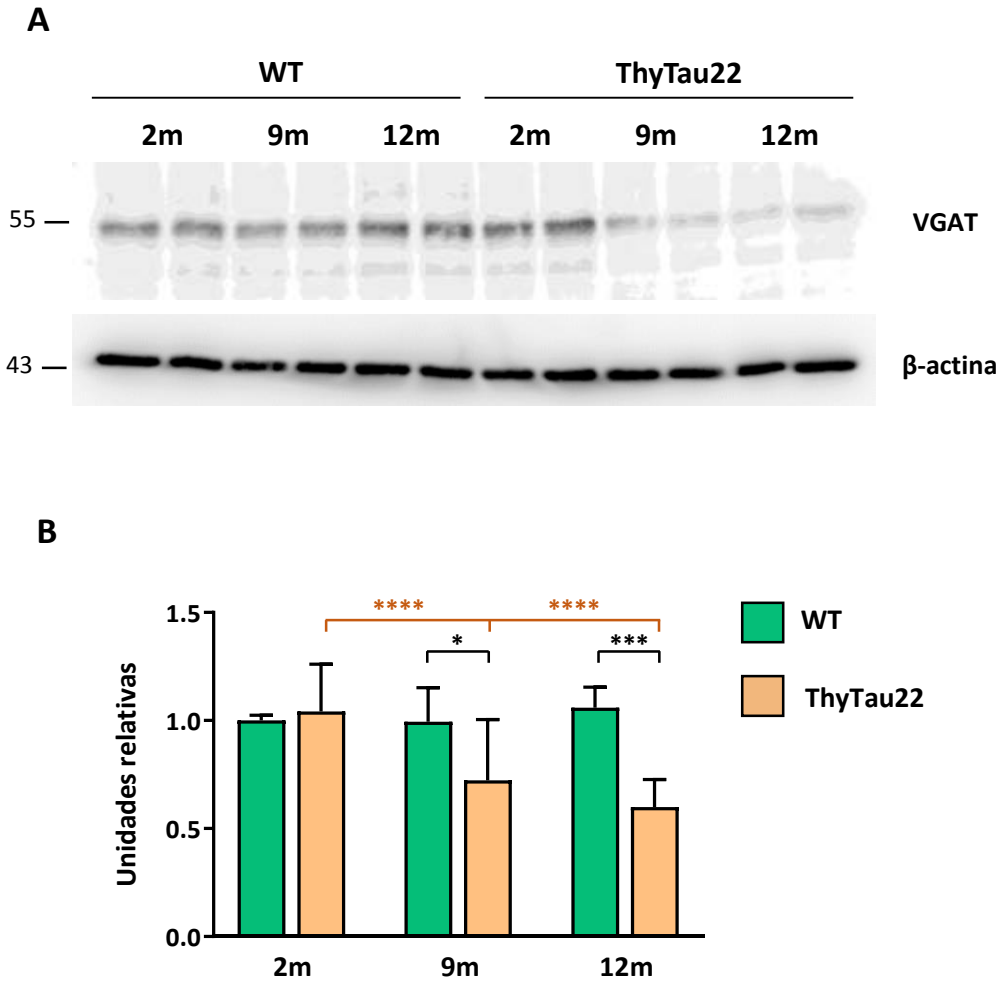


Figura 3.3.8. Reducción de los niveles del transportador vesicular de GABA (VGAT) en el hipocampo de los animales ThyTau22. (**A**) Western-blot representativo y (**B**) cuantificación de los niveles totales de la proteína de terminales presinápticos inhibitorios VGAT en el hipocampo de ratones ThyTau22 y WT a los 2, 9 y 12 meses de edad. A partir de los 9 meses de edad existe una reducción significativa de los niveles de esta proteína en el modelo transgénico respecto a los WT, y las diferencias aumentan progresivamente con la edad. Los valores están referidos con respecto a los animales WT de 2 meses.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

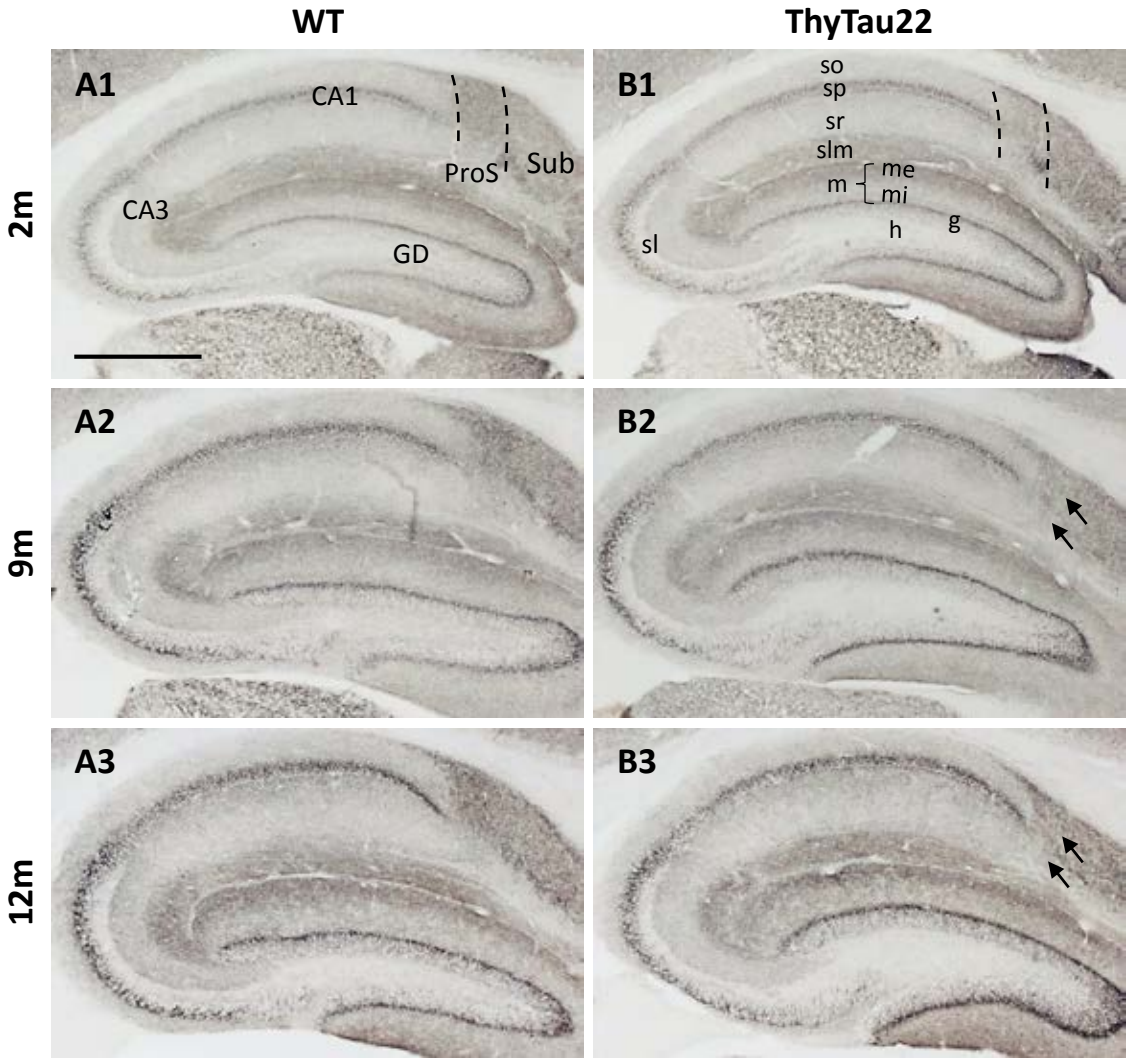


Figura 3.3.9. Patrón de inmunorreactividad para el transportador vesicular VGAT en el hipocampo de animales WT y ThyTau22 de 2, 9 y 12 meses de edad. El patrón de inmunomarcaje es similar en WT (**A1-A3**) y ThyTau22 (**B1-B3**) a todas las edades analizadas. La marca se concentra sobre la capa piramidal de CA1-CA3 y la capa granular del giro dentado. Destaca la tinción del estrato lacunoso-molecular de CA1-CA3 y la capa molecular externa del giro. Se observa una disminución de inmunorreactividad en prosubículo a los 2, 9 y 12 meses (flechas, **B1-B3**). *CA: cuerno de Ammón; GD: giro dentado; g: capa granular, h: hilio; m: capa molecular; me: capa molecular externa; mi: capa molecular interna; ProS: prosubículo; sl: estrato lúcido; slm: estrato lacunoso-molecular; so: estrato oriens; sp: estrato piramidal; sr: estrato radiado; Sub: subículo*. Barra de escala: 500 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

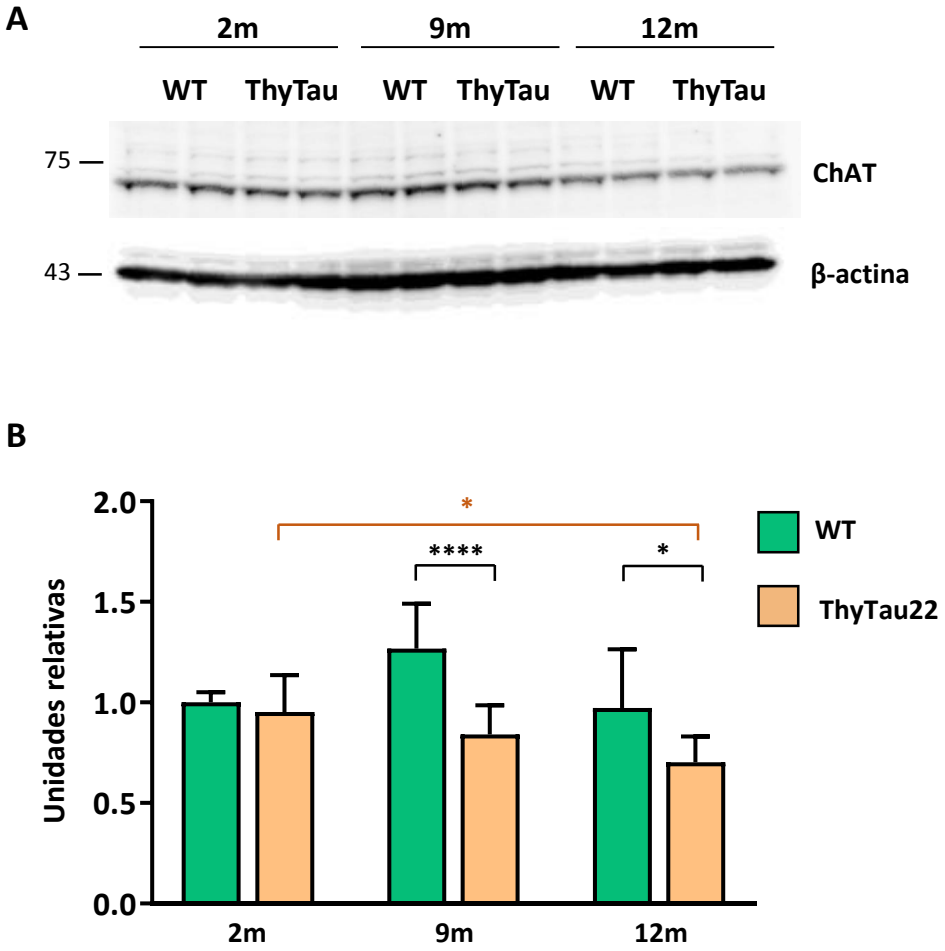


Figura 3.3.10. Disminución de los niveles de la enzima acetilcolina transferasa (ChAT) en el hipocampo del modelo ThyTau22 con la edad. (**A**) Western-blot representativo y (**B**) cuantificación de los niveles totales del marcador de terminales colinérgicos ChAT en el hipocampo de ratones ThyTau22 y WT de 2, 9 y 12 meses de edad. Los niveles hipocampales de la enzima ChAT en los animales ThyTau22 son significativamente menores que los presentes en los WT a partir de los 9 meses de edad. Los valores están referidos con respecto a los animales WT de 2 meses.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

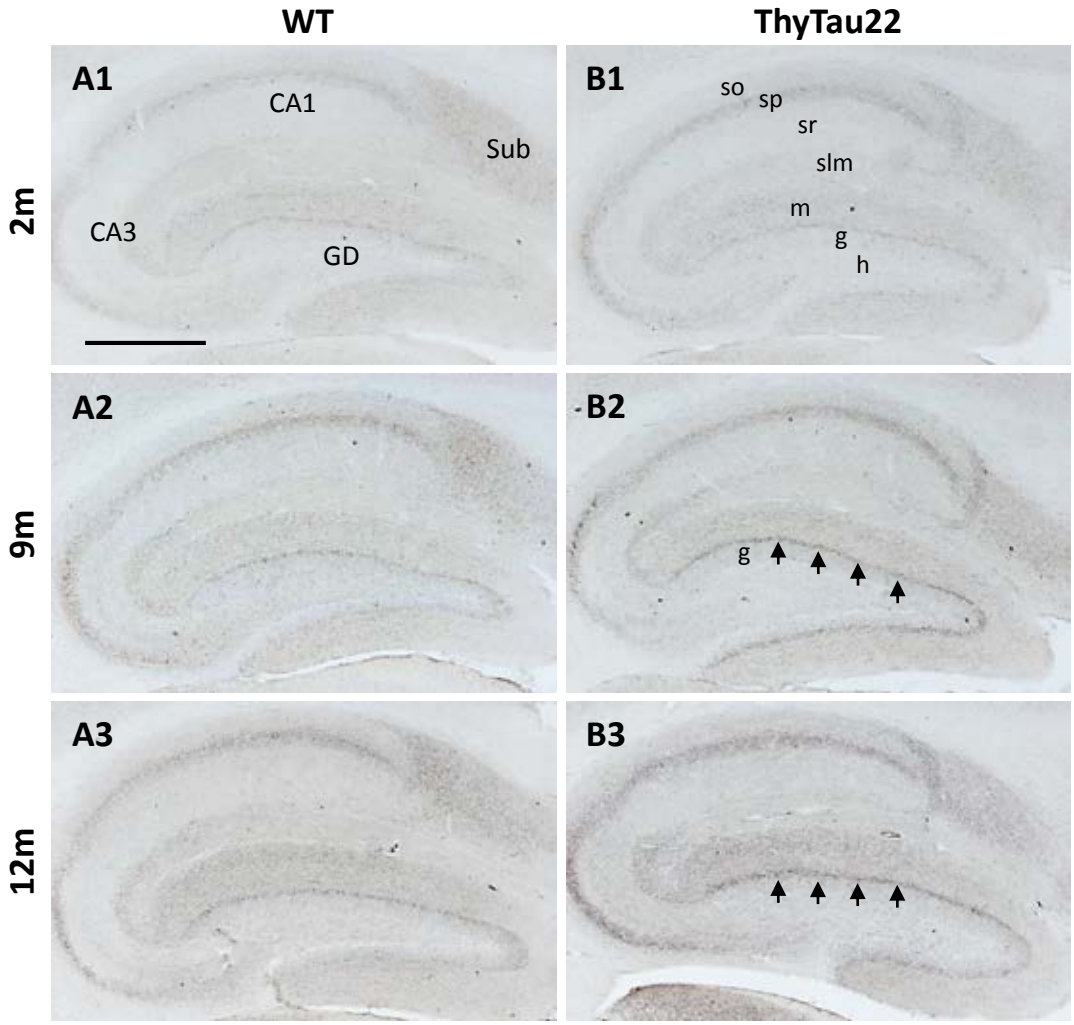


Figura 3.3.11. Estudio comparativo de la distribución de las aferencias colinérgicas en el hipocampo de animales WT y ThyTau22. Inmunohistoquímica para la enzima acetilcolina transferasa (ChAT) a 2 (**A1, B1**), 9 (**A2, B2**) y 12 (**A3, B3**) meses de edad. (**A, B**) En ambos genotipos se observa plexos muy inmunorreactivos adyacentes a las capas de células principales. En los animales transgénicos, a partir de los 9 meses (**B2**), existe un aumento de la inmunorreactividad en el plexo supragranular (flechas negras) del giro dentado con respecto a los ThyTau22 más jóvenes (**B1**) y los WT de la misma edad (**A2**). Esta diferencia se mantiene en edades más avanzadas (12 meses; **A3, B3**). *CA: cuerno de Ammón; GD: giro dentado; g: capa granular; h: hilio; m: capa molecular; sl: estrato lúcido; slm: estrato lacunoso-molecular; so: estrato oriens; sp: estrato piramidal; sr: estrato radiado; Sub: subículo*. Barras de escala: 500 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

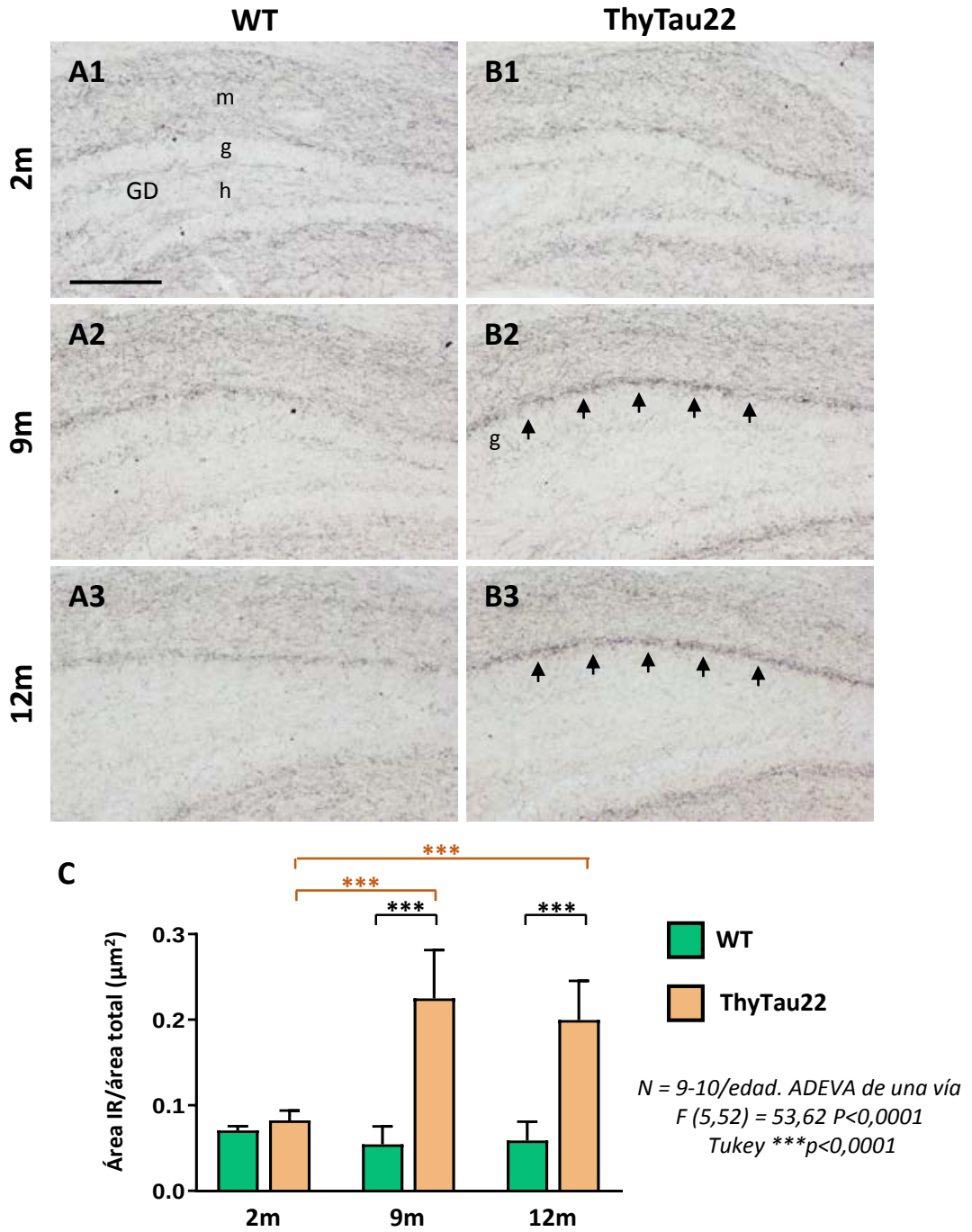


Figura 3.3.12. Aumento del inmunomarcaje en el plexo ChAT-positivo de la zona supragranular del giro dentado en el modelo ThyTau22 partir de los 9 meses de edad. (**A, B**) Imágenes representativas del giro dentado inmunoteñidas para ChAT en animales WT (**A**) y ThyTau22 (**B**) a los 2, 9 y 12 meses. Se observa un incremento de la tinción en la capa supragranular (flechas negras) en los ThyTau22 de 9 y 12 meses de edad (**C**) Cuantificación del área ChAT-positiva supragranular. El aumento del área inmunorreactiva de este plexo en el GD de los ThyTau22 fue significativo a partir de los 9 meses de edad en comparación con los ratones transgénicos WT así como con los animales transgénicos más jóvenes (2 meses). *GD: giro dentado; g: capa granular; h: hilio; m: capa molecular.* Barra de escala: 200 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

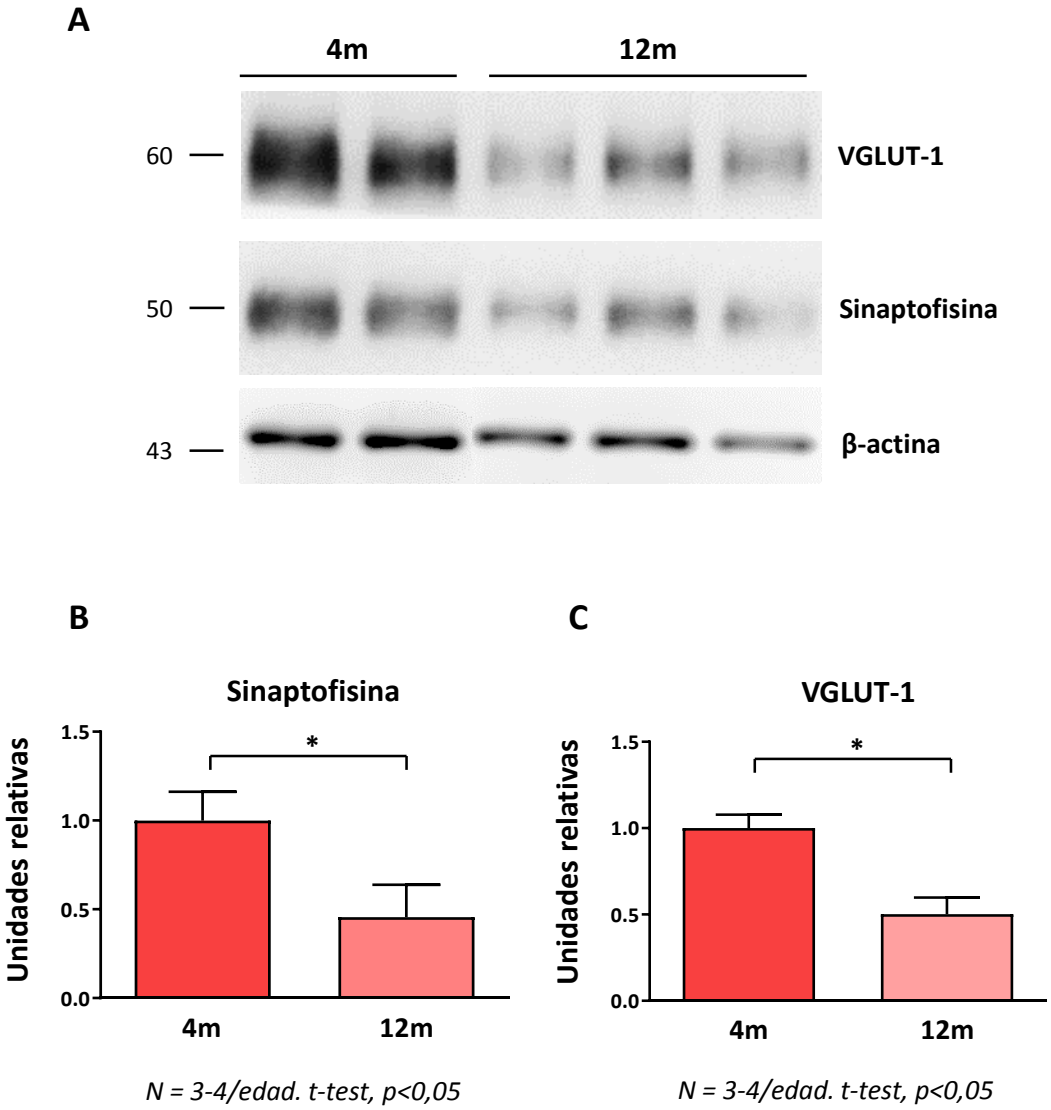


Figura 3.3.13. Reducción significativa de marcadores sinápticos en el hipocampo del modelo P301S. (**A**) Western-blots representativos de los marcadores presinápticos sinaptofisina y de sinapsis glutamatérgicas (VGLUT-1) en el modelo P301S a 4 y 12 meses de edad. (**B, C**) Cuantificación de los niveles hipocampales de cada marcador. Los niveles de sinaptofisina (**B**) y de VGLUT-1 (**C**) están significativamente disminuidos a los 12 meses con respecto a edades más jóvenes (4 meses). Los valores están referidos con respecto a los animales P301S de 4 meses.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

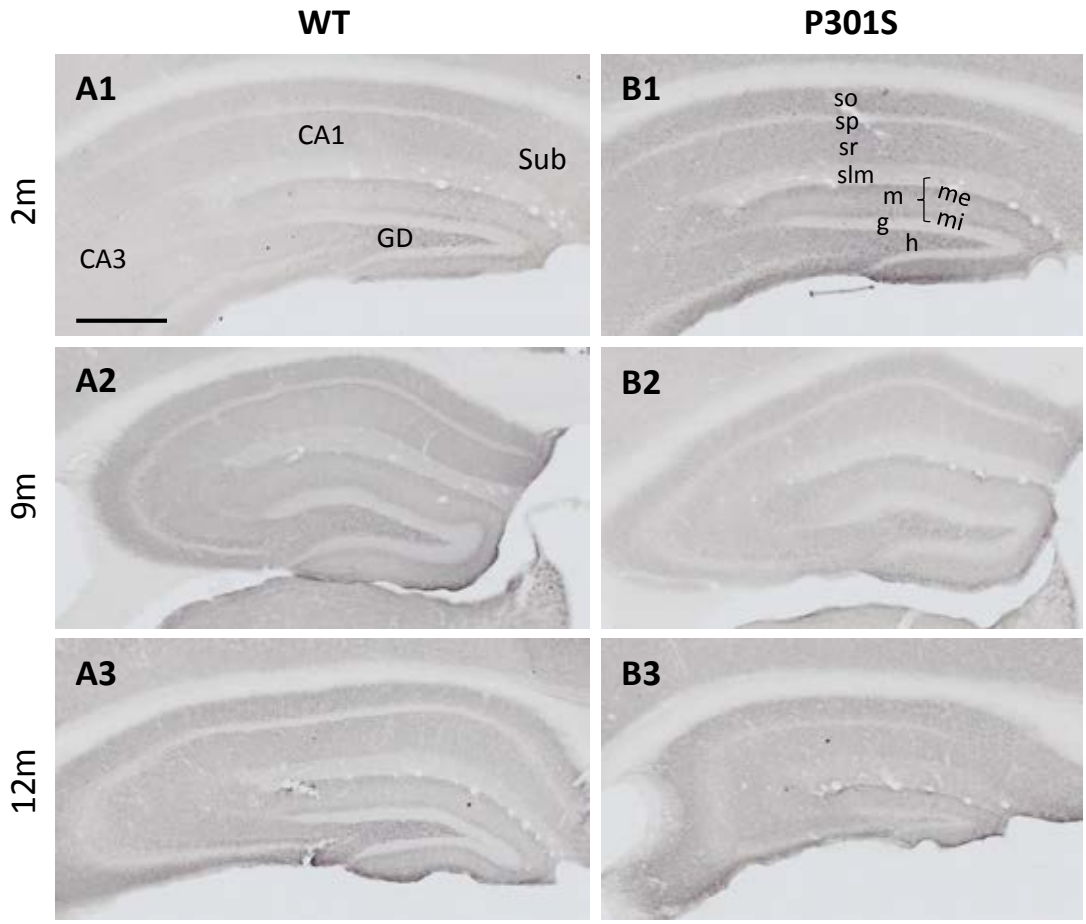


Figura 3.3.14. Patrón de inmunorreactividad para sinaptofisina en el hipocampo de animales WT y P301S de 2, 9 y 12 meses de edad. El inmunomarcaje para la proteína presináptica sinaptofisina muestra el típico patrón laminado en el hipocampo de ambos genotipos. Desde los 9 meses, se observa una menor inmunorreactividad en el neuropilo del modelo P301S, en comparación con los WT. A los 12 meses existe una importante atrofia hipocampal en los animales transgénicos. *CA: cuerno de Ammón; GD: giro dentado; g: capa granular, h: hilio; m: capa molecular; me: capa molecular externa; mi: capa molecular interna; sl: estrato lúcido; slm: estrato lacunoso-molecular; so: estrato oriens; sp: estrato piramidal; sr: estrato radiado; Sub: subículo*. Barra de escala: 400 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.3.6. EL HIPOCAMPO DEL MODELO P301S, PERO NO EL DEL THYTAU22, PRESENTA PÉRDIDA DE INTERNEURONAS GABAÉRGICAS POSITIVAS PARA PARVALBÚMINA

La parvalbúmina (PV) es una proteína de unión a calcio presente en un grupo de interneuronas GABAérgicas del hipocampo. Estas células intervienen en la inhibición perisomática (células en cesto) y de los segmentos iniciales de los axones (células en candelabro) de las neuronas principales, desempeñando papeles cruciales en la determinación de actividades oscilatorias y la regulación de la plasticidad sináptica en procesos de aprendizaje. Las interneuronas PV-positivas son vulnerables en el cerebro de pacientes con EA, lo que parece estar asociado a la patología tau (Sanchez-Mejias et al., 2019). Por ello, analizó la vulnerabilidad de esta subpoblación en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S. El marcaje inmunohistoquímico de PV mostró un patrón característico en los modelos transgénicos ThyTau22 (**Fig. 3.3.15 B**) y P301S (**Fig. 3.3.16 B**) similar a los controles WT (**Fig. 3.3.15 A y Fig. 3.3.16 A**). Los somas de estas interneuronas se concentraban especialmente en el estrato oriens y piramidal de CA1-CA3, mientras que en el giro dentado se localizaban adyacentes a la capa granular. Se hizo patente la inervación perisomática de las neuronas principales (tanto piramidales como granulares) al igual que las prolongaciones de las interneuronas hacia los estratos oriens y radiado de CA1, y hacia la capa molecular e hilio en el giro. Sin embargo, inicialmente no se apreciaron diferencias entre los dos modelos ni con sus correspondientes WT, ni en la cantidad de somas PV-positivos ni en el neuropilo marcado.

Para detectar si existía pérdida de este tipo de interneuronas, se realizó una cuantificación estereológica de la densidad numérica (DN, número de células/mm^3) de somas PV-positivos en la región de CA1 en ambos modelos a edad avanzada (18 meses para ThyTau22, y 12 meses para P301S). En los animales ThyTau22 (**Fig. 3.3.15 C**), la densidad numérica (células/mm^3) no fue significativamente distinta a la de los WT (2068,16 ± 351,37 vs 1967,65 ± 533,33). Del mismo modo, la densidad de la población de neuronas PV-positivas no varió de forma relevante entre los WT (3896,4 ± 467,1) y los P301S (4503,7 ± 930,59) (**Fig. 3.3.16 C**). Sin embargo, este modelo presenta una marcada atrofia del hipocampo (**Fig. 3.3.16 B1**) al igual que de otras regiones corticales. Por tanto, se hizo un estudio complementario para detectar posibles cambios en la población total de interneuronas PV-positivas debido a la pérdida de volumen hipocampal a los 12 meses. Usando el método Cavalieri se estimó el volumen de CA1 en las secciones cuantificadas del modelo P301S, permitiendo calcular el número total de somas PV-positivos en esta región (**Fig. 3.3.16 D**). Así, se confirmó que había un descenso significativo (-38,66 ± 12,41%; $p<0,01$) de neuronas PV-positivas en el hipocampo de los P301S en comparación con los WT de la misma edad. Por lo tanto, existe un proceso degenerativo de

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

interneuronas que contienen PV en el hipocampo del modelo P301S asociado a la atrofia hipocampal, mientras que en el ThyTau22 esta subpoblación no se ve afectada.

3.3.7. DEGENERACIÓN COLINÉRGICA EN EL TELENCÉFALO BASAL DE AMBOS MODELOS DE TAUPATÍA

En los pacientes de EA, los déficits colinérgicos correlacionan bien con la pérdida de neuronas colinérgicas en el telencéfalo basal. Los principales núcleos colinérgicos que inervan al hipocampo son el *septum* medial (SM) y el núcleo vertical de la banda de Broca (BDBv) (Mesulam, 2004). Así, la pérdida general de aferencias colinérgicas observada en la región hipocampal podría deberse, como ocurre en la EA, a una pérdida de neuronas en los núcleos basales telencefálicos. La corteza recibe inervación del núcleo basal de Meynert (NBM; o magnocelular en el caso de los roedores) que representa el primer núcleo de la región subcortical en degenerar en la EA (Whitehouse et al., 1982). Por tanto, se analizaron el SM y NBM en los cerebros de animales WT, ThyTau22 y P301S mediante inmunohistoquímica para la enzima ChAT a la edad de 12 meses.

En el *septum* medial se observó una menor inmunorreactividad en los animales ThyTau22 (**Fig. 3.3.17 B1**) y P301S (**Fig. 3.3.17 C1**) en comparación con los WT (**Fig. 3.3.17 A1**) de la misma edad, asociada a una aparente reducción tanto del neuropilo como del número de células inmunopositivas. Del mismo modo, en el NBM, donde las neuronas colinérgicas forman una red dendrítica muy característica (Bigl and Arendt, 1991), el marcaje para ChAT también se vió significativamente disminuido en los animales transgénicos ThyTau22 (**Fig. 3.3.17 B2**) y P301S (**Fig. 3.3.17 C2**) con respecto a los WT (**Fig. 3.3.17 A2**). La cuantificación estereológica (**Fig 3.3.18**) de la densidad numérica (DN; número de células/mm^3) de estas células ChAT-positivas mostró que en el caso del SM (**Fig. 3.3.18 A1**), los animales ThyTau22 presentaron una reducción del 32,6 ± 9,9% con respecto a los WT de su edad (16304,89 ± 2410,8 vs. 24183,75 ± 1691,5, respectivamente; $p<0,01$). Lo mismo sucedió con los animales P301S (**Fig. 3.3.18 B1**) que presentaron un descenso del 21,61 ± 7,71% con respecto a los WT (20520,5 ± 2018,4 vs. 26177,7 ± 2715,1 respectivamente; $p<0,05$). En el NBM, los animales ThyTau22 (**Fig. 3.3.18 A2**) presentaron una bajada del 35,53 ± 4,07% con respecto a su grupo WT (9672,8 ± 610,9 vs. 15003,75 ± 2715,09 respectivamente; $p<0,01$). Por último, en el modelo P301S (**Fig. 3.3.18 B2**) la reducción con respecto al grupo WT fue de un 37,67 ± 8,92% (14942,5 ± 2140,4 vs. 23974,1 ± 3140,6, respectivamente; $p<0,01$).

Por tanto, en estos dos modelos de taupatía existe un proceso neurodegenerativo que afecta a los núcleos telencefálicos basales, y en consecuencia a la inervación colinérgica del hipocampo, al igual que ocurre en pacientes de EA.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

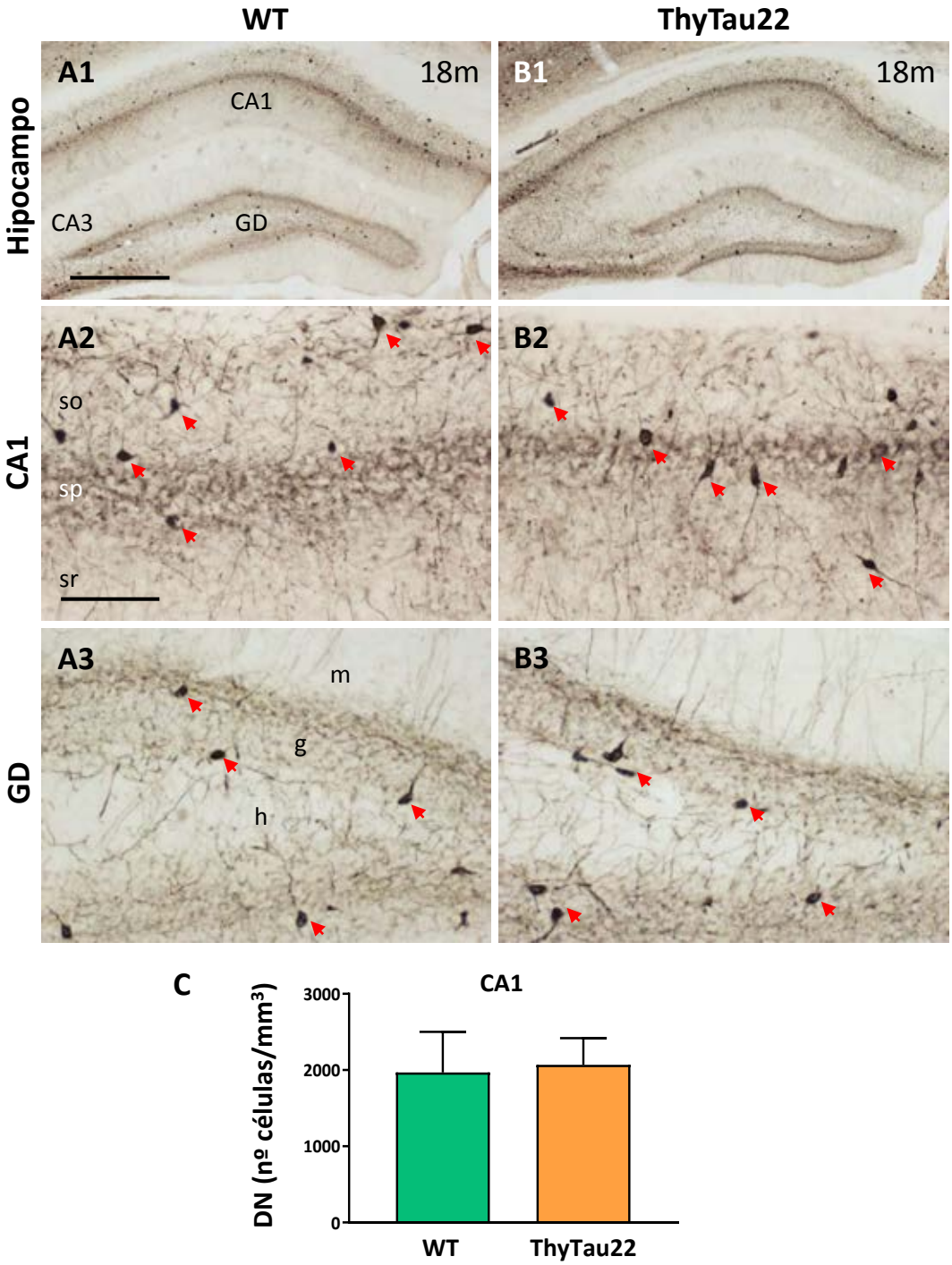


Figura 3.3.15. La densidad de interneuronas PV-positivas no se encuentra alterada en el hipocampo del modelo ThyTau22. Inmunotinción para parvalbúmina en el hipocampo de animales WT (**A**) y ThyTau22 (**B**) de 18 meses de edad. Se muestran imágenes representativas del neuropilo y somas (flechas) inmunomarcados en CA1 (**A2, B2**) y giro dentado (**A3, B3**) de ambos grupos. Destaca el plexo perisomático PV-positivo en las capas piramidal y granular. No se observan diferencias entre ambos genotipos en ninguna de las dos regiones. (**C**) No existen variaciones significativas en la densidad numérica (DN; número de somas PV-positivos/mm^3) de este tipo celular en la región CA1 de los animales ThyTau22 y WT de la misma edad (n=4/grupo). *CA: cornu ammonis; GD: giro dentado; g: granular; h: hilio; m: molecular; so: estrato oriens; sp, estrato piramidal; sr, estrato radiado.* Barras de escala: A1, B1: 200 µm; A2-B3: 100 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

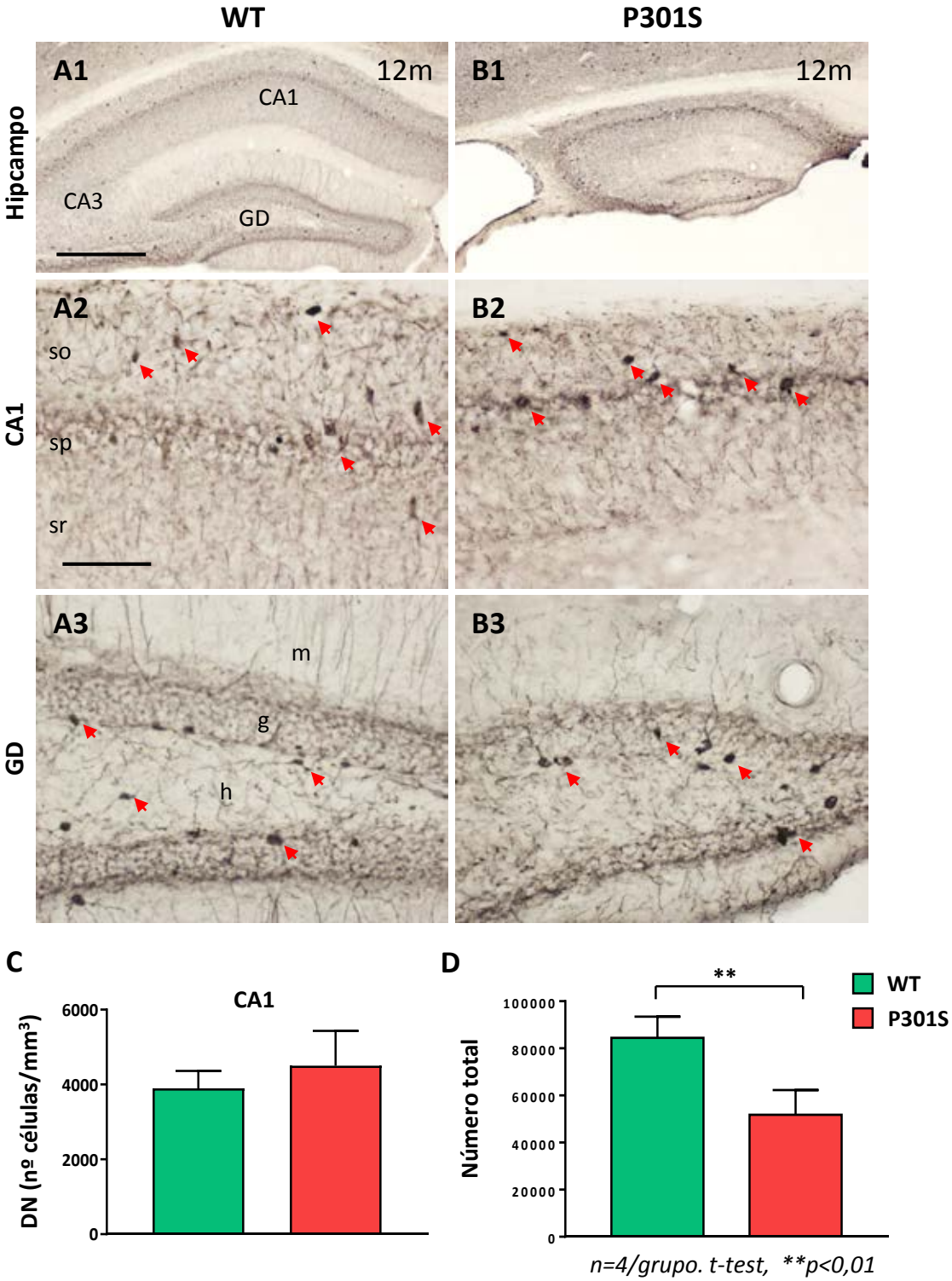


Figura 3.3.16. Pérdida de interneuronas PV-positivas en el hipocampo del modelo P301S. Inmunohistoquímica para parvalbúmina en el hipocampo de animales WT (**A**) y P301S (**B**) de 12 meses de edad. Se aprecia la fuerte atrofia hipocampal de los ratones P301S. (**A2, B2**) Las imágenes muestran el neuropilo y somas (flechas) marcados en la región CA1 de ambos grupos. (**A3, B3**) Marcaje en el giro dentado. No se observan alteraciones en el patrón de inmunomarcaje entre ambos genotipos. (**C**) La densidad numérica (DN; número de somas PV-positivos/mm^3) en la región CA1 de los P301S no difiere de los WT (n=4/grupo). (**D**) El número total de células PV-positivas de los P301S se ve reducido de manera significativa. *CA: cornu ammonis; GD: giro dentado; g: granular; h: hilio; m: molecular; so: estrato oriens; sp: estrato piramidal; sr: estrato radiado.* Barras de escala: A1, B1: 200 µm; A2-B3: 100 µm.

UNIVERSIDAD DE MALAGA

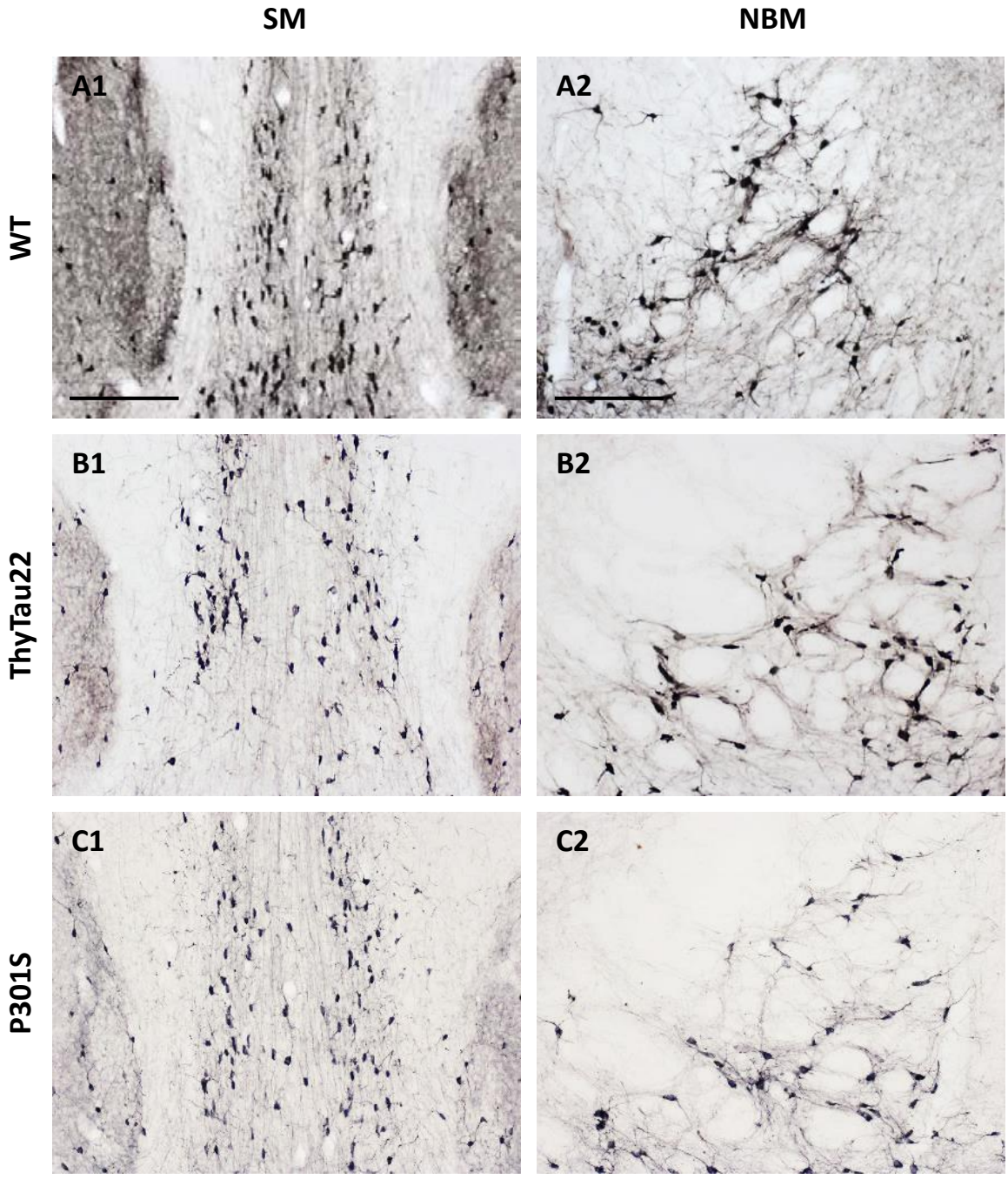


Figura 3.3.17. Reducción de la población de neuronas ChAT-positivas en el telencéfalo de los modelos ThyTau22 y P301S. Inmunohistoquímica para ChAT en el septum medial (**A1-C1**) y el núcleo basal de Meynert (**A2-C2**) a los 12 meses de edad. Imágenes representativas que muestran una menor densidad de neuronas inmunopositivas en estas áreas de los animales ThyTau22 (**B**) y P301S (**C**) comparados con los WT (**A**) de la misma edad. *SM: septum medial; NBM: núcleo basal de Meynert*. Barras de escala: 200 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

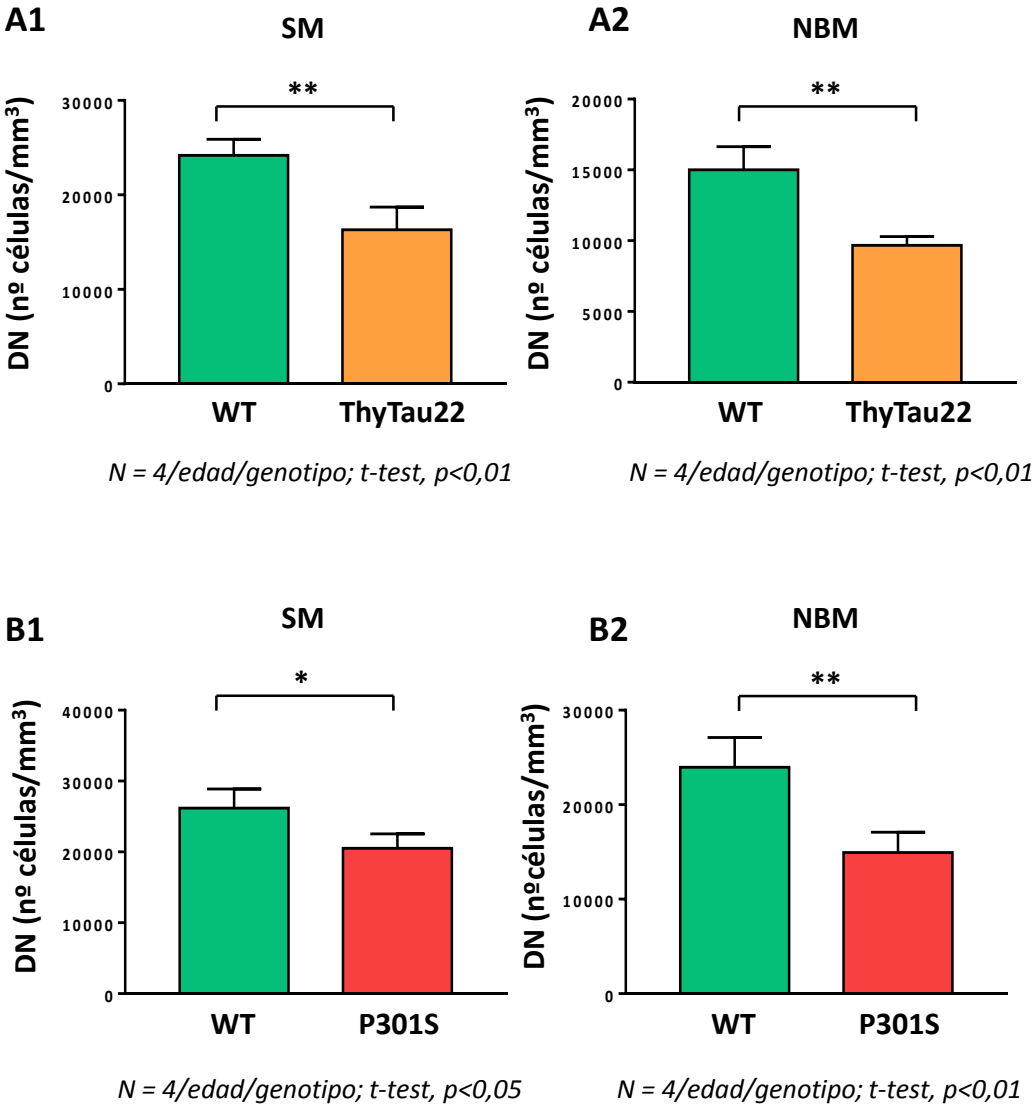


Figura 3.3.18. Pérdida de neuronas colinérgicas en los núcleos del telencéfalo basal de los modelos ThyTau22 y P301S. Cuantificación por estereología de la densidad numérica de células ChAT-positivas en el septum medial (A1, B1) y núcleo basal de Meynert (A2, B2) a los 12 meses de edad. Tanto en los animales ThyTau22 (A) como en los P301S (B) la densidad de células ChAT-positivas desciende significativamente en los dos núcleos colinérgicos analizados (n=4/grupo). *SM: septum medial; NBM: núcleo basal de Meynert*.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.3.8. ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DEL PROCESO NEURODEGENERATIVO EN EL HIPOCAMPO DE LOS MODELOS THYTAU22 Y P301S

Además de los problemas derivados de la pérdida de función de tau, su translocación hacia el compartimento somatodendrítico también entraña una ganancia de toxicidad. Existe relación entre la patología de tau, la disfunción de orgánulos subcelulares como las mitocondrias (Cheng and Bai 2018) o el núcleo (Eftekharzadeh et al., 2018), y los procesos que regulan la calidad de estos orgánulos como la autofagia y la mitofagia (Chakravorty et al., 2019). Es por ello que se planteó realizar una caracterización ultraestructural de signos de degeneración neuronal mediante microscopía electrónica de transmisión en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S.

En primer lugar, se analizaron a nivel subcelular las neuronas piramidales de la región CA1 ya que se caracterizan por la acumulación patológica de fosfo-tau en ambos modelos. En el hipocampo de animales ThyTau22 de 6 meses se encontró que algunas neuronas presentaban indentaciones en el núcleo (**Fig. 3.3.19 A-C**), que podían llegar a tener una longitud considerable, y que contenían citoplasma neuronal con aspecto granulado (**Fig. 3.3.19 D**). También, se encontraron algunas mitocondrias con crestas dilatadas (**Fig. 3.3.19 E**). A 12 meses, (**Fig. 3.3.20**) la frecuencia de aparición de células piramidales con indentaciones nucleares fue en aumento (**Fig. 3.3.20 A**, detalle de neurona con varias indentaciones nucleares). Estas neuronas también presentaban cisternas del aparato de Golgi con dilataciones (**Fig. 3.3.20 B**), y un mayor número de mitocondrias con alteraciones en las crestas y matriz amorfa (**Fig. 3.3.20 C**). A edades muy avanzadas (18 meses) constatamos que los núcleos con indentaciones de gran tamaño se encontraron mayoritariamente en neuronas con NFTs (**Fig. 3.3.21 A-C**). Aunque con MET no se llegó a observar inmunorreactividad para AT8 en estas indentaciones nucleares (**Fig. 3.3.21 D** e inserto), a microscopía óptica de campo claro encontramos somas de neuronas piramidales corticales con indentaciones nucleares positivas para AT8 (no mostrado). Además, tanto en el hipocampo (inserto en **Fig. 3.3.21 A**) como en corteza (no mostrado), hallamos cuerpos neuronales con indentaciones nucleares positivas para el anticuerpo específico de tau humano HT7. Por otro lado, es importante destacar que las neuronas con fosfo-tau presentaban con mayor frecuencia mitocondrias con estructuras patológicas, llegando a presentar roturas en su envuelta de doble membrana (**Fig. 3.3.22**). Estas mitocondrias con morfología patológica se localizaron tanto en los somas (**Fig. 3.3.22 A-C**) como en las dendritas (**Fig. 3.3.22 D-F**).

A continuación, se realizó el estudio ultraestructural de las neuronas principales de CA1 en el modelo P301S a edades avanzadas (12 meses; **Figs. 3.3.23 y 3.3.24**). A esta edad, la patología de tau ya está completamente extendida por todo el hipocampo y en esta región se

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

encontraron algunas neuronas con mayor electrodensidad y morfología degenerativa (**Fig. 3.3.23 A**). La observación a MET evidenció que este modelo animal también reproduce los eventos patológicos descritos para el ratón ThyTau22. Así, en las células piramidales de P301S se identificaron indentaciones nucleares profundas (**Fig. 3.3.23 A y B**), aunque parecían ser menos frecuentes que en el modelo ThyTau22. A microscopía óptica de campo claro se detectaron núcleos con indentaciones positivas para AT8 en algunas células granulares (ver inserto en **Fig. 3.3.23 B**) y corticales (no mostrado). La saturación en la inmunotinción y el grado de empaquetamiento en la capa piramidal no permitió discriminar con claridad la presencia de estas indentaciones en el hipocampo propio del modelo P301S. En las células piramidales también se hallaron evidencias del deterioro del aparato de Golgi, como la presencia de cisternas vacuolizadas (**Fig. 3.3.23 C**) y de patología mitocondrial (**Fig. 3.3.23 C y D**) tanto en las zonas de neuropilo (ver detalles de estrato oriens; **Fig. 3.3.24 A-C**) como en los somas de la capa piramidal. Además, las alteraciones morfológicas de las mitocondrias de nuevo aparecieron estrechamente asociadas a la acumulación de fosfo-tau en las neuronas, tanto en CA1 (**Fig. 3.3.24 D**) como en el giro dentado (detalles de somas en **Fig. 3.3.25 A y C**; detalles de neuropilo en **Fig. 3.3.25 B y D**). En este punto, es importante recordar que en el P301S la patología de tau aparece con anterioridad en el giro dentado que en el hipocampo propio. En comparación con ThyTau22 (**Fig. 3.3.26 A y B**), la frecuencia y severidad de la patología mitocondrial en este modelo parecía mayor (**Fig. 3.3.26 C y D**). Las mitocondrias de las neuronas granulares se caracterizaron por presentar frecuentemente la matriz bastante desestructurada, desorganización de las crestas y desintegración de su doble membrana.

Por último, llamó especialmente la atención la presencia de grupos de células con citoplasma y núcleo poco electrodenso (**Fig. 3.3.27 A-C**) en el estrato granular del giro dentado del modelo P301S. La mayoría de estas células se situaban en la zona subgranular y tenían una forma similar al resto de las células granulares (de menor tamaño que las piramidales y con forma redondeada) por lo que las identificamos como neuronas. Estas células se caracterizaban por presentar un núcleo poco electrodenso en comparación con las circundantes, y un citoplasma con aspecto muy vacuolizado y altamente desorganizado (**Fig. 3.3.27 D**). En su interior la cantidad de mitocondrias con morfología anómala resultó ser bastante elevada (**Fig. 3.3.27 E y F**). Frecuentemente, estas neuronas se encontraron asociadas y en íntimo contacto con células microgliales (**Fig. 3.3.28**), alrededor de las cuales el espacio extracelular se mostraba especialmente dilatado (**Fig. 3.3.28 C y D**). Al analizar la capa granular del giro dentado de los animales ThyTau22 de la misma edad (12 meses, **Fig. 3.3.29**) no se encontraron grupos de neuronas vacuolizadas. Excepcionalmente apareció alguna neurona con una porción de citoplasma en contacto con microglía y ligeramente menos electrodenso que el de las neuronas circundantes.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Por tanto, en este bloque hemos descrito que en ambos modelos de taupatía existen alteraciones de los orgánulos subcelulares que están asociadas con la presencia de fosfo-tau, destacando la severidad de la patología mitocondrial en el modelo P301S. Además, en este modelo hemos encontrado neuronas con fenotipos degenerativos tanto en el estrato piramidal como en el giro dentado. Algunas neuronas granulares del P301S a edades avanzadas presentaban un fenotipo muy poco electrodenso asociadas al contacto con células microgliales.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

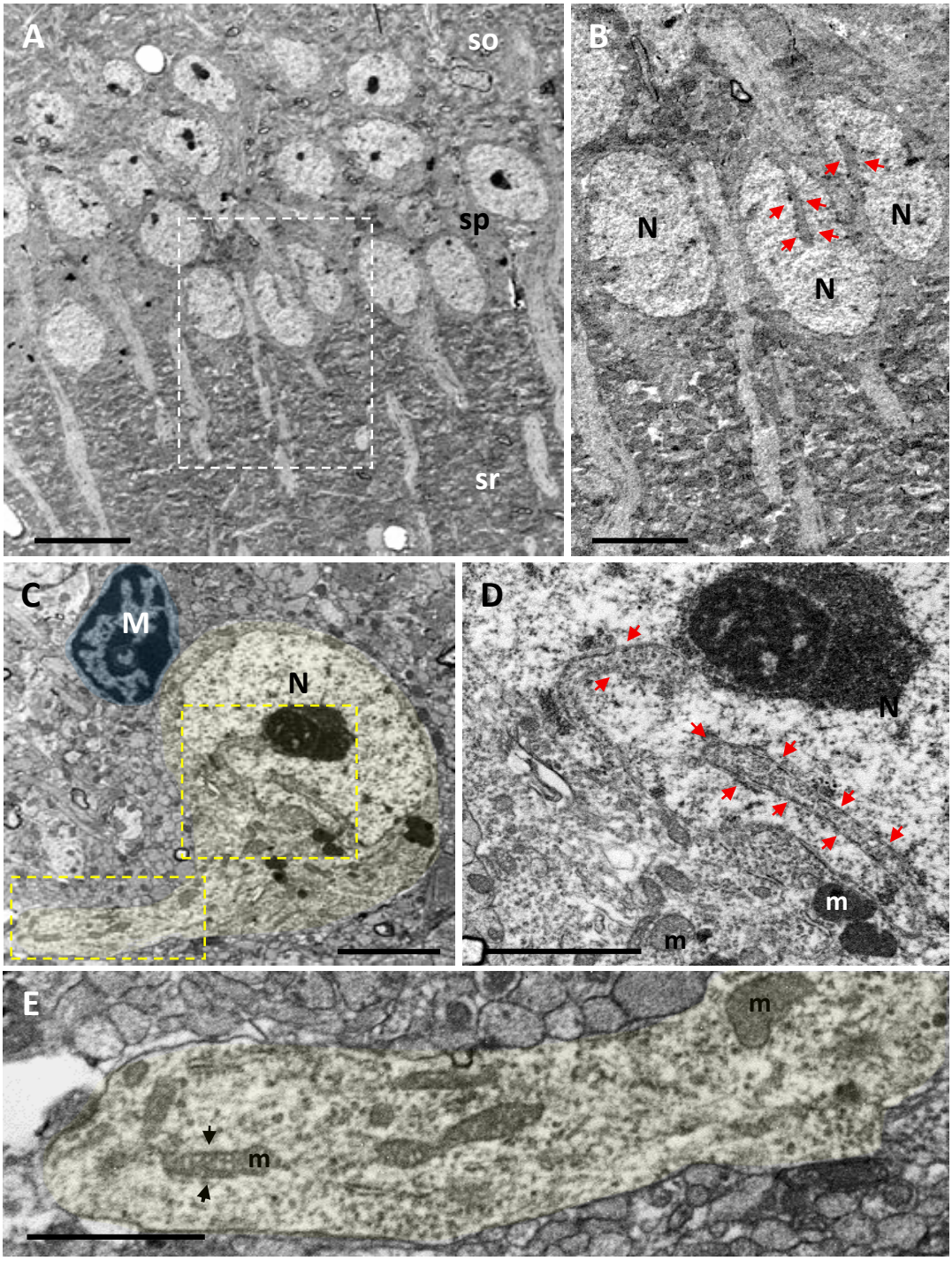


Figura 3.3.19. Estudio ultraestructural de las neuronas piramidales en el hipocampo del modelo ThyTau22 a los 6 meses de edad. Microscopía electrónica de transmisión. (**A**) Imagen panorámica de la capa piramidal de CA1. Algunas neuronas presentan profundas indentaciones nucleares (flechas rojas en **B**). (**C**) Neurona (amarillo) con grandes indentaciones en el núcleo (flechas en **D**) y una célula microglial asociada (M, azul). Algunas mitocondrias presentan crestas dilatadas (flechas en **E**). *M: microglía; m: mitocondria; N: núcleo; so: estrato oriens; sp: estrato piramidal; sr: estrato radiado.* Barras de escala: A, B: 10 µm; C-E: 2,5 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

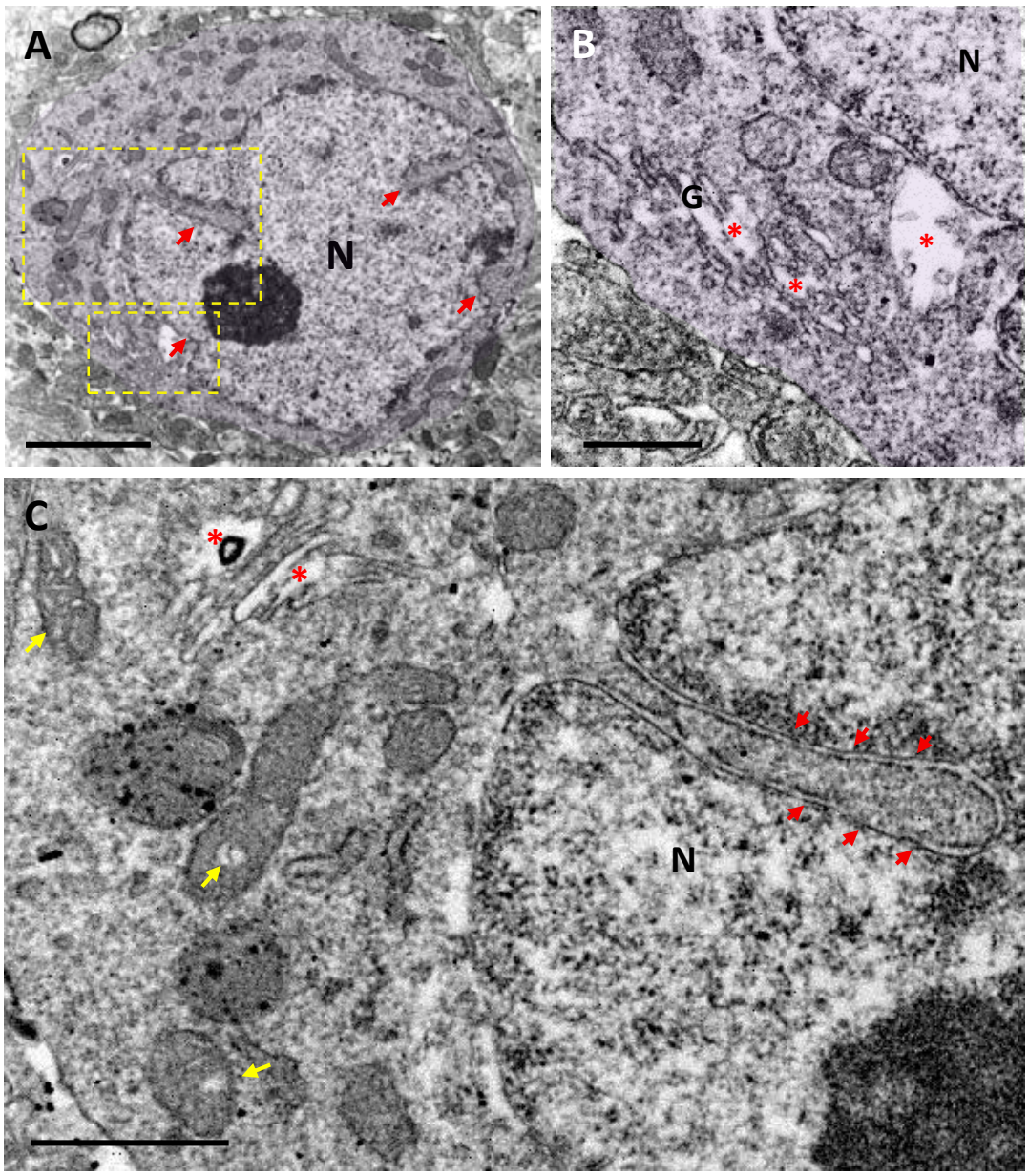


Figura 3.3.20. Anormalidades morfológicas en orgánulos de neuronas piramidales del modelo ThyTau22 a los 12 meses. Microscopía electrónica de transmisión. (**A**) Panorámica de neurona piramidal de CA1 con varias indentaciones nucleares (flechas rojas). (**B**) Ampliación donde se aprecian dilataciones de las cisternas del aparato de Golgi (asteriscos). (**C**) Detalle del citoplasma neuronal mostrando una de las indentaciones del núcleo (flechas rojas), aparato de Golgi dilatado (asteriscos) y mitocondrias con crestas dilatadas y huecos en su interior (flechas amarillas). *G: aparato de Golgi; m: mitocondria; N: núcleo.* Barras de escala: A: 2 µm; B, C: 0,5 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

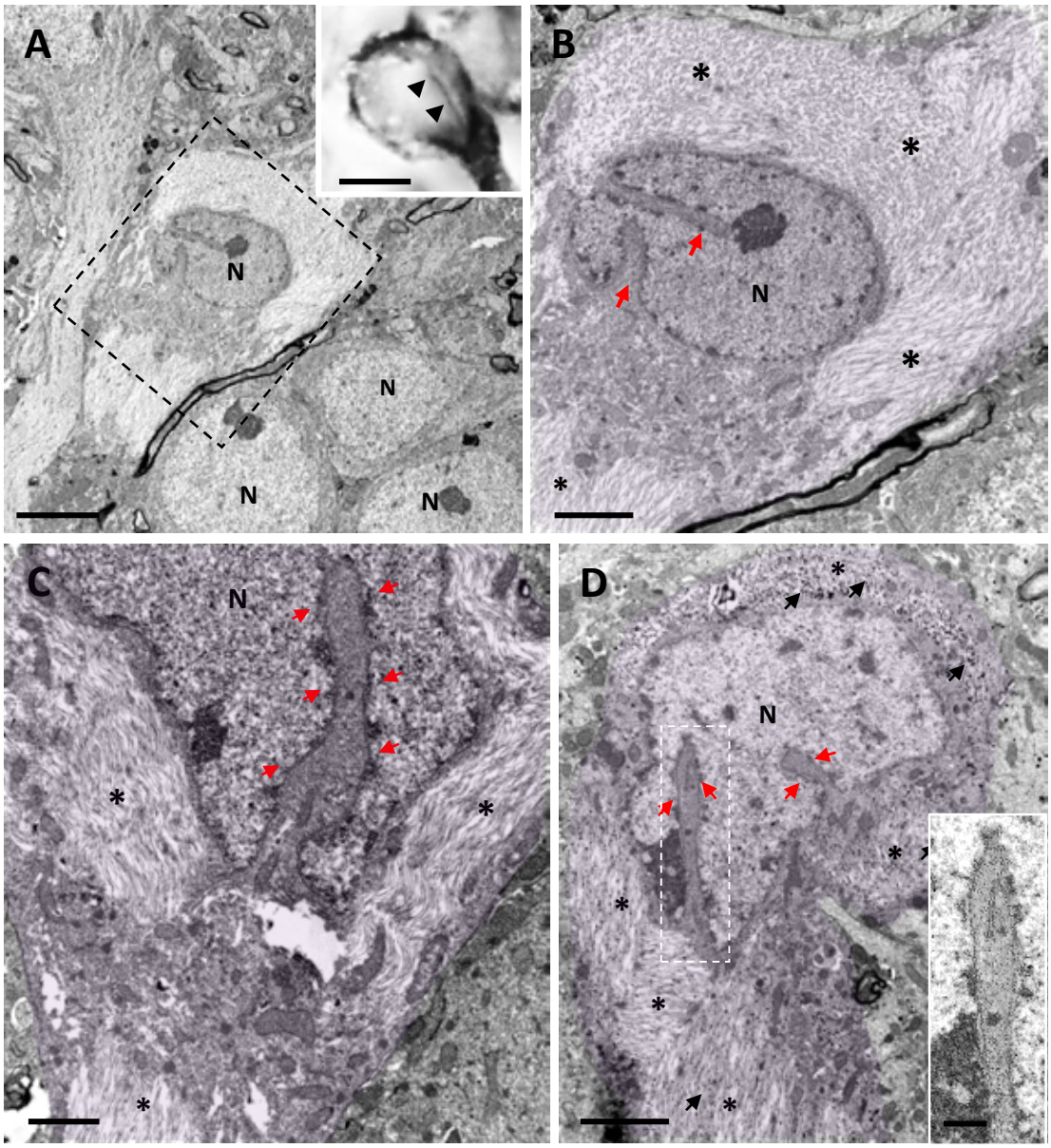


Figura 3.3.21. Las indentaciones nucleares son más frecuentes en las neuronas con ovillos neurofibrilares. Microscopía electrónica de transmisión. ThyTau22 de 18 meses. (**A**) Porción del estrato piramidal en el que se observa un cuerpo neuronal con ovillos neurofibrilares (asteriscos, detalle en **B**) y varias indentaciones nucleares (flechas rojas en **B**). El inserto en **A** muestra un detalle a microscopía óptica de neurona piramidal con indentación nuclear positiva (flechas) para el anticuerpo HT7 (tau humano). (**C**) Detalle de neurona piramidal (morado) con ovillo (asteriscos) y gran indentación nuclear (flechas rojas). (**D**) Detalle de neurona piramidal (morado) con ovillos neurofibrilares (asteriscos) positivos para AT8 (flechas) y varias indentaciones nucleares (flechas rojas, detalle inserto en **D**). *N: núcleo.* Barras de escala: A: 5 µm; B, D: 2 µm; C, inserto en D: 1 µm, inserto en A: 7 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

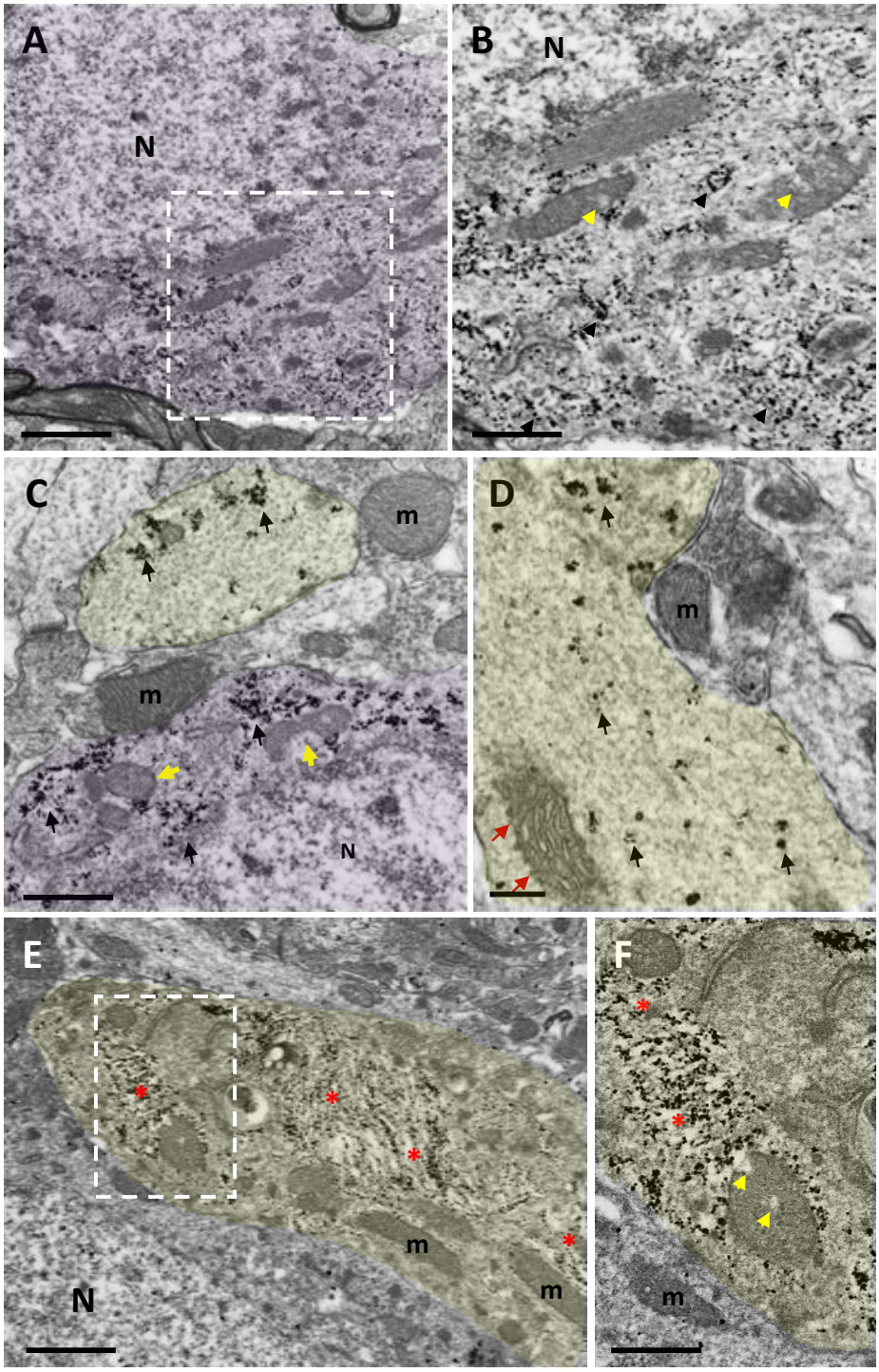


Figura 3.3.22. Presencia de mitocondrias con morfología patológica en las neuronas con fosfo-tau del modelo ThyTau22. Inmuno-oro para AT8 a microscopía electrónica de transmisión. **(A, C)** Detalles de somas de neuronas piramidales (morado) de un animal de 18 meses de edad con filamentos positivos para AT8 (flechas negras). En **B y C,** se señalan mitocondrias con morfología anómala (flechas amarillas). (**D**) Detalle de dendrita (amarillo) con fosfo-tau (flechas negras). En las neuronas positivas para AT8 encontramos mitocondrias anómalas (flechas rojas), mientras que en las células adyacentes sin patología tau, las mitocondrias (m) presentan morfología normal. (**E, F**) Dendrita (amarillo) con filamentos AT8-positivos agrupados (asterisco rojo) cerca de mitocondrias con morfología normal (m). Se observa una mitocondria con pérdida de integridad estructural (flechas amarillas en **F**) rodeada de marca para AT8. *m: mitocondria; N: núcleo.* Barras de escala: A, E: 1 µm; B, F: 0,5 µm; D: 0,2 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

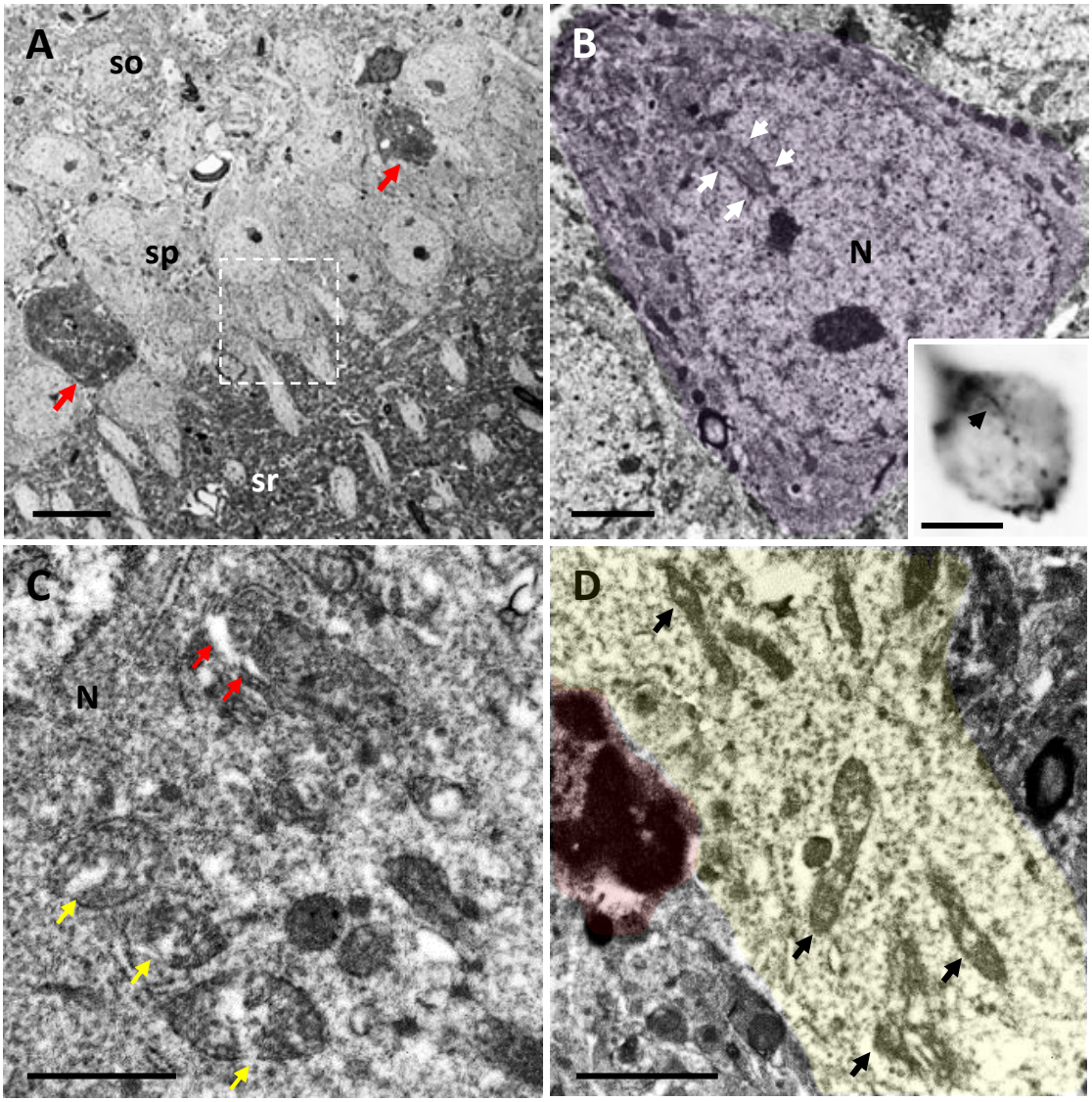


Figura 3.3.23. Estudio ultraestructural de las neuronas piramidales de CA1 en el modelo P301S. Microscopía electrónica de transmisión. (**A**) Panorámica de la capa piramidal de CA1 en animal P301S de 12 meses de edad. Se observan neuronas con alta electrodensidad y morfología degenerativa (flechas rojas). (**B**) Neurona piramidal (morado) con indentación nuclear (flechas blancas). Inserto en **B**, se muestra imagen a microscopía óptica de soma de neurona granular con indentación nuclear inmunomarcada con AT8 (flecha). (**C**) Detalle de la pérdida de integridad estructural de las mitocondrias (flechas amarillas) y dilataciones en las cisternas del Golgi (flechas rojas) de una neurona piramidal. (**D**) Detalle de dendrita apical (amarillo) con varias mitocondrias elongadas que presentan alteraciones estructurales (flechas negras). Una célula microglial (rojo) contacta con la dendrita. N: núcleo; *sr: estrato radiado; sp: estrato piramidal; so: estrato oriens*. Barras de escala: A: 10 µm; B, D: 2 µm; C: 1 µm; inserto en B: 7 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

