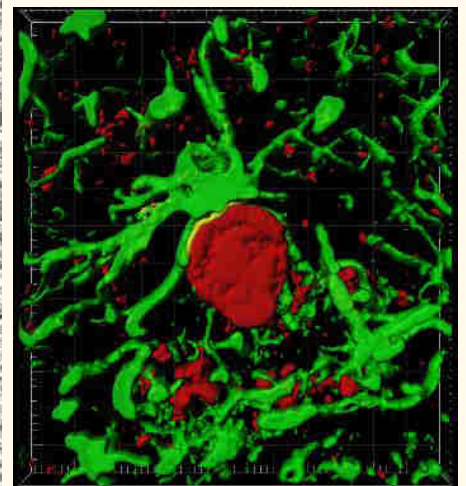
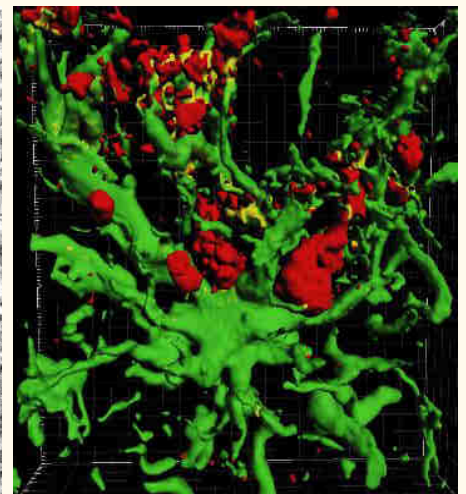
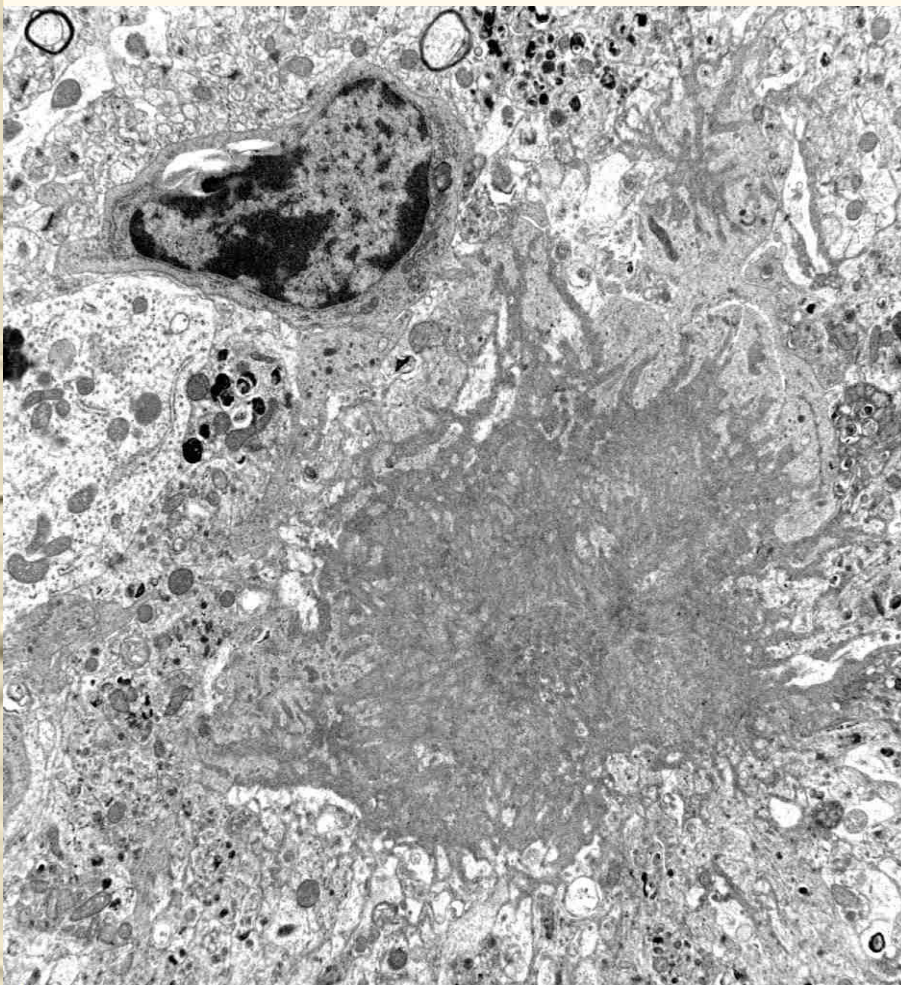
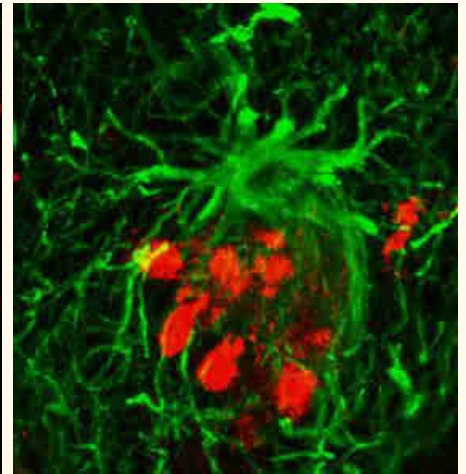
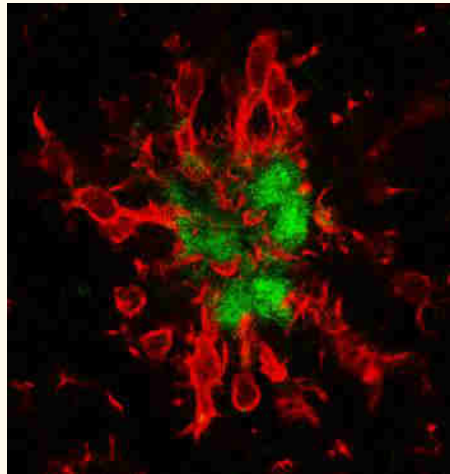
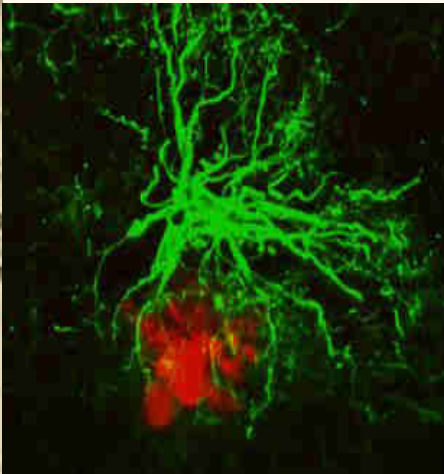


# TESIS DOCTORAL

Ángela Gómez Arboledas



## Patología glial en el hipocampo de modelos transgénicos de la enfermedad de Alzheimer: un enfoque ultraestructural




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





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

AUTOR: Ángela Gómez Arboledas

 <http://orcid.org/0000-0001-9636-9512>

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](http://riuma.uma.es)





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

## TESIS DOCTORAL

---

# PATOLOGÍA GLIAL EN EL HIPOCAMPO DE MODELOS TRANSGÉNICOS DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: UN ENFOQUE ULTRAESTRUCTURAL

---

Memoria presentada por la Licenciada  
Dña. Ángela Gómez Arboledas para  
Optar al Grado de Doctor por la  
Universidad de Málaga

Directores: Dra. Antonia Gutiérrez Pérez y Dr. José Carlos Dávila Cansino

Málaga, 2017









UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

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

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

**Dr. D. José Carlos Dávila Cansino**, Catedrático del Departamento de Biología Celular,  
Genética y Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga,

### INFORMAN

Que Dña. Ángela Gómez Arboledas ha realizado bajo su dirección el trabajo experimental que ha llevado a la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral, titulada "Patología glial en el hipocampo de modelos de la enfermedad de Alzheimer: un enfoque ultraestructural". Considerando que constituye trabajo de Tesis Doctoral, autorizamos su presentación para optar al Grado de Doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente documento en Málaga, a 17 de Noviembre de 2017

Fdo.: Antonia Gutiérrez

Fdo.: José Carlos Dávila







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

*Deciphering the link between astrocyte reactivity and neuronal damage in Alzheimer's disease.* Entidad Financiera: Fundació La Marató TV3, Ref. 127/C/2014. IP: Dra. Antonia Gutiérrez Pérez. Duración 2015-2018.

*Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED).* Programa 1: Enfermedad de Alzheimer y otras demencias degenerativas. Entidad financiera: Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Ciencia e Innovación, Ref. grupo CB06/05/1116. IP: Dra. Antonia Gutiérrez Pérez. Duración: 2007-2017 (renovable).

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

*Potencial patológico de los astrocitos: una nueva perspectiva en la enfermedad de Alzheimer.* Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED). Proyecto Intramural Colaborativo. Entidad financiera: Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Ciencia e Innovación, Ref. PI2015-2/02-3. IP Subproyecto 02: Dra. Antonia Gutiérrez Pérez. Duración 2016-2017.

*Evaluando la disfunción microglial y astrogial 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.

Dña. Ángela Gómez Arboledas, durante este tiempo ha disfrutado de un contrato de Investigación con cargo a Proyecto de Investigación (Ref. 127/C/2014) financiado por Fundació LaMarató.





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

1. **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, Vizuite M, Comella JX, Galea E, Vitorica J and Gutierrez A.** (2017). Phagocytic clearance of presynaptic dystrophies by reactive astrocytes in Alzheimer's disease. *Glia. In Press*. DOI: 10.1002/glia.23270.
2. **Baglietto-Vargas D, Sanchez-Mejias E, Navarro V, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Gomez-Arboledas A, Sanchez-Mico MV, Sanchez-Varo R, Vizuite M, Davila JC, Garcia-Verdugo JM, Vitorica J and Gutierrez A.** (2017). Dual roles of A $\beta$  in proliferative processes in an amyloidogenic model of Alzheimer's disease. *Scientific Reports.*, 7(1): 10085. DOI: 10.1038/s41598-017-10353-7
3. **Trujillo-Estrada L, Davila JC, Sanchez-Mejias E, Sanchez-Varo R, Gomez-Arboledas A, Vizuite M, Vitorica J and Gutierrez A.** (2014). Early neuronal loss and axonal/presynaptic damage is associated with accelerated amyloid- $\beta$  accumulation in A $\beta$ PP/PS1 Alzheimer's disease mice subiculum. *Journal of Alzheimers Disease.*, 42(2): 521-541. DOI: 10.3233/JAD-140495



*Tal y como dice el refranero español, “es de bien nacido ser agradecido”. Por ello y porque este trabajo es de muchas personas que han colaborado directa o indirectamente en él, tengo mucho que agradecer...*

*En primer lugar, tengo que agradecerle a Antonia, “la jefa”, que hace ya cinco años me diera la oportunidad de formar parte de esta preciosa familia. Porque no es nada fácil conseguir hacer de un grupo de investigación, una familia de la que todos nos sentimos afortunados y orgullosos de pertenecer, y eso sería totalmente imposible sin ti. Por tu constante dedicación a este trabajo y a nosotros, por tu esfuerzo, tu motivación, tus consejos y, sobre todo, la ilusión que transmites día a día. Para los que no te conocen, espero que con estas palabras puedan hacerse una idea del apoyo que has sido estos años, pero para todos aquellos que te conocen, sabrán que ni siquiera con 100 páginas más podría agradecerte todo lo que has hecho por mi durante este tiempo. Por todo esto y mucho más que me dejo, Gracias.*

*En segundo lugar, pero no por ello menos importante, a José Carlos, mi segundo jefe. Porque has sido el maestro que todo el mundo quisiera tener, y durante estos años te has dedicado en cuerpo y alma a enseñarme todo lo que sabes de microscopía electrónica. Son incontables las horas que hemos pasado juntos en el microscopio electrónico, la mayoría de las veces riéndonos y el resto discutiendo (siempre de broma) por ver quien tenía la razón, pero sea como fuera, las largas mañanas de observación se hacían mucho más cortas con tus explicaciones y tu sentido del humor. Sabes de sobra que esta Tesis habría sido totalmente imposible sin ti, sin tu cabezonería y nuestras eternas conversaciones acerca de lo que hacen la microglía y los astrocitos. Espero poder seguir aprendiendo de ti durante mucho tiempo, y conseguir, algún día, superar al maestro ;)*

*Muchas gracias también a nuestro jefe en la distancia, a Javier, por su inestimable ayuda día a día y su esfuerzo con el artículo de los astrocitos. Gracias también a todo el equipo de la Universidad de Sevilla, por ayudarnos siempre con sus conocimientos bioquímicos.*

*Y ahora sí, el momento más esperado en la sala de becarios... ¡Recordad que el orden de los factores no altera el producto! Gracias de todo corazón a: Eli, por tener una sonrisa en todo momento y darme abrazos cada día que lo he necesitado, además de por toda tu ayuda, consejos y sabiduría estos 5 años; a Mercedes, porque desde que tenemos las mesas juntas venir a trabajar es mucho más divertido y siempre has estado dispuesta a ayudarme en todo sin dudarle; porque como buenas rubias platino que somos, nosotras nos entendemos como nadie y porque los viernes no serían iguales sin nuestra “operación croqueta”. A Raquelita, por ser la jefa de la sala de becarios y porque al final has conseguido que hasta me gusten tus chistes malos; a Cristina, por sus aportaciones de calidad que nos hacen reír sin parar día tras día, además de por su gran ayuda en el laboratorio durante los meses de estrés de la tesis; a Juanjo, por alegrarnos siempre con dulces, por sus lecciones de historia y por no dejar nunca de sonreír; a Juan, porque aunque me meta mucho contigo, tus conocimientos bioquímicos han sido de gran ayuda en todo momento; y a Marina, que a pesar de ser la incorporación más reciente, en estos pocos meses has conseguido ganarte el cariño de todos con tu buena disposición y sobre todo, con tus historias de pijamas.*

*Gracias a Laura, aunque estés fuera yo te sigo considerando parte de la sala de becarios y de nuestro grupo. Gracias por toda tu ayuda durante los años que estuviste aquí y los innumerables momentos vividos dentro y fuera de la facultad. Muchísimas gracias, además, tanto a ti como a Juanje, por acogerme durante los 3 meses de mi andadura americana. Porque me acogisteis en vuestra casa y me tratasteis como a una hermana, haciéndome sentir como en casa a tantos kilómetros de distancia. Hicisteis que la experiencia fuera inolvidable y que jamás olvide nuestros “road trips” a LA, Las Vegas, San Diego, etc.*

*Siguiendo con la aventura americana, muchas gracias David por todas tus enseñanzas y tu ayuda, tanto los meses que estuve allí como los meses posteriores durante la elaboración de esta Tesis. Sin Rosa, el pequeño Martín y sin ti, la experiencia no habría sido ni tan siquiera parecida a como la recuerdo.*

*Me gustaría también agradecerle al Dr. LaFerla, por la acogida en su laboratorio de la Universidad de California durante los tres meses de estancia predoctoral. En especial, gracias a mis dos “picapiedras”, Alessandra y Stefania, por todos los momentos que pasamos juntas, por llevarme de excursión al lugar de ensueño de toda compradora compulsiva (el outlet), pero también a diferentes museos, y, sobre todo, por enseñarme la gastronomía brasileña y que la amistad no tiene fronteras.*

*A todos los compañeros del departamento de Biología Celular, en especial a Ana y Ángel porque siempre han estado ahí para ofrecerme su ayuda en todo momento y por su alegría y los momentos de risas.*

*A mis amigos, tanto a los que antes formaban parte de la sala de becarios y se les echa muchísimo de menos, como a aquellos que, ajenos a esta locura de las tesis, han estado ahí en todo momento para apoyarme y vivir grandes momentos juntos. Mis niñas, Azucena, Marta y Silvia, gracias por vuestra amistad.*

*A mi familia, especialmente a mis padres, mi segundo padre “Ri”, mi hermana, mi tío “Coma” y aquellos que me vieron empezar este largo proceso, pero no han podido llegar a verlo finalizado. Sin vuestro apoyo y vuestros ánimos constantes desde que decidí comenzar este proyecto, no habría sido posible llegar hasta aquí. Por ello, no hay palabras suficientes para poder agradeceros todo lo que habéis hecho y seguís haciendo cada día por mí.*

*Finalmente, gracias a la persona que está ahí cada minuto del día desde hace 13 años, Simón. Porque nunca jamás has dudado de que sería capaz de conseguir todo lo que me proponga y no has dejado de animarme a conseguirlo. Por estos últimos meses en los que, incluso cuando el estrés me superaba y dejaba de ser yo, conseguías sacarme una sonrisa y hacerme reír a carcajadas. Porque desde que te conocí eres mi persona.*

*A mi familia*

*A Simón*









*En algún lugar,  
algo increíble está esperando a ser descubierto*

Carl Sagan

---



<b>A<math>\beta</math>, Abeta:</b> $\beta$ -amiloide	<b>CR1:</b> Receptor del complemento 1
<b>AAC:</b> Angiopatía Amiloide Cerebral	<b>CSF:</b> Fluido cefalorraquídeo, del inglés, CerebroSpinal Fluid
<b>AAV:</b> Virus adeno-asociados, del inglés, Adeno-Associated Virus	<b>CTF:</b> Fragmento C-terminal
<b>AD:</b> Enfermedad de Alzheimer, del inglés Alzheimer's disease	<b>DAB:</b> 3-3'diaminobencidina tetrahidroclorhídrico
<b>ADDLs:</b> Ligandos difusibles derivados del $\beta$ -amiloide, del inglés, Amyloid beta Derived Diffusible Ligands	<b>DABCO:</b> 1,4-diazabicyclo [2.2.2]-octano
<b>ADEVA:</b> Análisis de la varianza	<b>DAPI:</b> 4'-6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorhídrico
<b>AEP:</b> Asparagina endopeptidasa, del inglés, Asparagine EndoPeptidase	<b>DCO:</b> Dominio de unión a colágeno
<b>AICD:</b> Dominio intracelular del APP, del inglés, APP intracelular Domain	<b>DCu:</b> Dominio de unión a cobre
<b>ALDH1L1:</b> Aldehído deshidrogenasa, del inglés, ALdehyde DeHydrogenase 1 family member L1	<b>DDSA:</b> del inglés, DoDenyl Succinic Anhydride
<b>ANOVA:</b> del inglés Analysis of Variance	<b>DH:</b> Dominio de unión a heparina
<b>APLP:</b> del inglés Amyloid Precursor-Like Protein	<b>DMP-30:</b> 2,4,6-Tris(dimetilaminometil)fenol 95%
<b>ApoE:</b> Apolipoproteína E	<b>DO:</b> Densidad óptica
<b>APP:</b> Proteína precursora amiloide	<b>DPX:</b> Dibutil ftalato
<b>AQP4:</b> Aquaporina 4	<b>DZn:</b> Dominio de unión a zinc
<b>BACE:</b> Enzima de corte del APP en el sitio $\beta$	<b>EA:</b> Enfermedad de Alzheimer
<b>BLBP:</b> del inglés, Brain Lipid-Binding Protein	<b>EAAT:</b> del inglés Excitatory Amino Acid Transporter
<b>BSA:</b> Albúmina de suero bovino	<b>ECE:</b> Enzima convertidora de endotelina
<b>CA:</b> Cuerno de Ammón	<b>ELISA:</b> del inglés, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
<b>CAA:</b> Angiopatía amiloide cerebral, del inglés, Cerebral Amyloid Angiopathy	<b>EM:</b> Microscopía electrónica, del inglés, Electron Microscopy
<b>CFC:</b> Test de condicionamiento al miedo, del inglés, Contextual Fear Conditioning	<b>FAD:</b> Enfermedad de Alzheimer Familiar, del inglés Familial Alzheimer's Disease
<b>CLU:</b> Clusterina	<b>FIB/SEM:</b> del inglés, Focus Ion Beam Scanning Electron Microscope
<b>CNS:</b> Sistema nervioso central, del inglés, Central Nervous System	<b>FPC:</b> Factor promotor de crecimiento
	<b>g:</b> Capa granular del giro dentado
	<b>GABA:</b> Ácido gamma amino butírico
	<b>GAG:</b> Sitio de unión a glucosaminoglucanos

<b>GD:</b> Giro dentado	<b>LTP:</b> Potenciación a largo plazo, del inglés, Long Term Potenciation
<b>GFAP:</b> Proteína glial fibrilar ácida, del inglés, Glial Fibrillar Acidic Protein	<b>m:</b> Capa molecular del giro dentado
<b>GFP:</b> Proteína verde fluorescente, del inglés, Green fluorescent Protein	<b>M1:</b> Microglía clásica
<b>GS:</b> Glutamina sintetasa	<b>M2:</b> Microglía alternativa
<b>GSK3-β:</b> Quinasa glucógeno sintasa 3	<b>MAP:</b> Proteína asociada a los microtúbulos
<b>GWAS:</b> del inglés, Genome Wide Association Studies	<b>Megf10:</b> del inglés, Multiple Epidermal Growth Factor-like domains protein 10
<b>h:</b> Hilio del giro dentado	<b>MET:</b> Microscopía electrónica de transmisión
<b>HE:</b> Heterocigoto	<b>MHC:</b> Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>HMG-CoA:</b> Hidroxi-Metil Glutaril CoEnzima A	<b>MMC:</b> Metaloproteinasas de la matriz extracelular
<b>HO:</b> Homocigoto	<b>MT:</b> Microtúbulos
<b>HSP:</b> Proteína del choque térmico, del inglés, Heat Shock Protein	<b>MWM:</b> Laberinto acuático de Morris, del inglés, Morris-Water Maze
<b>Iba1:</b> del inglés Ionized calcium Binding Adapter molecule 1	<b>NADPH:</b> Nicotiamida-adenina dinucleótido fosfato
<b>ID:</b> Índice de discriminación	<b>NEP:</b> Neprilisina
<b>IDE:</b> Enzima degradadora de insulina, del inglés, Insulin-Degrading Enzyme	<b>NeuN:</b> Núcleos neuronales
<b>IFN-γ:</b> Interferón gamma	<b>NFTs:</b> Ovillos neurofibrilares, del inglés, Neurofibrillary tangles
<b>Ig:</b> Inmunoglobulina	<b>NO:</b> Óxido nítrico
<b>IGF-1:</b> Factor de crecimiento insulínico, del inglés, Insuline Growth Factor	<b>NOR:</b> Test de reconocimiento de objetos, del inglés, Novel Object Recognition
<b>IL:</b> Interleuquina	<b>NSAID:</b> Droga antiinflamatoria no esteroidea, del inglés, NonSteroidal AntInflammatory Drug
<b>IL-1R1:</b> Receptor de interleuquina 1	<b>Ntg:</b> No transgénico
<b>iNOS:</b> Sintasa del óxido nítrico inducible	<b>PB:</b> Tampón fosfato
<b>KI:</b> Knock-in	<b>PBS:</b> Tampón fosfato salino
<b>KO:</b> Knock-out	<b>PCR:</b> Reacción en cadena de la polimerasa
<b>KPI:</b> Dominio inhibidor de la serín proteasa Kunitz	
<b>LPS:</b> Lipopolisacáridos	
<b>LRP1:</b> del inglés, Low density lipoprotein Receptor-related Protein	

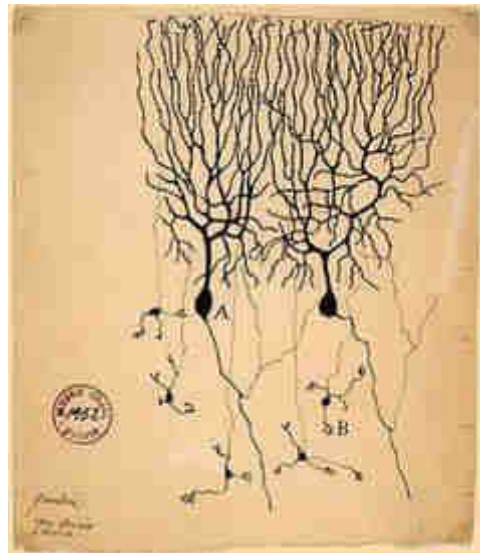
<b>PDGF:</b> Factor de crecimiento derivado de plaquetas	<b>Tg:</b> Transgénico
<b>PHF:</b> Filamentos apareados helicoidales	<b>TGF-β:</b> Factor de crecimiento transformante beta
<b>PFs:</b> Protofibrillas	<b>Th:</b> Linfocito T helper
<b>PICALM:</b> del inglés, Phosphatidylinositol-binding Clathrin Assembly protein	<b>TioS:</b> Tioflavina S
<b>PLP:</b> Paraformaldehído, L-lisina, Metaperiodato sódico	<b>TLRs:</b> del inglés, Toll Like Receptor
<b>PrP:</b> Proteína priónica	<b>TNFα:</b> Factor de necrosis tumoral alfa
<b>PS1:</b> Presenilina 1	<b>Tollip:</b> del inglés, Toll Interacting Protein
<b>PS2:</b> Presenilina 2	<b>TREM2:</b> del inglés, Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2
<b>RAGE:</b> del inglés, Receptor for Advanced Glycation Endproducts	<b>vGlutT:</b> Transportador vesicular de glutamato
<b>RE:</b> Retículo endoplasmático	<b>WT:</b> Genotipo salvaje, del inglés, Wild Type
<b>ROS:</b> Especies reactivas de oxígeno	
<b>S:</b> Subículum	
<b>S1:</b> fracción de proteínas soluble aislada bioquímicamente	
<b>sAPPα:</b> Fracción APP alfa soluble	
<b>sAPPβ:</b> Fracción APP beta soluble	
<b>SD:</b> Desviación estándar, del inglés, Standard Deviation	
<b>sl:</b> Stratum lucidum	
<b>slm:</b> Stratum lacunosum-moleculare	
<b>sm:</b> Stratum moleculare	
<b>SNC:</b> Sistema nervioso central	
<b>so:</b> Stratum oriens	
<b>SOD:</b> Superóxido dismutasa	
<b>sp:</b> Stratum pyramidale	
<b>sr:</b> Stratum radiatum	
<b>Swe, S:</b> mutación Swedish de la APP	
<b>TBS:</b> Tampón tris salino, del inglés, Tris-Buffered Saline	
<b>TBST:</b> Tampón tris salino con Tritón X-100	
<b>TCR:</b> Receptores de células T	





# ÍNDICES

---



Santiago Ramón y Cajal



<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Enfermedad de Alzheimer</b>	<b>3</b>
1.1.1. Tipos de Alzheimer y factores de riesgo	4
1.1.2. Neuropatología	6
<b>1.2. A<math>\beta</math> y patología amiloide</b>	<b>8</b>
1.2.1. APP	8
1.2.2. Presenilinas: PS1 y PS2	9
1.2.3. Procesamiento del APP	10
1.2.4. Péptido $\beta$ -amiloide y su eliminación	12
1.2.5. Agregación del péptido $\beta$ -amiloide: tipos de depósitos extracelulares	13
1.2.5.1. Tipos de depósitos extracelulares de A $\beta$	14
1.2.5.2. Formas oligoméricas de A $\beta$	15
1.2.6. Hipótesis clásica de la cascada amiloide	15
<b>1.3. Tau y patología neurofibrilar</b>	<b>17</b>
<b>1.4. Patología neurítica, pérdida neuronal y sináptica</b>	<b>18</b>
1.4.1. Patología neurítica	18
1.4.2. Pérdida neuronal y sináptica	19
<b>1.5. Activación glial y respuesta neuroinflamatoria</b>	<b>20</b>
1.5.1. Microglía	21
1.5.2. Astrogliá	26
<b>1.6. Modelos murinos transgénicos de la enfermedad de Alzheimer</b>	<b>28</b>
1.6.1. Modelos transgénicos monogénicos	29
1.6.2. Modelos transgénicos bigénicos	30
1.6.3. Modelos transgénicos trigénicos	30
<b>1.7. Hipocampo</b>	<b>34</b>
<b>1.8. Planteamiento del trabajo y objetivos</b>	<b>38</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>41</b>
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>53</b>
<b>2.1. Sujetos de estudio</b>	<b>55</b>
2.1.1. Animales de experimentación	55
2.1.2. Muestras humanas <i>post mortem</i>	58

<b>2.2. Estudios in vivo</b>	59
2.2.1. Inyecciones estereotáxicas intrahipocampales	59
2.2.2. Evaluación cognitiva de ratones transgénicos 3xTgAD	61
2.2.2.1. Laberinto acuático de Morris	61
2.2.2.2. Test del miedo condicionado	62
<b>2.3. Procesamiento del tejido</b>	63
2.3.1. Fijación y conservación del tejido de ratón	63
2.3.2. Obtención de cortes de hipocampo de cerebro de ratón	63
2.3.3. Fijación de las muestras humanas y obtención de los cortes	64
<b>2.4. Tinciones histológicas</b>	67
2.4.1. Violeta de cresilo	67
2.4.2. Azul de Toluidina	68
2.4.3. Rojo Congo	68
2.4.4. Tioflavina S	69
2.4.5. DAPI	69
<b>2.5. Inmuntinciones para Microscopía Óptica</b>	70
2.5.1. Marcaje inmunohistoquímico simple para microscopía óptica convencional	71
2.5.2. Marcaje inmunohistoquímico doble para microscopía óptica convencional (DAB-Níquel/DAB)	75
2.5.3. Marcaje inmunofluorescente múltiple para microscopía confocal	76
2.5.4. Inmunofluorescencia doble para células en cultivo	78
2.5.5. Controles de la inmunohistoquímica/inmunofluorescencia	78
<b>2.6. Obtención de imágenes de Microscopía Óptica</b>	79
2.6.1. Imágenes de microscopía óptica de campo claro	79
2.6.2. Imágenes de microscopía de fluorescencia	79
2.6.3. Procesamiento de imágenes	79
<b>2.7. Microscopía Electrónica de Transmisión</b>	80
2.7.1. Fijación y conservación del tejido	80
2.7.2. Obtención de las secciones	80
2.7.3. Postfijación, deshidratación e inclusión en resina de las secciones	80
2.7.4. Montaje y tallado de las secciones incluidas en resina	81
2.7.5. Ultramicrotomía	82
2.7.6. Procesamiento de células en cultivo para MET	82

2.7.7.	Protocolo general de la técnica de inmuno-oro para MET	83
2.7.8.	Observación y obtención de las imágenes	85
2.7.9.	Estudio ultraestructural 3D. Microscopía FIB-SEM	86
<b>2.8.</b>	<b>Estudios cuantitativos por análisis de imagen</b>	<b>86</b>
2.8.1.	Carga amiloide y carga astrogial	86
2.8.2.	Estudio de la morfología de células gliales	88
2.8.3.	Cuantificación de la inmunotinción para IL-1R1 por densitometría	89
2.8.4.	Cuantificación de neuritas distróficas y prolongaciones astrogiales	90
2.8.5.	Cuantificación del tamaño de las neuritas distróficas	91
2.8.6.	Cuantificación del tamaño de las células astrogiales	91
2.8.7.	Cuantificación del número y grosor de las prolongaciones astrogiales	92
<b>2.9.</b>	<b>Estudios bioquímicos</b>	<b>93</b>
2.9.1.	Disección de hipocampo	93
2.9.2.	Aislamiento de proteínas a partir del hipocampo	93
2.9.3.	Ensayo de proteínas. Método de Bradford	93
2.9.4.	ELISA (Del inglés <i>Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay</i> )	94
<b>2.10.</b>	<b>Análisis estadístico de datos</b>	<b>95</b>
<b>2.11.</b>	<b>Material y Métodos Suplementarios</b>	<b>96</b>
2.11.1.	Cultivos astrogiales primarios	96
2.11.2.	Obtención de neurosinaptosomas	96
2.11.3.	Ensayos de estimulación de cultivos astrogiales primarios	97
2.11.4.	Aislamiento de ARN y proteínas a partir de muestras de cerebro	97
2.11.5.	Comprobación de la integridad del ARN purificado	98
2.11.6.	Retrotranscripción	98
2.11.7.	RT-PCR en tiempo real	98
2.11.8.	Western-Blot (WB)	99
<b>2.12.</b>	<b>Apéndice</b>	<b>100</b>
2.12.1.	Tampones para inmunohistoquímica	100
2.12.2.	Solución fijadora	101
2.12.3.	Solución crioprotectora	101
2.12.4.	Portaobjetos gelatinizados	101
2.12.5.	Solución de revelado	102
2.12.6.	Protocolo de deshidratación y montaje	102
2.12.7.	Medio de montaje para inmunofluorescencia	103

2.12.8. Preparación de microscopía electrónica de transmisión (MET)	103
2.12.9. Tinciones	105
2.12.10. Listado de reactivos	106

<b>Bibliografía</b>	108
---------------------	-----

### **3. RESULTADOS** **111**

<b>3.1. <u>Reactividad astrogliar en el hipocampo de modelos animales y pacientes de</u></b>	115
--	-----

#### **Alzheimer**

<b>Introducción</b>	115
---------------------	-----

<b>Resultados</b>	116
-------------------	-----

3.1.1. Estructura y organización del hipocampo de los animales APP/PS1	116
--	-----

3.1.2. La patología amiloide va acompañada de una notable respuesta astrogliar	117
--	-----

3.1.3. Identificación ultraestructural de células astrogliar en el hipocampo del modelo APP/PS1	130
---	-----

3.1.4. Los astrocitos reactivos se asocian con los depósitos extracelulares de A $\beta$	138
--	-----

3.1.5. Los astrocitos reactivos envuelven e internalizan neuritas distróficas	149
---	-----

3.1.6. La astrogliar reactiva fagocita y degrada neuritas distróficas en el modelo transgénico APP/PS1	160
--	-----

3.1.7. El proceso de fagocitosis astrogliar de neuritas distróficas también ocurre en el hipocampo de pacientes de Alzheimer	167
--	-----

3.1.8. Los astrocitos en cultivo fagocitan neurosinaptomas procedentes de animales WT y APP/PS1	176
---	-----

<b>Discusión</b>	186
------------------	-----

<b>Bibliografía</b>	198
---------------------	-----

<b>3.2. <u>Estudio de la microglía activada en el hipocampo del modelo APP/PS1</u></b>	205
--	-----