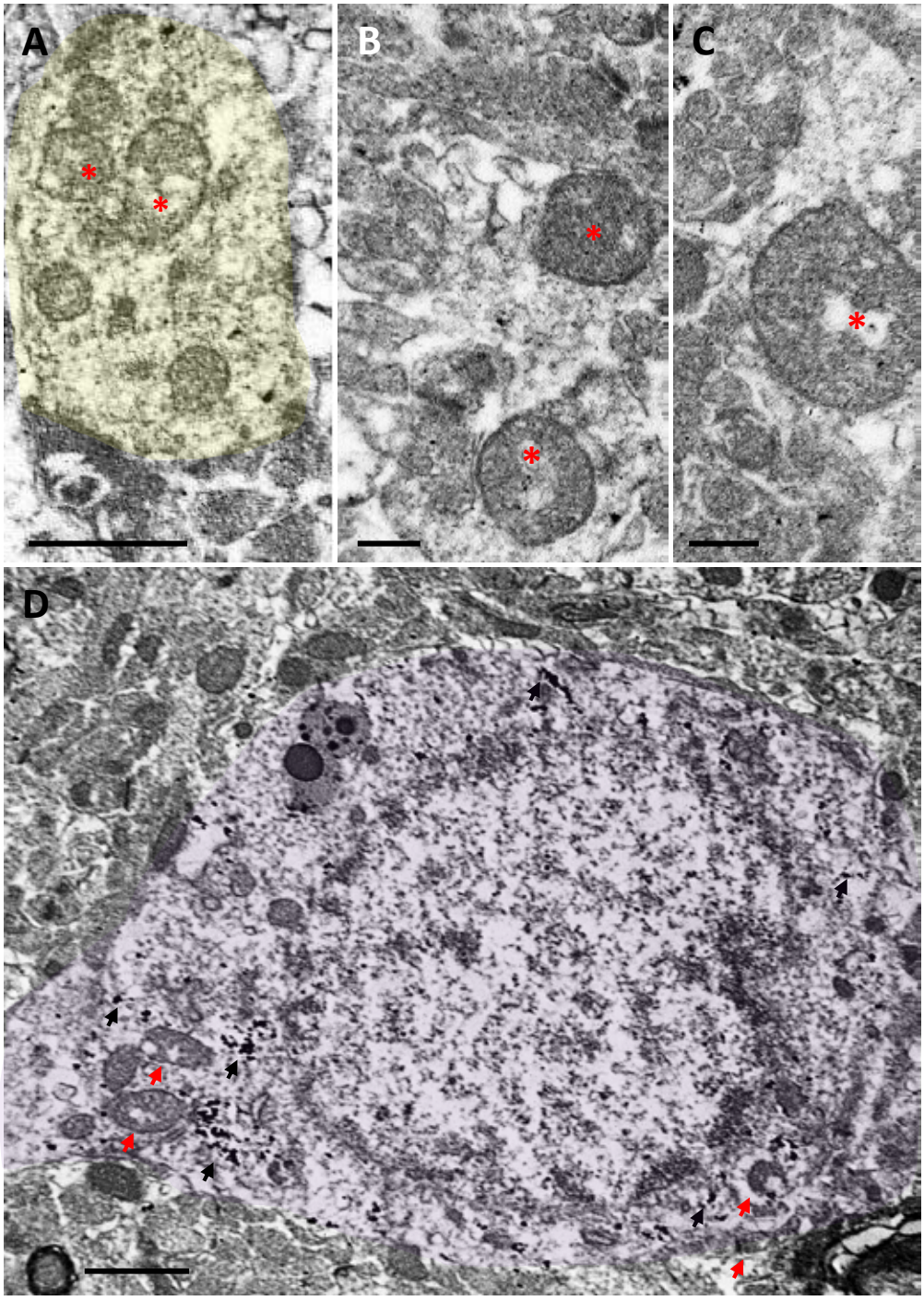


Figura 3.3.24. Patología mitocondrial en las neuronas piramidales en el modelo P301S. Microscopía electrónica de transmisión. (**A-C**) Detalles del neuropilo del estrato oriens de CA1 en un animal de 12 meses de edad. Se detecta una gran cantidad de mitocondrias con notable pérdida de integridad de las crestas (asteriscos). (**D**) Soma de neurona piramidal marcado con inmuno-oro para AT8 (flechas negras) conteniendo mitocondrias con morfología patológica (flechas rojas). *N: núcleo.* Barras de escala: A: 1 µm; B, C: 0,25 µm; D: 1 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

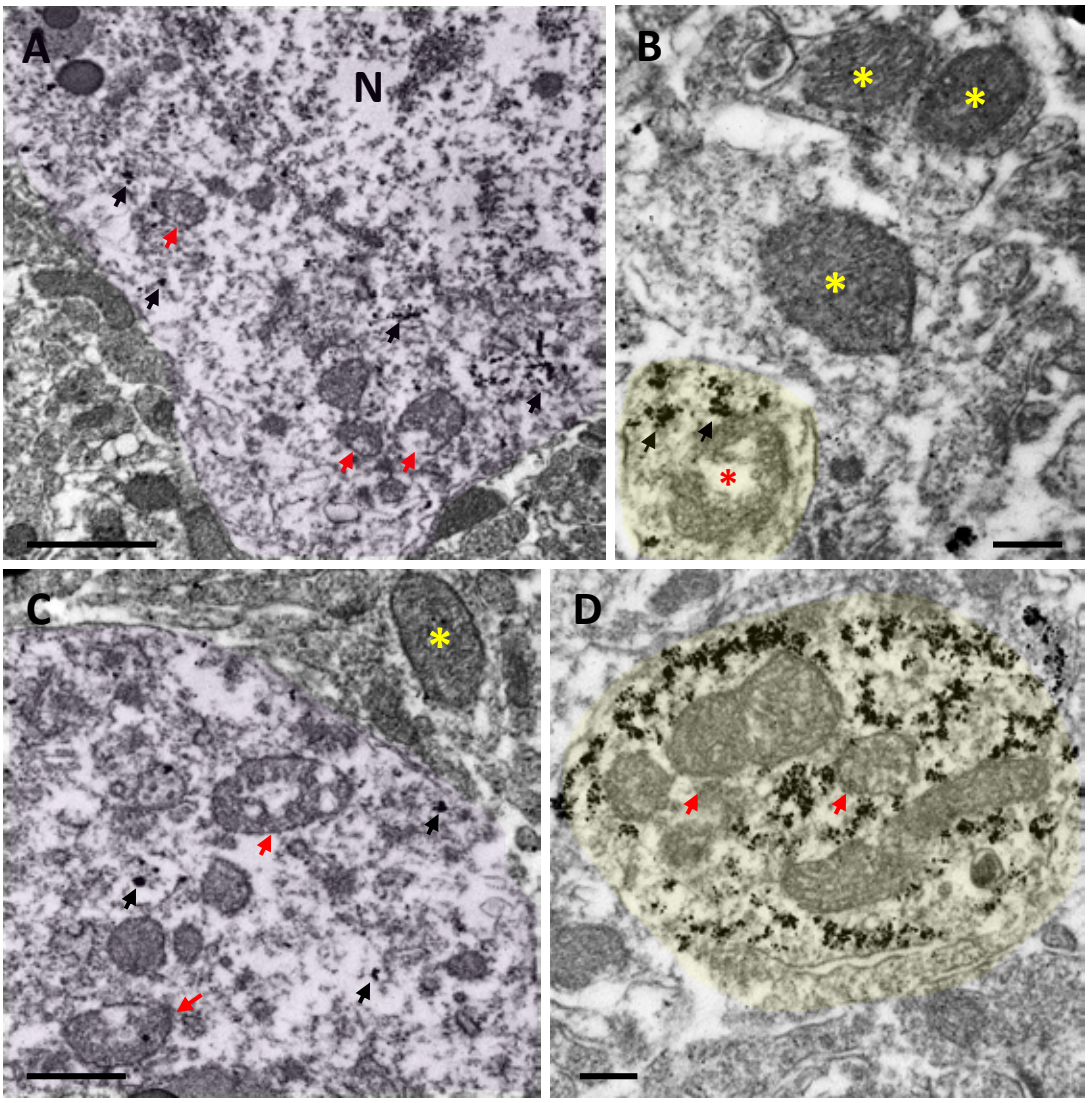


Figura 3.3.25. Las neuronas granulares positivas para AT8 del modelo P301S exhiben patología mitocondrial. Inmuno-oro para AT8 a microscopía electrónica de transmisión en el giro dentado de animales P301S de 12 meses. (**A**) Detalle de soma neuronal (morado) con mitocondrias que exhiben una marcada morfología degenerativa (flechas rojas). Las flechas negras señalan las partículas de oro. (**B**) Detalle del neuropilo de la capa molecular del giro dentado. Mitocondria con morfología patológica (asterisco rojo) en una prolongación neuronal (amarillo) que contiene fosfo-tau (flechas negras). Mitocondrias con aspecto normal en células adyacentes sin patología tau (asteriscos amarillos). (**C**) Detalle de soma neuronal (morado) con marcaje para AT8 (flechas negras) y varias mitocondrias con profundas alteraciones morfológicas (flechas rojas). (**D**) Detalle de dendrita (amarillo) con abundante marca para fosfo-tau y varias mitocondrias con patología (flechas rojas). Barras de escala: A: 1 µm; B, D: 0,2 µm; C: 0,5 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

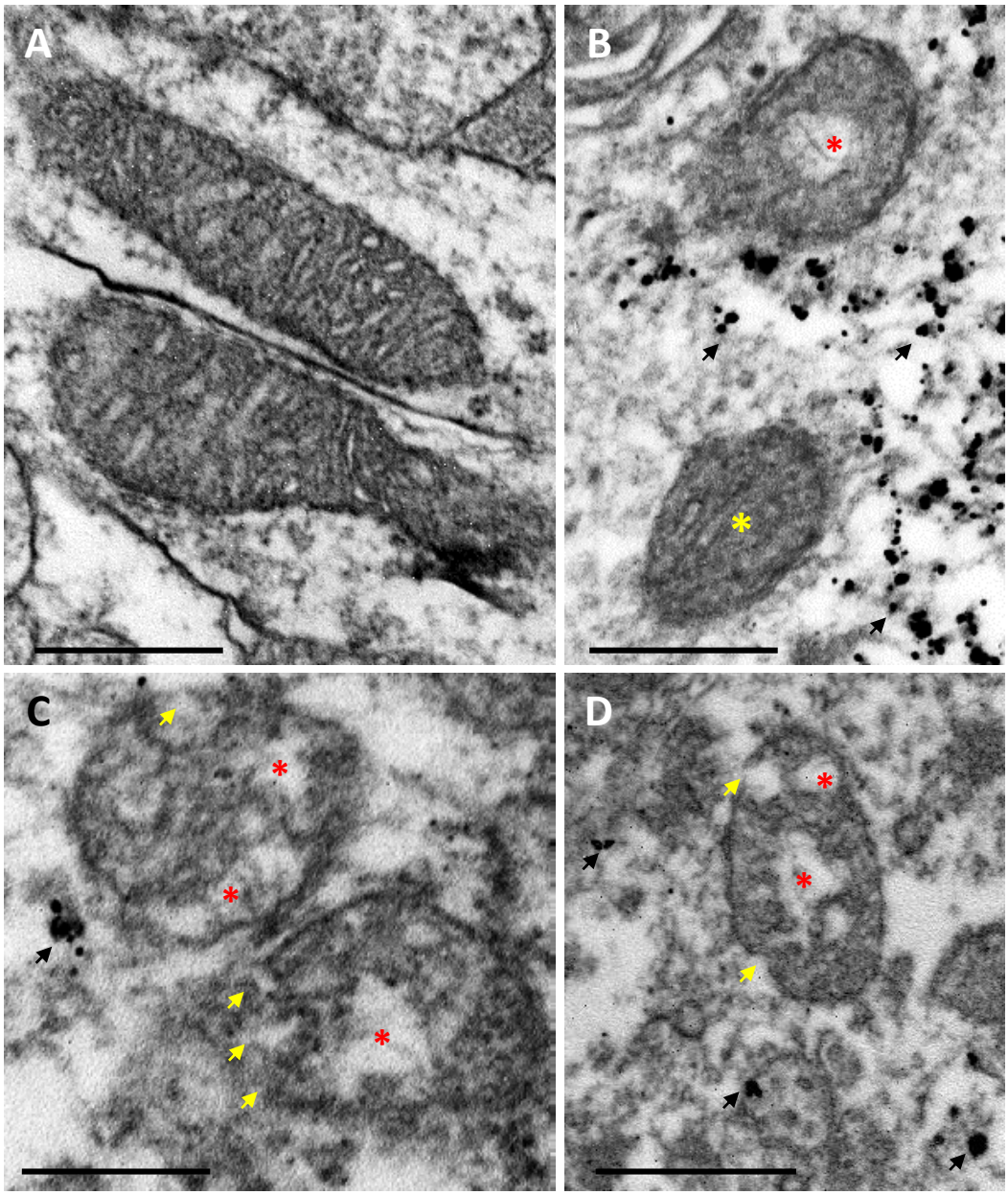


Figura 3.3.26. Las alteraciones morfológicas mitocondriales son más acusadas en el modelo P301S que en el ThyTau22. Microscopía electrónica de transmisión. **(A, B)** Imágenes representativas de mitocondrias neuronales en el modelo ThyTau22. En **A**, mitocondrias con morfología normal. En **B**, detalles de una mitocondria con morfología normal (asterisco amarillo) junto a otra mitocondria con vacuolas en la matriz (asterisco rojo) en una prolongación neuronal con marcaje para AT8. **(C, D)** Imágenes representativas de mitocondrias morfológicamente muy deterioradas en el modelo P301S. Se aprecia pérdida de electrodensidad y de la integridad de las crestas (asteriscos) en su interior, así como rotura de la doble envuelta membranal (flechas amarillas). Las flechas negras indican marca AT8-positiva. Barras de escala: A: 1 µm; B y D: 0,25 µm; C: 0,2 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

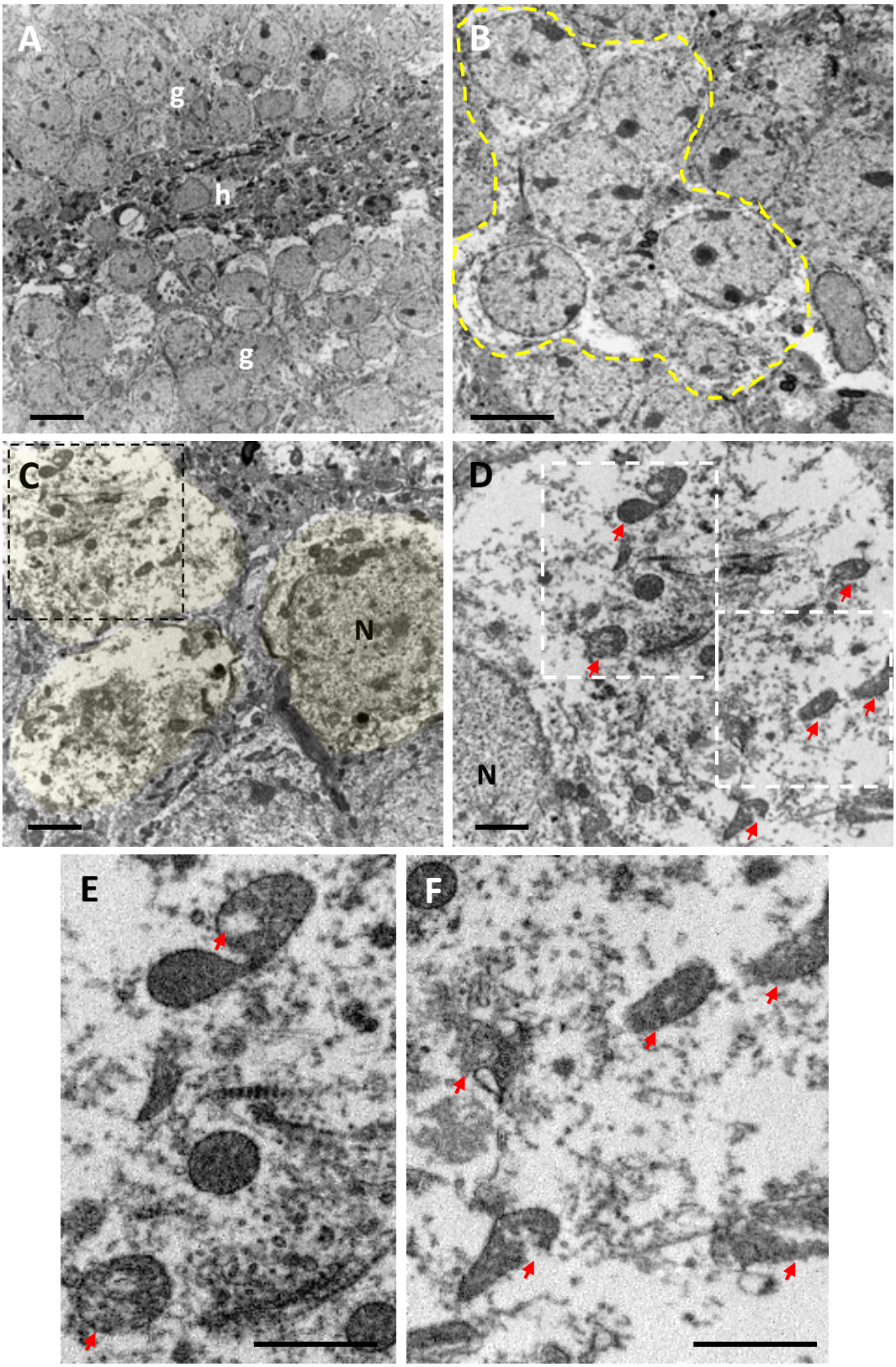


Figura 3.3.27. El giro dentado del modelo P301S presenta células electroclaras con gran cantidad de mitocondrias con morfología patológica. Microscopía electrónica de transmisión. (**A**) Panorámica de las capas granular e hilio del giro dentado de animal P301S de 12 meses. En la capa subgranular se aprecian somas neuronales muy poco electrodensos (ver línea discontinua en **B**). (**C, D**) Detalles de somas electroclaros (amarillo). Estas células contienen gran cantidad de mitocondrias con alteraciones patológicas (flechas rojas en **E, F**). *g: capa granular; h: hilio; N: núcleo.* Barras de escala: A: 10 µm; B: 5 µm; C: 2 µm; D, E, F: 1 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

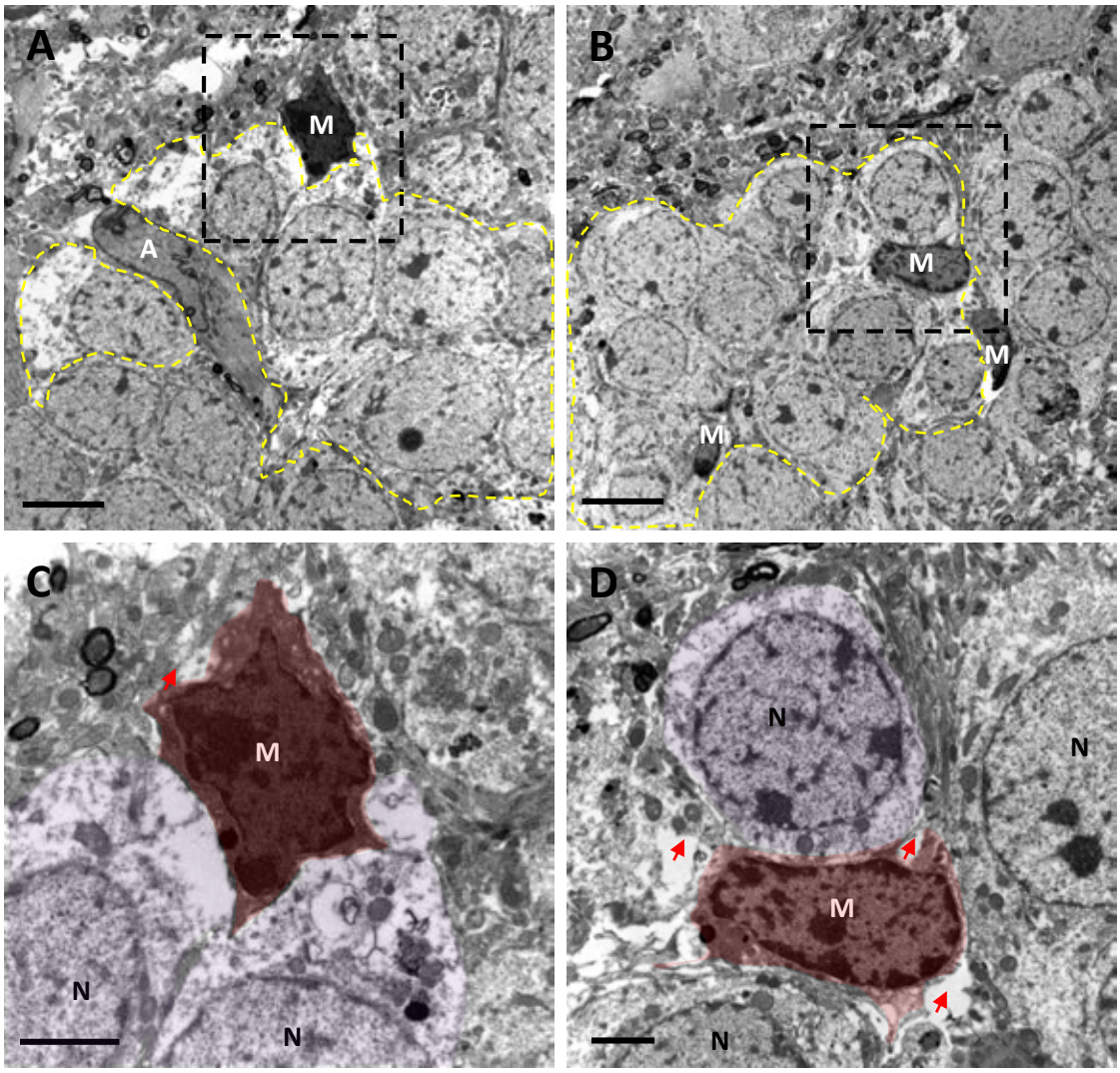


Figura 3.3.28. Las células granulares electroclaras suelen aparecer en estrecho contacto con células microgliales. (**A, B**) Imágenes representativas de la capa subgranular del giro dentado. Las líneas discontinuas delimitan un grupo de neuronas con el citoplasma de baja electrodensidad. (**C, D**) Células microgliales (rojas) en contacto con células granulares (morado) de citoplasma electroclaro. Las flechas señalan dilataciones en el espacio extracelular. *A: astrocito; M: microglía; N: núcleo.* Barras de escala: A, B: 5 µm; C, D: 2 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

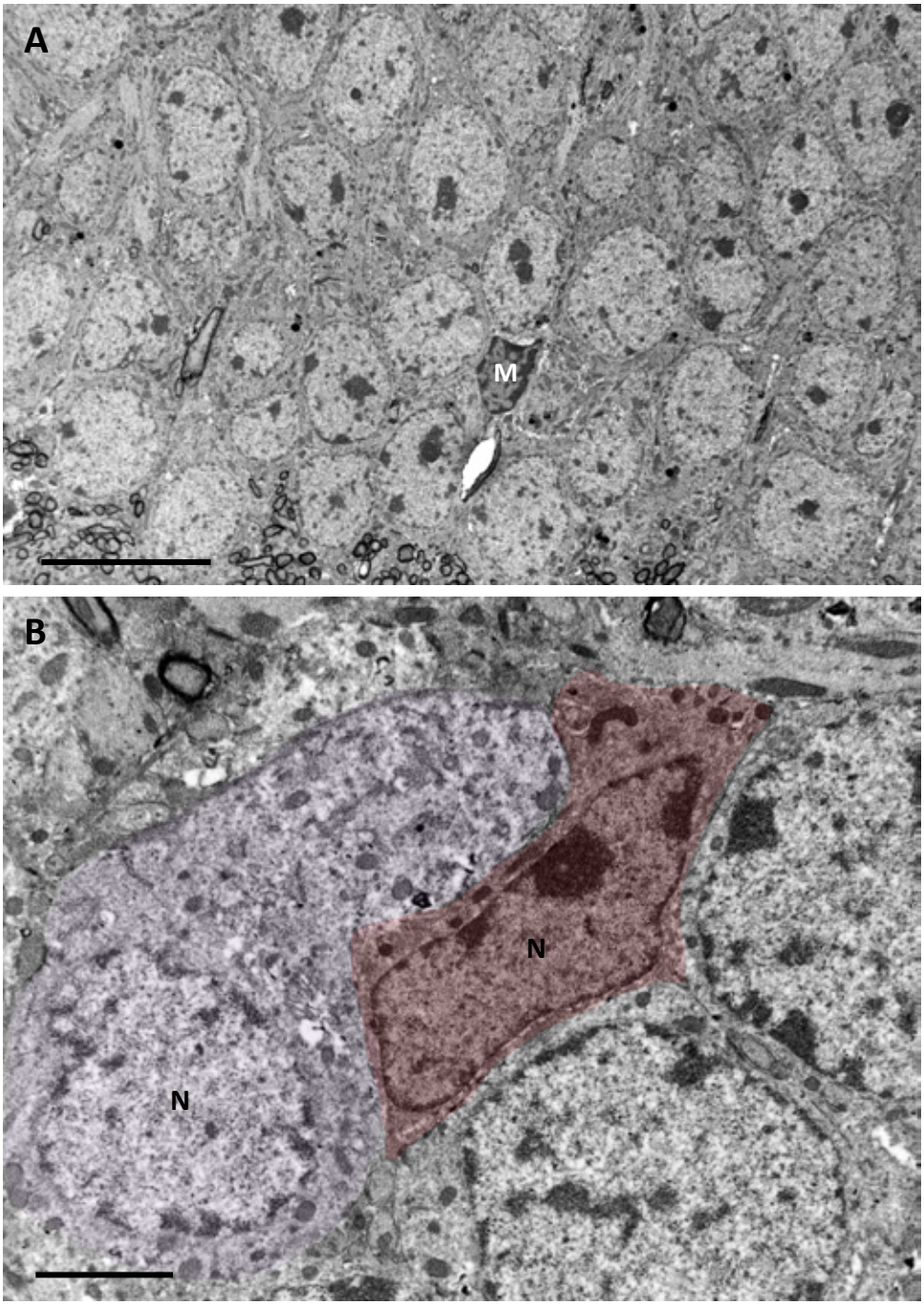


Figura 3.3.29. Las neuronas poco electrodensas son escasas en el giro dentado del modelo ThyTau22. (**A**) Panorámica de la capa granular del giro dentado. No se observan células granulares con citoplasma de baja electrodensidad. (**B**) Detalle de célula microglial (rojo) en contacto con varias neuronas de la capa granular del giro. El citoplasma de la neurona (morado) en la zona de contacto con la microglía aparece ligeramente más electroclaro. *M: microglía; N: núcleo.* Barras de escala: A: 10 µm; B: 2 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.4. EFECTO DE LA ESTABILIZACIÓN MICROTUBULAR SOBRE LA FUNCIÓN COGNITIVA Y EL PROCESO PATOLÓGICO EN UN MODELO AMILOIDOGÉNICO

Las neuronas son células extremadamente polarizadas desde un punto de vista tanto morfológico como funcional. Por tanto, son especialmente vulnerables a daños ocasionados por la hiperfosforilación de tau, la desestabilización microtubular y sus consecuencias, como los fallos en el transporte axonal y en el flujo autofágico. Según la hipótesis de la cascada amiloide (Hardy and Higgins, 1992), es el péptido β-amiloide el que desencadena estos procesos en la EA, aunque la relación entre la patología de Aβ y tau en este contexto aún no está del todo definida. En base al mencionado paradigma, la mayor parte de los esfuerzos para identificar nuevas dianas terapéuticas y posibles estrategias farmacológicas se han centrado en la patología amiloide. Sin embargo, los fracasos sucesivos en fases clínicas han reconducido la investigación hacia la inclusión de otras dianas, entre ellas aquellas dirigidas a la patología de tau (revisado en Congdon and Sigurdsson, 2018; Medina, 2018; Cummings et al., 2019).

En este último capítulo de Resultados hemos analizado la conexión entre la patología tau y la patología amiloide evaluando el efecto de un estabilizador de microtúbulos (epotilona D; EpoD) en un modelo amiloidogénico APP/PS1. Este tratamiento fue administrado mediante inyecciones intraperitoneales (una inyección semanal; dosis 2 mg EpoD/kg) durante tres meses (desde los 3 a los 6 meses de edad). Este modelo transgénico exhibe placas amiloides rodeadas de neuritas distróficas (de tipo axonal/presináptico) e hiperfosforilación de tau desde los 3-4 meses de edad en varias regiones cerebrales como el hipocampo, además de muerte neuronal y déficits cognitivos. Por lo tanto, este modelo animal constituye una herramienta valiosa para probar el efecto de potenciales terapias farmacológicas para la EA (Blanchard et al., 2003; Ramos et al., 2006; Caballero et al., 2007; Moreno-Gonzalez et al., 2009; Baglietto-Vargas et al., 2010; Jimenez et al., 2011; Sanchez-Varo et al., 2012; Torres et al., 2012; Trujillo-Estrada et al., 2014; Gomez-Arboledas et al., 2017; Sanchez-Mejias et al., 2019).

3.4.1. EL TRATAMIENTO CON EPOTILONA D PREVIENE LOS DÉFICITS COGNITIVOS DEL MODELO APP/PS1

Para determinar si el tratamiento con EpoD tuvo algún efecto sobre las funciones cognitivas del modelo transgénico APP/PS1, se analizaron varios parámetros asociados con la función hipocampal (aprendizaje-memoria) tanto en el grupo de animales tratados con EpoD ($APP/PS1^{EpoD}$, N = 8) como en el grupo inyectado con la solución vehículo ($APP/PS1^{Veh}$, N = 7). Las pruebas conductuales se realizaron durante las dos últimas semanas de tratamiento. Además, como controles adicionales se emplearon animales WT (N=12) de la misma edad y fondo genético. Se ha utilizado una amplia batería de tests que evalúan diversos aspectos de la

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

cognición: campo abierto, reconocimiento de objetos, laberinto en Y, laberinto en Y específico de contexto y laberinto acuático de Morris.

3.4.1.1. El tratamiento no afecta a la capacidad exploratoria ni locomotora de los animales APP/PS1

La prueba de campo abierto (OF, del inglés *Open Field*) sirve para estudiar el comportamiento locomotor y exploratorio de los animales. Además, permite que los animales se habitúen al recinto para las posteriores pruebas de reconocimiento de objetos.

Los parámetros analizados correspondieron a la actividad locomotora espontánea (distancia recorrida y velocidad media, **Fig. 3.4.1 A y B**, respectivamente) y la conducta exploratoria vertical (número de *rearings*, **Fig. 3.4.1 C**). El análisis estadístico puso de manifiesto que entre los tres grupos de animales no existieron diferencias significativas ni en la distancia (**Fig. 3.4.1 A**; $F(2,22) = 0{,}491$; $P = 0{,}619$) ni en la velocidad media de desplazamiento (**Fig. 3.4.1 B**; $F(2,22) = 0{,}576$; $P = 0{,}571$). Los tres grupos también mostraron una conducta exploratoria vertical similar (**Fig. 3.4.1 C**; número de exploraciones verticales; test de Kruskal-Wallis, $P = 0{,}419$). Por tanto, la administración intraperitoneal de EpoD o de la solución vehículo (DMSO/salino) no provocó efectos adversos sobre la conducta exploratoria y locomoción de los ratones implicados en el estudio. Así, estos resultados permiten descartar que las diferencias observadas en los posteriores tests se debiesen a problemas causados por efectos secundarios de las soluciones administradas a los animales o por la transgénesis.

3.4.1.2. El tratamiento con EpoD protege la memoria de reconocimiento de los animales APP/PS1

La memoria de reconocimiento es un subtipo de memoria episódica, dependiente del hipocampo (Dere et al., 2005; Vogel-Ciernia and Wood, 2014; Bird, 2017). Para evaluarla, en este trabajo se han empleado las pruebas de reconocimiento del lugar del objeto (*OLT,* del inglés *object-location test*) y de reconocimiento de un objeto nuevo (*NOR,* del inglés *novel object recognition*). En ambas se obtuvo un índice de discriminación (ID), resultado de determinar el tiempo que emplea el animal explorando el objeto desplazado/nuevo frente al tiempo total de exploración.

Mediante la prueba *OLT* (**Fig. 3.4.2 A**) se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos ($F(2,22) = 7{,}842$; $P = 0{,}003$). Concretamente, los animales APP/PS1^{EpoD} presentaron un ID de lugar significativamente mayor que los APP/PS1^{Veh} ($p<0{,}01$), que tuvieron el peor desempeño de la tarea ($p<0{,}05$ vs. WT). Por tanto, los animales APP/PS1^{Veh} no fueron capaces de reconocer el cambio de posición de uno de los objetos presentados, pero sí los que

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

recibieron EpoD, que de hecho mostraron un comportamiento prácticamente equivalente al de los WT.

Con la prueba *NOR* se obtuvieron resultados similares (**Fig. 3.4.2 B**) ($F(2,22) = 16,47$; $P < 0,001$). De nuevo, la EpoD mejoró de forma significativa la realización de la prueba por parte del modelo transgénico dado que los animales tratados presentaron un aumento en el ID de objeto en comparación con el grupo vehículo ($APP/PS1^{EpoD}$ vs. $APP/PS1^{Veh}$ $p<0,001$), cuyo comportamiento distaba del grupo WT ($p<0,001$). Asimismo, la capacidad de los animales $APP/PS1^{EpoD}$ para discriminar entre los objetos no se diferenciaba de la de los WT.

Por consiguiente, estos resultados sugieren que el tratamiento con EpoD previene la aparición de los déficits cognitivos asociados a la memoria de reconocimiento en los ratones transgénicos APP/PS1, lográndose además índices equivalentes a los que muestran los animales de genotipo silvestre de la misma edad.

3.4.1.3. No existen diferencias en la prueba del laberinto en Y entre los animales APP/PS1 y WT a los 6 meses de edad

La memoria de trabajo es un tipo de memoria a corto plazo que se encuentra dañada en la EA y otras demencias, debido a la afectación de la corteza prefrontal (Stopford et al., 2012). En roedores, se estudia a través del comportamiento de alternancia espontánea en el laberinto en "Y". La alternancia espontánea se define como el número de entradas sucesivas en los tres brazos (Biswas et al., 2014) traduciéndose en un índice de memoria.

Al realizar este test no se observaron diferencias significativas ($F(2,22) = 0,338$; $P = 0,717$) en las alternancias de los tres grupos experimentales (**Fig. 3.4.3 A**), lo que indica que al menos a la edad de 6 meses este modelo APP/PS1 no presenta déficits en la memoria de trabajo. De forma complementaria, durante este test se evaluó la conducta exploratoria espontánea de los animales sin que se detectaran diferencias significativas ni en la distancia recorrida (**Fig. 3.4.3 B**; $F(2,22) = 0,993$; $P = 0,386$) ni para la velocidad de desplazamiento (**Fig. 3.4.3 C**; $F(2,22) = 1$; $P = 0,384$), que pudieran complicar la detección de alteraciones cognitivas con esta prueba.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.4.1.4. Los animales APP/PS1 tratados con EpoD presentan una mejora en la memoria a largo plazo en comparación con el grupo vehículo

Para analizar la memoria a largo plazo se ha empleado una variante del laberinto en Y que presenta distintos patrones en cada brazo, permitiendo crear distintos contextos. Inicialmente, se mostraron al animal dos de los tres brazos (brazo de salida y familiar), para posteriormente (24 horas después) permitirle explorar los tres libremente.

Una vez realizada la prueba, el análisis estadístico reveló que los animales APP/PS1^{EpoD} presentaron diferencias significativas en el tiempo que permanecían en los distintos brazos (**Fig. 3.4.4 A**) ($F(2,14) = 4{,}783$; $P = 0{,}026$), del mismo modo que los WT ($F(2,22) = 41{,}933$; $P < 0{,}0001$). Por el contrario, los animales del grupo vehículo no discriminaban entre los tres brazos ($F(2, 10) = 3{,}075$; $P = 0{,}091$). Las pruebas *a posteriori*, tomando los tiempos de exploración en cada brazo, indicaron que los APP/PS1^{EpoD} mostraron una mayor preferencia por el brazo nuevo que por el familiar ($p<0{,}05$) lo que indica que fueron capaces de diferenciar el nuevo contexto. Los animales WT exploraron el brazo nuevo mucho más tiempo que los otros dos (familiar y salida, $p<0{,}0001$) ya conocidos. Comparando entre los grupos, los WT permanecieron más tiempo explorando el brazo nuevo que los APP/PS1^{Veh} ($p<0{,}05$), sin que hubiera diferencias significativas con los animales APP/PS1^{EpoD}. De nuevo, se midieron la distancia (**Fig. 3.4.4 B**) y la velocidad (**Fig. 3.4.4 C**), sin que apareciera ningún defecto locomotor en estos animales.

Por tanto, los datos sugieren que los animales APP/PS1 presentan déficits en la memoria a largo plazo a los 6 meses, y que el tratamiento con EpoD aminora o protege al menos parcialmente de estos déficits.

3.4.1.5. El tratamiento con EpoD tiene un efecto protector sobre las funciones de aprendizaje y memoria espacial del modelo APP/PS1

Para determinar si la estabilización microtubular tuvo algún efecto sobre la memoria espacial de los animales transgénicos, se utilizó el laberinto acuático de Morris (MWM, del inglés *Morris Water Maze*). Este test permitió analizar la capacidad de aprendizaje (fase de adquisición) y memoria espacial a corto plazo (fase de retención). El fundamento de esta prueba consiste en que el animal debe encontrar y recordar la ubicación de una plataforma ligeramente sumergida valiéndose de diversas claves contextuales.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.4.1.5.1. Fase de adquisición

Durante los tres primeros días de la fase de adquisición, todos los grupos presentaron una reducción progresiva de las latencias de escape (**Fig. 3.4.5 A**). A partir de ese momento, la curva de aprendizaje de los APP/PS1^{Veh} no mostró variaciones. Sin embargo, tanto el grupo APP/PS1^{EpoD} como el WT, continuaron rebajando el tiempo que tardaban en localizar la plataforma hasta el final de esta fase (día 7). El análisis estadístico de los datos demostró que en los tres grupos había diferencias significativas entre los días de aprendizaje ($F(6, 126) = 23{,}047$; $P < 0{,}001$) y entre los distintos grupos ($F(2, 126) = 5{,}812$; $P = 0{,}01$). Igualmente, también se observó un efecto de la interacción ($F(2{,}126) = 2{,}138$; $P = 0{,}019$). No se encontraron diferencias significativas en el aprendizaje entre los APP/PS1^{EpoD} y los WT. Los animales APP/PS1^{Veh} mostraron diferencias en las latencias de escape durante varios días de entrenamiento con respecto a los APP/PS1^{EpoD} ($p<0{,}05$), y con el grupo WT ($p<0{,}05$). Por tanto, se aprecia una protección de los procesos de aprendizaje en el modelo tratado con respecto al grupo vehículo a los 6 meses de edad, de manera que alcanzaba niveles similares a los del grupo silvestre.

3.4.1.5.2. Fase de retención

Esta fase permite estimar el grado de retención de las memorias que los ratones hayan generado durante la fase de adquisición. Pasadas 1,5 horas desde la fase anterior, se retiró la plataforma sumergida, y los animales realizaron un ensayo. Esta vez el parámetro que se tuvo en cuenta fue el tiempo que los animales pasaron explorando el cuadrante diana. Los resultados mostraron la existencia de diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de exploración entre los tres grupos (**Fig. 3.4.5 B**; $F(2,21) = 9{,}34$; $P = 0{,}014$). Los animales APP/PS1^{EpoD} mostraron tiempos de exploración significativamente mayores que los APP/PS1^{Veh} ($21{,}65 \pm 4{,}4$s vs. $11{,}69 \pm 11$s; $p<0{,}05$) y muy similares al grupo WT ($25{,}48 \pm 9{,}6$s), que mostró también diferencias significativas con respecto al grupo vehículo ($p<0{,}01$). Así pues, podemos afirmar que el tratamiento con EpoD detuvo o revirtió parcialmente el déficit observado en la memoria espacial a corto plazo en el grupo tratado con EpoD, lográndose índices similares a los WT.

3.4.1.5.3. Plataforma visible

Esta prueba permite descartar problemas relacionados con la percepción visual que puedan alterar la evaluación de la conducta exploratoria. Para ello se elevó la plataforma ligeramente sobre la superficie del agua y se analizaron la latencia de escape (**Fig. 3.4.6 A**), la distancia recorrida (**Fig. 3.4.6 B**) y la velocidad (**Fig. 3.4.6 C**). Así pues, con respecto a la latencia, se detectaron diferencias significativas debidas a los ensayos ($F(3,63) = 42{,}13$; $P < 0{,}0001$), al grupo ($F(2,63) = 6{,}528$; $P = 0{,}006$) y que existe un efecto de interacción ($F(6,63) = 2{,}467$; $P = 0{,}033$).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Los análisis *a posteriori* demuestran que las diferencias significativas se dan en el primer ensayo (E1) entre los APP/PS1^{Veh} y APP/PS1^{EpoD} ($p<0,001$), así como en los E1 y E2 entre los WT y los APP/PS1^{EpoD} ($p<0,05$), pero que finalmente desaparecieron en el resto de los ensayos.

En el caso de la distancia, los análisis estadísticos revelaron que existían diferencias significativas debidas a los ensayos ($F (3,63) = 22,40$; $p<0,0001$) y al grupo ($F (2,63) = 4,564$; $P = 0,023$). Sin embargo, estas diferencias solo se observaron en el primer ensayo (E1) entre el grupo tratado con EpoD y los WT ($p<0,01$). Por otro lado, no existe ningún efecto de interacción ($F (6,63) = 1,713$; $P = 0,133$). En cuanto a la velocidad, se observaron diferencias estadísticamente significativas debidas a los ensayos ($F (3,63) = 9,841$; $P < 0,0001$), mientras que no existieron diferencias debidas al grupo ($F (2,63) = 1,036$; $P = 0,372$), ni tampoco hay algún efecto de la interacción ($F (6,63) = 1,441$; $P = 0,213$).

Por tanto, se puede concluir que todos los grupos progresaron correctamente a lo largo de los ensayos en la tarea de plataforma visible, descartándose así la existencia de problemas visuales.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

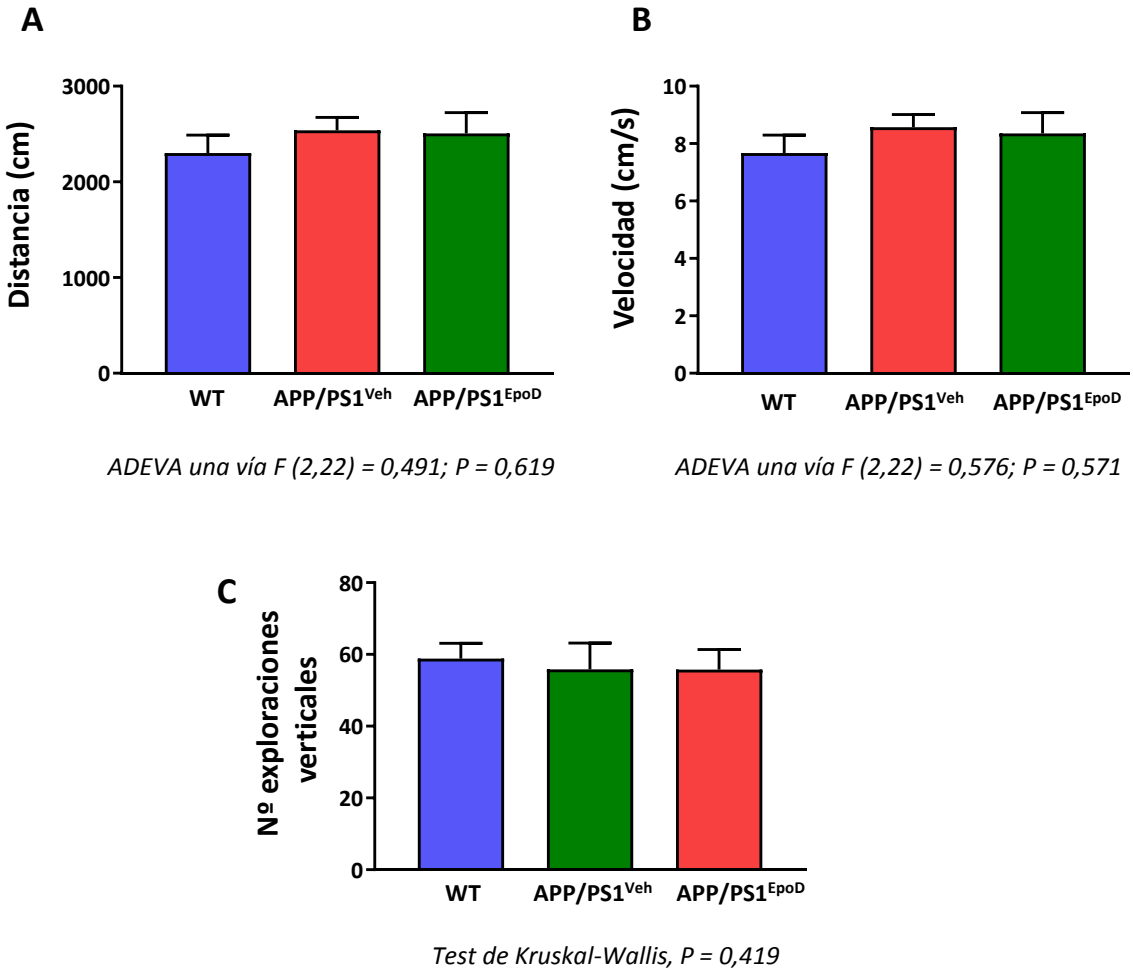


Figura 3.4.1. El modelo APP/PS1 no muestra cambios en las capacidades exploratorias y locomotoras. La prueba del campo abierto demostró que no existen alteraciones en las capacidades exploratorias ni locomotoras en el grupo de animales tratados con EpoD (APP/PS1^{EpoD}; n=8) o vehículo (APP/PS1^{Veh}; n=7) a los 6 meses en comparación con animales WT (n=12) de la misma edad. No se encontraron diferencias significativas en (**A**) la distancia (cm) recorrida, (**B**) la velocidad media (cm/s) ni (**C**) la conducta exploratoria vertical (número de *rearings*) entre los distintos grupos. Los valores representados corresponden a la media ± SEM.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

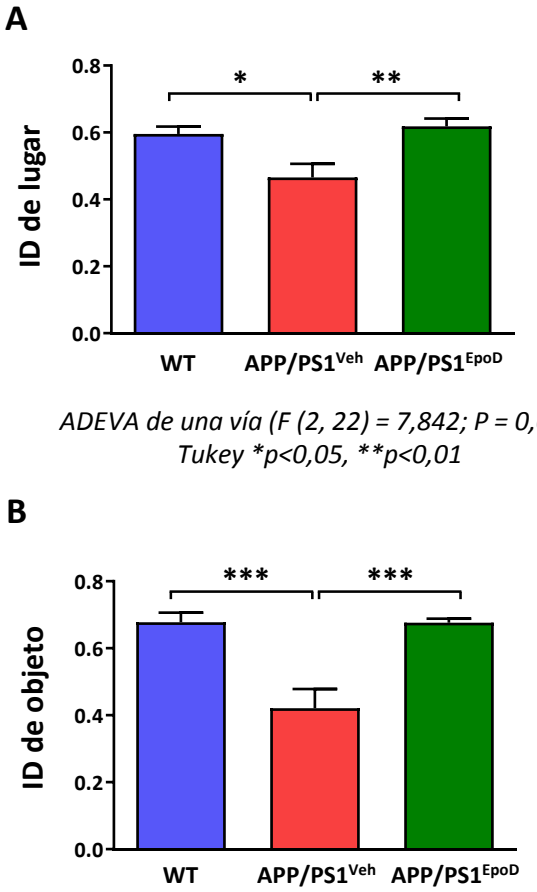


Figura 3.4.2. El tratamiento con EpoD protege la memoria de tipo episódica en el modelo APP/PS1. (**A**) La prueba de reconocimiento de localización antigua (OLT) revela diferencias significativas entre los animales tratados (APP/PS1^{EpoD}) y los no tratados (APP/PS1^{veh}) en el índice de discriminación de lugar (ID lugar). El grupo vehículo presenta dificultades para realizar la tarea en comparación con los animales WT, y los animales tratados con EpoD la realizan de modo similar al grupo de genotipo silvestre. (**B**) La tarea de reconocimiento de objeto nuevo (NOR) también revela diferencias significativas entre los grupos tratados y no tratados en el índice de discriminación correspondiente (ID objeto). Los animales APP/PS1^{EpoD} presentan una mejora significativa del rendimiento en comparación con los APP/PS1^{Veh}, y comportándose de manera similar a los ratones WT. Los valores representados corresponden a la media ± SEM.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

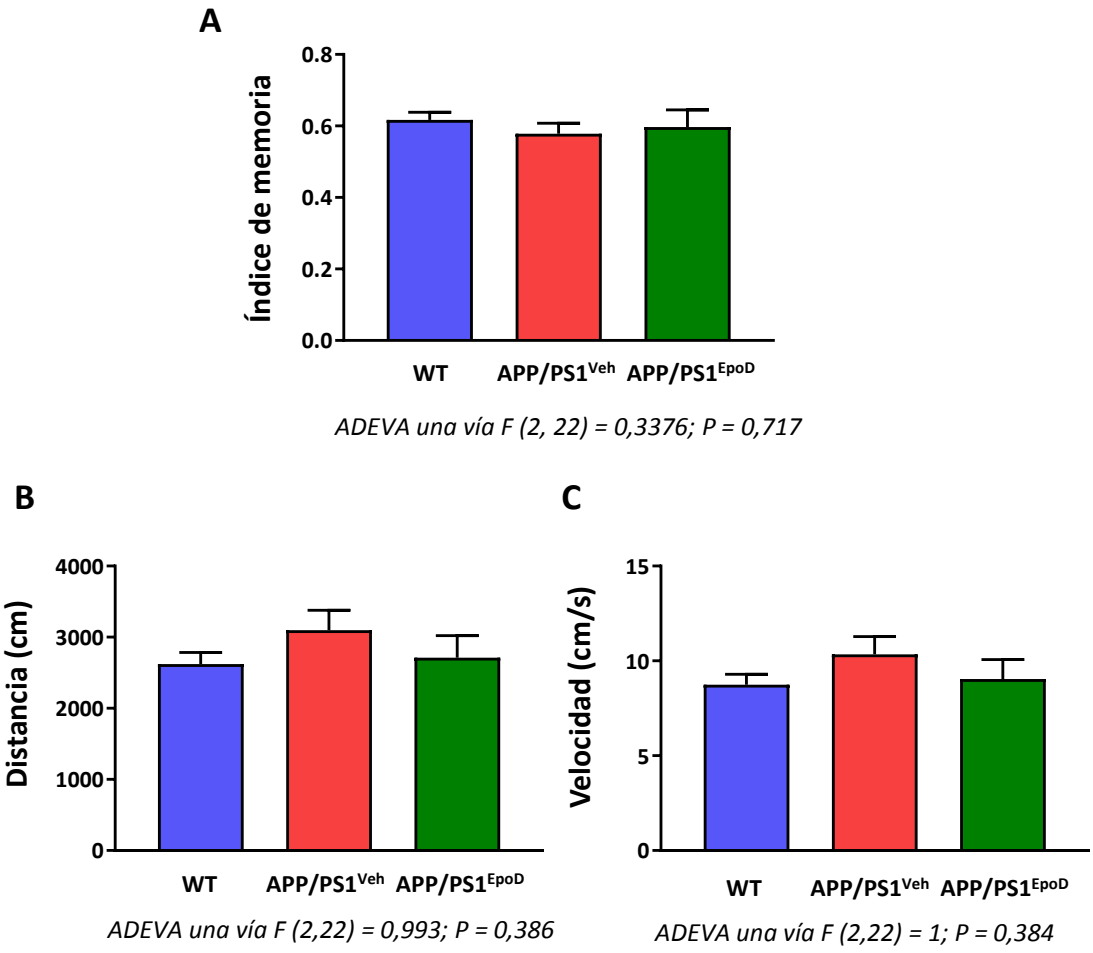


Figura 3.4.3. La memoria de trabajo no se encuentra afectada en los animales APP/PS1 de 6 meses de edad. (**A**) Durante la evaluación cognitiva con el laberinto en Y no se observaron diferencias significativas en el índice de memoria (número de alternancias) entre los grupos (APP/PS1^{Veh}, APP/PS1^{EpoD} y WT). La posible influencia de alteraciones en la conducta exploratoria sobre este resultado quedó descartada al no existir cambios en (**B**) la distancia (cm) recorrida por los ratones ni en (**C**) la velocidad media (cm/s). Los valores representados corresponden a la media ± SEM.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

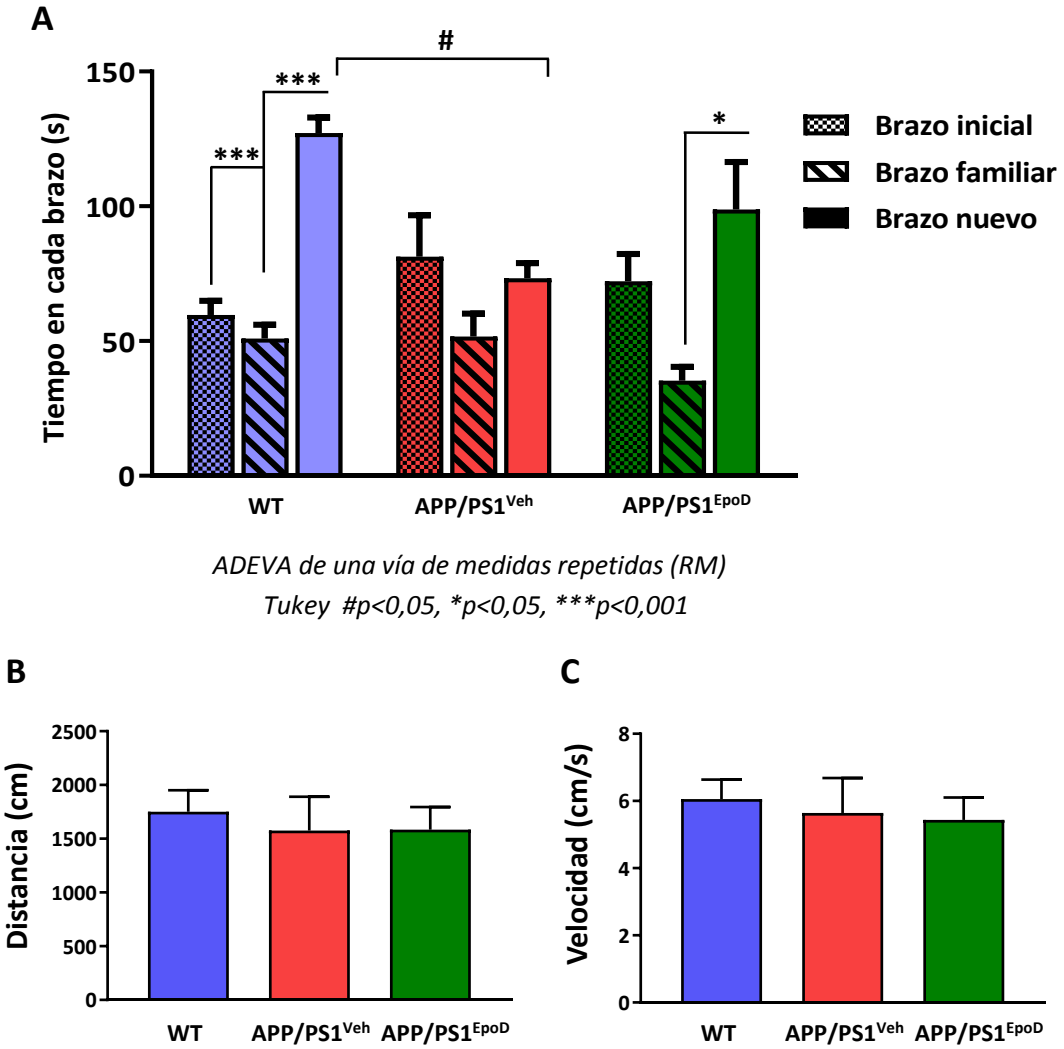
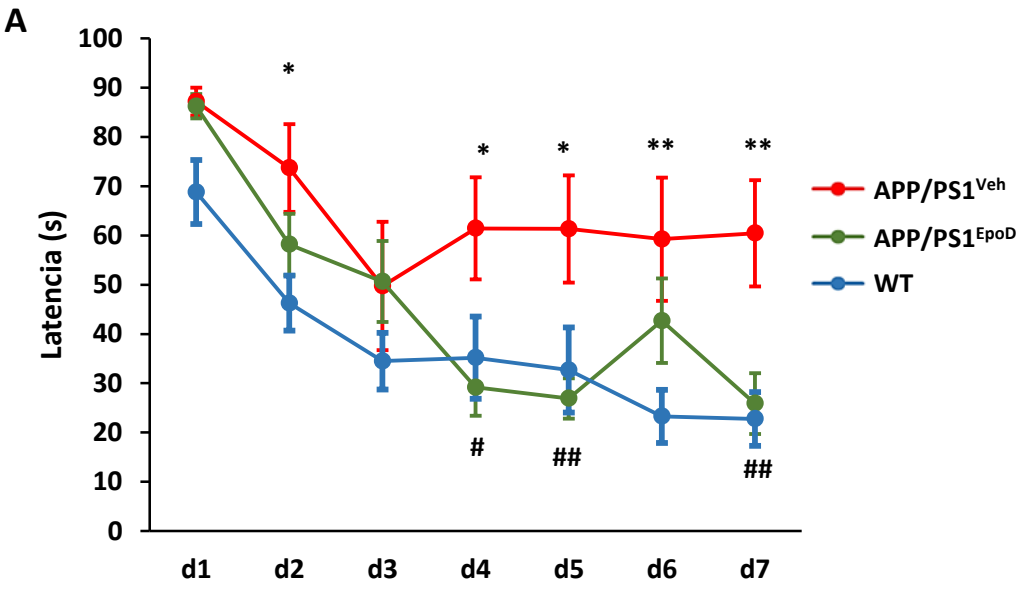
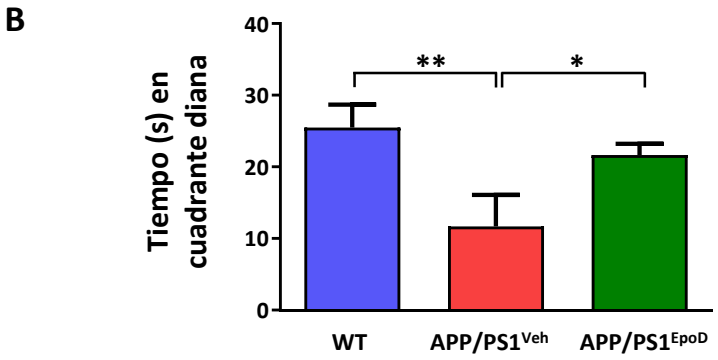


Figura 3.4.4. El tratamiento con EpoD protege la memoria a largo plazo de los ratones APP/PS1. Prueba del laberinto en Y específico de contexto. (**A**) Tiempo de exploración (s) en cada brazo durante la fase de retención. Los APP/PS1^{EpoD} exploraron más tiempo el brazo nuevo que los otros dos, habiendo una diferencia significativa con respecto al brazo familiar. El grupo WT distinguió perfectamente el brazo nuevo de los otros dos. No hay diferencias para los APP/PS1^{Veh}. El análisis intergrupo muestra que el tiempo de exploración del brazo nuevo por los animales WT y APP/PS1^{Veh} (Tukey, *p<0,05) es significativamente diferente. Los animales tratados realizaron este test de manera más parecida a los WT que el grupo vehículo. De nuevo, no se observaron diferencias para **(B)** la distancia (cm) o **(C)** la velocidad (cm/s). Los datos representados corresponden a las medias ± SEM.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



ADEVA de doble vía de medidas repetidas (RM)
*APP/PS1^{Veh} vs. WT. Tukey *p<0,05, **p<0,01*
APP/PS1^{Veh} vs. APP/PS1^{EpoD}. Tukey $^{\#}$p<0,05, $^{\#\#}$p<0,01



ADEVA de una vía F (2,21) = 9,34, P = 0,014
*Tukey *p<0,05, **p<0,01*

Figura 3.4.5. El tratamiento con EpoD preserva el aprendizaje y la memoria espacial en los animales APP/PS1. Evaluación con el laberinto acuático de Morris. **(A)** Durante la **fase de aprendizaje**, todos los grupos disminuyeron la latencia de escape (s). El grupo APP/PS1^{EpoD} mostraba una curva de aprendizaje similar a la de los WT. Se observa un aprendizaje deficiente en los animales APP/PS1^{Veh}. (**B**) En la **prueba de retención de memoria,** tanto los APP/PS1^{EpoD} como los WT mostraron una preferencia similar por el cuadrante objetivo, en contraste con los ratones que recibieron el vehículo. Todos los datos mostrados corresponden a la media ± SEM.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

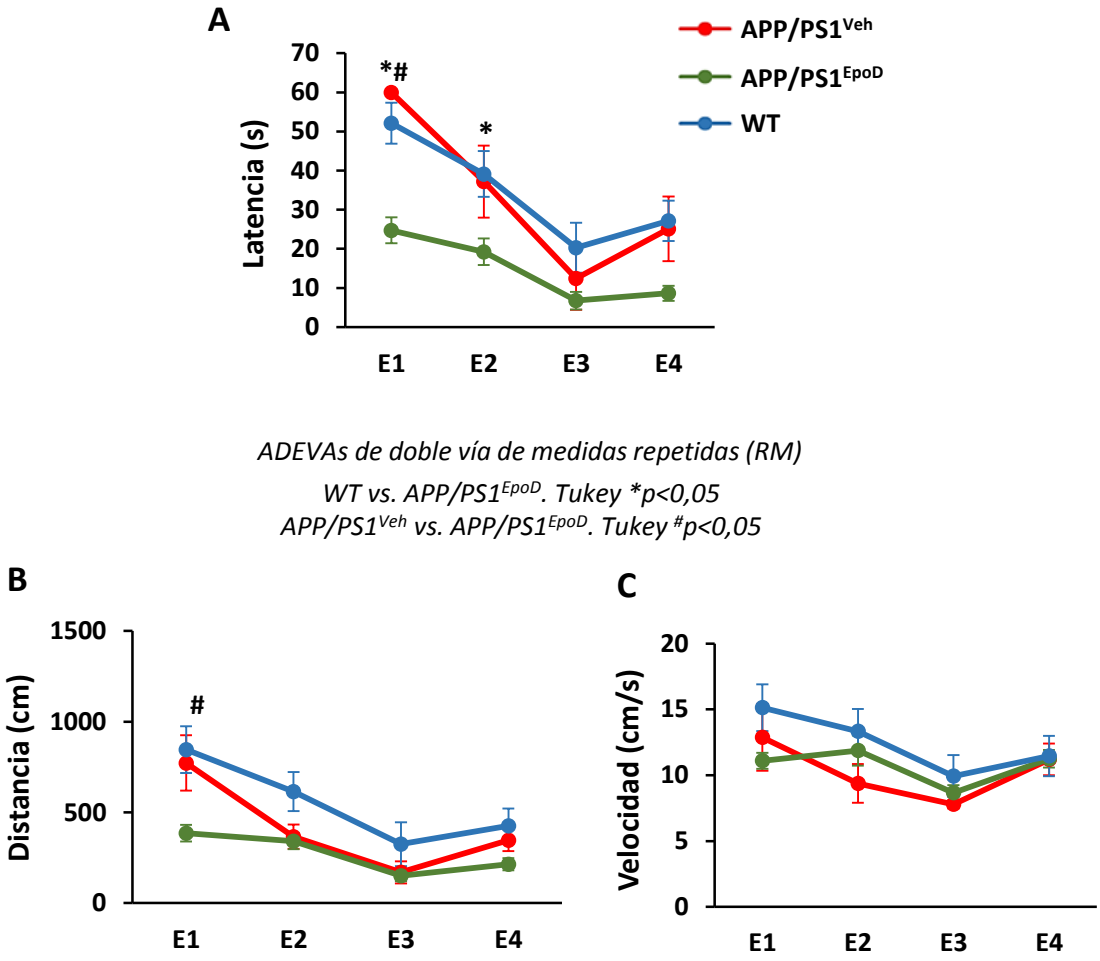


Figura 3.4.6. Ausencia de alteraciones en la conducta exploratoria en el laberinto acuático de Morris. Prueba de la plataforma visible. **(A)** El tiempo (s) y (**B**) la distancia (cm) recorrida por los animales para encontrar la plataforma fue disminuyendo a medida que se incrementaba el número de ensayos (E1-4) realizados. Solo se detectaron algunas diferencias significativas entre los dos grupos APP/PS1 (E1); y entre los APP/PS1^{EpoD} y WT (E1 y E2 en **A**) en los primeros ensayos. (**C**) No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en lo referente a la velocidad de nado (cm/s). Los datos representados corresponden a las medias ± SEM.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.4.2. EL TRATAMIENTO CON EPOD MEJORA LA ESTABILIDAD MICROTUBULAR EN EL HIPOCAMPO DE LOS ANIMALES TRANSGÉNICOS

Se sabe que los microtúbulos más estables están enriquecidos en tubulinas acetiladas (AcTub) (Schulze et al., 1987; Portran et al., 2017). Además, se ha descrito que los niveles de AcTub disminuyen en el cerebro de pacientes con EA (Hempen and Brion, 1996). Por lo tanto, esta modificación postraduccional de la tubulina se considera un biomarcador adecuado para evaluar la estabilización microtubular. Para verificar el efecto de la EpoD sobre los microtúbulos en este modelo, realizamos un análisis comparativo de dicha modificación mediante inmunofluorescencia para microscopía confocal (**Fig. 3.4.7**) en el hipocampo de los tres grupos de animales. El grupo APP/PS1^{EpoD} (**Fig. 3.4.7 A3-C3**) presentó un inmunomarcaje mucho más intenso en los estratos piramidal y radiado (donde se encuentran los somas y dendritas apicales de las neuronas principales de CA1-3) que los ratones APP/PS1 inyectados con la solución vehículo (**Fig. 3.4.7 A2-C2**)**.** De hecho, estos últimos presentaban bastantes alteraciones en la red dendrítica. En el grupo EpoD, la tinción era similar e incluso de mayor intensidad que en los ratones WT (**Fig. 3.4.7 A1-C1**). Estas diferencias también se encontraron en porciones constituidas por tractos axonales como el *alveus* (**Fig. 3.4.7 D**), que mostró un aumento del marcaje en los animales APP/PS1^{EpoD} (**Fig. 3.4.7 D3**) con respecto a los APP/PS1^{Veh} (**Fig. 3.4.7 D2**), resultando similar al de los WT (**Fig. 3.4.7 D1**). Por tanto, la menor inmunorreactividad para AcTub en los APP/PS1^{Veh} apunta a una mayor inestabilidad de los microtúbulos, en parte debida al efecto perjudicial de la deposición amiloide (ver detalle del impacto de una placa teñida con Tio-S en **Fig. 3.4.7 E1-E3**) en el entorno de estas prolongaciones.

Por ello, podemos decir que la administración de EpoD mejora la integridad/densidad de los microtúbulos tanto axonales como dendríticos en los ratones APP/PS1, ya que el neuropilo del hipocampo mostró signos de recuperación después del tratamiento.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

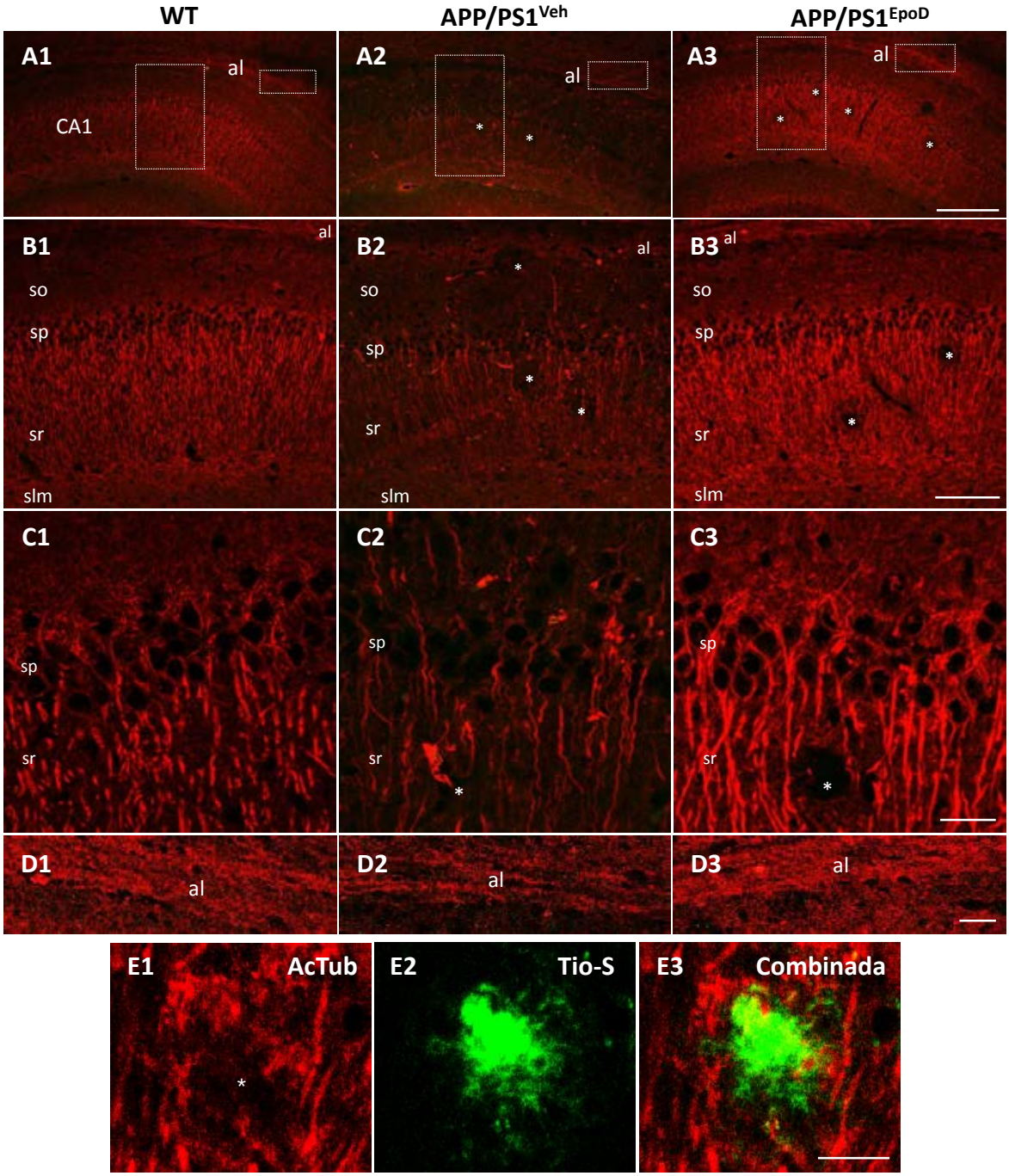


Figura 3.4.7. El tratamiento con EpoD promueve la estabilidad microtubular del hipocampo de los ratones APP/PS1. Inmunofluorescencia para tubulina acetilada (AcTub) en el hipocampo de ratones WT (**A1-D1**), APP/PS1^{Veh} (**A2-D2**) y APP/PS1^{EpoD} (**A3-D3**). Los animales transgénicos inyectados con vehículo muestran menor señal inmunorreactiva en comparación con los animales WT, mientras que en los animales tratados con EpoD la intensidad del inmunomarcaje es similar a los WT. (**D**) Detalles de la región del *alveus* a mayores aumentos. Los asteriscos (*) señalan zonas inmunonegativas debido a la presencia de placas extracelulares de Aβ (ver placa teñida con Tio-S en **E**). a*l: alveus; CA1: región del asta de Ammón; slm: estrato lacunoso-molecular; so: estrato oriens; sp: estrato piramidal; sr: estrato radiado*. Barras de escala: A: 250 µm; B-C: 100 µm; D: 25 µm; E: 15 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.4.3. EL TRATAMIENTO CON EPOD PROTEGE DE LOS DAÑOS SINÁPTICOS/AXONALES ASOCIADOS A LA PATOLOGÍA AMILOIDE

Como hemos mencionado, el modelo APP/PS1 desarrolla patología neurítica en forma de distrofias axonales/presinápticas que rodean a las placas de Aβ desde edades tempranas en el hipocampo (Ramos et al., 2006; Baglietto-Vargas et al., 2010; Sanchez-Varo et al., 2012; Torres et al., 2012; Gomez-Arboledas et al., 2018), subículo (Trujillo-Estrada et al., 2013, 2014) y porciones corticales (Moreno-Gonzalez et al., 2009; Sanchez-Mejias et al., 2019). Estas prolongaciones aberrantes exhiben una acumulación anormal de proteínas relacionadas con la patología de la EA (APP y fosfo-tau), junto con otras involucradas en funciones sinápticas o en la proteostasis (Sanchez-Varo et al., 2012; Torres et al., 2012). Todos estos procesos tienen en común que, de un modo u otro, dependen del flujo axoplásmico. Dado que las sinapsis constituyen un buen parámetro para correlacionar con la memoria, con el objetivo de averiguar si la preservación de la cognición en los animales APP/PS1^{EpoD} se debía a una protección sináptica/axonal relacionada con la estabilización microtubular, evaluamos los niveles de diversos marcadores sinápticos, así como de proteínas que se encuentran acumuladas en las neuritas distróficas: ubiquitina y APP.

3.4.3.1. El tratamiento con EpoD redujo la patología sináptica en el hipocampo de los APP/PS1

Al igual que en el bloque anterior, utilizamos la proteína sinaptofisina (Syn) como marcador general de terminales presinápticos. En primer lugar, mediante WB (**Fig. 3.4.8 A y B**), se detectaron diferencias significativas en los niveles de Syn hipocampales entre los grupos ($F(2,11) = 4,386$; $P = 0,039$). Los animales APP/PS1^{Veh} presentaban un descenso significativo en los niveles de esta proteína (-25,6 ± 11,68% con respecto al WT; $p<0,05$) que aparecieron bastante restaurados en los APP/PS1^{EpoD}, alcanzando valores similares a los de los animales de genotipo silvestre de la misma edad (92,86 ± 13,19% del nivel de un WT; 1,23 veces mayor que el grupo APP/PS1^{Veh}).

Seguidamente, se realizó una tinción inmunohistoquímica para comparar los niveles y distribución de esta proteína en secciones con hipocampo de los tres grupos de animales (**Fig. 3.4.9**). De forma general, la inmunotinción reveló un patrón difuso por todo el neuropilo con diferencias regionales en la intensidad de la tinción dependiendo de las aferencias recibidas en cada capa. En concreto, en la capa molecular del giro dentado (**Fig. 3.4.9 A1, B1 y C1**) se obtiene un bandeado trilaminar específico, delimitando la capa molecular externa colindante con la fisura hipocampal, molecular media y molecular interna junto a la capa de la granular. Las subcapas externas e interna presentaron mayor inmunorreactividad que la zona intermedia, debido a la distribución espacial de las proyecciones CE-GD (Deller et al., 1996).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

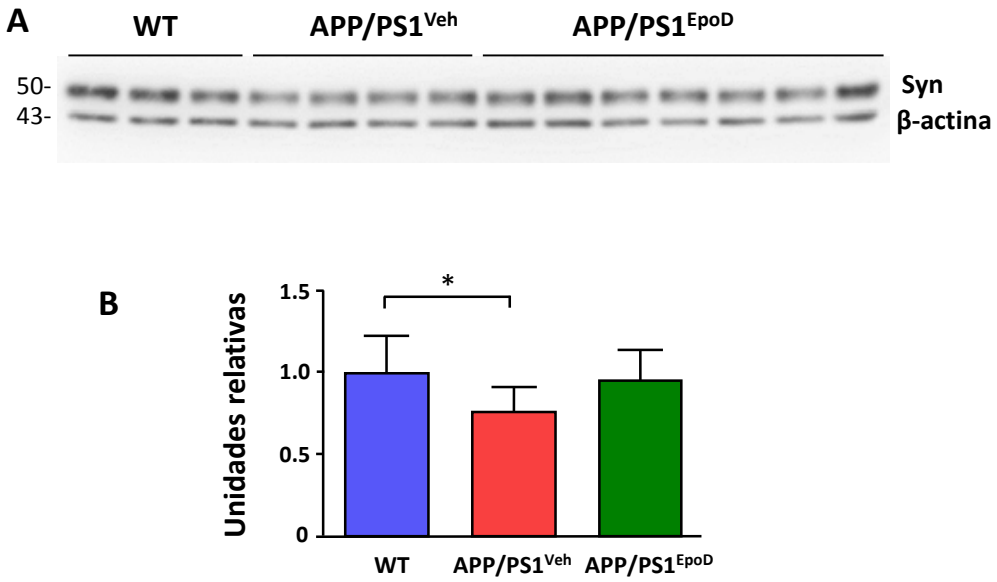
Cualitativamente, se observaba una menor inmunorreactividad en los animales APP/PS1 en comparación con el grupo WT (**Fig. 3.4.9 A2, B2 y C2)**. Además, en la capa molecular, se observaban alteraciones en el bandeado, que afectaban especialmente a la capa molecular interna del grupo vehículo (**Fig. 3.4.9 B2**) y en menor medida al grupo tratado (**Fig. 3.4.9 C2**) en comparación con los WT (**Fig. 3.4.9 A2**). Se realizó un estudio cuantitativo del área inmunorreactiva para Syn en la capa molecular interna del giro con respecto al área de la capa molecular total, y se encontró una reducción significativa ($F(2,12) = 5,644$; $P = 0,019$) en el grupo $APP/PS1^{Veh}$ en contraste con los ratones WT (-14,28 ± 8%; $p<0,05$) (**Fig.3.4.9 D**). Esta inervación experimentó una recuperación significativa en ratones tratados con EpoD (+ 10,28 ± 5%; $p<0,05$ vs. grupo vehículo).

A continuación, se analizó el efecto del tratamiento específicamente sobre distintas subpoblaciones de terminales presinápticos (glutamatérgicos y GABAérgicos), usando los marcadores VGLUT-1 y VGAT, respectivamente. El análisis mediante WB de los niveles hipocampales de VGAT (**Fig. 3.4.10 A y B**) mostró que los animales $APP/PS1^{Veh}$ presentaron valores inferiores (78,49 ± 10,50 % vs. WT), aunque esta reducción no alcanzó relevancia estadística ($F(2, 10) = 2,678$; $P = 0,117$). Es destacable que los animales $APP/PS1^{EpoD}$ mantuvieron estables los niveles de VGAT (103,5 ± 21,97% vs. WT). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en los niveles de VGLUT-1 del hipocampo (**Fig. 3.4.10 C y D**) entre los tres grupos ($APP/PS1^{Veh}$ 91,22 ± 21,37% vs. WT; $APP/PS1^{EpoD}$ 105,15 ± 3,42% vs. WT).

Por último, se analizó la proteína específica de elementos postsinápticos PSD95 mediante WB (**Fig. 3.4. 11**), obteniéndose diferencias significativas entre los grupos ($F(2, 10) = 12,44$; $P = 0,0019$). Los niveles de este marcador en los animales $APP/PS1^{EpoD}$ fueron significativamente mayores que los presentes en los inyectados solo con vehículo (1,34 veces mayor; $p<0,05$), que de hecho se encontraron bastante mermados (-38,56 ± 10,44% vs. WT; $p<0,01$). De este modo, el grupo tratado mostró una importante recuperación de esta proteína, llegando a aproximarse al grupo WT (84,01 ± 8,8% de los niveles WT).

Resumiendo, podemos decir que el modelo APP/PS1 presenta pérdida general de elementos presinápticos (Syn) y postsinápticos (PSD95) en el hipocampo a los 6 meses de edad, y que la administración de EpoD permitió su restauración (al menos parcial). A esta temprana edad no pudimos detectar cambios significativos de subpoblaciones sinápticas específicas (glutamatérgicas y GABAérgicas) en el hipocampo de ninguno de los grupos transgénicos, y por tanto no fue posible evaluar el impacto de EpoD sobre ellas.