<b>Introducción</b>	205
---------------------	-----

<b>Resultados</b>	207
-------------------	-----

3.2.1. La microglía activada se localiza rodeando el centro fibrilar denso de las placas amiloides	207
--	-----

3.2.2. El estudio ultraestructural de la microglía activada que rodea las placas	211
--	-----



amiloides revela subpoblaciones funcionales distintas	
3.2.3. La microglía activada parece participar en la formación/compactación de las placas amiloides	214
<b>Discusión</b>	228
<b>Bibliografía</b>	235
<b>3.3. Efecto de la modulación de Tom1/Tollip sobre la progresión de la patología en un modelo triple transgénico de Alzheimer</b>	239
<b>Introducción</b>	239
<b>Resultados</b>	241
3.3.1. Efecto de la modulación de Tom1/Tollip sobre la capacidad cognitiva	241
3.3.2. Análisis cualitativo de la expresión de Tom1 y Tollip en los diferentes grupos de tratamiento	248
3.3.3. Aumento de la expresión de IL-1R1 en animales 3xTgAD-Tollip-sh y 3xTgAD-Tom-sh	249
3.3.4. Localización celular y subcelular del receptor de interleuquina 1 (IL-1R1)	255
3.3.5. El silenciamiento génico de Tom1 y de Tollip produce un aumento de la patología amiloide en animales 3xTgAD	258
3.3.6. Efectos de la modulación de Tom1/Tollip sobre la reactividad glial en el modelo 3xTgAD	263
<b>Discusión</b>	277
<b>Bibliografía</b>	287
<b>4. REFLEXIÓN FINAL Y CONCLUSIONES</b>	293
<b>Reflexión final</b>	295
<b>Conclusiones</b>	299
<b>Conclusions</b>	300
<b>Bibliografía</b>	301
<b>5. SUMMARY</b>	303
<b>5.1. Abstract</b>	307

<b>5.2. Literature outline</b>	308
5.2.1. Alzheimer's disease	308
5.2.2. The amyloid cascade hypothesis	309
5.2.3. Inflammation in Alzheimer's disease	310
5.2.4. Animal models of Alzheimer's disease	312
5.2.5. Aims of the study	313
<b>5.3. Materials and methods</b>	314
5.3.1. Transgenic mice	314
5.3.2. Human samples	315
5.3.3. Region of study: Hippocampus	315
5.3.4. Tissue preparation	316
5.3.5. Histological staining with Thioflavin S	316
5.3.6. Light microscopy immunohistochemistry	316
5.3.7. Electron microscopy	317
5.3.8. Focussed Ion Beam Scanning Electron Microscopy (FIB/SEM)	318
5.3.9. Quantitative image analysis	318
5.3.10. Behavioral analysis	319
5.3.11. Statistical analysis	319
<b>5.4. Results and Discussion</b>	320
5.4.1. Characterization of the reactive astroglial cells in the hippocampus of an APP/PS1 mouse model	320
5.4.2. Microglial activation in the hippocampus of a double transgenic APP/PS1 mouse model	321
5.4.3. Impact of Tom1/Tollip modulation on pathology progression in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease	323
<b>5.5. References</b>	325

## **6. ANEXOS (PUBLICACIONES)** 331

---

<b>Anexo 1. Gomez-Arboledas y col., 2017</b>	333
<b>Anexo 2. Baglietto-Vargas y col., 2017</b>	357
<b>Anexo 3. Trujillo-Estrada y col., 2014</b>	375

## 1. INTRODUCCIÓN 3

<b>Figura 1.1.</b> Dibujo comparativo de un hemisferio cerebral humano sano (izquierda) y otro de un paciente de Alzheimer (derecha)	7
<b>Figura 1.2.</b> Representación esquemática de la proteína precursora amiloide	8
<b>Figura 1.3.</b> Esquema de las vías de procesamiento del APP	11
<b>Figura 1.4.</b> Esquema representativo de las hipótesis alternativas de procesamiento proteolítico del APP	12
<b>Figura 1.5.</b> Agregación de monómeros de A $\beta$	14
<b>Figura 1.6.</b> Tipos de placas seniles	14
<b>Figura 1.7.</b> Hipótesis de la cascada amiloide	16
<b>Figura 1.8.</b> Ovillos neurofibrilares intracelulares	18
<b>Figura 1.9.</b> Fenotipos de activación microglial	23
<b>Figura 1.10.</b> El perfil génico de la microglía permite diferenciar los distintos estados que adquiere durante la progresión de la enfermedad	25
<b>Figura 1.11.</b> Formación hipocampal	36
<b>Figura 1.12.</b> Esquema básico de las conexiones del circuito trisináptico	37
<b>Tabla 1.1.</b> Genes relacionados con el sistema inmune que constituyen un factor de riesgo para la enfermedad de Alzheimer	6
<b>Tabla 1.2.</b> Resumen de los principales modelos transgénicos murinos para el estudio de la enfermedad de Alzheimer	31

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS 53

<b>Figura 2.1.</b> Esquema de las mutaciones del Alzheimer familiar que contiene la proteína humana APP <sub>751</sub> en el modelo transgénico APP <sub>751SL</sub> /PS1 <sub>M146L</sub>	56
<b>Figura 2.2.</b> Esquema del mantenimiento de parentales y generación de animales doble transgénicos APP/PS1	57
<b>Figura 2.3.</b> Diseño experimental empleado para la sobreexpresión/supresión de las proteínas Tom1/Tollip en el hipocampo de animales nTg y 3xTgAD	61
<b>Figura 2.4.</b> Representación del laberinto acuático de Morris	62
<b>Figura 2.5.</b> Delimitación anatómica de la formación hipocampal, compuesta por el hipocampo propio (regiones CA), el giro dentado (GD) y el subículo (S)	65

<b>Figura 2.6.</b> Delimitación anatómica del lóbulo temporal medial de las muestras humanas empleadas en este trabajo	66
<b>Figura 2.7.</b> Esquema de la inmunoperoxidasa para microscopía óptica convencional	72
<b>Figura 2.8.</b> Esquema de la inmunofluorescencia triple	76
<b>Figura 2.9.</b> Representación esquemática de la inmuno-oro para microscopía electrónica de transmisión	85
<b>Figura 2.10.</b> Proceso de binarización con el programa de análisis de imagen Visilog 6.3	87
<b>Figura 2.11.</b> Análisis de las placas de Abeta con el programa de análisis de imagen Imaris 7.2.3	88
<b>Figura 2.12.</b> Análisis de la morfología astrogliar con el programa de análisis de imagen Imaris 7.2.3	89
<b>Figura 2.13.</b> Análisis de IL-1R1 total mediante densidad óptica	89
<b>Figura 2.14.</b> Método de cuantificación de neuritas distróficas asociadas a prolongaciones astrogliales	91
<b>Tabla 2.1.</b> Relación de animales empleados para el objetivo 3 del presente trabajo de Tesis Doctoral	58
<b>Tabla 2.2.</b> Relación de los casos humanos analizados en el presente estudio	59
<b>Tabla 2.3.</b> Marcadores analizados en los estudios inmunohistoquímicos y sus características	72
<b>Tabla 2.4.</b> Relación de anticuerpos empleados en los estudios inmunohistoquímicos	74
<b>Tabla 2.5.</b> Relación de anticuerpos secundarios empleados en los estudios inmunohistoquímicos de microscopía óptica de campo claro	75
<b>Tabla 2.6.</b> Relación de anticuerpos secundarios empleados en los estudios de inmunofluorescencia	77
<b>Tabla 2.7.</b> Relación de anticuerpos secundarios conjugados con oro empleados en los estudios de inmunomarcaje para MET	85

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN** **113**

---

#### **3.1. Reactividad astrogliar en el hipocampo de modelos animales y pacientes de**

##### **Alzheimer**

<b>Figura 3.1.1.</b> Citoarquitectura del hipocampo de animales WT y APP/PS1 de 6 y 12	118
--	-----

meses de edad

<b>Figura 3.1.2.</b> Patrón de expresión temporal de A $\beta$ oligomérico extracelular en el hipocampo de animales APP/PS1 de 4 (A), 6 (B) y 12 (C) meses de edad	119
<b>Figura 3.1.3.</b> Patrón de astrogliosis en el hipocampo de ratones APP/PS1 y WT a 4, 6 y 12 meses de edad	120
<b>Figura 3.1.4.</b> Aumento significativo de reactividad astrocitaria con la edad en la región CA1 del hipocampo de animales APP/PS1	122
<b>Figura 3.1.5.</b> Los astrocitos reactivos expresan selectivamente el marcador BLBP	124
<b>Figura 3.1.6.</b> Estudio comparativo de la reactividad astrogliosa en el hipocampo de ratones APP/PS1 y WT a 4, 6 y 12 meses de edad	126
<b>Figura 3.1.7.</b> Aumento de la reactividad astrogliosa en la región CA1 del hipocampo de animales APP/PS1	127
<b>Figura 3.1.8.</b> El aumento de la reactividad astrogliosa con la edad en el hipocampo de los animales APP/PS1 se correlaciona con el aumento de la carga amiloide	129
<b>Figura 3.1.9.</b> Identificación a microscopía electrónica de transmisión de astrocitos mediante inmunomarcaje de GFAP con oro coloidal	132
<b>Figura 3.1.10.</b> Identificación a microscopía electrónica de transmisión de células astrogliales inmunomarcadas para ALDH1L1 en el hipocampo de ratones APP/PS1	133
<b>Figura 3.1.11.</b> Localización ultraestructural de AQP4 en pies perivasculares astrocitarios	134
<b>Figura 3.1.12.</b> La membrana plasmática de los astrocitos reactivos presenta un alto contenido en AQP4	135
<b>Figura 3.1.13.</b> Identificación a microscopía electrónica de transmisión de astrocitos inmunomarcados para GS en el hipocampo de ratones APP/PS1	136
<b>Figura 3.1.14.</b> Identificación de astrocitos a nivel ultraestructural mediante inmunotinción para EAAT2 en secciones de hipocampo de ratones APP/PS1	137
<b>Figura 3.1.15.</b> Estrecha relación entre las placas fibrilares y la astrogliosis reactiva en el hipocampo del modelo transgénico APP/PS1	140
<b>Figura 3.1.16.</b> Asociación entre la astrogliosis reactiva y la placa amiloide en el hipocampo de animales APP/PS1	141
<b>Figura 3.1.17.</b> Las prolongaciones de los astrocitos reactivos alcanzan el centro fibrilar de las placas neuríticas	142
<b>Figura 3.1.18.</b> Contacto entre los filamentos intermedios astrogliales y las fibras de A $\beta$	143

<b>Figura 3.1.19.</b> Identificación ultraestructural de prolongaciones de astrocitos en íntimo contacto con fibras de A $\beta$	144
<b>Figura 3.1.20.</b> Presencia de A $\beta$ fibrilar en el interior de astrocitos de ratones APP/PS1	145
<b>Figura 3.1.21.</b> Inmunolocalización del receptor de fagocitosis Megf10 en el hipocampo de animales APP/PS1	146
<b>Figura 3.1.22.</b> Megf10 se localiza en la periferia del centro fibrilar de las placas neuríticas	147
<b>Figura 3.1.23.</b> Localización ultraestructural de Megf10 en la zona de contacto astrogliá-fibras de A $\beta$ en el hipocampo de animales APP/PS1 de 6 y 12 meses de edad	148
<b>Figura 3.1.24.</b> Las placas amiloides en el hipocampo del modelo APP/PS1 son de tipo neurítico con numerosas neuritas distrofias a su alrededor	150
<b>Figura 3.1.25.</b> La patología neurítica aumenta en paralelo con el progreso de la patología amiloide en el hipocampo del modelo APP/PS1	151
<b>Figura 3.1.26.</b> Estrecha relación de la astrogliá reactiva con las placas amiloides y las neuritas distróficas	152
<b>Figura 3.1.27.</b> Los astrocitos reactivos contactan, envuelven e internalizan neuritas distróficas	154
<b>Figura 3.1.28.</b> Identificación ultraestructural de neuritas distróficas en el interior de astrocitos reactivos asociados a placas amiloides	155
<b>Figura 3.1.29.</b> Estudio ultraestructural del proceso de internalización astrogliá de una neurita distrófica	156
<b>Figura 3.1.30.</b> Aumento con la edad de la patología neurítica y del recubrimiento astrogliá asociado a las placas amiloides en el hipocampo de animales APP/PS1	158
<b>Figura 3.1.31.</b> Aumento con la edad del proceso de fagocitosis de neuritas distróficas por los astrocitos reactivos asociados a las placas amiloides	159
<b>Figura 3.1.32.</b> Las neuritas distróficas internalizadas por los astrocitos reactivos están rodeadas por membrana plasmática astrogliá EAAT2-positiva	161
<b>Figura 3.1.33.</b> Las neuritas distróficas fagocitadas están rodeadas por membrana plasmática astrogliá AQP4-positiva	162
<b>Figura 3.1.34.</b> Digestión intracelular de neuritas distróficas por astrocitos reactivos	163
<b>Figura 3.1.35.</b> Digestión intracelular de neuritas distróficas	164
<b>Figura 3.1.36.</b> Las neuritas distróficas fagocitadas por los astrocitos reactivos son de naturaleza presináptica	165
<b>Figura 3.1.37.</b> Origen neuronal de las neuritas distróficas fagocitadas por los	166



astrocitos reactivos

<b>Figura 3.1.38.</b> Los astrocitos reactivos envuelven terminales presinápticos distróficos	168
<b>Figura 3.1.39.</b> Los astrocitos reactivos envuelven neuritas distróficas en el hipocampo de pacientes de Alzheimer	169
<b>Figura 3.1.40.</b> Identificación ultraestructural de neuritas distróficas en el interior de astrocitos reactivos en el hipocampo de pacientes de Alzheimer	172
<b>Figura 3.1.41.</b> Comparativa de la interacción entre neuritas distróficas y astrocitos reactivos en el hipocampo de pacientes de Alzheimer (A y B) y del modelo APP/PS1 (C y D)	173
<b>Figura 3.1.42.</b> Las neuritas distróficas del hipocampo de pacientes de Alzheimer son de mayor tamaño que las del modelo APP/PS1	174
<b>Figura 3.1.43.</b> Estudio morfométrico comparativo de los astrocitos reactivos en el hipocampo de animales APP/PS1 de 12 meses de edad y de pacientes de Alzheimer (Braak V-VI)	175
<b>Figura 3.1.44.</b> Los astrocitos primarios fagocitan <i>in vitro</i> neurosinaptosomas aislados de hipocampo de animales APP/PS1	177
<b>Figura 3.1.45.</b> La fagocitosis de neurosinaptosomas APP/PS1 induce la acumulación de inclusiones membranosas heterogéneas en el citoplasma astrogliar	178

### **3.2. Estudio de la microglía activada en el hipocampo del modelo APP/PS1**

<b>Figura 3.2.1.</b> Inmunomarcaje con anti-Iba1 para la identificación de células microgliales a microscopía óptica y electrónica	208
<b>Figura 3.2.2.</b> La astrogliá reactiva, además de la microglía, rodea las placas amiloides	209
<b>Figura 3.2.3.</b> La microglía activada se localiza específicamente rodeando las placas amiloides	210
<b>Figura 3.2.4.</b> Estudio ultraestructural de la microglía en el hipocampo del modelo transgénico APP/PS1	212
<b>Figura 3.2.5.</b> Diversidad ultraestructural de la microglía	213
<b>Figura 3.2.6.</b> Estrecha relación entre la microglía activada y el núcleo fibrilar de las placas amiloides	215
<b>Figura 3.2.7.</b> El citoplasma microglial se entremezcla con las fibrillas amiloides de las placas	216
<b>Figura 3.2.8.</b> Marcaje diferencial de microglía y de A $\beta$ a microscopía electrónica de transmisión	217

<b>Figura 3.2.9.</b> El A $\beta$ oligomérico se localiza preferentemente en la periferia de las placas amiloides	218
<b>Figura 3.2.10.</b> La microglía activada que rodea las placas amiloides presenta A $\beta$ fibrilar en su interior	221
<b>Figura 3.2.11.</b> Presencia de A $\beta$ intracelular en células microgliales de pacientes de Alzheimer	222
<b>Figura 3.2.12.</b> Identificación ultraestructural de fibrillas amiloides en el interior de la microglía	223
<b>Figura 3.2.13.</b> Evidencia ultraestructural de fibrillas amiloides en el citoplasma microglial	224
<b>Figura 3.2.14.</b> La microglía activada parece participar en la formación de fibrillas de A $\beta$	225
<b>Figura 3.2.15.</b> El retículo endoplasmático de la microglía se asocia con las fibrillas amiloides	227

### **3.3. Efecto de la modulación de Tom1/Tollip sobre la progresión de la patología en un modelo triple transgénico de Alzheimer**