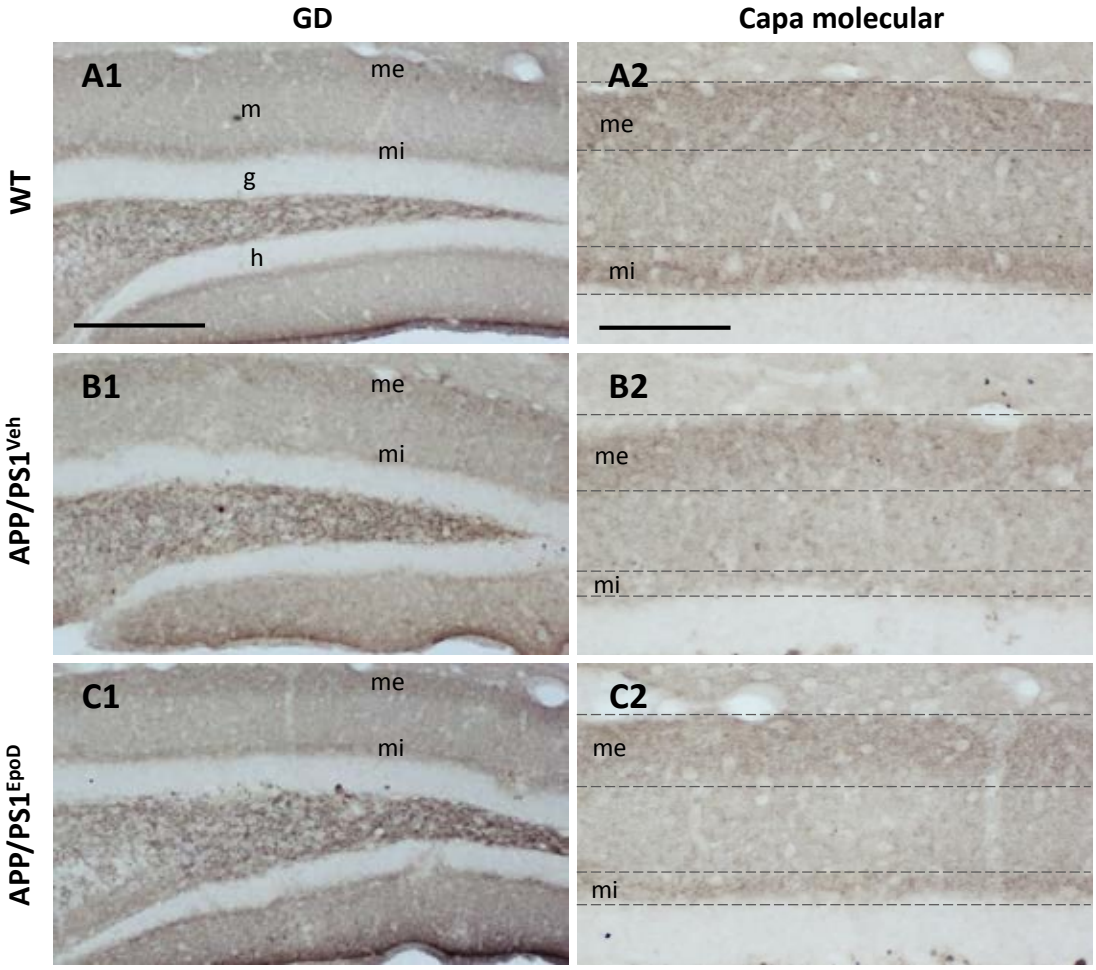
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

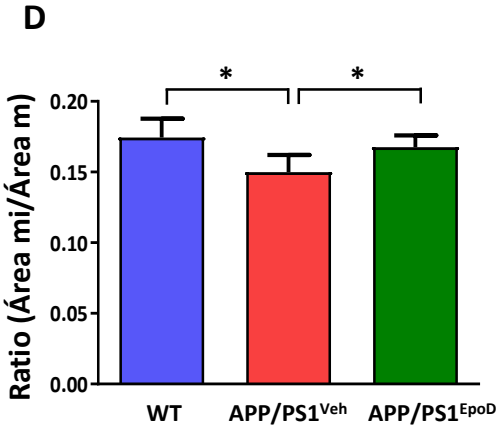


ADEVA de una via F(2,11) = 4,386; P = 0,039
*Tukey *p<0,05*

Figura 3.4.8. El tratamiento con EpoD preserva los niveles de la proteína presináptica sinaptofisina en el hipocampo de los animales APP/PS1. Western blot representativo (**A**) y análisis cuantitativo (**B**) de sinaptofisina (Syn) en el hipocampo de ratones WT, APP/PS1^{Veh} y APP/PS1^{EpoD}. Para la cuantificación, los niveles fueron referidos al grupo WT. Se empleó β-actina como control de carga. Los niveles de Syn están significativamente más bajos en los ratones APP/PS1^{Veh} comparado con el grupo WT de la misma edad, mientras que el grupo APP/PS1^{EpoD} presenta una recuperación parcial de esta proteína presináptica. *Este estudio se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Vitorica (IBIS, Sevilla).*

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA





*ADEVA de una vía F(2,12) = 5,644; P = 0,019; Tukey *p<0,05*

Figura 3.4.9. El tratamiento con EpoD reduce la patología sináptica en el giro dentado de APP/PS1. (**A1-C1)** Inmunotinción para sinaptofisina (Syn) en el giro dentado, y (**A2-C2**) detalles de la capa molecular de animales WT, APP/PS1^{Veh} y APP/PS1^{EpoD}. En WT se distingue el patrón de bandas para Syn en la capa molecular, con mayor inmunorreactividad en las capas molecular externa e interna. (**D**) Disminución significativa del área immunoteñida en la molecular interna de los animales APP/PS1^{Veh} en comparación con el grupo WT. Los animales tratados con EpoD presentan un área similar a los WT. *g: capa granular; GD: giro dentado; h: hilio; m: capa molecular; me: zona externa de la capa molecular; mi: zona interna de la capa molecular.* Barras de escala A1-C1: 200 µm; A2-C2: 100 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

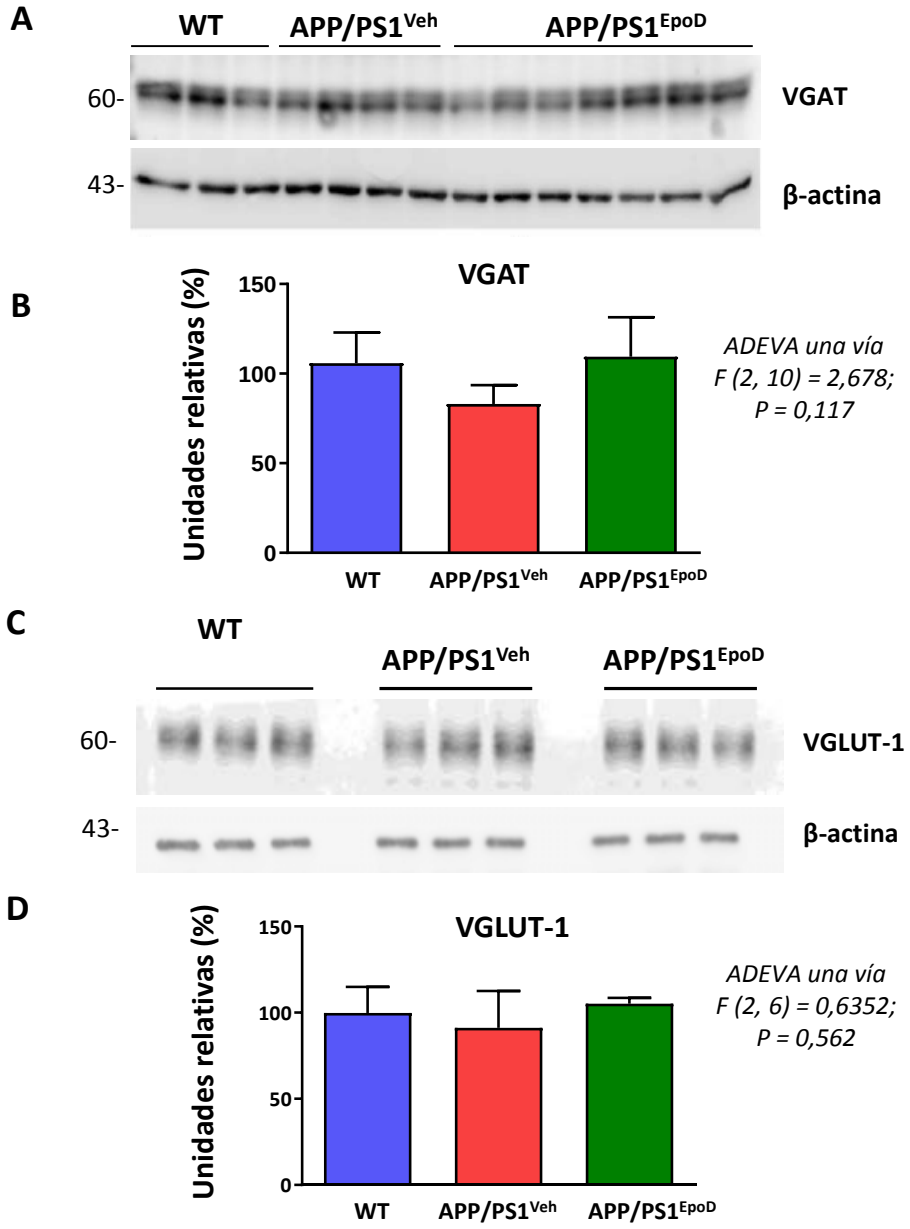
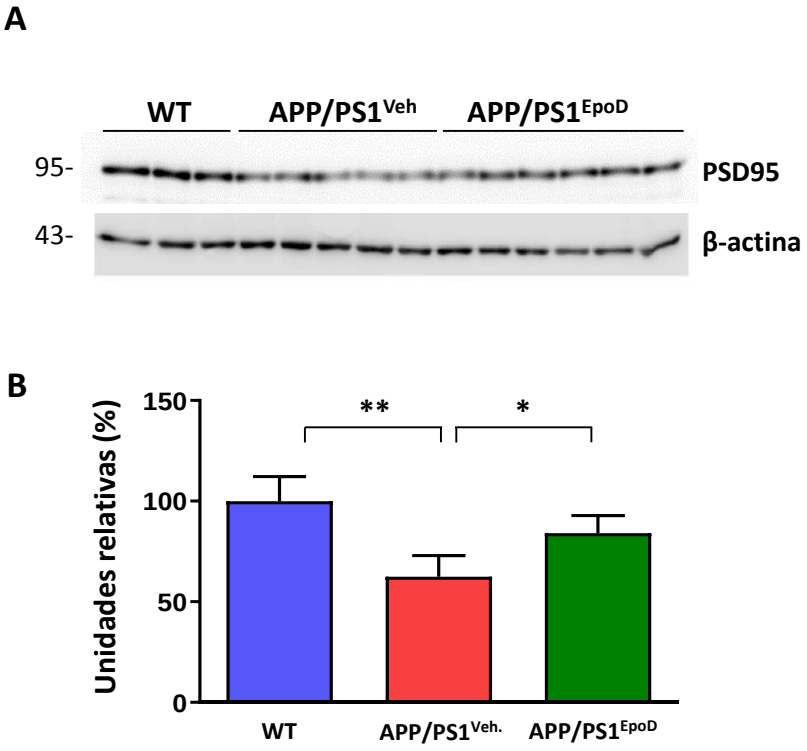


Figura 3.4.10. Efecto del tratamiento con EpoD sobre los niveles de VGAT y VGLUT-1 en el hipocampo de los animales APP/PS1. Western blots representativos (**A, C**) y análisis cuantitativo (**B, D**) de proteínas totales de los marcadores presinápticos (VGAT, transportador vesicular de GABA) y VGLUT-1 (transportador vesicular de glutamato-1) en el hipocampo de ratones WT, APP/PS1^{Veh} y APP/PS1^{EpoD}. Para la cuantificación, los niveles fueron referidos al grupo WT. Se empleó β-actina como control de carga. Se encontró una ligera recuperación en el grupo tratado en el caso del marcador GABAérgico VGAT (**A, B**), pero que no llegó a ser estadísticamente significativa. No se detectaron cambios en los niveles de VGLUT-1 (**C, D**) en ningún caso a esta edad. *Este estudio se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Vitorica (IBIS, Sevilla).*

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



ADEVA de una via F (2, 10) = 12,44; P = 0,0019
*Tukey *p<0,05, **p<0,01*

Figura 3.4.11. El tratamiento con EpoD preserva los niveles de la proteína postsináptica PSD95 en el hipocampo de los animales APP/PS1. Western blot representativo (**A**) y análisis cuantitativo (**B**) de los niveles de la proteína postsináptica PSD95 en el hipocampo de ratones WT, APP/PS1^{Veh} y APP/PS1^{EpoD}. Para la cuantificación, los niveles fueron referidos al grupo WT. Se empleó β-actina como control de carga. Los niveles de esta proteína se encontraron significativamente reducidos en los ratones del grupo APP/PS1^{Veh}, y fueron prácticamente restaurados al valor del grupo control gracias al tratamiento con EpoD. *Este estudio se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Vitorica (IBIS, Sevilla).*

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.4.3.2. Estudio del efecto de la EpoD sobre la patología neurítica en el hipocampo del modelo APP/PS1

Seguidamente, se analizó si la prevención del daño sináptico en los animales tratados tenía relación con una mejora de la patología axonal. Sabiendo que el modelo APP/PS1 reproduce la acumulación de proteínas ubiquitinadas en las neuritas distróficas periplaca (Sáchez-Varo et al., 2012; Torres et al., 2012; Trujillo-Estrada et al., 2013), se utilizó la ubiquitina como marcador para determinar si la estabilización microtubular estaría contribuyendo a la reducción de la patología neurítica en el hipocampo de estos animales.

En primer lugar, se constató mediante WB que los niveles de proteínas ubiquitinadas (**Fig. 3.4.12**) estaban incrementados significativamente ($F(2,11) = 14,97$; $P= 0,001$) en los animales APP/PS1^{Veh}, casi duplicando los del grupo WT (1,82 ± 0,27 veces; $p<0,001$). Los ratones APP/PS1^{EpoD}, aunque aún mantenían cierta diferencia con los WT (1,46 ± 0,16 veces mayor; $p<0,05$), sí que mostraban una disminución significativa (- 19,92 ± 7,83%; $p<0,01$) con respecto al grupo inyectado solo con vehículo.

Para confirmar estos resultados realizamos una tinción inmunohistoquímica para ubiquitina contrateñida con rojo congo (panorámicas del hipocampo en **Fig. 3.4.13 A1 y B1**). Como corresponde, el marcaje apareció en los somas neuronales, definiendo claramente el estrato piramidal de CA1 (**Fig. 3.13 A2 y B2**) y la capa granular del giro dentado (no mostrado). Además, en todos los animales APP/PS1 detectamos la presencia de proteínas ubiquitinadas en las neuritas distróficas alrededor de las placas congofílicas. Tanto en los APP/PS1^{EpoD} (**Fig. 3.13 B**) como en los APP/PS1^{Veh} (**Fig. 3.4.13 A**), se observaba una gran cantidad de distrofias ubiquitina-positivas asociadas a las placas del estrato oriens de CA1, siendo superior en los animales APP/PS1^{Veh} (**Fig. 3.4.13 A3 y B3**). El estudio cuantitativo mediante análisis de imagen mostró que existía un descenso significativo del área ocupada por las distrofias positivas para ubiquitina en el estrato oriens de CA1 (**Fig. 3.4.13 C**) en los animales APP/PS1^{EpoD} (-30,10 ± 19,18%; $p<0,05$) en comparación con los inyectados únicamente con vehículo.

A continuación, nos planteamos si la disminución de la cantidad de distrofias en CA1 podría deberse a (i) una reducción en el número de placas como consecuencia de una menor producción/deposición de Aβ, (ii) un descenso en la capacidad tóxica de los depósitos amiloides y por tanto en la propia cantidad de distrofias asociada a cada placa, o (iii) una combinación de ambos factores. Para responder a esta cuestión, en primer lugar, se determinó la relación entre la superficie de las placas y el área de distrofia asociada (corona distrófica), y si ésta se veía alterada por el tratamiento. Para ello, las placas neuríticas fueron clasificadas en función de su tamaño en “grandes” (con un área superior a 700 μm^2), “medianas” (entre 200-700 μm^2) o “pequeñas” (menores de 200 μm^2). Desde un punto de vista cualitativo, no se observaron

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

diferencias en la relación "área de distrofia/área de placa" entre placas pertenecientes a individuos APP/PS1^{Veh} (**Fig. 3.4.14, A1-A3**) o APP/PS1^{EpoD} (**Fig. 3.4.14, B1-B3**). En general, las placas de gran tamaño presentaron una mayor cantidad de distrofias que las medianas, y éstas a su vez, más que las pequeñas. En definitiva, el tamaño de la corona distrófica ubiquitina-positiva resultó ser proporcional al de la misma placa. Finalmente, el análisis cuantitativo corroboró que no existían diferencias significativas en esta proporción entre ambos grupos (**Fig. 3.4.14 C**; Mann-Whitney, P = 0,77). Además, al segregar los datos de acuerdo con el tamaño de las placas tampoco se detectó ninguna diferencia significativa (**Fig. 3.4.14 D**).

Por tanto, estos datos apuntan a que el descenso en la cantidad de distrofias presentes en CA1 parecía estar más bien asociada a una disminución de la propia carga amiloide (bien por una reducción en el número o en el tamaño de las placas y, por ende, de las distrofias que llevarían asociadas) que a un descenso del efecto tóxico del depósito *per se* sobre el neuropilo circundante.

Con el fin de confirmar la mejora de la patología neurítica (no solo la relacionada con el sistema UPS), se analizó mediante inmunohistoquímica otro marcador clásico de distrofias, la proteína precursora amiloide APP (**Fig. 3.4.15**) (Sanchez-Varo et al., 2012). Esta proteína está presente en la membrana plasmática, de vesículas y orgánulos (O'Brien and Wong, 2011) y, por tanto, los fallos en el transporte axonal suponen también una acumulación de esta proteína en las distrofias. La expresión del transgén hAPP en el modelo APP/PS1 está restringida a las neuronas de tipo glutamatérgico, por el promotor incluido en la construcción. Efectivamente, la inmunohistoquímica mostró que la presencia de hAPP era elevada en los somas de las neuronas principales (**Fig. 3.4.15**), ubicados en el estrato piramidal de CA1-CA3 (CA1 en **Fig. 3.15 A2 y B2**) y la capa granular del giro dentado. El marcaje también aparecía en el neuropilo tiñendo profusamente zonas como el hilio. Además, como era de esperar, y acorde a datos previos del grupo (Sanchez-Varo et al., 2012), la inmensa mayoría de las distrofias marcadas aparecieron asociadas a las placas congofílicas en ambos grupos. Cualitativamente, se percibió un descenso en la cantidad de estas placas en los animales APP/PS1^{EpoD} (**Fig. 3.4.15 B3**) en comparación con los APP/PS1^{Veh} (**Fig. 3.4.15 A3**). El estudio cuantitativo (**Fig. 3.4.15 C**) determinó la existencia de un descenso significativo (-27,51 ± 18,12%; $p<0,05$) en el área ocupada por las distrofias APP-positivas (carga de distrofias) en el estrato oriens de la región CA1 de los animales APP/PS1^{EpoD} en comparación con los APP/PS1^{Veh}, del mismo modo que lo observado para las distrofias ubiquitina-positivas.

Los resultados expuestos en este apartado sugieren que el tratamiento con la EpoD habría mejorado el flujo axonal, reduciendo la patología neurítica y redundando por tanto en una mejor conectividad entre los somas y los terminales sinápticos.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

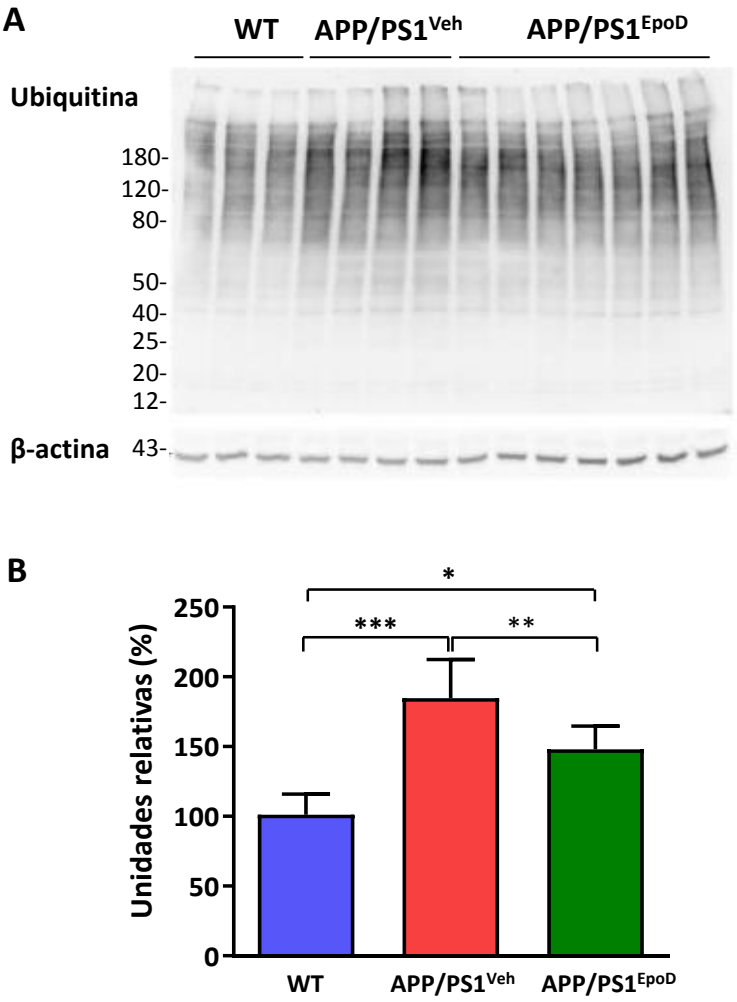
3.4.4. LA ESTABILIZACIÓN MICROTUBULAR REDUCE LA PÉRDIDA DE INTERNEURONAS GABAÉRGICAS EN EL HIPOCAMPO

La muerte de interneuronas GABAérgicas es un evento ampliamente constatado en la EA. En este sentido, nuestro grupo ha demostrado que en este modelo APP/PS1 existe un proceso neurodegenerativo selectivo de ciertos subtipos de neuronas GABAérgicas, entre ellas poblaciones que expresan somatostatina (SOM) en el hipocampo, subículo, la corteza entorrinal y perirrinal (Ramos et al., 2006; Moreno-Gonzalez et al., 2009; Trujillo-Estrada et al., 2013; Sanchez-Mejias et al., 2019), que se encuentra asociado a la patología amiloide. Por lo tanto, se decidió analizar el impacto del tratamiento con EpoD sobre esta subpoblación de interneuronas en el hipocampo de los animales APP/PS1^{EpoD} comparando con los animales APP/PS1^{Veh} y WT de la misma edad.

La tinción inmunohistoquímica para SOM en el hipocampo (**Fig 3.4.16 A**) mostró que los somas de estas neuronas se encuentran mayoritariamente concentrados en el estrato oriens de CA1-CA3 (**Fig. 3.4.16 B**, detalles en **3.4.16 C**) y el hilio del giro dentado. Además, en los animales transgénicos se observaron neuritas distróficas positivas para este neuropéptido (**Fig. 3.4.16 C2 y C3**) asociadas los depósitos amiloides (detalle en **Figura 3.4.16 D**). Se evaluó la densidad numérica (DN) tanto de las células como de las distrofias SOM-positivas en la región CA1 mediante cuantificación estereológica. En efecto, el tratamiento disminuyó significativamente la cantidad de distrofias axonales asociadas a las placas en los animales APP/PS1 (**Fig. 3.4.16 E**; - 33,63 ± 19,84%; 33221 ± 8222 distrofias/mm^3 APP/PS1^{Veh} vs. 22048 ± 4376 distrofias/mm^3 APP/PS1^{EpoD}; p<0,05), sugiriendo un efecto protector de la EpoD sobre la patología neurítica SOM-positiva. Más relevante aún fue que el tratamiento redujo significativamente la pérdida de esta subpoblación neuronal (F (2,12) = 11,15; P = 0,0018) en comparación con el grupo APP/PS1^{Veh} (**Fig. 3.4.16 F**; +20,07 ± 7,36% en los APP/PS1^{EpoD}; 7471 ± 1174 células/mm^3 APP/PS1^{Veh} vs. 9873 ± 727 células/mm^3 APP/PS1^{EpoD}; p<0,001) que presentó una reducción del 37,57 ± 15,7% con respecto al grupo WT (11968 ± 2199 células/mm^3; p<0,5).

Por lo tanto, estos datos sugieren que la estabilización de los microtúbulos por la acción de la EpoD fue capaz de proteger a una subpoblación de interneuronas SOM vulnerable a la patología de la EA, no solo de la degeneración axonal, sino también de la muerte celular.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



ADEVA de una vía F (2,11) = 14,97; P<0,001
*Tukey *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001*

Figura 3.4.12. El tratamiento con EpoD reduce la acumulación de proteínas ubiquitinadas en el hipocampo de los animales APP/PS1. Western blot representativo (**A**) y análisis cuantitativo (**B**) de proteínas ubiquitinadas en el hipocampo de ratones WT, vehículo y EpoD. Para la cuantificación, los niveles fueron referidos al grupo WT. Se produce una acumulación significativa de proteínas ubiquitinadas en los animales APP/PS1^{Veh} comparados con los controles, así como una reducción significativa de estas proteínas en los animales APP/PS1 tratados con EpoD. *Este estudio se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Vitorica (IBIS, Sevilla).*

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

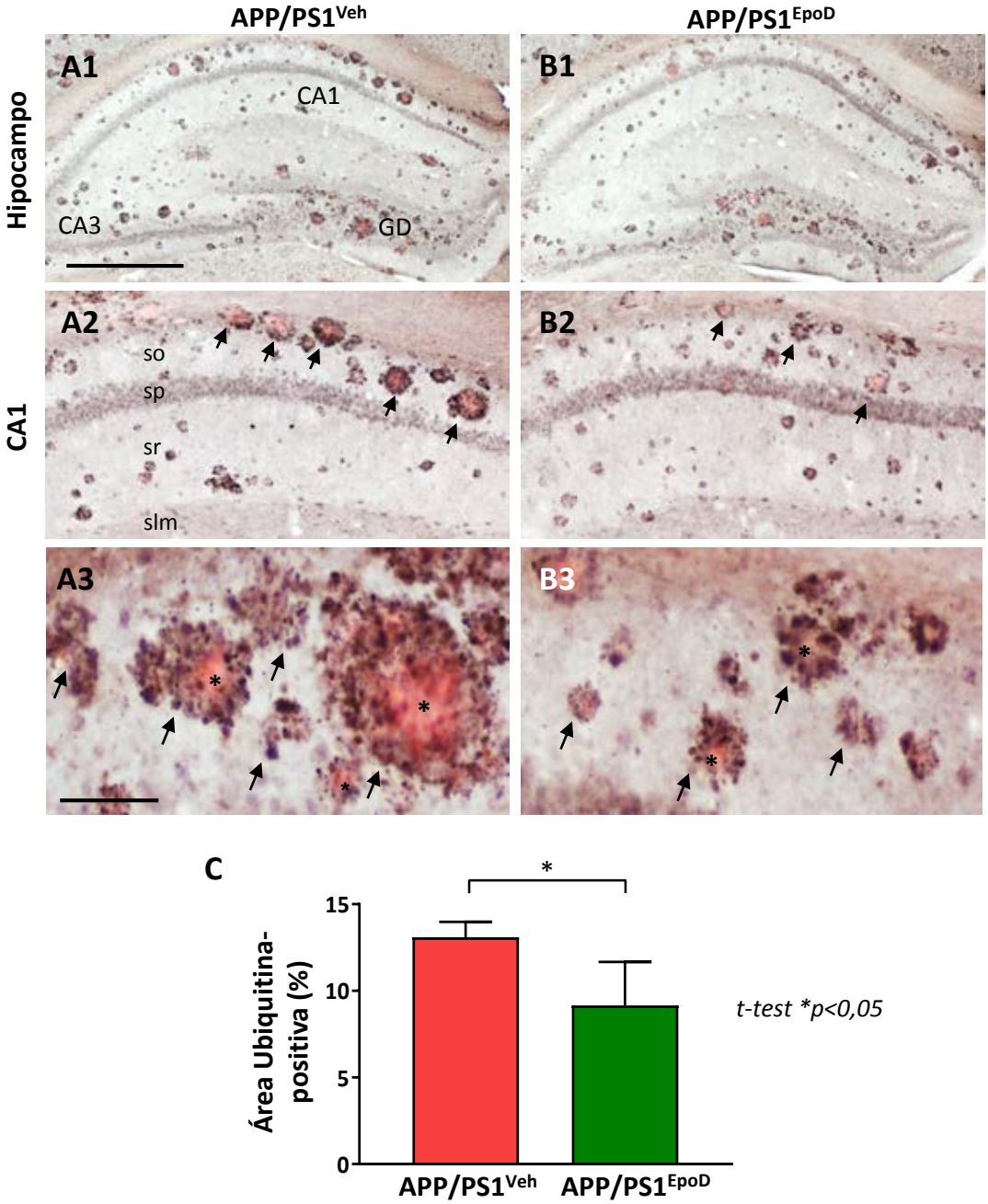


Figura 3.4.13. El tratamiento con EpoD reduce la carga de neuritas distróficas ubiquitina-positivas en el hipocampo de APP/PS1. Inmunohistoquímica para ubiquitina y contratinción con rojo congo en el hipocampo de animales APP/PS1^{Veh} (**A1**, y detalle de CA1 en **A2**) y APP/PS1^{EpoD} (**B1,** y detalle de CA1 en **B2**)**.** Detalles de las placas congofílicas (asteriscos) del estrato oriens de CA1 de animales APP/PS1^{Veh} (**A3**) y APP/PS1^{EpoD} (**B3**), rodeadas de neuritas distróficas positivas para ubiquitina (flechas). Se aprecia una reducción en el número y tamaño de los depósitos amiloides fibrilares en el grupo tratado con EpoD. (**C**) La cuantificación del área de CA1 ocupada por estas distrofias (carga de neuritas distróficas) mostró una disminución estadísticamente significativa en los animales tratados con EpoD en comparación con el grupo vehículo. *CA: cornu ammonis; GD, giro dentado; slm: estrato lacunoso-molecular; so: estrato oriens; sp: estrato piramidal; sr: estrato radiado*. Barras de escala A1, B1: 500 µm; A2, B2: 200 µm; A3, B3: 100 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

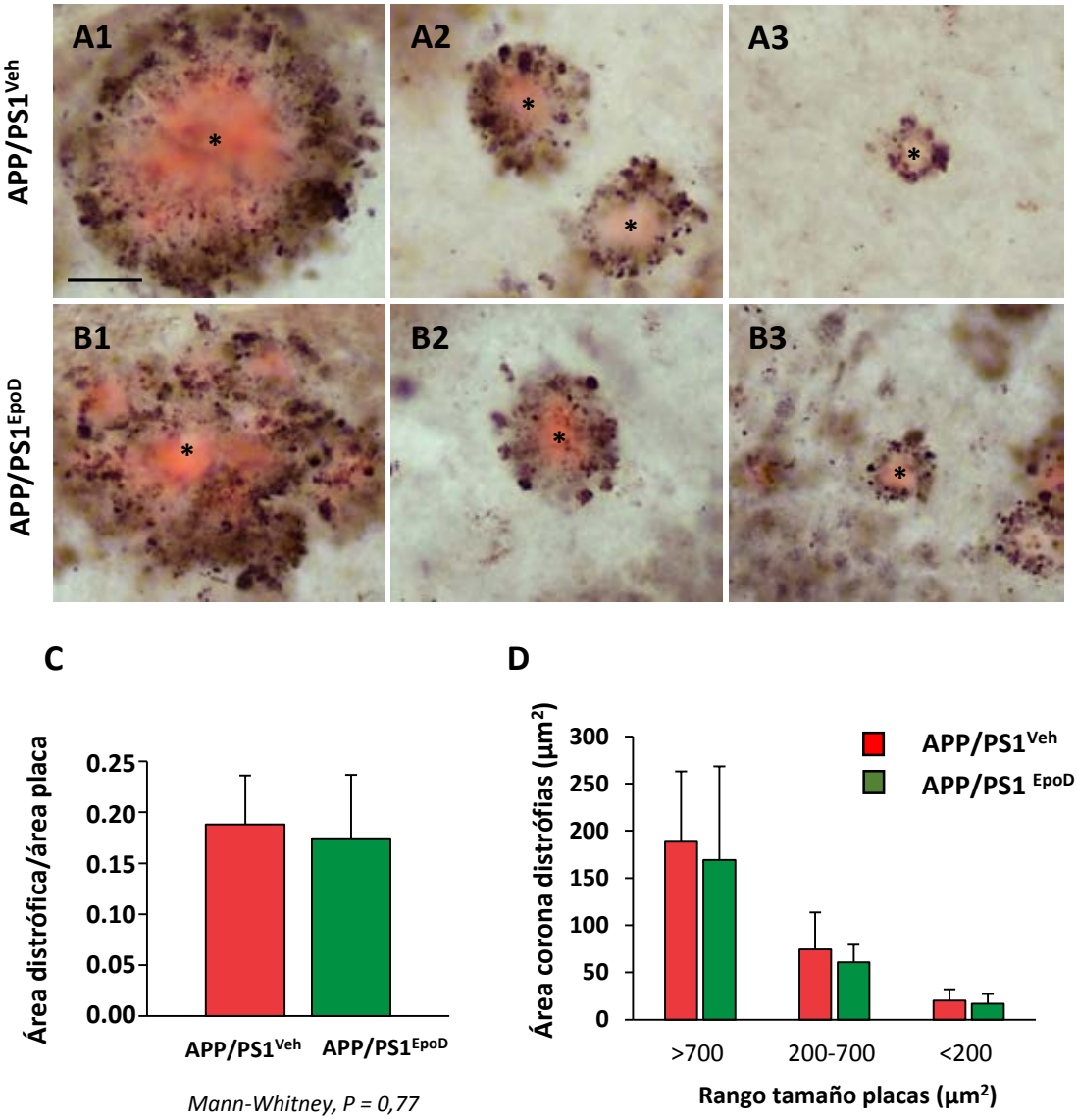


Figura 3.4.14. El tratamiento con EpoD no modifica la cantidad de distrofias por placa en el hipocampo del modelo APP/PS1. Se muestran detalles de placas fibrilares teñidas con rojo congo (asterisco), y su corona de neuritas distróficas inmunoteñidas para ubiquitina. Las placas fueron clasificadas en tres grupos de acuerdo a su tamaño: grandes (>700 µm², **A1, B1**), medianas (200-700 µm², **A2, B2**) y pequeñas (<200 µm² **A3, B3**). No existen diferencias significativas entre los dos grupos de animales en (**C**) la carga de distrofias (área inmunopositiva para ubiquitina) por unidad de área de la placa, ni en el área de la corona distrófica asociada a las placas clasificadas por tamaño (**D**). Barra de escala: 20 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

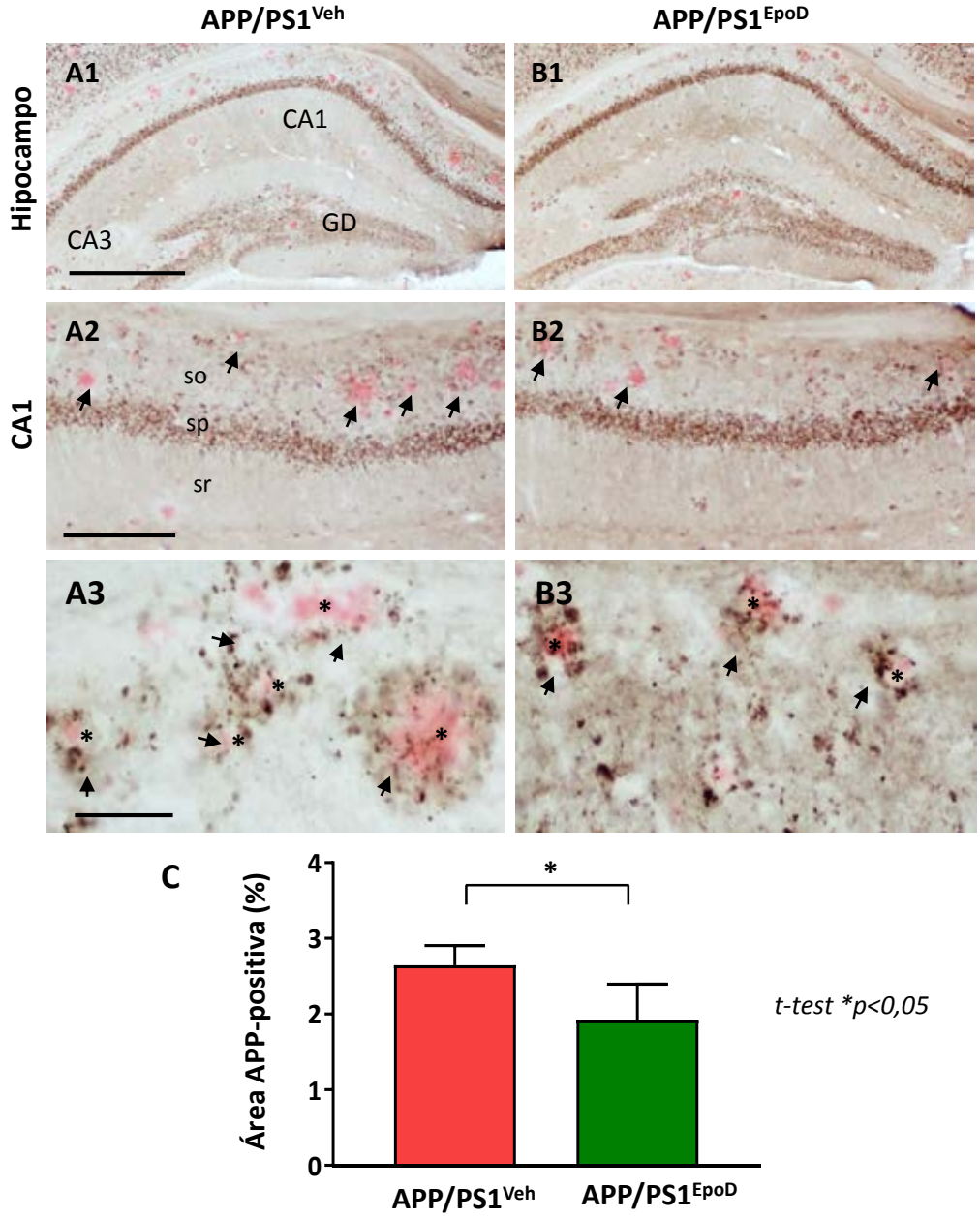


Figura 3.4.15. El tratamiento con EpoD reduce la carga de neuritas distróficas APP-positivas en el hipocampo de APP/PS1. Inmunohistoquímica para APP (marcador de distrofias) y contratinción con rojo congo (placas fibrilares) en el hipocampo de APP/PS1^{Veh} (**A1-A3**) y APP/PS1^{EpoD} (**B1-B3**). Detalle de la región CA1 del grupo vehículo en **A2** y del grupo EpoD en **B2.** Detalles de placas congofílicas (asterisco) rodeadas de neuritas distróficas APP-positivas (flechas) en el estrato oriens de CA1 del grupo vehículo (**A3**) y del grupo tratado (**B3**). Se observa una disminución en la cantidad de neuritas distróficas APP-positiva y de placas congofílicas en APP/PS1^{EpoD}. (**C**) La cuantificación del área de la región CA1 ocupada por distrofias APP (carga de neuritas) mostró una reducción significativa en los animales APP/PS1^{EpoD} en comparación con los APP/PS1^{Veh}. *CA: cornu ammonis; GD, giro dentado; so: estrato oriens; sp: estrato piramidal; sr: estrato radiado*. Barras de escala. A1, B1: 500 µm; A2, B2: 200 µm; A3, B3: 100 µm

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

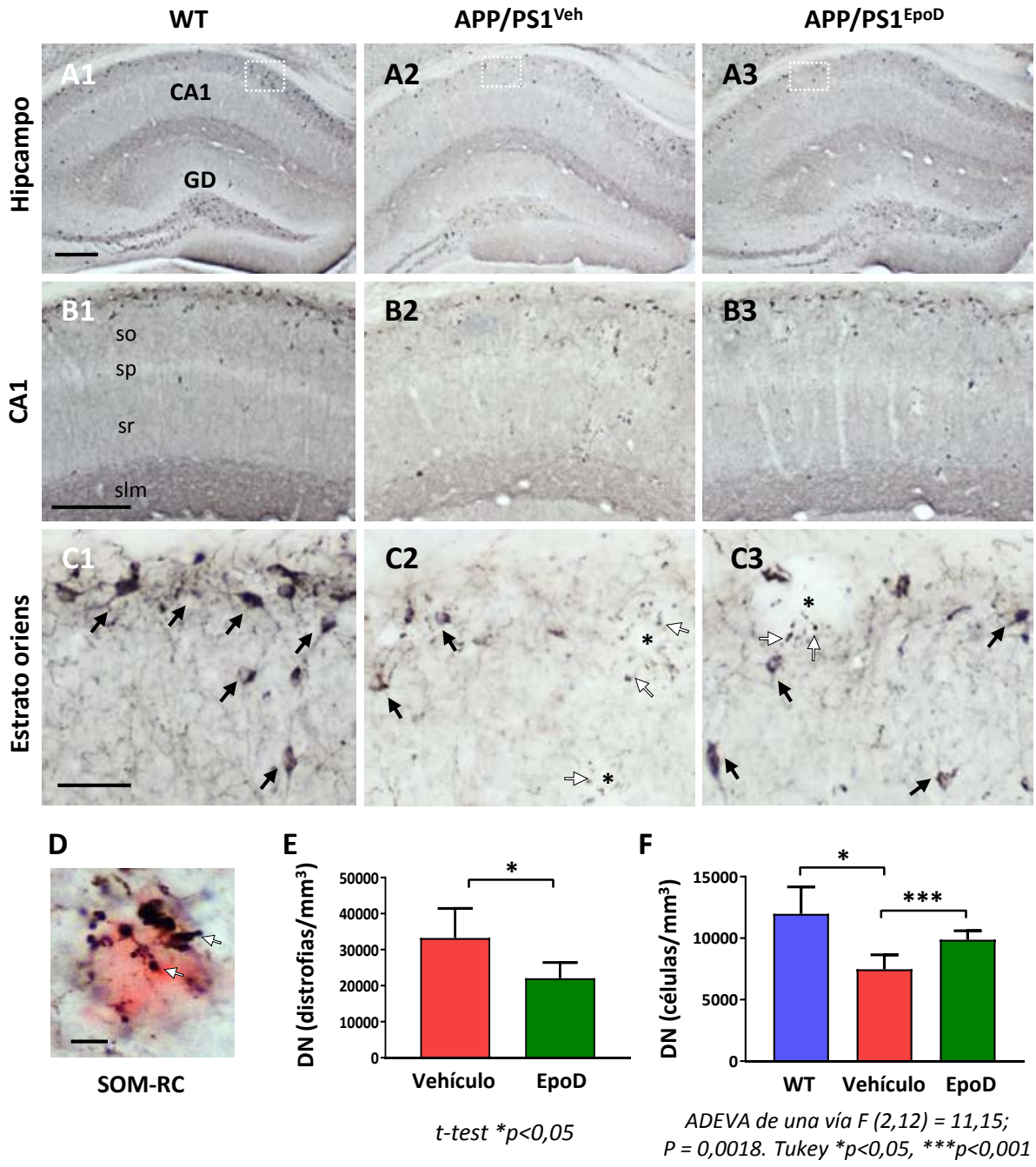


Figura 3.4.16. El tratamiento con EpoD reduce la pérdida de interneuronas SOM-positivas en APP/PS1. Imágenes panorámicas del hipocampo inmunomarcado para SOM en WT (**A1**), APP/PS1^{Veh} (**A2**) y APP/PS1^{EpoD} (**A3**). Detalles de la región CA1 (**B1-B3**) y del estrato oriens (**C1-C3**)**.** Se aprecia una menor densidad de somas SOM-positivos (flechas negras) en APP/PS1^{Veh} que en WT y APP/PS1^{EpoD}. Se señalan neuritas distróficas (flechas blancas) asociadas a las placas amiloides (asterisco). (**D**) Detalle de placa congofílica con neuritas SOM-positivas asociadas. (**E**) Disminución de la cantidad de neuritas SOM-positivas en CA1 de APP/PS1^{EpoD}. (**F**) Pérdida significativa de la densidad de interneuronas SOM-positivas en APP/PS1^{Veh} en comparación con los ratones WT, y recuperación significativa de esta población gabaérgica en APP/PS1^{EpoD}. *CA: cornu ammonis; GD: giro dentado; RC: rojo Congo; so: estrato oriens; sp, estrato piramidal; sr, estrato radiado; slm: estrato lacunoso-molecular.* Barras de escala: A: 250 µm; B: 100 µm; C: 50 µm; D: 20 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.4.5. LA EPOD REDUCE LAS PATOLOGÍAS DE TAU Y Aβ EN EL MODELO APP/PS1

A continuación, se evaluó si la reducción en los procesos neurodegenerativos del modelo APP/PS1 tratado con EpoD podría estar relacionada con una disminución de las marcas histopatológicas clásicas de la EA, es decir, la acumulación de fosfo-tau y/o del péptido Aβ. En este sentido es importante destacar que, aunque el modelo APP/PS1 no llega a desarrollar NFTs, sí que presenta acumulación de fosfo-tau en las neuritas distróficas que rodean las placas amiloides desde estadios tempranos (3-4 meses) (Sanchez-Varo et al., 2012; Torres et al., 2012). Por este motivo se analizó si el tratamiento con EpoD tuvo algún impacto en la patología neurítica asociada a tau en el hipocampo de este modelo amiloidogénico.

Primero, mediante WB se determinó la proporción de tau hiperfosforilada con respecto a tau total (AT8/TAU46) en el hipocampo de los animales que recibieron la solución vehículo y el tratamiento con EpoD (**Fig. 3.4.17**). Como era de esperar, se detectó una reducción en la proporción de fosfo-tau acumulada en los animales APP/PS1^{EpoD} (60,07 ± 6,7%; $p<0,05$) en comparación con el grupo APP/PS1^{Veh} (100,07 ± 26,89%). Además, se realizó una inmunohistoquímica para fosfo-tau (AT8) seguida de contratinción con rojo congo en el hipocampo de los animales APP/PS1 para observar las neuritas distróficas AT8-positivas (**Fig. 3.4.18**). El marcaje se situó preferentemente alrededor de las placas congofílicas (ver insertos en **Fig. 3.4.18 A2 y B2**), al igual que ocurrió anteriormente con los marcadores ubiquitina y APP. Cualitativamente, se apreció que la patología neurítica AT8-positiva era menor en la región CA1 de los ratones APP/PS1^{EpoD} (**Fig. 3.4.18 B1 y B2**) que en los APP/PS1^{Veh} (**Fig. 3.4.18 A1 y A2**). La cuantificación estereológica de la densidad numérica de distrofias AT8-positivas (**Fig. 3.4.18 C**) confirmó que la cantidad de distrofias en CA1 era significativamente menor (-27,17% ± 19,1%; $p<0,05$) en los animales tratados con EpoD que en los APP/PS1^{Veh}. Por lo tanto, a pesar del hecho de que las vías de señalización involucradas en la fosforilación de tau no son un objetivo directo de los fármacos estabilizadores de microtúbulos, estos datos indican que EpoD atenúa la patología de tau en el modelo APP/PS1, al menos a nivel neurítico.

A continuación, con el fin de analizar si el tratamiento con EpoD influyó en la deposición extracelular del péptido Aβ, se realizó una tinción inmunohistoquímica para Aβ42 (isoforma con mayor capacidad de agregación, y presente tanto en placas fibrilares como no fibrilares (**Fig. 3.4.19;** ver detalle de placa inserto en **Fig. 3.4.19 B2**) en secciones hipocampales de animales APP/PS1^{Veh} y APP/PS1^{EpoD} (**Fig. 3.4.19 A y B,** respectivamente). En ambos grupos se apreció que el estrato oriens de CA1 y el hilio del giro dentado eran las capas que concentraban mayor densidad de placas, además de ser las de mayor tamaño. Cierta cantidad de placas apareció en el estrato piramidal y en el estrato radiado **(Fig. 3.4.19 A2 y B2)**; el estrato lacunoso-molecular

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

presentaba escasos depósitos amiloides en ambos grupos, aunque sí aparecieron placas asociadas a los vasos sanguíneos de la fisura hipocampal. Con respecto a las subcapas del giro dentado (**Fig. 3.4.19 A3 y B3)**, la capa molecular presentaba menor densidad de placas y de menor tamaño que el hilio. Desde un punto de vista cualitativo, en el hipocampo del grupo tratado se observó una menor cantidad de depósitos amiloides que en el grupo control **(Fig. 3.4.19 A1 y B1)**, tanto en la región CA1 (**Fig. 3.4.19 A2 y B2**) como en giro dentado (**Fig. 3.4.19 A3 y B3**). Precisamente, las diferencias más notables entre ambos grupos se daban en el estrato oriens de CA1 e hilio.

Se realizó un estudio cuantitativo mediante análisis de imagen para determinar la carga amiloide para Aβ42. Los animales APP/PS1^{EpoD} mostraron un descenso significativo en comparación con los APP/PS1^{Veh} tanto en la región CA1 (**Fig. 3.4.19 C**; - 19,5 ± 13,02%; $p<0,05$) como en el giro dentado (**Fig. 3.4.19 D**; - 17,46 ± 13,09%; $p<0,05$).

El siguiente paso fue dilucidar si esta disminución de la carga amiloide extracelular era consecuencia de una reducción del número o del tamaño de las placas. Para ello, se realizó una cuantificación estereológica de la densidad numérica en la región CA1 que demostró que la cantidad de depósitos amiloides permaneció inalterada (**Fig. 3.4.20 A**, -2,73 ± 14,17% APP/PS1^{EpoD} vs. APP/PS1^{Veh}). Sin embargo, el área media de las placas (μm^2) en los animales APP/PS1^{EpoD} fue significativamente menor que en el grupo que recibió el vehículo (**Fig. 3.4.20 B**, -35,07 ± 13,46%; $p<0,01$). Segmentado las placas por grupos de tamaño, hubo una reducción prominente en la categoría de las placas más grandes (>2000 μm^2) (-55,25 ± 18,78%, $p<0,001$) junto con un aumento (aunque no significativo) en la densidad de los depósitos más pequeños (<50 μm^2) (+ 21,4 ± 7,68% vs. APP/PS1^{Veh}) (**Fig. 3.4.20 C**).

Para complementar este estudio se analizaron los agregados amiloides de naturaleza fibrilar (que conforman el núcleo de las placas) mediante tinción con Tio-S (con capacidad de unirse a estructuras con conformación en hoja-β plegada) en el hipocampo de ambos grupos. Como era de esperar, la cantidad de placas fibrilares detectadas (**Fig. 3.4.21**; ver detalle de placa en inserto en **Fig. 3.4.21 B2**) fue menor que la de placas Aβ42-positivas. La disposición de estos depósitos, en cuanto a su abundancia relativa por capas, se mantuvo de manera similar a lo observado con el marcaje para Aβ42, apareciendo mayoritariamente en el estrato oriens de CA1 (**Fig. 3.4.21 A2 y B2**) y en el hilio del giro dentado (**Fig. 3.4.21 A3 y B3**). Cualitativamente, se apreciaba un ligero descenso en la cantidad de placas fibrilares tanto en las regiones de CA1 como del giro en los animales APP/PS1^{EpoD} (**Fig. 3.4.21 B**) comparándolos con los APP/PS1^{Veh} (**Fig. 3.4.21 A**). El estudio cuantitativo realizado posteriormente determinó un descenso significativo en la carga de placas fibrilares en la región CA1 de los animales APP/PS1^{EpoD} (-27,75 ± 20,06%; $p=0,05$; **Fig. 3.4.21 C**) con respecto a los APP/PS1^{Veh}. En el giro dentado también disminuyó de

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

manera similar la carga amiloide fibrilar (-23,14 ± 21,7%; **Fig. 3.4.21 D**) en los animales APP/PS1^{EpoD}, aunque está diferencia no llegó a ser estadísticamente significativa.

Estos resultados histológicos fueron apoyados por los obtenidos al determinar los niveles totales de Aβ monomérico por WB (**Fig. 3.4.22 A y B**). Así, el hipocampo de los animales APP/PS1^{EpoD} presentó una reducción significativa de Aβ monomérico en comparación con el grupo APP/PS1^{Veh} (66,93 ± 9,40% vs. 100 ± 14,69% respectivamente; p<0,01). Previamente, nuestro grupo había demostrado que existe acumulación de Aβ en la fracción sinaptosomal del modelo APP/PS1, y que de hecho ésta podría ser un reflejo de la propia patología axonal (Torres et al., 2012). Como se muestra en la **Figura 3.4.22** (**C y D**), los animales APP/PS1^{EpoD} exhibieron una importante reducción de la cantidad de Aβ en los sinaptosomas con respecto al grupo APP/PS1^{Veh} (EpoD, 41,62 ± 15,35% vs. 100 ± 12,91%, respectivamente; p<0,01). A continuación, dado que las especies oligoméricas de Aβ solubles son las que tienen mayor potencial sinaptotóxico, se compararon los niveles de estos agregados en las fracciones solubles (S1) hipocampales mediante dot-blot (**Fig. 3.4.23**). En efecto, los animales tratados con EpoD presentaron una dramática disminución (-84,51 ± 7,4% vs. grupo APP/PS1^{Veh}; p<0,001) de los niveles de formas oligoméricas prefibrilares y fibrilares (anticuerpo conformacional OC; **Fig. 3.4.23 A y B, izquierda**) así como de aquellas de bajo peso molecular (-86,5 ± 5,6%, p<0,001; anticuerpo A11; **Fig. 3.4.23 A y B, derecha**).

3.4.6. EFECTO DE LA EPOD EN LA PRODUCCIÓN DE Aβ Y EN EL PROCESAMIENTO DE APP

Con el objetivo de dilucidar si la estabilización de los microtúbulos podría interferir en la producción de Aβ se realizó un estudio *in vitro* en un modelo celular amiloidogénico. Se utilizaron células de la línea N2a-APPSwe incubadas con EpoD a una concentración de 100nM durante 12 h o 24 h. Como control se realizó la incubación con la solución vehículo. Una vez finalizado el tratamiento, se analizó el contenido intracelular de Aβ mediante Western Blot (**Fig. 3.4.24 A y B**). El tratamiento agudo con EpoD produjo una reducción significativa en la cantidad de Aβ intracelular (41,63 ± 4,92% o 48,71 ± 4,27 % vs. 100,01 ± 23,71% para 12h y 24h EpoD vs. Control, respectivamente; p<0,05) sin que hubiera alteraciones en la producción de fragmentos carboxi-terminales derivados de APP (APP-CTFs) en estas células (F (2, 8) = 0,1251; P=0,88).

A continuación, se analizaron los niveles de APP-CTFs en extractos de cerebro de los animales APP/PS1^{Veh} y APP/PS1^{EpoD}. Por un lado, se cuantificaron los niveles de fragmentos APP-CTF solubles C99 y C83 (**Fig. 3.4.25 A y B**) así como de los fragmentos sAPPα y sAPPβ (**Fig. 3.4.25 C y D**). En ningún caso se detectaron diferencias significativas entre ambos grupos para estos fragmentos (t-test, p > 0,05). Del mismo modo, tampoco se encontraron diferencias en los niveles de APP-CTF entre las fracciones sinaptosomales de estos grupos (**Fig. 3.4.25 E y F**).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

El descenso en los niveles de Aβ debido al tratamiento, tanto *in vivo* como *in vitro,* también podría deberse a un efecto inhibitorio de EpoD sobre las actividades BACE-1 o γ-secretasa. Por lo tanto, se analizó el posible efecto directo de EpoD en la actividad de ambas enzimas en membranas extraídas de tejido cerebral de animales APP/PS1^{veh} y APP/PS1^{EpoD}. Se determinó que la actividad BACE-1 (**Fig. 3.4.26 A**) no se veía directamente afectada por el tratamiento (P = 0,294). La ausencia de inhibición de BACE-1 es coherente con el hecho de que no hubiera diferencias en la cantidad de APPβ soluble (**Fig. 3.4.25 D**) o de fragmentos C99 (**Fig. 3.4.26 B**). Del mismo modo, no se observaron cambios en los fragmentos solubles de APPα (**Fig. 3.4.25 D**) o C83 (**Fig. 3.4.26 B**), lo que descarta la inhibición de la α-secretasa por parte de EpoD. De forma complementaria, los datos revelaron que la EpoD no tuvo ningún efecto directo sobre la actividad de la γ-secretasa en los APP/PS1^{EpoD}, como indicó el que no existiesen diferencias significativas en los niveles de AICD (**Fig. 3.4.26 B y C**).

Todos estos datos en conjunto indican que la administración de EpoD no solo disminuye la patología tau, sino que también reduce la acumulación de Aβ, tanto a nivel extracelular (placas) como intracelular (fundamentalmente en la fracción sinaptosomal), produciendo una importante disminución en la cantidad de formas oligoméricas tóxicas solubles. Además, esta disminución no se debe a un efecto directo del compuesto sobre las actividades de las secretasas implicadas en la producción del péptido. Por lo tanto, es probable que el tratamiento haya actuado en uno de los puntos de conexión de ambas proteinopatías.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

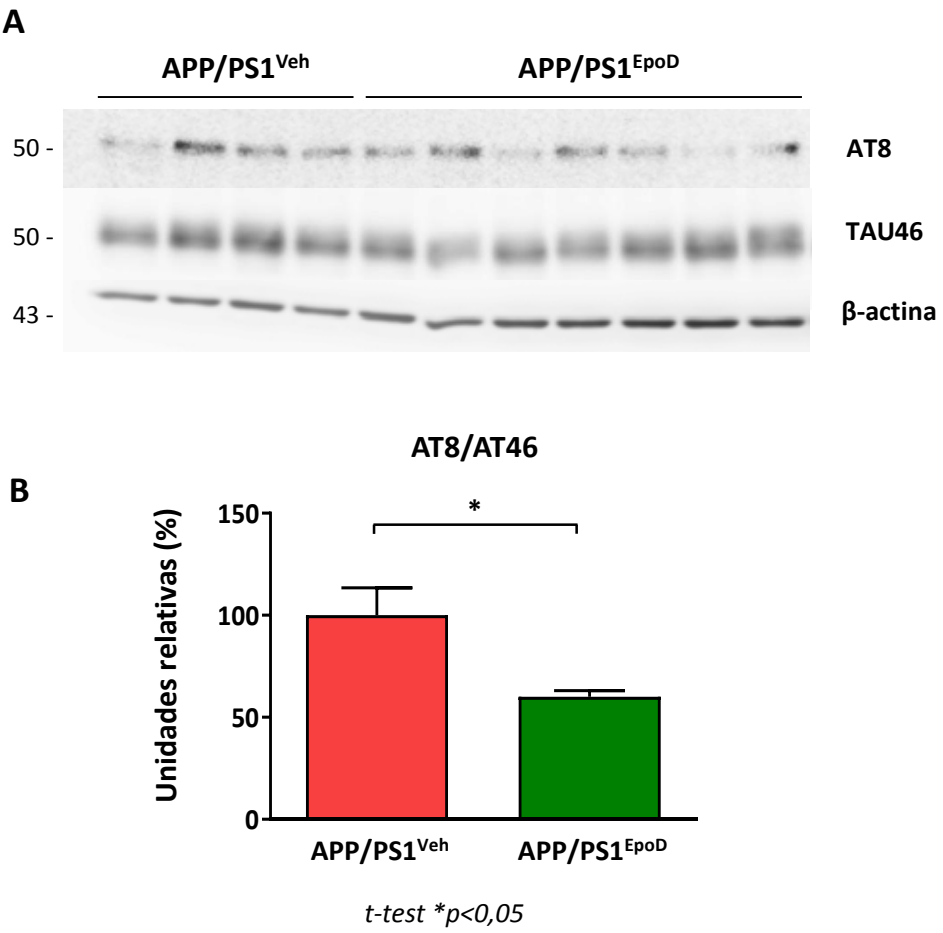


Figura 3.4.17. El tratamiento con EpoD reduce significativamente la patología tau en el hipocampo del modelo APP/PS1. Western blots representativos (**A**) y análisis cuantitativo (**B**) de la relación fosfo-tau con respecto al tau total (AT8/AT46) en los ratones APP/PS1^{Veh} y APP/PS1^{EpoD}. Se utilizó β-actina como control de carga. La acumulación de fosfo-tau en la región del hipocampo se reduce significativamente en los animales tratados con EpoD. *Este estudio se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Vitorica (IBIS, Sevilla).*

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

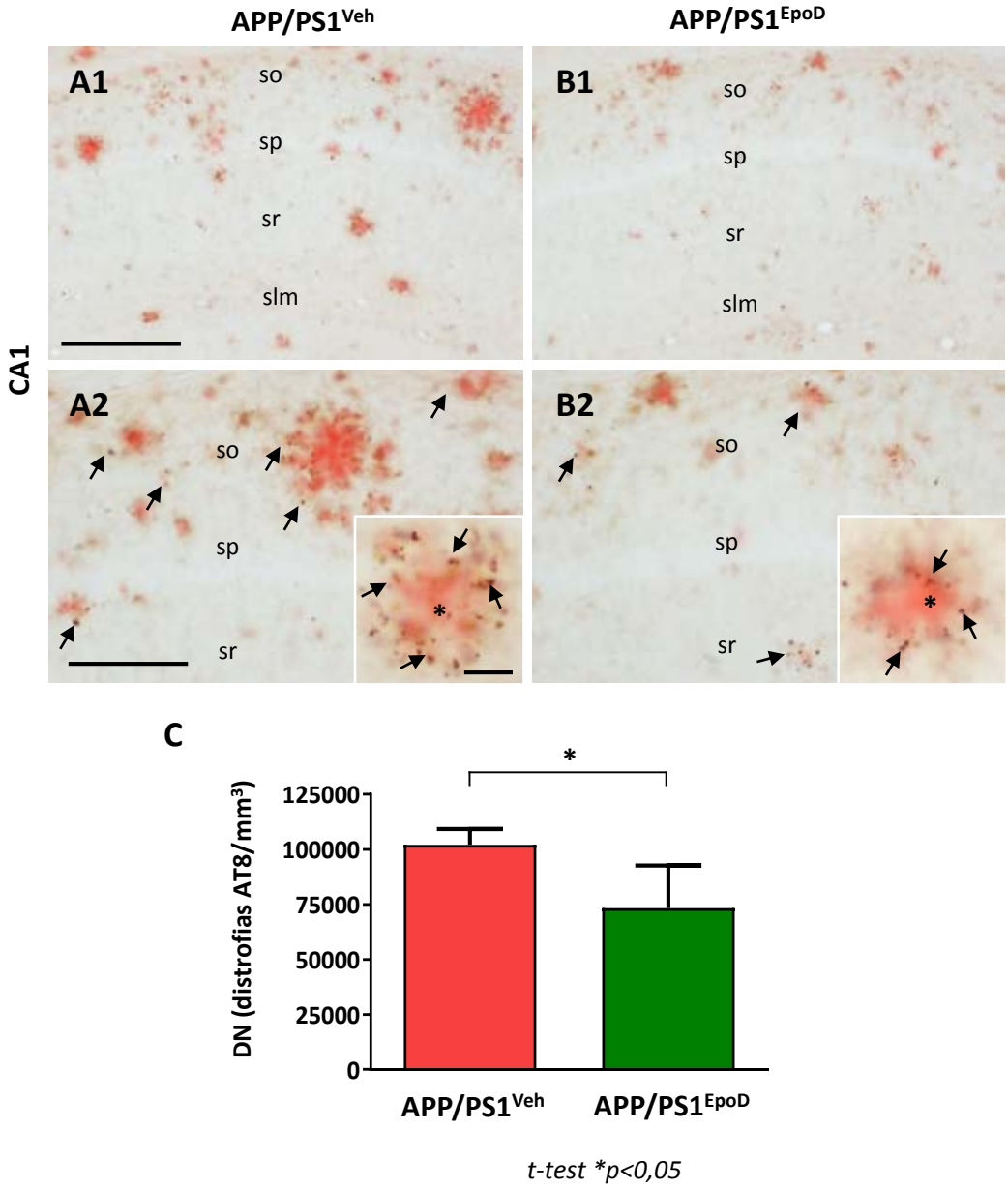


Figura 3.4.18. Reducción del número de neuritas distróficas que contienen fosfo-tau en el hipocampo de los animales APP/PS1 tratados con EpoD. (**A, B**) Imágenes de la región CA1 del hipocampo en las que se muestran placas congofílicas (asterisco) de animales APP/PS1^{Veh} (**A**) y APP/PS1^{EpoD} (**B**) rodeadas de neuritas distróficas inmunopositivas para AT8 (flechas). (**C**) La cuantificación estereológica revela una reducción estadísticamente significativa de la densidad numérica (número de distrofias/mm^3; DN) en los animales tratados con EpoD en comparación con el grupo vehículo. *so: estrato oriens; sp, estrato piramidal; sr, estrato radiado; slm: estrato lacunoso-molecular.* Barras de escala: A1, B1: 200 µm; A2, B2: 100 µm; insertos en A2, B2: 20 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

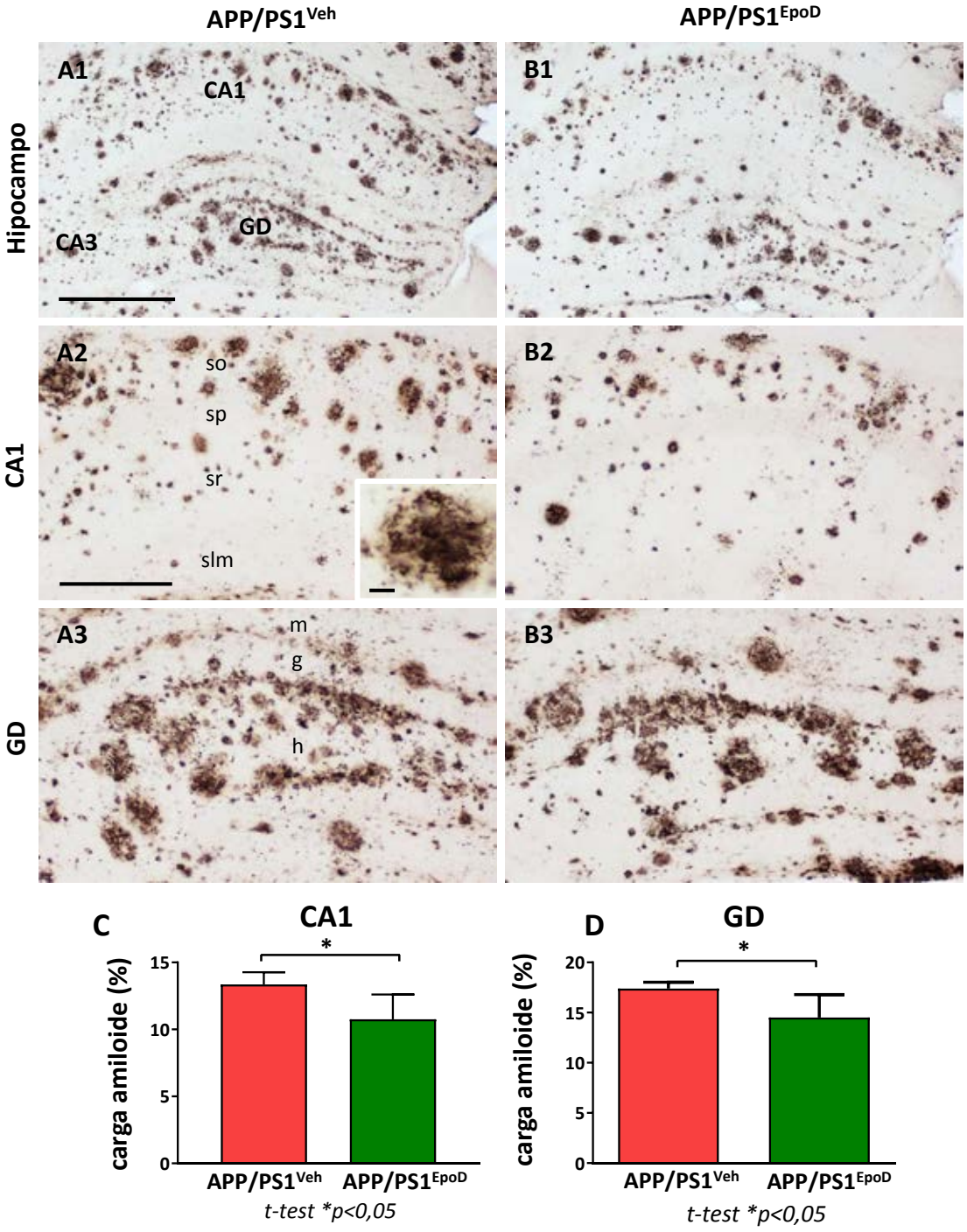


Figura 3.4.19. Disminución de la carga amiloide en el hipocampo de los animales tratados con EpoD. Inmunohistoquímica para $A\beta_{42}$ (detalle de placa **inserto en B2**). Se observa un descenso de la cantidad de placas inmunomarcadas en los animales APP/PS1^{EpoD} (**B1;** detalle de CA1 en **B2;** detalle de GD en **B3**) en comparación con los APP/PS1^{Veh} (**A1;** detalle de CA1 en **A2;** detalle de GD en **A3**). (**C, D**) La cuantificación por análisis de imagen del área inmunorreactiva para $A\beta_{42}$ muestra una disminución estadísticamente significativa tanto en CA1 (**C**) como en el GD (**D**) de los animales tratados con EpoD. *CA: cornu ammonis; g: capa granular; GD: giro dentado; h: hilio; m: capa molecular; so: estrato oriens; sp: estrato piramidal; sr: estrato radiado; slm: estrato lacunoso-molecular*. Barra de escala: A1, B1: 500 µm; A2-B3: 200 µm; inserto en A2: 20 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

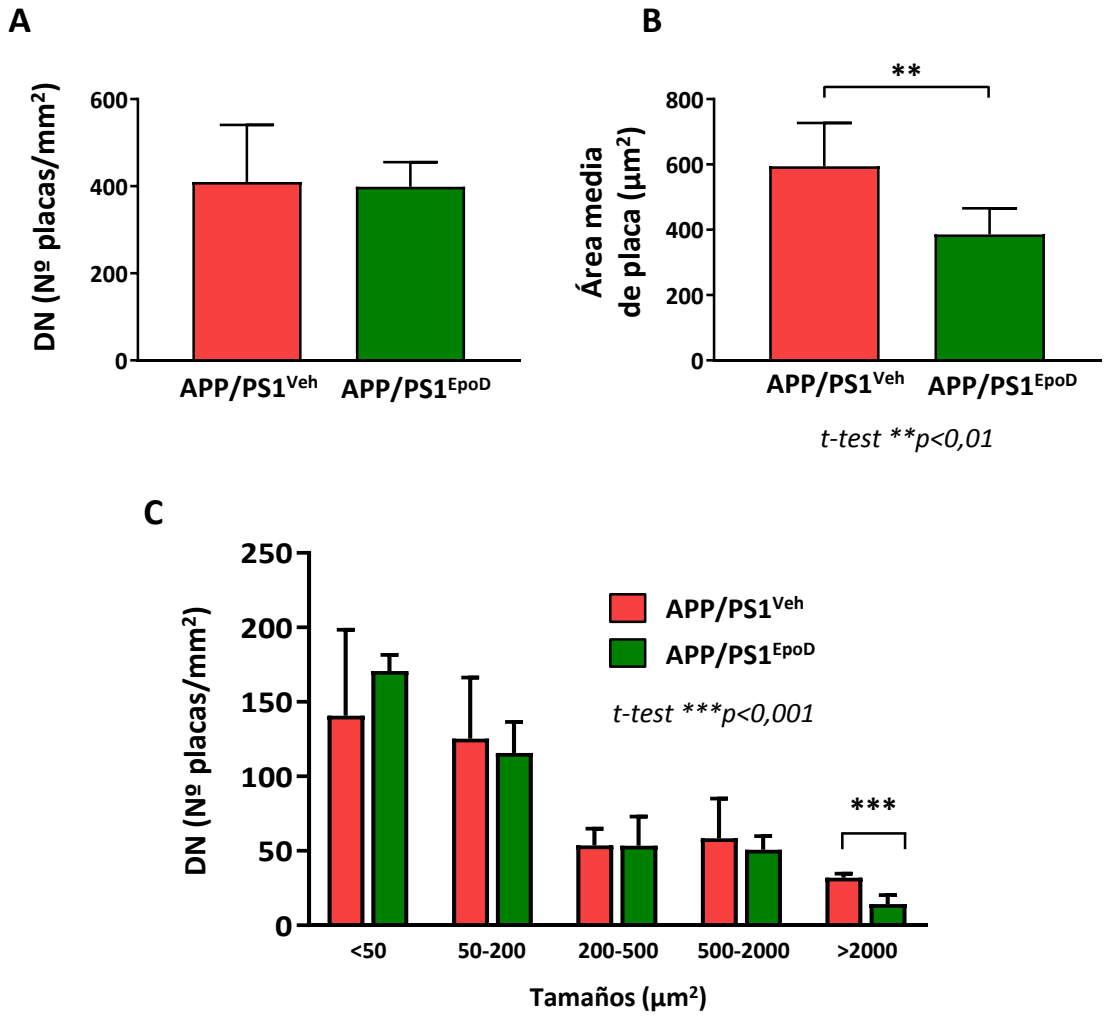


Figura 3.4.20. El tratamiento con EpoD reduce el tamaño medio de los depósitos de Aβ en el hipocampo de animales APP/PS1. El análisis cuantitativo del número (**A**) y del tamaño de placas (**B**) amiloides se ha realizado por estereología en la región CA1 de los ratones APP/PS1^{Veh} y APP/PS1^{EpoD}. (**A**) El número de placas no se ve afectado por el tratamiento. (**B**) El tamaño medio de las placas de los animales APP/PS1^{EpoD} es menor que en los APP/PS1^{Veh}. (**C**) Se muestra la distribución de placas por tamaño según su densidad numérica en distintos rangos de superficie (desde <50 µm² a >2000 µm²). Se detectan diferencias significativas en la cantidad de placas de mayor tamaño (superiores a 2000 µm²).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

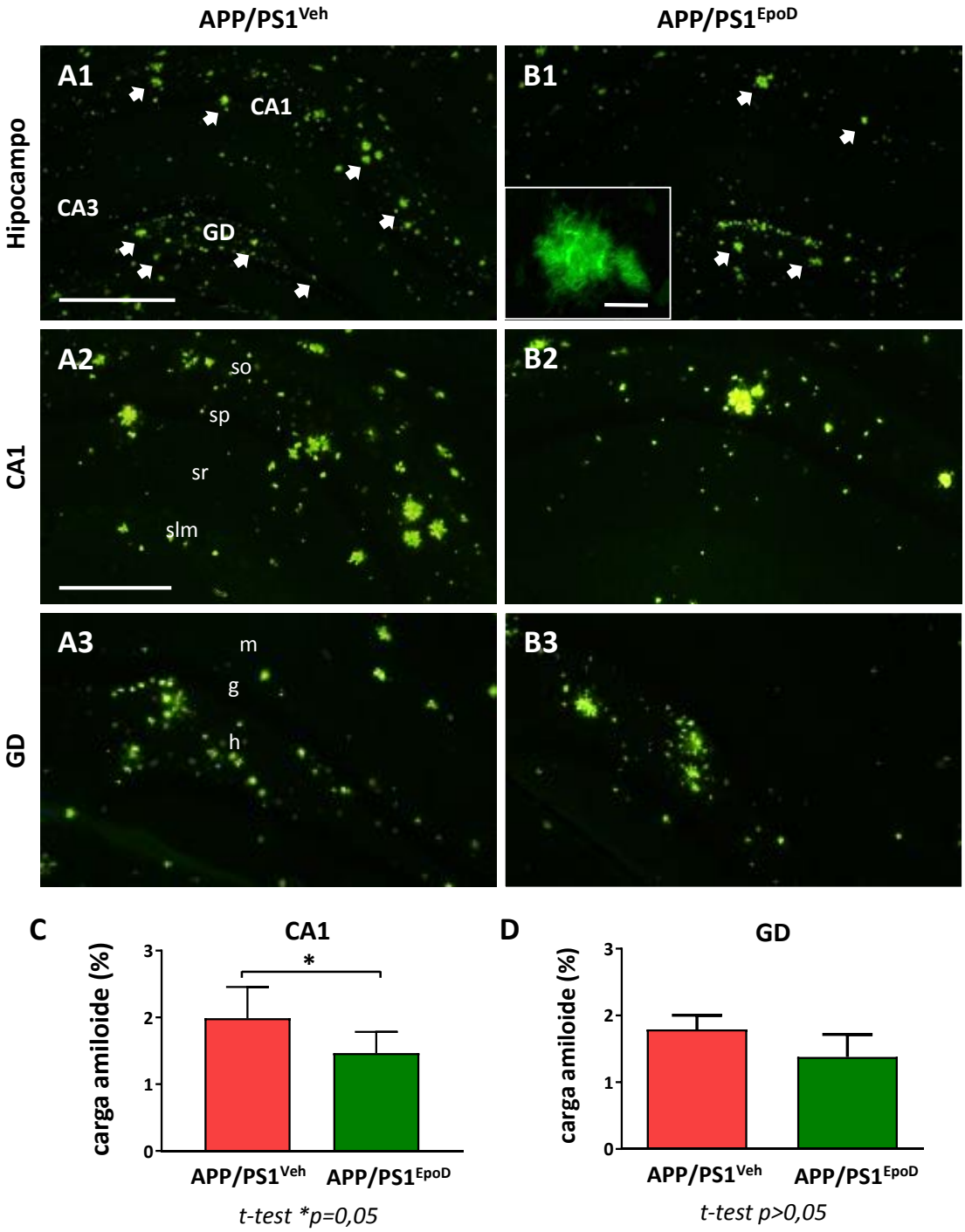


Figura 3.4.21. El tratamiento con EpoD reduce la carga amiloide fibrilar en el hipocampo de los animales APP/PS1. Tinción con Tioflavina-S (Tio-S), que permite visualizar las placas fibrilares (flechas, detalle de placa **inserto en B1**). Se aprecia una disminución del área ocupada por las placas en los animales tratados con EpoD (**B1-B3;** panorámica del hipocampo y detalles de CA1 y GD, respectivamente) comparados con los controles (vehículo, **A1-A3**). (**C-D**) La cuantificación por análisis de imagen mostró una reducción significativa en la carga amiloide de CA1 (**C**) así como una disminución en el GD (**D**) de los animales tratados con EpoD. *CA: cornu ammonis; g: capa granular; GD: giro dentado; h: hilio; m: capa molecular; so: estrato oriens; sp: estrato piramidal; sr: estrato radiado; slm: estrato lacunoso-molecular.* Barras de escala: A1, B1: 500 µm; A2-B3: 200 µm; inserto en B1: 20 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

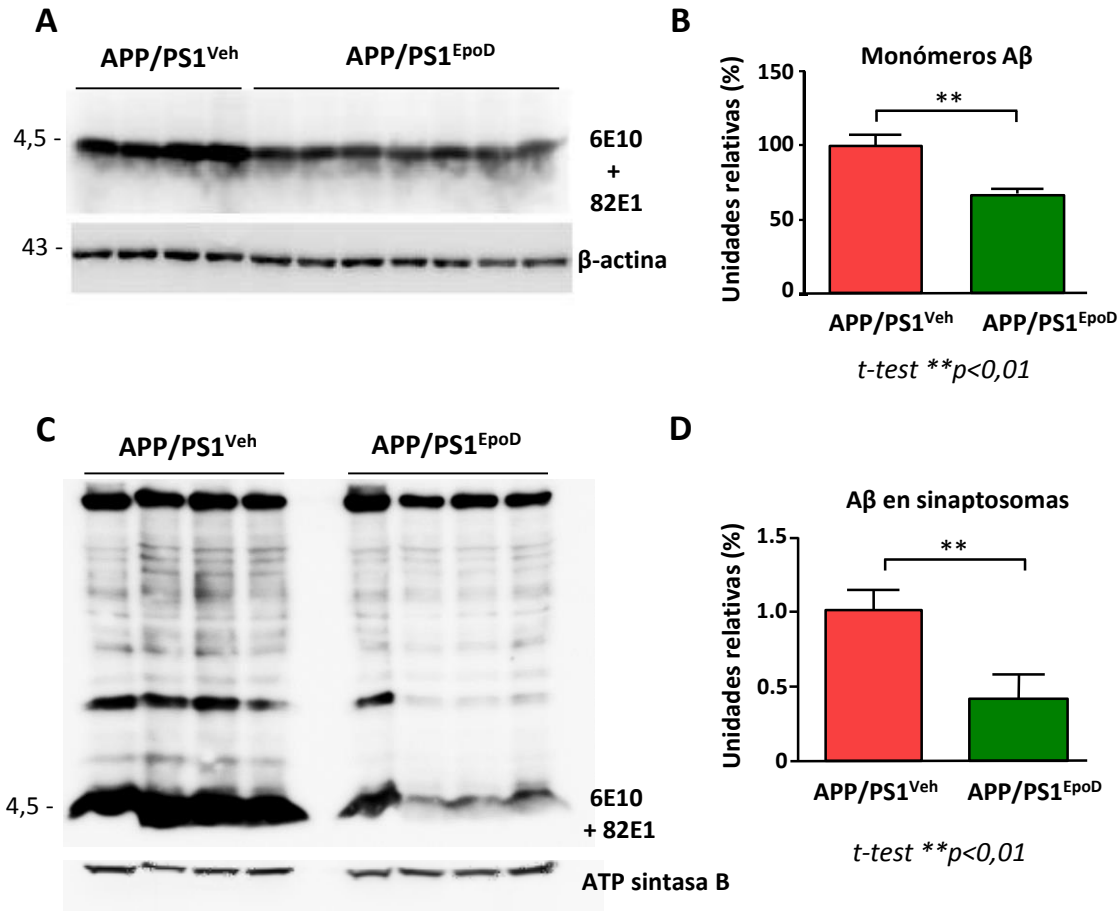


Figura 3.4.22. El tratamiento con EpoD reduce significativamente los niveles de Aβ en el hipocampo y en el compartimento sináptico de los animales APP/PS1. Western-blot representativo (**A**) y análisis cuantitativo (**B**) de la cantidad total de Aβ (marcaje con anticuerpos 6E10 y 82E1) en el hipocampo de ambos grupos de animales APP/PS1. Los ratones tratados con EpoD muestran una reducción significativa de los niveles de Aβ monomérico en comparación con el grupo vehículo. (**C, D**) El análisis de la cantidad de Aβ en las fracciones sinaptosomales del hipocampo mediante western-blots utilizando el mismo cóctel de anticuerpos, demuestra una disminución significativa en el contenido de Aβ anivel sináptico en los animales APP/PS1^{EpoD}. Los niveles se han relativizado con respecto al grupo APP/PS1^{Veh}. *Este estudio se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Vitorica (IBIS, Sevilla).*

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

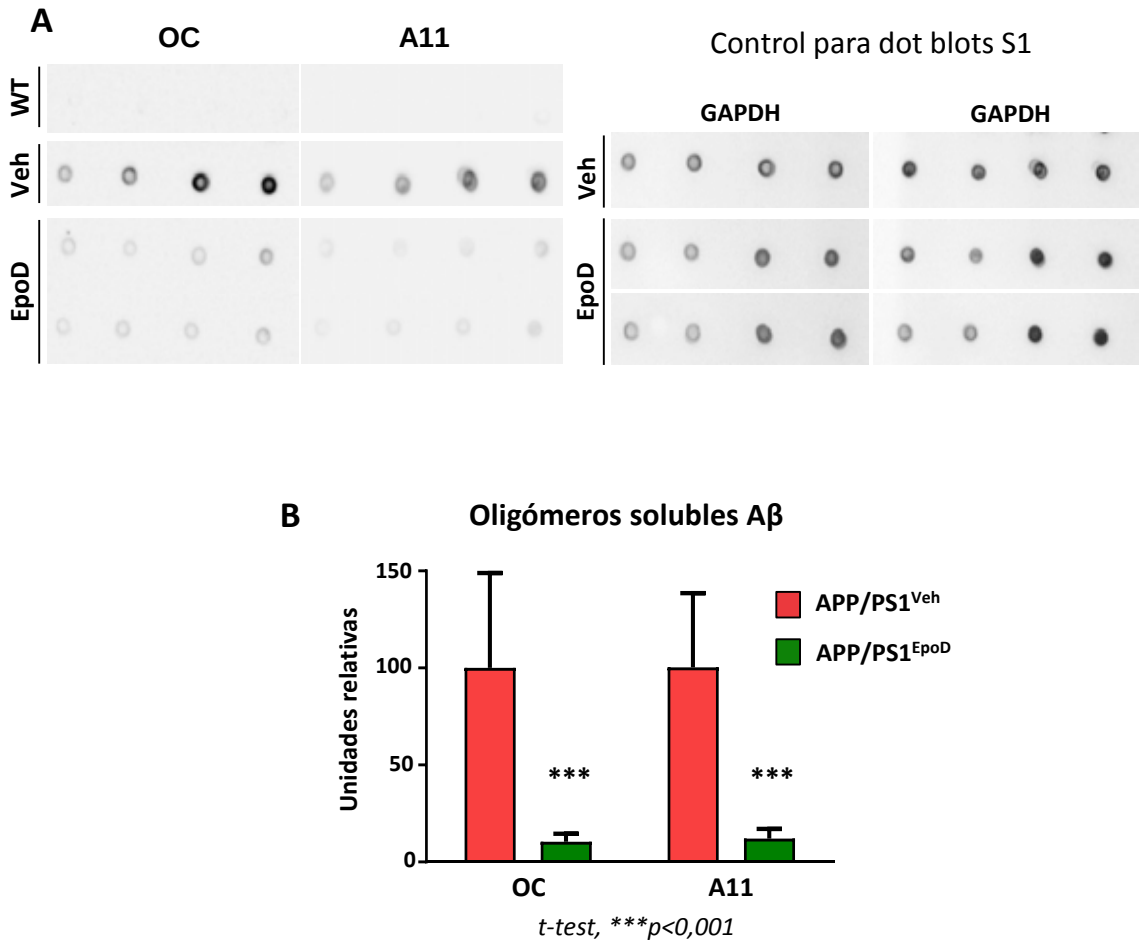


Figura 3.4.23. El tratamiento con EpoD produce una reducción muy significativa de los niveles de Aβ oligomérico soluble en el hipocampo de APP/PS1. (**A**) Dot-blots representativos y (**B**) análisis cuantitativo de distintas especies de Aβ oligomérico en las fracciones solubles (S1) del hipocampo de ambos grupos de animales APP/PS1. Como control negativo se han empleado animales WT de la misma edad. En los ratones APP/PS1^{EpoD} existe una reducción significativa de los niveles de Aβ oligomérico de tipo prefibrilar y fibrilar (anticuerpo OC) y también de formas oligoméricas de bajo peso molecular (anticuerpo A11) en comparación con el grupo vehículo. Como control de carga de proteínas se usó GAPDH. *Este estudio se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Vitorica (IBIS, Sevilla).*

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

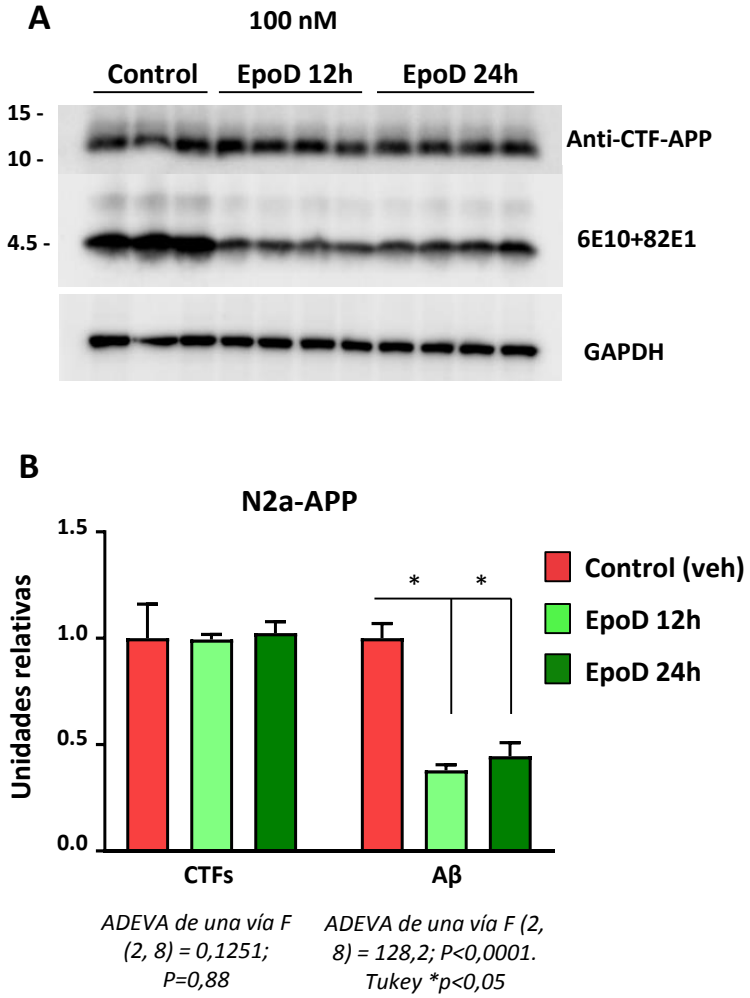


Figura 3.4.24. Estudio del efecto de EpoD sobre el procesamiento de APP y la producción de Aβ en un modelo amiloidogénico *in vitro*. (**A**) Efecto del tratamiento agudo con EpoD sobre la producción de fragmentos CTF derivados de APP (anti-APP C-terminal; APPCTF), y de Aβ intracelular (6E10+82E1) en la **línea N2a-APPSwe**. Los cultivos fueron incubados durante 12 h (N = 4) o 24 h (N = 4) con vehículo (controles, N = 3) o con EpoD 100 nM. (**B**) El estudio cuantitativo muestra que el tratamiento con EpoD *in vitro* produce una reducción significativa en los niveles de Aβ. *Este estudio se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Vitorica (IBIS, Sevilla).*

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

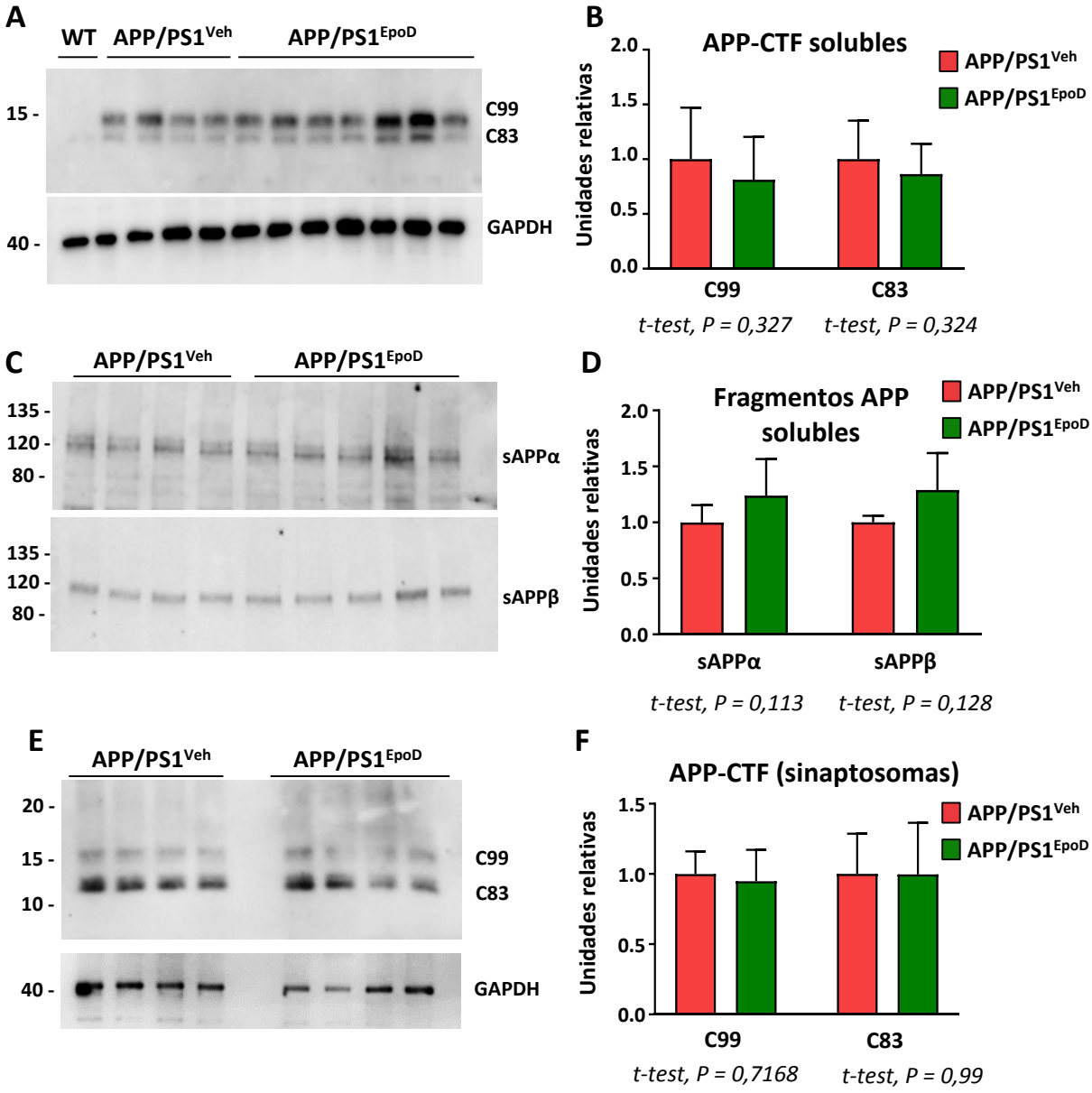


Figura 3.4.25. El tratamiento con EpoD no afecta el procesamiento de APP. (**A, B**) Western Blots representativo y análisis cuantitativo de los niveles de fragmentos CTF solubles (C99 y C83) de los animales APP/PS1^{Veh} y APP/PS1^{EpoD}. (**C, D**) WB representativo y análisis cuantitativo de los niveles de fragmentos solubles derivados de las actividades α- y β-secretasas (sAPPα, sAPPβ) en los animales APP/PS1^{Veh} y APP/PS1^{EpoD}. (**E, F**) Western Blots representativos y análisis cuantitativo de los niveles de fragmentos CTF (C99 y C83) en las fracciones sinaptosomales extraídas de animales APP/PS1. La EpoD no afecta a los niveles de ninguno de los fragmentos analizados en estos animales. *Este estudio se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Vitorica (IBIS, Sevilla).*

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

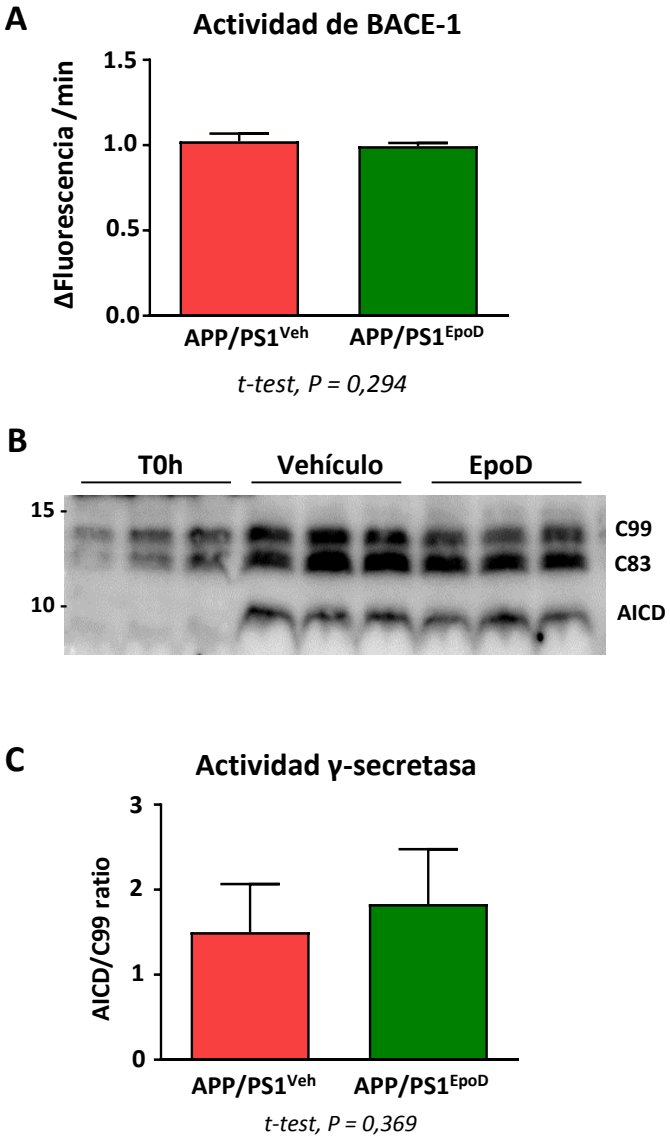


Figura 3.4.26. Efecto del tratamiento con EpoD sobre la actividad de la enzimas β- y γ-secretasa. (**A**) Análisis de la actividad enzimática de BACE-1 mediante fluorescencia en membranas extraídas del hipocampo animales APP/PS1^{Veh} y APP/PS1^{EpoD}. (**B**) Western-blot representativo y análisis cuantitativo (**C**) de los productos generados por la acción de la γ-secretasa (AICD) en membranas extraídas de la corteza de animales APP/PS1^{Veh} y APP/PS1^{EpoD}. No se observaron diferencias significativas ni en la actividad enzimática de BACE-1 ni en los productos generados por la γ-secretasa entre los grupos (N=6, experimentos independientes). *Este estudio se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Vitorica (IBIS, Sevilla).*

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.4.7. EL TRATAMIENTO CON EPOD NO ATENÚA LA RESPUESTA MICROGLIAL EN EL HIPOCAMPO DEL MODELO APP/PS1

En el contexto de la EA, las células microgliales son activadas por los agregados de Aβ y se disponen alrededor de las placas, sin embargo, su papel en la patogénesis de esta enfermedad aún es bastante controvertido. Concretamente, en este modelo animal APP/PS1 existe una potente respuesta microglial (Jimenez et al., 2008; Moreno-Gonzalez et al., 2009; Sanchez-Mejias et al., 2019) que en los estadios tempranos de la patología amiloide hipocampal se encuentra fundamentalmente asociada a los depósitos amiloides y presenta un perfil neuroprotector.

Dado que el tratamiento con EpoD produce una reducción de la carga amiloide, el siguiente paso fue analizar si la respuesta microglial asociada también se encontraría disminuida. Para ello, se realizó una tinción inmunohistoquímica para un marcador específico de esta población glial (Iba-1) en el hipocampo. En los animales WT (**Fig. 3.4.27 A**) se observó un fenotipo microglial típico del estado homeostático, con un cuerpo celular pequeño y redondeado, y multitud de prolongaciones ramificadas y delgadas (detalle en **Fig. 3.4.27 D**). Por otro lado, y como se esperaba, los animales transgénicos (**Fig. 3.4.27 B y C**) presentaron células microgliales con morfología activada (**Fig. 3.4.26 E**) formando agrupaciones alrededor de las placas amiloides (**Fig 3.4.27 F**). Las agrupaciones de células microgliales activadas se localizaban especialmente en el estrato oriens de CA1 y en el hilio del giro dentado, coincidiendo con las regiones con mayor densidad de placas en este modelo (ver **Fig. 3.4.19**) a la edad estudiada (6 meses). El análisis cuantitativo de la carga microglial (porcentaje de área ocupada por las células microgliales Iba-1 positivas) en la región CA1 confirmó que en los animales transgénicos existía un proceso de activación microglial ($F(2, 11) = 24{,}34$; $P < 0{,}0001$) que no se dio en el grupo control (2 ± 0,3 veces mayor en los vehículos vs. WT; $p<0{,}001$; 1,88 ± 0,9 veces mayor en los EpoD vs. WT $p<0{,}001$). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre los animales $APP/PS1^{Veh}$ y los $APP/PS1^{EpoD}$ en ninguna de las regiones hipocampales (**Fig. 3.4.27 G**). Sería interesante completar este estudio con marcadores específicos de activación microglial como CD45, y marcadores asociados a la firma molecular DAM, como Gal3 y Trem2. Además, habría que analizar si la reducción de los niveles de Aβ observada con el tratamiento de EpoD pudiera estar relacionado, al menos en parte, con un aumento de la capacidad fagocítica de la microglía activada.

Estos datos parecen indicar que EpoD no incide sobre la activación microglial una vez iniciada o que, dada la temprana edad de estos animales, quizás sería necesario un tratamiento crónico para poder observar algún efecto sobre esta población celular.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

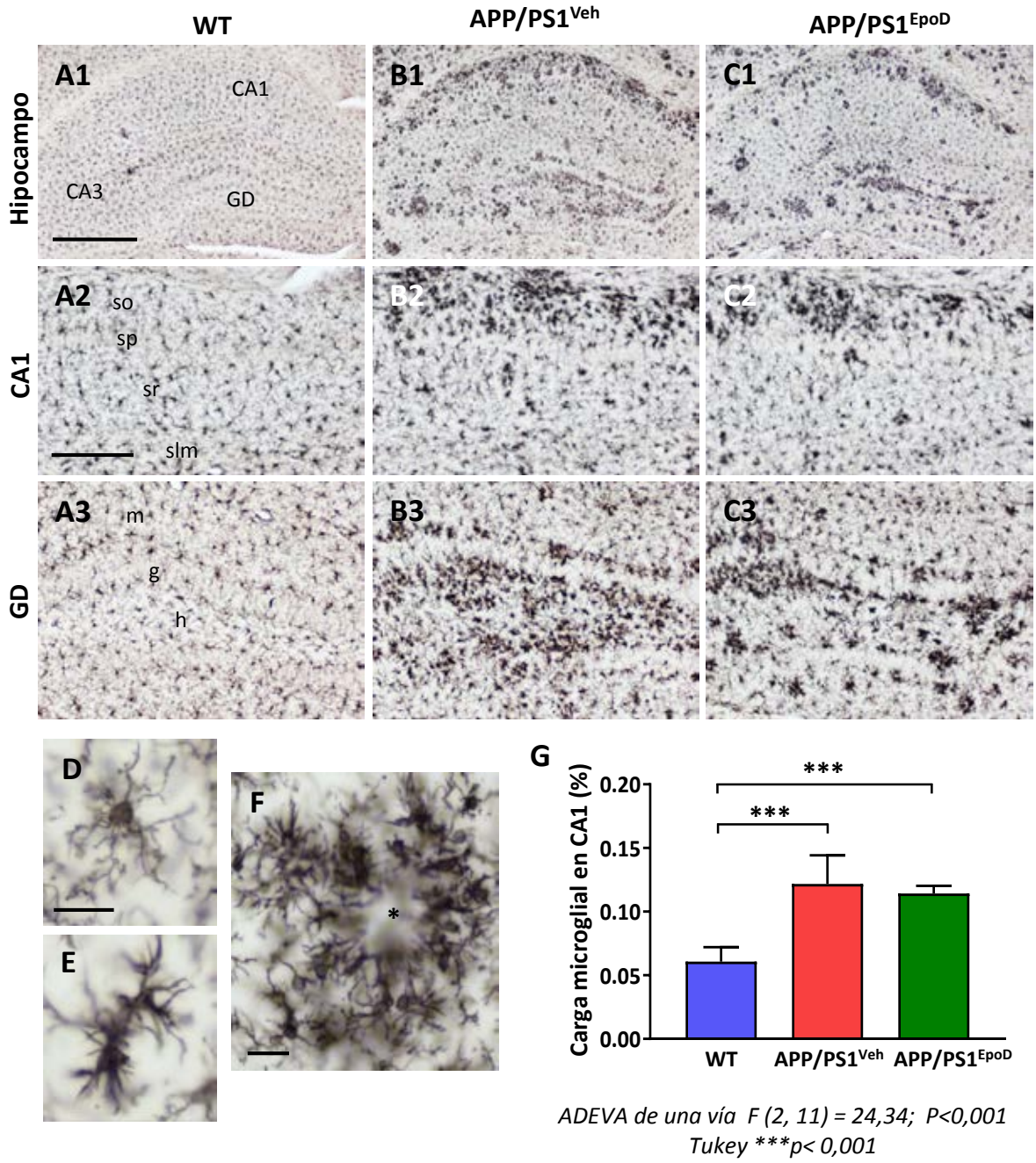


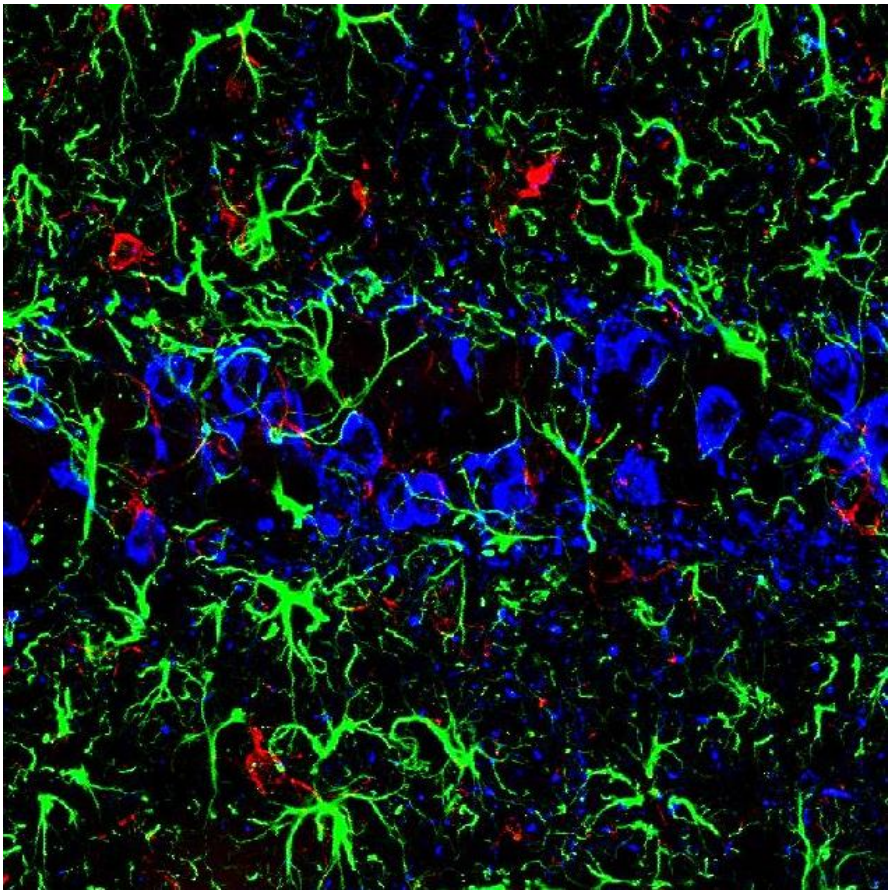
Figura 3.4.27. El tratamiento con EpoD no tuvo efecto sobre la carga microglial en el hipocampo de APP/PS1. Inmunohistoquímica para Iba-1. Se aprecia una intensa activación microglial en los animales APP/PS1 (**B, C**) con respecto a los WT (**A**). (**D-F**) Imágenes representativas de una célula microglial homeostática (**D**) y otra activada (**E**), así como un grupo de células activadas rodeando un depósito amiloide (asterisco, **F**). (**G**) La carga microglial aumenta significativamente en el modelo APP/PS1 respecto a los WT. Sin embargo, no existen diferencias significativas entre los grupo APP/PS1^{EpoD} y APP/PS1^{Veh}. *CA: cornu ammonis; GD: giro dentado; g: capa granular, h: hilio; m: capa molecular; slm: estrato lacunoso-molecular; so: estrato oriens; sp: estrato piramidal, sr: estrato radiado.* Barras de escala A1-C1: 500 µm, A2-C3: 200 µm; D-F: 20 µm.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

4. DISCUSIÓN



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

En este trabajo de Tesis Doctoral se ha analizado la progresión de la patología tau y su relación con el proceso neuroinflamatorio, así como con la pérdida sináptica y neuronal, en el hipocampo de dos modelos transgénicos de taupatía (ThyTau22 y P301S). Los resultados han puesto de manifiesto diferencias significativas entre ambos modelos, destacando lo concerniente a la respuesta de las células microgliales, que podrían estar motivadas por la intervención de distintas cepas de fosfo-tau con desigual capacidad de agregación y toxicidad.

En el cerebro de los pacientes de Alzheimer tiene lugar un proceso neuroinflamatorio, mediado por la activación de la microglía y la astroglía, cuyo efecto (beneficioso vs. perjudicial) sigue siendo ampliamente debatido. Esta activación glial ha sido objeto de numerosos estudios en la última década, principalmente en el contexto de la patología amiloide, utilizando modelos transgénicos que desarrollan placas. Sin embargo, poco se conoce de la contribución de la patología tau a este proceso. En este sentido, los resultados de este trabajo han permitido avanzar en el conocimiento de la relación entre la patología tau y la activación glial. El modelo P301S desarrolla una intensa respuesta microglial, con perfil DAM, en paralelo a la patología tau, en contraste con la leve activación encontrada en el modelo ThyTau22. Esta activación microglial incluye la presencia de microglía tipo “rod”, detectada también en el hipocampo de pacientes de Alzheimer, que parece encontrarse asociada íntimamente con las neuronas que contienen fosfo-tau.

Además, se ha realizado un estudio del proceso neurodegenerativo de estos dos modelos, caracterizando la pérdida sináptica así como la vulnerabilidad de determinadas poblaciones neuronales. Los sistemas glutamatérgico, gabaérgico y colinérgico están afectados en estos modelos, siendo el daño más acusado en el modelo P301S. Uno de los resultados más relevantes ha sido la identificación ultraestructural de una marcada patología mitocondrial en las neuronas que acumulan fosfo-tau en el modelo P301S, y que comprometería la función y viabilidad neuronal. En su conjunto, este trabajo añade información novedosa sobre la contribución de fosfo-tau a la patología neuronal.

Por último, se ha estudiado la relación entre la patología tau y la patología amiloide analizando el efecto de un estabilizador microtubular (epotilona D) en un modelo animal amiloidogénico. El modelo doble transgénico APP/PS1, que ha sido ampliamente caracterizado por nuestro grupo de investigación durante más de una década, presenta déficits cognitivos y patología amiloide hipocampal desde edades tempranas. La deposición amiloide está acompañada por la formación de neuritas distróficas (positivas para fosfo-tau), daño axonal y sináptico, muerte neuronal, afectación del proceso de neurogénesis hipocampal, y activación glial (Ramos et al., 2006; Jimenez et al., 2008; Moreno-Gonzalez et al., 2009; Baglietto-Vargas et al., 2010; Jimenez et al., 2011; Sanchez-Varo et al., 2012; Torres et al., 2012; Trujillo-Estrada et al., 2013, 2014; Baglietto-Vargas et al., 2017; Gomez-Arboledas et al., 2017; Sanchez-Mejias et

UNIVERSIDAD DE MALAGA

al., 2019). El tratamiento con EpoD ha producido una preservación de la función cognitiva asociada a una protección sináptica y neuronal, junto con una reducción de las patologías amiloide y tau. Estos resultados son de gran relevancia en el contexto de la EA al aportar evidencias sobre la relación entre la disfunción del citoesqueleto y las patologías de Aβ y tau. Por tanto, los estabilizadores de microtúbulos podrían ser considerados como agentes terapéuticos dirigidos contra ambas proteinopatías en la lucha contra esta enfermedad.

En general, con todos los estudios realizados se ha pretendido avanzar en el conocimiento de la patología tau y su contribución diferencial a la EA. A continuación, se discuten los resultados más relevantes obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral.

4.1. LAS DIFERENCIAS EN LA PATOLOGÍA TAU EN LOS MODELOS THYTAU22 Y P301S INDICAN LA FORMACIÓN DE DISTINTAS CEPAS DE FOSFO-TAU

Todas las taupatías, incluida la enfermedad de Alzheimer, se caracterizan por la acumulación y agregación de la proteína tau hiperfosforilada en el interior de las neuronas. Este fenómeno se ha conseguido reproducir fundamentalmente en modelos animales transgénicos para la proteína tau. La mayoría de ellos se basa en la introducción del gen *MAPT* humano (isoforma 4R) con mutaciones propias de formas familiares de taupatías puras, especialmente de la FTLD (Jankowsky and Zheng, 2017). Todos ellos reproducen en mayor o menor medida la patología de tau constituyendo una herramienta valiosa para su estudio en la EA, al separarla de los efectos de la patología amiloide. En los modelos usados en esta Tesis Doctoral, la acumulación y agregación de proteína tau fosforilada ha sido previamente documentada (Schindowski et al., 2006; Yoshiyama et al., 2007). Sin embargo, en nuestro estudio comparativo se pone de manifiesto que la patología tau hipocampal es mucho más severa en los animales P301S (línea PS19) que en los ThyTau22. La acumulación diferencial de fosfo-tau en estos modelos puede deberse a distintos mecanismos que no tienen por qué ser mutuamente excluyentes: diferencias en la expresión del transgén y/o en la homeostasis de los niveles de la proteína tau (desbalance entre la generación versus proteólisis/eliminación), entre otros.

Uno de los factores diferenciales a considerar es el promotor encargado de la regulación de la expresión del transgén de tau en los modelos. Por un lado, en el modelo ThyTau22 el transgén se encuentra bajo el control del promotor neuronal Thy1.2. Muchos modelos transgénicos para la EA y otras taupatías basan el control de la expresión en este promotor (Vidal et al., 1990). Por otro lado, el promotor que controla la expresión de la proteína tau en el modelo P301S, Prnp, corresponde al de la proteína priónica. Esta proteína está presente en neuronas y

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

en células gliales en condiciones fisiológicas (Lima et al., 2007). Además, cada promotor tiene un mecanismo de regulación determinado. Por ejemplo, el promotor Thy1.2 posee diversos factores reguladores que se asocian a una región del promotor muy estrecha (Spanopoulou et al., 1991), y el promotor de la proteína priónica posee un mecanismo de regulación en el cual, además de poseer islas CpG, necesita asociarse a regiones intrónicas (Haigh et al., 2007).

En este trabajo se ha detectado que los niveles de proteína tau total en el hipocampo del modelo P301S eran superiores a los del modelo ThyTau22. Como era de esperar, una mayor cantidad de proteína tau de partida coincide con más altos niveles de especies de tau hiperfosforilada, tal y como ha sido descrito en pacientes y en otros modelos animales. Se cree que estas formas fosforiladas, y en especial las oligoméricas, serían las responsables de los daños sinápticos y neuronales propios de las taupatías (revisado en Shafiei et al., 2017). No obstante, si la patología asociada a la fosforilación de tau es consecuencia de una ganancia de función tóxica y/o una pérdida de función fisiológica es todavía objeto de discusión (Goedert et al., 2012; DeVos and Hyman, 2017).

Se han descubierto muchos residuos susceptibles de ser fosforilados en la proteína tau, siendo la mayoría serina y treonina (revisado en Guo et al., 2017). La presencia de mutaciones en la secuencia proteica, y sobre todo en los dominios de unión a microtúbulos (MTBD), pueden volver a la proteína tau más propensa a ser fosforilada. En este caso, el modelo ThyTau22 expresa la proteína tau humana con las mutaciones P301S y G272V, mientras que el modelo P301S sólo la primera de ellas. Precisamente ésta consiste en una mutación puntual en uno de los codones del exón 10 (R2) de la isoforma 1N4R, el cual provoca la sustitución de un residuo de prolina (Pro) por el de una serina (Ser). Así que esta mutación añadiría un residuo adicional susceptible de ser fosforilado en una de las MTBD, potenciando así la desunión de tau a los microtúbulos y/o ligeros cambios conformacionales que faciliten otras fosforilaciones o modificaciones posteriores. Por otro lado, la mutación puntual G272V afecta al exón 9 que también codifica para los MTBD. Se trata del cambio de un residuo de glicina (Gly) por uno de valina (Val), un aminoácido más hidrófobo, que influiría en su capacidad de unión a microtúbulos y aumentaría su capacidad de agregación. En conjunto, la concentración de proteína en el citoplasma se vería incrementada y así la cantidad de tau susceptible de ser fosforilada por quinasas. Las distintas mutaciones, unidas a las fosforilaciones, generarían proteínas de tau con conformaciones alternativas que se comportarían como diferentes cepas priónicas (Luna-Muñoz et al., 2007; Gerson et al., 2016).

Una de las regiones más afectadas por la patología de tau en la EA es el hipocampo (Braak and Braak, 1991; Braak et al., 2006), siendo clave en los procesos de memoria y aprendizaje. En los modelos ThyTau22 y P301S, esta región acumula gran cantidad de fosfo-tau desde edades muy tempranas, aumentando con el envejecimiento, y extendiéndose por otras

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

regiones corticales y límbicas siguiendo un patrón espacio-temporal determinado (Schindowski et al. 2006; Yoshiyama et al. 2007). Mediante inmunohistoquímica con el anticuerpo AT8 hemos observado que fosfo-tau se acumulaba de forma evidente en el hipocampo de estos modelos, pero también en otras regiones como la amígdala y la corteza entorrinal. Como ya demostraron los resultados moleculares, la patología tau en el modelo P301S fue mucho más acusada que en los ThyTau22. El inmunomarcaje evidenció que, además, la progresión espacio-temporal en ambos modelos fue diferente. El marcaje para fosfo-tau en el hipocampo de los animales ThyTau22 se detectó mayoritariamente en los somas y dendritas apicales de las neuronas piramidales, mientras que en el modelo P301S la tinción inicialmente se concentró en el neuropilo, y a edades más avanzadas la cantidad de somas inmunoteñidos aumentó drásticamente.

En el modelo ThyTau22, la patología comenzó principalmente en la porción de CA1 más próxima al subículo (CA1-Sub), extendiéndose a continuación por dicha región hasta CA3, y finalmente por el giro dentado (CA1-CA3-GD). Está descrito que el hipocampo recibe aferencias directamente desde las capas superficiales (II-III) de la corteza entorrinal hacia CA3 y giro dentado (vía perforante), y desde la capa III hacia el alveus, desde el cual las fibras acaban penetrando en CA1 (vía alvear) (van Groen et al., 2003; Witter and Amaral, 2004). Esto podría sugerir que el origen de la patología en este modelo se encuentra en estas capas de la corteza entorrinal, como ocurre en los pacientes de Alzheimer (Hyman et al., 1987; Gómez-Isla et al., 1997) y en otros modelos de taupatía (De Calignon et al., 2012). Sin embargo, se detectó poco marcaje fosfo-tau positivo en neuronas entorrinales de las capas superficiales (I-III). La amígdala fue otra región con intensa patología tau en este modelo, similar a lo descrito previamente (Schindowski et al., 2006). Se sabe que esta es una de las regiones más afectadas durante la EA (Vogt et al., 1990; Ortner et al., 2016) y que proyecta axones hacia el hipocampo, principalmente a la región ventral de CA1 y a CA3 (Pikkarainen et al., 1999). La transmisión de fosfo-tau desde la amígdala hacia las partes ventrales de CA1 explicaría por qué el marcaje para AT8 es intenso en las porciones más caudales del hipocampo. La amígdala también proyecta hacia el giro dentado, pero en menor medida. Además, la región de CA3 se encuentra conectada con CA1 a través de la vía colateral de Schaffer y ambas subregiones a su vez proyectan hacia la misma amígdala (Yang and Wang, 2017).

Teniendo todo esto en cuenta, es posible que la progresión de la patología en el modelo ThyTau22 aparezca inicialmente en el hipocampo propio y amígdala, para posteriormente alcanzar la capa V de la CE, y de allí pasar a otras regiones corticales y talámicas a edades avanzadas. Esto explicaría por qué la patología en CA1 es mucho más acusada que en el giro, ya que este último quedaría excluido en gran medida de este circuito sináptico principal. Así, la presencia de marca AT8-positiva en el mismo a partir de los 6 meses podría proceder de las

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

aferencias que surgen en las capas profundas de la corteza entorrinal ya afectadas por la patología de fosfo-tau (Gloveli et al., 2001). La pronta afectación de la amígdala y el hipocampo constituiría, además, una de las razones de que en este modelo se haya observado una pérdida de peso anormal desde edades muy tempranas (Schindowski et al., 2006) debido a conductas alimentarias y de apetito alteradas (Jeugd et al., 2011; Lo et al., 2013) ya que el dúo amígdala-hipocampo está muy implicado en la regulación de estos comportamientos (Zhang, et al., 2011). Sería necesario realizar un análisis más exhaustivo con el marcaje para otras formas fosforiladas de tau en todas estas regiones, incluso a edades previas a los 2 meses para poder establecer exactamente la región de inicio de la patología.

Con respecto al modelo P301S, hemos observado que la patología de tau, además de ser más severa, sigue un patrón de extensión distinto. El estudio inmunohistoquímico con AT8 reveló que las primeras zonas donde hay presencia de fosfo-tau en el hipocampo son las aferencias que inervan CA3 (estrato lúcido) y la capa molecular (inicialmente la porción interna) del giro dentado. Con la edad el marcaje aumentaba en estas dos regiones, incrementándose también el número de somas neuronales marcados, y extendiéndose después hacia la región CA1 (GD-CA3-CA1), posiblemente por la vía colateral de Schaffer. En estadios tempranos se detectó marcaje en algunas neuronas entorrinales (capas II y III) que fue muy intenso a edades más avanzadas; tales neuronas contactan a través de la vía perforante con CA3 y el giro dentado, como parte del circuito trisináptico. Estos datos concuerdan con los hallazgos realizados anteriormente en este modelo (Yoshiyama et al., 2007), y de forma más interesante, esta progresión resulta más similar a la existente en la EA, en la cual las neuronas de capas II-III de la corteza entorrinal son más vulnerables (Stranahan and Mattson, 2010) y representan uno de los puntos de inicio de la patología tau (Ridler, 2018), que sería transmitida a las regiones del hipocampo con las que contactan sinápticamente.

La variabilidad observada en estos dos modelos es un fenómeno que también afecta a las taupatías en humanos. Cada taupatía presenta patrones únicos en su neuropatología, su progresión y las regiones cerebrales que se ven afectadas. Esta variabilidad recuerda a la existente en las diferentes enfermedades priónicas. En los experimentos de siembra (*seeding*) realizados en cultivos y modelos animales (Clavaguera et al., 2013; Sanders et al., 2014; Boluda et al., 2015; Kaufman et al., 2016) se ha comprobado que tau se comporta como una proteína capaz de adquirir una conformación alternativa y transmitirla a otras proteínas tau con una conformación nativa. Según el modelo de priones, lo que sucedería es que se forman conjuntos de tau estructurados de forma única en una región del cerebro (cepas), desde cuyas neuronas escapan. Estas "semillas" actúan como plantillas funcionales para desencadenar una mayor agregación de proteínas después de la internalización por células adyacentes o conectadas sinápticamente. Los resultados de diversos estudios demuestran que la patología de tau se

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

transmite en el tiempo entre regiones con gran número de conexiones y preferentemente desde elementos presinápticos (axones) a postsinápticos (dendritas y somas neuronales). Además, al inyectarse tau procedente de diferentes cerebros de pacientes, se reproduce el mismo patrón patológico en los modelos que en la fuente original (Narasimhan et al., 2017). El posible comportamiento de tau como una proteína priónica y su capacidad para constituirse en cepas diferentes, podría explicar las diferencias observadas entre los dos modelos estudiados en este trabajo. El estudio y caracterización de estas discrepancias serían de gran interés a la hora de establecer métodos de diagnóstico y nuevas terapias para el tratamiento de estas patologías.

El hecho de que se constituyan cepas diferentes de fosfo-tau no solo afecta a la intensidad y progresión de su patología, sino que también le confiere una capacidad de agregación concreta (Lathuilière et al., 2017). De hecho, recientemente se ha demostrado que la diversidad a nivel molecular de las modificaciones postraduccionales o las diferentes conformaciones patológicas de tau, podrían estar asociadas con la heterogeneidad que presentan los pacientes con EA (Dujardin et al., 2020). En la EA, la proteína tau hiperfosforilada comienza a agregarse hasta constituir estructuras insolubles y fibrilares como los NFTs. Estos agregados somáticos son positivos para tinciones como la tioflavina-S (Tio-S), que detecta estructuras fibrilares con conformación de lámina β-plegada. El estudio con este fluorocromo reveló la existencia de estas estructuras positivas en las neuronas piramidales de CA1 del modelo ThyTau22. El número de somas positivos para Tio-S, aunque no muy elevado, aumentaba y progresaba con la edad siguiendo el mismo patrón que la patología fosfo-tau. Nuestro estudio ultraestructural a microscopía electrónica de transmisión confirmó la existencia de fibras intraneuronales fosfo-tau positivas. A diferencia de los NFTs de pacientes de EA, los del modelo ThyTau22 están constituidos en su mayoría por filamentos rectos (SF, *straigh filaments*) y no por filamentos helicoidales pareados (PHFs, *paired helicoidal filaments*) coincidiendo con lo descrito anteriormente en este modelo (Schindowski et al., 2006).

Sorprendentemente, el modelo P301S no presentó neuronas hipocampales Tio-S positivas a ninguna de las edades analizadas. Esto no concuerda con lo reportado previamente en este modelo (Yoshiyama et al., 2007), ni tampoco con los Western-blots en los que se detectaron altos niveles de tau AT100-positivo (Romero-Molina et al., 2018), los cuales representan fosforilaciones relacionadas con estadios de agregación elevados como PHFs y NFTs (Zheng-Fischhöfer et al., 1998). Aun así, el estudio ultraestructural a MET confirmó estos resultados al no evidenciarse estructuras intraneuronales tipo NFTs como las observadas en ThyTau22. No conocemos las causas de la discrepancia entre nuestros resultados y los reportados por otros autores con este modelo, aunque podrían estar relacionadas con la edad, el género o por variaciones a nivel de la patología como consecuencia de los diferentes fondos genéticos usados (Iba et al., 2013; Woerman et al., 2017).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Es importante destacar que, de manera similar a lo descrito con las placas amiloides, la generación de NFTs podría constituir un mecanismo neuroprotector frente a la toxicidad de las formas solubles de fosfo-tau (Santacruz et al., 2005; De Calignon et al., 2010; D'Orange et al., 2018). Así, la notable diferencia a nivel de los estadios de agregación de fosfo-tau entre ambos modelos (ThyTau22 desarrolla ovillos en el hipocampo, mientras P301S no lo hace) podría, al menos en parte, verse contribuida por la presencia de la mutación G272V en ThyTau22 (que aporta mayor hidrofobicidad) y constituye una prueba de la diversidad en la capacidad agregativa y tóxica de las cepas de fosfo-tau, y que en consecuencia tendrían distinta repercusión sobre la respuesta neuroinflamatoria, actividad sináptica y viabilidad neuronal en ambos modelos.

4.2. LOS FALLOS EN LOS SISTEMAS DE DEGRADACIÓN PROTEICA CONTRIBUYEN A LA ACUMULACIÓN Y AGREGACIÓN DE FOSFO-TAU

La acumulación de proteína tau hiperfosforilada en el hipocampo de estos modelos animales (en mayor medida en el P301S) podría ser causada no solo por un aumento de su producción, sino también por fallos en los sistemas intracelulares encargados de su degradación. Está bien establecido que en la EA, y otras enfermedades neurodegenerativas, estos sistemas proteolíticos se encuentran dañados y por tanto son diana de ensayos terapéuticos (Nixon, 2013; Morimoto and Cuervo, 2014; Kaushik and Cuervo, 2015; Di Meco et al., 2017; Scrivo et al., 2018; Hegde et al., 2019; Hipp et al., 2019). Las alteraciones en estos sistemas podrían ser claves en el origen de las patologías tanto de Aβ como de tau, ya que la mayor parte de los casos de EA son esporádicos y no están asociados a mutaciones en estas proteínas (Cao et al., 2019; Hardy, 2019). Por otro lado, otros autores refieren que el aumento de marcadores propios de los sistemas de degradación indicarían no una disfunción, sino por el contrario, la respuesta de la célula frente a la acumulación exacerbada de material proteico y celular, que finalmente llegaría a saturarse en estadios avanzados (Cheng et al., 2018).

El análisis comparativo del inmunomarcaje para ubiquitina demostró que existe una acumulación anormal de esta proteína con la edad en el hipocampo de P301S y ThyTau22, en comparación con los animales WT. El modelo ThyTau22 presentó somas neuronales con alta acumulación de ubiquitina en la capa piramidal de CA1, siguiendo un patrón de marcaje similar al observado con Tio-S. Este dato era de esperar dado que los NFTs contienen proteína tau altamente ubiquitinada (Perry et al., 1987; García-Sierra et al., 2012), aunque en este trabajo faltaría confirmarlo mediante doble marcaje ubiquitina/Tio-S, o con anticuerpos para

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

estructuras tipo PHFs y/o formas fosforiladas tardías (AT100). Por otro lado, el marcaje para ubiquitina en los animales P301S aparecía en somas de neuronas principales, y asociado al neuropilo (hilio fundamentalmente). Tau es ubiquitinada para ser degradada por el sistema del proteosoma (UPS), de modo que la elevada cantidad de proteínas ubiquitinadas sugiere que fosfo-tau no está siendo eliminada, bien por saturación/fallos del sistema o bien porque su estado de agregación imposibilite su degradación por esta vía. Aunque no hemos detectado estructuras tipo NFTs en este modelo, sí que se ha reportado la presencia de oligómeros (Lopez-Gonzalez et al., 2015) cuyo tamaño supera al del poro del proteosoma (Lee et al., 2013). Al comparar con el modelo amiloidogénico APP/PS1, cuyas alteraciones del sistema de proteólisis han sido estudiadas previamente por nuestro grupo (Sanchez-Varo et al., 2012; Torres et al., 2012), observamos que la acumulación anómala de ubiquitina ocurre asociada a la patología neurítica periplaca (fundamentalmente de tipo axonal/presináptica) en contraste con la prevalencia somática de los modelos de taupatía. Por tanto, aunque ambos modelos comparten fallos en el sistema UPS, podrían existir diferencias en los mecanismos que los originan.

Aquellos agregados que no pueden ser degradados por el sistema UPS son derivados a la vía autofágica-lisosomal (Yang and Klionsky, 2010). Este sistema es esencial para el buen funcionamiento neuronal, de forma que los déficits en esta ruta pueden llevar a la acumulación de tau patológico y al proceso neurodegenerativo. La acumulación de vesículas autofágicas y otros defectos en dicha vía se han descrito en muestras *postmortem* de pacientes de EA y de taupatías puras, así como en modelos amiloidogénicos (Lin et al., 2003; Yu et al., 2004; Nixon et al., 2005; Sanchez-Varo et al., 2012; Piras et al., 2016). Sin embargo, el análisis inmunohistoquímico para LC3b (marcador de autofagosomas) no mostró variaciones asociadas a la progresión de la patología tau en los modelos P301S y ThyTau22, similar a lo descrito ya previamente (Zheng et al., 2020). Este resultado marca una diferencia con lo observado por nuestro grupo en el modelo APP/PS1 (Sanchez-Varo et al., 2012; este trabajo), en el que moléculas de LC3b cambian su ubicación (somatodendrítica, pues es una MAP) y se acumulan en las neuritas distróficas periplaca (de naturaleza axonal/presináptica fundamentalmente), aumentando en paralelo con la progresión de la patología amiloide. Aunque sería necesario realizar un análisis cuantitativo por WB para corroborar esta aparente ausencia de cambios en la expresión de LC3b en estos modelos de taupatía, nuestro estudio ultraestructural apoya esta observación, ya que no fue habitual ver acumulación de vesículas autofágicas en el citoplasma de neuronas fosfo-tau positivas, lo que en un principio corresponde con un correcto flujo autofágico. Por otro lado, el marcaje para LAMP2 sí que reveló acumulaciones patológicas de esta proteína lisosomal siguiendo un patrón espacio-temporal paralelo a fosfo-tau, siendo bastante más acusado en el modelo P301S que en ThyTau22. Este aumento de LAMP2 en el modelo P301S podría ser consecuencia de la no digestión del contenido lisosomal si bien serían necesarios estudios adicionales para confirmar esta hipótesis. Alternativamente podría deberse

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

a un aumento en la cantidad de esta proteína o del número de lisosomas como mecanismo compensatorio para intentar eliminar agregados de fosfo-tau que fueran transportados a su interior mediante LAMP2 (dado que este receptor interviene en la autofagia mediada por chaperonas), o bien por fallos en el tráfico/maduración en la vía endosomal-lisosomal (Cheng et al., 2018; Kulkarni and Maday, 2018). El potencial aumento en la cantidad de LAMP2 o lisosomas debería ser comprobado mediante estudios subcelulares cuantitativos.

En resumen, la sobreproducción de proteína tau y la acumulación de fosfo-tau podrían estimular en las neuronas la activación de diversas rutas de degradación proteica que, sin embargo, no parecen responder adecuadamente o incluso podrían verse saturadas. Hasta donde sabemos, en estos modelos no se han reportado defectos que afecten directamente a la funcionalidad de estos sistemas proteolíticos. Por tanto, la existencia de alteraciones en la homeostasis proteica es una característica común entre los modelos de taupatía y los amiloidogénicos, aunque los resultados obtenidos sugieren que algunos de los mecanismos subyacentes serían diferentes.

4.3. LA PATOLOGÍA TAU INDUCE UNA RESPUESTA GLIAL DIFERENCIAL EN EL HIPOCAMPO DE LOS MODELOS THYTAU22 Y P301S

La respuesta neuroinflamatoria, mediada por la activación de las células microgliales y astrogliales, es considerada en la actualidad como otro de los marcadores histopatológicos de la EA junto con las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares. La presencia de microglía y astroglía reactiva rodeando las placas es un evento característico en el cerebro de los pacientes (McGeer et al., 1987; Serrano-Pozo et al., 2013) y de los modelos amiloidogénicos (Sasaguri et al., 2017; Saito and Saido, 2018). Los estudios de GWAS de los últimos años han identificado diversos factores genéticos que aumentan el riesgo de padecer la forma esporádica de la enfermedad, entre ellos variantes en genes microgliales (tales como *TREM2, APOE, CLU, PICALM, CD33, CLEC7, LGAL3 y ABCA7*), otorgando así un papel esencial a estas células en la patogénesis de la EA (Guerreiro et al., 2013; Guimas-Almeida et al., 2018; Hansen et al., 2018; Pimenova et al., 2018; Boza-Serrano et al., 2019; Jansen et al., 2019; Kunkle et al., 2019; Sims et al., 2020).

La mayoría de los estudios sobre el papel de la activación microglial en la EA se han centrado en su relación con la patología de Aβ. Sin embargo, aún no está claro si estas células tienen una función beneficiosa (pero insuficiente) o perjudicial en el desarrollo de la patología, si existen diferentes subpoblaciones funcionales dependiendo de la región y el estadio de la

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

enfermedad, y más importante, si sufren un proceso degenerativo/disfuncional con el tiempo. En este sentido, un reciente análisis proteómico a gran escala en cerebros y líquido cerebroespinal de pacientes de EA ha revelado que la activación microglial y astroglial tiene un papel protector en la EA y que cambios en el metabolismo energético de estas células correlaciona con la progresión de la patología y el deterioro cognitivo (Johnson et al., 2020). Sin embargo, aún existen numerosas lagunas respecto a la relación glía activada/β-amiloide, pero menos se conoce sobre el papel de estas células en el inicio y/o progresión de la patología de tau tanto en la EA como en otras taupatías. En este trabajo de Tesis Doctoral hemos profundizado desde un punto de vista molecular, celular y ultraestructural en la respuesta de las células microgliales y astrogliales asociada a la patología de tau en los modelos ThyTau22 y P301S.

4.3.1. LA RESPUESTA MICROGLIAL ES DEPENDIENTE DEL TIPO DE PATOLOGÍA TAU

Uno de los resultados más relevantes de este trabajo de Tesis Doctoral es el contraste de la respuesta microglial en los modelos ThyTau22 y P301S frente a la patología tau. Mientras en el hipocampo de ThyTau22 la activación microglial con el avance de la patología es escasa, en el modelo P301S tiene lugar una fuerte respuesta, mayor incluso que la exhibida por los modelos amiloidogénicos. Además, esta activación microglial correlacionaba positivamente con la patología tau. En este sentido, ha sido descrito por nuestro grupo y otros (Sanchez-Mejias et al., 2016; Laurent et al., 2017) que existe una moderada activación microglial en modelos tau y en muestras *postmortem* de pacientes de EA. Diferencias de este tipo entre modelos de tau se han descrito utilizando *single-cell RNA-seq* (RNA-seq de célula única) (Friedman et al., 2018). Sin embargo, las razones de estas diferencias y los mecanismos que subyacen a la activación microglial mediada por fosfo-tau no han sido aún del todo identificados. En este proceso están implicados múltiples receptores de membrana y vías de señalización intracelulares, destacando el papel clave del receptor TREM2 (Takahashi et al., 2005; Melchior et al., 2010; Kleinberger et al., 2014), ampliamente expresado por la microglía del modelo P301S (presente trabajo).

Poco se conoce sobre el perfil molecular y los subtipos funcionales de la microglía activada en los modelos tau. Tradicionalmente, se había considerado que la microglía frente a situaciones patológicas adquiere un fenotipo activado, bien proinflamatorio (M1) o bien neuroprotector y antiinflamatorio (M2) (Colonna and Butovsky, 2017). Esta clasificación tan simplista no reflejaba la realidad de los potenciales fenotipos microgliales. De hecho, es posible que existan diferentes subtipos funcionales, tanto en situación fisiológica como patológica, dependiendo de la región cerebral, los estímulos del entorno, el tipo de situación patológica y el estadio de la enfermedad (Stratoulias et al., 2019). Así, los estudios transcriptómicos recientes han identificado una firma molecular microglial común a varias enfermedades

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

neurodegenerativas denominada como “DAM” (del inglés, *disease associated microglia*) o “MGnD” (fenotipo microglial neurodegenerativo). Tal perfil se caracteriza por la (sobre) expresión de una serie de genes, como por ejemplo *APOE, TREM2, DAP12, ITGAX, CD11C, ACL, CLEC7A, CS17* y *LGALS3*, así como un silenciamiento de la expresión de genes homeostáticos *como TMEM119, P2RY12* y *CX3CR1* entre otros (Keren-Shaul et al., 2017; Krasemann et al., 2017; Deczkowska et al., 2018). En el contexto de la EA, la microglía DAM se ha identificado alrededor de las placas amiloides, y se sigue debatiendo si este sería un perfil beneficioso o perjudicial, así como las dificultades en su estudio debido a las diferencias entre las especies humana y murina (Keren-Shaul et al., 2017; Krasemann et al., 2017; Friedman et al., 2018; Hansen et al., 2018; Henstridge et al., 2019; Zhou et al., 2020). En este sentido la activación del fenotipo microglial DAM, mediada por TREM2, promueve la fagocitosis de Aβ y desechos celulares, pero también estimula la producción de citoquinas proinflamatorias que de manera crónica puede ser perjudicial. La deficiencia de TREM2 da lugar a una activación del fenotipo DAM incompleta disminuyendo su capacidad de rodear y compactar las placas amiloides, con aumento de la patología neurítica (Ulrich et al., 2014; Yuan et al., 2016). Estos datos apoyan su papel en la formación de las placas amiloides retirando así formas tóxicas solubles del medio (Sosna et al., 2018; Spangenberg et al., 2019). A pesar de los avances en el conocimiento sobre la relación de la microglía con el desarrollo de la EA esporádica y su papel en la patología amiloide, quedan bastantes lagunas, y menos se conoce aún acerca de su relación con la patología tau. Se sabe que la microglía activada, así como los astrocitos reactivos, se localizan alrededor de neuronas con NFTs en el cerebro de pacientes (Probst et al., 1982; Cras et al., 1991; Overmyer et al., 1999; Serrano-Pozo et al., 2011), y se ha determinado que el silenciamiento de TREM2 agrava la patología tau, así como los déficits cognitivos en modelos de taupatía (Jiang et al., 2015).

Nuestro estudio ha demostrado que en el modelo P301S, que desarrolla una fuerte microgliosis, existe una sobreexpresión de los genes *trem2, cd68, clec7a* e *igf1*, característicos del perfil DAM. Este resultado sugiere que dichos genes no sólo se encontrarían implicados en la patología amiloide, sino también en la de tau. Sin embargo, no se detectó una disminución significativa en la expresión de genes homeostáticos (*p2ry12, cx3cr1, tmem119*). Otro trabajo reciente con este modelo tampoco encontró disminución de P2ry12, aunque sí de Tmem119 (van Olst et al., 2020). Si bien podríamos estar hablando de un nuevo perfil molecular, este resultado podría ser consecuencia de un incremento de la población microglial. De hecho, la proliferación de estas células es un suceso ya descrito en situaciones patológicas como la EA (Gómez-Nicola et al., 2013; Askew et al., 2017; Baglietto-Vargas et al., 2017; Askew and Gomez-Nicola, 2018; Mancuso et al., 2019). Esta nueva microglía procede de la división de otras células microgliales maduras, y no de células precursoras (Füger et al., 2017; Askew and Gomez-Nicola, 2018). La existencia de proliferación microglial en el ratón P301S podría explicar una compensación de los niveles de expresión de genes homeostáticos, aunque sería necesario

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

realizar cuantificaciones estereológicas de microglía, o estudios de proliferación como BrdU o Ki67 en combinación con marcadores de este tipo celular. En este sentido, datos preliminares del laboratorio del Dr. Vitorica (Univ. Sevilla) han revelado un aumento de Ki67 en el hipocampo del modelo P301S.

Por otro lado, en modelos amiloidogénicos, la presencia de microglía P2yr12 negativa se ha asociado con microglía DAM, pero esto ocurre sólo en el entorno más cercano de las placas neuríticas y no en los espacios interplaca (Holtman et al., 2017; Sarlus and Heneka, 2017). Es más, en muestras de pacientes de EA se ha observado que en regiones sin patología amiloide, pero con abundante fosfo-tau, la microglía no sólo no presenta descenso del marcaje para P2yr12, sino que además exhibe un marcado perfil fagocítico (Walker et al., 2020).

Por otro lado, hemos determinado la sobreexpresión del también marcador homeostático *cx3cr1* (receptor de la fractalquina) en P301S, así como en un modelo basado en APP. Esta molécula y su ligando están altamente implicados en la comunicación neurona-microglía y en fenómenos de neuroprotección (Nash et al., 2014). La eliminación de este receptor implica agravamiento de la patología de tau en modelos animales (Sheridan and Murphy, 2013). Fosfo-tau se une a los receptores CX3CR1 microgliales promoviendo su fagocitosis (Bolós et al., 2017), dato que concuerda con el aumento de la expresión en ambos modelos de *cd68*, marcador lisosomal indicativo de un aumento de la actividad fagocítica. Todos estos datos apuntan a que la presencia de fosfo-tau promueve que la microglía adopte un fenotipo DAM, cuyo perfil transcriptómico diferiría en algunos puntos del que exhibe frente a la patología amiloide (Sierksma et al., 2020), apoyando la idea de la existencia de diversos fenotipos funcionales microgliales. Sería necesario profundizar en este aspecto de la activación microglial, teniendo en cuenta la variabilidad de respuesta que esta población presenta dependiendo del agente patológico y de la región cerebral analizada (Stratoulias et al., 2019).

Entre las posibles causas que determinan estas discrepancias en la respuesta microglial en el hipocampo de los modelos P301S y ThyTau22 hay que incluir las diferencias en la acumulación, fosforilación y agregación de tau. Anteriormente, hemos especulado sobre el origen de los distintos los niveles de expresión de los transgenes, además de la posibilidad de que las diferentes mutaciones portadas en ambos modelos den lugar a distintas cepas de la proteína patogénica. Estas ideas se apoyan en las diferencias observadas en los niveles de tau/fosfo-tau, en los patrones de progresión espacio-temporal y en su estado de agregación.

El hipocampo del modelo P301S presenta mayor cantidad de tau y fosfo-tau que ThyTau22, de manera que la propia severidad de la patología representaría un punto clave en la activación microglial. Se ha descrito que la presencia de tau truncado puede activar la microglía (Kovac et al., 2011) y que la propia proteína tau sin fosforilar, es capaz de activar el perfil

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

inflamatorio de las células microgliales (Perea et al., 2018). Además, tau puede ser internalizado en cultivo por la microglía sin necesidad de encontrarse fosforilado (Bolós et al., 2015). Por tanto, el encontrarse bajo el control del promotor *Prnp*, conllevaría una sobreproducción de la proteína mutada que comienza a ser secretada al exterior en formas no fosforiladas o muy poco fosforiladas que activan a las células microgliales circundantes. Éstas comienzan un proceso de activación que promueve la hiperfosforilación de tau en el interior neuronal (Gorlovoy et al., 2009) con el fin de que este sea agregado en formas menos tóxicas tal y como atestiguan los altos niveles de AT100 (fosforilaciones muy tardías y asociadas a estados de mayor agregación). Otros estudios realizados en este modelo demuestran que la microgliosis sucede posteriormente a la aparición de estadios tempranos de agregación (van Olst et al., 2020), y que precede a la formación de ovillos (Yoshiyama et al., 2007). Aunque no hemos detectado NFTs en P301S a ninguna de las edades empleadas, la cronificación de esta situación por la continua producción de proteína tau, el propio efecto neurotóxico de las formas hiperfosforiladas y la propagación de la patología por parte de la microglía junto con la secreción continua de especies reactivas de oxígeno y citoquinas proinflamatorias, generarían un círculo vicioso que sería el causante de la grave neurodegeneración que presenta este modelo transgénico.

El hipocampo del modelo P301S no solo presenta mayor cantidad de tau/fosfo tau que ThyTau22 sino que su capacidad de agregación es diferente. Las neuronas del modelo ThyTau22 producen menor cantidad de proteína tau mutada y, de alguna forma que desconocemos, las mismas neuronas y/o las células microgliales, conseguirían contener eficazmente la toxicidad formando ovillos neurofibrilares sin necesidad de poner en marcha una fuerte respuesta neuroinflamatoria. De hecho, los NFTs se han propuesto como modo de neuroprotección ante la toxicidad de las formas solubles de fosfo-tau (Santacruz et al., 2005; De Calignon et al., 2010; D'Orange et al., 2018). De forma análoga, las placas amiloides representarían una forma de retirar formas solubles neurotóxicas de Aβ del medio extracelular, y se postula que la microglía interviene en su formación y compactación (Sosna et al., 2018; Spangenberg et al., 2019). Así, mientras en ThyTau22 se forman NFTs (Tioflavina-S positivos; SFs observables a MET) en el modelo P301S no se detectaron estas estructuras insolubles. Además, en colaboración con el grupo del Dr. Javier Vitorica hemos demostrado que en las fracciones solubles (S1) hipocampales de animales P301S son abundantes las formas oligoméricas de tau, mientras que apenas se detectan en las procedentes del modelo ThyTau22 (Romero-Molina et al., 2018). En este sentido es importante mencionar que una caracterización más detallada de las especies de tau que inducen activación microglial es aún una cuestión pendiente. Se ha descrito que cuando se aplican *in vitro* formas oligoméricas y fibrilares de tau, pero no monoméricas, se induce activación microglial (Morales et al., 2013). Aunque la capacidad fagocítica de la microglía para los agregados de tau parece ser relativamente modesta (Majerova et al., 2014; Hopp et al., 2018), han logrado ser detectados en la microglía activada del cerebro de pacientes (Odawara

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

et al., 1995; Hopp et al., 2018). Se ha comprobado que los oligómeros de tau toman parte en el proceso de inflamación crónica y que colocalizan con las células microgliales en pacientes de FTLD y EA (Nilson et al., 2017), lo que sugiere que el proceso de fagocitosis de estos oligómeros activaría la microglía, tal y como sugieren nuestros datos. De hecho, la microglía tiene capacidad de fagocitar agregados de tau *in vitro* e *in vivo* (De Calignon et al., 2012; Asai et al., 2015; Luo et al., 2015; Sanchez-Mejias et al., 2016; Brelstaff et al., 2018; Hopp et al., 2018), y parece ser que este proceso depende en parte de los receptores CX3CR1 (Bolós et al., 2015, 2017), que como ya se ha apuntado están sobreexpresados en P301S.

4.3.2. LA ACTIVACIÓN MICROGLIAL PROMUEVE LA PROGRESIÓN DE LA PATOLOGÍA TAU EN EL HIPOCAMPO DEL MODELO P301S

La microglía en estado no activado u "homeostática", se caracteriza morfológicamente por presentar prolongaciones finas y altamente ramificadas a la vez que un cuerpo celular de pequeño tamaño. Ante un estímulo perjudicial para el entorno, esta célula se activa y cambia su morfología acortando y engrosando las prolongaciones y aumentando el tamaño del cuerpo celular (Li and Barres, 2017). Los cambios morfológicos derivados de la activación ocurren tanto en pacientes de EA, como en modelos amiloidogénicos así como en las taupatías primarias (revisado en Bachiller et al., 2018).

En este Trabajo, hemos realizado un análisis comparativo de la progresión de la activación microglial en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S con marcadores específicos de microglía (Iba-1) y microglía activada (CD45). Los estudios inmunohistoquímicos confirmaron la fuerte activación microglial con la progresión de la patología tau en el modelo P301S comparado con el modelo ThyTau22. Los cambios morfológicos detectados se vieron acompañados de un intenso marcaje para CD45 que seguía el mismo patrón espacio-temporal que el marcaje para Iba-1 y para fosfo-tau. Otro estudio reciente ha caracterizado alteraciones en la complejidad microglial relacionadas con su activación en la corteza del modelo P301S (van Olst et al., 2020). Al mismo tiempo, observamos que con la edad también se producía un aumento de la infiltración de linfocitos en el parénquima del hipocampo. Este fenómeno ha sido reportado anteriormente tanto en cerebros de pacientes (Speciale et al., 2007; Fehervari, 2016) como en modelos de patología amiloide (Jimenez et al., 2008; Ferretti et al., 2016; St-Amour et al., 2019) y de tau (Laurent et al., 2017, 2018), pudiendo representar un factor que activa diferentes vías inflamatorias y media muerte neuronal.

En conjunto, nuestros resultados indican que la activación microglial correlaciona estrechamente con la progresión de la patología de tau entre regiones hipocampales conectadas sináptica y anatómicamente. Sin embargo, aunque bien conocida la relación entre la patología de tau y la activación microglial, aún hoy día no está claro del todo si la patología precede a la

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

activación o si es la propia microglía la que desencadena y/o exacerba la misma. Diversos estudios indican, como ya se ha comentado, que la presencia exclusiva de patología tau puede llegar a inducir la activación microglial. Incluso la eliminación del gen de la proteína tau parece prevenir la activación microglial asociada a la neurodegeneración (Maphis et al., 2015). Estudios en muestras de pacientes de taupatías puras (Ishizawa and Dickson, 2001; Henkel et al., 2004; Gerhard et al., 2005; Sasaki et al., 2008) y de EA, muestran células microgliales activadas cercanas a neuronas con NFTs (Sheffield et al., 2000; Walker et al., 2020), y se ha propuesto que el número de células activadas correlaciona mejor con la presencia de NFTs que con la activación y distribución de la microglía alrededor de las placas amiloides (Serrano-Pozo et al., 2011). Estos hallazgos se han reforzado con datos de estudios con modelos de rata que expresan tau humana-truncada no mutada (Stozicka et al., 2010) junto con los reportados en este mismo modelo (Yoshiyama et al., 2007) y en otros (Ishikawa et al., 2018; Sahara et al., 2018; Saito and Saido, 2018).

Además, la implicación de la activación microglial en los diferentes eventos patológicos como la hiperfosforilación, agregación y propagación de la proteína tau está bien documentada (revisado en Laurent et al., 2018). Se ha propuesto que la microglía puede mediar en la progresión de la patología mediante la fagocitosis de tau extracelular y de exosomas que contienen fosfo-tau que son expulsados por las neuronas (revisado en Colin et al, 2020). La incapacidad para degradar este tau patológico por parte de la microglía haría que lo secretase hacia el exterior, tomándolo otras neuronas circundantes (Asai et al., 2015). No obstante, esto no explica por qué nuestro grupo y otros han descrito una baja activación microglial en algunos modelos de taupatía y en muestras *postmortem* de cerebros de pacientes con EA (Sanchez-Mejias et al., 2016; Laurent et al., 2017). En este sentido, un estudio reciente (Friedman et al., 2018) ha referido una alta variabilidad en la respuesta neuroinflamatoria entre modelos murinos y pacientes de EA.

4.3.3. LA FUERTE ACTIVACIÓN MICROGLIAL EN EL HIPOCAMPO DEL MODELO P301S ES DEPENDIENTE DE TREM2

Los mecanismos que subyacen bajo esta diferente reactividad microglial no están del todo claros. En todo caso, para que la microglía adquiera un fenotipo DAM es esencial el papel del receptor TREM2 (Takahashi et al., 2005; Melchior et al., 2010; Kleinberger et al., 2014; Jiang et al., 2015; Krasemann et al., 2017). Aunque no se ha esclarecido del todo cómo ocurre la activación DAM, se sabe que ocurre en dos etapas. La primera es independiente de TREM2 y ocurre un descenso en la expresión de genes homeostáticos como *CX3CR1, P2YR12, TMEM119*, y una sobreexpresión de genes de activación como *TYROBP* y *APOE*. En la segunda etapa, dependiente de *TREM2*, se produce la sobreexpresión de genes como *AXL, CST7, CLEC7A* y el

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

propio *TREM2*. Este cambio de expresión génica va acompañado de cambios morfológicos en la célula y un aumento de la actividad fagocítica (Keren-Shaul et al., 2017; Krasemann et al., 2017). Sin embargo, aún quedan muchas incógnitas por resolver sobre el papel neuroprotector o neurotóxico de la activación de TREM2 en la patología amiloide. Los resultados obtenidos hasta la fecha en modelos animales amiloidogénicos han revelado resultados contradictorios, aunque apuntan a un papel neuroprotector (Meilandt et al., 2020). Lo mismo ocurre en el caso de la importancia de TREM2 en la patología de tau. Los estudios de ablación de TREM2 en modelos de taupatía pura muestran una reducción de la patología de tau y de la pérdida sináptica y neuronal (Leyns and Holtzman, 2017; Sayed et al., 2018); sin embargo, otros estudios han obtenido resultados opuestos (Bemiller et al., 2017). Por ejemplo, el silenciamiento de TREM2 en el modelo P301S a edades anteriores al despunte de la patología (5 meses, Jiang et al., 2016) demuestran que la acumulación de fosfo-tau aumenta en ausencia de este receptor. Todo parece apuntar a que como ocurre en el caso de los modelos amiloidogénicos, el papel de TREM2 en estadios iniciales de la enfermedad sería neuroprotector, mientras que se tornaría deletéreo en estadios avanzados de la patología (Hickman et al., 2018).

Nuestros resultados han mostrado que en el hipocampo de los animales P301S ocurre un aumento de la expresión de TREM2 con el avance de la patología, de forma más acusada que en un modelo amiloidogénico. Al ser TREM2 clave en la transición hacia perfil microglial DAM, explicaría por qué los niveles de expresión de otros marcadores DAM aumentan también significativamente al mismo tiempo. TREM2 está también implicado en fenómenos de supervivencia y proliferación microglial (Wang et al., 2016; Ulland et al., 2017), lo que contribuye a explicar el aumento de la expresión de genes microgliales homeostáticos como *cx3cr1 y tmem119* en el hipocampo de los P301S y APP a edades avanzadas.

La inmunohistoquímica para TREM2 en el hipocampo de animales P301S reveló la existencia de un marcaje intenso a edades avanzadas (12 meses), sugiriendo que existe una relación entre la patología de fosfo-tau y la activación DAM, ya que no se detectó microglía TREM2 positiva en animales WT de la misma edad. Por otro lado, el avance de la patología de tau no ha supuesto un incremento significativo de los niveles de TREM2 ni de otros marcadores DAM u homeostáticos en el hipocampo de ThyTau22. Por tanto, la escasa activación microglial en este modelo puede estar relacionada con la ausencia de estimulación de TREM2 ante la acumulación/ agregación de fosfo-tau, explicando así la falta de microglía DAM de este modelo y las diferencias con respecto a la magnitud de la respuesta orquestada en los animales P301S.

Otro de los resultados que prueba esta hipótesis es el estudio del marcador galectina-3 (Gal3). El gen de la galectina-3 (*LGAL3*) se encuentra sobreexpresado en la microglía DAM (Krasemann et al., 2017; Butovsky and Weiner, 2018; Boza-Serrano et al., 2019) presente en la EA y en otras situaciones patológicas como la esclerosis lateral amiotrófica y el daño isquémico;

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

así como en el propio envejecimiento (Burguillos et al., 2015; Holtman et al., 2015). Ciertos polimorfismos de este gen se han considerado también como factores de riesgo para padecer la EA (Boza-Serrano et al., 2019).

Gal3 ha sido relacionada con la activación microglial en la patología de Aβ dado que se trata de un ligando de TREM2 y de TLR4 (Burguillos et al., 2015; Boza-Serrano et al., 2019). Se ha observado que la ausencia de Gal3 en un modelo amiloidogénico provoca una respuesta microglial atenuada, a la vez que una disminución de genes implicados en la señalización de receptores TLR y TREM2, debido posiblemente a que Gal3 está implicada en la oligomerización del péptido amiloide (Tao et al., 2020). Tanto la deleción como la deficiencia en Gal3 en modelos amiloidogénicos reduce la carga amiloide junto con una mejora de las capacidades cognitivas (Boza-Serrano et al., 2019; Tao et al., 2020). Por tanto, Gal3 estimularía el perfil pro-inflamatorio microglial en presencia de patología amiloide (Ramírez et al., 2019). Poco se conoce del papel de la Gal3 en otras proteinopatías neurodegenerativas. Recientemente, se ha demostrado que esta proteína también media la respuesta inflamatoria en un modelo de la enfermedad de Huntington (Siew et al., 2019) y su implicación en Parkinson (Boza-Serrano et al., 2014), por lo que podría también estar involucrada en el proceso inflamatorio asociado a tau.

En este trabajo hemos detectado una elevada cantidad de microglía Gal3-positiva en el modelo P301S, que representa una subpoblación de microglía activada (CD45-positiva), concordando con hallazgos anteriores (Yip et al., 2017). El patrón de expresión espacio-temporal de la microglía Gal3-positiva se relaciona estrechamente con el de la patología de fosfo-tau, si bien de momento no están claros ni la relación entre ambos ni el mecanismo inductor. Posiblemente, la activación mediada por TREM2 induzca la expresión del gen para Gal3, la cual al ser secretada al exterior activará otras células microgliales adyacentes y reforzará su propia activación (actividad autocrina), exacerbando aún más el fenotipo DAM. Una de las implicaciones de este proceso de activación es que se potencia la capacidad de proliferación y supervivencia microgliales, y especialmente su capacidad fagocítica. Se sabe que la Gal3 funciona como una opsonina (Cockram et al., 2019) y que permite la fagocitosis de células apoptóticas (Karlsson et al., 2009), lo cual podría estar así potenciando la muerte neuronal y la pérdida sináptica. La capacidad de Gal3 para agregar β-amiloide ha sido demostrada (Boza-Serrano et al., 2019; Tao et al., 2020), sin embargo, su implicación en la agregación de tau patológico no se ha descrito hasta el momento, siendo por tanto un punto importante para estudiar en el futuro. Todos estos resultados refuerzan la idea de que la inhibición de la respuesta mediada por TREM2/Gal3 podría significar una diana terapéutica eficaz para el tratamiento de las taupatías.

Por último, fue llamativa la presencia de cierta cantidad de células Gal3-positivas en el hipocampo de los ThyTau22, al no haberse detectado apenas activación microglial en este

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

modelo. Varias razones podrían explicar esta situación. Por un lado, existe la posibilidad de que estas células Gal3-positivas sean también CD45-positivas, pero presenten niveles de expresión muy bajos. De otro lado, la expresión de Gal3 no está restringida únicamente a la microglía, sino que se ha detectado en otras células tales como macrófagos y células dendríticas (Breuilh et al., 2007). La presencia de células dendríticas y microglía con fenotipo dendrítico ha sido descrita en situaciones de daño cerebral (Reichmann et al., 2002; Karman et al., 2004) y se postula que se introducen en el parénquima cerebral en enfermedades neurodegenerativas como la EA y el Parkinson (revisado en Bossù et al., 2015) y en el propio envejecimiento (Kaunzner et al., 2012). La extravasación de monocitos es un fenómeno propio de situaciones patológicas (Feng et al., 2019) y son capaces de diferenciarse en células dendríticas (Mildner et al., 2013). Por último, aunque se ha descrito la existencia de astrocitos y neuronas Gal3-positivas (Yip et al. 2017; Boza-Serrano et al., 2019) no parece ser el caso de las células presentes en el hipocampo de ThyTau22 dada su morfología. Para poder determinar si estas células son de origen microglial o proceden de macrófagos infiltrados, sería necesario emplear combinaciones de marcadores específicos para microglía (TMEM119), para macrófagos perivasculares (MRC-1, CD163) y/o periféricos (CCR2).

4.3.4. LA MICROGLÍA SUFRE UN PROCESO DEGENERATIVO EN FASES AVANZADAS DE LA PATOLOGÍA TAU EN EL MODELO THYTAU22

En el hipocampo del modelo ThyTau22 hemos detectado una reducción de la carga microglial Iba1-positiva a edades muy avanzadas (18 meses), cuando se alcanzan altos niveles de la patología de fosfo-tau. Nuestro grupo ha demostrado que, en el hipocampo de pacientes con Alzheimer, además de ocurrir una activación mucho menor que en los modelos amiloidogénicos, existe un proceso de degeneración microglial, caracterizado por presentar prolongaciones fragmentadas, dilataciones esferoidales y distrofias en las prolongaciones (Sanchez-Mejias et al., 2016; Gutierrez and Vitorica 2018; Navarro et al., 2018). Además, se produce un descenso en el número de células microgliales así como en el dominio microglial, es decir, en el área del parénquima cerebral que es protegido y monitorizado por cada microglía. Aunque no se han detectado con claridad dilataciones esferoidales ni prolongaciones distróficas en la microglía del modelo ThyTau22, sí que se observaba un descenso del dominio microglial en la región de CA1, tal y como nuestro grupo ha reportado previamente (Sanchez-Mejias et al., 2016). Estudios recientes sostienen que la existencia de microglía distrófica es un evento propio sólo de humanos (Streit et al., 2020). A pesar de ello, la patología microglial observada en el modelo ThyTau22 parece reproducir en cierta medida la presente en los humanos en estadios Braak V-VI, en los que la mayor parte del parénquima del hilio no se encontraba protegido por prolongaciones microgliales. En este sentido, Streit et al., 2009, mostraron que estas estructuras microgliales se encuentran asociadas a estructuras positivas para tau. El descenso en el dominio

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

microglial ha sido descrito en regiones corticales con patología fosfo-tau en un modelo P301S bajo control del promotor Thy1.2 (van Olst et al., 2020). Además, nuestro grupo, en colaboración con el laboratorio del Dr. Javier Vitorica (Univ. Sevilla), ha demostrado mediante estudios *in vitro* que las fracciones solubles (S1) procedentes del cerebro de pacientes y del modelo ThyTau22, ricas en formas fosforiladas de tau, son tóxicas para la línea microglial inmortalizada BV2 (Sanchez-Mejias et al., 2016; Romero-Molina et al., 2018). Por tanto, este proceso gliodegenerativo podría estar ocurriendo a edades avanzadas (12-18 meses) en el hipocampo de los animales ThyTau22.

Hemos argumentado en el apartado anterior que existe una generación de oligómeros de tau en la región CA1 de estos animales que es contenida posteriormente, ya que a edades más avanzadas no son detectados (Zheng et al., 2020). Además, hemos demostrado en este trabajo que el número de NFTs aumenta con la edad considerablemente. No obstante, a los 18 meses, se ha descrito un descenso en la inmunorreactividad para fosfo-tau (Schindowski et al., 2006), atribuyéndolo a un descenso en el número de neuronas en CA1. Varios mecanismos podrían explicar este aumento de la mortalidad neuronal: En primer lugar, la propia patología de tau habría desgastado la maquinaria neuronal con la consecuente muerte de la célula (Bi et al., 2017). Por otro lado, se sabe que la microglía a edades avanzadas tanto en humanos como en roedores, comienza a mostrar perfiles transcriptómicos que sugieren síntomas de degeneración y falta de capacidad de respuesta (Galatro et al., 2017; Streit et al., 2020). De este modo, cabe la posibilidad de que la función neuroprotectora que realiza la microglía sobre la neurona se vea interrumpida (Streit et al., 2005). Por último, en este trabajo hemos observado que no sólo ocurre infiltración linfocitaria en los animales P301S sino que también en el hipocampo de los ThyTau22 asociado a la edad. En concreto, la infiltración de linfocitos T CD8+ está implicada en la muerte neuronal en este mismo modelo (Laurent et al., 2017) y podría contribuir a la liberación de las especies tóxicas del interior de las neuronas. Cualquiera de los tres eventos o todos en conjunto, propiciarían la muerte de neuronas piramidales descrita y la liberación de las formas solubles tóxicas contenidas en el interior neuronal. En el exterior, encontrarían una población microglial envejecida y desgastada que no sería capaz de responder adecuadamente y entraría en senescencia.