<b>Figura 3.3.1.</b> Representación esquemática de la cascada de señalización de la IL-1	240
<b>Figura 3.3.2.</b> Esquema de la activación y terminación de la cascada de señalización de IL-1 $\beta$	241
<b>Figura 3.3.3.</b> La sobreexpresión de Tom1 revierte los déficits de memoria espacial en el modelo 3xTgAD mientras que el silenciamiento de Tollip los agrava significativamente	244
<b>Figura 3.3.4.</b> No existen diferencias de motilidad entre los ratones 3xTgAD y los no transgénicos (nTg) en la prueba del laberinto acuático de Morris	246
<b>Figura 3.3.5.</b> El silenciamiento de Tom1 o de Tollip induce deficiencias cognitivas en el modelo 3xTgAD en respuesta al miedo condicionado	247
<b>Figura 3.3.6.</b> Expresión de la proteína Tollip en el hipocampo de animales 3xTgAD y no transgénicos (nTg) en los diferentes grupos experimentales	250
<b>Figura 3.3.7.</b> Expresión de la proteína Tom1 en el hipocampo de animales 3xTgAD y no transgénicos (nTg) en los diferentes grupos experimentales	251
<b>Figura 3.3.8.</b> Controles inmunohistoquímicos del silenciamiento génico para Tollip (A-B) y Tom1 (C-D)	252
<b>Figura 3.3.9.</b> Las neuronas piramidales del hipocampo de ratones 3xTgAD-Tom-AAV	253

sobreexpresan Tom1

- Figura 3.3.10.** El silenciamiento génico de Tollip (Tollip-sh) y de Tom1 (Tom-sh) induce un incremento de la expresión del receptor tipo I de interleuquina 1 (IL-1R1) en el hipocampo del modelo 3xTgAD 254
- Figura 3.3.11.** Expresión del receptor tipo I de interleuquina 1 (IL-1R1) en neuronas del hipocampo del modelo 3xTgAD 256
- Figura 3.3.12.** Localización ultraestructural del receptor tipo I de interleuquina 1 (IL-1R1) en el hipocampo del modelo 3xTgAD 257
- Figura 3.3.13.** El receptor tipo I de interleuquina 1 (IL-1R1) se localiza en la membrana plasmática y en el citoplasma neuronal 259
- Figura 3.3.14.** El receptor tipo I de interleuquina 1 (IL-1R1) se expresa en células microgliales 260
- Figura 3.3.15.** El receptor tipo I de interleuquina 1 (IL-1R1) se expresa en células astrogliales 261
- Figura 3.3.16.** Patología amiloide en el hipocampo de animales 3xTgAD de los diferentes grupos experimentales 264
- Figura 3.3.17.** Estudio comparativo de la patología amiloide en la región del subículo del modelo 3xTgAD en los diferentes grupos experimentales 265
- Figura 3.3.18.** Estudio cuantitativo del número y tamaño de las placas de A $\beta$  en el hipocampo del modelo 3xTgAD en los grupos control (Ctrl-AAV), de silenciamiento génico de Tollip (Tollip-sh) o de Tom (Tom-sh) y de sobreexpresión de Tom (Tom-AAV) 266
- Figura 3.3.19.** Las células microgliales de los grupos Tollip-sh y Tom-sh manifiestan cambios morfológicos 270
- Figura 3.3.20.** Análisis de la población microglial en el hipocampo del modelo 3xTgAD en los grupos control (Ctrl-AAV), de silenciamiento génico de Tollip (Tollip-sh) o de Tom1 (Tom-sh) y de sobreexpresión de Tom (Tom-AAV) 271
- Figura 3.3.21.** Las células astrogliales de los grupos Tollip-sh y Tom-sh manifiestan cambios morfológicos 272
- Figura 3.3.22.** Análisis de la población astrogliar en el hipocampo de animales 3xTgAD control, Tollip-sh, Tom-sh y Tom-AAV 273

### **Figuras Suplementarias**

- Figura Suplementaria 3.1.** Expresión de BLBP en la región subgranular del giro 180

dentado en animales WT y APP/PS1

**Figura Suplementaria 3.2.** Inmunolocalización de AQP4 en el hipocampo de animales WT 181

**Figura Suplementaria 3.3.** La astrogliá reactiva expresa los marcadores GFAP y ALDH1L1 182

**Figura Suplementaria 3.4.** No hay evidencias ultraestructurales de la internalización de neuritas distróficas por parte de la microglía 183

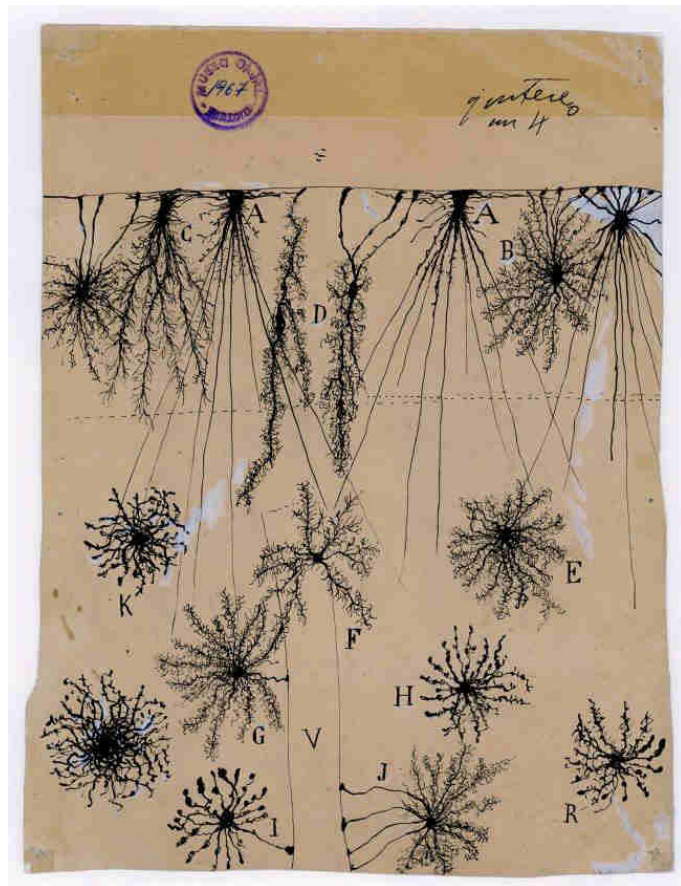
**Figura Suplementaria 3.5.** La expresión del marcador astrocítico GFAP aumenta significativamente en las muestras de pacientes en estadio Braak V-VI 185

**Figura Suplementaria 3.6.** Niveles de A $\beta$ 2 soluble en el hipocampo en animales 3xTgAD de los grupos control, Tollip-sh, Tom-sh y Tom-AAV 274

**Figura Suplementaria 3.7.** Aumento en los niveles de citoquinas proinflamatorias en el hipocampo de animales 3xTgAD-Tom-sh y 3xTgAD-Tollip-sh 275

**Figura Suplementaria 3.8.** Niveles de las citoquinas antiinflamatorias IL-10 e IL-4 en la fracción soluble hipocampal de los animales 3xTgAD control, Tollip-sh, Tom-sh y Tom-AAV 276

# 1. INTRODUCCIÓN



Santiago Ramón y Cajal



## 1.1

ENFERMEDAD DE  
ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la principal causa de demencia que afecta al 10% de la población mayor de 65 años. Es una proteinopatía neurodegenerativa de curso progresivo e irreversible que se manifiesta con deterioro de las funciones cognitivas y alteraciones conductuales. La pérdida de memoria va acompañada de agnosia (incapacidad para reconocer personas u objetos), apraxia (alteración de los gestos e incapacidad de llevar a cabo tareas rutinarias) y/o afasia (alteraciones del lenguaje). Desde el punto de vista clínico, la enfermedad da comienzo con una fase preclínica asintomática, seguida por una fase prodrómica (o de deterioro cognitivo leve) y finalmente de la fase clínica que conduce al paciente a un estado generalizado de demencia (van Strien et al. 2009; Scheltens et al. 2016; Winblad et al. 2015). Este declive cognitivo es debido a daños selectivos en regiones cerebrales implicadas en procesos de memoria, como son la corteza entorrinal, el hipocampo, la amígdala y áreas neocorticales, ocasionando con el tiempo un deterioro severo y finalmente la demencia.

En la actualidad, se estima que el número de afectados por esta enfermedad es de unos 46 millones a nivel mundial, de los cuales unos 800.000 corresponden a España. Debido al envejecimiento progresivo de la población, y en ausencia de terapias efectivas, se calcula que se alcancen los 130 millones de afectados en todo el mundo en el año 2050 (Prince et al. 2016). Todo ello ha convertido a esta patología en un grave problema de salud pública, y por tanto un reto social urgente de solucionar.

Muchos han sido los avances científicos sobre los mecanismos biológicos que subyacen a esta enfermedad desde que Alois Alzheimer la describiera en 1907; sin embargo, la ausencia de buenos marcadores biológicos hace que aún no dispongamos de un test de diagnóstico *ante mortem* y que sólo el análisis neuropatológico *post mortem* permita el diagnóstico definitivo. En la actualidad no existe ningún tratamiento farmacológico efectivo que frene o retrase el desarrollo de la EA; los fármacos disponibles son exclusivamente de carácter sintomático ofreciendo un beneficio clínico limitado.

### 1.1.1. Tipos de Alzheimer y factores de riesgo

Se distinguen dos formas de la EA en función de la edad de inicio, su incidencia y las causas que provocan su aparición. Sin embargo, y a pesar de ser dos formas bien diferenciadas de la enfermedad, ambos tipos presentan la misma sintomatología y lesiones histopatológicas.

Alzheimer esporádico (95-98% de los casos). Esta forma de la enfermedad se conoce también como Alzheimer de inicio tardío y engloba la mayor parte de los casos de Alzheimer. Su incidencia se encuentra en un 3-4% de los adultos entre 60-65 años, sin embargo, esta cifra se duplica cada 5 años hasta alcanzar una incidencia de casi un 50% en los mayores de 80 años. Su origen es multifactorial, siendo sus causas desconocidas hasta el momento, aunque la edad juega un papel fundamental en su desarrollo así como factores genéticos y ambientales (Ballard et al. 2011; Scheltens et al. 2016; Zuroff et al. 2017).

Alzheimer familiar (3-5% de los casos). También conocido como de inicio temprano, se caracteriza principalmente por su pronta aparición (a los 35-40 años de edad). Su causa es de origen genético y aunque existen numerosas mutaciones en diversos genes que predisponen a la enfermedad, únicamente las mutaciones autosómicas dominantes (con un 100% de penetrancia) en los genes de la presenilinas 1 y 2 (PS1 y PS2) y la proteína precursora amiloide (APP) han sido directamente implicadas en la aparición de la enfermedad (Bertram et al. 2010; O'Brien and Wong 2011; Karch et al. 2014; Calero et al. 2015; Herrup 2015; Cristóvão et al. 2016; Drummond and Wisniewski 2016; Cacace et al. 2016).

*Presenilina-1 (PS1)*. Localizado en el cromosoma 14, sus mutaciones son la causa más común del Alzheimer familiar (30-50% antes de los 55 años y un 70% del total de casos de Alzheimer familiar) (Sherrington et al. 1995; Czech et al. 2000). Actualmente se conocen 241 mutaciones de este gen (<http://www.alzforum.org/mutations>), entre ellas la que portaba Auguste Deter (mutación F176L), paciente de Alois Alzheimer (Müller et al. 2013).

*Presenilina-2 (PS2)*. Se encuentra en el cromosoma 1 (Rogaev et al. 1995) y sus mutaciones, al igual que las de la presenilina-1, modifican el procesamiento normal de la proteína precursora amiloide. Se han descrito 45 mutaciones de este gen que están relacionadas con el Alzheimer (<http://www.alzforum.org/mutations>).

*Proteína precursora amiloide (APP)*. Las mutaciones en este gen fueron las primeras descritas en relación al Alzheimer familiar a pesar de que se presentan en un bajo número de personas (10%). Su localización en el cromosoma 21 provoca que, en casos de duplicación cromosómica (como ocurre en el Síndrome de Down), se desarrolle la EA de manera temprana (Czech et al. 2000; Thinakaran and Koo 2008; Wiseman et al. 2015). Se han descrito 52 mutaciones en el gen de la proteína precursora amiloide (<http://www.alzforum.org/mutations>).



Existe un gran número de factores de riesgo que predisponen a la aparición y desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Estos factores son:

**Genéticos.** Se han conseguido identificar una gran cantidad de factores de riesgo genéticos que están implicados en el inicio, progresión y severidad de la patología (Giri et al. 2016; Rosenberg et al. 2016; Scheltens et al. 2016). El primero de todos los genes confirmado como factor de riesgo para el Alzheimer esporádico fue el alelo  $\epsilon 4$  del gen de la apolipoproteína E (*APOE*). A partir de ahí, se han identificado más de 20 genes relacionados con la patología que, a grandes rasgos, se pueden clasificar en tres vías y mecanismos biológicos principales: metabolismo lipídico, transporte vesicular y endocitosis y respuesta inflamatoria (ver Tabla 1.1). Entre ellos, podemos destacar *CLU* (clusterina), *PICALM* (del inglés “phosphatidyl inositol-binding clathrin assembly protein”), *TREM2* (del inglés “triggering receptor expressed on myeloid cells 2), *CR1* (receptor del complemento 1),  $\alpha 2$ -macroglobulina, y *PLA2* (fosfolipasa A2) (Calero et al. 2015).

**Género.** El hecho de que la esperanza de vida del género femenino sea mayor que la del masculino (Riedel et al. 2016) junto con el papel neuroprotector que poseen los estrógenos, hacen que las mujeres postmenopáusicas tengan mayor riesgo de sufrir EA (Maccioni et al. 2001).

**Enfermedad cardiovascular:** Las enfermedades cardiovasculares, como la hipertensión, la aterosclerosis y la isquemia cerebral incrementan el riesgo de desarrollar EA (van Norden et al. 2012; Karran and De Strooper 2016). Además, el A $\beta$  también se puede acumular en los vasos sanguíneos, desarrollando la angiopatía amiloide cerebral (AAC) (Drummond and Wisniewski 2016; Zuroff et al. 2017). Todo ello ha llevado a establecer la hipótesis vascular de la EA (Karran and De Strooper 2016).

**Exposición a metales:** entre ellos, el hierro, cobre, zinc, mercurio y plomo. El aluminio es neurotóxico, dado que induce la expresión de APP y su procesamiento amiloidogénico (Di Paolo et al. 2014).

**Otros factores:** como el estilo de vida, la dieta, la obesidad, el estrés, la inactividad física y mental, el bajo nivel educacional, la depresión, el riesgo de enfermedad vascular, el tabaco, el traumatismo cerebral y la diabetes mellitus tipo II son factores de riesgo modificables (Scheltens et al. 2016; Kuruva and Reddy 2017). La reserva cognitiva tiene amplias implicaciones biológicas en la patogénesis de la EA. Las actividades intelectuales (como los videojuegos o la lectura) y sociales pueden contribuir a reducir el riesgo de desarrollar EA (Kocahan and Doğan 2017).

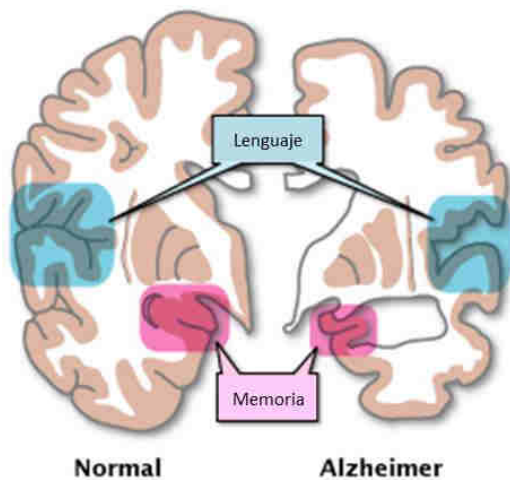
**Tabla 1.1.** Genes relacionados con el sistema inmune que constituyen un factor de riesgo para la enfermedad de Alzheimer

Gen	Loc. Cromosoma	Función	Loc. Celular	Loc. Cerebral
<b>TREM2</b>	6p21.1	Respuesta inflamatoria	Membrana plasmática	Microglía
<b>CD33</b>	19q13.3	Endocitosis mediada por clatrina. Señalización celular	Membrana plasmática	Microglía
<b>CR1</b>	1q32	Aclaramiento de $\beta$ -amiloide. Activación del complemento	Membrana plasmática	Microglía y neuronas
<b>CLU</b>	8p21-p12	Regulación complemento	Citoplasma y espacio extracelular	Microglía, astrocitos y neuronas
<b>MS4A4E/6A</b>	11q12.1-q12.2	Transducción de señales. Función inmune	Membrana plasmática	Microglía
<b>ABCA7</b>	19p13.3	Fagocitosis	Membrana plasmática	Microglía, astrocitos y neuronas
<b>INPP5D (SHIP1)</b>	2q37.1	Señalización citoquinas	Citoplasma	Microglía y astrocitos
<b>HLA-DRB5/DRB1</b>	6p21.3	Función inmune. Histocompatibilidad	Membrana plasmática y espacio extracelular	Microglía y astrocitos

### 1.1.2. Neuropatología

El cerebro de los pacientes de Alzheimer se caracteriza por una serie de cambios, tanto a nivel macroscópico como microscópico, muy distintivos (para revisión ver Perl 2010; Scheltens et al. 2016). Los cambios macroscópicos se caracterizan fundamentalmente por una importante atrofia cortical, manifestada mediante la disminución del grosor de las circunvoluciones, el engrosamiento de los surcos y las meninges y la dilatación de las cavidades ventriculares que da lugar a una pérdida en peso y volumen de la corteza cerebral (Fig. 1.1).

La atrofia cerebral se puede analizar mediante neuroimagen (resonancia magnética) para mejorar el diagnóstico precoz y ayudar a predecir el curso de la enfermedad (Nasrallah and Wolk 2014; Eskildsen et al. 2015).



**Figura 1.1.** Dibujo comparativo de un hemisferio cerebral humano sano (izquierda) y otro de un paciente de Alzheimer (derecha). El cerebro afectado por la EA tiene un volumen inferior al cerebro sano y presenta dilatación de los ventrículos. Esta atrofia afecta fundamentalmente a los lóbulos temporales, frontales, parietales y occipitales. Las áreas más afectadas son aquellas en las que residen las funciones de memoria (hipocampo) y lenguaje (áreas de Broca y de Wernicke). Modificado de <https://gamebasedassessmentofdememtia>.

A nivel microscópico, las lesiones histopatológicas características de la EA son (revisado en Gomez-Isla et al. 2008; Duyckaerts et al. 2009; Perl 2010; Serrano-Pozo et al. 2011):

1. Acumulación de proteínas agregadas, en forma de **placas seniles** (depósitos extracelulares) formadas por la proteína  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) y, que se depositan en el parénquima cerebral y en la pared de los vasos sanguíneos, y de **ovillos neurofibrilares** intracelulares (NFTs, del inglés “*Neurofibrillary Tangles*”) formados por la proteína Tau hiperfosforilada. Estas dos alteraciones tisulares proteicas, descritas por Alois Alzheimer hace más de 100 años, constituyen aún en la actualidad las lesiones histopatológicas post mortem para el diagnóstico definitivo de la enfermedad.
2. Pérdida significativa de neuronas y contactos sinápticos en áreas cerebrales selectivamente vulnerables, que en muchas ocasiones están implicadas en el procesamiento de la información y la adquisición de la memoria. En la primera fase de la EA, las neuronas colinérgicas del telencéfalo basal y las adrenérgicas del *locus coeruleus* son las más afectadas.
3. También, es característica la presencia de un proceso neuroinflamatorio, con activación glial (ver revisión Heneka et al. 2015), que se detallará más adelante (Apartado 1.5).

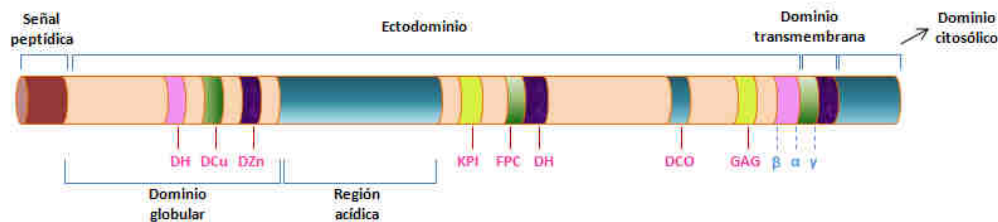
## 1.2

A $\beta$  Y PATOLOGÍA  
AMILOIDE

Una de las lesiones microscópicas más características en el cerebro de los pacientes de Alzheimer son las placas seniles, agregados proteicos localizados en el parénquima nervioso y cuyo componente principal es el péptido  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ), generado a partir de la proteína precursora amiloide (APP) mediante procesamiento proteolítico.

## 1.2.1. APP

La proteína precursora amiloide (APP), es codificada por el gen *APP* localizado en el cromosoma 21 (21q21.3), y se pueden encontrar tres isoformas proteicas, APP695, APP751 y APP770, siendo la primera de ellas la más abundante en neuronas (Müller et al. 2017; Giri et al. 2016). La proteína APP (Fig. 1.2) es una glicoproteína integral de membrana de tipo I, constituida por un largo ectodominio (N-terminal) de estructura globular, un dominio transmembrana y un pequeño dominio citosólico (C-terminal) (Turner et al. 2003; Rajendran and Annaert 2012; Nguyen 2015).



**Figura 1.2. Representación esquemática de la proteína precursora amiloide.** En la secuencia proteica del APP encontramos numerosos sitios de unión a moléculas de la matriz extracelular, como el colágeno o la heparina. Entre el ectodominio y el dominio transmembrana se encuentran los sitios de corte de las secretasas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  que generarán la escisión del péptido A $\beta$ . DH: dominio de unión a heparina; DCu: dominio de unión a cobre; DZn: dominio de unión a zinc; KPI: dominio inhibidor de la serín proteasa Kunitz; FPC: factor promotor de crecimiento; DCO: dominio de unión a colágeno; GAG: sitio de unión a glucosaminoglucanos. (Modificado de Evin y Weidmaan, 2002).

La proteína APP, además de ser la responsable de la formación del  $\beta$ -amiloide, también tiene otras funciones fisiológicas, sin embargo, éstas son bastante menos conocidas (ver revisión Müller et al. 2017). Le ha sido atribuida la participación en procesos de adhesión y señalización celular, transporte de metales, crecimiento de neuritas, migración neuronal, o potenciación a largo plazo (LTP), teniendo así un papel durante el desarrollo cerebral participando en la diferenciación y migración neuronal, así como en el estado adulto, interviniendo en la formación y reparación sináptica (Müller et al. 2017). Además, podría tener propiedades neuroprotectoras, antioxidantes y tróficas (Evin and Weidemann 2002; Thinakaran and Koo 2008; O'Brien and Wong 2011; Rajendran and Annaert 2012; Nguyen 2015; Tatarnikova et al. 2015; Andreeva et al. 2017).

Han sido descritas unas 50 mutaciones en el gen APP relacionadas con las formas familiares de la EA. Estas pueden incrementar la producción del péptido A $\beta$ 42, disminuir la de A $\beta$ 40, aumentar la patogenicidad del A $\beta$ , su formación fibrilar y su capacidad de agregación (Macleod et al. 2015; Musiek and Holtzman 2015; Tatarnikova et al. 2015). No obstante, la mutación A673T en APP reduce la producción amiloidogénica de A $\beta$  y su agregación, proporcionando protección contra el declive cognitivo asociado a la edad (Herrup 2015; Karran and De Strooper 2016; Selkoe and Hardy 2016; Zuroff et al. 2017).

### 1.2.2. Presenilinas: PS1 y PS2

Las presenilinas 1 y 2 (PS1 y PS2) son proteínas transmembrana (Czech et al. 2000), que constituyen el centro catalítico del complejo  $\gamma$ -secretasa, en el que también nos encontramos otras proteínas como la nicastrina (NCT), el potenciador de presenilina (PEN2) y APH1 y 2 (proteína faríngea anterior defectuosa 1 y 2), que cataliza escisiones intramembranales sobre proteínas transmembrana (Andreeva et al. 2017). Entre sus sustratos se distinguen Notch y APP (Cai et al. 2015). Dado que forman parte del complejo enzimático  $\gamma$ -secretasa, juegan un papel muy importante en la formación del péptido  $\beta$ -amiloide y, por tanto, en la patología del Alzheimer (De Strooper 2010).

Ambas presenilinas contienen entre 6-8 dominios transmembrana y los dominios N-y C-terminal están orientados hacia el citosol. Se localizan tanto en el aparato de Golgi como en el RE, aunque se han encontrado también en la membrana plasmática, compartimentos endocíticos, vacuolas autofágicas y lisosomas (Vetrivel et al. 2006; Cai et al. 2015). PS1 y PS2 comparten más de un 65% de homología, siendo la primera de ellas la que se expresa de manera mayoritaria. En cuanto a sus funciones, se encuentran la implicación en el tráfico y renovación de proteínas, en la homeostasis del calcio y en la regulación de la señalización mediada por  $\beta$ -catenina (De Strooper et al. 2012).

El gen para la PS1 se localiza en el cromosoma 14 (14q24.3) y el gen para la PS2 se encuentra en el cromosoma 1 (1q31-q42). Mientras que para el primero de ellos se han llegado a identificar 241 mutaciones patogénicas para el segundo sólo se han descrito 45 mutaciones. No obstante, el resultado de todas estas mutaciones es análogo, ya que en ambos

casos se produce una alteración del complejo  $\gamma$ -secretasa que da lugar a un aumento en la producción de A $\beta$ 42 y una disminución de A $\beta$ 40; aumento que es algo menor en el caso de intervenir PS2 (Giri et al. 2016). Las mutaciones en las presenilinas son de carácter autosómico dominante, altamente penetrantes y se asocian con las formas familiares de la EA (Vetrivel et al. 2006).

### 1.2.3. Procesamiento del APP

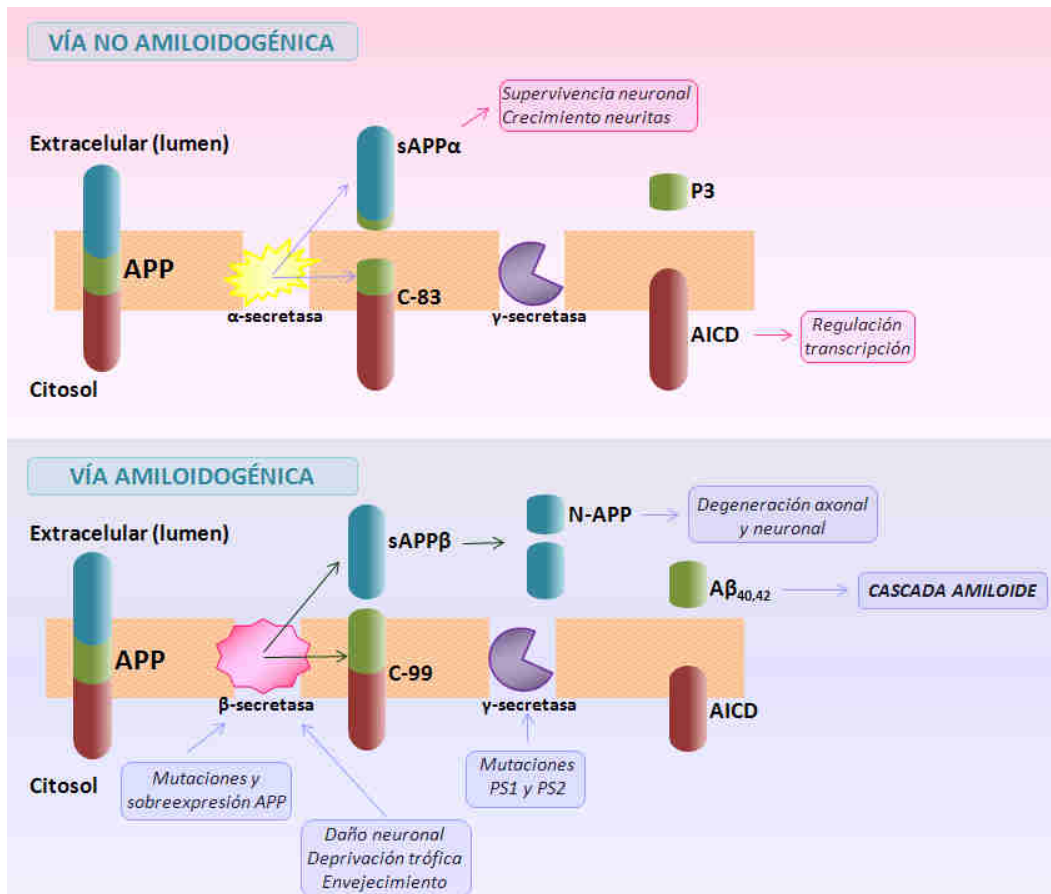
El péptido  $\beta$ -amiloide se genera por la acción de  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasas durante el envejecimiento normal, aunque este procesamiento proteolítico ocurre de manera más acusada durante la enfermedad de Alzheimer. Esta proteólisis no sólo da lugar al A $\beta$ , que se acumula y da lugar a las placas seniles, si no que se generan también un gran número de moléculas con diversas funciones.

Tras su síntesis en el retículo endoplasmático, la proteína APP en su forma madura glicosilada se dirige a la membrana plasmática en donde puede ser procesada o endocitada (Evin and Weidemann 2002; Thinakaran and Koo 2008; Zhang et al. 2011; Nguyen 2015). La proteína APP es sustrato de diferentes enzimas, por las que va a sufrir distintos procesamientos proteolíticos: vías canónicas (amiloidogénica y no amiloidogénica) en la que participan las secretasas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ; y las vías no canónicas en la que están implicadas enzimas como las caspasas, meprina,  $\delta$ -secretasa y  $\eta$ -secretasa. De todas ellas, la principal responsable de la formación del péptido  $\beta$ -amiloide es la vía canónica amiloidogénica. En ella, primero actúa la enzima  $\beta$ -secretasa (BACE1 o BACE2) que da lugar a un fragmento soluble del ectodominio, sAPP $\beta$ , y a un fragmento C-terminal (CTF $\beta$ ). Sobre este último actúa el complejo de la  $\gamma$ -secretasa y se acaba liberando el péptido  $\beta$ -amiloide y el fragmento intracelular del APP (AICD).

Las vías canónicas de procesamiento del APP son (Fig. 1.3):

Ruta no amiloidogénica: es la vía de procesamiento del APP predominante en la mayoría de células. Recibe su nombre debido a que la acción de la  $\alpha$ -secretasa tiene lugar en el interior de la región que da lugar al A $\beta$ , evitando así su producción. En su lugar, esta proteasa que se encuentra anclada a la membrana origina un fragmento soluble denominado sAPP $\alpha$  que es liberado al espacio extracelular y al que se le atribuyen propiedades neurotróficas y neuroprotectoras (De Strooper 2010). Se genera también un fragmento C-terminal o CTF constituido por 83 aminoácidos (C83) que permanece anclado a la membrana plasmática. Es este fragmento el que será sustrato de la  $\gamma$ -secretasa (complejo enzimático del que forma parte la Presenilina), que lleva a cabo su acción proteolítica en el interior de la membrana y dará lugar a los péptidos p3 (puede encontrarse en las placas, aunque no se considera tóxico hasta el momento) y AICD (o p7; dominio intracelular de APP). Este último es citosólico y podría tener un papel en la regulación de la transcripción génica (De Strooper 2010; Zhang et al. 2011; O'Brien and Wong 2011; Wilkins and Swerdlow 2017).

**Ruta amiloidogénica:** esta vía alternativa de procesamiento del APP es minoritaria en la mayoría de los tipos celulares, excepto en las neuronas, dando lugar a la producción de péptidos de A $\beta$ . La ruta comienza con la acción de la  $\beta$ -secretasa (acción atribuida a la aspartil proteasa BACE-1), presente principalmente en los endosomas y aparato de Golgi de las neuronas (Vassar et al. 2009). Mediante esta acción enzimática se origina el fragmento sAPP $\beta$  (de menor tamaño que sAPP $\alpha$ ) y el péptido C99 (fragmento C-terminal de 99 aminoácidos), que permanece anclado a la membrana y contiene la secuencia intacta del A $\beta$ . Este péptido es sustrato de la  $\gamma$ -secretasa, de manera que se libera A $\beta$  de 40-42 aminoácidos extracelularmente y AICD intracelularmente (Selkoe 2001, 2008; Wilkins and Swerdlow 2017; Tomita 2017). El procesamiento proteolítico del sAPP $\beta$  da lugar al N-APP, que parece estar implicado en procesos de degeneración axonal y neuronal (Nikolaev et al. 2009; De Strooper 2010).

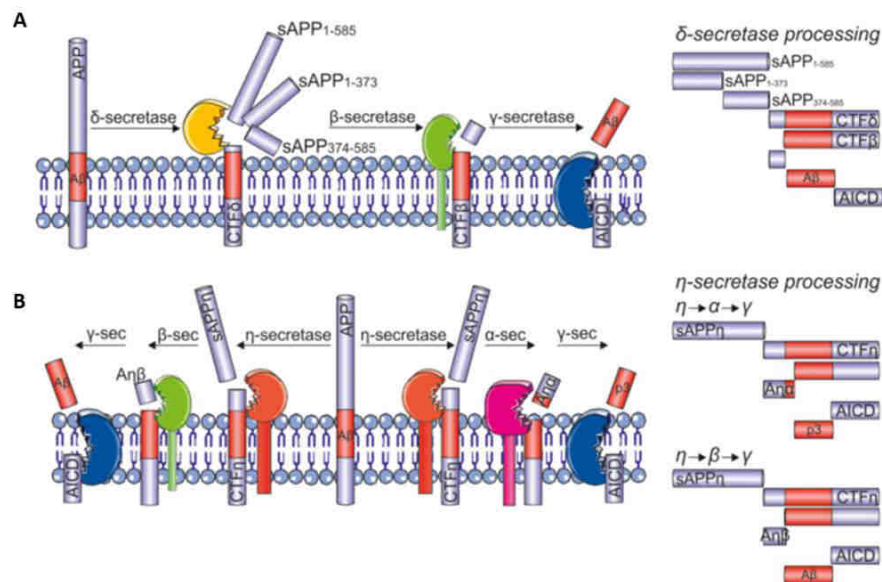


**Figura 1.3. Esquema de las vías de procesamiento del APP.** Mediante la vía no amiloidogénica, el metabolismo del APP se produce por la acción secuencial de la  $\alpha$ - y  $\gamma$ -secretasa, generando sAPP $\alpha$ , p3 y AICD. Sin embargo, el procesamiento mediante la vía amiloidogénica tiene lugar mediante la acción de la  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasa, dando lugar a los fragmentos N-APP, AICD y A $\beta_{40-42}$  (Modificado de Kim and Tsai 2009).