Sorprendentemente, no se ha detectado vulnerabilidad a la toxicidad de las células microgliales al incubar con fracciones solubles cerebrales del modelo P301S (Romero-Molina et al., 2018). Se comprobó que las S1 procedentes de animales ThyTau22 de 12 meses presentaban mayor concentración de tau positivo para AT8 que las procedentes de los P301S, lo que sugiere que fosfo-tau en dichas fracciones de este modelo se encuentran en mayor estado de agregación/ insolubilidad que las presentes en las de ThyTau22. Algo que, por otra parte, concordaría con los altísimos niveles de AT100 detectados por WB en el cerebro de los P301S.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Sin embargo, cuando estas fracciones son solubilizadas, tampoco revisten toxicidad para la microglía por lo que no todas las formas fosforiladas son igualmente tóxicas y la conformación de la proteína tau agregada determina en gran parte esa toxicidad. Todo esto, refuerza una vez más la hipótesis de que las diferentes cepas de tau patológico son capaces de generar respuestas inflamatorias distintas y que los procesos de agregación de tau buscan proteger a la neurona de la toxicidad de las formas solubles.

4.3.5. LA MICROGLÍA ACTIVADA AUMENTA SU CAPACIDAD FAGOCÍTICA PARA ELIMINAR FORMAS PATOLÓGICAS DE TAU

Una de las funciones clásicas de la microglía activada es la capacidad de fagocitar y eliminar sinapsis, desechos celulares y células muertas. Este proceso se encuentra amplificado en condiciones patológicas. En la microglía DAM, el incremento del metabolismo lipídico, la actividad lisosomal y la fagocitosis se encuentran reguladas por TREM2. ApoE y otras proteínas cuya expresión se ve aumentada en el fenotipo microglial DAM, también interaccionan con Aβ y TREM2, promoviendo la fagocitosis del péptido (Keren-Shaul et al., 2017; Krasemann et al., 2017; Hansen et al., 2018; Henstridge et al., 2019). Menos conocido es el papel que juega la fagocitosis mediada por la microglía en el contexto de la patología de tau. Se sabe que la microglía es capaz de fagocitar tau tanto *in vitro* como *in vivo* (Bolós et al., 2015, 2017) y que aumenta la fagocitosis de sinapsis y de neuronas cuando estas contienen fosfo-tau en su interior (Brelstaff et al., 2018; Dejanovic et al., 2018).

En relación con el papel fagocítico de la microglía en presencia de fosfo-tau, el análisis transcriptómico realizado en el hipocampo de ambos modelos de taupatía reveló un aumento de la expresión de *cd68* con la edad en los animales P301S. CD68 es una proteína que se expresa fundamentalmente en las membranas de lisosomas y endosomas microgliales. Se encuentra estrechamente relacionado con la fagocitosis, de manera que se expresa también en linfocitos y macrófagos (Chistiakov et al., 2017). Nuestro estudio reveló que el inmunomarcaje para CD68 fue significativamente más elevado en el hipocampo de los animales P301S y coincidía con el patrón espacio-temporal de la patología de tau. En el modelo ThyTau22 sólo se encontraron algunas células microgliales con mayor cantidad de lisosomas en su interior. El aumento lisosomal en P301S ocurría en zonas con abundante marcaje para fosfo-tau. Esto tiene conexión con el aumento con la edad del marcaje de LAMP2 descrito en secciones anteriores en este modelo, existiendo la posibilidad de que la mayor parte de ese incremento no se corresponda con un aumento de la autofagia neuronal, sino que se deba a la propia activación microglial.

El doble marcaje para Gal3 y fosfo-tau (AT8) reveló que esta subpoblación microglial fagocita pequeños agregados de fosfo-tau en el modelo P301S. La fagocitosis de tau por parte de la microglía está documentada (Bolós et al., 2015, 2017) y puede suceder a través de la

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

interacción de fosfo-tau con receptores como CX3CR1 (sobreexpresado en el hipocampo del modelo P301S a edades avanzadas), así como mediante la fagocitosis de estructuras sinápticas y neuronas que lo contengan (Sanchez-Mejias et al., 2016; Brelstaff et al., 2018; Dejanovic et al., 2018). En este sentido, Gal3 funciona como opsonina para promover la eliminación de neuronas y porciones neuronales deterioradas (Nomura et al., 2017). En apoyo a nuestros resultados, un estudio reciente en este modelo ha demostrado la colocalización de estructuras CD68+/AT8+ en células microgliales corticales (van Olst et al., 2020). La incapacidad de la microglía activada para degradar el tau patológico provocaría que lo volviese a secretar al exterior, probablemente asociado a exosomas, que serían tomados por las neuronas circundantes expandiéndose así más rápidamente la patología (Crotti et al., 2019). Esto podría representar otra de las causas que estarían contribuyendo a la agresiva e intensa proteinopatía presente en el modelo P301S.

4.4. LA RESPUESTA ASTROCITARIA FRENTE A FOSFO-TAU ES DEPENDIENTE DE LA ACTIVACIÓN MICROGLIAL

En la respuesta inflamatoria presente en la EA y otras patologías neurodegenerativas, no sólo intervienen las células microgliales, sino que la astroglía también es capaz de sufrir cambios fenotípicos y promover la secreción de citoquinas proinflamatorias (revisado en Arranz and De Strooper, 2019). Por el momento, la respuesta astroglial ante la patología de tau ha sido comparativamente poco estudiada. Sin embargo, la microglía ha acaparado la atención durante los últimos años debido posiblemente a su condición de macrófagos residentes en el parénquima cerebral, y también al descubrimiento de polimorfismos en genes microgliales asociados a las formas esporádicas de la EA (Colonna and Wang, 2016; Huang et al., 2017). No obstante, los estudios más recientes proponen que la progresión de la patología provoca que la microglía se vuelva disfuncional (Korvatska et al., 2015; Yuan et al., 2016; Streit et al., 2020), sin embargo, aún queda por determinar si los astrocitos juegan un papel esencial en la patogénesis de la EA. La existencia de reactividad astroglial ante la presencia de Aβ es ampliamente conocida, disponiéndose los atrocitos reactivos en el entorno de las placas amiloides y proyectando prolongaciones hacia las mismas (Perez-Nievas and Serrano-Pozo, 2018), pero su función, si agrava o atenúa la patología de la EA, no es conocida aun (Arranz and Stropper, 2019). El perfil transcriptómico y funcional de los astrocitos en condiciones neurodegenerativas ha comenzado a estudiarse (Chen et al., 2020; Das et al., 2020; Zhou et al., 2020) confirmando una implicación de los astrocitos y las vías del sistema del complemento, estrés oxidativo, lisosomal e inflamatorias en la patogénesis de la EA. Estos estudios sugieren que existe disfunción astroglial y una pérdida de coordinación metabólica entre neuronas y astrocitos en la EA. En apoyo a esta idea, estudios transcriptómicos del grupo del Dr. Vitorica en astrocitos aislados del modelo

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

P301S y del modelo amiloidogénico APP indican disfunción metabólica junto con la inducción de genes de la vía del complemento e inflamación (Sanchez-Mico, 2019 Tesis Doctoral). Por tanto, la astrogliosis asociada a fosfo-tau y/o Abeta en la patología Alzheimer implicaría ganancia de función inflamatoria y disminución de las capacidades fisiológicas neuroprotectoras de los astrocitos. Esta disfunción astroglial implicaría una disminución del soporte homeostático que afectaría a la supervivencia neuronal y la funcionalidad de las sinapsis contribuyendo a la progresión de la EA.

Los astrocitos reactivos son capaces de secretar citoquinas proinflamatorias (González-Reyes et al., 2017) y fagocitar péptido Aβ (Wyss-Coray and Mucke, 2002; Jones et al., 2013; Xiao et al., 2014; Domínguez-Prieto et al., 2018). Recientemente, nuestro grupo de investigación también ha reportado la capacidad de los astrocitos reactivos de fagocitar neuritas distróficas (presinapsis aberrantes) en el entorno de las placas amiloides (Gomez-Arboledas et al., 2018) aunque esta capacidad fagocítica de los astrocitos es poco eficiente siendo Aβ el agente causante de esta disfunción (Sanchez-Mico et al., resultados del grupo enviados para publicación).

En este trabajo, se ha pretendido profundizar en la menos conocida respuesta astroglial ante la patología de tau. Para ello, realizamos un estudio de los niveles de expresión de la proteína GFAP con la edad en el hipocampo de ambos modelos de taupatía. Los resultados mostraron que tanto en los animales ThyTau22 como en los P301S ocurría un aumento significativo de la carga astroglial a lo largo del envejecimiento. Sin embargo, este incremento mostró una correlación más potente con la patología tau en el modelo P301S que en ThyTau22. Estos resultados coinciden con la ausencia de diferencias significativas en los niveles de expresión del gen *gfap* entre los animales ThyTau22 y WT. Por tanto, el aumento de la reactividad astroglial en este modelo tiene cierta relación con fosfo-tau y un componente asociado al envejecimiento, el cual se ha demostrado que produce un ligero aumento de la expresión de esta proteína (Morgan et al., 1997; Bernal and Peterson, 2011). Al igual que lo observado en este trabajo, se ha descrito un incremento ligeramente más intenso de la reactividad astroglial en la región de transición CA1-Sub en ThyTau22 (Schindowsky et al., 2006), coincidiendo con el lugar de inicio de la patología de tau.

En el hipocampo del modelo P301S la reactividad astroglial superó con creces a la medida en ThyTau22. Esta fuerte respuesta astroglial podría ser inducida por la activación microglial que la precede en el tiempo. La clasificación de subtipos funcionales de astrocitos reactivos (en un contexto de daño agudo) en dos categorías contrapuestas, una perfil neurotóxico (A1; inducido por choque séptico) y otra con perfil neuroprotector (A2; inducido por isquemia), no ha sido corroborada en situación de neurodegeneración (Das et al., 2020). Esta clasificación binaria en dos subtipos astrogliales reactivos es probablemente insuficiente

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

para explicar la diversidad de programas funcionales que pueden activar los astrocitos reactivos y que podrían depender en función del contexto patológico, la región cerebral, el estadio de la enfermedad, etc (Boisvert et al., 2018). Es interesante que la polarización hacia el fenotipo astroglial ''A1'' es dependiente de la mediación de citoquinas proinflamatorias secretadas por la microglía activada, tales como IL1α, TNFα o C1q (Liddelow et al., 2017) y está especialmente modulada por la acción de ApoE4. La comunicación microglía-astroglía parece ser un hecho común no solo en situación fisiológica sino también en la patológica (Vainchtein and Molofsky, 2020). En nuestro estudio, la carga microglial Iba-1-positiva a los 9 meses de edad, y especialmente la carga de microglía activada (CD45-positiva), fue significativamente mayor en P301S en comparación con los otros genotipos. En el caso de la reactividad astroglial, fue significativa a edades más tardías (12 meses) por todo el hipocampo, dando sustento a esta hipótesis. Es más, existe una fuerte correlación positiva entre la carga microglial tanto general (Iba-1) como activada (CD45) con la carga astroglial (GFAP), indicando que cuando aumenta la reactividad microglial también lo hace la astroglial. Los estudios de inmunofluorescencia triple marcando fosfo-tau, microglía y astroglía también apoyan esta idea. En el caso del modelo ThyTau22, observamos que a mayor concentración de fosfo-tau, la microglía parece responder ligeramente al igual que lo hace la astroglía; sin embargo, cuando la microglía comienza a mostrar signos de degeneración (18 meses), no se altera la reactividad de los astrocitos. Esto indica, como anteriormente se ha comentado, que el aumento de GFAP detectado es, al menos en parte, por el efecto del envejecimiento. No obstante, es posible que la pequeña reactividad microglial observada en los ThyTau22 (especialmente en CA1) influya también en cierto modo en el ligero aumento de la carga astroglial, ya que existe una leve correlación positiva entre ambos parámetros. Además, el descenso de la carga microglial a los 18 meses en CA1, posiblemente por un proceso degenerativo, explicaría el por qué la carga astroglial se estabiliza en CA1 de los ThyTau22 a esa edad. Por el contrario, en los P301S, la progresión de la activación microglial/astroglial fue aumentando progresivamente con la edad y avance de la patología. Para confirmar esta hipótesis podría realizarse un estudio detallado de la perfil génico astroglial y ver si es dependiente o no de genes microgliales, además de hacer una caracterización extensa para determinar si existen subpoblaciones asociadas a situaciones patológicas (DAA) (Habib et al., 2020), incluso realizar estudios que incluyan la depleción o inhibición de la activación microglial, aunque algunos estudios realizados en este sentido confirman que la patología se ve disminuida (Shi et al., 2019). Es más, la misma inmunotinción triple reveló una estrecha relación entre los dos tipos gliales y neuronas con fosfo-tau. Ésta seguía un patrón característico en el cual la célula microglial contacta más estrechamente con la neurona afectada, mientras que la astroglía envía prolongaciones desde una posición más externa. Curiosamente, un estudio anterior (Sheng et al., 1997) ya describió estas asociaciones en la corteza parahipocampal de pacientes con Alzheimer en las que el estadio de agregación de NFTs determinaba el grado de

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

asociación entre neurona y glía. Interesantemente, la microglía asociada a las células con pre-NFTs mostraba intenso marcaje para IL1α y los astrocitos circundantes fueron positivos para S100β. Por tanto, la adquisición de un perfil citotóxico de los astrocitos en la patología de tau requeriría la activación previa de la microglía, y ambos tipos celulares podrían intervenir en la progresión de la patología tau y en la formación de los NFTs intraneuronales.

4.4.1. LOS ASTROCITOS INTERNALIZAN FOSFO-TAU PARA ELIMINARLO DEL PARÉNQUIMA CEREBRAL

La astroglía, como la microglía activada, contacta estrechamente con somas y estructuras neuronales con fosfo-tau en su interior. Nuestro estudio ha revelado la presencia de agregados de fosfo-tau de pequeño tamaño en el interior de las prolongaciones y cuerpos astrocitarios, tanto en el modelo ThyTau22 como en el P301S. Una de las razones que explicaría este hallazgo sería una expresión ectópica (no neuronal) del transgén humano introducido. En situación fisiológica, el promotor Thy1.2 se expresa no solamente en neuronas sino en varios tipos celulares. En el caso del cerebro, se sabe que se puede expresar ligeramente en astrocitos. Lo mismo ocurre en el caso de la proteína priónica (y por tanto, del promotor Prnp) (Jackson et al., 2014). Esta proteína es secretada de forma fisiológica por los astrocitos con fines neuroprotectores (Lima et al., 2007). Más aún, la propia mutación P301S está asociada a la taupatía CBD (del inglés, *corticobasal degeneration*) caracterizada por la presencia de agregados de fosfo-tau en los astrocitos y la generación de "placas astrocitarias". Sin embargo, el no haber detectado estas estructuras a ninguna de las edades analizadas, y que otros grupos hayan reportado que en ambos modelos la expresión de los transgenes se ha detectado en tejido nervioso y fundamentalmente en neuronas (Schindowski et al., 2006; Yoshiyama et al., 2007), invita a pensar que el fosfo-tau detectado en astrocitos procedería del medio extracelular. Además, otros estudios recientes apuntan a que no sólo la microglía fagocita tau patológico del medio circundante, sino que los astrocitos son capaces de internalizar tau extracelular en forma monomérica siendo posible que también contribuyan a la propagación de esta proteína, aunque se desconocen los mecanismos implicados (Perea et al., 2019).

Los estudios ultraestructurales al MET confirmaron la presencia de tau fosforilado en el citoplasma astrocitario. En ningún caso se observaron partículas AT8-positivas rodeadas de material membranoso, lo cual no concuerda con una actividad fagocítica típica realizada por vía endocítica por parte de los astrocitos. No obstante, la proteína tau patológica es capaz de afectar a la integridad membranal (Jones et al., 2012; Fanni et al., 2019) y de translocarse hacia el citoplasma celular, donde queda libre. Es de destacar que la cantidad de agregados de fosfo-tau en las prolongaciones astrocitarias asociadas a vasos sanguíneos (o pies perivasculares) era elevada en ambos modelos de taupatía. Todo parece indicar que la astroglía concentra fosfo-

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

tau en el entorno de los vasos sanguíneos con el fin de drenarlos al exterior del parénquima cerebral. Se conoce bien que el aclaramiento extracelular de Aβ está regulado por los transportadores en la BBB, por enzimas como la neprilisina y enzimas que degradan la insulina, así como por el flujo glinfático (Patel et al., 2019), pero los datos sobre la regulación del aclaramiento extracelular de tau son escasos. Un estudio mostró que varias isoformas de tau se detectan fácilmente en plasma después de la inyección en los ventrículos (Banks et al., 2016), pero se desconocen los mecanismos que median este proceso. También hay alguna evidencia de que el sistema glinfático está involucrado (Iliff et al., 2014; Patel et al., 2019). Con todo ello, nuevos y extensos estudios deben realizarse en este sentido, ya que potenciar la eliminación de las proteínas patológicas cerebrales mediada por la astroglía podría constituir una diana terapéutica eficaz para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

4.5. LOS MODELOS DE TAUPATÍA THYTAU22 Y P301S PRESENTAN PÉRDIDA SINÁPTICA Y NEURONAL

La pérdida sináptica es un factor común a todas las enfermedades neurodegenerativas. En el caso de la EA, correlaciona de manera más estrecha con los déficits cognitivos que con la patología amiloide (Sze et al., 1997; Forner et al., 2017), si bien existe cierta relación entre la pérdida sináptica y la toxicidad de las formas oligoméricas (Koffie et al., 2009; Sanchez-Varo et al., 2012; Arbel-Ornath et al., 2017). Además, se postula que la toxicidad sináptica y neuronal que presenta Aβ está mediada por la proteína tau patológica (revisado Bloom, 2014; Forner et al., 2017). De hecho, los experimentos en modelos de EA muestran que la reducción de los niveles de proteína tau reduce la severidad de la patología y mejora la capacidad cognitiva de los animales (Pickett et al., 2019). La pérdida sináptica observada en los pacientes y modelos de taupatías puras sustentan la hipótesis de que gran parte del daño sináptico y neuronal estaría mediado por tau. No obstante, los mecanismos que subyacen a esta pérdida aún no han sido esclarecidos, ni tampoco si, como ocurre en la EA, existen grupos o conjuntos de neuronas y sinapsis con vulnerabilidad diferencial, o cepas de tau más agresivas que otras en este sentido. Por ello, en esta Tesis Doctoral decidimos realizar un estudio más detallado de la pérdida sináptica y neuronal en los modelos ThyTau22 y P301S.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

4.5.1. LA PÉRDIDA SINÁPTICA COINCIDE CON LA PROGRESIÓN ESPACIO-TEMPORAL DE LA PATOLOGÍA DE TAU

En la EA, tanto la patología de tau como la pérdida sináptica correlacionan mejor con los daños cognitivos que la patología amiloide, lo que sugiere la existencia de una estrecha relación espacio-temporal entre ellos. En este trabajo hemos observado que el hipocampo del modelo ThyTau22 exhibe un descenso significativo de marcadores sinápticos (Syn, VGLUT-1, VGAT) con la edad, especialmente a los 9-12 meses, coincidiendo con el momento en que la patología de tau es especialmente intensa. Además, a nivel regional se reveló una disminución significativa del área inmunorreactiva para estos marcadores desde edades tempranas en zonas muy específicas como CA1-Sub y el estrato lúcido de CA3, coincidiendo con los lugares de aparición de la patología de fosfo-tau en el hipocampo. El descenso de los marcadores Syn y VGLUT-1 en estas regiones podría ser consecuencia de una pérdida de las neuronas que las inervan, sin embargo, no se ha reportado que este modelo presente una muerte neuronal significativa hasta edades avanzadas (Schindowski et al., 2007) por lo que parece ser que la pérdida sináptica es por efecto directo de tau sobre la integridad del terminal.

Son varios los mecanismos propuestos para explicar el papel de tau sobre la disfunción sináptica: En primer lugar, la propia desestabilización microtubular producida por su desunión de las tubulinas implicaría un descenso en el transporte axonal y, en consecuencia, del suministro de los elementos necesarios para el mantenimiento de los terminales presinápticos. De hecho, se ha descrito que el modelo ThyTau22 presenta un descenso en los niveles de tubulina acetilada (AcTub, modificación postraduccional propia de microtúbulos estables) con la edad (Zhang et al., 2005; Brunden et al., 2010). Los estudios ultraestructurales realizados en este trabajo han mostrado la presencia de fosfo-tau en los terminales presinápticos, donde se sabe que esta proteína podría unirse a vesículas sinápticas y secuestrarlas en el terminal remodelando el citoesqueleto de actina (Zhou et al., 2017). Estudios recientes proponen que este secuestro ocurre a través de la unión de tau a otras proteínas como la sinaptogirina-3, cuya eliminación podría evitar este efecto adverso (McInnes et al., 2018).

No sólo tau patológico es capaz de afectar directamente a la secreción de vesículas sinápticas desde el terminal presináptico, sino que su liberación también puede verse condicionada por el estado del elemento postsináptico. Es sobradamente conocido que tau al ser hiperfosforilado se transloca desde el compartimento axonal al somatodendrítico, incluyendo las espinas dendríticas. Aquí tau es capaz de afectar a la actividad de diversos canales y receptores. Su asociación con quinasas como Fyn promueve la fosforilación y activación de receptores glutamatérgicos como los NMDA, provocando entradas anormales de calcio causantes de excitoxicidad (Li and Götz, 2017). La activación de estos receptores también puede

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

estar mediada por la unión de tau a los receptores muscarínicos (Gómez-Ramos et al., 2009). La presencia de fosfo-tau en la espina produce también la internalización de otros receptores como los AMPA (Suzuki and Kimura, 2017), y se ha relacionado la activación anormal de los receptores de GABA con la fosforilación de tau al provocar inhibición de la fosfatasa PP2A (Nykänen et al., 2012). La integridad sináptica depende de que la sinapsis sea activa, por lo que la disfunción a nivel postsináptico implica una desconexión entre ambos elementos que lleva a la degeneración del terminal. Sin embargo, a los 12 meses de edad, los niveles de PSD95 (proteína de elementos postsinápticos de sinapsis excitatorias) se vieron incrementados significativamente en el modelo ThyTau22, sugiriendo la articulación de algún mecanismo compensatorio que buscase paliar la pérdida de tono glutamatérgico en el hipocampo de estos animales.

El papel de la glía en la poda sináptica es conocido, y en esta línea se ha descrito la intervención de la microglía junto con el sistema del complemento en la eliminación de espinas que contienen fosfo-tau en taupatías (Dejanovic et al., 2018). En un trabajo reciente se ha mostrado la disminución de la proteína postsináptica Homer-1 y su colocalización con estructuras endo-lisosomales (LAMP1) microgliales en la corteza de este modelo (Van Olst et al., 2020), apuntando a este rol de la microglía en la pérdida de sinapsis. En este sentido, la actividad de los astrocitos también ha sido relacionada con la sinaptoxicidad en la EA, ya que el péptido amiloide es capaz de activar la secreción de glutamato por parte de estas células, y así potenciar la excitotoxicidad en los terminales con receptores de glutamato (Huang et al., 2018). En las taupatías, los problemas en el transporte de glutamato hacia los astrocitos también han sido relacionados con la patología de tau (Dabir et al., 2006). Además, los astrocitos pueden presentar déficits en sus funciones homeostáticas en los modelos de tau desde edades tempranas (Sidoryk-Wegrzynowicz et al., 2017).

En el caso del modelo P301S, los análisis de niveles de Syn y VGLUT-1 demuestran que la pérdida sináptica hipocampal es muy severa, mayor que en el modelo ThyTau22, y en consonancia con una mayor patología de tau y una más intensa respuesta neuroinflamatoria. Esta pérdida significativa de sinapsis ayudaría a explicar la marcada atrofia hipocampal que exhibe este modelo a edades avanzadas. Se ha descrito que la pérdida de inmunorreactividad de Syn en el estrato lúcido del modelo P301S ocurre desde edades muy tempranas (3 meses, Yoshiyama et al., 2007) y desciende drásticamente a partir de los 9 meses en todo el hipocampo (Yoshiyama et al., 2010). Nuestro estudio inmunohistoquímico para Syn en el hipocampo de estos animales confirma estos hallazgos. Como se ha mostrado, en este modelo una de las zonas donde comienza a aparecer el marcaje para AT8 es precisamente en el estrato lúcido. Por tanto, en ambos modelos concuerda que el avance de la pérdida de sinapsis en una región sucede a la par que aumenta la patología de fosfo-tau, pudiendo estar asociada con distintos mecanismos de activación/disfunción glial.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

4.5.2. MUERTE SELECTIVA DE NEURONAS COLINÉRGICAS EN LOS NÚCLEOS TELENCEFÁLICOS

El análisis de los niveles de enzima acetilcolina transferasa (ChAT), y el marcaje mediante inmunohistoquímica, revelaron que en el hipocampo de los animales ThyTau22 ocurre una pérdida importante de aferencias colinérgicas. Además, hemos demostrado que a edades avanzadas tanto en este modelo como en P301S ocurre una pérdida significativa de neuronas colinérgicas en la región del *septum* medial (SM) y el núcleo basal de Meynert (NBM). La primera de ellas representa una de las principales vías aferentes colinérgicas del hipocampo (Unal et al., 2015). Por tanto, la disminución de los niveles de ChAT observados a nivel hipocampal se debe a un proceso neurodegenerativo de las neuronas aferentes. Se pudo descartar el efecto del envejecimiento dado que los animales WT no presentaban pérdida colinérgica.

Esto también se ha descrito anteriormente en la EA y otras taupatías (Köhler et al., 2010; Hampel et al., 2018). La evidencia sugiere que las neuronas colinérgicas del teléncefalo basal son selectivamente vulnerables a la degeneración en la enfermedad de Alzheimer (Mesulam, 2013). En consecuencia, los estudios en muestras *postmortem* de pacientes de EA han demostrado pérdida neuronal en los núcleos colinérgicos y una reducción de la actividad cortical de la acetilcolina transferasa asociada con el grado de deterioro cognitivo (Cantero et al., 2019). Es más, la regulación a la baja de los marcadores colinérgicos se ha reportado en sujetos asintomáticos de edad avanzada, lo que sugiere que la denervación colinérgica ocurre relativamente temprano en el curso de la enfermedad (Palmer and Gershon, 1990). Las regiones cerebrales que reciben proyecciones colinérgicas de los núcleos basales (es decir, la neocorteza, el hipocampo y la amígdala) se ven gravemente afectadas en la EA (Braak and Braak, 1991; Scheff et al., 2006), lo que concuerda con los resultados obtenidos en esta Tesis.

Además, hemos observado que a la par que disminuyen con la edad los niveles hipocampales de ChAT en el modelo ThyTau22, el marcaje se intensificaba en ciertas zonas formando un plexo en la capa piramidal de CA1 y la zona supragranular del GD. Una de las razones que podría explicar este *sprouting* sería un mecanismo mediante el cual el neuropilo de las neuronas resilientes promueva o potencie la inervación de manera compensatoria en las regiones correspondientes. Tales fenómenos se han descrito en otras patologías, en los que la pérdida de receptores postsinápticos induce esta respuesta en el terminal opuesto (Guyon et al., 1998; Erb et al., 2001). En este mismo modelo se ha reportado que los niveles hipocampales de ARNm de enzimas relacionadas con las vías colinérgicas difieren de las presentes en animales WT. Es posible, que la razón sea precisamente la aparición de mecanismos compensatorios que buscan minimizar la pérdida de estas aferencias (García-Gómez et al., 2016). Curiosamente, se ha demostrado recientemente que el genotipo ApoE puede influir en los mecanismos

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

compensatorios colinérgicos. En particular, el alelo ApoE4 está asociado con déficits en la remodelación compensatoria del hipocampo colinérgico en respuesta a la pérdida de aferencias (Bott et al., 2016).

4.5.3. LA VULNERABILIDAD DE LAS INTERNEURONAS PARVALBÚMINA EN EL HIPOCAMPO ES DEPENDIENTE DE LA PATOLOGÍA DE TAU

La vulnerabilidad del sistema GABAérgico en la EA está bien establecida, y sigue siendo un tema candente en este contexto (Hardy et al., 1987; Fuhrer et al., 2017; Sanchez-Mejias et al., 2019). Nuestro grupo ha caracterizado en profundidad la pérdida de interneuronas GABAérgicas en modelos animales de amiloidosis (Ramos et al., 2006; Moreno-Gonzalez et al., 2009; Baglietto-Vargas et al., 2010; Trujillo-Estrada et al., 2014; Sanchez-Mejias et al., 2019). Sin embargo, se sabe menos de la implicación de la patología tau con respecto al sistema GABAérgico, aunque sí que se encuentra dañado en ciertas regiones como el *septum* medial (Soler et al., 2017). En este trabajo hemos detectado una alteración en las sinapsis GABAérgicas hipocampales del modelo ThyTau22 (descenso de los niveles de VGAT), que podría ser parcialmente consecuencia de la muerte de interneuronas en esta región cerebral.

Mediante análisis estereológico hemos demostrado que en el hipocampo del modelo P301S ocurre una pérdida significativa de interneuronas PV-positivas a edades avanzadas (12 meses). Sin embargo, esta misma población no se ve afectada por la patología tau en ThyTau22. Por tanto, para identificar el origen de la pérdida de terminales sinápticos inhibitorios en este caso, se hace necesario incluir estudios centrados en daños locales a nivel axonal/sináptico así como determinaciones de la densidad de otras subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas potencialmente vulnerables, como aquellas que expresan somatostatina (SOM) o NPY.

Existen varias causas que permitirían justificar la diferencia en la vulnerabilidad de las interneuronas PV entre ambos modelos, en relación con aspectos comentados en apartados anteriores, y cuya base reside en las diferencias entre el tipo de patología tau que desarrollan. En el modelo P301S, la taupatía es mucho más severa y la posible presencia de una cantidad elevada de oligómeros de fosfo-tau solubles (no presentes en los ThyTau22) causaría toxicidad también en las neuronas inhibitorias. Por otro lado, la propia sobreactivación microglial de este modelo podría estar a su vez mediando la muerte neuronal de esta población. Así, la fuerte atrofia hipocampal podría ser consecuencia de la pérdida de neuropilo debido un aumento de la fagocitosis de sinapsis por parte de estas células gliales (Dejavonic et al., 2018) y a la eliminación de neuronas en estadios avanzados de la patología (Shi et al., 2019). Más adelante comentaremos este aspecto en mayor profundidad.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Resultados previos del grupo han demostrado que las interneuronas PV no se ven afectadas en el modelo amiloidogénico APP/PS1, a diferencia de otras subpoblaciones GABAérgicas altamente vulnerable en este contexto, como las ya mencionadas neuronas SOM-positivas (Ramos et al., 2006; Moreno-Gonzalez et al., 2010; Trujillo-Estrada et al., 2014; Sanchez-Mejias et al., 2019). Es posible que las neuronas PV sean resistentes a los efectos tóxicos del péptido β-amiloide, de hecho, ni siquiera forman neuritas distróficas en la proximidad de las placas. Sin embargo, y en apoyo a nuestros resultados, las interneuronas PV-positivas son muy vulnerables en cerebros de pacientes de Alzheimer, tal y como hemos demostrado recientemente en la corteza perirrinal (Sanchez-Mejias et al., 2019) y en hipocampo (Sanchez-Mejias, 2015 Tesis Doctoral). Por tanto, la pérdida de las neuronas PV parece estar asociada a la patología tau, presente en los pacientes, y no en los modelos amiloidogénicos. De hecho se ha descrito la presencia de tau fosforilado en neuronas PV en el cerebro de pacientes (Dávila-Bouziguet et al., 2019). La pérdida de neuronas PV también ha sido descrita en otros modelos de taupatía (Levenga et al., 2014; Zallo et al., 2018). Por tanto, los agregados de fosfo-tau presentes en el modelo P301S serían el agente tóxico subyacente a la pérdida de las neuronas PV en este modelo.

Las neuronas PV constituyen una de las principales subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas del hipocampo y realizan inervación del compartimento perisomático (células PV en cesto) y segmento inicial del axón (células PV en candelabro) de las neuronas piramidales provocando una potente inhibición de estas células (Kawaguchi and Kubota, 1997; Ascoli et al., 2008). Además, dado que las neuronas PV cercanas están unidas eléctricamente por uniones tipo gap, forman redes inhibitorias coordinadas que permiten modular sincrónicamente la actividad de muchas células piramidales (Hestrin and Galarreta, 2005). La interneuronas PV de disparo rápido son una fuente de inhibición para generar actividades oscilatorias gamma (Cardin, 2016), y es conocido que en pacientes de EA la frecuencia gamma se encuentra alterada (Stam et al., 2002). En este sentido, se ha demostrado una relación directa entre el déficit de frecuencia gamma y la patología Alzheimer (Gahete et al., 2010). Es más, la estimulación de las ondas gamma en modelos de EA produce una disminución de fosfo-tau, por lo que la pérdida de interneuronas PV en el hipocampo del modelo P301S y en pacientes de Alzheimer podría contribuir significativamente a la patología en esta región cerebral. Finalmente, la alteración de los circuitos GABAérgicos podría contribuir decisivamente en el deterioro cognitivo manifestado por los pacientes de Alzheimer.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

4.5.4. EL ESTADO DE AGREGACIÓN DE FOSFO-TAU CORRELACIONA CON EL DAÑO MITOCONDRIAL Y LA SUPERVIVENCIA NEURONAL

La hiperfosforilación de tau no sólo genera toxicidad neuronal por la pérdida de su función fisiológica, como la desestabilización de los microtúbulos y la interrupción del flujo axonal, sino que también se postula que una ganancia de función tóxica afectaría a orgánulos subcelulares. Se sabe que la translocación de tau hacia el compartimento somatodendrítico, además de dañar a los elementos postsinápticos, es capaz de alterar sistemas de endomembranas como el retículo endoplásmático (RE), el aparato de Golgi (Joshi et al., 2015), el núcleo (Eftekharzadeh et al., 2018) y, especialmente a las mitocondrias (Cheng and Bai, 2018; Perez et al., 2018; Zheng et al., 2020)

El presente estudio ultraestructural a MET reveló que aquellas neuronas que acumulaban fosfo-tau presentaban distensiones de las cisternas del Golgi y del RE. De hecho, se ha observado fragmentación del Golgi en muestras de pacientes de diversas enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer, el Parkinson, Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (Joshi et al., 2015). Sin embargo, la base molecular de la fragmentación del Golgi y su papel en la progresión de la enfermedad permanecen en gran medida sin explorar. Se sabe que la proteína tau interactúa con las membranas de este orgánulo mediando su asociación con los microtúbulos (Farah et al., 2006), y que su sobreexpresión (ya sea en su forma silvestre o mutada) provoca la fragmentación del Golgi en neuronas primarias hipocampales (Liazoghli et al., 2005). Por tanto, parece ser que la sobreabundancia de tau y la posible formación de NFTs preceden a los defectos morfológicos del aparato de Golgi. Además, la fragmentación del Golgi puede a su vez afectar la fosforilación de tau (Jiang et al., 2014) y promover la formación de NFTs en la EA (Grundke-Iqbal et al., 1986). Por lo tanto, existe una estrecha conexión entre la morfología y la función del Golgi, la organización de los microtúbulos y la patología tau en la EA, algo a lo que apuntan ya otros estudios (Antón-Fernández et al., 2017).

Por otro lado, es interesante destacar que encontramos neuronas piramidales de CA1 con grandes indentaciones nucleares, cuya frecuencia parecía aumentar con la edad y estar asociada a la acumulación de fosfo-tau citoplasmático, sobre todo en aquellas que contenían NFTs en el modelo ThyTau22. Estas estructuras han sido recientemente identificadas como “rods nucleares” en la enfermedad de Huntington, y definidas como invaginaciones de la membrana nuclear que contienen citoplasma con elevada cantidad de proteína tau (Fernández-Nogales et al., 2014). Tales rods se han identificado tanto en el modelo P301S (Fernández-Nogales et al., 2017) como en cerebros de pacientes con taupatías, y también en neuronas derivadas de iPSC con la mutación P301L (Paonessa et al., 2019). Estas indentaciones han sido asociadas con daño y disfunción nuclear, siendo este trabajo la primera vez que se identifican

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

en el modelo ThyTau22, lo cual sugiere que este podría ser un fenómeno común en todas las taupatías. La disfunción de la lámina nuclear y las hendiduras nucleares neuronales en la EA se han relacionado con un inadecuado acoplamiento citoesquelético/nucleosquelético, proponiéndose como un nuevo mecanismo mediador de neurotoxicidad en las taupatías (Frost et al., 2016). De esta forma, los rods nucleares adquieren una relevancia patogénica cuyo conocimiento requiere un estudio en mayor profundidad.

Entre las alteraciones encontradas en los diferentes orgánulos subcelulares, destacó la presencia de mitocondrias con morfología anómala, presentando una matriz desorganizada y crestas dilatadas, así como roturas en la doble envuelta membranal. En el caso de los animales P301S, la frecuencia así como la severidad del grado de afectación de las mitocondrias fue más elevada que en ThyTau22. Esta patología morfológica se ha relacionado previamente con signos de degeneración mitocondrial. Nuestro estudio apunta a que la disfunción mitocondrial está estrechamente relacionada con la acumulación de fosfo-tau en la neurona, ya que en ambos modelos las mitocondrias dañadas se encontraban en neuronas con marcaje AT8. Las disfunción mitocondrial juega un papel esencial en la patología de la EA, habiendo llegado a proponerse como posible origen o potenciador de la misma (Chakravorty et al., 2019). Se sabe que el péptido amiloide es capaz de afectar a la función e integridad mitocondrial (Mossmann et al., 2014), pero que en presencia de tau, esta capacidad se ve acentuada (Quintanilla et al., 2014). Tau afecta a la función mitocondrial de diversas formas como, por ejemplo, impidiendo su transporte y correcta distribución en la neurona (Pérez et al., 2018), alterando el equilibrio de fisión/fusión mitocondrial (DuBoff et al., 2012), y por tanto, la correcta función de los complejos que forman parte de la cadena respiratoria (David et al., 2005) así como a los procesos de mitofagia mediante la inhibición de la función de la proteína parkina (Cummins et al., 2019). Además, se ha demostrado que los oligómeros de tau son capaces de deteriorar las membranas mitocondriales (Camilleri et al., 2020). Todo esto en conjunto supondría no sólo la falta de ATP y otras moléculas esenciales para la supervivencia neuronal, sino una fuente de especies reactivas de oxígeno (ROS) que podrían dañar y afectar a otros orgánulos y estructuras celulares.

En este sentido, nuestros resultados apuntan a que el estado de agregación de fosfo-tau, representaría un factor determinante en el grado de daño mitocondrial. Contemplamos esta hipótesis, ya que en los somas o dendritas de los animales ThyTau22 que presentaban estructuras tipo ovillos neurofibrilares, las mitocondrias no aparecían tan dañadas como en el caso del modelo P301S. De nuevo, cabe la posibilidad de que la formación de NFTs intraneuronales suponga un mecanismo de contención de la toxicidad de las formas solubles de fosfo-tau. En los últimos años esta hipótesis ha cobrado importancia, dado que las neuronas con NFTs parecen no mostrar signos de degeneración y continúan integradas perfectamente en sus circuitos neuronales, lo que demuestra que siguen siendo funcionales. Esta idea parece verse

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

confirmada por nuestro estudio ultraestructural sobre neuronas piramidales de ThyTau22 con ovillos, que no presentaban signos claves de degeneración como un citoplasma muy electrodenso o pérdida masiva de orgánulos y estructuras citoplasmáticas. De este modo, tratamientos que pudieran potenciar bien el aclaramiento, o por el contrario la agregación de tau patológico a configuraciones no tóxicas, podrían representar terapias prometedoras para paliar la EA y otras taupatías (Congdon and Sigurdsson, 2018). Asimismo, teniendo en cuenta que la función mitocondrial está gravemente comprometida en la EA, las terapias dirigidas a restaurar esta disfunción mitocondrial podrían ser estrategias neuroprotectoras de gran interés (Rai et al., 2020).

4.5.5. LOS CONTACTOS MICROGLÍA-NEURONA AUMENTAN CON EL DAÑO MITOCONDRIAL Y PODRÍAN MEDIAR LA MUERTE NEURONAL EN EL MODELO P301S.

Previamente se ha discutido el rol de la microglía activada en el contexto de la patología de tau, sugiriendo que este tipo celular contribuiría a su progresión y exacerbación. No obstante, teorías actuales también apuntan a que la activación microglial en la EA inicialmente tendría un papel neuroprotector, que al cronificarse derivaría en un proceso neuroinflamatorio de elevado potencial tóxico, o que bien ocurriría un proceso gliodegenerativo con una consecuente pérdida de la función microglial. Sin embargo, ninguno de estos procesos tendría por qué ser mutuamente excluyentes dada la elevada y creciente diversidad de morfotipos microgliales.

Nuestros resultados muestran que aquellas neuronas que exhiben un marcado contenido en fosfo-tau están rodeadas y en estrecho contacto con prolongaciones de células microgliales con morfología activada, especialmente en el modelo P301S, con una patología más intensa que ThyTau22. Es más, la presencia de fosfo-tau provocaba un aumento de la microglía tipo *rod* en el estrato radiado de CA1, especialmente en los animales P301S de edad más avanzada. En los últimos años este tipo morfológico microglial está cobrando importancia dado que aparece especialmente asociado a las regiones con patología de tau en situaciones de daño cerebral y en enfermedades neurodegenerativas (Holloway et al., 2019).

Numerosos mecanismos median las interacciones neurona-microglía, como las señales “cómeme” (“*eat-me” signal*) o las dependientes de fractalquina (Eyo et al., 2016; Vilalta and Brown, 2018). Una de las más conocidas es la secreción por parte de la neurona de moléculas de ATP/ADP. Durante la lesión neuronal, el ATP y los metabolitos relacionados son liberados hacia el espacio extracelular y se unen a receptores ionotrópicos (P2X) o metabotrópicos (P2Y), muchos de los cuales se encuentran en la superficie microglial (Inoue, 2008). En el cerebro sano,

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

la liberación de ATP neuronal regula la dinámica de las ramificaciones microgliales e induce una respuesta quimiotáctica rápida hacia el lugar de la lesión.

En este sentido, los estudios ultraestructurales mostrados en este trabajo revelaron que la microglía rod solía asociarse con las dendritas apicales en porciones con altas concentraciones de mitocondrias y estructuras relacionadas. En los somas neuronales estas agrupaciones de mitocondrias eran frecuentes en las regiones de contacto microglía-neurona, sugiriendo que una de las formas en las que la neurona se comunica con la microglía es a través de la función mitocondrial. De hecho, la mitocondria es un orgánulo productor de ATP, y ya se ha comentado que las células microgliales monitorizan y ejercen funciones de neuroprotección a través de uniones celulares en las que están implicados los receptores purinérgicos. En efecto, se ha descrito que en las zonas de contacto estos receptores se sitúan frente a dominios de membrana neuronales tras los que se agrupan conjuntos de mitocondrias y material celular diverso que interviene en la comunicación con la microglía vía ATP/ADP-receptor P2ry12 (Cserép et al., 2020). Frente a un daño, estos autores observaron que las células microgliales rodeaban los somas neuronales situados en la periferia de la lesión con el fin de protegerlas. Otros estudios, han descrito una respuesta similar ante la inducción de daño neurotóxico en las dendritas apicales de CA1, aumentando la microglía rod mientras duraba esta situación (Hasegawa et al., 2007). Ante una exposición continuada de daño neuronal, este perfil neuroprotector de la microglía rod puede tornarse en un fenotipo ameboide y citotóxico (Bohatschek et al., 2001). Por tanto, en el modelo P301S (y en menor medida en el ThyTau22) el aumento de contactos neurona-microglía podría estar mediado por una respuesta ante el daño mitocondrial provocado por fosfo-tau con el fin de proteger a las neuronas todavía viables de la apoptosis.

El receptor P2ry12 es altamente expresado por la microglía en condiciones fisiológicas, pero su expresión se reduce en modelos murinos de EA (Keren-Shaul et al., 2017, Krasemann et al., 2017), lo que indica que la respuesta microglial hacia la neurona puede estar comprometida en las patologías neurodegenerativas. Sin embargo, ni los resultados de expresión génica en el modelo P301S ni otros trabajos en que se observa microglía P2yr12-positiva en el entorno de los agregados de tau (Walker et al., 2020), parecen coincidir con este hecho, de forma que la respuesta microglial ante el péptido amiloide y tau es similar, pero con importantes diferencias.

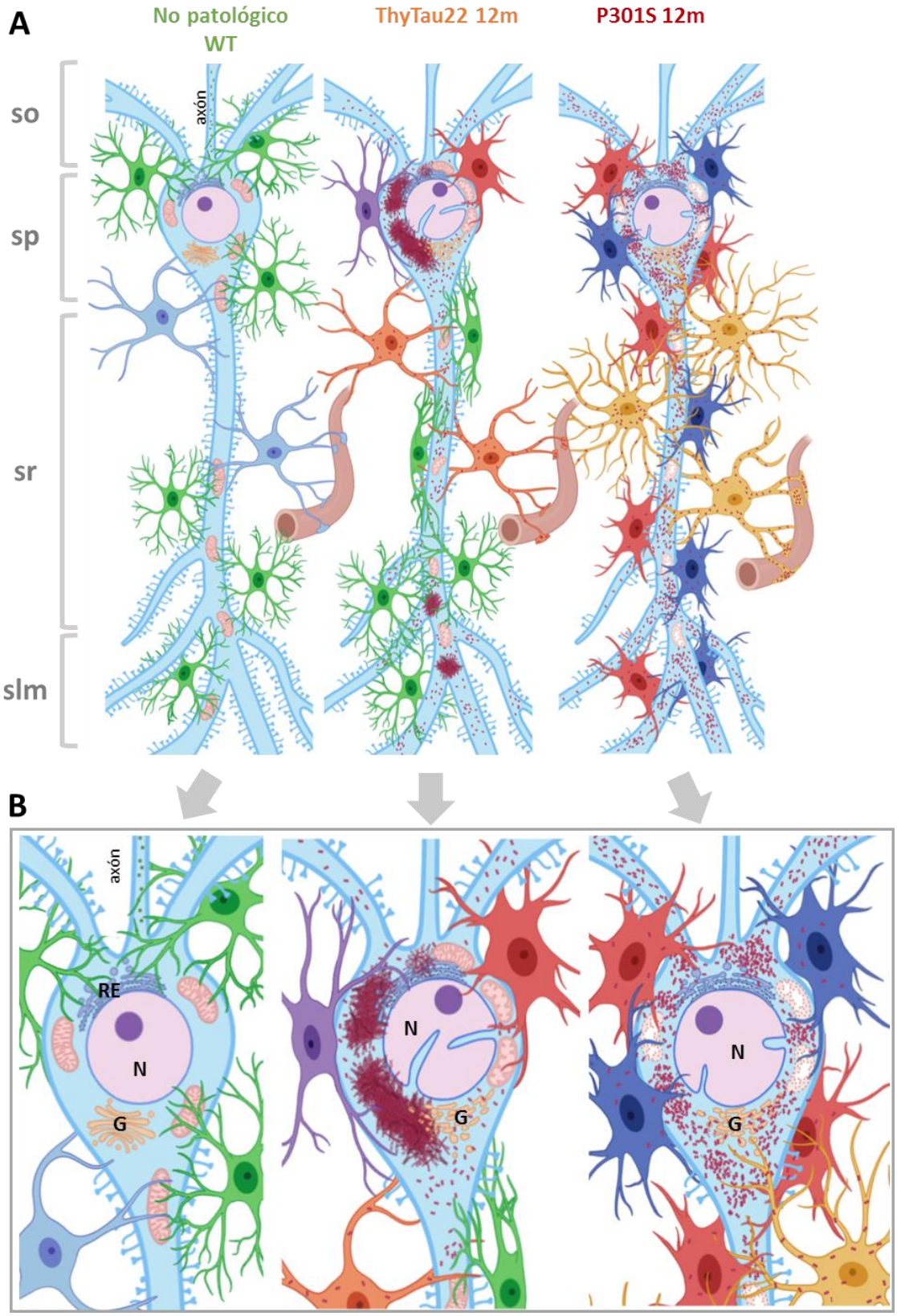
Por otro lado, otros autores han descrito recientemente que en el modelo P301S la patología de tau acaba por provocar la muerte de neuronas granulares del GD, mediada en este caso por la microglía e interviniendo ApoE4 en el proceso (Shi et al., 2019). En los modelos analizados en este trabajo hemos encontrado grupos de células en esta región hipocampal con citoplasma de electrodensidad muy baja, sin orgánulos y asociadas en su mayoría a células microgliales. Estas neuronas granulares contenían fosfo-tau y una elevada cantidad de mitocondrias muy dañadas. Se sabe que las neuronas afectadas por patología de tau pierden la

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

capacidad de distribuir correctamente las mitocondrias, concentrándose en el soma, donde empiezan a deteriorarse y a secretar al citoplasma grandes cantidades de ROS (Pérez et al., 2018). Tanto la liberación excesiva de ATP como el estrés neuronal (el cual provoca la exposición de señales "cómeme") induce a la microglía a activarse y adoptar un perfil fagocítico para eliminar el soma y otras estructuras dañadas como las sinapsis. También la presencia de proteína tau en el medio circundante promueve la pérdida de ácido siálico de las superficies membranales, lo que permite la fagocitosis de neuronas por parte de la microglía a través de opsoninas como Galectina-3 (Nomura et al., 2017; Allendorf et al., 2020). Este proceso explicaría la presencia de gran cantidad de microglía Gal3-positiva adosada a las capas neuronales en el modelo P301S, frente a su escasez en el modelo ThyTau22.

A modo de resumen, en la **Figura 4.1** se muestra un esquema que refleja las diferencias presentes en las neuronas hipocampales de los modelos ThyTau22 y P301S en lo que respecta a la patología/agregación de fosfo-tau, la respuesta microglial y astroglial, así como en las consecuencias a nivel subcelular (núcleo, mitocondrias y aparato de Golgi) y sináptico.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

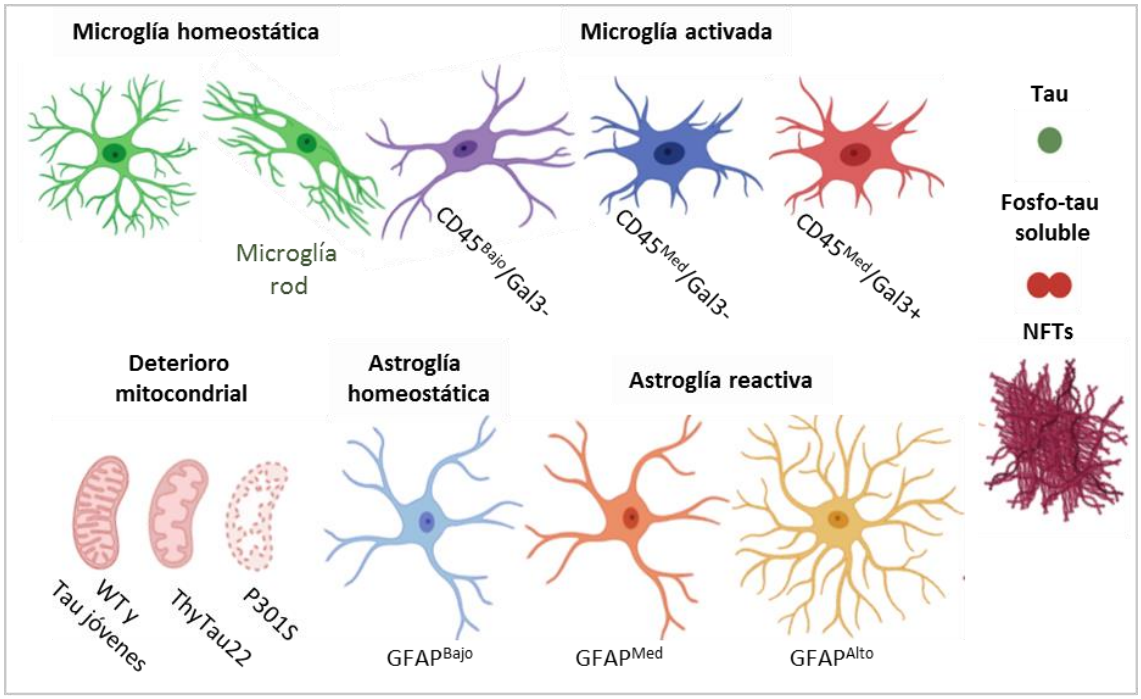


Figura 4.1. Patología tau, respuesta glial y alteraciones neuronales en los modelos ThyTau22 y P301S. (**A**) Comparativa de neuronas y glía de la región CA1 hipocampal entre animales WT, ThyTau22 y P301S. En (**B**) se muestra un detalle aumentado de la porción con los somas neuronales. En situación no patológica (WT, izquierda), la proteína tau se concentra en el compartimento axonal, y la microglía y astroglía exhiben un fenotipo homeostático. Sin embargo, en los modelos de taupatía se produce un aumento de las especies de **fosfo-tau** con mayor capacidad agregativa, que se translocan fundamentalmente al compartimento somatodendrítico, aunque también se acumulan en elementos sinápticos. En el modelo ThyTau22 (centro), fosfo-tau se acumula principalmente en el soma y las dendritas principales, y es capaz de agregarse hasta la conformación de tipo **NFTs,** desplazando y deteriorando orgánulos como el aparato de Golgi (G) o el núcleo (N, formándose los llamados "**rods nucleares**"), y en especial, las mitocondrias. La alta concentración de fosfo-tau somático provoca cierta activación microglial en torno a esta porción neuronal. El **daño mitocondrial** es una de las principales señales que estimula la aparición de **microglía tipo rod** en las dendritas apicales (estrato radiatum) con el fin de protegerlas de la toxicidad de fosfo-tau. En el modelo P301S (derecha), las neuronas acumulan mayor cantidad de fosfo-tau, pero sin llegar a desarrollar NFTs. El deterioro mitocondrial ocasionado por la acumulación de especies fosfo-tau es más severo que en el modelo ThyTau22. La mayor intensidad en la patología de tau y mitocondrial se ve acompañada por una fuerte **activación microglial** (CD45+), caracterizada por un fenotipo tipo **DAM**, y destacando una subpoblación positiva para galectina-3 **(Gal3+)**, uno de los ligandos de TREM2. La microglía activada interviene en la fagocitosis de fosfo-tau. Además, en ambos modelos se produce un aumento de la **reactividad astrocitaria**, aunque en mayor medida en los ratones P301S. Los astrocitos capturan fosfo-tau extracelular y lo concentran en los pies perivasculares en un aparente intento por drenarlo hacia el torrente sanguíneo. En conjunto, se produce una **importante pérdida sináptica y neuronal**, siendo la patología más severa en el modelo P301S. Por tanto, las diferentes mutaciones en el gen *MAPT* generan cepas de tau con distintos perfiles patológicos, lo que condiciona la respuesta neuroinflamatoria y el daño neuronal asociados. *slm: estrato lacunoso-molecular; so: estrato oriens; sp: estrato piramidal; sr: estrato radiado.*Imagen creada con Biorender.com

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

4.6. LA ESTABILIZACIÓN MICROTUBULAR PREVIENE LOS DÉFICITS COGNITIVOS Y DISMINUYE EL FENOTIPO PATOLÓGICO EN UN MODELO AMILOIDOGÉNICO APP/PS1

Muchas patologías neurodegenerativas, incluida la EA, tienen en común la disfunción de la red microtubular y los trastornos asociados en el transporte axonal (Matamoros and Baas, 2016; Brunden et al., 2017). En consecuencia, aquellas moléculas cuya principal diana sean los microtúbulos podrían ser consideradas como potenciales tratamientos para todas estas enfermedades (Varidaki et al., 2018). De hecho, en los últimos años han sido varios los ensayos clínicos iniciados con el fin de evaluar la eficacia de los estabilizadores de microtúbulos para el tratamiento de proteinopatías neurodegenerativas (Congdon and Sigurdsson, 2018). El hecho de que muchos de estos compuestos estén aprobados por la FDA, y sean típicamente usados en clínica como antitumorales, constituye una ventaja adicional. El efecto de algunos estabilizadores de microtúbulos sobre la patología tau ha sido testado a nivel preclínico en modelos de taupatías puras, dando como resultado una mejora en el transporte axonal y función locomotora (Zhang et al., 2005; Barten et al., 2012). No obstante, hasta el momento el impacto de estos estabilizadores sobre la patología amiloide no había sido evaluado *in vivo*.

Hasta donde alcanza nuestro conocimiento, este bloque de la presente Tesis Doctoral constituye el primer estudio preclínico que evalúa el efecto de un estabilizador microtubular con capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica, la epotilona D (EpoD), en un modelo transgénico amiloidogénico de la EA. En este trabajo hemos demostrado por primera vez que la administración temprana de EpoD previene el deterioro cognitivo y del avance de la patología de Aβ y tau en el modelo murino APP/PS1.

A nivel clínico, la EA se caracteriza por un deterioro progresivo de las funciones cognitivas y conductuales, hasta llegar a un estado de demencia. Por tanto, es de suma importancia desarrollar modelos animales que reproduzcan este declive cognitivo, así como tests equivalentes a los usados con pacientes que permitan su detección y evaluación (Webster et al., 2014). En estudios previos, nuestro grupo ha descrito déficits cognitivos en este modelo animal, tanto en la memoria espacial como en la de reconocimiento, entre los 6 y 9 meses de edad (Sanchez-Varo, 2011 Tesis Doctoral; Trujillo-Estrada et al., 2013). En este trabajo hemos confirmado que desde los 6 meses de edad estos animales presentan déficits en distintos tipos de memoria (reconocimiento, espacial, memoria a corto y largo plazo). Dado que estas funciones cognitivas (o sus equivalentes) se encuentran afectadas en la EA, este modelo APP/PS1 constituye una valiosa herramienta para el ensayo de nuevos tratamientos capaces de, al menos, detener el avance del deterioro cognitivo de los pacientes.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

En este trabajo hemos demostrado que la administración intraperitoneal semanal del estabilizador de microtúbulos EpoD, en fases iniciales de la patología (3 a 6 meses), previene o reduce la afectación de distintos tipos de memoria dependientes de la función hipocampal en el modelo APP/PS1. En concreto, el tratamiento ha protegido la memoria de reconocimiento, y ha limitado el declive del aprendizaje (fase de aprendizaje del MWM) y memoria espaciales (fase de retención del MWM), así como de la memoria a largo plazo (laberinto en Y específico de contexto). Además, ni la EpoD ni la solución vehículo provocaron efectos secundarios que alterasen la capacidad locomotora ni exploratoria en los animales tratados, por lo que estos datos demuestran a nivel preclínico que el uso de estabilizadores de microtúbulos, como la EpoD o derivados, podrían representar una intervención terapéutica exitosa y segura. Estos resultados están en consonancia con los descritos en otros modelos de taupatía pura, en los cuales la administración periférica de EpoD produjo una recuperación cognitiva significativa (Brunden et al., 2010; Barten et al., 2012; Zhang et al., 2012).

Los microtúbulos son estructuras esenciales para la correcta función y supervivencia neuronal, dada la extrema polarización de estas células (Guedes-Dias and Holzbaur, 2019; Kelliher et al., 2019). Las tubulinas se ven sometidas a determinadas modificaciones postraduccionales que están involucradas en la regulación dinámica de los microtúbulos, y que por tanto codifican información sobre la funcionalidad de estos elementos del citoesqueleto (Janke and Kneussel, 2010; Song and Brady, 2015). Los microtúbulos más estables, los considerados “de larga vida”, suelen encontrarse enriquecidos en tubulinas acetiladas (AcTub), como un mecanismo de protección contra el envejecimiento mecánico (Schulze et al., 1987; Portran et al., 2017). De hecho, en los cerebros de pacientes de EA, se ha identificado una reducción de los niveles de AcTub (Hempen and Brion, 1996) lo que correlaciona con la capacidad del péptido Aβ de incrementar la inestabilidad de la red microtubular (Tsushima et al., 2015). En consonancia con estas observaciones, la presencia de AcTub en el hipocampo del modelo APP/PS1 fue baja, lo cual indica que la estabilidad de los microtúbulos en esta región cerebral se encuentra comprometida, hecho que podría estar contribuyendo a la patología de este modelo. El tratamiento con EpoD dio lugar a un enriquecimiento en AcTub en el hipocampo de estos animales, siendo un indicador del incremento de la cantidad de microtúbulos estables. Este dato se encuentra apoyado por los resultados descritos anteriormente sobre ensayos preclínicos en modelos murinos de taupatía y Parkinson tratados con este compuesto (Brunden et al., 2010; Zhang et al., 2012; Cartelli et al., 2013). Por tanto, la estabilización microtubular redunda en el transporte axonal, dando lugar a una reducción de la patología EA y sus manifestaciones clínicas.

Está bien establecido que los oligómeros solubles de Aβ producen daño sináptico, siendo este uno de los factores que mejor correlaciona con el daño cognitivo en las primeras

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

etapas de la enfermedad (Walsh and Selkoe, 2004; Arendt, 2009). Las alteraciones sinápticas presentes en el hipocampo del modelo APP/PS1 desde edades tempranas han sido previamente descritas por nuestro grupo (este trabajo y véase Sanchez-Varo, 2011 Tesis Doctoral; Sanchez-Varo et al., 2012). La protección cognitiva observada en los animales tratados parece ser consecuencia de la preservación de la integridad sináptica a través de la estabilización microtubular, bien de modo directo a través de la mejora del tráfico intracelular de proteínas, o bien indirectamente mediante la reducción de la producción y acumulación de Aβ. La EpoD parece intervenir tanto a nivel presináptico como postsináptico, como demuestra la preservación parcial de los niveles de sinaptofisina y PSD95 en el hipocampo de los APP/PS1 tratados. Dicho efecto, podría deberse probablemente a la mejora en el tráfico dependiente de la red microtubular tanto en los compartimentos dendríticos como axonales. En este sentido, se ha descrito que la EpoD consigue revertir la pérdida de espinas sinápticas inducida por Aβ en cultivos organotípicos de hipocampo procedente de animales transgénicos APP (Penazzi et al., 2016). Además, el incremento de la densidad postsináptica en la región CA3 en un modelo de taupatía tras la administración de EpoD apoya nuestra hipótesis (Zhang et al., 2012). Por otro lado, estudios realizados con otras epotilonas (EpoB) han demostrado que su administración durante la eliminación fisiológica de sinapsis en uniones neuromusculares es suficiente para evitar el desmantelamiento de los microtúbulos de los axones implicados (Brill et al., 2016), revelando así la importancia de los microtúbulos en el mantenimiento de las sinapsis.

Una de las principales consecuencias de los fallos en el transporte a lo largo de las prolongaciones neuronales es la formación de neuritas distróficas, que constituyen una marca histopatológica típica de la EA. Previamente, nuestro grupo ha demostrado que la mayoría de neuritas distróficas en el modelo APP/PS1 corresponden a axones y terminales presinápticos aberrantes (Sanchez-Varo et al., 2012; Trujillo-Estrada et al., 2014; Gomez-Arboledas et al., 2018), caracterizados por defectos en el citoesqueleto (Torres et al., 2012) la acumulación de proteínas, material vesicular y péptidos de Aβ (Sanchez-Varo et al., 2012; Torres et al., 2012; Trujillo-Estrada et al., 2014). Tras el tratamiento con EpoD, el número de neuritas distróficas, la acumulación de proteínas ubiquitinadas y el contenido de Aβ presináptico se vieron reducidos. Por tanto, la restauración de la integridad microtubular, junto con la reducción de fosfo-tau, probablemente hayan redundado en una mejora del flujo axoplásmico y el estado sináptico. Muy probablemente, la mejora en la memoria/conducta de los animales tras el tratamiento con EpoD puede ser achacada a la recuperación sináptica vinculada a la reducción de la patología axonal.

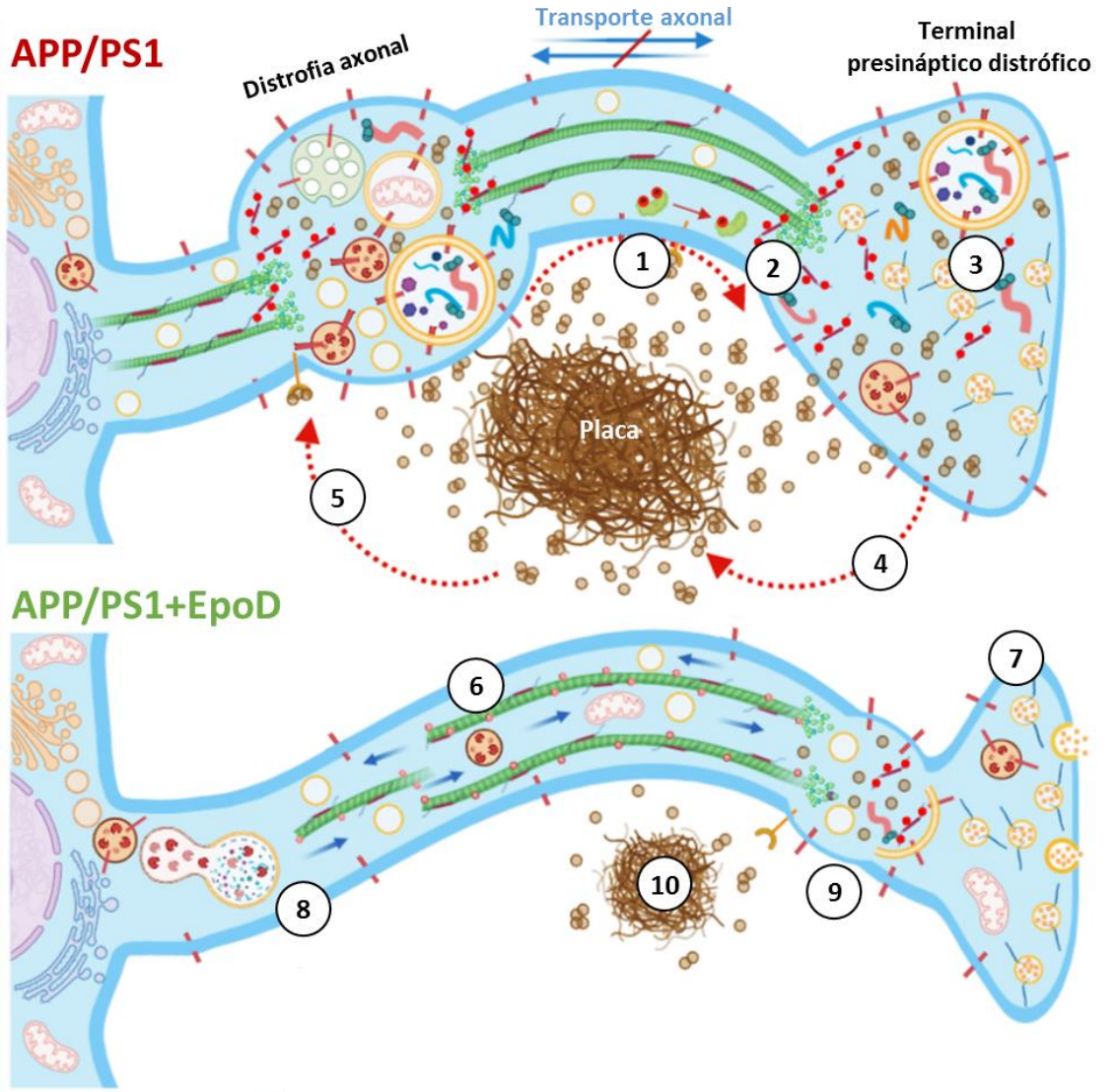
La estrecha relación espacio-temporal entre las neuritas distróficas y las placas amiloides (Meyer-Luehmann et al., 2008) indica que existe una directa conexión entre ambos eventos patológicos. De hecho, el péptido Aβ puede alterar los microtúbulos (Zempel et al. 2010,

UNIVERSIDAD DE MALAGA

2013; Tsushima et al., 2015), promoviendo así la formación de distrofias, las cuales a su vez pueden funcionar como fuentes de producción de Aβ (Sanchez-Varo et al., 2012; Torres et al., 2012; Sadleir et al., 2016), dando lugar a un círculo vicioso. En este trabajo hemos observado que el hipocampo de los ratones tratados con EpoD muestra una reducción significativa del contenido en Aβ, tanto intracelular como extracelular, y se ha descartado *in vitro* que dicho efecto se debiera a una acción directa de este compuesto sobre las actividades enzimáticas de BACE-1 o γ-secretasa. Del mismo modo, el tratamiento con EpoD aplicado un modelo de EA *in vitro* (células N2a-APP) fue eficaz a la hora de reducir sus niveles de Aβ. Además, el tratamiento produjo una reducción del tamaño de los depósitos amiloides extracelulares *in vivo*. En parte, la reducción del área distrófica en el hipocampo de estos animales parece estar asociada a la reducción de la densidad de placas de mayor calibre. Teniendo esto en cuenta, una posibilidad es que la estabilización microtubular permita la degradación de Aβ en los compartimentos lisosomales al mejorar el flujo autofágico (y por tanto la fusión de los autofagosomas con los lisosomas). Además, ante la ausencia de alteraciones en los niveles de C99, es posible que la colocalización a nivel subcelular, y por ende, el procesamiento proteolítico de C99 por γ-secretasa se vea indirectamente reducido. Ambas circunstancias concuerdan con la drástica disminución en el contenido de Aβ en las fracciones sinaptosomales tras el tratamiento con EpoD. Por otro lado, la disminución de la patología tau también podría explicarse por este descenso en los niveles de Aβ y especialmente de las formas solubles oligoméricas. Es sabido que el Aβ (sobre todo en estado oligomérico) es capaz de interaccionar y activar receptores de tipo glutamatérgico como los NMDA (revisado en Liu et al., 2019), generándose flujos de calcio hacia el interior celular que, entre otras cosas, pueden activar quinasas de tau e inducir procesos de sinaptotoxicidad y neurotoxicidad (Renner et al., 2010; Rammes et al., 2017). Como vemos, una reducción en los niveles de Aβ y en especial de las formas solubles oligoméricas, supone una menor fosforilación de la proteína tau, que no se desacoplaría de los microtúbulos y contribuiría así a la estabilización de la red, entre otras funciones fisiológicas.

En la **Figura 4.2.**, se muestra un resumen del efecto que tiene el tratamiento con EpoD sobre el transporte axonal y la patología axonal-sináptica, propia del modelo APP/PS1 a los 6 meses de edad. EpoD estabilizaría la red microtubular, lo que permitiría una mejora en el transporte axonal entre el soma y los terminales sinápticos, reduciéndose así la cantidad de distrofias y propiciando un mejor funcionamiento del sistema autofágico-lisosomal, el cual permitiría la correcta eliminación de proteínas y agregados como los agregados de Aβ, contribuyendo así a la disminución de la patología amiloide y de tau. Esto demuestra la existencia de un punto de conexión entre las patologías amiloide y de tau.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Figura 4.2. Esquema que ilustra el efecto del tratamiento con EpoD sobre la patología axonal/ presináptica y la patología amiloide en el modelo APP/PS1. EpoD estabiliza la red microtubular y mejora el transporte axonal, produciendo una disminución de la patología neurítica y sináptica junto con un fuerte descenso de la patología amiloide. En los animales APP/PS1, el péptido Aβ es generado dentro de las neuronas que expresan el transgen APP humano mutado, y es liberado al parénquima cerebral, donde una vez alcanzado cierto umbral de agregación, se deposita en forma de placas amiloides extracelulares. (**1**) Las especies solubles de Aβ oligomérico producen, a través de su unión a receptores de membrana, la activación de quinasas que fosforilan a la proteína tau. (**2**) Tau en su forma hiperfosforilada (fosfo-tau) se desacopla de los microtúbulos (MT). La desestabilización de la red microtubular por la pérdida de función de tau produce fallos en el transporte axonal que interfieren en el tráfico proteico y de orgánulos entre el soma y los elementos presinápticos. Así, en estos puntos se van acumulando proteínas (algunas ubiquitinadas, incluyendo fosfo-tau) y elementos subcelulares, especialmente vesículas de la vía autofágica/lisosomal. En consecuencia, el neuropilo se torna aberrante generándose neuritas distróficas (axones y elementos presinápticos) (**3**). La elevada concentración de APP en los orgánulos acumulados en las distrofias redunda en un aumento de la producción de Aβ, que continuaría agregándose y provocando un aumento del tamaño de los depósitos extracelulares (**4**). Las formas oligoméricas retroalimentan la desestabilización microtubular, y por tanto, la acumulación/procesamiento de APP para generar más Aβ (**5**), estableciéndose un círculo vicioso. (**6**) El tratamiento con EpoD contribuye a la estabilidad microtubular y restablece el tráfico axonal entre el soma y los terminales sinápticos, manteniendo su funcionalidad (**7**). Además, al mejorar el flujo autofágico (**8**) se reduce la cantidad de material vesicular acumulado, y aumenta la capacidad para eliminar los agregados de Aβ. En consecuencia, la patología axonal/presináptica se ve significativamente reducida (**9**), así como la producción de Aβ, disminuyendo sus niveles tanto intracelulares como extracelulares, y dando lugar a una reducción del tamaño de las placas (**10**). Por tanto, EpoD tiene un efecto protector y contribuye a evitar la pérdida cognitiva y la muerte neuronal en este modelo amiloidogénico. Imagen creada con BioRender.com

Un hallazgo relevante en este estudio ha sido el efecto neuroprotector de la EpoD sobre una subpoblación de interneuronas GABAérgicas, altamente vulnerable en la EA, que expresa somatostatina (SOM). Esta población de interneuronas GABAérgicas se encuentra muy dañada en el hipocampo y otras regiones cerebrales del ratón APP/PS1 desde edades tempranas, y su pérdida se ha asociado estrechamente con la carga de Aβ (Ramos et al., 2006; Moreno-Gonzalez et al., 2009; Trujillo-Estrada et al., 2013, 2014; Sanchez-Mejias et al., 2019). A este respecto, es importante mencionar que en este modelo de EA únicamente las neuronas principales pueden expresar el transgén humano mutado para APP (Ramos et al., 2006; Sanchez-Varo et al., 2012; Sanchez-Mejias et al., 2019). Por lo tanto, la patología de las células SOM debe ser consecuencia del efecto deletéreo del Aβ extracelular. En este sentido es destacable que esta población de interneuronas hipocampales presenta una alta proporción de receptores de tipo NMDA (por los que el Aβ tiene una alta afinidad) en comparación con las neuronas principales (Nyíri et al., 2003; Szabadits et al., 2011), lo que explicaría en parte su alta vulnerabilidad en la EA. La reducción de los niveles de Aβ (monoméricos y oligoméricos) y del tamaño de las placas, junto con la disminución de la acumulación proteica y protección sináptica al reducirse las distrofias SOM-positivas, son indicativos de la protección de esta población. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que demuestra que el tratamiento con EpoD previene la pérdida neuronal en un

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

modelo *in vivo* de amiloidosis. La protección de células SOM-positivas mediada por EpoD explicaría, al menos parcialmente, la recuperación cognitiva en los ratones tratados.

La disfunción GABAérgica se ha postulado como un importante contribuyente al deterioro cognitivo manifestado por los pacientes de EA (Palop and Mucke, 2016). La pérdida de neuronas SOM es un evento patogénico bien establecido en los cerebros con EA (Kumar, 2005; Burgos-Ramos et al., 2008; Epelbaum et al., 2009; Sanchez-Mejias et al., 2019b). Considerando que la SOM participa en procesos de memoria y plasticidad sináptica (Kim et al., 2016; Liguz-Lecznar et al., 2016; Yavorska and Wehr, 2016; Abbas et al., 2018), la pérdida de estas interneuronas parece contribuir a los déficits cognitivos asociados a la EA. Además, la protección de la población SOM también puede representar un papel activo en el descenso en la patología amiloidea en los animales tratados con EpoD. Se sabe que la SOM regula los niveles de la enzima neprilisina (enzima que escinde el péptido Aβ) (Saito et al., 2005), interfiere en la fibrilación del Aβ (Solarski et al., 2018) y regula las alteraciones inducidas por el péptido sobre la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Paik et al., 2019). Por tanto, la pérdida de neuronas GABAérgicas juega un papel esencial en la patogénesis de la EA.

Por último, aunque el tratamiento con EpoD haya influido notablemente sobre diversos aspectos patológicos en los ratones APP/PS1, no ha llegado a generar cambios significativos en el proceso neuroinflamatorio hipocampal, como demuestran los datos de la carga microglial en esta región. Dada la naturaleza bifásica de la respuesta inflamatoria descrita en este modelo (Jimenez et al., 2008), una posible explicación es la ventana temporal en la que los animales APP/PS1 han sido tratados, encontrándose a esta temprana edad en las fases iniciales de la patología, donde la activación microglial estaría realizando un papel neuroprotector. Por tanto, sería necesario realizar un tratamiento de mayor duración o en estadios avanzados de la patología para determinar si la EpoD sería capaz de modular la respuesta inmune cerebral asociada a la EA.

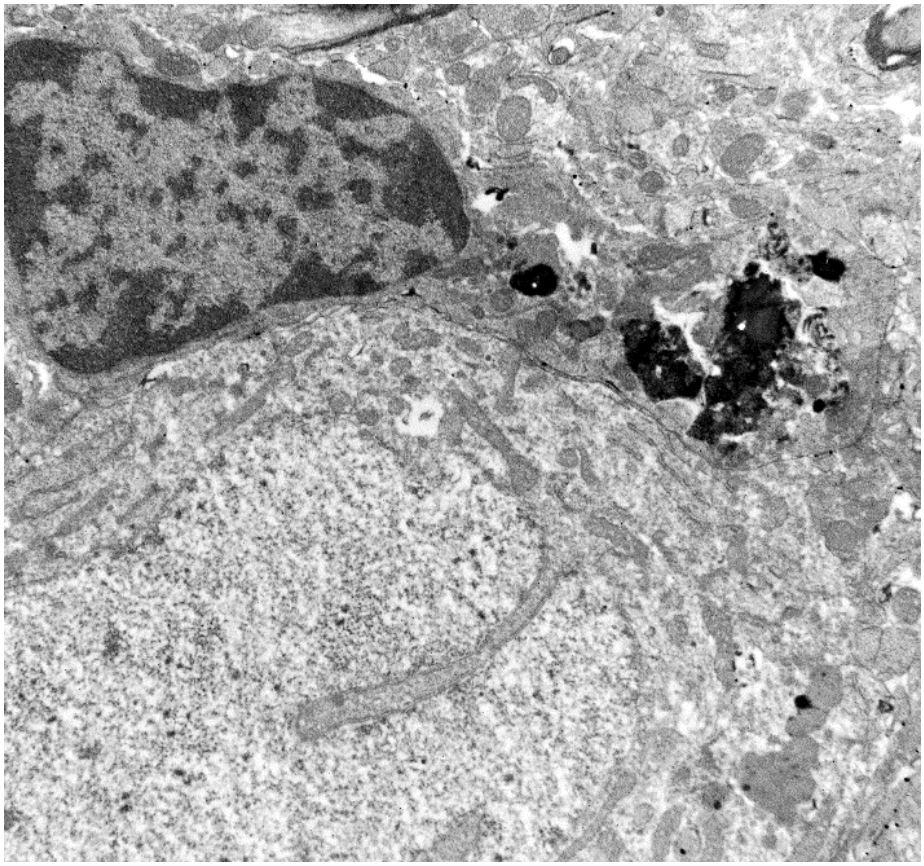
En resumen, este trabajo demuestra que la estabilización microtubular, y/o los efectos indirectos inducidos por el tratamiento con EpoD, promueven la preservación de la memoria, la recuperación sináptica/neurítica y la protección neuronal. Es de destacar que el tratamiento con EpoD redujo, no solo la patología de tau, sino también la acumulación presináptica y extracelular del péptido Aβ, incluyendo las especies oligoméricas con alta capacidad sinaptotóxica. Estos datos sostienen la teoría de que las distrofias son elementos productores de péptido Aβ, e indican que la patología neurítica tiene un papel relevante como punto de interconexión entre las dos proteinopatías de la EA. Por todo lo expuesto, los estabilizadores microtubulares deben considerarse buenos candidatos terapéuticos para modificar la progresión de la EA, ya que se dirigen tanto a la patología de Aβ como la de tau.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

5. CONCLUSIONES



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. La patología tau en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S muestra un patrón de progresión, desarrollo e intensidad dependiente de genotipo, dando lugar a la formación de diferentes agregados o cepas de fosfo-tau en cada modelo transgénico. La acumulación de estos agregados patológicos parece estar asociada a fallos en los sistemas de degradación proteica intraneuronal. Descifrar la naturaleza molecular de las especies tóxicas de tau y potenciar su eliminación podría contribuir al desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas para la enfermedad de Alzheimer y otras taupatías.

2. Estas diferencias en la patología tau podrían explicar las distintas respuestas microgliales que desarrollan estos dos modelos de taupatía. En el modelo P301S, fosfo-tau dispara una fuerte respuesta microglial con un perfil DAM, similar a la descrita en modelos amiloidogénicos. Sin embargo, el modelo ThyTau22 solo muestra una leve activación microglial que además presenta rasgos degenerativos en las fases avanzadas de la patología, al igual que ocurre en pacientes de Alzheimer. Por lo tanto, no todos los modelos transgénicos de tau reproducen la patología microglial que tiene lugar en el hipocampo de los pacientes, hecho que hay que tener en consideración a la hora de evaluar potenciales terapias.

3. Al igual que lo descrito para la respuesta microglial, fosfo-tau provoca diferentes respuestas astrogliales en el hipocampo de los modelos ThyTau22 y P301S. La fuerte reactividad de los astrocitos en el modelo P301S se ve precedida por la activación microglial, pudiendo ser ésta la desencadenante de la respuesta astroglial. Los astrocitos reactivos, del mismo modo que la microglía activada, se relacionan estrechamente con las neuronas que contienen fosfo-tau e internalizan tau patológico. Estas células gliales podrían intervenir en la propagación de la patología tau y/o en la eliminación de estos agregados, y por tanto, se postulan como interesantes dianas terapéuticas.

4. La progresión e intensidad de la patología tau coinciden espaciotemporalmente con la pérdida sináptica y neuronal en los modelos ThyTau22 y P301S. A nivel subcelular, la acumulación intraneuronal de fosfo-tau produce alteraciones morfológicas en orgánulos esenciales como el núcleo y las mitocondrias. La patología mitocondrial es muy severa en el modelo P301S siendo, por tanto, dependiente del estado de agregación de las especies de fosfo-tau. La disfunción mitocondrial mediada por las especies tóxicas de tau afectaría a la función neuronal y sináptica, por lo que determinar el vínculo entre fosfo tau y el deterioro mitocondrial podría ser un objetivo terapéutico.