El péptido A $\beta$  que se origina mediante la vía amiloidogénica tiene una longitud de 40 o 42 aminoácidos, de manera que la mayoría del A $\beta$  termina en Val40 (A $\beta$ 1-40) en su extremo C-terminal, sin embargo existe un pequeño porcentaje de este A $\beta$  que lo hace en Ala42 (A $\beta$ 1-42) adquiriendo mayor hidrofobicidad, por lo que tiene mayor tendencia a la agregación y formación de fibrillas (Hiltunen et al. 2009; De Strooper 2010; Zhang et al. 2011).

Aunque el procesamiento del APP mediante la acción secuencial de las  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasas según la ruta no amiloidogénica/amiloidogénica sigue siendo la hipótesis más aceptada actualmente, recientemente se han propuesto nuevas hipótesis alternativas para su procesamiento proteolítico (ver revisión Andrew et al. 2016). Estas vías de procesamiento del APP, proponen una acción combinada de las secretasas clásicas con la  $\delta$ -secretasa (AEP: asparagina endopeptidasa) y  $\eta$ -secretasa, causando un aumento en los niveles de producción de A $\beta$ . Sin embargo, a día de hoy no se ha descrito ninguna mutación relacionada con el Alzheimer familiar en estas enzimas proteolíticas, por lo que se cuestiona su relevancia respecto a la patología de la EA.



**Figura 1.4. Esquema representativo de las hipótesis alternativas de procesamiento proteolítico del APP.** Mediante la acción secuencial de la  $\delta$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasa se generan 3 fragmentos solubles de APP (sAPP) de diferente longitud, AICD y A $\beta$  (A). Por otro lado, la acción de la  $\eta$ -secretasa da lugar a la producción de diferentes péptidos según la acción alternativa de la  $\alpha$ - o  $\beta$ -secretasa, de manera que únicamente se genera péptido  $\beta$ -amiloide cuando actúan las  $\eta$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasas secuencialmente (B). (Tomado de Andrew et al. 2016).

#### 1.2.4. Péptido $\beta$ -amiloide y su eliminación

El péptido A $\beta$  es una proteína de pequeño tamaño, 4 kDa, constituida por 39-43 aminoácidos (Macleod et al. 2015). En condiciones fisiológicas, más del 90% de las especies de A $\beta$  se encuentran en la forma A $\beta$ 40 (soluble) y menos del 5% son A $\beta$ 42 (insoluble y con mayor propensión a la agregación), la cual predomina en la EA. Hay evidencias de que el A $\beta$  puede acumularse en el interior celular, distribuyéndose por el citosol neuronal, aunque también se puede localizar en diferentes compartimentos subcelulares (Sun et al. 2015), incluyendo la



mitocondria, lisosomas y retículo endoplasmático, pudiendo causar disfuncionalidad en los mismos (Kuruva and Reddy 2017). Esto se debe a que el péptido A $\beta$  se puede formar en cualquier compartimento celular de membrana, allá donde residan las secretasas, quedándose en el interior celular o liberándose al exterior, tanto si se ha formado en la membrana plasmática o porque haya seguido la vía secretora (Takahashi et al. 2017).

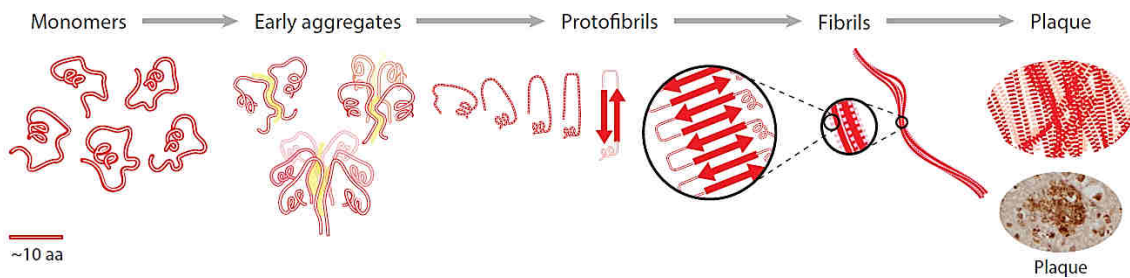
Un desequilibrio entre la producción y la eliminación de A $\beta$  puede lugar a su acumulación en forma de placas seniles. En pacientes con Alzheimer familiar ha sido descrito un aumento en la producción de A $\beta$ ; mientras que los enfermos con Alzheimer esporádico no muestran este aumento, por lo que se sugiere que la disminución en su eliminación podría ser el origen de la acumulación de A $\beta$  en placas seniles (Evin and Weidemann 2002; Duyckaerts et al. 2009; Miners et al. 2014).

Para evitar la acumulación del A $\beta$  en forma de placas seniles, es necesaria su degradación mediante diferentes tipos de enzimas y proteasas, cuyo principal objetivo es transformar este péptido en fragmentos solubles más pequeños carentes de efectos neurotóxicos. Las proteasas que intervienen en este proceso son la catepsina B, catepsina D, gelatinasa A, factor XIa serina proteasa (FXIa), metaloproteinasa-9 de la matriz (MMP-9), neprilisina (NEP), proteasa presecuencia (PreP) y el complejo  $\alpha$ 2-macroglobulina. Entre las enzimas, se engloban la enzima convertidora de angiotensina (ACE), la enzima convertidora de endotelina (ECE), la enzima de degradación de insulina (IDE), el activador tisular del plasminógeno (tPA) y el activador tisular del plasminógeno tipo uroquinasa (uPT) (Mueller-Steiner et al. 2006; De Strooper 2010; Sun et al. 2015; Andreeva et al. 2017).

Por otro lado, el A $\beta$  también puede ser eliminado al ser dirigido a la circulación periférica a través de la barrera hematoencefálica, el drenaje perivascular o el sistema glinfático, o al ser fagocitado por determinados tipos celulares, como las células gliales, y sometido a los sistemas de degradación intracelulares (autofagia, degradación endosomal/lisosomal y sistema ubiquitina-proteasoma) (Zuroff et al. 2017).

### 1.2.5. Agregación del péptido $\beta$ -amiloide: tipos de depósitos extracelulares

El péptido  $\beta$ -amiloide (especialmente los monómeros de A $\beta$ 1-42) tiene tendencia a agregarse extracelularmente. Esta agregación de los monómeros A $\beta$  solubles ocurre de forma secuencial en dímeros, trímeros, oligómeros, protofibrillas y fibrillas insolubles con estructura de lámina  $\beta$ -plegada antiparalela, constituyendo las placas de amiloide o seniles (Takahashi et al. 2017). (Fig. 1.5)

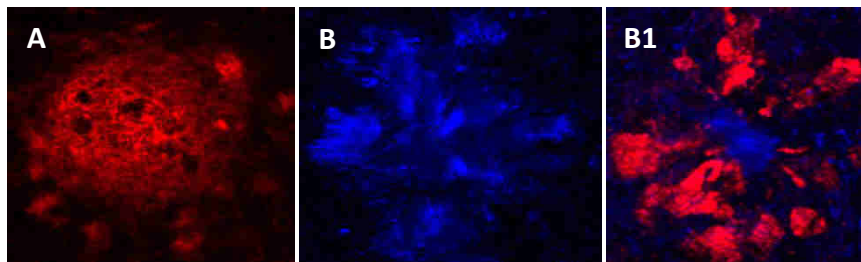


**Figura 1.5. Agregación de monómeros de A $\beta$ .** Los monómeros de A $\beta$  (especialmente A $\beta$ 42) pueden agregarse formando dímeros, trímeros (agregados tempranos), protofibrillas y fibrillas (insolubles) que formarán las placas seniles. (Tomado de Graham et al. 2017).

#### 1.2.5.1. Tipos de depósitos extracelulares de A $\beta$ .

Podemos encontrar varios tipos de placas amiloides o seniles (ver revisiones Selkoe 2001; Perl 2010):

- **Placas neuríticas:** depósitos extracelulares de A $\beta$  de aspecto filamentoso formadas por las isoformas A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42, siendo esta última el componente mayoritario (Dickson 1997). Estas placas suelen aparecer íntimamente asociadas tanto a neuritas distróficas como a células gliales (microglía y astrogía) activadas (Duyckaerts et al. 2009; Bouvier et al. 2016). Las placas neuríticas se subdividen a su vez en *placas primitivas*, de forma esférica y sin núcleo compacto (suelen aparecer en las zonas cercanas a los axones y a las sinapsis) y *placas clásicas*, caracterizadas por un núcleo amiloide denso, redondo y compacto (se suelen asociar a los vasos sanguíneos) (Fig. 1.6).



**Figura 1.6. Tipos de placas seniles.** Las placas neuríticas (B) son de aspecto filamentoso, mientras las placas difusas (A), no fibrilares, tienen un núcleo compacto. Las placas neuríticas se caracterizan por aparecer íntimamente asociadas a neuritas distróficas (B1, rojo). Inmunofluorescencia simple para 6E10 (A) y para 4G8 (B); inmunofluorescencia doble (B1) para 4G8 (azul) y APP (rojo). Imágenes tomadas en nuestro laboratorio.

- **Placas difusas:** depósitos extracelulares no fibrilares (no congofílicos). No presentan una forma clara, por lo que su estructura es amorfa o difusa y no presentan un núcleo compacto. Asociadas a este tipo de placas apenas encontramos células microgliales, astrocitos o neuritas distróficas. Su composición principal es A $\beta$ <sub>42</sub>, presentando escasa o nula cantidad de A $\beta$ <sub>40</sub> (Perl 2010).

### 1.2.5.2. Formas oligoméricas de A $\beta$

A pesar de que históricamente la enfermedad de Alzheimer se ha caracterizado por la acumulación de depósitos extracelulares de A $\beta$  (ver Apdo. 1.2.5.1) y esto se ha relacionado con la gran mayoría de lesiones tisulares que aparecen durante el progreso de la enfermedad, las formas fibrilares insolubles de A $\beta$  no son las únicas causantes de los daños producidos durante la EA. Se ha descrito la existencia de diferentes formas solubles de A $\beta$  oligomérico, con capacidad de difundir por el parénquima cerebral y provocar un efecto tóxico a nivel sináptico y neuronal (Haass and Selkoe 2007; Viola and Klein 2015).

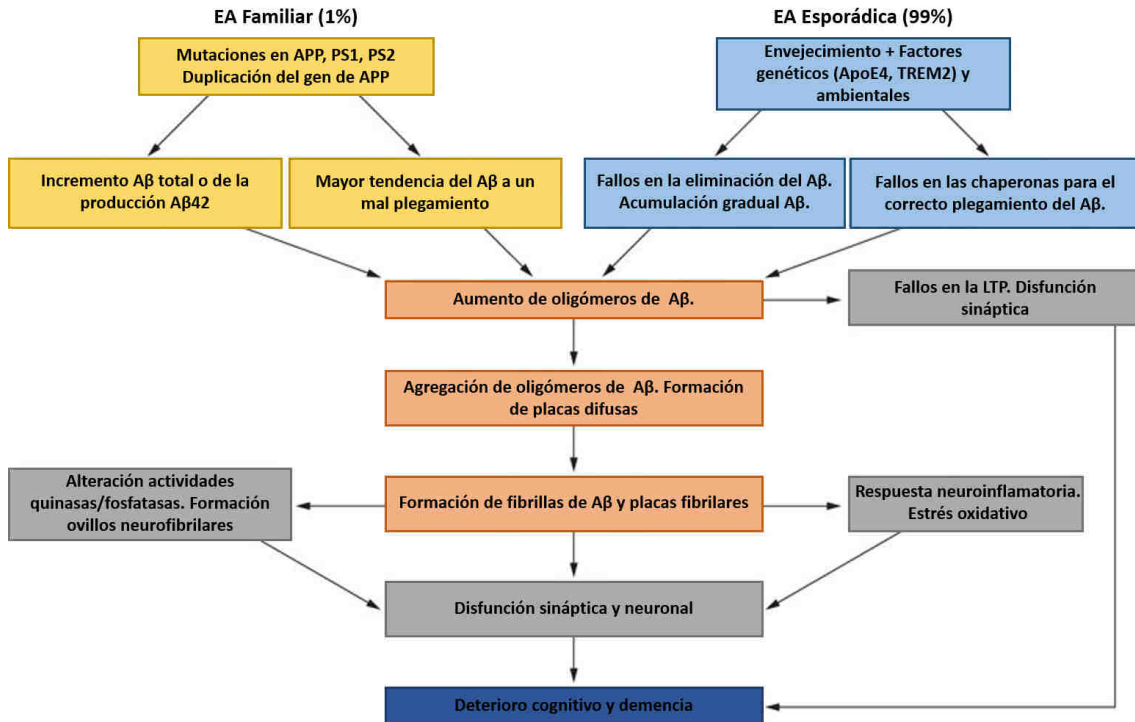
Existen numerosas formas intermediarias de péptido  $\beta$ -amiloide oligomérico soluble, empezando por los dímeros (de aproximadamente 8 KDa) y continuando con los paranúcleos, los globulómeros, las estructuras anulares, los ligandos difusibles derivados del A $\beta$  (ADDLs) y las protofibrillas (PFs) (Sakono and Zako 2010). Éstas últimas superarían los límites de solubilidad y se depositarían en forma de fibras amiloides. Los ADDLs, que son hexámeros, octámeros y dodecámeros (Lambert et al. 1998), se han identificado en muestras *post mortem* de pacientes de Alzheimer, y sus niveles se correlacionan bien con los fallos cognitivos. Estas formas oligoméricas solubles de Abeta pueden inhibir el mantenimiento de la LTP en el hipocampo e interferir en la señalización de los receptores NMDA o AMPA en la membrana sináptica provocando la internalización de estos receptores mediante endocitosis (Haass and Selkoe 2007; Viola and Klein 2015). Además, pueden inducir cambios en la membrana neuronal y glial, conllevando a la alteración de las vías de señalización, perturbación de la homeostasis del calcio, producción de especies reactivas de oxígeno, provocar cascadas inflamatorias y disfunción mitocondrial.

### 1.2.6. Hipótesis clásica de la cascada amiloide.

La hipótesis causativa más aceptada actualmente de la enfermedad de Alzheimer es la teoría de la cascada amiloide (Hardy and Allsop 1991; Hardy and Higgins 1992; Selkoe and Hardy 2016), en la cual se considera a la agregación y acumulación de A $\beta$  (tanto por su sobreproducción en las formas familiares de la enfermedad, como por alteraciones en las vías de eliminación en las formas esporádicas) como el evento inicial desencadenante de la patología, provocando la formación de los ovillos neurofibrilares, la pérdida sináptica y la muerte neuronal, dando paso finalmente a la demencia (Fig. 1.7).

La patogénesis comienza con el aumento de los niveles de A $\beta$  (por un aumento de su producción o por una disminución en su eliminación), principalmente su isoforma A $\beta$ 42 que tiende a agregarse en forma de oligómeros provocando alteraciones en la función sináptica y la formación de neuritas distróficas. El aumento de A $\beta$  provoca también la aparición de una respuesta neuroinflamatoria, mediada por células astrogliales y microgliales. Con el tiempo se genera estrés oxidativo, que finalmente afecta a la homeostasis neuronal (Galea et al. 2012). A continuación, todos estos cambios neuronales afectan al transporte axonal y se altera la

actividad de las quinasas, provocando la hiperfosforilación de la proteína Tau, su agregación y acumulación posterior formando los NFTs. Finalmente, todos estos cambios dan lugar a una muerte neuronal masiva que se manifiesta mediante un estado progresivo de demencia (Haass and Selkoe 2007).



**Figura 1.7. Hipótesis de la cascada amiloide.** La acumulación de péptido  $\beta$ -amiloide se sitúa en lo alto de la pirámide de esta progresión de eventos patológicos conocidos como la cascada amiloide. De esta manera, la deposición de A $\beta$  provocaría la formación de NFTs, la muerte celular y la demencia. Todo ello aparece acompañado de una intensa respuesta neuroinflamatoria mediada por células gliales (astroglía y microglía). Modificado de Blenow et al 2010.

Esta hipótesis ha sido ampliamente discutida en los últimos años por diversos autores (Herrup 2015; Karran and De Strooper 2016). Por un lado, se ve apoyada por el hecho de que las mutaciones implicadas en las formas familiares de la enfermedad se localizan en genes relacionados con las proteínas APP y presenilinas, dando lugar a un aumento en la producción de A $\beta$ <sub>42</sub>. Además, las personas con síndrome de Down presentan placas amiloides desde edades tempranas debido a la trisomía del cromosoma 21, en el cual se localiza el gen del APP (Selkoe 2001; Rovelet-Lecrux et al. 2006). Sin embargo en contra de la hipótesis de la cascada amiloide existen también diferentes evidencias como la existencia de animales transgénicos para APP en los que no se desarrollan los eventos típicos de la cascada amiloide (Herrup 2015), la aparición de placas y ovillos en regiones y tiempos diferentes y diversos estudios en los que la carga amiloide y el daño cognitivo no muestran correlación (Herrup 2015; Karran and De Strooper 2016). Por todo ello, se ha propuesto un mecanismo mediante el cual las placas fibrilares podrían actuar de manera dinámica liberando formas oligoméricas tóxicas al medio que las rodea, reconciliando así la hipótesis clásica con la oligomérica (Hardy and Selkoe 2002;

Walsh and Selkoe 2007). Otra de las principales razones por la que ha sido cuestionada esta hipótesis son los continuos fracasos obtenidos hasta la fecha en su traslación hacia una terapia efectiva.