5. La estabilización microtubular, mediada por el tratamiento con Epotilona D, en el modelo amiloidogénico APP/PS1 reduce la patología sináptica/axonal y la pérdida neuronal en el hipocampo resultando en una protección de la función cognitiva. La preservación del citoesqueleto y, posiblemente la mejora del transporte axonal, no solo reduce los niveles de fosfo-tau sino que también disminuye significativamente la patología amiloide. Por tanto, los agentes estabilizadores de microtúbulos deben ser considerados como potenciales candidatos para modular el curso de la enfermedad de Alzheimer al actuar conjuntamente sobre ambas dianas, Aβ y tau.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

1. Tau pathology in the hippocampus of the ThyTau22 and P301S models shows a genotype-dependent pattern of progression, development and intensity, leading to the formation of different aggregates or strains of phospho-tau in each model. The accumulation of these pathological aggregates seems to be associated with intraneuronal protein degradation system impairment. Deciphering the molecular nature of the toxic tau species and enhancing their elimination could contribute to the development of new therapeutic approaches for Alzheimer's disease and other tauopathies.

2. These differences in tau pathology could explain the different microglial responses triggered in both tauopathy models. In the P301S model, phospho-tau induces a strong microglial response with a DAM profile, similar to that described in amyloidogenic models. However, the ThyTau22 model only shows a slight microglial activation that shows a degenerative profile at the advanced stages of the pathology, just as it occurs in Alzheimer's patients. Therefore, not all tau transgenic models reproduce the microglial pathology that occurs in the hippocampus of patients, a fact that must be taken into account when evaluating potential therapies.

3. As for the microglial response, phospho-tau elicits different astroglial responses in the hippocampus of the ThyTau22 and P301S models. The strong astrocyte reactivity in the P301S model is preceded by microglial activation, and this may be the trigger for the astroglial response. Reactive astrocytes, like activated microglia, are closely related to neurons that contain phospho-tau and internalize pathological tau. These glial cells could participate in the propagation of tau pathology and/or in the elimination of these aggregates, and therefore they are postulated as interesting therapeutic targets.

4. The progression and intensity of tau pathology coincide spatially and temporally with synaptic and neuronal loss in the ThyTau22 and P301S models. At the subcellular level, the intraneuronal accumulation of phospho-tau produces morphological alterations in essential organelles such as the nucleus and the mitochondria. Mitochondrial pathology is very severe in P301S model being, therefore, dependent of the aggregation state of phospho-tau species. Mitochondrial dysfunction mediated by toxic tau species would affect neuronal and synaptic function, so determining the link between phospho-tau and mitochondrial impairment could be a therapeutic objective.

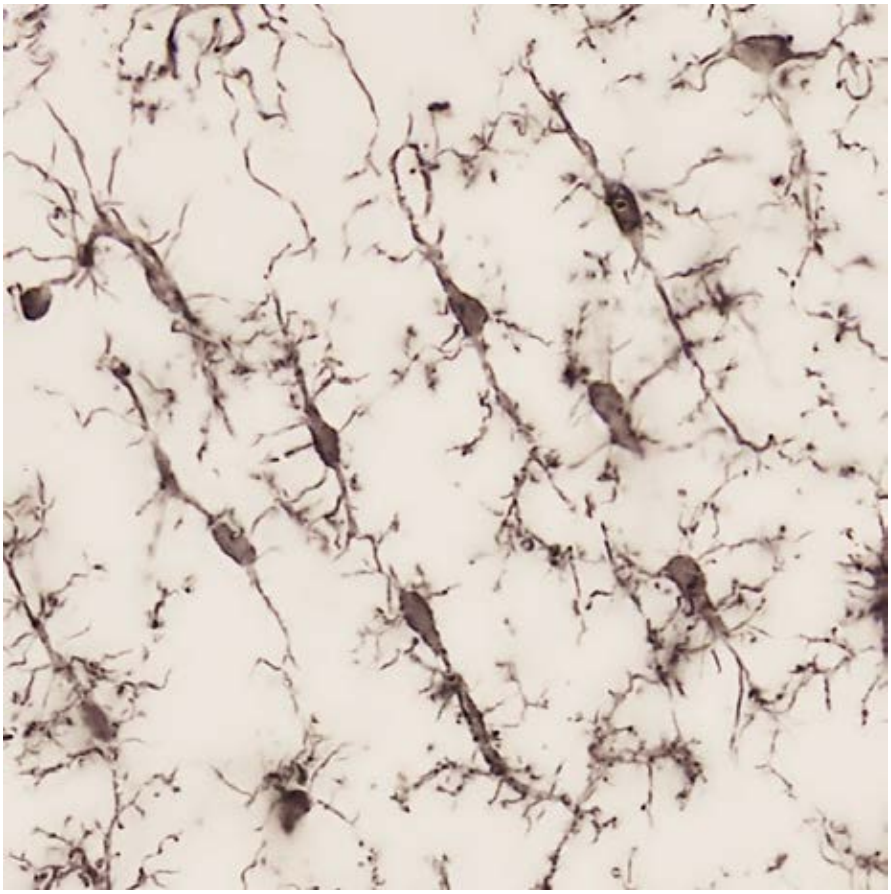
5. Microtubular stabilization, mediated by Epothilone D treatment, in the amyloidogenic APP/PS1 model reduces synaptic/axonal pathology and neuronal loss in the hippocampus, resulting in cognitive function protection. The preservation of the cytoskeleton and, possibly, the improvement of axonal transport, not only reduce phospho-tau levels, but also significantly reduce amyloid pathology. Therefore, microtubule stabilizing agents should be considered as potential candidates to modulate the course of Alzheimer's disease by acting together on both targets, Aβ and tau.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

6. SUMMARY



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

PhD Thesis - 2020

CONTRIBUTION OF TAU PATHOLOGY TO NEUROINFLAMMATION AND THE DEGENERATIVE PROCESS IN ALZHEIMER'S DISEASE: AN ANALYSIS IN TRANSGENIC ANIMAL MODELS

Author (PhD Student):

Juan José Fernández Valenzuela

Bachelor in Biology

MS in Cellular and Molecular Biology

PhD Supervisors:

Dr. Antonia Gutiérrez Pérez. Full Professor of Cell Biology at University of Malaga

Dr. Raquel Sánchez Varo. Postdoctoral Researcher at University of Malaga

Laboratory Address:

Department of Cell Biology, Genetics and Physiology (Cell Biology Area). Faculty of Sciences. University of Malaga. Campus Teatinos, 29071. Malaga, Spain

Contact Information:

Juan José Fernández Valenzuela. Email: juanjofv@uma.es. Phone: +34 952131935

Dr. Antonia Gutiérrez. Email: agutierrez@uma.es. Phone: +34 952133344

Dr. Raquel Sánchez. Email: raquelsv@uma.es. Phone: +34 952131935

Grants Support:

This PhD work was supported by grants PI12/01431, PI15/00796 and PI18/01557 from Instituto Salud Carlos III co-financed with FEDER funds from European Union, by the cooperative grant PI2017/2 from CIBERNED, by PAIDI group CTS-950 from Junta de Andalucía, and by CIBERNED from Instituto Salud Carlos III, Spain. Juan José Fernández-Valenzuela was sponsored by a FPU fellowship from Ministry of Education, Culture and Sports (2015-2019) and Contrato Puente from University of Malaga (2020).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Publications in peer-reviewed journals:

Fernandez-Valenzuela JJ, Sanchez-Varo R, Muñoz-Castro C, De Castro V, Sanchez-Mejias E, Navarro V, Jimenez S, Nuñez-Diaz C, Gomez-Arboledas A, Moreno-Gonzalez I, Vizuete M, Davila JC, Vitorica J, Gutierrez A. *Enhancing microtubule-stabilization rescue cognitive déficits and ameliorates pathological phenotype in an amyloidogenic Alzheimer's disease model*. ***Scientific Reports*** 2020. *10: 1–17*. doi: 10.1038/s41598-020-71767-4. Impact factor: 4.12

Sanchez-Mejias E, Nuñez-Diaz C, Sanchez-Varo R, Gomez-Arboledas A, Garcia-Leon JA, Fernandez-Valenzuela JJ, Mejias-Ortega M, Trujillo-Estrada L, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Davila JC, Vitorica J, Gutierrez A. *Distinct disease-sensitive GABAergic neurons in the perirhinal cortex of Alzheimer's mice and patients.* **Brain Pathology** 2020, 30(2):345-363.doi: 10.1111/bpa.12785. Impact factor: 6.15

Romero-Molina C, Navarro V, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Fernandez-Valenzuela JJ, Sanchez-Mico MV, Muñoz-Castro C, Gutierrez A, Vitorica J, Vizuete M. *Distinct microglial responses in two transgenic murine models of TAU pathology.* **Frontiers in Cellular Neuroscience** 2018, 12(421):1-12. doi: 10.3389/fncel.2018.00421. Impact factor: 3.9

Gomez-Arboledas A, Davila JC, Sanchez-Mejias E, Navarro V, Nuñez-Diaz C, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mico MV, Trujillo-Estrada L, Fernandez-Valenzuela JJ, Vizuete M, Comella JX, Galea E, Vitorica J, Gutierrez A. *Phagocytic clearance of presynaptic dystrophies by reactive astrocytes in Alzheimer's disease.* **Glia** 2018, 66(3):637-653. doi: 10.1002/glia.23270. Impact factor: 5.83

Book Chapter

Fernandez-Valenzuela JJ, Sanchez-Varo R y Gutierrez A. *Descifrando la contribución patogénica de Abeta y TAU en modelos transgénicos de la enfermedad de Alzheimer*. Metabolic Reprogramming as a Target for Cancer and other Diseases. 2018 pp 221-234. UMA Editorial. ISBN 978-84-17449-55-1.

In addition, this thesis contains unpublished data.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

6.1. ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most prevalent form of dementia worldwide, and the number of patients is progressively rising owing to population ageing. Unfortunately, there is no cure so far for this devastating neurodegenerative tauopathy. AD brains display two main histopathological hallmarks, the accumulation of amyloid-beta peptide (Aβ) and hyperphosphorylated tau (phospho-tau) in the form of extracellular amyloid plaques and intraneuronal neurofibrillary tangles (NFTs), respectively. The build-up of these misfolded proteins is accompanied by a sustained neuroinflammation, with the involvement of glial cells. Given that many genes related to the risk of developing sporadic AD are expressed by microglia, these cells seem to be a key factor in the pathogenesis of this disease and, thereby, have become a major research target. A number of evidence suggest that activated microglia may display both neuroprotective and neurotoxic functions, switching from one phenotype to the other during disease progression. It has been reported that in response to Aβ, periplaque activated microglia display a specific transcriptional profile, named disease-associated microglia (DAM). DAM microglia could have protective functions, such as Aβ phagocytosis and plaque compaction. However, they can also produce proinflammatory molecules, giving rise to synaptic loss and neuronal loss. Nevertheless, the function of activated microglia and astroglia in the progression of tau pathology has received quite less attention and remains unclear. Importantly, our group has recently reported a microglial degenerative process in parallel with the pathological progression in the hippocampus of AD patients and the ThyTau22 model. It is unknown if similar inflammatory or gliodegenerative processes take place in other tau models that may contain different phospho-tau species. For this reason, deciphering the molecular nature of distinct toxic tau strains might be a relevant therapeutic approach, not only for AD, but also for other primary tauopathies.

According to the amyloid cascade hypothesis, the accumulation of Aβ is the causative pathological factor of AD, leading to a sequence of events conducting to the appearance of phospho-tau. However, given that these proteinopathies do not initiate or progress simultaneously (neither spatial nor temporarily) in AD brains, there is still several pending questions about the relationship between them. A relevant point is that the search of therapies had been centered on amyloid pathology until recently with a lack of success in clinical trials. Moreover, there is no major correlation between amyloid pathology and cognitive decline, with even some cases bearing substantial amount of plaques but no cognitive failure. Thus, it is not surprising the growing interest in tau (either its gain-of-toxicity or loss-of-function) as a potential pharmacological target. Therefore, microtubule stabilizers have become attractive therapeutic candidates for AD and other neurodegenerative tauopathies.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

The main objective of this PhD Thesis is to analyze at the cellular, subcellular and molecular level, the progression of tau pathology along with the morphological and functional phenotypes induced by phospho-tau over glial cells (microglia and astroglia), and the effect on synaptic and neuron viability in the hippocampus of two tau transgenic models (P301S and ThyTau22). We have also studied the effect of the treatment with a microtubule stabilizer compound (epothilone D) over an amyloidogenic model of AD to ascertain, at some point, the interaction between Aβ and tau pathologies in this neurodegenerative condition.

Our results have evidenced a clear distinction between the properties of P301S and ThyTau22 phospho-tau species, which gave rise to different kind of aggregates. ThyTau22 neurons exhibited NFTs, which may serve as a protective containment strategy. However, P301S mice displayed no tangles, but high levels of other phospho-tau aggregates instead. These differences may trigger distinct molecular mechanisms concerning the neuroinflammatory response and neuronal damage. In this regard, we found that P301S microglia acquired a DAM phenotype, and astroglia was also activated. Both glial cells participated in the phagocytosis of soluble phospho-tau species. Conversely, ThyTau22 microglial cells showed scarce reactivity, with a degenerative profile, resembling what has been reported in AD samples. In addition, phospho-tau containing neurons exhibited important subcellular alterations, mainly at mitochondrial level. This deleterious effect was more prominent in P301S hippocampus. Finally, the microtubule stabilization in an amyloidogenic mouse model of AD was able to protect synaptic and cognitive functions, ameliorating dystrophic pathology and neuronal loss, by reducing phospho-tau and, more interesting, Aβ accumulation. The preservation of the cytoskeleton, maybe mediated by the restoration of axonal flow, was able to modify both tau and amyloid pathologies. Therefore, microtubule stabilizing agents should be considered as potential candidates to modulate the course of AD by acting on Aβ and tau together.

6.2. LITERATURE OUTLINE

6.2.1. ALZHEIMER'S DISEASE

Alzheimer's disease is the most common form of dementia in the elderly (Long and Holtzman, 2019). Around 50 million people in the world are estimated to be affected by this progressive neurodegenerative proteinopathy. This number is continuously rising due to population ageing (World Alzheimer Report, 2019) together with the absence of early biomarkers and effective pharmacological treatments, among other factors. Therefore, identifying the underlying pathogenic mechanisms is essential to uncover novel therapeutical targets and develop successful disease-modifying treatments.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

The main histopathological hallmark of AD is the accumulation of two misfolded proteins: amyloid-beta (Aβ) peptide in the form of extracellular plaques (senile plaques), and hyperphosphorylated tau protein (phospho-tau) giving rise to intraneuronal neurofibrillary tangles (NFTs) (Perl 2010; Masters et al. 2015; Calderon-Garcidueñas and Duyckaerts 2017). Pathological aggregation of tau species defines AD as a tauopathy, and the coexistence of cerebral amyloidosis classifies this condition as a secondary tauopathy. These two protein lesions, described by Alois Alzheimer over a century ago (Alzheimer, 1907) are accompanied by neuroinflammation, synaptic damage and neuronal loss. Both protein lesions progressively spread within neuronal circuits, affecting learning and memory processes. However, the link between Aβ and tau, and their specific deleterious roles in brain, remain elusive.

The early onset familial AD (FAD) (<1% of cases) is initiated owing to dominant mutations in amyloid precursor protein (*APP*), or presenilins (*PSEN1 or PSEN2*) genes (Calero et al., 2015; Calderon-Garcidueñas and Duyckaerts, 2017; Sasaguri et al., 2017; Shi and Holtzman, 2018). Aging and the APOE4 genotype constitute the main risk factors for the sporadic late-onset form of AD (AD) (99% of cases). However, despite of being a tauopathy, there is no genetic mutation in *TAU* triggering AD. Genome wide association studies (GWAS) have identified nearly 30 genes that increase the risk for developing sporadic AD, which are associated to cholesterol metabolism (*CLU*), endocytosis (*PICALM*), immune response and microglial function (*TREM2, CR1, CD33, etc.*), among others (Verheijen and Sleegers, 2018; Kunkle et al., 2019). Understanding the role of these newly identified risk factors should facilitate the comprehension of mechanisms underlying Alzheimer's pathogenesis (Calero et al., 2015; Giri et al., 2016; Sasaguri et al., 2017; Shi and Holtzman, 2018).

6.2.2. TAU PROTEIN

Tau protein is encoded by the microtubule-associated protein tau gene (MAPT), located on chromosome 17q21, and expressed chiefly in neuronal cells. In the adult human brain there are six isoforms of tau, created by the alternative splicing and correspond to the inclusion of an additional microtubule-binding repeat-region (3R or 4R) at the carboxy-terminal, and the insertion of 29 amino acids at the N-terminal (0N, 1N, or 2N), thereby varying in length from 352 to 441 amino acids (Barbier et al., 2019).

Under physiological conditions, tau is a soluble protein naturally not prone to aggregate. Although tau is estimated to have multiple functions, its canonical function is dynamically binding to microtubules to promote cytoskeletal support and flexibility, being implicated in the axonal transport. Axoplasmic flow is especially vital in neurons, due to their strong morphological and functional polarity. Tau-microtubule interaction is well-regulated by post-translational modifications, like phosphorylation and dephosphorylation. Phosphorylation from

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

diverse protein kinases (such as GSK3β or CDK5) reduces the propensity of binding to microtubules, altering stability and shifting to disassembly. Up to 85 specific sites of tau phosphorylation have been reported. In tauopathies like AD, hyperphosphorylation of tau occurs, which releases tau from the microtubule resulting in the destabilization of microtubules, increasing the levels of cytosolic free tau. In addition, free phospho-tau quickly aggregates giving rise to PHFs (paired helicoidal filaments) and then, NFTs. The pathological accumulation of phospho-tau species is accompanied by a neuroinflammatory process, synaptic loss and neuronal death.

The amyloid cascade hypothesis (Hardy and Higgins, 1992) postulates that the accumulation of Aβ peptides triggers the pathogenesis of AD, leading to NFTs and neurodegeneration that finally result in memory dysfunction (Hardy and Selkoe, 2002). Oligomeric soluble Aβ peptides, instead of extracellular fibrillar plaques, are currently considered the main toxic agents since they better correlate with AD symptoms (Forner et al., 2017). Even though both theories, the classical and the oligomeric, posit the existence of some connecting dots between amyloid aggregation/accumulation and the phosphorylation of tau, the link between Aβ and tau pathology still remains obscure. In addition, the constant failure in clinical trials centered on Aβ has led to a paradigm shift locating other pathological mechanisms as phospho-tau accumulation or neuroinflammatory response in the eye of the storm (Cummings et al., 2019). Given that AD is a multifactorial disorder, a multitarget approach must be applied to increase treatment efficacy (Makin 2018; Yuksel and Tacal, 2019).

6.2.3. MICROGLIA AND INFLAMMATION IN ALZHEIMER'S DISEASE

Reactive gliosis and neuroinflammation are hallmarks of neurodegenerative tauopathies (Kinney et al., 2018; Hammond et al., 2019; Scheiblich et al., 2020). In addition to Aβ plaques and NFTs, AD patients develop a sustained inflammatory response mediated by microglial and astroglial activation. Brain inflammation appears to be neuroprotective during an acute-phase response, but turns into a detrimental component when it comes to a chronic inflammatory response (Calsolaro and Edison, 2016; Ransohoff, 2016; Sarlus and Heneka, 2017; Hammond et al., 2019; Webers et al., 2020).

The involvement of microglia in AD progression is a hot topic at this moment (Calsolaro and Edison, 2016; Ransohoff, 2016; Sarlus and Heneka, 2017; Hammond et al., 2019; Webers et al., 2020). In fact, recent genetic and transcriptomic studies indicate that microglia-related pathways are central to AD risk and pathogenesis. In this line, several genes associated with the risk of late-onset AD (including *ABCA7, TREM2 CD33, CR1,* among others) codify for proteins involved in innate immunity and microglial function (Guerreiro et al., 2013; Guimas Almeida et al., 2018; Pimenova et al., 2018; Boza-Serrano et al., 2019; Kunkle et al., 2019; Liddelow, 2019;

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Andrews et al., 2020). The precise role of microglial cells in tauopathies is unclear, but recent research in patients and tau-based models have evidenced microglial activation may mediate tau pathology (Yoshiyama et al., 2007; Cherry et al., 2016; Leyns and Holtzman, 2017; Perea et al., 2018; Romero-Molina et al., 2018; van Olst et al., 2020) by phagocyting and propagating extracellular phospho-tau (Asai et al., 2015; Bolós et al., 2015, 2017; Pérez et al., 2019). On the other hand, microglia may participate in eliminating synaptic phospho-tau with the aid of the complement system (Dejanovic et al., 2018), and NFTs/PHFs containing neurons may expose superficial "eat-signals" to be eliminated by phagocytosis (Brelstaff et al., 2018).

These resident cells of innate immune system in CNS were initially classified according to macrophage M1 or M2 activation states. However, recent findings allow to divide microglia into more specific subtypes/cluster with different genetic expression profiles (Hashemiaghdam and Mroczek, 2020). Under physiological conditions, **homeostatic or surveillant** microglia are ramified cells with a round and compact cellular body. However, in pathological conditions such as AD, these cells turn into **activated microglia**, which are recognized by their ameboid morphology, with thick and retracted processes (Hansen et al., 2018; Song and Colonna, 2018; Sierra et al., 2019). These reactive cells present an intense phagocytic activity and secrete proinflammatory substances to the environment. In this sense, transcriptomic studies identified a novel disease-associated microglial (DAM) phenotype, characterized by a reduction in the expression of homeostatic genes (such as *CX3CR1*, *P2RY12* and *TMEM119*) and combined with a gene profile related to neurodegeneration (*APOE*, *CLEC7A*, *IGF1*, *TREM2* among others). This molecular signature points to the relevance of lipid metabolism, lysosomal, phagocytosis and immune response pathways in AD pathogenesis (Keren-Shaul et al. 2017; Krasemann et al. 2017; Hansen et al. 2018). Among these cluster of genes, a pivotal role in AD progression has been suggested for *TREM2* (microglial triggering receptor expressed in myeloid cells 2), which encodes for a lipid and lipoprotein sensor that sustain reactive microgliosis, regulating the transcriptional activation of microglial cells (Krasemann et al., 2017). However, the role of TREM2-mediated microglial activation, or even the function of the microglial cells in the pathology of AD, has not been fully elucidated.

With aging, and more intensively during neurodegenerative diseases (reviewed in Scheiblich et al., 2020; Streit et al., 2020) microglia acquires a **senescent phenotype**, leading to a weaker cerebral immunological protection. The presence of **dystrophic microglia**, which exhibit spheroid swellings, fragmentation and deramification among other characteristics, has been described in AD brains (Sanchez-Mejias et al., 2016). In this sense, our group has demonstrated that soluble species of phospho-tau are toxic to microglial cells in culture, giving rise to dystrophic microglia (Sanchez-Mejias et al., 2016). **Dark microglia** (Bisht et al., 2016) consist of a phagocytic highly electron-dense microglia, associated to pathological conditions.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

This morphotype is associated to synaptic components and it seems to be involved in the pathological modification of neuronal circuits.

Therefore, these cells seem to promote the elimination of Aβ and tau at early stages (Condello et al., 2015), but may also be actively involved in the loss of synapses at advanced stages (Wu et al., 2015; Spangenberg and Green, 2017), in parallel to the exacerbation of both proteinopathies (Xiang et al., 2016; Leyns and Holtzman, 2017), through the secretion of proinflammatory cytokines and reactive oxygen species (Colonna and Butovsky, 2017). Therefore, there is an ongoing debate about whether activated microglia have a protective and/or harmful effect in the progression of AD pathology. Thus, considering microglia as a therapeutic target for this disease requires an in-depth understanding and a better characterization of microglial phenotypes.

6.2.4. AIMS OF THE STUDY

Neuroinflammation is a common process in neurodegenerative diseases such as tauopathies. In AD brains and models, amyloid deposits induce a strong microglial activation around them. However, little is known about the specific relationship of tau pathology and glial activation. It is not clear whether the microglia is able to keep their homeostatic functions acting as a protective agent, or on the contrary, becomes vulnerable to phospho-tau toxic species, suffering a degenerative process. An additional scenario could be that microglia were actively involved in the spreading of tau pathology, synaptic damage and neuronal death. In this regard, there is also a lack of knowledge about the role played by astrocytes with respect to tau in neurodegenerative conditions. Besides, it is also unclear the differential impact of tau pathology over synaptic function and neuronal loss in the amyloidogenic context of AD.

The general objective of this Doctoral Thesis is to characterize, mainly at the cellular and ultrastructural level, the contribution of tau pathology to the neuroinflammatory process and neuronal damage in Alzheimer's disease. To this aim, the specific objectives are the following:

Objective 1. To characterize the progression of tau pathology in the hippocampus of two mouse models of primary tauopathy (P301S and ThyTau22).

- ✓ 1.1. To determine the spatio-temporal progression and accumulation of the different pathogenic forms of tau.
- ✓ 1.2. To longitudinally analyze the progression of tau pathology *in vivo* using functional PET neuroimaging. This objective has been carried out during a research stay in the laboratory of Dr. Claudio Soto in the University of Texas Health Science Center at Houston (UTHealth; Houston, USA).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Objective 2. To study the neuroinflammatory response during the progression of tau pathology in the hippocampus of the P301S and ThyTau22 models.

- ✓ 2.1. To determine microglial and astroglial activation profiles.
- ✓ 2.2. To analyze the relationship between glial activation and phospho-tau.

Objective 3. To analyze synaptic and neuronal damage during the progression of tau pathology in P301S and ThyTau22 models.

- ✓ 3.1. To analyze the synaptopathy associated to the progression of tau pathology.
- ✓ 3.2. To analyze the selective vulnerability of neuronal subpopulations (hippocampal interneurons and cholinergic neurons) and to evaluate the neuronal damage at the ultrastructural level.

Objective 4. To study *in vivo* the connection between tau and amyloid pathologies with the neurodegenerative process in the hippocampus of the amyloidogenic model APP/PS1.

- ✓ 4.1. To determine the effect of a microtubular stabilizer (epothilone D) over the cognitive functions in an amyloidogenic APP/PS1 model.
- ✓ 4.2. To analyze the effect of microtubule stabilization over tau pathology, the degenerative process (axonal/synaptic) and the neuronal death.
- ✓ 4.3. To study the effect of microtubular stabilization over amyloid pathology.

6.3. MATERIALS AND METHODS

6.3.1. TRANSGENIC MICE AND EPOTHILONE-D TREATMENT

Male and female transgenic tau P301S (PS19Vle/J; C57BL/6 x C3H background) (Jackson Laboratory; Yoshiyama et al., 2007) mice of 2, 6, 8, 9, 10 and 12 months of age, and ThyTau22 (C57BL/6 background) (Charles River) (Schindowsky et al., 2006) mice of 2, 6, 9, 12 and 18 months were used.

For epothilone D (EpoD) treatment, male and female 3-month-old APP/PS1 ($APP751_{Swe-London}/PS1_{M146L;}$ C57BL/6 background; Sanofi, France) mice were randomly assigned to two groups to receive weekly intraperitoneal injections of 2 mg/kg EpoD (Med. Chem. Express, USA) ($APP/PS1^{EpoD}$, n= 8) or vehicle solution ($APP/PS1^{Veh}$, n=7) over a period of 3 months. APP/PS1 transgenic model has been previously characterized (Blanchard et al. 2003; Ramos et al. 2006; Jimenez et al. 2008; Moreno-Gonzalez et al. 2009; Baglietto-Vargas et al., 2010; Sanchez-Varo et al. 2012; Torres et al. 2012; Trujillo-Estrada et al. 2014; Gomez-Arboledas et al. 2018; Sanchez-Mejias et al., 2019).

UNIVERSIDAD DE MALAGA

Age-matched non-transgenic mice (wild-type, WT) with C57BL/6 background were used as controls. All animal experiments were carried out in accordance with the Spanish and the European Union regulations (RD53/2013 and 2010/63/UE), and with the approval of the committee of Animal Research from the University of Malaga (Spain).

6.3.2. REGION OF STUDY: HIPPOCAMPUS

The hippocampus is a horn-like paired structure, located inside the medial temporal lobe, beneath the cortical surface. It belongs to the limbic system and plays important roles in the consolidation of information from short-term memory to long-term memory and spatial navigation. The hippocampus is one of the first regions to be affected as accumulates amyloid plaques since early stages of AD (Braak and Braak 1991; Andersen et al. 2007), as also occurs in temporal neocortex and the entorhinal cortex.

The hippocampal formation is defined as the set of the subiculum, the hippocampus proper (HP), and the dentate gyrus (DG). The mice hippocampus can be found from Bregma -0.94 mm to Bregma -4.04 mm (Franklin and Paxinos 2012). At rostral levels, the hippocampus appears dorsally, after septum, inferior to the corpus callosum, superior to the dorsal thalamus and dorso-laterally bordered by lateral ventricles and parietal cortex. Medially, this structure is bordered by the fimbria-fornix. The hippocampus bends caudo-ventrally (temporal pole), and it is situated close to the amygdaloid complex. Its lateral boundaries are defined by the entorhinal and perirhinal cortex, among others. In addition, the HP can be divided into four regions, called CA1 to CA4 (CA meaning *Cornu Ammonis*). CA1 area is localized between the subiculum and the hippocampus, whereas CA2 and CA3 are inside the hippocampus. CA4 region is practically indistinguishable in mice hippocampal formation (Andersen, 2007).

6.3.3. TISSUE PREPARATION

Mice were anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg) and transcardially perfused with 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS). For biochemical purposes, left hippocampi were dissected out and frozen. Right hemispheres were fixed by immersion with 4% paraformaldehyde, 75mM lysine, 10mM sodium metaperiodate in 0.1 M phosphate buffer (PB) for 5 days at 4°C. Some animals were perfused with PBS, followed by the fixative solution. Fixed and cryoprotected brains/hemispheres were sectioned at 40 µm thickness in the coronal plane on a freezing microtome and serially collected in cold PBS and 0.02% sodium azide.

6.3.4. THIOFLAVIN-S, CONGO RED AND GALLYAS STAININGS

Free-floating sections were incubated for 5 minutes with 0.015% Thioflavin-S in 50% ethanol, and then rinsed in 50% ethanol and PBS, mounted onto gelatin-coated slides and coverslipped with 0.01 M PBS containing 50% glycerine and 2.5% triethylenediamine. For Congo

UNIVERSIDAD DE MALAGA

red counterstaining, sections were incubated for 3 minutes with 0.2% Congo red in 100% ethanol with NaCl 0.03%, and then washed in PBS. Tissue was finally mounted on gelatine-coated slides, air-dried, dehydrated in graded ethanol, cleared in xylene and coverslipped with DPX mounting medium.

Gallyas silver staining for NFTs was performed in 10 µm-thick paraffin sections from P301S brains (n=4/group) (Uchihara 2007; Gallyas and Wolf, 1986). Mounted sections were rinsed in distilled water for 1 minute. Then, slides were incubated in 0.25% potassium permanganate for 15 minutes, 2% oxalic acid for 2 minutes, and periodic acid for 7.5 minutes, washing in between with distilled water for 1 minute. Sections were rinsed twice again before incubating in silver iodide for 1 minute, and then, in acetic acid 0,5% for 2 steps of 5 minutes. After washing with distilled water, slides were incubated in the developing solution for a maximum of 30 minutes. To stop the reaction, 0.5% acetic acid (2 x 5 minutes) steps were applied, followed by 1 minute in distilled water before dehydrating and coverslipping with DPX.

6.3.5. LIGHT MICROSCOPY IMMUNOHISTOCHEMISTRY

Serial sections from all animals mice were processed simultaneously for light and confocal microscopy immunostaining using same batches of solutions to minimize variability in immunolabeling conditions as previously reported (Ramos et al. 2006; Jimenez et al. 2008).

Antigen retrieval method (80°C in 50 mM citrate buffer, or 0.2% triton-X in PBS) was first performed (if needed). Then, free-floating sections were treated with 3% H_2O_2/10% methanol in PBS to inhibit endogenous peroxidase, and with avidin-biotin Blocking Kit to block endogenous avidin, biotin and biotin-binding proteins. For single immunolabeling, sections were incubated overnight at room temperature with one of the following primary antibodies: anti-Aβ1-42 rabbit polyclonal (1:5000, Abcam); anti-Aβ1-17 (6E10 clone) mouse monoclonal (1:5000, Covance); anti-acetylated-tubulin mouse monoclonal (1:50000, Sigma); anti-APP-C-term goat polyclonal (1:200000, Meridian Life Sciences); anti-CD68 rabbit polyclonal (1:1000, Abcam); anti-CD45 rat polyclonal (1:500, AbD Serotec); anti-ChAT goat polyclonal (1:1000, Millipore); anti-Galectin3 goat polyclonal (1:5000, R&D); anti-GFAP rabbit polyclonal (1:10000, Dako); anti-GFAP chicken polyclonal (1:20000, Millipore); anti-Iba1 goat polyclonal (1:2000, Abcam); anti-Iba1 rabbit polyclonal (1:1000, Wako); anti-LAMP1 rat polyclonal (1:500, Sigma); anti-LAMP2 rat polyclonal (1:500, Santa Cruz); anti-LC3b rabbit polyclonal (1:1000, Cell Signaling); anti-PHF-Tau (AT8 clone) mouse monoclonal (1:1000, Termofisher); anti-pre-tanglesTau (MC1) mouse monoclonal (1:350, gift by Dr. Peter Davies); anti-PV rabbit polyclonal (1/5000, Swant); anti-SNAP-25 (1:50000, Sigma); anti-Synaptophysin rabbit polyclonal (1:1000, Abcam); anti-TREM2 sheep polyclonal (1:1000, R&D); anti-ubiquitin rabbit polyclonal (1:5000, Dako); anti-VGAT rabbit polyclonal (1:5000, Calbiochem); anti-VGLUT1 guinea-pig polyclonal (1:10000, Synaptic

UNIVERSIDAD DE MALAGA

systems). The tissue-bound primary antibody was detected by the incubation for 70 min with the corresponding biotinilylated secondary antibody (1:500, Vector Laboratories), followed by incubation with streptavidin-conjugated horseradish peroxidase (1:2000, Sigma) for 90 min, and finally visualized with 0.02% 3-3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma Aldrich), 0.01% hydrogen peroxide in PBS and 0.03% nickel ammonium sulphate. Specify of the immune reactions was controlled by omitting the primary antisera.

For double or triple immunofluorescence labeling, sections were first sequentially incubated with the indicated primaries antibodies followed by the corresponding Alexa Fluor ®488/568 or Cy5® secondary antibodies (1:1000, Invitrogen). Sections were examined under a confocal laser microscope (Leica SP8).

6.3.6. TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY

For transmission electron microscopy (TEM), fixed brains were sectioned at 50 µm or 250 µm thicknesses in the coronal plane on a vibratome (Leica VT1000S) and serially collected in cold PB and 0.02% sodium azide. For standard electron microscopy, the 250 µm-thick sections were postfixed in 1% osmium tetroxide in 0.1 M PB, block stained with uranyl acetate, dehydrated in acetone, and flat embedded in Araldite. Selected areas were cut in ultrathin sections and examined with an electron microscope (JEOL JEM1400).

For the immunogold labeling, 50-µm thick sections were cryoprotected in a 25% sucrose and 10% glycerol solution, followed by freezing at -80°C in order to increase the antibody penetrance. Sections were then incubated 48h in primary antibody in a PBS 0.1M/0.1% sodium azide/2% BSA-solution at 22°C. The tissue-bound primary antibody was detected by the incubation with the corresponding 1.4 nm gold-conjugated secondary antibody (1:100, Nanoprobes) overnight at 22°C. After postfixation with 2% glutaraldehyde and washing with 50 mM sodium citrate, the labelling was enhanced with the HQ Silver™ Kit (Nanoprobes), and gold toned. Finally, the immunolabeled sections were processed as we previously described by the osmium fixation, dehydration and embedding steps. The primary antibody was omitted in negative control experiments.

6.3.7. QUANTITATIVE IMAGE ANALYSIS

Phospho-tau and Plaque loadings were defined as the percentage of total area (CA1, DG or total hippocampus) immunostained with the anti-phospho-tau (AT8) or anti-Aβ ($A\beta_{42}$) antibodies, or stained with Thioflavin-S (tangles or plaques). *Synaptic loading* was defined as the percentage of area stained with anti-Synaptophysin (Syn) in the inner molecular layer related to the total molecular layer. *Dystrophic loading* was defined as the area occupied by dystrophic neurites immunorreactive to APP or ubiquitin, related to the hippocampal area analyzed (CA1).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Glial loading was defined as the percentage of area stained with anti-Iba1 (total microglia), anti-CD45 (activated microglia) or anti-GFAP (astroglia) related to the hippocampal area analyzed (CA1).

The image analysis was carried out as follows*:* Immunostained sections were examined under a Nikon Eclipse 80i microscope and images were acquired with a Nikon DS-5M digital camera using the ACT-2U imaging software (Nikon corporation). The camera settings were adjusted at the start of the experiment and maintained for uniformity. Digital images from Tau, APP/PS1 and WT mice were analyzed using Visilog 6.3 analysis program (Noesis, France). The immunopositive signal within the selected brain region was converted into 8-bit gray scale, and immunostained events were identified by a threshold level mask. This threshold was maintained throughout the whole image analysis for uniformity. Quantitative comparisons were carried out on sections processed at the same time with same batches of solutions.

6.3.8. STEREOLOGICAL ANALYSIS

Neuron and dystrophic neurites counting. SOM-positive cells and SOM- or AT8-positive dystrophic neurites were stereologically quantified in the CA1 subfield of APP/PS1^{EpoD} (n = 7) and APP/PS1^{Veh} (n = 4) groups according to the optical fractionator method as described previously (Moreno-Gonzalez et al. 2009b; Ramos et al. 2006; Sanchez-Mejias et al. 2019a; Trujillo-Estrada et al. 2014, 2013a). In addition, CA1 PV- and ChAT-positive cells from basal forebrain were stereologically quantified in P301S and ThyTau22 mice (n=4/group/genotype). Age-matched wild-type mice (n = 4) were used as control group for every cell counting. Briefly, the quantitative analyses were performed using an Olympus BX61 microscope interfaced with a computer and an Olympus DP71 digital camera, and the NewCAST (Computer Assisted Stereological Toolbox) software package (Olympus, Denmark). Cell/dystrophic quantification was done through the rostrocaudal extent of each cerebral region in every seventh section (with a distance of 280 µm), and an average of 7 sections were analyzed for each animal. Boundaries were defined using a 4x objective and the number of neurons was counted using a 100×/1.35 objective. We used a counting frame of 1874.2 µm^2 with step lengths of 68.45×68.45 µm. The numerical density (ND; cells or dystrophies/mm^3) of immunopositive events was estimated using the following formula: ND=N/(A×10_m/SV), where N is the number of dissector-counted somatic/dystrophic profiles, A, the area and SV is the volumetric shrinkage factor of the sample (the SV was determined in the same way as described by Ramos et al. (2006). The precision of the individual estimations is expressed by the coefficient of error (CE). Total CE (CE group value) was calculated using the CEs in each individual animal. An investigator who was blinded to the experimental conditions performed neuronal/dystrophic profile counts.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Plaque size. Plaque morphometric analysis was performed as previously reported (Trujillo-Estrada et al., 2014) using the nucleator method with isotropic probes (radii=5) by the NewCAST software package from Olympus stereological system. CA1 subfield was analyzed in sections from APP/PS1^{Veh} (n = 4) and APP/PS1^{EpoD} (n = 7) mice immunostained with anti-Aβ42 using a counting frame of 6022.8 µm^2. For individual plaque measurement, a 40x objective was used. Each analysis was done by a single examiner, blinded to sample identities.

6.3.9. LONGITUDINAL PET IMAGING WITH ^{18}F-THK5351 TAU TRACER

All mice were manipulated in accordance to UT MD Anderson's IACUC guidelines. Mice were anesthetized using 2% isoflurane, and a catheter was placed in the tail vein. The anesthetized mice were then positioned on a Bruker Albira PET/SPECT/CT scanner (Bruker Biospin Corp., Billerica, MA, USA). A bolus injection of ~ 150 uCi of radioactive tracer (18F-THK5351) was given via the catheter in the tail vein at start of the PET measurement followed by a saline flush. The imaging protocol consisted of a 20 min PET followed by a 3 min CT scan (400 uA, 45 kV, 120 projections). The PET data was acquired in list mode and was histogramed into 22 timeframes (15x20 s, 5x60 s, 2x300 s). The images were reconstructed using the Maximum Likelihood Expectation Maximization (MLEM) method with 12 iterations. Scatter, random coincidences, decay, and attenuation corrections were applied. Analysis was done with PMOD (PMOD Technologies Ltd., Zürich, Switzerland). The mean SUV-bw (g/ml) of the brain region and normal muscle tissue were measured over the course of the scan, and a ratio of the brain to muscle was calculated.

6.3.10. RETROTRANSCRIPTION AND QUANTITATIVE REAL-TIME RT-PCR

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 minutes 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).

Retrotranscription (RT) of 4 µg of total RNA was performed with the High-Capacity cDNA Reverse transcription Kit (Applied Biosystems) as described in Romero-Molina et al. (2018). For real-time qPCR, 40 ng of cDNA were mixed with Eagle Taq Master Mix (Sigma) and Taqman Gene Expression assay probes. The following genes were analyzed, CD45 (ref. Mm01293577_m1), CD68 (ref. Mm03047340_m1), Clec7a (Mm01183349_m1), CX3CR1 (Mm02620111_s1), GAPDH (ref. Mm99999915_g1), Iba1 (ref. Mm00479862_g1), IGF-1(ref Mm00439560_m1), P2ry12 (ref. Mm01950543_s1), and TMEM119 (ref. Mm00525305_m1). Quantitative PCR reactions (qPCR) were done using an ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems). Results were expressed using the

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

comparative double-delta Ct method (2-11Ct). 1Ct values represent GAPDH normalized expression levels.

6.3.11. TOTAL PROTEIN EXTRACTION, WESTERN BLOTS AND DOT-BLOTS

Total protein was extracted as described previously (Ramos et al., 2006; Jimenez et al., 2008; 2011; Torres et al., 2012). Protein pellets from dissected hippocampi, obtained using the Tripure TM Isolation Reagent, were resuspended in 4% SDS and 8 M urea in 40 Mm Tris–HCl, pH 7.4 and rotated overnight at room temperature. Western blots (WB) were performed as described previously (Araujo et al., 1996). Briefly, 7–15 µg of protein from the different samples were loaded on 10% and 12% SDS-Tris-Glycine-PAGE and transferred to nitrocellulose (Hybond-C Extra, Amersham, Sweden). To analyze Aβ, protein samples were loaded onto 16% SDS-Tris-Tricine-PAGE and transferred to PVDF (Inmobilon-P, Millipore). After blocking, using 5% non-fat milk, the membranes were incubated overnight, at 4°C, with the appropriate antibody. Membranes were then incubated with the corresponding horseradish-peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (Cell Signaling) at a dilution of 1:10000. Each blot was developed using the ECL-plus detection method (Amersham, Sweden). For quantification, images were obtained using Image-Quant Las 4000 mini gold (GE Healthcare Bio-Sciences) and analyzed using PCBAS program. In each experiment, the intensity of bands from WT mice and/or experimental condition were averaged and considered as 100% relative units. For normalization purposes, proteins were first estimated by Lowry and protein loading corrected by β-actin. Dot-blot were performed to detect the presence of specific forms of Aβ in soluble fractions. A drop of sample with a known amount of protein (3 µg) was placed on the nitrocellulose membrane and allowed to dry. The membrane was washed followed by blocking buffer (5% BSA in TBS-T) and then incubated in the corresponding primary antibody overnight at 4 °C. Afterwards, the same steps were followed as for the WB. Protein loading was controlled with parallel dot-blots developed using anti-GAPDH. The signal was developed on X-ray films (Premium Clear Blue X-ray Film) using the AFP Mini Med X-Ray Film Processor (AFP manufacturing) capture system.

6.3.12. SYNAPTOSOMES AND SOLUBLE FRACTIONS ISOLATION

The synaptosomal and soluble (S1) fractions were obtained as described previously in (Sanchez-Varo et al., 2012). Briefly, the tissue was homogenized using a Dounce homogenizer in 0.32 M Sucrose, 10 mM Tris–HCl (pH 7.4) buffer (buffer A) containing complete protease and phosphatase inhibitor cocktails (Sigma). After homogenization, the crude synaptosomal fraction (synaptosomes plus mitochondria) was isolated by two sequential centrifugations (1500×g, 10 min followed by 12500×g, 20 min; at 4°C). The crude synaptosomes were resuspended in 13% (final concentration) Ficoll 400 (in buffer A) and layered on the bottom of a discontinuous gradient, composed by buffer A and 7% Ficoll (in buffer A). The gradients were centrifuged at 100000×g (45 min at 4°C) and the synaptosomes were isolated at the 7.5–13% interface. After

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

washing (twice with buffer A), the protein content of the synaptosomal fractions was quantified by Lowry. The soluble and microsomal fractions (supernatant and pellet, respectively) from APP/PS1 and WT mice were obtained after centrifugation at 100,000xg (1 h, 4 °C).

6.3.13. BACE-1 AND GAMMA-SECRETASE ACTIVITY

BACE-1 activity was determined using a commercial kit (R&D Systems, Germany) following the manufacturer's instructions (Torres et al., 2012). Fresh membranes from the hippocampus of APP/PS1 animals were solubilized in the buffer supplied by the manufacturer, centrifuged and the supernatant used for the assay. Activity determination was performed using the substrates supplied by the manufacturer. For the enzyme assay, the fluorescence intensity was determined every 15 minutes with a Synergy HT Multi-mode microplate reader (Biotek). The activity was calculated considering the maximum slope of the fluorescence intensity respect to time and subsequently corrected according to the amount of added protein. **γ-secretase** activity was determined following a protocol previously described with some modifications (Tamboli et al., 2011). Firstly, cerebral cortex membranes of APP/PS1 animals were isolated and resuspended in citrate buffer containing protease inhibitors (Roche). Aliquots of 150 µg of protein were used for each assay. The samples were incubated in the absence (vehicle solution) or presence of EpoD (100 nM). After incubation, membranes were sonicated and centrifuged. Supernatants were used to determine AICD production by WB. As negative controls, membranes were kept at 4 °C and treated as previously described.

6.3.14. *IN VITRO* STUDIES

N2a-APPSwe cell line treatment: mouse neuroblastoma cells stably transfected with the human APP gene with the Swedish mutation were incubated with vehicle solution or EpoD. N2aAPPswe cells were grown following a pre-established protocol (Vetrivel et al., 2005). For the treatment, an initial EpoD solution, passed through a 0.2 µm filter, was diluted in the same medium to a final concentration of 100 nM. This medium was maintained for 12 or 24 hours before harvesting the cells and isolate the RNA and proteins.

6.3.15 BEHAVIOURAL ANALYSIS

Behavioral tests were performed during the light period of the light/dark cycle and the experimenter was blind to the genotypes and treatment of mice. Animals were adapted to the experimental conditions before behavioral test. All behavioral registrations were performed using the monitoring software Ethovision XT 7.0 (Noldus, Netherlands). All mice were manipulated in accordance to University of Malaga IACUC guidelines.

During the last two weeks of treatment, 6-month-old APP/PS1^{EpoD} (n=8) and APP/PS1^{Veh} (n=7) mice were submitted to motor function and cognitive tests. Non-transgenic wild-type (WT;

UNIVERSIDAD DE MALAGA

n=12) mice of the same genetic background and age were also included. Briefly, open-field (OF) test was used to examine motor function (Filali et al., 2012; Trujillo-Estrada et al., 2013). Mice were placed in a square-shape arena (30 x 30 cm) and allowed to explore for 5 minutes. Distance travelled, navigation speed and number of rearings were quantified. Object recognition tests were used for recognition memory (Ennanceur and Delacour, 1998; Davis et al., 2013). The object location task (OLT) and the novel object recognition task (NORT) tests were performed 1 and 24 hours after the habituation with OF. Both tasks consisted of an acquisition and a discrimination phase (test phase), of 10 minutes each one, with a delay of 3 hours between them. During OLT, two identical objects were presented to the animals. In the test phase, one of the objects was displaced to a novel location. For NORT, mice were allowed to explore two identical sample objects. Then, one of the familiar objects was replaced by a novel one. The basal measure was the time spent by the mice exploring objects during the sample phases and the test trial. Additionally, two discrimination indexes were calculated for the test trial: a location recognition ratio (total time exploring displaced object/total time of exploration) and an object recognition ratio (total time exploring novel object/total time of exploration). The time was recorded only when the mice touched the object with their nose. Y-maze task was used to evaluate working memory (Hughes, 2004). The maze consisted of three acrylic arms (31 x 15 x 7 cm) placed at 120^{o} respect to each other. Mice were allowed to explore for 5 minutes, and the spontaneous alternance was measured. Y-maze specific context task was used to evaluate long-term memory (Hughes 2004; Karl et al., 2012). The maze consisted of three acrylic arms (31 x 18 x 32 cm) displayed different internal visual patterns, placed at 120^{o} respect to each other arms clues. Animals performed two trials (training and test), with a 24 hours inter-trial interval. During training, one arm was blocked off with a panel (novel arm). The mice were placed and allowed to freely explore the other two arms for 8 minutes. In the test trial, all arms were accessible and mice explore freely for 5 minutes. Time spent by the animal in each arm, distance (cm), and speed (cm/s) were analyzed. Morris water maze (MWM) was used to evaluate spatial cognition and memory using a circular pool (1.4 m diameter, San Diego Instruments, Inc., California, USA), where animals have to locate a hidden platform beneath opaque water, guided by some spatial cues (Morris, 1984; Navarrete et al., 2008). Mice were trained to find the platform (learning or acquisition phase) for 7 days (4 trials/day, maximum trial duration 90 s, intertrial interval of 5 min). On the day 7, 1.5 hours after the last trial, the platform was removed and animals were allowed to explore the maze for 60s (retention phase). To discard visual or motivational deficiencies, on day 8 animals performed the visible platform test (4 trials, maximum trial duration 60s). Latency, distance travelled, speed, and time spent in the target quadrant (retention phase) were analyzed.

P301S mice and the corresponding WT mice were blindly assessed longitudinally at 6 months, 8 months, 10 months, and 12 months of age subsequent to PET brain imaging. Motor

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

coordination and activity, grip-strength, and fatigue are all measurements that were analyzed by the behavioral task of RotaRod (Med Associates Inc., Vermont). As previously described (Edwards III et al. 2019), the animal was placed on a horizontal oriented, rotating cylinder that accelerated from 4 to 40 rpms over a 5 minute trial. The latency to fall was quantified and averaged over 3 trials with 2 minutes interval rest. The final cut-off latency to fall measurement was 6 minutes. To prevent false interpretations or falls, two consecutive rotations of the animal clinging to the rod was considered as a latency to fall measurement. The animals were aided for 30 seconds in the first trial to prevent unnecessary behavior (i.e. turning and false-positive falls/jumps). Barnes maze is a medial temporal lobe dependent task that evaluates spatial learning and memory. The maze consisted of a circular platform with 40 holes with one being an exit from the arena, and the animal uses spatial cues or shapes to discover the stationary escape hole in a 3 minute trial (Moreno-Gonzalez et al. 2017). To run Barnes maze as a longitudinal behavioral task, mice were trained on day 1 with two additional acquisition trials and then 2 trials per day for 4 days. This training phase was performed in a subset of mice at 6 months and 8 months of age to establish an age-dependent performance in the training phase between Tg and WT mice. Thereafter, two additional trials to assess memory recall were performed at 10 and 12 months of age prior to brain PET imaging. Primary latency to the escape hole was used to assess learning and memory. Task performance was recorded and analyzed using the TopScan 2.0 tracking software (Clever Sys, Reston, VA). All mice were manipulated in accordance to UT MD Anderson's IACUC guidelines.

6.3.16 STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analyzes were performed using the GraphPad software 7.0. Normally distributed data were expressed as the mean ± SD, except for the cognitive data expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). Mean values were compared using one-way ANOVA and one-way or two-way ANOVA with repeated measures (RM) followed by Tukey post hoc test. Non-normal data were compared with the Mann-Whitney U test (for two groups comparisons). The significance was set at 95% of confidence. Linear correlations were analyzed using the Pearson test.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

6.4 RESULTS AND DISCUSSION

6.4.1 PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF TAU PATHOLOGY IN THE HIPPOCAMPUS OF THYTAU22 AND P301S MICE DURING THE DISEASE PROGRESSION

The presence of intraneuronal NFTs made of hyperphosphorylated tau is one of the protein lesions that characterize AD brains. However, the specific pathological role of phospho-tau, as well as the relationship between amyloid and tau pathologies in AD, remains elusive. It has been suggested that soluble oligomeric forms of phospho-tau, like soluble Aβ, could provoke axonal, synaptic and neuronal damage and, consequently, play a role in cognitive failure during AD progression. In this sense, NFTs could act like reservoirs of toxic species of tau, just like it has been proposed with plaques. Therefore, one of the main objectives of this work was to characterize and compare the species of tau implicated in the age-dependent progression of the pathology in two different transgenic models of tauopathy, P301S and ThyTau22 (G272V and P301S mutations) at 2, 6, 9, 12 and 18 months of age. P301S mice was only analyzed from 2 to 12 months of age, since progressive paralysis initiated around 8.5 months of age, with only a 20% survival rate at 12 months, comparable to other studies of this mouse strain (Yoshiyama et al., 2007).

This thesis work has been centered on the hippocampus (including hippocampus proper and dentate gyrus), since is one of the earliest cerebral regions affected by tau pathology during AD development (Braak II-III) (Braak and Braak, 1991; Braak et al., 2006).

6.4.1.1 P301S mice exhibit stronger hippocampal tau pathology than ThyTau22 model, but do not develop NFTs

Firstly, we assessed if there was any difference in tau expression and/or phosphorylation between these two models of primary tauopathy. Initially by Western-blot (WB), using anti-tau total and anti-phospho-tau antibodies, and then followed by immunohistochemical detection using AT8, and Thioflavin-S (Thio-S) staining for NFTs. Finally, ultrastructural analysis was performed using transmission electron microscopy (TEM).

Thus, we tested the accumulation of total tau in the hippocampus of both models by WB using Tau46 (C-terminal) and Tau12 (N-terminal) antibodies. Significant higher levels of total tau were found in P301S in comparison to ThyTau22 mice. We then analyzed possible differences concerning the phosphorylation pattern between both models using three specific monoclonal antibodies (AT8, AT100, and AT180). We found an age-dependent increase in tau phosphorylation in both models. Young (2–4 months of age) ThyTau22 or P301S mice displayed low (below the detection limits) phospho-tau accumulation. At 9–12 months of age, both models showed a significant accumulation of phospho-tau species. As occurred with Tau

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

expression, P301S model presented higher amount of phospho-tau species when compared with ThyTau22 mice.

Next, we verified the differences in tau hyperphosphorylation by immunohistochemistry for AT8. In both models the accumulation of phospho-tau in the hippocampal region was notably higher in comparison to other adjacent brain areas, such as cortex or thalamus. At early ages, AT8 immunolabeling in the ThyTau22 hippocampus appeared within neuronal somata and proximal dendrites in the CA1 region, close to subiculum. With aging, pathology spreads along CA1, then to CA3, finally reaching the dentate gyrus (DG). In CA1, the stratum oriens and stratum radiatum showed a widespread labeling, and numerous principal cells were immunopositive. In DG, from 6 months of age, staining firstly appeared in neuropile portions (hilus and inner molecular layer), and later in some granular cells. AT8 immunostaining was stronger within the neuropile of P301S hippocampus than ThyTau22, specially from 9 months of age. In this model, pathology initiated in DG (inner molecular layer) and CA3 (stratum lucidum), spreading later to CA1. At 12 months, staining was extensive to the whole hippocampus.

The load (total hippocampal area occupied by AT8 immunostaining) significantly increased with age, as measured by image analysis in both the CA1 region and dentate gyrus. As expected, AT8 burden was significantly higher in P301S mice than in ThyTau22, especially in dentate gyrus at advanced stages. In addition, at ultrastructural level, AT8 immunogold particles were found in soma, dendrites and synaptic compartments.

Thio-S staining evidenced NFTs-like structures in ThyTau22 hippocampus from very early ages, restricted to pyramidal layer, mostly in CA1, whereas P301S showed no Thio-S positive staining at any age. Ultrastructural examination by TEM confirmed that ThyTau22, but not P301S mice, exhibited intraneuronal tangles, which were formed by straight filaments (SF) of phospho-tau (AT8-positive).

6.4.1.2 Longitudinal assessment of tau pathology by *in vivo* PET imaging correlates with behavioral deficits

Positron emission tomography (PET) imaging, especially with the use of several tau radiotracers, is a promising approach enabling the anatomical follow-up of tau aggregates *in vivo* cross-sectionally and longitudinally under neurodegenerative conditions. In this work, tau transgenic P301S mice were analyzed by longitudinal (from 6 to 12 month-old) *in vivo* PET brain imaging using the tau ligand ^{18F}THK5351, in parallel with a behavioral characterization and a complementary histological characterization (Dr. Claudio Soto's Lab, UTH Health Science Center at Houston, USA). Our results demonstrate an increase of cerebral tau pathology by *in vivo* PET imaging in P301S mice compared to age-matched WT, in consonance with pathological tau,

UNIVERSIDAD DE MALAGA

phenotypic (survival rate, paralysis) and behavioral (motor defects at RotaRod and memory alterations assessed by Barnes Maze) deficits.

6.4.1.3 P301S and ThyTau22 models exhibit similar alterations in proteostatic systems

Proteostasis dysfunction in the CNS is involved in age-related neurodegeneration. Therefore, pathological accumulation of phospho-tau in AD brains might partly be the result of alterations in these homeostatic mechanisms. In fact, it is well-known that ubiquitin-proteasome system (UPS) and autophagic-lysosomal pathways are severely affected in neurodegenerative tauopathies (Lee et al., 2013; Götz et al., 2016; Cao et al., 2019). However, the relationship between the failures in these systems and phospho-tau accumulation has not been clearly established yet. Under physiological conditions, tau is ubiquitinated so their levels are controlled by UPS system, and in fact, NFTs are known to contain ubiquitinated tau (Lasagna-Reeves et al., 2012; Perry et al., 1987; García-Sierra et al., 2012). Autophagy is a process mediated by the autophagosomes, implicated in the degradation of cytoplasmic components within lysosomes. This mechanism is involved in the elimination of tau aggregates whose size do not allow their entering into the proteasome pore. Since defects in autophagy and UPS have been extensively reported in AD, connected to enhanced accumulation of Aβ peptides (Nixon et al., 2005; see review by Nixon and Yan, 2011), the analysis of these pathways in the context of pure tauopathies has been included in the present work.

Immunostaining showed that ubiquitin accumulation in both models was found to be mainly associated to some neuronal somata in hippocampal pyramidal layer, which highly likely belong to neurons containing NFT-like structures or phospho-tau, as described before. In P301S there was also intense accumulation of this protein in the granular cells and hilar neuropil. Concerning autophagy-lysosomal pathway, there was no alterations in the expression of the autophagosomal marker LC3b in the models, whilst the lysosomal protein LAMP2 accumulation seemed to be closely associated to the tau pathology progression, existing a widespread accumulation of LAMP2 firstly in dentate gyrus, and finally all over the hippocampus in P301S.

The amyloidogenic model APP/PS1 showed accumulation of all these markers within dystrophic neurites associated to amyloid plaques (Sanchez-Varo et al., 2012; Torres et al., 2012). Accordingly, the alterations in proteostasis in tau models seemed to be associated to the location of the corresponding proteinopathy, NFTs in ThyTau22 model, and throughout all the hippocampus in P301S. It is possible that UPS system cannot deal with oligomers of tau that are bigger than the proteasome pore (Tai et al., 2012), and collapses. Then, tau aggregates might be derived to autophagy-lysosomal system, which in turn also depends on axoplasmic flow for the fusion of autophagosomes and lysosomes. Thereby, these mechanisms could be affected by the tau loss-of-function, creating a vicious circle.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

6.4.2 DISTINCT MICROGLIAL RESPONSES IN P301S AND THYTAU22 HIPPOCAMPUS

Our group has previously reported the existence of different microglial responses between Aβ and tau-based mouse models (Sanchez-Mejias et al., 2016). Models of amyloidosis, such as APP or APP/PS1 transgenic mice, showed strong microglial activation, whereas the model ThyTau22 displayed a weak microglial response (Sanchez-Mejias et al., 2016; Gutierrez and Vitorica, 2018; Navarro et al., 2018). In this work, we have compared the expression of different microglial genes in the hippocampus of ThyTau22 and P301S mouse models, including an APP-based model as positive control (Romero-Molina et al., 2018). Firstly, the expression of microglial genes identified as DAM (disease-associated microglia) program was evaluated by qPCR. As expected (Sanchez-Mejias et al., 2016), ThyTau22 model displayed a limited expression of microglial activation markers (such as CD45, CD68, TREM2, Clec7a, and IGF-1) at both early (2-4 months) and advanced ages (9-12 month-old), while the expression levels were significantly increased in the APP model (as compared to WT). Conversely, we found a strong microglial activation in the P301S model (restricted to older ages), even higher than that observed in the APP positive control. We have also determined the expression of some homeostatic genes, since it has been described that microglial activation is accompanied by a drop in their expression (Keren-Shaul et al., 2017). No differences were observed in TMEM119 or P2ry12, but a significant increase in CX3CR1 and Iba1 markers was found, which may be due to an increment in the amount of microglial cells, suggesting a proliferative process of microglia upon activation (Askew et al., 2017; Baglietto-Vargas et al., 2017; Tay et al., 2017). In this sense, preliminary results from Dr. Vitorica's lab have shown an increase in Ki67 proliferation marker in P301S model.

The histological characterization of the microglial response in the hippocampus of Thytau22 and P301S mice from 2 to 12/18 months of age was initially performed by immunohistochemical staining with Iba1. This technique showed the regular distribution of microglial cells throughout the hippocampus, and evidenced that the morphological changes related to microglial activation (short processes and hypertrophic cell body) were easily detected in the P301S, but scarcely in ThyTau22, exhibiting a resting morphotype like WT cells. Next, the analysis of the microglial load, as area occupied by Iba1-immunopositive cells was addressed. Iba1 loading was found to be increased with aging, showing a positive correlation with tau accumulation in P301S. In addition, most of microglial cells in the hippocampus of this mouse model were strongly positive for the markers of activation CD45, TREM2, and Galectin-3 (Gal3). Moreover, CD45-positive monocytes/lymphocytes were found to be infiltrated in hippocampal parenchyma, especially in the dentate gyrus from old P301S mice. As expected, CD45-loading significantly increased with age in P301S, positively correlating with tau accumulation. TREM2 is a DAM gene highly expressed by activated CD45-positive microglia,

UNIVERSIDAD DE MALAGA

coding for a microglial receptor that drive DAM phenotype, and seems to play a key role in plaque isolation. In fact, the presence of some variations in *TREM2* gene increase the risk for AD. Gal-3 is a carbohydrate-binding protein also associated with Aβ aggregation/compaction (Venegas et al., 2017; Boza-Serrano et al., 2019). The amount of both TREM2- or Gal-immunopositive cells was also progressively increasing with age. However, ThyTau22 mice showed scarce, if any, positive cell for any of these proteins.

6.4.2.1 Microglial activation is TREM2-dependent and mediates phospho-tau phagocytosis

Microglia-mediated phagocytosis of synapses and apoptotic neurons is increased in AD and pure tauopathies (reviewed in Galloway et al., 2019). Moreover, microglial cells maintain protein homeostasis by phagocyting Aβ peptide (D'Andrea et al., 2004; Zuhoff et al., 2017) and pathologic tau (Bolós et al., 2015; Sanchez-Mejias et al., 2016; Das et al., 2020). We have just shown that there is a widespread microglial activation (DAM profile) in P301S mouse model, in contrast to a low response in ThyTau22. Next, we have investigated in depth, at cellular and subcellular level, the interrelationship between phospho-tau containing neurons and activated/phagocytic microglia in the hippocampus of ThyTau22 and P301S mice.

For this purpose, we included the analysis of the specific marker for activated microglia with phagocytic activity CD68, and the lysosomal marker LAMP1. In WT mice, CD68 immunostaining showed a basal signal, mostly consisting of little immunoreactive dots in microglial cells with quiescent morphology. Scarce CD68-positive microglial cells with a reactive morphotype were found in ThyTau22 hippocampus, usually close to phospho-tau containing regions (stratum pyramidal). However, in P301S mouse hippocampus, this staining exhibited a similar pattern to CD45. Triple immunofluorescence Iba1/AT8/LAMP1 demonstrated an intimate contact of LAMP1 high-expressing microglia with AT8 positive neurons in P301S mice. As shown, CD68 and Gal-3 microglial cells presented AT8 immunoreactivity, indicating a phospho-tau internalization. It is remarkable that, in every case, activated microglial cells were found interacting with phospho-tau-containing soma or neuropil. Interestingly, a highly proliferative and phagocytic subtype of microglia, the rod microglia (Tam and Ma, 2014), was found by both optic and electron microscopy to be intimately associated to apical dendrites in stratum radiatum, mostly in old P301S mice. These elongated cells presented an electrodense cytoplasm with a heterochromatic nucleus. Little is known concerning rod microglia, but in AD *postmortem* samples, they have been described to associate to PHFs (Bachstetter et al., 2015, 2017). Even though we cannot rule out the possibility of microglia phagocytosing extracellular phospho-tau, it is possible these cells are capturing tau from the inside of neurons.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

6.4.2.2 Differential astroglial response may be the consequence of distinct microglial activation profiles

Astroglial cells acquire a reactive phenotype around plaques in both AD brains and amyloidogenic models, but their role remains unclear. In this sense, our group has recently reported that reactive astrocytes phagocyte periplaque dystrophic neurites (Gomez-Arboledas, et al., 2018). Nevertheless, phospho-tau/astrocytes interaction has not yet been deeply investigated.

Analyzing the specific astrocytic marker GFAP by immunohistochemistry, the subsequent quantification evidenced that P301S showed an intense astrogliosis in the hippocampus, correlating with phospho-tau pathology, and according to the microglial activation pattern. As reported with microglia, astroglial reactivity was more intense in this model than in ThyTau22 mice, pointing to a coordination between both glial responses, which may be directed by microglia. Moreover, ultrastructural analysis demonstrated the location of AT8-positive structures within astrocytes cytoplasm, and specially in perivascular feet, suggesting the involvement of these cells in the clearance of pathologic phospho-tau through the blood-brain barrier. In this sense, it has been reported that tau isoforms can be detected in plasm after being injected in ventricles (Banks et al., 2016), and the glymphatic system seem to be involved (Iliff et al., 2014; Patel et al., 2019), but still little is known about this process.

Therefore, phospho-tau seems to induce a DAM phenotype different to what has been described in amyloidogenic models, suggesting both pathologies give rise to different microglial activation profiles. Moreover, these findings demonstrated the existence of different microglial responses also between distinct tau-based lines. Microglial, and the subsequent astroglial activation phenotypes, are seemingly conditioned not only by the amount of pathological tau, but also by the strain diversity and their aggregation profiles. In addition, microglia may mediate tau pathological progression by phagocyting extracellular tau from media or neuronal exosomes (Laurent et al., 2018) or even releasing tau aggregates whenever they cannot successfully eliminate them (Asai et al., 2015). Gal-3 may function as an opsonin (Cockram et al., 2019) allowing apoptotic cells phagocytosis (Karlsson et al., 2009), potentiating neuronal and synaptic loss. Lymphocytic infiltration has been reported in AD patients (Speciale et al.,2007; Fehervari et al., 2016), and also in APP- (Jimenez et al., 2008; Ferreti et al., 2016; St-Amour et al., 2019) and tau- based models (Laurent et al., 2017, 2018), and may represent another factor with unknown impact in proinflammatory response and neuronal loss. Thus, the design of compounds for the modulation of glial activation as a therapy for AD, should definitively take into account the functional diversity of these cells.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

6.4.3 SYNAPTIC AND NEURONAL ALTERATIONS IN MOUSE MODEL OF TAUOPATHIES

6.4.3.1 **Synaptic affectation is more severe in P301S mouse hippocampus**

Cognitive and memory impairment in early stages of AD is likely caused by a synaptic dysfunction preceding neuronal loss. In fact, synaptic loss/damage has been considered the best pathological correlate of early decline in cognitive function in AD. In addition, both Aβ and tau mediate synaptic functions under physiological conditions. Aβ regulate neurotransmitter release (Abramov et al., 2009) whereas tau is relevant for axonal and spines stability (Guerrero-Muñoz et al., 2015; Huang et al., 2016). Therefore, alterations in these proteins may give rise to synaptic dysfunction (Forner et al., 2017). However, synaptotoxic effect of Aβ has been more in-depth analyzed in contrast to phospho-tau. In addition, the role of glial activation in synaptic and neuronal damage is gaining interest among researches. Taking all these points into account, this part of the work was focused on the synaptic and neuronal pathology in tauopathy models.

The initial approach to evaluate the synaptic condition of ThyTau22 was analyzing the general presynaptic marker synaptophysin (Syn). Levels of this molecule have been found to be decreased in AD patients (Masliah et al., 2001) and transgenic mouse (Mucke et al., 2000; Rutten et al., 2005). Firstly, by WB we found there was a significant decrease in Syn levels in ThyTau22 hippocampus at 9 months of age, which remained at similarly low levels at 12 months. Nevertheless, the differences were not statistically significant during the model aging. Syn-immunohistochemistry showed slight differences between WT and ThyTau22 genotype with obvious differences in stratum lucidum thickness, initiated from 2 months of age. This result was confirmed with another presynaptic marker (SNAP25) immunostaining.

Since glutamatergic and GABAergic neurotransmission systems are specifically affected in AD (Paula-Lima et al., 2013; Giovannetti et al., 2019; Sanchez-Mejias et al., 2019) and pure tauopathies (Levenga et al., 2014; Crescenzi et al., 2017) we analyzed VGLUT-1 (*vesicular glutamate transporter 1*), PSD95 (postsynaptic marker) and VGAT (*Vesicular GABA Transporter*). Glutamatergic marker was significantly reduced at 12 months of age, paralleled by an increase in PSD95, probably as a compensatory mechanism due to the reduced excitatory input in this cerebral region. Inhibitory innervation (VGAT) was also found to be reduced in ThyTau22 mouse from 9 months of age. Therefore, ThyTau22 model exhibit a general loss of presynaptic terminals in the hippocampus from very early ages, which was progressing with time. This decrease might be due to the pathological progression of phospho-tau combined with specific alterations that are likely associated to this specific genotype.

On the other hand, synaptic pathology in P301S mice was much more intense when it comes to the loss of presynaptic markers, both Syn and VGLUT-1, in the hippocampus at 12 months of age compared to young mice (4-month-old). This result was expected due to the

UNIVERSIDAD DE MALAGA

stronger phospho-tau pathology and widespread microglial activation found in the parenchyma of these animals, but we cannot rule out the impact of the strong hydrocephaly developed by these animals at this old age.

6.4.3.2 Differential neuronal degeneration of parvalbumin interneurons takes place in old P301S, while cholinergic degeneration is a common process in both models

We have previously reported that Parvalbumin (PV)- containing interneurons are a vulnerable subppopulation in AD patients. This neuronal loss seems to be mediated by tau pathology (Sanchez-Mejias et al., 2019). Hence, the vulnerability of PV-positive cells to phospho-tau accumulation has been investigated in 12 month-old ThyTau22 and P301S hippocampus by stereological quantification. Numerical density (cells/mm^3) of PV-cells in ThyTau22 mouse was unaltered in comparison to age-matched WT. However, there was a significant decrease in the total number of PV-positive neurons in P301S mice.

The specific dysfunction/loss of basal forebrain cholinergic neurons and their projections has been reported as one of the earliest pathological events in AD. Consequently, in order to compensate this cholinergic imbalance, many compounds whose target is the acetylcholinesterase inhibition have been raised, but with limited success. Cholinergic projections from brain stem nuclei arrive to hippocampus (Pasquier and Reinoso-Suarez, 1978; Schäfer et al., 1998) and their affectation in AD has been well documented (Kása et al., 1997; Pepeu and Grazia-Giovannini, 2017; Hampel et al., 2018). Specifically, cholinergic fibers originating from the medial septal nucleus (MS) and the vertical limb of the diagonal band (VDB) arriving to hippocampal formation terminate innervating pyramidal and granular cell layers. The activity of the septohippocampal projection has been the subject of much interest with regard to its possible pacemaker function in orchestrating hippocampal network activities (Cobb and Davies 2005). Interestingly, hypoactivity of septohippocampal projections underlies the earliest AD symptomatology (Riekkinen et al., 1990) mediated by reduction in choline acetyltransferase (ChAT) activity (Bergmann et al., 1978; Perry et al., 1987). Since ChAT is an enzyme implicated in the biosynthesis of the neurotransmitter acetylcholine, present in cholinergic neurons and fibers, it is used as a marker for monitoring the functional state of this cell type in the nervous system.

Importantly, animal models for AD also reproduce this cholinergic pathology displaying neuronal loss and axonal pathology (loss of projections, dystrophic neurites). In ThyTau22 model, ChAT protein levels were decreased at 9 months compared to age-matched WT. Differences became statistically significant later, at 12 months of age. ChAT-immunostaining in hippocampal formation showed a strong increase in supragranular plexus immunoreactivity from 9 months of age. Finally, we have detected the loss of cholinergic neurons from both MS and Meynert basal nuclei in both tauopathy models by stereological quantification. The loss of

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

septal neurons together with the impairment of septohippocampal fibers has already been described with other techniques in ThyTau22 model by Belarbi et al., (2009, 2011) at the age of 12 months, reinforcing our results.

Analysis by electron microscopy of principal hippocampal cells allowed the identification of nuclear indentations and mitochondrial fragmentations/alterations in phospho-tau containing neurons. These subcellular pathological manifestations were more severe and more frequently detected in AT8-positive P301S neurons than in cells containing NFTs from ThyTau22. Moreover, some granular cells in close contact with microglial cells in P301S dentate gyrus, exhibited a rare weakly electron-dense phenotype, associate to the presence of vacuoles. Overall, these data highlight the differential neurotoxic effect of different strains and aggregates of phospho-tau, which may be mediated by the action of any specific microglial subpopulation.

6.4.4 *IN VIVO* ANALYSIS OF MICROTUBULE-STABILIZATION IN AN APP/PS1 MOUSE MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE

In tauopathies such as AD, microtubule destabilization negatively affects to axonal and synaptic integrity contributing to neurodegeneration. In this work, we have tested the effect of intraperitoneal administration of a microtubule stabilizer (epothilone D, EpoD) in the hippocampus of the double transgenic APP/PS1 mouse model, starting before the onset of the pathology (from 3 to 6 months of age).

6.4.4.1 EpoD rescues memory deficits in APP/PS1 mice

Cognitive skills of APP/PS1^{EpoD} and APP/PS1^{Veh} mice were evaluated during the last two weeks of EpoD treatment. Age-matched (6-month-old) WT mice were included as controls. APP/PS1^{EpoD} or APP/PS1^{Veh} mice did not shown locomotive or exploratory behavior defects in comparison to WT animals at open-field test (OF). Episodic-like memory was tested using the old-location task (OLT, spatial memory) and the novel object recognition task (NORT, recognition memory), demonstrating that EpoD administration protected APP/PS1 mouse from the cognitive deficits observed in vehicle group. Next, long-term memory analyzed using a context Y-maze showed a protective action of this compound on this type of memory. Finally, spatial learning and memory were also evaluated by Morris Water Maze (MWM). The results obtained in the acquisition phase indicated that microtubule stabilization preserved APP/PS1 allocentric learning. Later, during the probe trial (retention phase), APP/PS1^{Veh} mice showed significant difficulties in performing the task, in contrast to the other two groups (WT and EpoD). Therefore, EpoD treatment was also able to maintain the short-term spatial memory in APP/PS1 mice. Overall, these data indicate that hippocampal-related cognitive function was protected in APP/PS1^{EpoD} mice.

UNIVERSIDAD DE MALAGA

6.4.4.2 EpoD improves microtubular stability in the hippocampus of APP/PS1

Acetylated tubulin (AcTub) is a well-known biomarker of stable microtubules (Schulze et al., 1987; Lou et al., 2014; Portran et al., 2017). Immunofluorescence confocal microscopy of AcTub depicted neuronal somata, apical dendrites and axonal tracts (alveus) in the hippocampus of WT mice. Thio-S co-staining evidenced the impact of amyloid plaques in the APP/PS1 hippocampal neuropil. APP/PS1^{Veh} mice showed lower AcTub immunoreactivity than WT group, evidencing higher microtubule instability. Furthermore, the intensity of AcTub immunostaining in APP/PS1^{EpoD} mice was stronger than in vehicle group, pointing to a better preservation of microtubule network in neurons of the EpoD-treated mice hippocampus.

6.4.4.3 EpoD protects against Aβ-induced synaptic/axonal pathology

The hippocampus of APP/PS1 model displays significant amyloid extracellular deposition surrounded by dystrophic neurites of axonal/presynaptic nature (Blanchard et al., 2003; Caballero et al., 2007; Gavilán et al. 2007; Sanchez-Varo et al., 2012; Torres et al., 2012; Trujillo-Estrada et al., 2013, 2014; Gomez-Arboledas et al., 2018) since early ages. The functional integrity of neuronal processes/synapses strongly depends on axonal flow, and thereby, of microtubules. Thus, to investigate if the cognitive protection observed in APP/PS1^{EpoD} group was consequence of synaptic preservation, we studied presynaptic and postsynaptic markers, synaptophysin (Syn) and PSD95, respectively. WB showed a significant decrease of Syn levels in APP/PS1^{Veh} mice that were almost recovered by EpoD administration. These data were then validated by immunohistochemistry, since we observed a significant protection of Syn-immunoreactivity in the inner molecular layer of dentate gyrus, receiving entorhinal and local GABAergic innervation (Bakst et al., 1986; Deller et al., 1996). Accordingly, the protein levels of PSD95 were significantly recovered in the hippocampus of EpoD mice compared to vehicle group.

Considering that synaptic preservation could be mediated by the amelioration of the axonal pathology reported in this model (Sanchez-Varo et al., 2012; Torres et al., 2012), we analyzed the accumulation of total ubiquitinated proteins and the ubiquitin-positive dystrophies in the hippocampus by quantitative WB and ubiquitin immunolabeling, respectively. Both techniques confirmed that EpoD administration significantly reduced ubiquitin hippocampal accumulation in the hippocampus of APP/PS1^{EpoD} animals compared to APP/PS1^{Veh}, visible as a decrease in ubiquitin-positive dystrophic neurites. Given that dystrophies also contain APP protein (Sanchez-Varo et al., 2012), we corroborated the decrease of periplaque dystrophic pathology using an anti-APP antibody. These data indicate that the amelioration of axonal transport defects by improving microtubular stability with EpoD leads to the preservation of synaptic integrity, and reduced the dystrophic pathology in this amyloidogenic mouse model.

UNIVERSIDAD DE MALAGA

6.4.4.4 Microtubular stabilization reduces SOM interneuron loss

SOM neuron loss is a well-established pathogenic event in AD brains (Kumar, 2005; Epelbaum et al., 2009; Sanchez-Mejias et al., 2019). APP/PS1 mouse exhibit an important loss of GABAergic interneurons at very early ages in memory-relevant brain areas such as hippocampus, subiculum, entorhinal and perirhinal cortices (Ramos et al., 2006; Moreno-Gonzalez et al., 2009; Baglietto-Vargas et al., 2010; Trujillo-Estrada et al., 2013, 2014; Sanchez-Mejias et al., 2019). The quantification of SOM- interneurons and SOM-containing dystrophies in the CA1 region of hippocampus by stereology showed that EpoD treatment significantly reduced the numerical density of plaque-associated SOM-positive neuritic dystrophies *versus* vehicle-injected mice. Importantly, the amount (cells/mm^3) of SOM cells was partly recovered in APP/PS1^{EpoD} in comparison to vehicle group, even though did not reach WT values. Therefore, EpoD treatment was able to protect, not only from axonal damage but also from cell death this specific interneuron subpopulation in the hippocampus of APP/PS1 model. To the best of our knowledge, this is the first study reporting prevention of neuronal death in an *in vivo* amyloidogenic model. The neuroprotection of vulnerable SOM cells could partly give an explanation to the cognitive recovery in EpoD-treated mice.

6.4.4.5 EpoD reduces both phospho-tau and Aβ pathology

Even though APP/PS1 mice do not develop NFTs, they do reproduce key pathological modifications of tau such as hyperphosphorylation, accumulating AT8-positive aggregates within dystrophic neuropile around plaques, and thus evidenciating a link between Aβ and tau pathology. Thus, to evaluate the impact of EpoD treatment on the AD-like histopathological lesions we analyzed phospho-tau and Aβ build-up in the hippocampus of APP/PS1 model. Indeed, EpoD treatment attenuated tau pathology. When comparing AT8/TAU46 ratio by WB, APP/PS1 mice showed a significant reduction in phospho-tau after EpoD treatment levels, which was accompanied by a significant decrease of AT8-positive dystrophic neurites in hippocampal CA1 subfield.

Concerning extracellular amyloid pathology, Aβ burden (evaluated with anti-Aβ42 and Thio-S stainings) was found to be significantly reduced in EpoD group. Even though the numerical density (plaques/mm^2) of amyloid plaques did not significantly change in CA1 subfield after treatment, the size of the deposits was significantly smaller in APP/PS1^{EpoD} mice compared to vehicle group. Importantly, using WB we found a significant reduction in total monomeric Aβ levels together with a striking drop in hippocampal oligomeric Aβ and in the intracellular Aβ accumulation within synaptosomal fraction in APP/PS1^{EpoD} hippocampus compared to APP/PS1^{Veh}. Since build-up of Aβ in the synaptosomes may reflect the axonal pathology in APP/PS1 mice (Sanchez-Varo et al., 2012), microtubule stabilization reduced the Aβ content

UNIVERSIDAD DE MALAGA

within the presynaptic terminals. This effect could be due to either an increase in lysosome-mediated Aβ degradation or, alternatively, to a decrease in APP processing at the synapses.

In order to check if microtubule stabilization could reduce Aβ production, we used an *in vitro* amyloidogenic model: the N2a-APPSwe cell line. Acute treatments (12h or 24h) with either vehicle or EpoD (100nM) solution were carried out and the intracellular content of Aβ was analyzed by WB. EpoD produced a significant reduction in intracellular Aβ in this cell line.