A pesar de las evidencias en contra de la hipótesis de la cascada amiloide, ésta sigue siendo todavía la hipótesis más ampliamente aceptada. Sin embargo, existen otras muchas hipótesis acerca de la enfermedad de Alzheimer (ver revisión Karran y De Strooper 2016): la hipótesis de la cascada mitocondrial, la hipótesis metabólica, la hipótesis de la neurodegeneración del citoesqueleto neuronal y la hipótesis inflamatoria, entre otras.

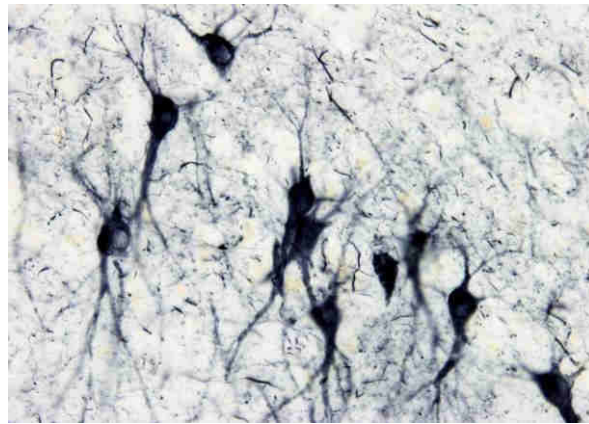
# 1.3

## TAU Y PATOLOGÍA NEUROFIBRILAR

La proteína Tau es un fosfolipopéptido, encargado fundamentalmente de la estabilización de los microtúbulos (MTs) del citoesqueleto, así como de favorecer su polimerización. Es por ello que la proteína Tau tiene una función crítica para la supervivencia celular ya que participa activamente en el mantenimiento de la estructura celular interna. La proteína Tau está codificada por el gen *MAPT*, localizado en el cromosoma 17, que puede dar lugar hasta 6 isoformas diferentes mediante *splicing* alternativo (Morishima-Kawashima and Ihara 2002; Duyckaerts et al. 2009; Iqbal et al. 2015; Holtzman et al. 2016).

En el cerebro de pacientes con la EA, la proteína Tau se encuentra hiperfosforilada anormalmente, lo que produce su disociación de los microtúbulos y su agregación formando los filamentos pareados helicoidales (PHFs). Éstos se manifiestan como ovillos neurofibrilares (NFTs) en el soma neuronal, como hilos neuropílicos (*neuropil threads*) en neuritas, y como neuritas distróficas rodeando el núcleo de  $\beta$ -amiloide de las placas neuríticas (Grundke-Iqbal et al. 1987). Esta desorganización de los microtúbulos del citoesqueleto genera alteraciones en el transporte axonal y ocasiona fallos en todos los procesos dependientes de este tipo de transporte, dando lugar a la pérdida de sinapsis, generación de neuritas distróficas y en última instancia a la muerte neuronal (Morishima-Kawashima and Ihara 2002; Iqbal and Grundke-Iqbal 2008; Duyckaerts et al. 2009; Wang et al. 2013).

Los ovillos neurofibrilares son una de las dos principales marcas histopatológicas de la EA, y su densidad se correlaciona directamente con la severidad de la enfermedad y la demencia (Iqbal et al. 2015).



**Figura 1.8. Ovillos neurofibrilares intracelulares.** Presencia de ovillos neurofibrilares en el interior de neuronas de la región CA2 de muestras *post mortem* de pacientes de Alzheimer. Inmunomarcaje para fosfo-tau. Imagen tomada en nuestro laboratorio.

# 1.4

## PATOLOGÍA NEURÍTICA, PÉRDIDA NEURONAL Y SINÁPTICA

### 1.4.1. Patología neurítica

La presencia de neuritas distróficas asociadas a las placas seniles es una característica distintiva en el cerebro de pacientes de Alzheimer (Masliah et al. 1991; Dickson et al. 1999; Bell y Hardingham 2011). Las neuritas distróficas son prolongaciones neuronales engrosadas como consecuencia de alteraciones del citoesqueleto y fallos en el transporte que ocasionan la acumulación de numerosas vesículas en su interior, la mayoría de naturaleza autofágica (Nixon and Yang 2011; Sanchez-Varo et al. 2012; Torres et al. 2012). La presencia de neurofilamentos y marcadores sinápticos, junto con la ausencia de marcadores dendríticos como MAP2, y con el hecho de que en ocasiones se detectan a nivel ultraestructural haciendo contacto sináptico, sugiere que las neuritas distróficas tienen un origen axonal o sináptico (Sanchez-Varo et al. 2012). En estas estructuras patológicas se acumula APP, además de las enzimas proteolíticas como BACE1 y  $\gamma$ -secretasa, siendo por tanto sitios de generación de Abeta (Kandalepas et al. 2013; Sadleir et al. 2016).

Al igual que en los enfermos de Alzheimer, las neuritas distróficas también se observan en un gran número de modelos animales para la EA, incluyendo los animales APP/PS1 empleados en este trabajo. Esto supone una gran ventaja ya que nos permite estudiar tanto la naturaleza de estas alteraciones como su relación con el resto de lesiones histopatológicas características de la enfermedad (Blanchard et al. 2003; Ramos et al. 2006; Moreno-Gonzalez et al. 2009; Baglietto-Vargas et al. 2010; Sanchez-Varo et al. 2012; Torres et al. 2012; Trujillo-Estrada et al. 2014).

#### 1.4.2. Pérdida neuronal y sináptica

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por una extensa pérdida neuronal y sináptica (Forner et al. 2017), que tiene lugar, entre otras, en regiones altamente vulnerables relacionadas con funciones de aprendizaje y memoria, dando lugar al declive cognitivo que caracteriza el curso de esta enfermedad (Duyckaerts et al. 2009). La pérdida neuronal afecta de manera fundamental a la región CA1 del hipocampo y a la capa II de la corteza entorrinal (Gómez-Isla et al. 1996; Price et al. 2001), aunque otras regiones como el bulbo olfatorio (ter Laak et al. 1994), la amígdala (Vereecken et al. 1994), el núcleo basal de Meynert (Vogels et al. 1990) y la parte medial de la sustancia negra se ven también afectadas (ver revisiones Heneka y O'Banion 2007; Duyckaerts et al. 2009; Castellani et al. 2010). Igualmente, se ha descrito una pérdida de un 25-35% de sinapsis y proteínas asociadas en la corteza entorrinal e hipocampo en pacientes en fase intermedia o moderada de la enfermedad (Gómez-Isla et al. 1996; Price et al. 2001). Las causas de la muerte neuronal selectiva son todavía desconocidas, aunque parece que la generación de especies reactivas de oxígeno, la excesiva activación de receptores de glutamato o el aumento en la concentración citoplasmática del calcio pueden tener un papel importante.

Al contrario de lo que ocurre con las neuritas distróficas, la pérdida neuronal y sináptica no se manifiesta ampliamente en los modelos animales para la EA, siendo éste el principal factor limitante a la hora de elegir un modelo animal adecuado. Sin embargo, en el modelo murino APP/PS1, empleado en el presente trabajo de Tesis Doctoral, sí se ha descrito una reducción selectiva en diferentes tipos de interneuronas GABAérgicas en el hipocampo y de neuronas principales en la corteza entorrinal, por lo que este modelo presenta una muerte neuronal bastante extensa (Ramos et al. 2006; Moreno-Gonzalez et al. 2009; Baglietto-Vargas et al. 2010; Trujillo-Estrada et al. 2014).



## 1.5

ACTIVACIÓN GLIAL Y RESPUESTA  
NEUROINFLAMATORIA

La hipótesis de la cascada amiloide de la enfermedad de Alzheimer se ha visto cuestionada tras los continuos fracasos terapéuticos basados en la eliminación del Abeta, siendo superada en los últimos años por una hipótesis alternativa multifactorial en la que la glía (microglía y astrogía) activada y la reacción neuroinflamatoria asociada desempeñarían un papel fundamental en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (Heneka et al. 2015; Heppner et al. 2015; Guillot-Sestier et al. 2015; Calsolaro and Edison 2016). La identificación de polimorfismos asociados al Alzheimer esporádico en genes asociados con la respuesta inmune innata cerebral (TREM2, CD33, HLA-DRB1, etc; ver Tabla 1.1) avalan un papel predominante de la neuroinflamación en la patogénesis del Alzheimer.

La inflamación es un proceso normal en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, e implica una activa participación del sistema inmune innato del SNC formado principalmente por las células de la microglía y la astrogía (Labzin et al. 2017). Se ha observado que la activación del sistema inmune y, con ello del proceso inflamatorio, contribuye a la exacerbación y progresión de la enfermedad; sin embargo, no se excluye la posibilidad de que las acciones inmunes puedan, al menos en parte, desempeñar un papel decisivo en el inicio de la enfermedad de Alzheimer. De hecho, se ha llegado a proponer la denominada hipótesis de la desregulación de las células gliales según la cual, cambios y alteración de la activación y regulación microglial resultaría en estrés oxidativo, neuroinflamación persistente y disfunción neuronal, lo que favorecería la producción y agregación de A $\beta$  (von Bernhardi et al. 2015). Otros estudios, sin embargo, sugieren que la activación de la microglía y los astrocitos es secundaria a la acumulación de A $\beta$ . Así pues, a través de la interacción entre el A $\beta$  y las células gliales se desencadenaría la cascada del proceso inflamatorio (Guerriero et al. 2016; Minter et al. 2016).

Aunque el péptido A $\beta$  por sí solo es suficiente para inducir una respuesta inflamatoria, es posible que haya otros estímulos causantes de la inflamación que pueden ser tanto intrínsecos al SNC (por ejemplo, daño cerebral traumático) como extrínsecos (inflamación sistémica, obesidad, diabetes mellitus tipo II) (Heneka et al. 2015). De hecho, se ha observado una posible relación entre el deterioro cognitivo, la circulación de citoquinas pro-inflamatorias y la infección por patógenos como virus y bacterias en pacientes con Alzheimer. Por tanto, la presencia de microorganismos podría exacerbar, en individuos especialmente vulnerables, el curso de la neuroinflamación e incluso se podría llegar a ser la causa directa de la demencia (McManus and Heneka 2017).



Los datos actuales indican que en el proceso neuroinflamatorio participan distintos tipos celulares del SNC como microglía, astrocitos, neuronas y células endoteliales, y también células del sistema inmune adaptativo. También están implicadas una gran cantidad de mediadores moleculares, como citoquinas (pro y antiinflamatorias), quimioquinas, caspasas, factores del complemento y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (González et al. 2014; Dá Mesquita et al. 2016). Aunque las células microgliales se consideran las principales mediadoras de la inflamación, la comunicación e interacción entre éstas y el resto de células presentes en el parénquima nervioso, es absolutamente necesario para el desarrollo de la inmunidad en este tejido. Así, los astrocitos participan de manera sinérgica con las células microgliales en el proceso inflamatorio.

### 1.5.1. Microglía

El SNC se caracteriza por un sistema inmune endógeno liderado por células inmunocompetentes propias conocidas como células microgliales o microglía. Este tipo celular constituye aproximadamente un 10% del total de las células del sistema nervioso, actuando fundamentalmente como soporte y protección neuronal (Masuda and Prinz 2016). Debido a su naturaleza fagocítica, las células microgliales son las encargadas de llevar a cabo funciones tales como la eliminación de patógenos, restos neuronales (procedentes de procesos de muerte neuronal) y agregados proteicos, además del mantenimiento de los circuitos neuronales mediante la remodelación de las sinapsis (Hong et al. 2016). Las células microgliales participan a distintos niveles de la respuesta inmune mediante la secreción de factores solubles como quimioquinas, citoquinas proinflamatorias o factores neurotróficos (ver revisión Colonna y Butovsky 2017). Durante el envejecimiento y la progresión de la enfermedad de Alzheimer, la microglía sufre una disfuncionalidad e hiperreactividad, mostrando cambios morfológicos y moleculares. Además, las células microgliales adquieren una mayor capacidad de proliferación, y se observa la presencia de microglía en un estado distrófico, que se caracteriza por la disminución del número de prolongaciones y el acortamiento y fragmentación de las mismas (Baron et al. 2014; Mosher and Wyss-Coray 2014; Streit et al. 2014; Colonna and Butovsky 2017; Salter and Stevens 2017). En condiciones fisiológicas, la microglía está implicada numerosas funciones, incluyendo la remodelación y plasticidad sináptica (Wu et al. 2015), la neurogénesis adulta mediando la supervivencia, proliferación y/o diferenciación neuronal, así como con la inducción de la muerte celular programada y la fagocitosis de células muertas (Schafer and Stevens 2015). Además, la microglía también parece proteger frente al efecto tóxico del glutamato sobre las neuronas, conocido como excitotoxicidad.

Sin embargo, es ante un determinado daño neurológico cuando se hace patente la participación activa de estas células microgliales a fin de solucionar el problema acontecido. Las respuestas que se ponen en marcha ante el daño son variadas y complejas. Inicialmente, estas respuestas van encaminadas a revertir el daño ocasionado y reestablecer la homeostasis

tisular, estando implicados tanto la microglía como los astrocitos. Estas células, gracias a sus funciones inmunes y llevando a cabo una inflamación controlada y rápida (inflamación aguda), recuperan las condiciones normales y fisiológicas en el parénquima nervioso. Sin embargo, la presencia continuada del agente desencadenante de esta respuesta inmunológica (ej., proteínas tóxicas que se acumulan en las enfermedades neurodegenerativas) puede conducir a un estado inflamatorio crónico, con una sobreactivación microglial y astrocitaria que lleva a la producción y liberación de cantidades excesivas de citoquinas proinflamatorias y de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, entre otras sustancias (Sochocka et al. 2016). Esto a su vez provoca la desregulación de los procesos y mecanismos destinados a eliminar el daño causado y, por tanto, se acaba creando un ambiente en el que el estrés oxidativo, la muerte celular, la infiltración de leucocitos a través de la barrera hematoencefálica alterada (Schwartz and Deczkowska 2016) y la degeneración tisular, se van agravando de manera proporcional al tiempo de permanencia del factor responsable de la respuesta, así como a la intensidad de la misma.

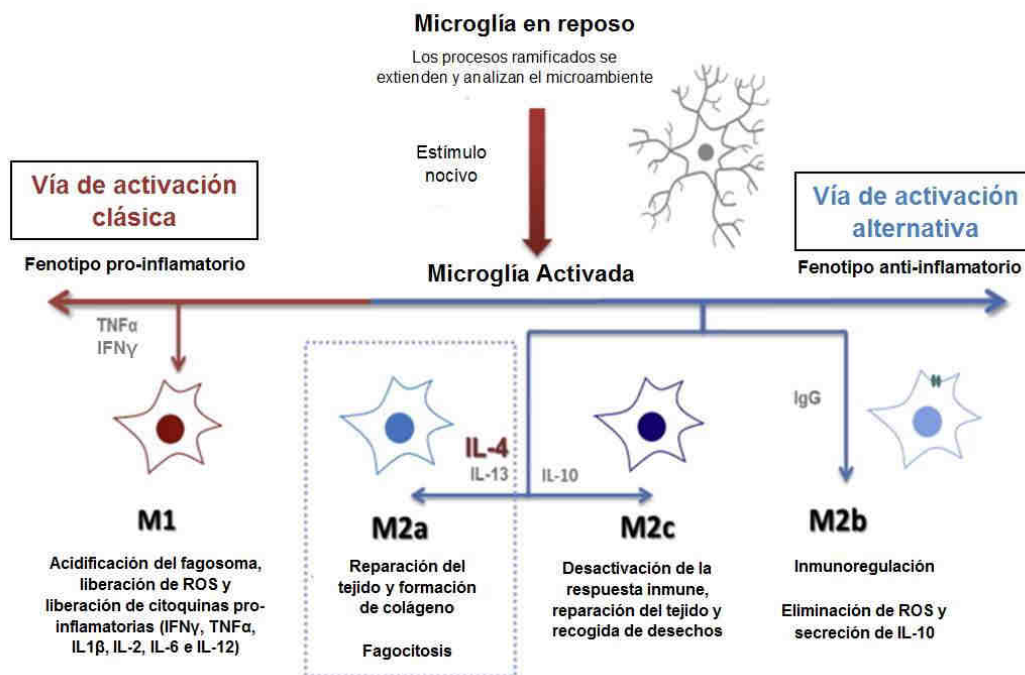
Las células microgliales reaccionan y responden de forma diferente a los distintos estímulos, presentando en cada situación fenotipos morfológicos y funcionales característicos (Cai et al. 2014; Mosher and Wyss-Coray 2014; Li et al. 2014; Heneka et al. 2015). Así, se puede clasificar a la microglía en dos estados principales: un estado no activado, en el cual las células muestran, por lo general, un cuerpo celular compacto y de pequeño tamaño, pero con abundantes prolongaciones ramificadas, y otro estado, activado, en el que las células suelen tener cuerpos celulares de mayor tamaño (hipertrofia) y una menor cantidad de prolongaciones, aunque más engrosadas. Parece ser que son las condiciones fisiológicas del sistema nervioso lo que determina la presencia de uno u otro estado (du et al. 2016). En condiciones normales, las células microgliales suelen adoptar un estado no activado, de vigilancia, en el que desempeñan funciones homeostáticas en el tejido nervioso; mientras que, ante un daño o situación patológica, la microglía pasa al estado activado, a fin de combatir el daño producido y recuperar la homeostasis tisular. Dentro de este estado activado, la microglía puede adoptar dos fenotipos extremos, funcionalmente opuestos: uno proinflamatorio y otro de regulación inmunológica, denominados por similitud con la clasificación de los macrófagos periféricos fenotipo clásico (M1) y fenotipo alternativo (M2), respectivamente (Colonna and Butovsky 2017), aunque esta visión está siendo actualmente revisada (Ransohoff 2016; Masgrau et al. 2017).