Next, levels of carboxi-terminal fragments derived from APP proteolytic processing (APP-CTFs) were analyzed in brain extracts from APP/PS1^{Veh} and APP/PS1^{EpoD} animals. No significant differences were found neither in the production of soluble APP-CTF, sAPPα and sAPPβ fragments, nor in APP-CTF in the synaptosomal fractions. Finally, the decrease in Aβ levels was confirmed to be unrelated to a direct inhibitory effect of EpoD on BACE-1 or γ-secretase activities, using membranes extracted from brain tissue of APP/PS1^{Veh} and APP/PS1^{EpoD} animals.

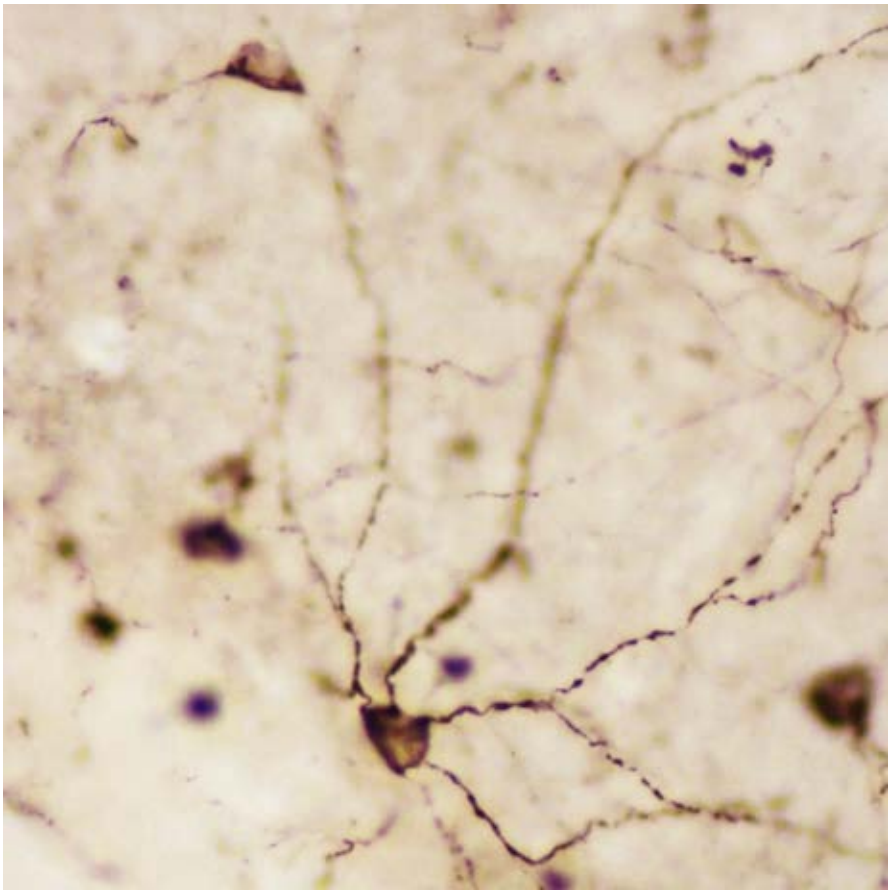
Taken together, our results suggested that EpoD treatment induced microtubule stabilization, leading to memory improvement, synaptic/axonal recovery and SOM neuronal protection. Strikingly, EpoD administration not only reduced tau pathology, but also the intra- and extra- cellular amyloid build-up. Therefore, MT-stabilizing drugs seem to be relevant candidates to be used for targeting both proteinopathies (Aβ and tau) in AD patients.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

7. BIBLIOGRAFÍA



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Abbas AI, Sundiang MJM, Henoch B, Morton MP, Bolkan SS, Park AJ, Harris AZ, Kellendonk C, Gordon JA. 2018. Somatostatin Interneurons Facilitate Hippocampal-Prefrontal Synchrony and Prefrontal Spatial Encoding. *Neuron* **100**: 926-939.e3.

Abramov E, Dolev I, Fogel H, Ciccotosto GD, Ruff E, Slutsky I. 2009. Amyloid-B as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses. *Nat Neurosci* **12**: 1567–1576.

Allendorf DH, Puigdellívol M, Brown GC. 2020. Activated microglia desialylate their surface, stimulating complement receptor 3-mediated phagocytosis of neurons. *Glia* **68**: 989–998.

Alonso ADC, Zaidi T, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. 2001. Hyperphosphorylation induces self-assembly of τ into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 6923–6928.

Alzheimer, A. (1907). An unusual disease of the cerebral cortex. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie*, 64, 146-148.

Ambrad Giovannetti E, Fuhrmann M. 2019. Unsupervised excitation: GABAergic dysfunctions in Alzheimer's disease. *Brain Res* **1707**: 216–226.

Amram S, Frenkel D. 2017. Animal Models of Alzheimer's Disease. In *Neuroprotection in Alzheimer's Disease*, pp. 31–58, Elsevier Inc.

Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'keefe J. 2007. *The Hippocampus Book*.

Andrew RJ, Kellett KAB, Thinakaran G, Hooper NM. 2016. A Greek tragedy: The growing complexity of Alzheimer amyloid precursor protein proteolysis. *J Biol Chem* **291**: 19235–19244.

Andrews SJ, Fulton-Howard B, Goate A. 2020. Interpretation of risk loci from genome-wide association studies of Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*.

Antón-Fernández A, Aparicio-Torres G, Tapia S, DeFelipe J, Muñoz A. 2017. Morphometric alterations of Golgi apparatus in Alzheimer's disease are related to tau hyperphosphorylation. *Neurobiol Dis* **97**: 11–23.

Arbel-Ornath M, Hudry E, Boivin JR, Hashimoto T, Takeda S, Kuchibhotla K V., Hou S, Lattarulo CR, Belcher AM, Shakerdge N, et al. 2017. Soluble oligomeric amyloid-β induces calcium dyshomeostasis that precedes synapse loss in the living mouse brain. *Mol Neurodegener* **12**: 27.

Arendt T. 2009. Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **118**: 167–179.

Arendt T, Stieler JT, Holzer M. 2016. Tau and tauopathies. *Brain Res Bull* **126**: 238–292.

Arranz AM, De Strooper B. 2019. The role of astroglia in Alzheimer's disease: pathophysiology and clinical implications. *Lancet Neurol* **18**: 406–414.

Asai H, Ikezu S, Tsunoda S, Medalla M, Luebke J, Haydar T, Wolozin B, Butovsky O, Kügler S, Ikezu T. 2015. Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat Neurosci* **18**: 1584–1593.

Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, Benavides-Piccione R, Burkhalter A, Buzsáki G, Cauli B, DeFelipe J, Fairén A, et al. 2008. Petilla terminology: Nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* **9**: 557–568.

Askew K, Gomez-Nicola D. 2018. A story of birth and death: Insights into the formation and dynamics of the microglial population. *Brain Behav Immun* **69**: 9–17.

Askew K, Li K, Olmos-Alonso A, Garcia-Moreno F, Liang Y, Richardson P, Tipton T, Chapman MA, Riecken K, Beccari S, et al. 2017. Coupled Proliferation and Apoptosis Maintain the Rapid Turnover of Microglia in the Adult Brain. *Cell Rep* **18**: 391–405.

Avila J, Jimenez JS, Sayas CL, Bolos M, Zabala JC, Rivas G, Hernandez F. 2016. Tau Structures. *Front Aging Neurosci* **8**.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Ayers JI, Giasson BI, Borchelt DR. 2018. Prion-like Spreading in Tauopathies. *Biol Psychiatry* **83**: 337–346.

Bachiller S, Jiménez-Ferrer I, Paulus A, Yang Y, Swanberg M, Deierborg T, Boza-Serrano A. 2018. Microglia in neurological diseases: A road map to brain-disease dependent-inflammatory response. *Front Cell Neurosci* **12**: 488.

Bachstetter AD, Ighodaro ET, Hassoun Y, Aldeiri D, Neltner JH, Patel E, Abner EL, Nelson PT. 2017. Rod-shaped microglia morphology is associated with aging in 2 human autopsy series. *Neurobiol Aging* **52**: 98–105.

Bachstetter AD, Van Eldik LJ, Schmitt FA, Neltner JH, Ighodaro ET, Webster SJ, Patel E, Abner EL, Kryscio RJ, Nelson PT. 2015. Disease-related microglia heterogeneity in the hippocampus of Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies, and hippocampal sclerosis of aging. *Acta Neuropathol Commun* **3**: 32.

Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, Vizuete M, et al. 2010. Calretinin interneurons are early targets of extracellular amyloid-β pathology in PS1/AβPP Alzheimer mice hippocampus. *J Alzheimer's Dis* **21**: 119–132.

Baglietto-Vargas D, Sánchez-Mejias E, Navarro V, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Gómez-Arboledas A, Sánchez-Mico M, Sánchez-Varo R, Vizuete M, Dávila JC, et al. 2017. Dual roles of Aβ in proliferative processes in an amyloidogenic model of Alzheimer's disease. *Sci Rep* **7**.

Bagyinszky E, Youn YC, An SSA, Kim S. 2014. The genetics of Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging* **9**: 535–551.

Ballatore C, Lee VMY, Trojanowski JQ. 2007. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* **8**: 663–672.

Banks WA, Kovac A, Majerova P, Bullock KM, Shi M, Zhang J. 2016. Tau proteins cross the blood-brain barrier. *J Alzheimer's Dis* **55**: 411–419.

Barbier P, Zejneli O, Martinho M, Lasorsa A, Belle V, Smet-Nocca C, Tsvetkov PO, Devred F, Landrieu I. 2019. Role of tau as a microtubule-associated protein: Structural and functional aspects. *Front Aging Neurosci* **10**.

Barten DM, Fanara P, Andorfer C, Hoque N, Anne Wong PY, Husted KH, Cadelina GW, DeCarr LB, Yang L, Liu V, et al. 2012. Hyperdynamic microtubules, cognitive deficits, and pathology are improved in tau transgenic mice with low doses of the microtubule-stabilizing agent BMS-241027. *J Neurosci* **32**: 7137–7145.

Bateman RJ, Benzinger TL, Berry S, Clifford DB, Duggan C, Fagan AM, Fanning K, Farlow MR, Hassenstab J, McDade EM, et al. 2017. The DIAN-TU Next Generation Alzheimer's prevention trial: Adaptive design and disease progression model. *Alzheimer's Dement* **13**: 8–19.

Bemiller SM, McCray TJ, Allan K, Formica S V., Xu G, Wilson G, Kokiko-Cochran ON, Crish SD, Lasagna-Reeves CA, Ransohoff RM, et al. 2017. TREM2 deficiency exacerbates tau pathology through dysregulated kinase signaling in a mouse model of tauopathy. *Mol Neurodegener* **12**: 74.

Benilova I, Karran E, De Strooper B. 2012. The toxic Aβ oligomer and Alzheimer's disease: An emperor in need of clothes. *Nat Neurosci* **15**: 349–357.

Bernal GM, Peterson DA. 2011. Phenotypic and gene expression modification with normal brain aging in GFAP-positive astrocytes and neural stem cells. *Aging Cell* **10**: 466–482.

Bi M, Gladbach A, Van Eersel J, Ittner A, Przybyla M, Van Hummel A, Chua SW, Hoven J Van Der, Lee WS, Müller J, et al. 2017. Tau exacerbates excitotoxic brain damage in an animal model of stroke. *Nat Commun* **8**.

Bigl V, Arendt T. 1991. Cholinergic neurons of the central nervous system: morphofunctional aspects. *Acta*

UNIVERSIDAD DE MALAGA

Psychiatr Scand **83**: 7–13.

Bilkei-Gorzo A. 2014. Genetic mouse models of brain ageing and Alzheimer's disease. *Pharmacol Ther* **142**: 244–257.

Birks J. 2006. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev*.

Bisht K, Sharma KP, Lecours C, Gabriela Sánchez M, El Hajj H, Milior G, Olmos-Alonso A, Gómez-Nicola D, Luheshi G, Vallières L, et al. 2016. Dark microglia: A new phenotype predominantly associated with pathological states. *Glia* **64**: 826–839.

Biswas RR, D MC, Rao ASRS, Kadali SR. 2014. Effect of atorvastatin on memory in albino mice. *JClinDiagnRes* **8**: HF01–HF04.

Bittar A, Bhatt N, Kayed R. 2020. Advances and considerations in AD tau-targeted immunotherapy. *Neurobiol Dis* **134**: 104707.

Biundo F, Del Prete D, Zhang H, Arancio O, D'Adamio L. 2018. A role for tau in learning, memory and synaptic plasticity. *Sci Rep* **8**.

Blanchard V, Moussaoui S, Czech C, Touchet N, Bonici B, Planche M, Canton T, Jedidi I, Gohin M, Wirths O, et al. 2003. Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with Aβ deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Exp Neurol* **184**: 247–263.

Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. 2006. Alzheimer's disease. *Lancet* **368**: 387–403.

Blennow K, Hampel H, Weiner M, Zetterberg H. 2010. Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* **6**: 131–144.

Bloom GS. 2014. Amyloid-β and tau: The trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA Neurol* **71**: 505–508.

Bohatschek M, Kloss CUA, Kalla R, Raivich G. 2001. In vitro model of microglial deramification: Ramified microglia transform into amoeboid phagocytes following addition of brain cell membranes to microglia-astrocyte cocultures. *J Neurosci Res* **64**: 508–522.

Boisvert MM, Erikson GA, Shokhirev MN, Allen NJ. 2018. The Aging Astrocyte Transcriptome from Multiple Regions of the Mouse Brain. *Cell Rep* **22**: 269–285.

Bolós M, Llorens-Martín M, Jurado-Arjona J, Hernández F, Rábano A, Avila J. 2015. Direct Evidence of Internalization of Tau by Microglia in Vitro and in Vivo. *J Alzheimer's Dis* **50**: 77–87.

Bolós M, Llorens-Martín M, Perea JR, Jurado-Arjona J, Rábano A, Hernández F, Avila J. 2017. Absence of CX3CR1 impairs the internalization of Tau by microglia. *Mol Neurodegener* **12**.

Boluda S, Iba M, Zhang B, Raible KM, Lee VMY, Trojanowski JQ. 2015. Differential induction and spread of tau pathology in young PS19 tau transgenic mice following intracerebral injections of pathological tau from Alzheimer's disease or corticobasal degeneration brains. *Acta Neuropathol* **129**: 221–237.

Booker SA, Vida I. 2018. Morphological diversity and connectivity of hippocampal interneurons. *Cell Tissue Res* **373**: 619–641.

Borchelt DR, Ratovitski T, Van Lare J, Lee MK, Gonzales V, Jenkins NA, Copeland NG, Price DL, Sisodia SS. 1997. Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron* **19**: 939–945.

Bossù P, Spalletta G, Caltagirone C, Ciaramella A. 2015. Myeloid dendritic cells are potential players in human neurodegenerative diseases. *Front Immunol* **6**.

Botchway BOA, Moore MK, Akinleye FO, Iyer IC, Fang M. 2018. Nutrition: Review on the possible treatment for Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis* **61**: 867–883.

Bott JB, Héraud C, Cosquer B, Herbeaux K, Aubert J, Sartori M, Goutagny R, Mathis C. 2016. APOE-sensitive cholinergic sprouting compensates for hippocampal dysfunctions due to reduced entorhinal input. *J Neurosci* **36**: 10472–10486.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Boutajangout A, Authelet M, Blanchard V, Touchet N, Tremp G, Pradier L, Brion JP. 2004. Characterisation of cytoskeletal abnormalities in mice transgenic for wild-type human tau and familial Alzheimer's disease mutants of APP and presenilin-1. *Neurobiol Dis* **15**: 47–60.

Boza-Serrano A, Reyes JF, Rey NL, Leffler H, Bousset L, Nilsson U, Brundin P, Venero JL, Burguillos MA, Deierborg T. 2014. The role of Galectin-3 in α-synuclein-induced microglial activation. *Acta Neuropathol Commun* **2**: 1–14.

Boza-Serrano A, Ruiz R, Sanchez-Varo R, García-Revilla J, Yang Y, Jimenez-Ferrer I, Paulus A, Wennström M, Vilalta A, Allendorf D, et al. 2019. Galectin-3, a novel endogenous TREM2 ligand, detrimentally regulates inflammatory response in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 1–23.

Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretzschmar H, Tredici K. 2006. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol* **112**: 389–404.

Braak H, Braak E, Bohl J. 1993. Staging of alzheimer-related cortical destruction. *Eur Neurol* **33**: 403–408.

Braak H, Braak E. 1991. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* **82**: 239–259.

Braak H, Braak E. 1991. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* **82**: 239–259.

Brelstaff J, Tolkovsky AM, Ghetti B, Goedert M, Spillantini MG. 2018. Living Neurons with Tau Filaments Aberrantly Expose Phosphatidylserine and Are Phagocytosed by Microglia. *Cell Rep* **24**: 1939-1948.e4.

Brelstaff J, Tolkovsky AM, Ghetti B, Goedert M, Spillantini MG. 2018. Living Neurons with Tau Filaments Aberrantly Expose Phosphatidylserine and Are Phagocytosed by Microglia. *Cell Rep* **24**: 1939-1948.e4.

Breuilh L, Vanhoutte F, Fontaine J, Van Stijn CMW, Tillie-Leblond I, Capron M, Faveeuw C, Jouault T, Van Die I, Gosset P, et al. 2007. Galectin-3 modulates immune and inflammatory responses during helminthic infection: Impact of galectin-3 deficiency on the functions of dendritic cells. *Infect Immun* **75**: 5148–5157.

Brill MS, Kleele T, Ruschkies L, Wang M, Marahori NA, Reuter MS, Hausrat TJ, Weigand E, Fisher M, Ahles A, et al. 2016. Branch-Specific Microtubule Destabilization Mediates Axon Branch Loss during Neuromuscular Synapse Elimination. *Neuron* **92**: 845–856.

Brown GC, St George-Hyslop PH. 2017. Deciphering microglial diversity in Alzheimer's disease. *Science (80-)* **356**: 1123–1124.

Brunden KR, Lee VM, Smith AB, Trojanowski JQ, Ballatore C. 2017. Altered microtubule dynamics in neurodegenerative disease: Therapeutic potential of microtubule-stabilizing drugs. *Neurobiol Dis* **105**: 328–335.

Brunden KR, Zhang B, Carroll J, Yao Y, Potuzak JS, Hogan AML, Iba M, James MJ, Xie SX, Ballatore C, et al. 2010. Epothilone D improves microtubule density, axonal integrity, and cognition in a transgenic mouse model of tauopathy. *J Neurosci* **30**: 13861–13866.

Brunello CA, Merezhko M, Uronen RL, Huttunen HJ. 2019. Mechanisms of secretion and spreading of pathological tau protein. *Cell Mol Life Sci* 1–24.

Burgos-Ramos E, Hervás-Aguilar A, Aguado-Llera D, Puebla-Jiménez L, Hernández-Pinto AM, Barrios V, Arilla-Ferreiro E. 2008. Somatostatin and Alzheimer's disease. *Mol Cell Endocrinol* **286**: 104–111.

Burguillos MA, Svensson M, Schulte T, Boza-Serrano A, Garcia-Quintanilla A, Kavanagh E, Santiago M, Viceconte N, Oliva-Martin MJ, Osman AM, et al. 2015. Microglia-secreted galectin-3 acts as a toll-like receptor 4 ligand and contributes to microglial activation. *Cell Rep* **10**: 1626–1638.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Busche MA, Hyman BT. 2020. Synergy between amyloid-β and tau in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*.

Bussière T, Bard F, Barbour R, Grajeda H, Guido T, Khan K, Schenk D, Games D, Seubert P, Buttini M. 2004. Morphological characterization of Thioflavin-S-positive amyloid plaques in transgenic Alzheimer mice and effect of passive Aβ immunotherapy on their clearance. *Am J Pathol* **165**: 987–995.

Bustamante HA, González AE, Cerda-Troncoso C, Shaughnessy R, Otth C, Soza A, Burgos P V. 2018. Interplay between the autophagy-lysosomal pathway and the ubiquitin-proteasome system: A target for therapeutic development in alzheimer's disease. *Front Cell Neurosci* **12**: 126.

Butovsky O, Weiner HL. 2018. Microglial signatures and their role in health and disease. *Nat Rev Neurosci* **19**: 622–635.

Caballero C, Jimenez S, Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Gavilan MP, Ramos B, Del Rio JC, Vizuete M, Gutierrez A, et al. 2007. Inter-individual variability in the expression of the mutated form of hPS1M146L determined the production of Aβ peptides in the PS1xAPP transgenic mice. *J Neurosci Res* **85**: 787–797.

Calsolaro V, Edison P. 2016. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. *Alzheimer's Dement* **12**: 719–732.

Camilleri A, Ghio S, Caruana M, Weckbecker D, Schmidt F, Kamp F, Leonov A, Ryazanov S, Griesinger C, Giese A, et al. 2020. Tau-induced mitochondrial membrane perturbation is dependent upon cardiolipin. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* **1862**.

Cantero JL, Atienza M, Lage C, Zaborszky L, Vilaplana E, Lopez-Garcia S, Pozueta A, Rodriguez-Rodriguez E, Blesa R, Alcolea D, et al. 2019. Atrophy of Basal Forebrain Initiates with Tau Pathology in Individuals at Risk for Alzheimer's Disease. *Cereb Cortex* 1–16.

Cao J, Zhong MB, Toro CA, Zhang L, Cai D. 2019. Endo-lysosomal pathway and ubiquitin-proteasome system dysfunction in Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurosci Lett* **703**: 68–78.

Cao YN, Zheng LL, Wang D, Liang XX, Gao F, Zhou XL. 2018. Recent advances in microtubule-stabilizing agents. *Eur J Med Chem* **143**: 806–828.

Cardin JA. 2016. Snapshots of the brain in action: Local circuit operations through the lens of γ oscillations. *J Neurosci* **36**: 10496–10504.

Cartelli D, Casagrande F, Busceti CL, Bucci D, Molinaro G, Traficante A, Passarella D, Giavini E, Pezzoli G, Battaglia G, et al. 2013. Microtubule alterations occur early in experimental parkinsonism and the microtubule stabilizer Epothilone D is neuroprotective. *Sci Rep* **3**: 1837.

Cassel JC, Duconseille E, Jeltsch H, Will B. 1997. The fimbria-fornix/cingular bundle pathways: A review of neurochemical and behavioural approaches using lesions and transplantation techniques. *Prog Neurobiol* **51**: 663–716.

Castegna A, Lauderback CM, Mohmmad-Abdul H, Butterfield DA. 2004. Modulation of phospholipid asymmetry in synaptosomal membranes by the lipid peroxidation products, 4-hydroxynonenal and acrolein: Implications for Alzheimer's disease. *Brain Res* **1004**: 193–197.

Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA. 2010. *Alzheimer disease*. Mosby

Castro-Alvarez JF, Uribe-Arias A, Raigoza DM, Cardona-Gómez GP. 2014. Cyclin-dependent kinase 5, a node protein in diminished tauopathy: A systems biology approach. *Front Aging Neurosci* **6**: 232.

Chakravorty A, Jetto CT, Manjithaya R. 2019. Dysfunctional Mitochondria and Mitophagy as Drivers of Alzheimer's Disease Pathogenesis. *Front Aging Neurosci* **11**: 1–16.

Chen W-T, Lu A, Craessaerts K, Pavie B, Sala Frigerio C, Corthout N, Qian X, Laláková

UNIVERSIDAD DE MALAGA

J, Kühnemund M, Voytyuk I, et al. 2020. Spatial Transcriptomics and In Situ Sequencing to Study Alzheimer's Disease. *Cell* 976–991.

Cheng J, North BJ, Zhang T, Dai X, Tao K, Guo J, Wei W. 2018. The emerging roles of protein homeostasis-governing pathways in Alzheimer's disease. *Aging Cell* **17**: 1–21.

Cheng Y, Bai F. 2018. The association of tau with mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Front Neurosci* **12**: 163.

Cherry JD, Tripodis Y, Alvarez VE, Huber B, Kiernan PT, Daneshvar DH, Mez J, Montenigro PH, Solomon TM, Alosco ML, et al. 2016. Microglial neuroinflammation contributes to tau accumulation in chronic traumatic encephalopathy. *Acta Neuropathol Commun* **4**: 112.

Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev Y V. 2017. CD68/macrosialin: Not just a histochemical marker. *Lab Investig* **97**: 4–13.

Clavaguera F, Akatsu H, Fraser G, Crowther RA, Frank S, Hench J, Probst A, Winkler DT, Reichwald J, Staufenbiel M, et al. 2013. Brain homogenates from human tauopathies induce tau inclusions in mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 9535–9540.

Clavaguera F, Duyckaerts C, Haïk S. 2020. Prion-like properties of Tau assemblies. *Curr Opin Neurobiol* **61**: 49–57.

Cockram TOJ, Puigdellívol M, Brown GC. 2019. Calreticulin and Galectin-3 Opsonise Bacteria for Phagocytosis by Microglia. *Front Immunol* **10**: 2647.

Colin M, Dujardin S, Schraen-Maschke S, Meno-Tetang G, Duyckaerts C, Courade JP, Buée L. 2020a. From the prion-like propagation hypothesis to therapeutic strategies of anti-tau immunotherapy. *Acta Neuropathol* **139**: 3–25.

Colonna M, Butovsky O. 2017. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu Rev Immunol* **35**: 441–468.

Colonna M, Wang Y. 2016. TREM2 variants: New keys to decipher Alzheimer disease pathogenesis. *Nat Rev Neurosci* **17**: 201–207.

Congdon EE, Sigurdsson EM. 2018. Tau-targeting therapies for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* **14**: 399–415.

Coppola G, Chinnathambi S, Lee JJY, Dombroski BA, Baker MC, Soto-ortolaza AI, Lee SE, Klein E, Huang AY, Sears R, et al. 2012. Evidence for a role of the rare p.A152T variant in mapt in increasing the risk for FTD-spectrum and Alzheimer's diseases. *Hum Mol Genet* **21**: 3500–3512.

Craig LA, Hong NS, McDonald RJ. 2011. Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. *Neurosci Biobehav Rev* **35**: 1397–1409.

Cras P, Kawai M, Siedlak S, Perry G. 1991. Microglia are associated with the extracellular neurofibrillary tangles of alzheimer disease. *Brain Res* **558**: 312–314.

Crescenzi R, DeBrosse C, Nanga RPR, Byrne MD, Krishnamoorthy G, D'Aquilla K, Nath H, Morales KH, Iba M, Hariharan H, et al. 2017. Longitudinal imaging reveals subhippocampal dynamics in glutamate levels associated with histopathologic events in a mouse model of tauopathy and healthy mice. *Hippocampus* **27**: 285–302.

Crotti A, Sait HR, McAvoy KM, Estrada K, Ergun A, Szak S, Marsh G, Jandreski L, Peterson M, Reynolds TL, et al. 2019. BIN1 favors the spreading of Tau via extracellular vesicles. *Sci Rep* **9**: 1–20.

Cserép C, Pósfai B, Lénárt N, Fekete R, László ZI, Lele Z, Orsolits B, Molnár G, Heindl S, Schwarcz AD, et al. 2020. Microglia monitor and protect neuronal function through specialized somatic purinergic junctions. *Science (80-)* **367**: 528–537.

Cuello AC. 2017. Early and Late CNS Inflammation in Alzheimer's Disease: Two Extremes of a Continuum? *Trends Pharmacol Sci* **38**: 956–966.

Cummings J, Lee G, Ritter A, Sabbagh M,

UNIVERSIDAD DE MALAGA

Zhong K. 2019. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2019. *Alzheimer's Dement Transl Res Clin Interv* **5**: 272–293.

Cummings J, Lee G, Ritter A, Sabbagh M, Zhong K. 2020. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2020. *Alzheimer's Dement Transl Res Clin Interv* **6**.

Cummins N, Tweedie A, Zuryn S, Bertran-Gonzalez J, Götz J. 2019. Disease-associated tau impairs mitophagy by inhibiting Parkin translocation to mitochondria. *EMBO J* **38**.

D'Andrea MR, Cole GM, Ard MD. 2004. The microglial phagocytic role with specific plaque types in the Alzheimer disease brain. *Neurobiol Aging* **25**: 675–683.

D'Orange M, Aurégan G, Cheramy D, Gaudin-Guérif M, Lieger S, Guillermier M, Stimmer L, Joséphine C, Hérard AS, Gaillard MC, et al. 2018. Potentiating tangle formation reduces acute toxicity of soluble tau species in the rat. *Brain* **141**: 535–549.

Dabir D V., Robinson MB, Swanson E, Zhang B, Trojanowski JQ, Lee VMY, Forman MS. 2006. Impaired glutamate transport in a mouse model of tau pathology in astrocytes. *J Neurosci* **26**: 644–654.

Das R, Balmik AA, Chinnathambi S. 2020. Phagocytosis of full-length Tau oligomers by Actin-remodeling of activated microglia. *J Neuroinflammation* **17**: 10.

David DC, Hauptmann S, Scherping I, Schuessel K, Keil U, Rizzu P, Ravid R, Dröse S, Brandt U, Müller WE, et al. 2005. Proteomic and functional analyses reveal a mitochondrial dysfunction in P301L tau transgenic mice. *J Biol Chem* **280**: 23802–23814.

Dávila-Bouziguet E, Targa-Fabra G, Ávila J, Soriano E, Pascual M. 2019. Differential accumulation of Tau phosphorylated at residues Thr231, Ser262 and Thr205 in hippocampal interneurons and its modulation by Tau mutations (VLW) and amyloid-β peptide. *Neurobiol Dis* **125**: 232–244.

De Calignon A, Fox LM, Pitstick R, Carlson GA, Bacskai BJ, Spires-Jones TL, Hyman BT. 2010. Caspase activation precedes and leads to tangles. *Nature* **464**: 1201–1204.

De Calignon A, Polydoro M, Suárez-Calvet M, William C, Adamowicz DH, Kopeikina KJ, Pitstick R, Sahara N, Ashe KH, Carlson GA, et al. 2012. Propagation of Tau Pathology in a Model of Early Alzheimer's Disease. *Neuron* **73**: 685–697.

De Strooper B, Annaert W. 2010. Novel Research Horizons for Presenilins and γ-Secretases in Cell Biology and Disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* **26**: 235–260.

De Strooper B, Karran E. 2016. The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell* **164**: 603–615.

Deczkowska A, Keren-Shaul H, Weiner A, Colonna M, Schwartz M, Amit I. 2018. Disease-Associated Microglia: A Universal Immune Sensor of Neurodegeneration. *Cell* **173**: 1073–1081.

Deemyad T, Lüthi J, Spruston N. 2018. Astrocytes integrate and drive action potential firing in inhibitory subnetworks. *Nat Commun* **9**: 1–13.

Dejanovic B, Huntley MA, De Mazière A, Meilandt WJ, Wu T, Srinivasan K, Jiang Z, Gandham V, Friedman BA, Ngu H, et al. 2018. Changes in the Synaptic Proteome in Tauopathy and Rescue of Tau-Induced Synapse Loss by C1q Antibodies. *Neuron* **100**: 1322-1336.e7.

Deller T, Martinez A, Nitsch R, Frotscher M. 1996. A novel entorhinal projection to the rat dentate gyrus: Direct innervation of proximal dendrites and cell bodies of granule cells and GABAergic neurons. *J Neurosci* **16**: 3322–3333.

Dere E, Huston JP, De Souza Silva MA. 2005. Episodic-like memory in mice: Simultaneous assessment of object, place and temporal order memory. *Brain Res Protoc* **16**: 10–19.

Desikan RS, Schork AJ, Wang Y, Witoelar A, Sharma M, McEvoy LK, Holland D, Brewer JB, Chen CH, Thompson WK, et

UNIVERSIDAD DE MALAGA

al. 2015. Genetic overlap between Alzheimer's disease and Parkinson's disease at the MAPT locus. *Mol Psychiatry* **20**: 1588–1595.

DeVos SL, Hyman BT. 2017. Tau at the Crossroads between Neurotoxicity and Neuroprotection. *Neuron* **94**: 703–704.

Di Meco A, Li JG, Blass BE, Abou-Gharbia M, Lauretti E, Praticò D. 2017. 12/15-Lipoxygenase Inhibition Reverses Cognitive Impairment, Brain Amyloidosis, and Tau Pathology by Stimulating Autophagy in Aged Triple Transgenic Mice. *Biol Psychiatry* **81**: 92–100.

Dixit R, Ross JL, Goldman YE, Holzbaur ELF. 2008. Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science (80-)* **319**: 1086–1089.

Domínguez-Prieto M, Velasco A, Tabernero A, Medina JM. 2018. Endocytosis and Transcytosis of Amyloid-β Peptides by Astrocytes: A Possible Mechanism for Amyloid-β Clearance in Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis* **Preprint**: 1–16.

Du X, Wang X, Geng M. 2018. Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. *Transl Neurodegener* **7**.

DuBoff B, Götz J, Feany MB. 2012. Tau Promotes Neurodegeneration via DRP1 Mislocalization In Vivo. *Neuron* **75**: 618–632.

Duggal P, Mehan S. 2019. Neuroprotective Approach of Anti-Cancer Microtubule Stabilizers Against Tauopathy Associated Dementia: Current Status of Clinical and Preclinical Findings. *J Alzheimer's Dis Reports* **3**: 179–218.

Dujardin S, Commins C, Lathuiliere A, Beerepoot P, Fernandes AR, Kamath T V, De Los Santos MB, Klickstein N, Corjuc DL, Corjuc BT, et al. 2020. Tau molecular diversity contributes to clinical heterogeneity in Alzheimer's disease. *Nat Med* **26**: 1256–1263.

Eckermann K, Mocanu MM, Khlistunova I, Biernat J, Nissen A, Hofmann A, Schönig K, Bujard H, Haemisch A, Mandelkow E, et al. 2007. The β-propensity of tau determines aggregation and synaptic loss in inducible mouse models of tauopathy. *J Biol Chem* **282**: 31755–31765.

Eftekharzadeh B, Daigle JG, Kapinos LE, Coyne A, Schiantarelli J, Carlomagno Y, Cook C, Miller SJ, Dujardin S, Amaral AS, et al. 2018. Tau Protein Disrupts Nucleocytoplasmic Transport in Alzheimer's Disease. *Neuron* **99**: 925-940.e7.

Efthymiou AG, Goate AM. 2017. Late onset Alzheimer's disease genetics implicates microglial pathways in disease risk. *Mol Neurodegener* **12**: 1–12.

Elder GA, Gama Sosa MA, De Gasperi R. 2010. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med* **77**: 69–81.

Elie A, Prezel E, Guérin C, Denarier E, Ramirez-Rios S, Serre L, Andrieux A, Fourest-Lieuvin A, Blanchoin L, Arnal I. 2015. Tau co-organizes dynamic microtubule and actin networks. *Sci Rep* **5**: 1–10.

Elmaleh DR, Farlow MR, Conti PS, Tompkins RG, Kundakovic L, Tanzi RE. 2019. Developing Effective Alzheimer's Disease Therapies: Clinical Experience and Future Directions. *J Alzheimer's Dis* **71**: 715–732.

Ennaceur A. and Delacour J. 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1" Behavioral data. *Behav Brain Res* **31**: 47–59.

Epelbaum J, Guillou JL, Gastambide F, Hoyer D, Duron E, Viollet C. 2009. Somatostatin, Alzheimer's disease and cognition: An old story coming of age? *Prog Neurobiol* **89**: 153–161.

Erb C, Troost J, Kopf S, Schmitt U, Löffelholz K, Soreq H, Klein J. 2001. Compensatory mechanisms enhance hippocampal acetylcholine release in transgenic mice expressing human acetylcholinesterase. *J Neurochem* **77**: 638–646.

Evin G, Weidemann A. 2002. Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease Aβ amyloid peptides. *Peptides* **23**: 1285–1297.

UNIVERSIDAD DE MALAGA

Eyo UB, Peng J, Murugan M, Mo M, Lalani A, Xie P, Xu P, Margolis DJ, Wu LJ. 2016. Regulation of physical microglia–neuron interactions by fractalkine signaling after status epilepticus. *eNeuro* **3**.

Fanni AM, Vander Zanden CM, Majewska P V., Majewski J, Chi EY. 2019. Membrane-mediated fibrillation and toxicity of the tau hexapeptide PHF6. *J Biol Chem* **294**: 15304–15317.

Farah CA, Perreault S, Liazoghli D, Desjardins M, Anton A, Lauzon M, Paiement J, Leclerc N. 2006. Tau interacts with golgi membranes and mediates their association with microtubules. *Cell Motil Cytoskeleton* **63**: 710–724.

Fedorcsák I, Ehrenberg L. 1966. Effects of diethyl pyrocarbonate and methyl methanesulfonate on nucleic acids and nucleases. *Acta Chem Scand* **20**: 107–112.

Fehervari Z. 2016. Lymphocytes in Alzheimer's disease. *Nat Immunol* **17**: 355–355.

Fein JA, Sokolow S, Miller CA, Vinters H V., Yang F, Cole GM, Gylys KH. 2008. Co-localization of amyloid beta and tau pathology in Alzheimer's disease synaptosomes. *Am J Pathol* **172**: 1683–1692.

Feng L, Murugan M, Bosco DB, Liu Y, Peng J, Worrell GA, Wang HL, Ta LE, Richardson JR, Shen Y, et al. 2019. Microglial proliferation and monocyte infiltration contribute to microgliosis following status epilepticus. *Glia* **67**: 1434–1448.

Fernández-Nogales M, Cabrera JR, Santos-Galindo M, Hoozemans JJM, Ferrer I, Rozemuller AJM, Hernández F, Avila J, Lucas JJ. 2014. Huntington's disease is a four-repeat tauopathy with tau nuclear rods. *Nat Med* **20**: 881–885.

Fernández-Nogales M, Santos-Galindo M, Merchán-Rubira J, Hoozemans JJM, Rábano A, Ferrer I, Avila J, Hernández F, Lucas JJ. 2017. Tau-positive nuclear indentations in P301S tauopathy mice. *Brain Pathol* **27**: 314–322.

Ferreira ST, Vieira MNN, De Felice FG. 2007. Soluble protein oligomers as emerging toxins in Alzheimer's and other amyloid diseases. In *IUBMB Life*, Vol. 59 of, pp. 332–345, John Wiley & Sons, Ltd

Ferretti MT, Merlini M, Späni C, Gericke C, Schweizer N, Enzmann G, Engelhardt B, Kulic L, Suter T, Nitsch RM. 2016. T-cell brain infiltration and immature antigen-presenting cells in transgenic models of Alzheimer's disease-like cerebral amyloidosis. *Brain Behav Immun* **54**: 211–225.

Fojo T, Menefee M. 2007. Mechanisms of multidrug resistance: The potential role of microtubule-stabilizing agents. *Ann Oncol* **18**: 3–8.

Forner S, Baglietto-Vargas D, Martini AC, Trujillo-Estrada L, LaFerla FM. 2017. Synaptic Impairment in Alzheimer's Disease: A Dysregulated Symphony. *Trends Neurosci* **40**: 347–357.

Freund TF, Buzsáki G. 1998. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* **6**: 347–470.

Friedman BA, Srinivasan K, Ayalon G, Kaminker JS, Van Der Brug MP, Hansen Correspondence D V, Meilandt WJ, Lin H, Huntley MA, Cao Y, et al. 2018. Diverse Brain Myeloid Expression Profiles Reveal Distinct Microglial Activation States and Aspects of Alzheimer's Disease Not Evident in Mouse Models Data and Software Availability GSE89482 GSE93179 GSE93180 GSE95587 Diverse Brain Myeloid Expression Profi. *CellReports* **22**: 832–847.

Frost B, Bardai FH, Feany MB. 2016. Lamin Dysfunction Mediates Neurodegeneration in Tauopathies. *Curr Biol* **26**: 129–136.

Füger P, Hefendehl JK, Veeraraghavalu K, Wendeln AC, Schlosser C, Obermüller U, Wegenast-Braun BM, Neher JJ, Martus P, Kohsaka S, et al. 2017. Microglia turnover with aging and in an Alzheimer's model via long-term in vivo single-cell imaging. *Nat Neurosci* **20**: 1371–1376.

Fuhrer TE, Palpagama TH, Waldvogel HJ, Synek BJL, Turner C, Faull RL, Kwakowsky A. 2017. Impaired

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

expression of GABA transporters in the human Alzheimer's disease hippocampus, subiculum, entorhinal cortex and superior temporal gyrus. *Neuroscience* **351**: 108–118.

Gahete MD, Rubio A, Durán-Prado M, Avila J, Luque RM, Castao JP. 2010. Expression of somatostatin, cortistatin, and their receptors, as well as dopamine receptors, but not of neprilysin, are reduced in the temporal lobe of alzheimer's disease patients. *J Alzheimer's Dis* **20**: 465–475.

Galatro TF, Holtman IR, Lerario AM, Vainchtein ID, Brouwer N, Sola PR, Veras MM, Pereira TF, Leite REP, Möller T, et al. 2017. Transcriptomic analysis of purified human cortical microglia reveals age-associated changes. *Nat Neurosci* **20**: 1162–1171.

Galea E, Launay N, Portero-Otin M, Ruiz M, Pamplona R, Aubourg P, Ferrer I, Pujol A. 2012. Oxidative stress underlying axonal degeneration in adrenoleukodystrophy: A paradigm for multifactorial neurodegenerative diseases? *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* **1822**: 1475–1488.

Galloway DA, Phillips AEM, Owen DRJ, Moore CS. 2019. Phagocytosis in the brain: Homeostasis and disease. *Front Immunol* **10**: 790.

Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Borthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, et al. 1995. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β-amyloid precursor protein. *Nature* **373**: 523–527.

Gao Y-L, Wang N, Sun F-R, Cao X-P, Zhang W, Yu J-T. 2018. Tau in neurodegenerative disease. *Ann Transl Med* **6**: 175.

García-Gómez BE, Fernández-Gómez FJ, Muñoz-Delgado E, Buée L, Blum D, Vidal CJ. 2016. mRNA levels of ACh-related enzymes in the hippocampus of THY-Tau22 mouse: A model of human tauopathy with no signs of motor disturbance. *J Mol Neurosci* **58**: 411–415.

García-González L, Pilat D, Baranger K, Rivera S. 2019. Emerging alternative proteinases in APP metabolism and alzheimer's disease pathogenesis: A focus on MT1-MMP and MT5-MMP. *Front Aging Neurosci* **11**.

García-Sierra F, Jarero-Basulto JJ, Kristofikova Z, Majer E, Binder LI, Ripova D. 2012. Ubiquitin is associated with early truncation of tau protein at aspartic acid 421 during the maturation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* **22**: 240–250.

Gendreau KL, Hall GF. 2013. Tangles, Toxicity, and Tau Secretion in AD – New Approaches to a Vexing Problem. *Front Neurol* **4**.

Gerhard A, Schwarz J, Myers R, Wise R, Banati RB. 2005. Evolution of microglial activation in patients after ischemic stroke: A [11C](R)-PK11195 PET study. *Neuroimage* **24**: 591–595.

Gerson JE, Mudher A, Kayed R. 2016. Potential mechanisms and implications for the formation of tau oligomeric strains. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **51**: 482–496.

Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, et al. 2010. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science (80-)* **330**: 841–845.

Gloveli T, Dugladze T, Schmitz D, Heinemann U. 2001. Properties of entorhinal cortex deep layer neurons projecting to the rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci* **13**: 413–420.

Goedert M, Ghetti B, Spillantini MG. 2012. Frontotemporal dementia: Implications for understanding Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**: 1–21.

Gomez-Arboledas A, Davila JC, Sanchez-Mejias E, Navarro V, Nuñez-Diaz C, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mico MV, Trujillo-Estrada L, Fernandez-Valenzuela JJ, Vizuete M, et al. 2018. Phagocytic clearance of presynaptic dystrophies by reactive astrocytes in Alzheimer's disease. *Glia* **66**: 637–653.

Gómez-Isla T, Hollister R, West H, Mui S,

UNIVERSIDAD DE MALAGA

Growdon JH, Petersen RC, Parisi JE, Hyman BT. 1997. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* **41**: 17–24.

Gómez-Nicola D, Fransen NL, Suzzi S, Hugh Perry V. 2013. Regulation of microglial proliferation during chronic neurodegeneration. *J Neurosci* **33**: 2481–2493.

Gómez-Ramos A, Díaz-Hernández M, Rubio A, Díaz-Hernández JI, Miras-Portugal MT, Avila J. 2009. Characteristics and consequences of muscarinic receptor activation by tau protein. *Eur Neuropsychopharmacol* **19**: 708–717.

Gong B, Radulovic M, Figueiredo-Pereira ME, Cardozo C. 2016. The ubiquitin-proteasome system: Potential therapeutic targets for alzheimer's disease and spinal cord injury. *Front Mol Neurosci* **9**: 4.

Gong Y, Lippa CF, Zhu J, Lin Q, Rosso AL. 2009. Disruption of glutamate receptors at Shank-postsynaptic platform in Alzheimer's disease. *Brain Res* **1292**: 191–198.

González-Reyes RE, Nava-Mesa MO, Vargas-Sánchez K, Ariza-Salamanca D, Mora-Muñoz L. 2017. Involvement of Astrocytes in Alzheimer's Disease from a Neuroinflammatory and Oxidative Stress Perspective. *Front Mol Neurosci* **10**: 427.

Gorantla NV, Chinnathambi S. 2020. Autophagic Pathways to Clear the Tau Aggregates in Alzheimer's Disease. *Cell Mol Neurobiol*.

Gorlovoy P, Larionov S, Pham TTH, Neumann H. 2009. Accumulation of tau induced in neurites by microglial proinflammatory mediators. *FASEB J* **23**: 2502–2513.

Götz J, Chen F, Van Dorpe J, Nitsch RM. 2001. Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by Aβ42 fibrils. *Science (80-)* **293**: 1491–1495.

Götz J, Halliday G, Nisbet RM. 2019. Molecular Pathogenesis of the Tauopathies. *Annu Rev Pathol Mech Dis* **14**: 239–261.

Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. 1986. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 4913–4917.

Guedes-Dias P, Holzbaur ELF. 2019. Axonal transport: Driving synaptic function. *Science (80-)* **366**.

Guerreiro R, Wojtas A, Bras J, Carrasquillo M, Rogaeva E, Majounie E, Cruchaga C, Sassi C, Kauwe JSK, Younkin S, et al. 2013. TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N Engl J Med* **368**: 117–127.

Guerrero-Muñoz MJ, Gerson J, Castillo-Carranza DL. 2015. Tau oligomers: The toxic player at synapses in Alzheimer's disease. *Front Cell Neurosci* **9**: 1–10.

Guimas Almeida C, Sadat Mirfakhar F, Perdigão C, Burrinha T. 2018. Impact of late-onset Alzheimer's genetic risk factors on beta-amyloid endocytic production. *Cell Mol Life Sci* **75**: 2577–2589.

Gundersen HJG. 1988. The nucleator. *J Microsc* **151**: 3–21.

Guo T, Noble W, Hanger DP. 2017. Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathol* **133**: 665–704.

Gutierrez A, Vitorica J. 2018. Toward a New Concept of Alzheimer's Disease Models: A Perspective from Neuroinflammation eds. G. Perry, J. Avila, P.I. Moreira, A.A. Sorensen, and M. Tabaton. *J Alzheimer's Dis* **64**: S329–S338.

Guyon T, Wakkach A, Poea S, Mouly V, Klingel-Schmitt I, Levasseur P, Beeson D, Asher O, Tzartos S, Berrih-Aknin S. 1998. Regulation of acetylcholine receptor gene expression in human myasthenia gravis muscles. Evidences for a compensatory mechanism triggered by receptor loss. *J Clin Invest* **102**: 249–263.

Haass C, Selkoe DJ. 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: Lessons from the Alzheimer's amyloid β-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 101–112.

UNIVERSIDAD DE MALAGA

Habib N, McCabe C, Medina S, Varshavsky M, Kitsberg D, Dvir-Szternfeld R, Green G, Dionne D, Nguyen L, Marshall JL, et al. 2020. Disease-associated astrocytes in Alzheimer's disease and aging. *Nat Neurosci* **23**: 701–706.

Haigh CL, Wright JA, Brown DR. 2007. Regulation of Prion Protein Expression by Noncoding Regions of the Prnp Gene. *J Mol Biol* **368**: 915–927.

Hammond TR, Marsh SE, Stevens B. 2019. Immune Signaling in Neurodegeneration. *Immunity* **50**: 955–974.

Hampel H, Mesulam MM, Cuello AC, Farlow MR, Giacobini E, Grossberg GT, Khachaturian AS, Vergallo A, Cavedo E, Snyder PJ, et al. 2018. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain* **141**: 1917–1933.

Hane FT, Lee BY, Leonenko Z. 2017. Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 1: Pathology. *J Alzheimer's Dis* **57**: 1–28.

Hanger DP, Anderton BH, Noble W. 2009. Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med* **15**: 112–119.

Hannula DE, Duff MC. 2017. *The Hippocampus from Cells to Systems: Structure, Connectivity, and Functional Contributions to Memory and Flexible Cognition*. Springer International Publishing.

Hansen D V., Hanson JE, Sheng M. 2018. Microglia in Alzheimer's disease. *J Cell Biol* **217**: 459–472.

Hardy J, Allsop D. 1991. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* **12**: 383–388.

Hardy J, Cowburn R, Barton A, Reynolds G, Lofdahl E, O'Carroll AM, Wester P, Winblad B. 1987. Region-specific loss of glutamate innervation in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **73**: 77–80.

Hardy J, Higgins G. 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science (80-)* **256**: 184–185.

Hardy J. 2019. Failures in Protein Clearance Partly Underlie Late Onset Neurodegenerative Diseases and Link Pathology to Genetic Risk. *Front Neurosci* **13**: 1304.

Hasegawa S, Yamaguchi M, Nagao H, Mishina M, Mori K. 2007. Enhanced cell-to-cell contacts between activated microglia and pyramidal cell dendrites following kainic acid-induced neurotoxicity in the hippocampus. *J Neuroimmunol* **186**: 75–85.

Hashemiaghdam A, Mroczek M. 2020. Microglia heterogeneity and neurodegeneration: The emerging paradigm of the role of immunity in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol* **341**.

Hawkins BE, Krishnamurthy S, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Prough DS, Jackson GR, DeWitt DS, Kayed R. 2013. Rapid accumulation of endogenous Tau oligomers in a rat model of traumatic brain injury: Possible link between traumatic brain injury and sporadic tauopathies. *J Biol Chem* **288**: 17042–17050.

He Z, Guo JL, McBride JD, Narasimhan S, Kim H, Changolkar L, Zhang B, Gathagan RJ, Yue C, Dengler C, et al. 2018. Amyloid-β plaques enhance Alzheimer's brain tau-seeded pathologies by facilitating neuritic plaque tau aggregation. *Nat Med* **24**: 29–38.

Hegde AN, Smith SG, Duke LM, Pourquoi A, Vaz S. 2019. Perturbations of Ubiquitin-Proteasome-Mediated Proteolysis in Aging and Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* **11**: 324.

Hempen B, Brion JP. 1996. Reduction of Acetylated α-Tubulin Immunoreactivity in Neurofibrillary Tangle-bearing Neurons in Alzheimer's Disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **55**: 964–972.

Heneka MT, Carson MJ, Khoury J El, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, Jacobs AH, Wyss-Coray T, Vitorica J, Ransohoff RM, et al. 2015. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* **14**:

UNIVERSIDAD DE MALAGA

388–405.

Henkel JS, Engelhardt JI, Siklós L, Simpson EP, Kim SH, Pan T, Goodman JC, Siddique T, Beers DR, Appel SH. 2004. Presence of Dendritic Cells, MCP-1, and Activated Microglia/Macrophages in Amyotrophic Lateral Sclerosis Spinal Cord Tissue. *Ann Neurol* **55**: 221–235.

Henstridge CM, Hyman BT, Spires-Jones TL. 2019. Beyond the neuron–cellular interactions early in Alzheimer disease pathogenesis. *Nat Rev Neurosci* **20**: 94–108.

Hernández F, Merchán-Rubira J, Vallés-Saiz L, Rodríguez-Matellán A, Avila J. 2020. Differences Between Human and Murine Tau at the N-terminal End. *Front Aging Neurosci* **12**: 11.

Herndon JM, Tome ME, Davis TP. 2017. Development and Maintenance of the Blood-Brain Barrier. In *Primer on Cerebrovascular Diseases: Second Edition*, pp. 51–56, Elsevier Inc.

Herrup K. 2015. The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nat Neurosci* **18**: 794–799.

Hestrin S, Galarreta M. 2005. Electrical synapses define networks of neocortical GABAergic neurons. *Trends Neurosci* **28**: 304–309.

Hickman S, Izzy S, Sen P, Morsett L, El Khoury J. 2018. Microglia in neurodegeneration. *Nat Neurosci* **21**: 1359–1369.

Hipp MS, Kasturi P, Hartl FU. 2019. The proteostasis network and its decline in ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**: 421–435.

Holcomb L, Gordon MN, Mcgowan E, Yu X, Benkovic S, Jantzen P, Wright K, Saad I, Mueller R, Morgan D, et al. 1998. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med* **4**: 97–100.

Holloway OG, Canty AJ, King AE, Ziebell JM. 2019. Rod microglia and their role in neurological diseases. *Semin Cell Dev Biol* **94**: 96–103.

Holloway OG, Canty AJ, King AE, Ziebell JM. 2019. Rod microglia and their role in neurological diseases. *Semin Cell Dev Biol* **94**: 96–103.

Holmes C, Boche D, Wilkinson D, Yadegarfar G, Hopkins V, Bayer A, Jones RW, Bullock R, Love S, Neal JW, et al. 2008. Long-term effects of Aβ42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet* **372**: 216–223.

Holtman IR, Raj DD, Miller JA, Schaafsma W, Yin Z, Brouwer N, Wes PD, Möller T, Orre M, Kamphuis W, et al. 2015. Induction of a common microglia gene expression signature by aging and neurodegenerative conditions: a co-expression meta-analysis. *Acta Neuropathol Commun* **3**: 31.

Holtman IR, Skola D, Glass CK. 2017. Transcriptional control of microglia phenotypes in health and disease. *J Clin Invest* **127**: 3220–3229.

Hopp SC, Lin Y, Oakley D, Roe AD, Devos SL, Hanlon D, Hyman BT. 2018. The role of microglia in processing and spreading of bioactive tau seeds in Alzheimer ' s disease. *J Neuroinflammation* **15**: 1–15.

Hoskin JL, Sabbagh MN, Al-Hasan Y, Decourt B. 2019. Tau immunotherapies for Alzheimer's disease. *Expert Opin Investig Drugs* **28**: 545–554.

Huang KL, Marcora E, Pimenova AA, Di Narzo AF, Kapoor M, Jin SC, Harari O, Bertelsen S, Fairfax BP, Czajkowski J, et al. 2017. A common haplotype lowers PU.1 expression in myeloid cells and delays onset of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* **20**: 1052–1061.

Huang S, Tong H, Lei M, Zhou M, Guo W, Li G, Tang X, Li Z, Mo M, Zhang X, et al. 2018. Astrocytic glutamatergic transporters are involved in Aβ-induced synaptic dysfunction. *Brain Res* **1678**: 129–137.

Hughes RN. 2004. The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. *Neurosci Biobehav Rev* **28**: 497–505.

Hyman BT, Kromer LJ, van Hoesen GW. 1987a.

UNIVERSIDAD DE MALAGA

Reinnervation of the hippocampal perforant pathway zone in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* **21**: 259–267.

Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR. 1987b. Alzheimer's disease: Glutamate depletion in the hippocampal perforant pathway zone. *Ann Neurol* **22**: 37–40. http://doi.wiley.com/10.1002/ana.410220110 (Accessed March 16, 2020).

Iaccarino L, Tammewar G, Ayakta N, Baker SL, Bejanin A, Boxer AL, Gorno-Tempini ML, Janabi M, Kramer JH, Lazaris A, et al. 2018. Local and distant relationships between amyloid, tau and neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *NeuroImage Clin* **17**: 452–464.

Iba M, Guo JL, McBride JD, Zhang B, Trojanowski JQ, Lee VM-Y. 2013. Synthetic Tau Fibrils Mediate Transmission of Neurofibrillary Tangles in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's-Like Tauopathy. *J Neurosci* **33**: 1024–1037.

Iliff JJ, Chen MJ, Plog BA, Zeppenfeld DM, Soltero M, Yang L, Singh I, Deane R, Nedergaard M. 2014. Impairment of glymphatic pathway function promotes tau pathology after traumatic brain injury. *J Neurosci* **34**: 16180–16193.

Inoue K. 2008. Purinergic systems in microglia. *Cell Mol Life Sci* **65**: 3074–3080.

International AD. 2019. *Alzheimer's Disease International: World Alzheimer Report 2019 - Attitudes to Dementia*.

Iqbal K, Bolognin S, Wang X, Basurto-Islas G, Blanchard J, Tung YC. 2013. Animal models of the sporadic form of Alzheimer's disease: Focus on the disease and not just the lesions. *J Alzheimer's Dis* **37**: 469–474.

Iqbal K, Liu F, Gong CX. 2016. Tau and neurodegenerative disease: The story so far. *Nat Rev Neurol* **12**: 15–27.

Iqbal K, Liu F, Gong CX. 2018. Recent developments with tau-based drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* **13**: 399–410.

Ishikawa A, Tokunaga M, Maeda J, Minamihisamatsu T, Shimojo M, Takuwa H, Ono M, Ni R, Hirano S, Kuwabara S, et al. 2018. In vivo visualization of tau accumulation, microglial activation, and brain atrophy in a mouse model of tauopathy rTg4510. *J Alzheimer's Dis* **61**: 1037–1052.

Ishizawa K, Dickson DW. 2001. Microglial activation parallels system degeneration in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* **60**: 647–657.

Ittner A, Ittner LM. 2018. Dendritic Tau in Alzheimer's Disease. *Neuron* **99**: 13–27.

Ittner LM, Ke YD, Delerue F, Bi M, Gladbach A, van Eersel J, Wölfing H, Chieng BC, Christie MJ, Napier IA, et al. 2010. Dendritic function of tau mediates amyloid-β toxicity in alzheimer's disease mouse models. *Cell* **142**: 387–397.

Jackson JS, Witton J, Johnson JD, Ahmed Z, Ward M, Randall AD, Hutton ML, Isaac JT, O'Neill MJ, Ashby MC. 2017. Altered Synapse Stability in the Early Stages of Tauopathy. *Cell Rep* **18**: 3063–3068.

Jackson RJ, Rudinskiy N, Herrmann AG, Croft S, Kim JSM, Petrova V, Ramos-Rodriguez JJ, Pitstick R, Wegmann S, Garcia-Alloza M, et al. 2016. Human tau increases amyloid β plaque size but not amyloid β-mediated synapse loss in a novel mouse model of Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci* **44**: 3056–3066.

Jackson WS, Krost C, Borkowski AW, Kaczmarczyk L. 2014. Translation of the prion protein mRNA is robust in astrocytes but does not amplify during reactive astrocytosis in the mouse brain ed. J. Tatzelt. *PLoS One* **9**: e95958.

Janke C, Beck M, Stahl T, Holzer M, Brauer K, Bigl V, Arendt T. 1999. Phylogenetic diversity of the expression of the microtubule-associated protein tau: Implications for neurodegenerative disorders. *Mol Brain Res* **68**: 119–128.

Janke C, Kneussel M. 2010. Tubulin post-translational modifications: Encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton. *Trends Neurosci* **33**: 362–372.

Jankowsky JL, Zheng H. 2017. Practical

UNIVERSIDAD DE MALAGA

considerations for choosing a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* **12**.

Jansen IE, Savage JE, Watanabe K, Bryois J, Williams DM, Steinberg S, Sealock J, Karlsson IK, Hägg S, Athanasiu L, et al. 2019. Genome-wide meta-analysis identifies new loci and functional pathways influencing Alzheimer's disease risk. *Nat Genet* **51**: 404–413.

Jeganathan S, Von Bergen M, Brutlach H, Steinhoff HJ, Mandelkow E. 2006. Global hairpin folding of tau in solution. *Biochemistry* **45**: 2283–2293.

Jeugd A Van der, Ahmed T, Burnouf S, Belarbi K, Hamdame M, Grosjean ME, Humez S, Balschun D, Blum D, Buée L, et al. 2011. Hippocampal tauopathy in tau transgenic mice coincides with impaired hippocampus-dependent learning and memory, and attenuated late-phase long-term depression of synaptic transmission. *Neurobiol Learn Mem* **95**: 296–304.

Jiang Q, Wang L, Guan Y, Xu H, Niu Y, Han L, Wei YP, Lin L, Chu J, Wang Q, et al. 2014. Golgin-84-associated Golgi fragmentation triggers tau hyperphosphorylation by activation of cyclin-dependent kinase-5 and extracellular signal-regulated kinase. *Neurobiol Aging* **35**: 1352–1363.

Jiang T, Tan L, Zhu XC, Zhou JS, Cao L, Tan MS, Wang HF, Chen Q, Zhang YD, Yu JT. 2015. Silencing of TREM2 exacerbates tau pathology, neurodegenerative changes, and spatial learning deficits in P301S tau transgenic mice. *Neurobiol Aging* **36**: 3176–3186.

Jiang T, Zhang YD, Chen Q, Gao Q, Zhu XC, Zhou JS, Shi JQ, Lu H, Tan L, Yu JT. 2016. TREM2 modifies microglial phenotype and provides neuroprotection in P301S tau transgenic mice. *Neuropharmacology* **105**: 196–206.

Jiang T, Zhang YD, Chen Q, Gao Q, Zhu XC, Zhou JS, Shi JQ, Lu H, Tan L, Yu JT. 2016. TREM2 modifies microglial phenotype and provides neuroprotection in P301S tau transgenic mice. *Neuropharmacology* **105**: 196–206.

Jiang Z, Shih DM, Xia YR, Lusis AJ, De Beer FC, De Villiers WJS, Van Der Westhuyzen DR, De Beer MC. 1998. Structure, organization, and chromosomal mapping of the gene encoding macrosialin, a macrophage-restricted protein. *Genomics* **50**: 199–205.

Jimenez S, Baglietto-Vargas D, Caballero C, Moreno-Gonzalez I, Torres M, Sanchez-Varo R, Ruano D, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J. 2008. Inflammatory Response in the Hippocampus of PS1M146L/APP751SL Mouse Model of Alzheimer's Disease: Age-Dependent Switch in the Microglial Phenotype from Alternative to Classic. *J Neurosci* **28**: 11650–11661.

Jimenez S, Torres M, Vizuete M, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mejias E, Trujillo-Estrada L, Carmona-Cuenca I, Caballero C, Ruano D, Gutierrez A, et al. 2011. Age-dependent accumulation of soluble amyloid β (Aβ) oligomers reverses the neuroprotective effect of soluble amyloid precursor protein-α (sAPPα) by modulating phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt-GSK- 3β pathway in Alzheimer mouse model. *J Biol Chem* **286**: 18414–18425.

Jones EM, Dubey M, Camp PJ, Vernon BC, Biernat J, Mandelkow E, Majewski J, Chi EY. 2012. Interaction of Tau protein with model lipid membranes induces tau structural compaction and membrane disruption. *Biochemistry* **51**: 2539–2550.

Jones RS, Minogue AM, Connor TJ, Lynch MA. 2013. Amyloid-β-induced astrocytic phagocytosis is mediated by CD36, CD47 and RAGE. *J Neuroimmune Pharmacol* **8**: 301–311.

Johnson ECB, Dammer EB, Duong DM, Ping L, Zhou M, Yin L, Higginbotham LA, Guajardo A, White B, Troncoso JC, et al. 2020. Large-scale proteomic analysis of Alzheimer's disease brain and cerebrospinal fluid reveals early changes in energy metabolism associated with microglia and astrocyte activation. *Nat Med* **26**: 769–780.

Joshi G, Bekier ME, Wang Y. 2015. Golgi fragmentation in Alzheimer's disease.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Front Neurosci **9**: 340.

Jovanov-Milošević N, Petrović D, Sedmak G, Vukšić M, Hof PR, Šimić G. 2012. Human fetal tau protein isoform: Possibilities for Alzheimer's disease treatment. *Int J Biochem Cell Biol* **44**: 1290–1294.

Jucker M, Walker LC. 2011. Pathogenic protein seeding in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Ann Neurol* **70**: 532–540.

Kanaan NM, Morfini GA, LaPointe NE, Pigino GF, Patterson KR, Song Y, Andreadis A, Fu Y, Brady ST, Binder LI. 2011. Pathogenic forms of tau inhibit kinesin-dependent axonal transport through a mechanism involving activation of axonal phosphotransferases. *J Neurosci* **31**: 9858–9868.

Karch CM, Cruchaga C, Goate AM. 2014. Alzheimer's disease genetics: From the bench to the clinic. *Neuron* **83**: 11–26. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24991952 (Accessed May 16, 2018).

Karl T, Bhatia S, Cheng D, Kim WS, Garner B. 2012. Cognitive phenotyping of amyloid precursor protein transgenic J20 mice. *Behav Brain Res* **228**: 392–397.

Karlen SJ, Miller EB, Wang X, Levine ES, Zawadzki RJ, Burns ME. 2018. Monocyte infiltration rather than microglia proliferation dominates the early immune response to rapid photoreceptor degeneration. *J Neuroinflammation* **15**: 344.

Karlsson A, Christenson K, Matlak M, Bjïrstad Å, Brown KL, Telemo E, Salomonsson E, Leffler H, Bylund J. 2009. Galectin-3 functions as an opsonin and enhances the macrophage clearance of apoptotic neutrophils. *Glycobiology* **19**: 16–20.

Karman J, Ling C, Sandor M, Fabry Z. 2004. Initiation of Immune Responses in Brain Is Promoted by Local Dendritic Cells. *J Immunol* **173**: 2353–2361.

Kása P, Rakonczay Z, Gulya K. 1997. The cholinergic system in alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* **52**: 511–535.

Katsouri L, Birch AM, Renziehausen AWJ, Zach C, Aman Y, Steeds H, Bonsu A, Palmer EOC, Mirzaei N, Ries M, et al. 2019. Ablation of reactive astrocytes exacerbates disease pathology in a model of Alzheimer's disease. *Glia* **68**: 1017–1030.

Kaufman SK, Sanders DW, Thomas TL, Ruchinskas AJ, Vaquer-Alicea J, Sharma AM, Miller TM, Diamond MI. 2016. Tau Prion Strains Dictate Patterns of Cell Pathology, Progression Rate, and Regional Vulnerability In Vivo. *Neuron* **92**: 796–812.

Kaunzner UW, Miller MM, Gottfried-Blackmore A, Gal-Toth J, Felger JC, McEwen BS, Bulloch K. 2012. Accumulation of resident and peripheral dendritic cells in the aging CNS. *Neurobiol Aging* **33**: 681-693.e1.

Kaushik S, Cuervo AM. 2015. Proteostasis and aging. *Nat Med* **21**: 1406–1415.

Kawaguchi Y, Kubota Y. 1997. GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex* **7**: 476–486.

Kayed R, Lasagna-Reeves CA. 2013. Molecular mechanisms of amyloid oligomers toxicity. *J Alzheimer's Dis* **33**: S67–S78.

Kelliher MT, Saunders HA, Wildonger J. 2019. Microtubule control of functional architecture in neurons. *Curr Opin Neurobiol* **57**: 39–45.

Kelly SC, He B, Perez SE, Ginsberg SD, Mufson EJ, Counts SE. 2017. Locus coeruleus cellular and molecular pathology during the progression of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun* **5**: 8.

Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, Matcovitch-Natan O, Dvir-Szternfeld R, Ulland TK, David E, Baruch K, Lara-Astaiso D, Toth B, et al. 2017. A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell* **169**: 1276-1290.e17.

Khakh BS, Deneen B. 2019. The Emerging Nature of Astrocyte Diversity. *Annu Rev Neurosci* **42**: 187–207.

Khurana R, Uversky VN, Nielsen L, Fink AL. 2001. Is Congo Red an Amyloid-specific Dye? *J Biol Chem* **276**: 22715–22721.

UNIVERSIDAD DE MALAGA

Kim D, Jeong H, Lee J, Ghim JW, Her ES, Lee SH, Jung MW. 2016. Distinct Roles of Parvalbumin- and Somatostatin-Expressing Interneurons in Working Memory. *Neuron* **92**: 902–915.

Kim J, Yoon H, Basak J, Kim J. 2014. Apolipoprotein E in synaptic plasticity and alzheimer's disease: Potential cellular and molecular mechanisms. *Mol Cells* **37**: 833–840.

Kinney JW, Bemiller SM, Murtishaw AS, Leisgang AM, Salazar AM, Lamb BT. 2018. Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement Transl Res Clin Interv* **4**: 575–590.

Kleinberger G, Yamanishi Y, Suárez-Calvet M, Czirr E, Lohmann E, Cuyvers E, Struyfs H, Pettkus N, Wenninger-Weinzierl A, Mazaheri F, et al. 2014. TREM2 mutations implicated in neurodegeneration impair cell surface transport and phagocytosis. *Sci Transl Med* **6**.

Kneynsberg A, Combs B, Christensen K, Morfini G, Kanaan NM. 2017. Axonal degeneration in tauopathies: Disease relevance and underlying mechanisms. *Front Neurosci* **11**: 572.

Knierim JJ. 2015. The hippocampus. *Curr Biol* **25**: R1116–R1121.

Kocahan S, Doğan Z. 2017. Mechanisms of Alzheimer's disease pathogenesis and prevention: The brain, neural pathology, N-methyl-D-Aspartate receptors, tau protein and other risk factors. *Clin Psychopharmacol Neurosci* **15**: 1–8.

Koenigsknecht-Talboo J, Landreth GE. 2005. Microglial phagocytosis induced by fibrillar β-amyloid and IgGs are differentially regulated by proinflammatory cytokines. *J Neurosci* **25**: 8240–8249.

Koffie RM, Meyer-Luehmann M, Hashimoto T, Adams KW, Mielke ML, Garcia-Alloza M, Micheva KD, Smith SJ, Kim ML, Lee VM, et al. 2009. Oligomeric amyloid β associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 4012–4017.

Koffie RM, Meyer-Luehmann M, Hashimoto T, Adams KW, Mielke ML, Garcia-Alloza M, Micheva KD, Smith SJ, Kim ML, Lee VM, et al. 2009. Oligomeric amyloid β associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 4012–4017.

Köhler C, Bista P, Götz J, Schröder H. 2010. Analysis of the cholinergic pathology in the P301L tau transgenic pR5 model of tauopathy. *Brain Res* **1347**: 111–124.

Korvatska O, Leverenz JB, Jayadev S, McMillan P, Kurtz I, Guo X, Rumbaugh M, Matsushita M, Girirajan S, Dorschner MO, et al. 2015. R47H variant of TREM2 associated with Alzheimer disease in a large late-onset family clinical, genetic, and neuropathological study. *JAMA Neurol* **72**: 920–927.

Kosel F, Pelley JMS, Franklin TB. 2020. Behavioural and psychological symptoms of dementia in mouse models of Alzheimer's disease-related pathology. *Neurosci Biobehav Rev* **112**: 634–647.

Kovac A, Zilka N, Kazmerova Z, Cente M, Zilkova M, Novak M. 2011. Misfolded Truncated Protein τ Induces Innate Immune Response via MAPK Pathway. *J Immunol* **187**: 2732–2739.

Kovacs GG. 2018. Tauopathies. In *Handbook of Clinical Neurology*, Vol. 145 of, pp. 355–368.

Krasemann S, Madore C, Cialic R, Baufeld C, Calcagno N, El Fatimy R, Beckers L, O'Loughlin E, Xu Y, Fanek Z, et al. 2017. The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Immunity* **47**: 566-581.e9.

Krüger L, Mandelkow EM. 2016. Tau neurotoxicity and rescue in animal models of human Tauopathies. *Curr Opin Neurobiol* **36**: 52–58.

Kulkarni VV, Maday S. 2018. Compartment-specific dynamics and functions of autophagy in neurons. *Dev Neurobiol*

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

78: 298–310.

Kumar U. 2005. Expression of somatostatin receptor subtypes (SSTR1-5) in Alzheimer's disease brain: An immunohistochemical analysis. *Neuroscience* **134**: 525–538.

Kunkle BW, Grenier-Boley B, Sims R, Bis JC, Damotte V, Naj AC, Boland A, Vronskaya M, van der Lee SJ, Amlie-Wolf A, et al. 2019. Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates Aβ, tau, immunity and lipid processing. *Nat Genet* **51**: 414–430.

Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, et al. 1998. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Aβ1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 6448–6453.

Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Sarmiento J, Troncoso J, Jackson GR, Kayed R. 2012. Identification of oligomers at early stages of tau aggregation in Alzheimer's disease. *FASEB J* **26**: 1946–1959.

Lathuilière A, Valdés P, Papin S, Cacquevel M, Maclachlan C, Knott GW, Muhs A, Paganetti P, Schneider BL. 2017. Motifs in the tau protein that control binding to microtubules and aggregation determine pathological effects. *Sci Rep* **7**.

Latta CH, Sudduth TL, Weekman EM, Brothers HM, Abner EL, Popa GJ, Mendenhall MD, Gonzalez-Oregon F, Braun K, Wilcock DM. 2015. Determining the role of IL-4 induced neuroinflammation in microglial activity and amyloid-β using BV2 microglial cells and APP/PS1 transgenic mice. *J Neuroinflammation* **12**: 1–13.

Laurent C, Buée L, Blum D. 2018. Tau and neuroinflammation: What impact for Alzheimer's Disease and Tauopathies? *Biomed J* **41**: 21–33.

Laurent C, Buée L, Blum D. 2018. Tau and neuroinflammation: What impact for Alzheimer's Disease and Tauopathies? *Biomed J* **41**: 21–33.

Laurent C, Dorothée G, Hunot S, Martin E, Monnet Y, Duchamp M, Dong Y, Légeron FP, Leboucher A, Burnouf S, et al. 2017. Hippocampal T cell infiltration promotes neuroinflammation and cognitive decline in a mouse model of tauopathy. *Brain* **140**: 184–200.

Laurent C, Dorothée G, Hunot S, Martin E, Monnet Y, Duchamp M, Dong Y, Légeron FP, Leboucher A, Burnouf S, et al. 2017. Hippocampal T cell infiltration promotes neuroinflammation and cognitive decline in a mouse model of tauopathy. *Brain* **140**: 184–200.

Lee MJ, Lee JH, Rubinsztein DC. 2013. Tau degradation: The ubiquitin-proteasome system versus the autophagy-lysosome system. *Prog Neurobiol* **105**: 49–59.

Leroy K, Ando K, Laporte V, Dedecker R, Suain V, Authelet M, Héraud C, Pierrot N, Yilmaz Z, Octave JN, et al. 2012. Lack of tau proteins rescues neuronal cell death and decreases amyloidogenic processing of APP in APP/PS1 mice. *Am J Pathol* **181**: 1928–1940.

Levenga J, Krishnamurthy P, Rajamohamedsait H, Wong H, Franke TF, Cain P, Sigurdsson EM, Hoeffer CA. 2014. Tau pathology induces loss of GABAergic interneurons leading to altered synaptic plasticity and behavioral impairments. *Acta Neuropathol Commun* **2**.

Levenga J, Krishnamurthy P, Rajamohamedsait H, Wong H, Franke TF, Cain P, Sigurdsson EM, Hoeffer CA. 2014. Tau pathology induces loss of GABAergic interneurons leading to altered synaptic plasticity and behavioral impairments. *Acta Neuropathol Commun* **2**.

Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, Yen SH, Sahara N, Skipper L, Yager D, et al. 2001. Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science (80-)* **293**: 1487–1491.

Leyns CEG, Gratuze M, Narasimhan S, Jain N, Koscal LJ, Jiang H, Manis M, Colonna M,

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Lee VMY, Ulrich JD, et al. 2019. TREM2 function impedes tau seeding in neuritic plaques. *Nat Neurosci* 1.

Leyns CEG, Holtzman DM. 2017. Glial contributions to neurodegeneration in tauopathies. *Mol Neurodegener* **12**.

Li C, Götz J. 2017. Somatodendritic accumulation of Tau in Alzheimer's disease is promoted by Fyn-mediated local protein translation. *EMBO J* **36**: 3120–3138.

Li Q, Barres BA. 2017. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol* **18**: 225–242.

Liazoghli D, Perreault S, Micheva KD, Desjardins M, Leclerc N. 2005. Fragmentation of the Golgi apparatus induced by the overexpression of wild-type and mutant human tau forms in neurons. *Am J Pathol* **166**: 1499–1514.

Liddelow SA, Barres BA. 2017. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity* **46**: 957–967.

Liddelow SA, Marsh SE, Stevens B. 2020. Microglia and Astrocytes in Disease: Dynamic Duo or Partners in Crime? *Trends Immunol* 820–835.

Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, Bennett ML, Münch AE, Chung WS, Peterson TC, et al. 2017. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* **541**: 481–487.

Liddelow SA. 2019. Modern approaches to investigating non-neuronal aspects of Alzheimer's disease. *FASEB J* **33**: 1528–1535.

Liguz-Lecznar M, Urban-Ciecko J, Kossut M. 2016. Somatostatin and somatostatin-containing neurons in shaping neuronal activity and plasticity. *Front Neural Circuits* **10**: 1–15.

Lima FRS, Arantes CP, Muras AG, Nomizo R, Brentani RR, Martins VR. 2007. Cellular prion protein expression in astrocytes modulates neuronal survival and differentiation. *J Neurochem* **103**: 2164–2176.

Lin WL, Lewis J, Yen SH, Hutton M, Dickson DW. 2003. Ultrastructural neuronal pathology in transgenic mice expressing mutant (P301L) human tau. *J Neurocytol* **32**: 1091–1105.

Lippi SLP, Smith ML, Flinn JM. 2018. A Novel hAPP/htau Mouse Model of Alzheimer's Disease: Inclusion of APP With Tau Exacerbates Behavioral Deficits and Zinc Administration Heightens Tangle Pathology. *Front Aging Neurosci* **10**: 382.

Liu C, Götz J. 2013. Profiling murine tau with 0N, 1N and 2N isoform-specific antibodies in brain and peripheral organs reveals distinct subcellular localization, with the 1N isoform being enriched in the nucleus. *PLoS One* **8**.

Liu J, Chang L, Song Y, Li H, Wu Y. 2019. The role of NMDA receptors in Alzheimer's disease. *Front Neurosci* **13**: 43.

Liu Z, Li Y, Cui Y, Roberts C, Lu M, Wilhelmsson U, Pekny M, Chopp M. 2014. Beneficial effects of gfap/vimentin reactive astrocytes for axonal remodeling and motor behavioral recovery in mice after stroke. *Glia* **62**: 2022–2033.

Lo AC, Iscru E, Blum D, Tesseur I, Callaerts-Vegh Z, Buée L, De Strooper B, Balschun D, D'Hooge R. 2013. Amyloid and tau neuropathology differentially affect prefrontal synaptic plasticity and cognitive performance in mouse models of Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis* **37**: 109–125.

Long JM, Holtzman DM. 2019. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell* **179**: 312–339.

Lopez Lopez C, Tariot PN, Caputo A, Langbaum JB, Liu F, Riviere ME, Langlois C, Rouzade-Dominguez ML, Zalesak M, Hendrix S, et al. 2019. The Alzheimer's Prevention Initiative Generation Program: Study design of two randomized controlled trials for individuals at risk for clinical onset of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement Transl Res Clin Interv* **5**: 216–227.

UNIVERSIDAD DE MALAGA

Lopez-Gonzalez. I, Aso. E, Carmona. M, Armand-Ugon. M, Blanco. R, Naudi. A, Cabre. R, Portero-Otin. P, Pamplona. R. 2015. Neuroinflammatory gene regulation, mitochondrial function, oxidative stress, and brain lipid modifications with disease progression in tau P301S transgenic mice as a model of frontotemporal lobar degeneration-tau. *J Neuropathol Exp Neurol* **74**: 975–999.

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265–275.

Luna-Muñoz J, Chávez-Macías L, García-Sierra F, Mena R. 2007. Earliest stages of tau conformational changes are related to the appearance of a sequence of specific phospho-dependent tau epitopes in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **12**: 365–375.

Luo W, Liu W, Hu X, Hanna M, Caravaca A, Paul SM. 2015. Microglial internalization and degradation of pathological tau is enhanced by an anti-tau monoclonal antibody. *Sci Rep* **5**: 1–12.

Madav Y, Wairkar S, Prabhakar B. 2019. Recent therapeutic strategies targeting beta amyloid and tauopathies in Alzheimer's disease. *Brain Res Bull* **146**: 171–184.

Mai JK, Paxinos G. 2012. *The Human Nervous System*. Elsevier Inc.

Majerova P, Zilkova M, Kazmerova Z, Kovac A, Paholikova K, Kovacech B, Zilka N, Novak M. 2014. Microglia display modest phagocytic capacity for extracellular tau oligomers. *J Neuroinflammation* **11**: 1–12.

Malthankar-Phatak GH, Lin YG, Giovannone N, Siman R. 2012. Amyloid deposition and advanced age fails to induce alzheimer's type progression in a double knock-in mouse model. *Aging Dis* **3**: 141–155.

Mancuso R, Fryatt G, Cleal M, Obst J, Pipi E, Monzón-Sandoval J, Ribe E, Winchester L, Webber C, Nevado A, et al. 2019. CSF1R inhibitor JNJ-40346527 attenuates microglial proliferation and neurodegeneration in P301S mice. *Brain* **142**: 3243–3264.

Mano T, Nagata K, Nonaka T, Tarutani A, Imamura T, Hashimoto T, Bannai T, Koshi-Mano K, Tsuchida T, Ohtomo R, et al. 2017. Neuron-specific methylome analysis reveals epigenetic regulation and tau-related dysfunction of BRCA1 in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**: E9645–E9654.

Maphis N, Xu G, Kokiko-cochran ON, Cardona A, Ransohoff RM, Lamb BT, Bhaskar K. 2015. Loss of tau rescues inflammation-mediated neurodegeneration. *Front Neurosci* **9**: 196.

Martin L, Latypova X, Wilson CM, Magnaudeix A, Perrin ML, Yardin C, Terro F. 2013. Tau protein kinases: Involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* **12**: 289–309.

Matamoros AJ, Baas PW. 2016. Microtubules in health and degenerative disease of the nervous system. *Brain Res Bull* **126**: 217–225.

Matias I, Morgado J, Gomes FCA. 2019. Astrocyte Heterogeneity: Impact to Brain Aging and Disease. *Front Aging Neurosci* **11**.

McGeer PL, Itagaki S, Tago H, McGeer EG. 1987. Reactive microglia in patients with senile dementia of the Alzheimer type are positive for the histocompatibility glycoprotein HLA-DR. *Neurosci Lett* **79**: 195–200.

McInnes J, Wierda K, Snellinx A, Bounti L, Wang YC, Stancu IC, Apóstolo N, Gevaert K, Dewachter I, Spires-Jones TL, et al. 2018. Synaptogyrin-3 Mediates Presynaptic Dysfunction Induced by Tau. *Neuron* **97**: 823-835.e8.

McMillan P, Korvatska E, Poorkaj P, Evstafjeva Z, Robinson L, Greenup L, Leverenz J, Schellenberg GD, D'Souza I. 2008. Tau isoform regulation is region- and cell-specific in mouse brain. *J Comp Neurol* **511**: 788–803.

Medeiros R, LaFerla FM. 2013. Astrocytes: Conductors of the Alzheimer disease neuroinflammatory symphony. *Exp Neurol* **239**: 133–138.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Medina M. 2018. An overview on the clinical development of tau-based therapeutics. *Int J Mol Sci* **19**: 1160.

Meilandt WJ, Ngu H, Gogineni A, Lalehzadeh G, Lee S-H, Srinivasan K, Imperio J, Wu T, Weber M, Kruse AJ, et al. 2020. Trem2 deletion reduces late-stage amyloid plaque accumulation, elevates the Aβ42:Aβ40 ratio, and exacerbates axonal dystrophy and dendritic spine loss in the PS2APP Alzheimer's mouse model. *J Neurosci* **40**: 1871–19.

Melchior B, Garcia AE, Hsiung BK, Lo KM, Doose JM, Cameron Thrash J, Stalder AK, Staufenbiel M, Neumann H, Carson MJ. 2010. Dual induction of TREM2 and tolerance-related transcript, Tmem176b, in amyloid transgenic mice: Implications for vaccine-based therapies for Alzheimer's disease. *ASN Neuro* **2**: 157–170.

Meraz-Ríos MA, Lira-De León KI, Campos-Peña V, De Anda-Hernández MA, Mena-López R. 2010. Tau oligomers and aggregation in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **112**: 1353–1367.

Mesulam MM. 2004. The cholinergic innervation of the human cerebral cortex. In *Progress in Brain Research*, Vol. 145 of, pp. 67–78, Elsevier.

Mesulam MM. 2013. Cholinergic circuitry of the human nucleus basalis and its fate in Alzheimer's disease. *J Comp Neurol* **521**: 4124–4144.

Meyer-Luehmann M, Spires-Jones TL, Prada C, Garcia-Alloza M, De Calignon A, Rozkalne A, Koenigsknecht-Talboo J, Holtzman DM, Bacskai BJ, Hyman BT. 2008. Rapid appearance and local toxicity of amyloid-β plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* **451**: 720–724.

Mildner A, Yona S, Jung S. 2013. A Close Encounter of the Third Kind. Monocyte-Derived Cells. In *Advances in Immunology*, Vol. 120 of, pp. 69–103, Academic Press Inc.

Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ, Meyermann R. 2001. Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathol* **101**: 249–255.

Morales I, Jiménez JM, Mancilla M, Maccioni RB. 2013. Tau oligomers and fibrils induce activation of microglial cells. *J Alzheimer's Dis* **37**: 849–856.

Morales R. 2017. Prion strains in mammals: Different conformations leading to disease. *PLoS Pathog* **13**: 337–346.

Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Del Rio JC, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, et al. 2009. Extracellular amyloid-β and cytotoxic glial activation induce significant entorhinal neuron loss in young PS1M146L/APP751SL mice. *J Alzheimer's Dis* **18**: 755–776.

Moreno-Grau S, de Rojas I, Hernández I, Quintela I, Montrreal L, Alegret M, Hernández-Olasagarre B, Madrid L, González-Perez A, Maroñas O, et al. 2019. Genome-wide association analysis of dementia and its clinical endophenotypes reveal novel loci associated with Alzheimer's disease and three causality networks: The GR@ACE project. *Alzheimer's Dement* **15**: 1333–1347.

Morgan TE, Rozovsky I, Goldsmith SK, Stone DJ, Yoshida T, Finch CE. 1997. Increased transcription of the astrocyte gene GFAP during middle-age is attenuated by food restriction: Implications for the role of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **23**: 524–528.

Morimoto RI, Cuervo AM. 2014. Proteostasis and the aging proteome in health and disease. *Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci* **69**: S33–S38.

Morris R. 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Jourmd ~4Neuro* **11**: 47–60.

Mossmann D, Vögtle FN, Taskin AA, Teixeira PF, Ring J, Burkhart JM, Burger N, Pinho CM, Tadic J, Loreth D, et al. 2014. Amyloid-β peptide induces mitochondrial dysfunction by inhibition

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

of preprotein maturation. *Cell Metab* **20**: 662–669.

Mueed Z, Tandon P, Maurya SK, Deval R, Kamal MA, Poddar NK. 2019. Tau and mTOR: The hotspots for multifarious diseases in Alzheimer's development. *Front Neurosci* **13**: 1017.

Mullane K, Williams M. 2013. Alzheimer's therapeutics: Continued clinical failures question the validity of the amyloid hypothesis - But what lies beyond? *Biochem Pharmacol* **85**: 289–305.

Musiek ES, Holtzman DM. 2015. Three dimensions of the amyloid hypothesis: Time, space and "wingmen." *Nat Neurosci* **18**: 800–806.

Myers A, McGonigle P. 2019. Overview of Transgenic Mouse Models for Alzheimer's Disease. *Curr Protoc Neurosci* **89**.

Narasimhan S, Guo JL, Changolkar L, Stieber A, McBride JD, Silva L V, He Z, Zhang B, Gathagan RJ, Trojanowski JQ, et al. 2017. Pathological tau strains from human brains recapitulate the diversity of tauopathies in non-transgenic mouse brain. *J Neurosci* **37**: 1230–17.

Nash KR, Moran P, Finneran DJ, Hudson C, Robinson J, Morgan D, Bickford PC. 2014. Fractalkine Over Expression Suppresses α-Synuclein-mediated Neurodegeneration.

Navarrete F, Pérez-Ortiz JM, Femenía T, García-Gutiérrez MS, García-Payá ME, Leiva-Santana C, Manzanares J. 2008. Métodos de evaluación de trastornos cognitivos en modelos animales. *Rev Neurol* **47**: 137–145.

Navarro V, Sanchez-Mejias E, Jimenez S, Muñoz-Castro C, Sanchez-Varo R, Davila JC, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J. 2018. Microglia in Alzheimer's disease: Activated, dysfunctional or degenerative. *Front Aging Neurosci* **10**.

Newcombe EA, Camats-Perna J, Silva ML, Valmas N, Huat TJ, Medeiros R. 2018. Inflammation: the link between comorbidities, genetics, and Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* **15**: 276.

Nguyen KV. 2015. The human β-amyloid precursor protein: Biomolecular and epigenetic aspects. *Biomol Concepts* **6**: 11–32.

Nichols E, Szoeke CEI, Vollset SE, Abbasi N, Abd-Allah F, Abdela J, Aichour MTE, Akinyemi RO, Alahdab F, Asgedom SW, et al. 2019. Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol* **18**: 88–106.

Niciu MJ, Kelmendi B, Sanacora G. 2012. Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. *Pharmacol Biochem Behav* **100**: 656–664.

Nicoll JAR, Buckland GR, Harrison CH, Page A, Harris S, Love S, Neal JW, Holmes C, Boche D. 2019. Persistent neuropathological effects 14 years following amyloid-β immunization in Alzheimer's disease. *Brain* **142**: 2113–2126.

Nilson AN, English KC, Gerson JE, Whittle TB, Crain CN, Xue J, Sengupta U, Castillo-Carranza DL, Zhang W, Gupta P, et al. 2017. Tau Oligomers Associate with Inflammation in the Brain and Retina of Tauopathy Mice and in Neurodegenerative Diseases. *J Alzheimer's Dis* **55**: 1083–1099.

Nixon RA., Yang DS. 2011. Autophagy failure in Alzheimer's disease-locating the primary defect. *Neurobiol Dis* **43**: 38–45.

Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A, Cuervo AM. 2005. Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: An immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol* **64**: 113–122.

Nixon RA. 2013. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med* **19**: 983–997.

Nomura K, Vilalta A, Allendorf DH, Hornik TC, Brown GC. 2017. Activated Microglia Desialylate and Phagocytose Cells via Neuraminidase, Galectin-3, and Mer Tyrosine Kinase. *J Immunol* **198**: 4792–

UNIVERSIDAD DE MALAGA

4801.

Nortley R, Korte N, Izquierdo P, Hirunpattarasilp C, Mishra A, Jaunmuktane Z, Kyrargyri V, Pfeiffer T, Khennouf L, Madry C, et al. 2019. Amyloid b oligomers constrict human capillaries in Alzheimer's disease via signaling to pericytes. *Science (80-)* **365**.

Nygaard HB. 2018. Targeting Fyn Kinase in Alzheimer's Disease. *Biol Psychiatry* **83**: 369–376.

Nyíri G, Stephenson FA, Freund TF, Somogyi P. 2003. Large variability in synaptic N-methyl-D-aspartate receptor density on interneurons and a comparison with pyramidal-cell spines in the rat hippocampus. *Neuroscience* **119**: 347–363

Nykänen NP, Kysenius K, Sakha P, Tammela P, Huttunen HJ. 2012. γ-aminobutyric acid type A (GABA A) receptor activation modulates Tau phosphorylation. *J Biol Chem* **287**: 6743–6752.

O'Brien RJ, Wong PC. 2011. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci* **34**: 185–204.

Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Van Eldik L, et al. 2006. Intraneuronal β-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: Potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci* **26**: 10129–10140.

Odawara T, Iseki E, Kosaka K, Akiyama H, Ikeda K, Yamamoto T. 1995. Investigation of tau-2 positive microglia-like cells in the subcortical nuclei of human neurodegenerative disorders. *Neurosci Lett* **192**: 145–148.

Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kayed R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM. 2003. Triple-transgenic model of Alzheimer's Disease with plaques and tangles: Intracellular Aβ and synaptic dysfunction. *Neuron* **39**: 409–421.

Okamura N, Furumoto S, Fodero-Tavoletti MT, Mulligan RS, Harada R, Yates P, Pejoska S, Kudo Y, Masters CL, Yanai K, et al. 2014. Non-invasive assessment of Alzheimer's disease neurofibrillary pathology using 18F-THK5105 PET. *Brain* **137**: 1762–1771.

Okamura N, Furumoto S, Harada R, Tago T, Yoshikawa T, Fodero-Tavoletti M, Mulligan RS, Villemagne VL, Akatsu H, Yamamoto T, et al. 2013. Novel 18F-labeled arylquinoline derivatives for noninvasive imaging of Tau pathology in Alzheimer disease. *J Nucl Med* **54**: 1420–1427.

Onos KD, Sukoff Rizzo SJ, Howell GR, Sasner M. 2016. Toward more predictive genetic mouse models of Alzheimer's disease. *Brain Res Bull* **122**: 1–11.

Ortner M, Pasquini L, Barat M, Alexopoulos P, Grimmer T, Förster S, Diehl-Schmid J, Kurz A, Förstl H, Zimmer C, et al. 2016. Progressively disrupted intrinsic functional connectivity of basolateral amygdala in very early Alzheimer's disease. *Front Neurol* **7**: 132.

Osborn LM, Kamphuis W, Wadman WJ, Hol EM. 2016. Astrogliosis: An integral player in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* **144**: 121–141.

Overmyer M, Helisalmi S, Soininen H, Laakso M, Riekkinen P, Alafuzoff I. 1999. Reactive microglia in aging and dementia: An immunohistochemical study of postmortem human brain tissue. *Acta Neuropathol* **97**: 383–392.

Paik S, Somvanshi RK, Kumar U. 2019. Somatostatin Maintains Permeability and Integrity of Blood-Brain Barrier in β-Amyloid Induced Toxicity. *Mol Neurobiol* **56**: 292–306.

Palmer AM, Gershon S. 1990. Is the neuronal basis of Alzheimer's disease cholinergic or glutamatergic? *FASEB J* **4**: 2745–2752.

Palop JJ, Mucke L. 2016. Network abnormalities and interneuron dysfunction in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci* **17**: 777–792.

Palpagama TH, Waldvogel HJ, Faull RLM, Kwakowsky A. 2019. The Role of

UNIVERSIDAD DE MALAGA

Microglia and Astrocytes in Huntington's Disease. *Front Mol Neurosci* **12**.

Panza F, Lozupone M, Seripa D, Imbimbo BP. 2019. Amyloid-β immunotherapy for alzheimer disease: Is it now a long shot? *Ann Neurol* **85**: 303–315.

Paonessa F, Evans LD, Solanki R, Larrieu D, Wray S, Hardy J, Jackson SP, Livesey FJ. 2019. Microtubules Deform the Nuclear Membrane and Disrupt Nucleocytoplasmic Transport in Tau-Mediated Frontotemporal Dementia. *Cell Rep* **26**: 582-593.e5.

Patel TK, Habimana-Griffin L, Gao X, Xu B, Achilefu S, Alitalo K, McKee CA, Sheehan PW, Musiek ES, Xiong C, et al. 2019. Dural lymphatics regulate clearance of extracellular tau from the CNS. *Mol Neurodegener* **14**: 11.

Paula-Lima AC, Brito-Moreira J, Ferreira ST. 2013. Deregulation of excitatory neurotransmission underlying synapse failure in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **126**: 191–202.

Penazzi L, Tackenberg C, Ghori A, Golovyashkina N, Niewidok B, Selle K, Ballatore C, Smith AB, Bakota L, Brandt R. 2016. Aβ-mediated spine changes in the hippocampus are microtubule-dependent and can be reversed by a subnanomolar concentration of the microtubule-stabilizing agent epothilone D. *Neuropharmacology* **105**: 84–95.

Penazzi L, Tackenberg C, Ghori A, Golovyashkina N, Niewidok B, Selle K, Ballatore C, Smith AB, Bakota L, Brandt R. 2016. Aβ-mediated spine changes in the hippocampus are microtubule-dependent and can be reversed by a subnanomolar concentration of the microtubule-stabilizing agent epothilone D. *Neuropharmacology* **105**: 84–95.

Penègre C, Duquette A, Leclerc N. 2019. Tau secretion: Good and bad for neurons. *Front Neurosci* **13**.

Pepeu G, Grazia Giovannini M. 2017. The fate of the brain cholinergic neurons in neurodegenerative diseases. *Brain Res* **1670**: 173–184.

Perea JR, Ávila J, Bolós M. 2018. Dephosphorylated rather than hyperphosphorylated Tau triggers a pro-inflammatory profile in microglia through the p38 MAPK pathway. *Exp Neurol* **310**: 14–21.

Perea JR, Llorens-Martín M, Ávila J, Bolós M. 2018. The role of microglia in the spread of Tau: Relevance for tauopathies. *Front Cell Neurosci* **12**.

Perea JR, López E, Diéz-Ballesteros JC, Ávila J, Hernández F, Bolós M. 2019. Extracellular monomeric tau is internalized by astrocytes. *Front Neurosci* **13**.

Pérez M, Avila J, Hernández F. 2019. Propagation of tau via extracellular vesicles. *Front Neurosci* **13**: 698.

Pérez MJ, Jara C, Quintanilla RA. 2018. Contribution of Tau pathology to mitochondrial impairment in neurodegeneration. *Front Neurosci* **12**: 441.

Perez-Nievas BG, Serrano-Pozo A. 2018. Deciphering the astrocyte reaction in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* **10**: 114.

Perez-Nievas BG, Stein TD, Tai HC, Dols-Icardo O, Scotton TC, Barroeta-Espar I, Fernandez-Carballo L, De Munain EL, Perez J, Marquie M, et al. 2013. Dissecting phenotypic traits linked to human resilience to Alzheimer's pathology. *Brain* **136**: 2510–2526.

Perl DP. 2010. Neuropathology of Alzheimer ' s Disease. *Mt Sinai J Med* **77**: 32–42.

Perry G, Friedman R, Shaw G, Chau V. 1987. Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 3033–3036.

Pickett EK, Herrmann AG, McQueen J, Abt K, Dando O, Tulloch J, Jain P, Dunnett S, Sohrabi S, Fjeldstad MP, et al. 2019. Amyloid Beta and Tau Cooperate to Cause Reversible Behavioral and Transcriptional Deficits in a Model of

UNIVERSIDAD DE MALAGA

Alzheimer’s Disease.

Pikkarainen M, Rönkkö S, Savander V, Insausti R, Pitkänen A. 1999. Projections from the lateral, basal, and accessory basal nuclei of the amygdala to the hippocampal formation in rat. *J Comp Neurol* **403**: 229–260.

Pimenova AA, Raj T, Goate AM. 2018. Untangling Genetic Risk for Alzheimer's Disease. *Biol Psychiatry* **83**: 300–310.

Pinheiro L, Faustino C. 2019. Therapeutic Strategies Targeting Amyloid-β in Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res* **16**: 418–452.

Piras A, Collin L, Grüninger F, Graff C, Rönnbäck A. 2016. Autophagic and lysosomal defects in human tauopathies: analysis of post-mortem brain from patients with familial Alzheimer disease, corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol Commun* **4**: 22.

Pluvinage J V., Haney MS, Smith BAH, Sun J, Iram T, Bonanno L, Li L, Lee DP, Morgens DW, Yang AC, et al. 2019. CD22 blockade restores homeostatic microglial phagocytosis in ageing brains. *Nature* **568**: 187–192.

Portran D, Schaedel L, Xu Z, Théry M, Nachury M V. 2017. Tubulin acetylation protects long-lived microtubules against mechanical ageing. *Nat Cell Biol* **19**: 391–398.

Prinz M, Priller J, Sisodia SS, Ransohoff RM. 2011. Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nat Neurosci* **14**: 1227–1235.

Probst A, Ulrich J, Heitz PU. 1982. Senile dementia of Alzheimer type: Astroglial reaction to extracellular neurofibrillary tangles in the hippocampus - An immunocytochemical and electron-microscopic study. *Acta Neuropathol* **57**: 75–79.

Quintanilla RA, von Bernhardi R, Godoy JA, Inestrosa NC, Johnson GVW. 2014. Phosphorylated tau potentiates Aβ-induced mitochondrial damage in mature neurons. *Neurobiol Dis* **71**: 260–269.

Rai SN, Singh C, Singh A, Singh MP, Singh BK. 2020. Mitochondrial Dysfunction: a Potential Therapeutic Target to Treat Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol* **57**: 3075–3088.

Ramírez E, Sánchez-Maldonado C, Mayoral MA, Mendieta L, Alatriste V, Patricio-Martínez A, Limón ID. 2019. Neuroinflammation induced by the peptide amyloid-β (25–35) increase the presence of galectin-3 in astrocytes and microglia and impairs spatial memory. *Neuropeptides* **74**: 11–23.

Rammes G, Mattusch C, Wulff M, Seeser F, Kreuzer M, Zhu K, Deussing JM, Herms J, Parsons CG. 2017. Involvement of GluN2B subunit containing N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in mediating the acute and chronic synaptotoxic effects of oligomeric amyloid-beta (Aβ) in murine models of Alzheimer's disease (AD). *Neuropharmacology* **123**: 100–115.

Ramos B, Baglietto-Vargas D, Rio JC del, Moreno-Gonzalez I, Santa-Maria C, Jimenez S, Caballero C, Lopez-Tellez JF, Khan ZU, Ruano D, et al. 2006. Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1 × APP transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **27**: 1658–1672.

Ramprasad MP, Fischer W, Witztum JL, Sambrano GR, Quehenberger O, Steinberg D. 1995. The 94- to 97-kDa mouse macrophage membrane protein that recognizes oxidized low density lipoprotein and phosphatidylserine-rich liposomes is identical to macrosialin, the mouse homologue of human CD68. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 9580–9584.

Ransohoff RM. 2016. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science (80-)* **353**: 777–783.

Rasmussen J, Krasemann S, Altmeppen H, Schwarz P, Schelle J, Aguzzi A, Glatzel M, Jucker M. 2018. Infectious prions do not induce Aβ deposition in an in vivo seeding model. *Acta Neuropathol* **135**:

UNIVERSIDAD DE MALAGA

965–967.

Rauch JN, Luna G, Guzman E, Audouard M, Challis C, Sibih YE, Leshuk C, Hernandez I, Wegmann S, Hyman BT, et al. 2020. LRP1 is a master regulator of tau uptake and spread. *Nature* **580**: 381–385.

Reichmann G, Schroeter M, Jander S, Fischer HG. 2002. Dendritic cells and dendritic-like microglia in focal cortical ischemia of the mouse brain. *J Neuroimmunol* **129**: 125–132.

Reitz C. 2012. Alzheimer's disease and the amyloid cascade hypothesis: A critical review. *Int J Alzheimers Dis*.

Renner M, Lacor PN, Velasco PT, Xu J, Contractor A, Klein WL, Triller A. 2010. Deleterious Effects of Amyloid β Oligomers Acting as an Extracellular Scaffold for mGluR5. *Neuron* **66**: 739–754.

Ribé EM, Pérez M, Puig B, Gich I, Lim F, Cuadrado M, Sesma T, Catena S, Sánchez B, Nieto M, et al. 2005. Accelerated amyloid deposition, neurofibrillary degeneration and neuronal loss in double mutant APP/tau transgenic mice. *Neurobiol Dis* **20**: 814–822.

Ridler C. 2018. Tau seeding starts early in the entorhinal cortex. *Nat Rev Neurol* **14**: 380.

Riley KP, Snowdon DA, Markesbery WR. 2002. Alzheimer's neurofibrillary pathology and the spectrum of cognitive function: Findings from the Nun Study. *Ann Neurol* **51**: 567–577.

Rinne JO, Säkö E, Paljärvi L, Mölsä PK, Rinne UK. 1988. A comparison of brain choline acetyltransferase activity in Alzheimer's disease, multi-infarct dementia, and combined dementia. *J Neural Transm* **73**: 121–128.

Roberson ED, Halabisky B, Yoo JW, Yao J, Chin J, Yan F, Wu T, Hamto P, Devidze N, Yu GQ, et al. 2011. Amyloid-β/fyn-induced synaptic, network, and cognitive impairments depend on tau levels in multiple mouse models of alzheimer's disease. *J Neurosci* **31**: 700–711.

Rodríguez-Arellano JJ, Parpura V, Zorec R, Verkhratsky A. 2016. Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience* **323**: 170–182.

Romero-Molina C, Navarro V, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Fernandez-Valenzuela JJ, Sanchez-Mico M V., Muñoz-Castro C, Gutierrez A, Vitorica J, Vizuete M. 2018. Distinct Microglial Responses in Two Transgenic Murine Models of TAU Pathology. *Front Cell Neurosci* **12**: 421.

Rösler TW, Costa M, Höglinger GU. 2020. Disease-modifying strategies in primary tauopathies. *Neuropharmacology* **167**.

Rudinskiy N, Hawkes JM, Wegmann S, Kuchibhotla K V., Muzikansky A, Betensky RA, Spires-Jones TL, Hyman BT. 2014. Tau pathology does not affect experience-driven single-neuron and network-wide Arc/Arg3.1 responses. *Acta Neuropathol Commun* **2**: 63.

Sadleir KR, Kandalepas PC, Buggia-Prévot V, Nicholson DA, Thinakaran G, Vassar R. 2016. Presynaptic dystrophic neurites surrounding amyloid plaques are sites of microtubule disruption, BACE1 elevation, and increased Aβ generation in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **132**: 235–256.

Sahara N, Maeda J, Ishikawa A, Tokunaga M, Suhara T, Higuchi M. 2018. Microglial Activation during Pathogenesis of Tauopathy in rTg4510 Mice: Implications for the Early Diagnosis of Tauopathy. *J Alzheimer's Dis* **64**: S353–S359.

Saito T, Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Takano J, Huang SM, Suemoto T, Higuchi M, Saido TC. 2005. Somatostatin regulates brain amyloid β peptide Aβ42 through modulation of proteolytic degradation. *Nat Med* **11**: 434–439.

Saito T, Matsuba Y, Mihira N, Takano J, Nilsson P, Itohara S, Iwata N, Saido TC. 2014. Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* **17**: 661–663.

Saito T, Saido TC. 2018. Neuroinflammation in mouse models of Alzheimer's disease. *Clin Exp Neuroimmunol* **9**: 211–218.

UNIVERSIDAD DE MALAGA

Sala Frigerio C, Wolfs L, Fattorelli N, Thrupp N, Voytyuk I, Schmidt I, Mancuso R, Chen WT, Woodbury ME, Srivastava G, et al. 2019. The Major Risk Factors for Alzheimer's Disease: Age, Sex, and Genes Modulate the Microglia Response to Aβ Plaques. *Cell Rep* **27**: 1293-1306.e6.

Sánchez-Mejías, E. 2015. Estudio neuropatológico del hipocampo y giro parahipocampal en la enfermedad de Alzheimer: de modelos transgénicos a humanos. Tesis doctoral.

Sanchez-Mejias E, Navarro V, Jimenez S, Sanchez-Mico M, Sanchez-Varo R, Nuñez-Diaz C, Trujillo-Estrada L, Davila JC, Vizuete M, Gutierrez A, et al. 2016. Soluble phospho-tau from Alzheimer's disease hippocampus drives microglial degeneration. *Acta Neuropathol* **132**: 897–916.

Sanchez-Mejias E, Nuñez-Diaz C, Sanchez-Varo R, Gomez-Arboledas A, Garcia-Leon JA, Fernandez-Valenzuela JJ, Mejias-Ortega M, Trujillo-Estrada L, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, et al. 2019. Distinct disease-sensitive GABAergic neurons in the perirhinal cortex of Alzheimer's mice and patients. *Brain Pathol* bpa.12785.

Sanchez-Mico, MV. 2019. Caracterización de la respuesta y función astroglial en modelos y pacientes de la enfermedad de Alzheimer. Tesis Doctoral.

Sanchez-Varo, R. 2011. Estudio de la neuropatología neurítica y sináptica en el hipocampo del modelo transgénico murino PS1/APP de la enfermedad de Alzheimer. Tesis Doctoral.

Sanchez-Varo R, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, De Castro V, Jimenez S, Ruano D, Vizuete M, et al. 2012. Abnormal accumulation of autophagic vesicles correlates with axonal and synaptic pathology in young Alzheimer's mice hippocampus. *Acta Neuropathol* **123**: 53–70.

Sanders DW, Kaufman SK, DeVos SL, Sharma AM, Mirbaha H, Li A, Barker SJ, Foley AC, Thorpe JR, Serpell LC, et al. 2014. Distinct tau prion strains propagate in cells and mice and define different tauopathies. *Neuron* **82**: 1271–1288.

Santacruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, Guimaraes A, DeTure M, Ramsden M, McCowan E, et al. 2005. Medicine: Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science (80-)* **309**: 476–481.

Santa-María I, Hernández F, Smith MA, Perry G, Avila J, Moreno FJ. 2005. Neurotoxic dopamine quinone facilitates the assembly of tau into fibrillar polymers. *Mol Cell Biochem* **278**: 203–212.

Sarlus H, Heneka MT. 2017. Microglia in Alzheimer's disease. *J Clin Invest* **127**: 3240–3249.

Sasaguri H, Nilsson P, Hashimoto S, Nagata K, Saito T, De Strooper B, Hardy J, Vassar R, Winblad B, Saido TC. 2017. APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies. *EMBO J* **36**: 2473–2487.

Sasaki A, Kawarabayashi T, Murakami T, Matsubara E, Ikeda M, Hagiwara H, Westaway D, George-Hyslop PS, Shoji M, Nakazato Y. 2008. Microglial activation in brain lesions with tau deposits: Comparison of human tauopathies and tau transgenic mice TgTauP301L. *Brain Res* **1214**: 159–168.

Sayed FA, Telpoukhovskaia M, Kodama L, Li Y, Zhou Y, Le D, Hauduc A, Ludwig C, Gao F, Clelland C, et al. 2018. Differential effects of partial and complete loss of TREM2 on microglial injury response and tauopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**: 201811411.

Schäfer MKH, Eiden LE, Weihe E. 1998. Cholinergic neurons and terminal fields revealed by immunohistochemistry for the vesicular acetylcholine transporter. I. Central nervous system. *Neuroscience* **84**: 331–359.

Scheff SW, Neltner JH, Nelson PT. 2014. Is synaptic loss a unique hallmark of Alzheimer's disease? *Biochem Pharmacol* **88**: 517–528.

Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, Mufson EJ.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2006. Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* **27**: 1372–1384.

Scheiblich H, Trombly M, Ramirez A, Heneka MT. 2020. Neuroimmune Connections in Aging and Neurodegenerative Diseases. *Trends Immunol* 1–13.

Scheltens P, Blennow K, Breteler MMB, de Strooper B, Frisoni GB, Salloway S, Van der Flier WM. 2016. Alzheimer's disease. *Lancet* **388**: 505–517.

Schindowski K, Bretteville A, Leroy K, Bégard S, Brion JP, Hamdane M, Buée L. 2006. Alzheimer's disease-like tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated tau transgenic mouse without any motor deficits. *Am J Pathol* **169**: 599–616.

Schulze E, Asai DJ, Bulinski JC, Kirschner M. 1987. Posttranslational modification and microtubule stability. *J Cell Biol* **105**: 2167–2177.

Scrivo A, Bourdenx M, Pampliega O, Cuervo AM. 2018. Selective autophagy as a potential therapeutic target for neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol* **17**: 802–815.

Selkoe DJ. and Hardy J. 2016. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* **8**: 1409–1420.

Selkoe DJ. 2001. Alzheimer's disease: Genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* **81**: 741–766.

Sengupta A, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. 2006. Regulation of phosphorylation of tau by cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase-3 at substrate level. *FEBS Lett* **580**: 5925–5933.

Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. 2011. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **1**: a006189.

Serrano-Pozo A, Mielke ML, Gómez-Isla T, Betensky RA, Growdon JH, Frosch MP, Hyman BT. 2011. Reactive glia not only associates with plaques but also parallels tangles in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* **179**: 1373–1384.

Serrano-Pozo A, Muzikansky A, Gómez-Isla T, Growdon JH, Betensky RA, Frosch MP, Hyman BT. 2013. Differential relationships of reactive astrocytes and microglia to fibrillar amyloid deposits in alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **72**: 462–471.

Shafiei SS, Guerrero-Muñoz MJ, Castillo-Carranza DL. 2017. Tau oligomers: Cytotoxicity, propagation, and mitochondrial damage. *Front Aging Neurosci* **9**.

Sheffield LG, Marquis JG, Berman NEJ. 2000. Regional distribution of cortical microglia parallels that of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **285**: 165–168.

Sheng JG, Mrak RE, Griffin WST. 1997. Glial-neuronal interactions in Alzheimer disease: Progressive association of IL-1α+ microglia and S100β+ astrocytes with neurofibrillary tangle stages. *J Neuropathol Exp Neurol* **56**: 285–290.

Sheridan GK, Murphy KJ. 2013. Neuron-glia crosstalk in health and disease: Fractalkine and CX3CR1 take centre stage. *Open Biol* **3**: 1–14.

Shi Y, Holtzman DM. 2018. Interplay between innate immunity and Alzheimer disease: APOE and TREM2 in the spotlight. *Nat Rev Immunol* **18**: 759–772.

Shi Y, Manis M, Long J, Wang K, Sullivan PM, Remolina Serrano J, Hoyle R, Holtzman DM. 2019. Microglia drive APOE-dependent neurodegeneration in a tauopathy mouse model. *J Exp Med* **216**: 2546–2561.

Shi Y, Yamada K, Liddelow SA, Smith ST, Zhao L, Luo W, Tsai RM, Spina S, Grinberg LT, Rojas JC, et al. 2017. ApoE4 markedly exacerbates tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of tauopathy. *Nature* **549**: 523–527.

Shipton OA, Leitz JR, Dworzak J, Acton CEJ, Tunbridge EM, Denk F, Dawson HN, Vitek MP, Wade-Martins R, Paulsen O, et al. 2011. Tau protein is required for amyloid β-induced impairment of hippocampal long-term potentiation. *J*

UNIVERSIDAD DE MALAGA

Neurosci **31**: 1688–1692.

Sidoryk-Wegrzynowicz M, Gerber YN, Ries M, Sastre M, Tolkovsky AM, Spillantini MG. 2017. Astrocytes in mouse models of tauopathies acquire early deficits and lose neurosupportive functions. *Acta Neuropathol Commun* **5**: 89.

Sierksma A, Lu A, Mancuso R, Fattorelli N, Thrupp N, Salta E, Zoco J, Blum D, Buée L, De Strooper B, et al. 2020. Novel Alzheimer risk genes determine the microglia response to amyloid-β but not to TAU pathology. *EMBO Mol Med* **12**.

Sierra A, Paolicelli RC, Kettenmann H. 2019. Cien Años de Microglía: Milestones in a Century of Microglial Research. *Trends Neurosci* **42**: 778–792.

Siew JJ, Chen HM, Chen HY, Chen HL, Chen CM, Soong BW, Wu YR, Chang CP, Chan YC, Lin CH, et al. 2019. Galectin-3 is required for the microglia-mediated brain inflammation in a model of Huntington's disease. *Nat Commun* **10**: 1–18.

Sims R, Hill M, Williams J. 2020. The multiplex model of the genetics of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* **23**: 311–322.

Sofroniew M V., Vinters H V. 2010. Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathol* **119**: 7–35.

Solarski M, Wang H, Wille H, Schmitt-Ulms G. 2018. Somatostatin in Alzheimer's disease: A new Role for an Old Player. *Prion* **12**: 1–8.

Soler H, Dorca-Arévalo J, González M, Rubio SE, Ávila J, Soriano E, Pascual M. 2017. The GABAergic septohippocampal connection is impaired in a mouse model of tauopathy. *Neurobiol Aging* **49**: 40–51.

Song L, Lee C, Schindler C. 2011. Deletion of the murine scavenger receptor CD68. *J Lipid Res* **52**: 1542–1550.

Song WM, Colonna M. 2018. The identity and function of microglia in neurodegeneration. *Nat Immunol* **19**: 1048–1058.

Song Y, Brady ST. 2015. Post-translational modifications of tubulin: Pathways to functional diversity of microtubules. *Trends Cell Biol* **25**: 125–136.

Sorra KE, Harris KM. 2000. Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus* **10**: 501–511.

Sosna J, Philipp S, Albay RI, Reyes-Ruiz JM, Baglietto-Vargas D, LaFerla FM, Glabe CG. 2018. Early long-term administration of the CSF1R inhibitor PLX3397 ablates microglia and reduces accumulation of intraneuronal amyloid, neuritic plaque deposition and pre-fibrillar oligomers in 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* **13**: 1–11.

Sotiropoulos I, Galas MC, Silva JM, Skoulakis E, Wegmann S, Maina MB, Blum D, Sayas CL, Mandelkow EM, Mandelkow E, et al. 2017. Atypical, non-standard functions of the microtubule associated Tau protein. *Acta Neuropathol Commun* **5**: 91.

Spangenberg E, Severson PL, Hohsfield LA, Crapser J, Zhang J, Burton EA, Zhang Y, Spevak W, Lin J, Phan NY, et al. 2019. Sustained microglial depletion with CSF1R inhibitor impairs parenchymal plaque development in an Alzheimer's disease model. *Nat Commun* **10**: 1–21.

Španić E, Langer Horvat L, Hof PR, Šimić G. 2019. Role of Microglial Cells in Alzheimer's Disease Tau Propagation. *Front Aging Neurosci* **11**: 271.

Spanopoulou E, Giguere V, Grosveld F. 1991. The functional domains of the murine Thy-1 gene promoter. *Mol Cell Biol* **11**: 2216–2228.

Speciale L, Calabrese E, Saresella M, Tinelli C, Mariani C, Sanvito L, Longhi R, Ferrante P. 2007. Lymphocyte subset patterns and cytokine production in Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging* **28**: 1163–1169.

Spires TL, Orne JD, SantaCruz K, Pitstick R, Carlson GA, Ashe KH, Hyman BT. 2006. Region-specific dissociation of neuronal loss and neurofibrillary pathology in a mouse model of tauopathy. *Am J Pathol*

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

168: 1598–1607.

Stam CJ, Van Cappellen van Walsum AM, Pijnenburg YAL, Berendse HW, De Munck JC, Scheltens P, Van Dijk BW. 2002. Generalized synchronization of MEG recordings in Alzheimer's disease: Evidence for involvement of the gamma band. *J Clin Neurophysiol* **19**: 562–574.

St-Amour I, Bosoi CR, Paré I, Ignatius Arokia Doss PM, Rangachari M, Hébert SS, Bazin R, Calon F. 2019. Peripheral adaptive immunity of the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* **16**: 1–12.

Stoica HM, Cole AL, Swartzlander DB, Chen F, Wan YW, Bajaj L, Bader DA. 2018. TFEB enhances astroglial uptake of extracellular tau species and reduces tau spreading. *J Exp Med* **215**: 2355–2377.

Stopford CL, Thompson JC, Neary D, Richardson AMT, Snowden JS. 2012. Working memory, attention, and executive function in Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Cortex* **48**: 429–446.

Stozicka Z, Zilka N, Novak P, Kovacech B, Bugos O, Novak M. 2010. Genetic background modifies neurodegeneration and neuroinflammation driven by misfolded human tau protein in rat model of tauopathy: Implication for immunomodulatory approach to Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* **7**: 64.

Stranahan AM, Mattson MP. 2010. Selective vulnerability of neurons in layer II of the entorhinal cortex during aging and Alzheimer's disease. *Neural Plast* **2010**: 1–8.

Strang KH, Golde TE, Giasson BI. 2019. MAPT mutations, tauopathy, and mechanisms of neurodegeneration. *Lab Investig* **99**: 912–928. http://dx.doi.org/10.1038/s41374-019-0197-x.

Stratoulias V, Venero JL, Tremblay M, Joseph B. 2019. Microglial subtypes: diversity within the microglial community. *EMBO J* **38**.

Streit WJ, Braak H, Xue QS, Bechmann I. 2009. Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **118**: 475–485.

Streit WJ, Khoshbouei H, Bechmann I. 2020. Dystrophic microglia in late-onset Alzheimer's disease. *Glia* **68**: 845–854.

Su B, Wang X, Drew KL, Perry G, Smith MA, Zhu X. 2008. Physiological regulation of tau phosphorylation during hibernation. *J Neurochem* **105**: 2098–2108.

Suzhen D, Yale D, Feng G, Yinghe H, Zheng Z. 2012. Advances in the pathogenesis of Alzheimer's disease: a re-evaluation of amyloid cascade hypothesis. *Transl Neurodegener* **1**: 18.

Suzuki M, Kimura T. 2017. Microtubule-associated protein tau contributes to intra-dendritic trafficking of AMPA receptors in multiple. *Neurosci Lett* **653**: 276–282.

Szabadits E, Cserép C, Szonyi A, Fukazawa Y, Shigemoto R, Watanabe M, Itohara S, Freund TF, Nyiri G. 2011. NMDA receptors in hippocampal GABAergic synapses and their role in nitric oxide signaling. *J Neurosci* **31**: 5893–5904.

Sze CI, Troncoso JC, Kawas C, Mouton P, Price DL, Martin LJ. 1997. Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **56**: 933–944.

Takahashi K, Rochford CDP, Neumann H. 2005. Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *J Exp Med* **201**: 647–657.

Takahashi RH, Nagao T, Gouras GK. 2017. Plaque formation and the intraneuronal accumulation of β-amyloid in Alzheimer's disease. *Pathol Int* **67**: 185–193.

UNIVERSIDAD DE MALAGA

Takeuchi H, Iba M, Inoue H, Higuchi M, Takao K, Tsukita K, Karatsu Y, Iwamoto Y, Miyakawa T, Suhara T, et al. 2011. P301S mutant human tau transgenic mice manifest early symptoms of human tauopathies with dementia and altered sensorimotor gating. *PLoS One* **6**.

Tam WY, Ma CHE. 2014. Bipolar/rod-shaped microglia are proliferating microglia with distinct M1/M2 phenotypes. *Sci Rep* **4**: 1–7.

Tamboli IY, Hampel H, Tien NT, Tolksdorf K, Breiden B, Mathews PM, Saftig P, Sandhoff K, Walter J. 2011. Sphingolipid storage affects autophagic metabolism of the amyloid precursor protein and promotes Aβ generation. *J Neurosci* **31**: 1837–1849.

Tao CC, Cheng KM, Ma YL, Hsu WL, Chen YC, Fuh JL, Lee WJ, Chao CC, Lee EHY. 2020. Galectin-3 promotes Aβ oligomerization and Aβ toxicity in a mouse model of Alzheimer's disease. *Cell Death Differ* **27**: 192–209.

Tariot PN, Lopera F, Langbaum JB, Thomas RG, Hendrix S, Schneider LS, Rios-Romenets S, Giraldo M, Acosta N, Tobon C, et al. 2018. The Alzheimer's Prevention Initiative Autosomal-Dominant Alzheimer's Disease Trial: A study of crenezumab versus placebo in preclinical PSEN1 E280A mutation carriers to evaluate efficacy and safety in the treatment of autosomal-dominant Alzheimer's diseas. *Alzheimer's Dement Transl Res Clin Interv* **4**: 150–160.

Teter B, Morihara T, Lim GP, Chu T, Jones MR, Zuo X, Paul RM, Frautschy SA, Cole GM. 2019. Curcumin restores innate immune Alzheimer's disease risk gene expression to ameliorate Alzheimer pathogenesis. *Neurobiol Dis* **127**: 432–448.

Tomita T. 2017. Aberrant proteolytic processing and therapeutic strategies in Alzheimer disease. *Adv Biol Regul* **64**: 33–38.

Torres M, Jimenez S, Sanchez-Varo R, Navarro V, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Carmona I, Davila JC, Vizuete M, Gutierrez A, et al. 2012. Defective lysosomal proteolysis and axonal transport are early pathogenic events that worsen with age leading to increased APP metabolism and synaptic Abeta in transgenic APP/PS1 hippocampus. *Mol Neurodegener* **7**: 59.

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

Trujillo-Estrada L, Gomez-Arboledas A, Forner S, Martini AC, Gutierrez A, Baglietto-Vargas D, LaFerla FM. 2019. Astrocytes: From the Physiology to the Disease. *Curr Alzheimer Res* **16**: 675–698.

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

Tsushima H, Emanuele M, Polenghi A, Esposito A, Vassalli M, Barberis A, Difato F, Chieregatti E. 2015. HDAC6 and RhoA are novel players in Abeta-driven disruption of neuronal polarity. *Nat Commun* **6**.

Ulland TK, Song WM, Huang SCC, Ulrich JD, Sergushichev A, Beatty WL, Loboda AA, Zhou Y, Cairns NJ, Kambal A, et al. 2017. TREM2 Maintains Microglial Metabolic Fitness in Alzheimer's Disease. *Cell* **170**: 649-663.e13.

Ulrich G, Salvadè A, Boersema P, Calì T, Foglieni C, Sola M, Picotti P, Papin S, Paganetti P. 2018. Phosphorylation of nuclear Tau is modulated by distinct cellular pathways. *Sci Rep* **8**.

Ulrich JD, Finn MB, Wang Y, Shen A, Mahan TE, Jiang H, Stewart FR, Piccio L, Colonna M, Holtzman DM. 2014. Altered microglial response to Aβ plaques in APPPS1-21

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

mice heterozygous for TREM2. *Mol Neurodegener* **9**: 20.

Ulrich JD, Ulland TK, Colonna M, Holtzman DM. 2017. Elucidating the Role of TREM2 in Alzheimer's Disease. *Neuron* **94**: 237–248.

Unal G, Joshi A, Viney TJ, Kis V, Somogyi P. 2015. Synaptic targets of medial septal projections in the hippocampus and extrahippocampal cortices of the mouse. *J Neurosci* **35**: 15812–15826.

Vainchtein ID, Molofsky A V. 2020. Astrocytes and Microglia: In Sickness and in Health. *Trends Neurosci* **43**: 144–154.

Van der Jeugd A, Blum D, Raison S, Eddarkaoui S, Buée L, D'Hooge R. 2013. Observations in THY-Tau22 mice that resemble behavioral and psychological signs and symptoms of dementia. *Behav Brain Res* **242**: 34–39.

van der Kant R, Goldstein LSB, Ossenkoppele R. 2020. Amyloid-β-independent regulators of tau pathology in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci* **21**: 21–35.

van Groen T, Miettinen P, Kadish I. 2003. The entorhinal cortex of the mouse: Organization of the projection to the hippocampal formation. *Hippocampus*

van Olst L, Verhaege D, Franssen M, Kamermans A, Roucourt B, Carmans S, Ytebrouck E, van der Pol SMA, Wever D, Popovic M, et al. 2020. Microglial activation arises after aggregation of phosphorylated-tau in a neuron-specific P301S tauopathy mouse model. *Neurobiol Aging*.

Van Strien NM, Cappaert NLM, Witter MP. 2009. The anatomy of memory: An interactive overview of the parahippocampal- hippocampal network. *Nat Rev Neurosci* **10**: 272–282.

Vargas-Caballero M, Denk F, Wobst HJ, Arch E, Pegasiou CM, Oliver PL, Shipton OA, Paulsen O, Wade-Martins R. 2017. Wild-type, but not mutant N296H, human Tau restores Aβ-Mediated inhibition of LTP in Tau-/- mice. *Front Neurosci* **11**: 201.

Varidaki A, Hong Y, Coffey ET. 2018. Repositioning microtubule stabilizing drugs for brain disorders. *Front Cell Neurosci* **12**: 226.

Vetrivel KS, Cheng H, Kim SH, Chen Y, Barnes NY, Parent AT, Sisodia SS, Thinakaran G. 2005. Spatial segregation of γ-secretase and substrates in distinct membrane domains. *J Biol Chem* **280**: 25892–25900.

Vetrivel KS, Zhang YW, Xu H, Thinakaran G. 2006. Pathological and physiological functions of presenilins. *Mol Neurodegener* **1**: 4.

Vidal M, Morris R, Grosveld F, Spanopoulou E. 1990. Tissue-specific control elements of the Thy-1 gene. *EMBO J* **9**: 833–840.

Vilalta A, Brown GC. 2018. Neurophagy, the phagocytosis of live neurons and synapses by glia, contributes to brain development and disease. *FEBS J* **285**: 3566–3575.

Viola KL, Klein WL. 2015. Amyloid β oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. *Acta Neuropathol* **129**: 183–206.

Violet M, Chauderlier A, Delattre L, Tardivel M, Chouala MS, Sultan A, Marciniak E, Humez S, Binder L, Kayed R, et al. 2015. Prefibrillar Tau oligomers alter the nucleic acid protective function of Tau in hippocampal neurons in vivo. *Neurobiol Dis* **82**: 540–551.

Vogel-Ciernia A, Wood MA. 2014. Examining object location and object recognition memory in mice. *Curr Protoc Neurosci* **2014**: 8.31.1-8.31.17.

Vogels T, Leuzy A, Cicognola C, Ashton NJ, Smolek T, Novak M, Blennow K, Zetterberg H, Hromadka T, Zilka N, et al. 2019. Propagation of Tau Pathology : Integrating Insights From Postmortem and In Vivo Studies. *Biol Psychiatry* 1–11.

Vogt BA, Vogt LJ, Vrana KE, Gioia L, Meadows RS, Challa VR, Hof PR, Van Hoesen GW. 1998. Multivariate analysis of laminar patterns of neurodegeneration in posterior cingulate cortex in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* **153**: 8–22.

Vogt LJK, Hyman BT, Van Hoesen GW,

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Damasio AR. 1990. Pathological alterations in the amygdala in Alzheimer's disease. *Neuroscience* **37**: 377–385.

Vossel KA, Xu JC, Fomenko V, Miyamoto T, Suberbielle E, Knox JA, Ho K, Kim DH, Yu GQ, Mucke L. 2015. Tau reduction prevents Aβ-induced axonal transport deficits by blocking activation of GSK3β. *J Cell Biol* **209**: 419–433.

Walker DG, Tang TM, Mendsaikhan A, Tooyama I, Serrano GE, Sue LI, Beach TG, Lue L-F. 2020. Patterns of Expression of Purinergic Receptor P2RY12, a Putative Marker for Non-Activated Microglia, in Aged and Alzheimer's Disease Brains. *Int J Mol Sci* **21**: 678.

Walsh DM, Selkoe DJ. 2004. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* **44**: 181–193.

Wang Y, Mandelkow E. 2016. Tau in physiology and pathology. *Nat Rev Neurosci* **17**: 5–21.

Wang Y, Ulland TK, Ulrich JD, Song W, Tzaferis JA, Hole JT, Yuan P, Mahan TE, Shi Y, Gilfillan S, et al. 2016. TREM2-mediated early microglial response limits diffusion and toxicity of amyloid plaques. *J Exp Med* **213**: 667–675.

Webers A, Heneka MT, Gleeson PA. 2020. The role of innate immune responses and neuroinflammation in amyloid accumulation and progression of Alzheimer's disease. *Immunol Cell Biol* **98**: 28–41.

Webster SJ, Bachstetter AD, Nelson PT, Schmitt FA, Van Eldik LJ. 2014. Using mice to model Alzheimer's dementia: An overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Front Genet* **5**: 88.

Wheeler DW, White CM, Rees CL, Komendantov AO, Hamilton DJ, Ascoli GA. 2015. Hippocampome.org: A knowledge base of neuron types in the rodent hippocampus. *Elife* **4**: 1–28.

Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, DeLong MR. 1982. Alzheimer's disease and senile dementia: Loss of neurons in the basal forebrain. *Science (80-)* **215**: 1237–1239.

Wilkins HM, Swerdlow RH. 2017. Amyloid precursor protein processing and bioenergetics. *Brain Res Bull* **133**: 71–79.

Witter MP, Amaral DG. 2004. Hippocampal Formation. In *The Rat Nervous System*, pp. 635–704, Academic Press.

Wittrup A, Lieberman J. 2015. Knocking down disease: A progress report on siRNA therapeutics. *Nat Rev Genet* **16**: 543–552.

Woerman AL, Patel S, Kazmi SA, Oehler A, Freyman Y, Espiritu L, Cotter R, Castaneda JA, Olson SH, Prusiner SB. 2017. Kinetics of human mutant tau prion formation in the brains of 2 transgenic mouse lines. *JAMA Neurol* **74**: 1464–1472.

Wyss-Coray T, Mucke L. 2002. Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron* **35**: 419–32.

Xiao Q, Yan P, Ma X, Liu H, Perez R, Zhu A, Gonzales E, Burchett JM, Schuler DR, Cirrito JR, et al. 2014. Enhancing astrocytic lysosome biogenesis facilitates Aβ clearance and attenuates amyloid plaque pathogenesis. *J Neurosci* **34**: 9607–9620.

Yamamoto A, Yue Z. 2014. Autophagy and Its Normal and Pathogenic States in the Brain. *Annu Rev Neurosci* **37**: 55–78.

Yamazaki Y, Zhao N, Caulfield TR, Liu CC, Bu G. 2019. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. *Nat Rev Neurol* **15**: 501–518.

Yang Y, Wang JZ. 2017. From structure to behavior in basolateral amygdala-hippocampus circuits. *Front Neural Circuits* **11**: 86.

Yang Z, Klionsky DJ. 2010. Mammalian autophagy: Core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol* **22**: 124–131.

Yavorska I, Wehr M. 2016. Somatostatin-expressing inhibitory interneurons in cortical circuits. *Front Neural Circuits* **10**: 1–18.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Yeh FL, Hansen D V., Sheng M. 2017. TREM2, Microglia, and Neurodegenerative Diseases. *Trends Mol Med* **23**: 512–533.

Yeh FL, Wang Y, Tom I, Gonzalez LC, Sheng M. 2016. TREM2 Binds to Apolipoproteins, Including APOE and CLU/APOJ, and Thereby Facilitates Uptake of Amyloid-Beta by Microglia. *Neuron* **91**: 328–340.

Yin Z, Raj D, Saiepour N, Van Dam D, Brouwer N, Holtman IR, Eggen BJL, Möller T, Tamm JA, Abdourahman A, et al. 2017. Immune hyperreactivity of Aβ plaque-associated microglia in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **55**: 115–122.

Yip PK, Carrillo-Jimenez A, King P, Vilalta A, Nomura K, Chau CC, Egerton AMS, Liu ZH, Shetty AJ, Tremoleda JL, et al. 2017. Galectin-3 released in response to traumatic brain injury acts as an alarmin orchestrating brain immune response and promoting neurodegeneration. *Sci Rep* **7**.

Yoshiyama Y, Higuchi M, Zhang B, Huang SM, Iwata N, Saido TCC, Maeda J, Suhara T, Trojanowski JQ, Lee VMY. 2007. Synapse Loss and Microglial Activation Precede Tangles in a P301S Tauopathy Mouse Model. *Neuron* **53**: 337–351.

Yoshiyama Y, Kojima A, Ishikawa C, Arai K. 2010. Anti-inflammatory action of donepezil ameliorates tau pathology, synaptic loss, and neurodegeneration in a tauopathy mouse model. *J Alzheimer's Dis* **22**: 295–306.

Yu WH, Kumar A, Peterhoff C, Shapiro Kulnane L, Uchiyama Y, Lamb BT, Cuervo AM, Nixon RA. 2004. Autophagic vacuoles are enriched in amyloid precursor protein-secretase activities: Implications for β-amyloid peptide over-production and localization in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* **36**: 2531–2540.

Yuan P, Condello C, Keene CD, Wang Y, Bird TD, Paul SM, Luo W, Colonna M, Baddeley D, Grutzendler J. 2016. TREM2 Haplodeficiency in Mice and Humans Impairs the Microglia Barrier Function Leading to Decreased Amyloid Compaction and Severe Axonal Dystrophy. *Neuron* **92**: 252–264.

Yuste R. 2015. The discovery of dendritic spines by Cajal. *Front Neuroanat* **9**: 18.

Zallo F, Gardenal E, Verkhratsky A, Rodríguez JJ. 2018. Loss of calretinin and parvalbumin positive interneurones in the hippocampal CA1 of aged Alzheimer's disease mice. *Neurosci Lett* **681**: 19–25.

Zempel H, Luedtke J, Kumar Y, Biernat J, Dawson H, Mandelkow E, Mandelkow EM. 2013. Amyloid-β oligomers induce synaptic damage via Tau-dependent microtubule severing by TTLL6 and spastin. *EMBO J* **32**: 2920–2937.

Zempel H, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow EM. 2010. Aβ oligomers cause localized Ca2+ elevation, missorting of endogenous Tau into dendrites, Tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines. *J Neurosci* **30**: 11938–11950.

Zhang B, Carroll J, Trojanowski JQ, Yao Y, Iba M, Potuzak JS, Hogan A-ML, Xie SX, Ballatore C, Smith AB, et al. 2012. The Microtubule-Stabilizing Agent, Epothilone D, Reduces Axonal Dysfunction, Neurotoxicity, Cognitive Deficits, and Alzheimer-Like Pathology in an Interventional Study with Aged Tau Transgenic Mice. *J Neurosci* **32**: 3601–3611.

Zhang B, Maiti A, Shively S, Lakhani F, McDonald-Jones G, Bruce J, Lee EB, Xie SX, Joyce S, Li C, et al. 2005. Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model. *Proc Natl Acad Sci* **102**: 227–231.

Zhang F, Jiang L. 2014. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat* **11**: 243–256.

Zhang Q, Li H, Guo F. 2011. Amygdala, an important regulator for food intake. *Front Biol China* **6**: 82–85.

Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H. 2011. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain* **4**.

Zhang Z, Tian Y, Ye K. 2020. δ-secretase in neurodegenerative diseases:

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Mechanisms, regulators and therapeutic opportunities. *Transl Neurodegener* **9**: 1–9.

Zheng J, Akbari M, Schirmer C, Reynaert M-L, Loyens A, Lefebvre B, Buée L, Croteau DL, Galas M-C, Bohr VA. 2020. Hippocampal tau oligomerization early in tau pathology coincides with a transient alteration of mitochondrial homeostasis and DNA repair in a mouse model of tauopathy. *Acta Neuropathol Commun* **8**: 25.

Zheng-Fischhöfer Q, Biernat J, Mandelkow EM, Illenberger S, Godemann R, Mandelkow E. 1998. Sequential phosphorylation of Tau by glycogen synthase kinase-3β and protein kinase A at Thr212 and Ser214 generates the Alzheimer-specific epitope of antibody AT100 and requires a paired-helical-filament-like conformation. *Eur J Biochem* **252**: 542–552.

Zhong Q, Congdon EE, Nagaraja HN, Kuret J. 2012. Tau isoform composition influences rate and extent of filament formation. *J Biol Chem* **287**: 20711–20719.

Zhou L, McInnes J, Wierda K, Holt M, Herrmann AG, Jackson RJ, Wang YC, Swerts J, Beyens J, Miskiewicz K, et al. 2017. Tau association with synaptic vesicles causes presynaptic dysfunction. *Nat Commun* **8**.

Zhou Y, Song WM, Andhey PS, Swain A, Levy T, Miller KR, Poliani PL, Cominelli M, Grover S, Gilfillan S, et al. 2020. Human and mouse single-nucleus transcriptomics reveal TREM2-dependent and TREM2-independent cellular responses in Alzheimer's disease. *Nat Med* **26**: 131–142.

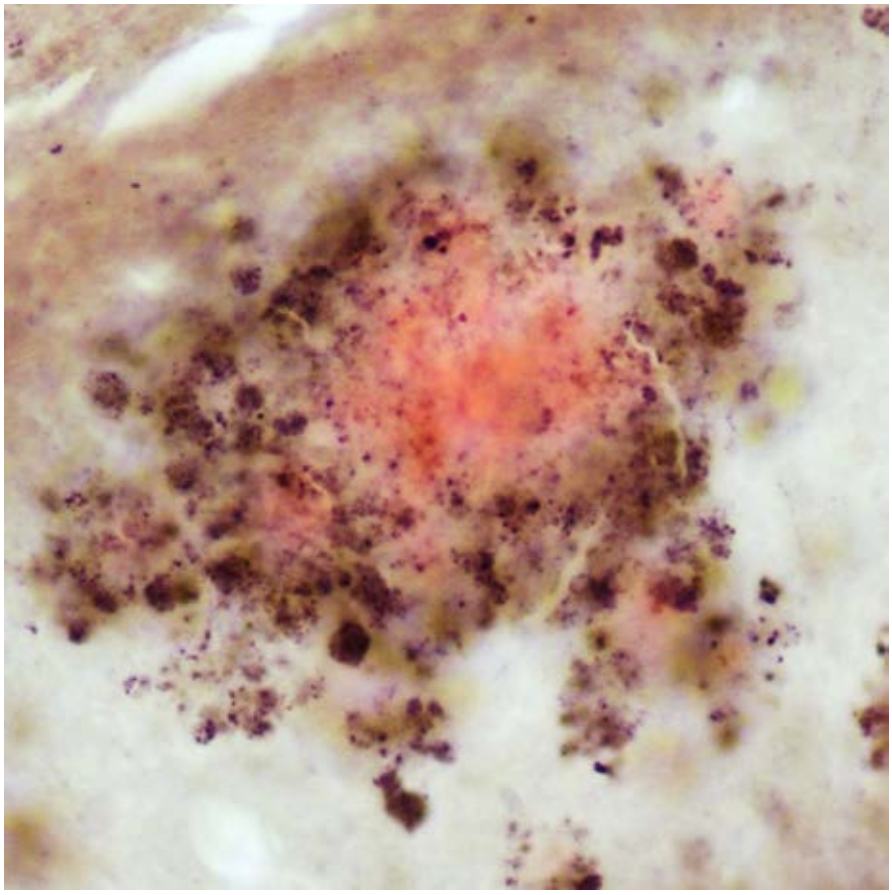
Zúñiga JM, Orellana-Mujica J, Tur-Mari J. 2011. *Ciencia y Tecnología del Animal de Laboratorio. Formación avanzada de postgrado.*

Zuroff L, Daley D, Black KL, Koronyo-Hamaoui M. 2017. Clearance of cerebral Aβ in Alzheimer's disease: reassessing the role of microglia and monocytes. *Cell Mol Life Sci* **74**: 2167–2201.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

7. ANEXOS



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ANEXO 1

Fernandez-Valenzuela JJ, Sanchez-Varo R, Muñoz-Castro C, De Castro V, Sanchez-Mejias E, Navarro V, Jimenez S, Nuñez-Diaz C, Gomez-Arboledas A, Moreno-Gonzalez I, Vizuete M, Davila JC, Vitorica J and Gutierrez A. (2020). Enhancing microtubule stabilization rescue cognitive deficits and ameliorates pathological phenotype in an amyloidogenic Alzheimer's disease model. *Scientific Reports. DOI: 10.1038/s41598-020-71767-4*

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

SCIENTIFIC REPORTS
nature research

Check for updates

OPEN

Enhancing microtubule stabilization rescues cognitive deficits and ameliorates pathological phenotype in an amyloidogenic Alzheimer's disease model

Juan Jose Fernandez-Valenzuela[1,2,5], Raquel Sanchez-Varo[1,2,5], Clara Muñoz-Castro[2,3,4], Vanessa De Castro[1], Elisabeth Sanchez-Mejias[1,2], Victoria Navarro[2,3,4], Sebastian Jimenez[2,3,4], Cristina Nuñez-Diaz[1,2], Angela Gomez-Arboledas[1,2], Ines Moreno-Gonzalez[1,2], Marisa Vizuete[2,3,4], Jose Carlos Davila[1,2], Javier Vitorica[2,3,4,6]✉ & Antonia Gutierrez[1,2,6]✉

In Alzheimer's disease (AD), and other tauopathies, microtubule destabilization compromises axonal and synaptic integrity contributing to neurodegeneration. These diseases are characterized by the intracellular accumulation of hyperphosphorylated tau leading to neurofibrillary pathology. AD brains also accumulate amyloid-beta (Aβ) deposits. However, the effect of microtubule stabilizing agents on Aβ pathology has not been assessed so far. Here we have evaluated the impact of the brain-penetrant microtubule-stabilizing agent Epothilone D (EpoD) in an amyloidogenic model of AD. Three-month-old APP/PS1 mice, before the pathology onset, were weekly injected with EpoD for 3 months. Treated mice showed significant decrease in the phospho-tau levels and, more interesting, in the intracellular and extracellular hippocampal Aβ accumulation, including the soluble oligomeric forms. Moreover, a significant cognitive improvement and amelioration of the synaptic and neuritic pathology was found. Remarkably, EpoD exerted a neuroprotective effect on SOM-interneurons, a highly AD-vulnerable GABAergic subpopulation. Therefore, our results suggested that EpoD improved microtubule dynamics and axonal transport in an AD-like context, reducing tau and Aβ levels and promoting neuronal and cognitive protection. These results underline the existence of a crosstalk between cytoskeleton pathology and the two major AD protein lesions. Therefore, microtubule stabilizers could be considered therapeutic agents to slow the progression of both tau and Aβ pathology.

In Alzheimer's disease (AD), and other neurodegenerative tauopathies, tau protein is abnormally hyperphosphorylated and aggregated into intraneuronal neurofibrillary tangles (NFTs)[1]. AD is also characterized by the presence of extracellular amyloid plaques, composed predominately of amyloid-β (Aβ) peptides, along with microglial response and neuroinflammation, axonal/synaptic damage and neuronal loss[2–7].

[1]Dpto. Biología Celular, Genética y Fisiología, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga-IBIMA, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos, 29071 Málaga, Spain. [2]Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain. [3]Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, C/Prof. Garcia Gonzalez 2, 41012 Sevilla, Spain. [4]Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Hospital Universitario Virgen del Rocio/CSIC, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain. [5]These authors contributed equally: Juan Jose Fernandez-Valenzuela and Raquel Sanchez-Varo. [6]These authors jointly supervised this work: Javier Vitorica and Antonia Gutierrez. ✉email: vitorica@us.es; agutierrez@uma.es

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

ANEXO 2

Sanchez-Mejias E, Nuñez-Diaz C, Sanchez-Varo R, Gomez-Arboledas A, Garcia-Leon JA, Fernandez-Valenzuela JJ, Mejias-Ortega M, Trujillo-Estrada L, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Davila JC, Vitorica J and Gutierrez A. (2019). Distinct disease-sensitive GABAergic neurons in the perirhinal cortex of Alzheimer's mice and patients. *Brain Pathology.* DOI: 10.1111/bpa.12785

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Brain Pathology ISSN 1015-6305

RESEARCH ARTICLE

Distinct disease-sensitive GABAergic neurons in the perirhinal cortex of Alzheimer's mice and patients

Elisabeth Sanchez-Mejias[1,2,*]; Cristina Nuñez-Diaz[1,2,*]; Raquel Sanchez-Varo[1,2]; Angela Gomez-Arboledas[1,2]; Juan Antonio Garcia-Leon[1,2]; Juan Jose Fernandez-Valenzuela[1,2]; Marina Mejias-Ortega[1,2]; Laura Trujillo-Estrada[1,2]; David Baglietto-Vargas[1,2]; Ines Moreno-Gonzalez[1,2]; Jose Carlos Davila[1,2]; Javier Vitorica[2,3,4,§]; Antonia Gutierrez[1,2,§]

[1] Dpto. Biología Celular, Genética y Fisiología, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga-IBIMA, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga, Spain.
[2] Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain.
[3] Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain.
[4] Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS)-Hospital Universitario Virgen del Rocio/CSIC/Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain.

Keywords
Alzheimer, GABA, human brain, interneuron, parvalbumin, somatostatin, transentorhinal cortex, transgenic mouse.

Abbreviations
Abeta, amyloid-beta; AD, Alzheimer's disease; ANOVA, analysis of variance; DAB, diaminobenzidine tetrahydrochloride; GABA, gamma-aminobutyric acid; hAPP, human amyloid precursor protein; nNOS, neuronal nitric oxide synthase; SOM, somatostatin; SD, standard deviation; PBS, phosphate-buffered saline; PV, parvalbumin; WT, wildtype.

Corresponding authors:
Antonia Gutierrez, PhD, Dpto. Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos, 29071 Málaga, Spain (email: *agutierrez@uma.es*)
Javier Vitorica, PhD, Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, C/ Prof. Garcia Gonzalez 2, 41012 Sevilla, Spain (email: *vitorica@us.es*)

Received 9 June 2019
Accepted 2 September 2019
Published Online Article
Accepted 00 Month 2019

[*]Both contributed equally as first authors

[§]Co-senior authors

doi:10.1111/bpa.12785

Abstract

Neuronal loss is the best neuropathological substrate that correlates with cortical atrophy and dementia in Alzheimer's disease (AD). Defective GABAergic neuronal functions may lead to cortical network hyperactivity and aberrant neuronal oscillations and in consequence, generate a detrimental alteration in memory processes. In this study, using immunohistochemical and stereological approaches, we report that the two major and non-overlapping groups of inhibitory interneurons (SOM-cells and PV-cells) displayed distinct vulnerability in the perirhinal cortex of APP/PS1 mice and AD patients. SOM-positive neurons were notably sensitive and exhibited a dramatic decrease in the perirhinal cortex of 6-month-old transgenic mice (57% and 61% in areas 36 and 35, respectively) and, most importantly, in AD patients (91% in Braak V–VI cases). In addition, this interneuron degenerative process seems to occur in parallel, and closely related, with the progression of the amyloid pathology. However, the population expressing PV was unaffected in APP/PS1 mice while in AD brains suffered a pronounced and significant loss (69%). As a key component of cortico-hippocampal networks, the perirhinal cortex plays an important role in memory processes, especially in familiarity-based memory recognition. Therefore, disrupted functional connectivity of this cortical region, as a result of the early SOM and PV neurodegeneration, might contribute to the altered brain rhythms and cognitive failures observed in the initial clinical phase of AD patients. Finally, these findings highlight the failure of amyloidogenic AD models to fully recapitulate the selective neuronal degeneration occurring in humans.

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is characterized by cognitive deficits that are correlated with aberrant neuronal network activity, which might relate to dysfunction of GABAergic neurons (2, 60). Inhibitory signal plays a fundamental role in the generation of cerebral rhythmic oscillations, so a defective inhibition, because of the loss or low activity of GABAergic interneurons, can lead to networks abnormalities. Impaired inhibition has been proposed as a potential mechanism of

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

© 2019 The Authors. Brain Pathology published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of International Society of Neuropathology
This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

ANEXO 3

Romero-Molina C, Navarro V, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Fernandez-Valenzuela JJ, Sanchez-Mico MV, Muñoz-Castro C, Gutierrez A, Vitorica V, Vizuete M. (2018). Distinct microglial responses in two transgenic murine models of tau pathology. *Frontiers in Cellular Neuroscience.* DOI: 10.3389/fncel.2018.00421

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

frontiers in Cellular Neuroscience

ORIGINAL RESEARCH
published: 14 November 2018
doi: 10.3389/fncel.2018.00421

Distinct Microglial Responses in Two Transgenic Murine Models of TAU Pathology

Carmen Romero-Molina[1,2,3], Victoria Navarro[1,2,3], Raquel Sanchez-Varo[3,4], Sebastian Jimenez[1,2,3], Juan J. Fernandez-Valenzuela[3,4], Maria V. Sanchez-Mico[1,2,3], Clara Muñoz-Castro[1,2,3], Antonia Gutierrez[3,4], Javier Vitorica[1,2,3]* and Marisa Vizuete[1,2,3]**

[1] Departamento Bioquimica y Biologia Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Seville, Spain, [2] Instituto de Biomedicina de Sevilla, Hospital Universitario Virgen del Rocio, CSIC, Universidad de Sevilla, Seville, Spain, [3] Centro de Investigacion Biomedica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas, Madrid, Spain, [4] Departamento Biologia Celular, Genetica y Fisiologia, Facultad de Ciencias, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Universidad de Málaga, Málaga, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:
Tomas Deierborg,
Lund University, Sweden

Reviewed by:
Astrid E. Cardona,
University of Texas at San Antonio, United States
Paul Anthony Adlard,
Florey Institute of Neuroscience and Mental Health, Australia

***Correspondence:**
Antonia Gutierrez
agutierrez@uma.es
Javier Vitorica
vitorica@us.es
Marisa Vizuete
mvizuete@us.es

Received: 23 July 2018
Accepted: 26 October 2018
Published: 14 November 2018

Citation:
Romero-Molina C, Navarro V, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Fernandez-Valenzuela JJ, Sanchez-Mico MV, Muñoz-Castro C, Gutierrez A, Vitorica J and Vizuete M (2018) Distinct Microglial Responses in Two Transgenic Murine Models of TAU Pathology. Front. Cell. Neurosci. 12:421. doi: 10.3389/fncel.2018.00421

Microglial cells are crucial players in the pathological process of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (AD). Microglial response in AD has been principally studied in relation to amyloid-beta pathology but, comparatively, little is known about inflammatory processes associated to tau pathology. In the hippocampus of AD patients, where tau pathology is more prominent than amyloid-beta pathology, a microglial degenerative process has been reported. In this work, we have directly compared the microglial response in two different transgenic tau mouse models: ThyTau22 and P301S. Surprisingly, these two models showed important differences in the microglial profile and tau pathology. Where ThyTau22 hippocampus manifested mild microglial activation, P301S mice exhibited a strong microglial response in parallel with high phospho-tau accumulation. This differential phospho-tau expression could account for the different microglial response in these two tau strains. However, soluble (S1) fractions from ThyTau22 hippocampus presented relatively high content of soluble phospho-tau (AT8-positive) and were highly toxic for microglial cells *in vitro*, whereas the correspondent S1 fractions from P301S mice displayed low soluble phospho-tau levels and were not toxic for microglial cells. Therefore, not only the expression levels but the aggregation of phospho-tau should differ between both models. In fact, most of tau forms in the P301S mice were aggregated and, in consequence, forming insoluble tau species. We conclude that different factors as tau mutations, accumulation, phosphorylation, and/or aggregation could account for the distinct microglial responses observed in these two tau models. For this reason, deciphering the molecular nature of toxic tau species for microglial cells might be a promising therapeutic approach in order to restore the deficient immunological protection observed in AD hippocampus.

Keywords: Alzheimer disease, microglia, tau models, inflammation, tauopathies

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

ANEXO 4

Gomez-Arboledas A, Davila JC, Sanchez-Mejias E, Navarro V, Nuñez-Diaz C, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mico MV, Trujillo-Estrada L, Fernandez-Valenzuela JJ, Vizuete M, Comella JX, Galea E, Vitorica J and Gutierrez A. (2018). Phagocytic clearance of presynaptic dystrophies by reactive astrocytes in Alzheimer's disease. *Glia.* DOI: 10.1002/glia.23270

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Received: 31 July 2017 | Revised: 8 November 2017 | Accepted: 10 November 2017

DOI: 10.1002/glia.23270

GLIA WILEY

RESEARCH ARTICLE

Phagocytic clearance of presynaptic dystrophies by reactive astrocytes in Alzheimer's disease

Angela Gomez-Arboledas[1,3] | Jose C. Davila[1,3] | Elisabeth Sanchez-Mejias[1,3] | Victoria Navarro[2,3,4] | Cristina Nuñez-Diaz[1,3] | Raquel Sanchez-Varo[1,3] | Maria Virtudes Sanchez-Mico[2,3,4] | Laura Trujillo-Estrada[1,3] | Juan Jose Fernandez-Valenzuela[1,3] | Marisa Vizuete[2,3,4] | Joan X. Comella[3,5,7] | Elena Galea[5,6] | Javier Vitorica[2,3,4*] | Antonia Gutierrez[1,3*]

[1]Dpto. Biologia Celular, Genetica y Fisiologia. Facultad de Ciencias, Instituto de Biomedicina de Malaga (IBIMA), Universidad de Malaga, Spain

[2]Dpto. Bioquimica y Biologia Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Spain

[3]Centro de Investigacion Biomedica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain

[4]Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS)-Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Spain

[5]Institut de Neurociències and Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Unitat de Bioquímica de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

[6]ICREA, Pg. Lluís Companys 23, Barcelona, 08010, Spain

[7]Institut de Recerca de lHopital Univesitary de la Vall d'Hebron (VHIR), Barcelona, Spain

Correspondence
Antonia Gutierrez, Dpto. Biologia Celular, Genetica y Fisiologia, Facultad de Ciencias, Universidad de Malaga, Campus de Teatinos s/n, Malaga 29071, Spain.
Email: agutierrez@uma.es
Javier Vitorica, Dpto. Bioquimica y Biologia Molecular, Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla, C/Prof. Garcia Gonzalez 2, Sevilla 41012, Spain.
Email: vitorica@us.es

Funding information
La Marató-TV3 Foundation, Grant Numbers 20141432 (AG), 20141431 (JV), 20141433 (JXC), 20141430 (EG); Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) Instituto de Salud Carlos III (ISCiii) of Spain co-financed by FEDER funds from European Union, Grant Numbers PI15/00796 (AG) and PI15/00957 (JV); CIBERNED, Grant Number PI2015-2/02 (AG, JV, JXC); Junta de Andalucía, Proyecto de Excelencia, Grant Number CTS-2035 (JV, AG)

Abstract

Reactive astrogliosis, a complex process characterized by cell hypertrophy and upregulation of components of intermediate filaments, is a common feature in brains of Alzheimer's patients. Reactive astrocytes are found in close association with neuritic plaques; however, the precise role of these glial cells in disease pathogenesis is unknown. In this study, using immunohistochemical techniques and light and electron microscopy, we report that plaque-associated reactive astrocytes enwrap, engulf and may digest presynaptic dystrophies in the hippocampus of amyloid precursor protein/presenilin-1 (APP/PS1) mice. Microglia, the brain phagocytic population, was apparently not engaged in this clearance. Phagocytic reactive astrocytes were present in 35% and 67% of amyloid plaques at 6 and 12 months of age, respectively. The proportion of engulfed dystrophic neurites was low, around 7% of total dystrophies around plaques at both ages. This fact, along with the accumulation of dystrophic neurites during disease course, suggests that the efficiency of the astrocyte phagocytic process might be limited or impaired. Reactive astrocytes surrounding and engulfing dystrophic neurites were also detected in the hippocampus of Alzheimer's patients by confocal and ultrastructural analysis. We posit that the phagocytic activity of reactive astrocytes might contribute to clear dysfunctional synapses or synaptic debris, thereby restoring impaired neural circuits and reducing the inflammatory impact of damaged neuronal parts and/or limiting the amyloid pathology. Therefore, potentiation of the phagocytic properties of reactive astrocytes may represent a potential therapy in Alzheimer's disease.

*Co-senior corresponding authors

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.
© 2017 The Authors GLIA Published by Wiley Periodicals, Inc.

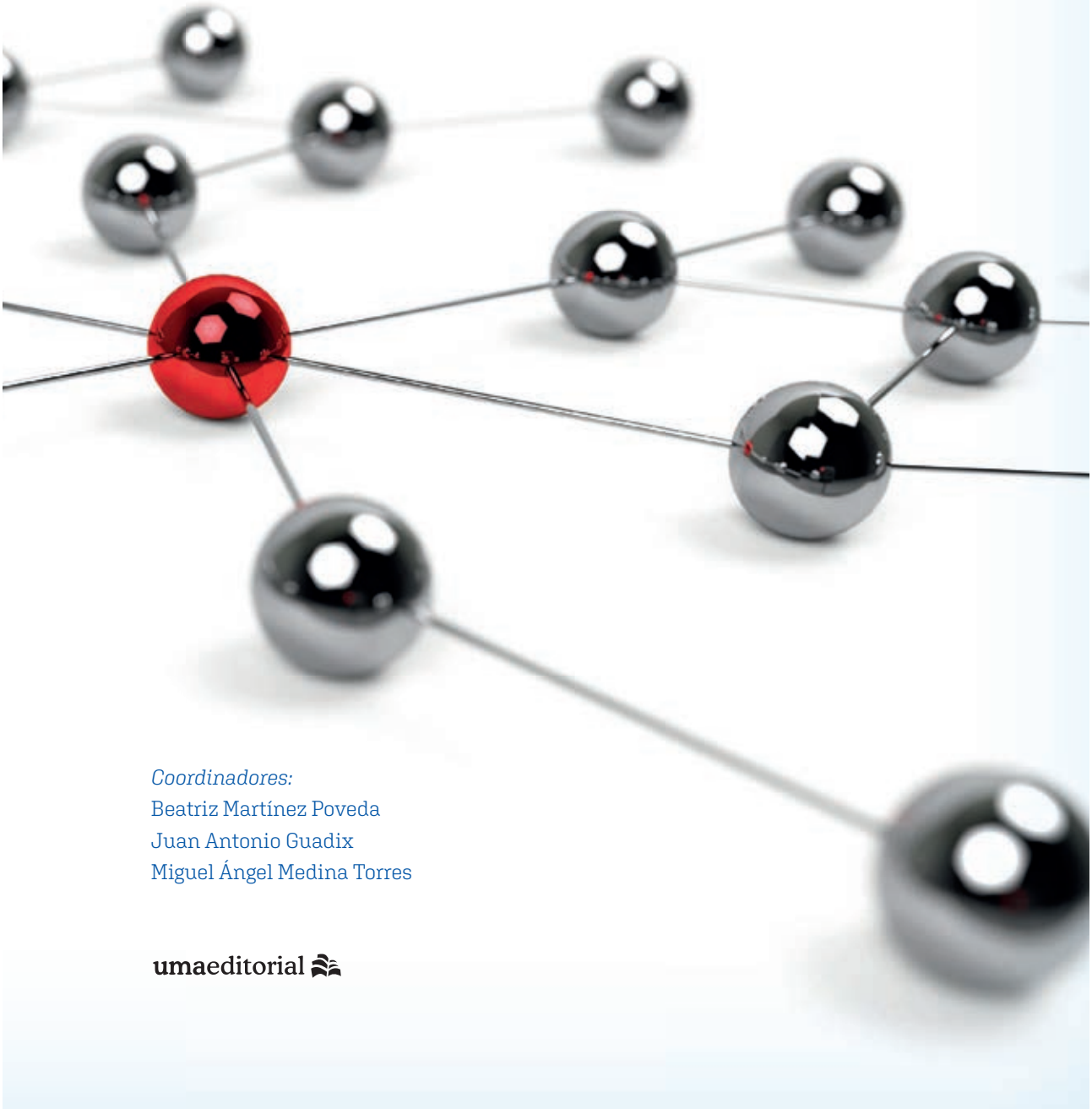
ANEXO 5

Fernandez-Valenzuela JJ, Sanchez-Varo R, Gutierrez A. (2018). Descifrando la contribución patogénica de Abeta y TAU en modelos transgénicos de la enfermedad de Alzheimer. *Libro de actas del Workshop Internacional: Metabolic Reprogramming as a Target for Cancer and Other Diseases"* ISBN: 978-84-17449-55-1. pp. 221-234 Depósito Legal MA-1550-2018. Editorial: UMA editorial. Universidad de Málaga

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Libro de actas del *Workshop* Internacional

Metabolic Reprogramming as a Target for Cancer and Other Diseases



Coordinadores:
Beatriz Martínez Poveda
Juan Antonio Guadix
Miguel Ángel Medina Torres

umaeditorial

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Descifrando la contribución patogénica de Abeta y TAU en modelos transgénicos de la enfermedad de alzheimer

Juan José Fernández-Valenzuela,* Raquel Sánchez-Varo* y Antonia Gutiérrez

Depto. Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga/IBIMA/CIBERNED, Málaga, España.

*Ambos autores han contribuido por igual en este trabajo.

Resumen

La enfermedad de Alzheimer (AD) empieza a ser considerada como la epidemia del siglo XXI, por ser la demencia más común entre las personas mayores de 65 años en un contexto de continuo envejecimiento de la población y de ausencia de tratamientos eficaces, lo que inevitablemente va asociado a un aumento de su prevalencia. A nivel histopatológico, la AD está definida como una proteinopatía, caracterizada por depósitos extracelulares (placas seniles) formados por la acumulación de péptidos beta-amiloide (Abeta), y por la formación de ovillos intraneuronales neurofibrilares a partir de la proteína tau hiperfosforilada. La coexistencia de ambos agregados proteicos en el cerebro de los pacientes conduce a disfunción sináptica, muerte neuronal, y finalmente al declive cognitivo. Diversos estudios han identificado fallos en el transporte axonal y en las vías de homeostasis proteica, junto con defectos en la respuesta neuroinflamatorioa mediada por la glía, como mecanismos patogénicos que participan en la acumulación de Abeta pero que también están presentes en otras demencias como las taupatías primarias. Así, el principal objetivo de este trabajo consiste en clarificar los efectos deletéreos de Abeta y fosfo-tau por separado, con la idea de obtener una mejor comprensión de la contribución diferencial de estos dos agentes tóxicos al proceso neurodegenerativo. Para ello, compararemos la progresión de los procesos antes mencionados en varios modelos murinos de la enfermedad basados en la expresión de genes APP o tau humano mutados utilizando diversas técnicas inmunohistoquímicas y moleculares. De este modo, podrían identificarse nuevas dianas terapéuticas relacionadas con las vías patogénicas de estas dos moléculas, lo que permitiría desarrollar nuevas estrategias neuroprotectoras contra esta devastadora enfermedad.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

DE MÁLAGA