Estas funciones diferenciales y distintivas radican en los marcadores de superficie que muestran las células, así como en la secreción de factores solubles, siendo crucial para ello la expresión y/o silenciamiento de determinados genes, como LCN2, TREM2, y JMJD3, entre muchos otros (Jha et al. 2016). El fenotipo microglial M1 produce gran cantidad de ROS, óxido nítrico (NO) y numerosas citoquinas proinflamatorias como IFN $\gamma$ , IL-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18 o TNF $\alpha$ . Tienen una mayor expresión de MHCII y CD86 e intervienen en la presentación de antígenos asociada a las células de tipo Th1. El fenotipo M2 es antiinflamatorio, y tiene

funciones neuroprotectoras y neuroreparadoras. Para ello, inhiben la producción de  $\text{IFN}\gamma$  y producen tanto moléculas antiinflamatorias como diversos factores de crecimiento (IL-4, IL-5, IL-10 o  $\text{TGF-}\beta$ ). Dentro de este segundo estado activado, podemos encontrar tres subclases (M2a, b y c) que, aunque presentan características bioquímicas similares, tienen funciones y mecanismos de activación ligeramente distintos (Franco and Fernández-Suárez 2015; du et al. 2016).

Así pues, la polarización hacia el estado M1 tiene como finalidad producir moléculas proinflamatorias y radicales libres que lleven a cabo la estimulación del sistema inmune, siendo así las células que actúan en la primera línea de defensa. Pero, una vez que el daño ha desaparecido, es necesario el cese de la inflamación, y en esto es donde entra en juego la microglía en el estado M2, la cual produce factores neurotróficos y protectores, así como citoquinas antiinflamatorias, favoreciendo así la inmunosupresión que permite la regeneración tisular y el regreso a la homeostasis (Tang and Le 2016).

Además de estos fenotipos microgliales activados y no activados, podemos encontrar células microgliales que se encuentran disfuncionales y deterioradas, como consecuencia del envejecimiento (microglía senescente), que no son capaces de llevar a cabo correctamente sus funciones (Streit and Xue 2009).



**Figura 1.9. Fenotipos de activación microglial.** Se muestran los diferentes estadios de activación microglial y la función de cada uno de ellos. Mientras que los macrófagos de tipo M1 corresponden con un fenotipo de activación clásica o pro-inflamatoria, los de tipo M2 muestran un fenotipo alternativo antiinflamatorio. Estos macrófagos M2 se dividen a su vez en 3 subtipos: M2a, M2b y M2c.  $\text{IgG}$ : Inmunoglobulina G, IL: Interleuquina,  $\text{TNF}\alpha$ : Factor de necrosis tumoral,  $\text{IFN}\gamma$ : interferón-gamma, ROS: Especies reactivas de oxígeno. Modificado de Latta et al. 2014.

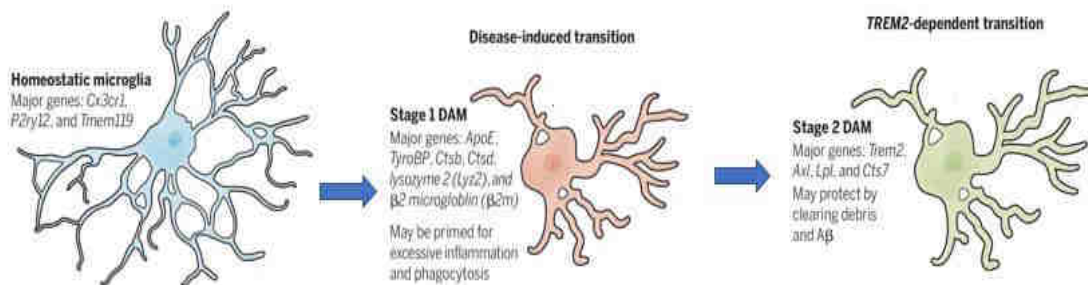
En la enfermedad de Alzheimer se ha relacionado la deposición de A $\beta$  con el inicio del proceso inflamatorio, de manera que las zonas en las que mayor cantidad de A $\beta$  se deposita, como el hipocampo, el subículo y la corteza entorrinal, son las que muestran mayor activación microglial. En este sentido, ha sido descrita la capacidad del péptido  $\beta$ -amiloide de atraer a las células microgliales (con alta capacidad migratoria), fomentando su activación en torno a las placas seniles y provocando que éstas se encuentren rodeadas por prolongaciones microgliales (Malm et al. 2005; Meyer-Luehmann et al. 2008). Así, la microglía podría constituir una barrera física frente a la toxicidad de la placa, promoviendo su compactación y aislamiento, evitando su expansión (Yuan et al. 2016). Además de actuar de barrera celular, la microglía reactiva podría participar en la fagocitosis de péptido amiloide oligomérico en un intento de aliviar la carga amiloide de las placas (Serrano-Pozo et al. 2013).

Estudios genéticos, realizados en miles de pacientes (GWAS), han demostrado una clara asociación entre la incidencia de la enfermedad de Alzheimer de tipo esporádico y genes directamente implicados en la respuesta inmune innata (TREM2, CD33, CR1, CLU, ABCA7, HLA, MS4A and EPHA1) (Korvatska et al. 2015; Colonna and Wang 2016; Villegas-Llerena et al. 2016; Huang et al. 2017; Sims et al. 2017), muchos de ellos altamente expresados por la microglía. De entre ellos, es de destacar que la mutación en el gen que codifica para el receptor de disparo expresado en células mieloides 2 (TREM2, del inglés "*Triggering receptor expressed in myeloid cells 2*") confiere un riesgo similar al de APOE4 para desarrollar Alzheimer. TREM2 es una glucoproteína de membrana perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas, y su señalización depende de la asociación e interacción con una proteína adaptadora, DAP12 o TYROBP (Colonna and Wang 2016). TREM2 está implicado en la promoción de la supervivencia, proliferación y activación microglial. Además, presenta un papel importante en la fagocitosis de neuronas dañadas (Yeh et al. 2017). Tanto TREM2, como CD33, están implicados en la activación y/o internalización microglial del Abeta (Bradshaw et al. 2013; Cruchaga et al. 2013; Griciuc et al. 2013; Hickman and El Khoury 2014; Yeh et al. 2017), por lo que su alteración podría suponer una disminución en la capacidad de fagocitosis de este péptido. Sin embargo, el papel que desempeña la activación microglial en el desarrollo de la patología no es conocido. En modelos transgénicos APP con deficiencia de TREM2 se inhibe la activación microglial produciéndose un aumento de la patología amiloide (placas y distrofias axonales) así como apoptosis microglial (Yuan et al. 2016). En consecuencia, deficiencias en la función microglial y/o su degeneración se postulan como mecanismo clave para desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

Clásicamente, la respuesta microglial se ha asociado al proceso neurodegenerativo observado en la patología del Alzheimer. Esta asociación se basa en la capacidad de las células microgliales de activarse, en presencia de cualquier daño o alteración cerebral, y producir cantidades elevadas de citoquinas proinflamatorias citotóxicas. Esta visión citotóxica de la activación microglial deriva de los estudios en modelos animales transgénicos que

sobreexpresan APP y en consecuencia acumulan Abeta. La microglía activada en los modelos se concentra alrededor de las placas amiloides. Los marcadores microgliales son muy diversos y su expresión se modifica según el estado de activación de las células. Además, diferenciar la microglía según su morfología o fenotipo molecular del resto de poblaciones de células mieloides es muy complicado debido al origen común (Herz et al. 2017), por lo que la mayoría de marcadores rutinariamente empleados en el estudio de la respuesta inflamatoria son expresados tanto por células microgliales como por monocitos/macrófagos periféricos. Sin embargo, recientemente los estudios transcriptómicos han identificado determinados genes que son expresados y regulados por las diferentes poblaciones mieloides (Hickman et al. 2013; Butovsky et al. 2014; Greter et al. 2015). En relación a este punto tan controvertido, nuestro grupo ha descrito mediante inmunohistoquímica que la microglía asociada a las placas presenta un perfil molecular Iba1+/CD45+/CD68+/P2ry12-, a diferencia de la microglía no activada interplaca que puede ser identificada por su perfil Iba1+/CD45-/CD68-/P2ry12+ (Sanchez-Mejias 2015; Sanchez-Mejias et al. 2016).

Recientemente, se ha definido el perfil molecular, mediante técnicas transcriptómicas, de la microglía activada que rodea las placas en modelos APP (Keren-shaul et al. 2017; Brown and George-Hyslop St 2017). Esta microglía ‘DAM’ muestra activación de genes asociados con el riesgo de desarrollar AD (TREM2, ApoE, Tyrobp) y con rutas como lisosoma/fagocitosis y respuesta inmune y endocitosis. El cambio de fenotipo microglial homeostático a neurodegenerativo esta mediado por la señalización TREM2-APOE (Krasemann et al. 2017).



**Figura 1.10.** El perfil génico de la microglía permite diferenciar los distintos estados que adquiere durante la progresión de la enfermedad. Modificado de Brown and George-Hyslop 2017.

Con el avance de la patología, en los modelos animales amiloidogénicos la activación microglial deja de estar restringida a las placas y se expande por todo el parénquima nervioso (con producción de TNFalfa, IL-1beta y otras citoquinas proinflamatorias), debido al aumento de oligómeros solubles de Aβ (Jimenez et al. 2008, 2011). Sin embargo, los estudios recientes de nuestro grupo en muestras humanas *post mortem* de pacientes han identificado un proceso de degeneración microglial en el hipocampo, con patrón regional definido siendo el giro dentado la zona más afectada, seguida por CA3 y CA1 (Sanchez-Mejias et al. 2016). Esta degeneración microglial está inducida por la acumulación de formas tóxicas de tau (fosfo-tau),

ausente en los modelos amiloidogénicos. Estos resultados contradictorios entre modelos amiloidogénicos y pacientes explicarían el escaso éxito en la traslación de resultados a la clínica humana, y ponen de manifiesto la necesidad de reproducir la desregulación del sistema inmune innato en los modelos animales para que recapitulen la patología de pacientes.

### 1.5.2. Astroglía

Los astrocitos, considerados como el tipo celular glial más abundante del SNC, participan junto con la microglía en la respuesta neuroinflamatoria. Estas células se caracterizan por la expresión de la proteína glial fibrilar ácida (GFAP), vimentina y nestina. Entre sus funciones principales (ver Sofroniew and Vinters 2010; Clarke and Barres 2013; Liddelow and Barres 2017) se encuentra el mantenimiento de la homeostasis neuronal, suministrando a las neuronas de antioxidantes, factores tróficos y otros elementos fundamentales para su soporte metabólico. Igualmente, mantienen el equilibrio hidro-salino del parénquima cerebral y retiran el exceso de iones de potasio y neurotransmisores resultantes de la actividad neuronal. Los astrocitos participan también activamente en el desarrollo y mantenimiento de las sinapsis. Además, este tipo celular participa en la formación y mantenimiento de barrera hematoencefálica, ya que se encuentra rodeando los vasos sanguíneos en el cerebro (Sofroniew and Vinters 2010; Medeiros and LaFerla 2013; Verkhratsky et al. 2014; Heppner et al. 2015; Haim and Rowitch 2017). Cuando se produce algún tipo de lesión, la astrogliá participa en la recuperación del daño mediante el aislamiento del tejido dañado y coopera con las células microgliales para la total recuperación del tejido nervioso.

Tradicionalmente, las células astrogliales se han clasificado en dos tipos principales: astrocitos protoplasmáticos, característicos de la sustancia gris y astrocitos fibrosos, típicos de la sustancia blanca. Sin embargo, y aunque en el pasado los astrocitos han sido considerados una población celular bastante homogénea, varios trabajos en los últimos años han mostrado la existencia de una gran heterogeneidad de esta población, sugiriendo la existencia de hasta 5 tipos de astrocitos diferentes en función de su morfología, su localización cerebral y su expresión proteica (ver revisión Haim y Rowitch 2017).

En los cerebros de pacientes de Alzheimer, los astrocitos, al igual que la microglía, experimentan cambios morfológicos y funcionales relacionados con distintos procesos de activación (y/o degeneración). Esta activación astrogliá, que se manifiesta por un incremento en la expresión de GFAP, puede observarse desde los primeros estadios de la enfermedad y progresa significativamente a medida que lo hace la patología amiloidea y de tau (Verkhratsky et al. 2010; Carter et al. 2012; Rodríguez-Arellano et al. 2016; Garwood et al. 2016). Estos astrocitos reactivos, que se concentran en las regiones con acumulación de placas amiloides, podrían secretar moléculas proinflamatorias y especies reactivas como el óxido nítrico, dando lugar a efectos citotóxicos (Heneka et al. 2005; Farina et al. 2007; Medeiros and LaFerla 2013;



Rodríguez-Arellano et al. 2016; Haim and Rowitch 2017). La localización de los astrocitos alrededor de las placas amiloides sugiere que los depósitos de A $\beta$  desencadenan la activación astrogliar, y esto podría conducir a la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$ , ya se ha observado que, tras la inyección de oligómeros A $\beta$ , hay una marcada activación astrogliar caracterizada por la activación transcripcional de NF- $\kappa$ B (Carrero et al. 2012; Medeiros and LaFerla 2013; Morales et al. 2014).

Por otro lado, los astrocitos que rodean las placas amiloides podrían tener un papel protector, aislando el amiloide o incluso participando en su eliminación mediante fagocitosis (Xiao et al. 2014; Garwood et al. 2016), ya que se ha demostrado que los astrocitos expresan receptores y vías de señalización implicadas en fagocitosis (Cahoy et al. 2008) y se ha encontrado péptido  $\beta$ -amiloide en el interior de estas células gliales, determinando su capacidad fagocítica tanto *in vitro* como *in vivo* (Nagele et al. 2003; Wyss-Coray et al. 2003). El aclaramiento de A $\beta$  por parte de los astrocitos estaría apoyado por la existencia del denominado *sistema glinfático*, encargado de generar flujos de líquido intersticial, desde y hacia el espacio perivascular. Este flujo sería el encargado de drenar el exceso de proteínas extracelulares, como el A $\beta$ , y evitar así su acumulación (Iliff and Nedergaard 2013). Finalmente, los astrocitos reactivos podrían participar en la eliminación de restos celulares o estructuras neuronales degenerantes, tales como las distrofias que se acumulan alrededor de las placas neuríticas, evitando así un proceso neuroinflamatorio potencial o restaurando la funcionalidad de los circuitos sinápticos.

Durante la enfermedad de Alzheimer, se dan procesos tanto de activación como de atrofia astrogliar (Osborn et al. 2016). El papel que desempeñan unos y otros en la progresión de la patología está aún por determinar, pero la atrofia/disfunción de los astrocitos reduciría el soporte homeostático astrogliar, teniendo graves consecuencias para el rendimiento y la supervivencia de las neuronas, así como también para la actividad funcional de las sinapsis. Todo esto daría como resultado el debilitamiento y la eliminación de las sinapsis, que es precisamente uno de los primeros eventos patológicos observados en la enfermedad (Terry 2000; Coleman et al. 2004; revisado en Rodríguez-Arellano et al. 2016). De nuevo, al igual que con la microglía, el papel de la reactividad astrogliar en la enfermedad de Alzheimer no es conocido. En este sentido, también se ha propuesto la diversidad fenotípica y funcional de los astrocitos reactivos asociados a la patología del Alzheimer y la activación microglial (Liddelw and Barres 2017).

## 1.6

MODELOS MURINOS  
TRANSGÉNICOS DE LA  
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Nuestro conocimiento de los mecanismos biológicos que subyacen a la enfermedad de Alzheimer ha progresado notablemente, contribuyendo a ello el uso de modelos animales que nos ha ayudado a comprender mejor la enfermedad, no solo en términos histopatológicos, sino también en los aspectos relacionados con el deterioro cognitivo típico del Alzheimer. Sin embargo, y a pesar de conocer muchos de los mecanismos patológicos, aún no se ha encontrado ningún tratamiento que ayude a retrasar o curar la enfermedad. Una de las principales razones del fracaso en el desarrollo de terapias efectivas para la enfermedad de Alzheimer es la ausencia de modelos animales que mimeticen todos los rasgos patológicos presentes en los pacientes. Es por esto, que la caracterización de buenos modelos animales es fundamental para la identificación de biomarcadores y dianas terapéuticas para el desarrollo de fármacos. Las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares, que se observan en muchos modelos animales, se corresponden con cambios patológicos tardíos en el Alzheimer, tras de la pérdida neuronal y la gliosis. Es, por tanto, por lo que existe un consenso general de que los tratamientos exitosos deben aplicarse antes del inicio de estas patologías y los síntomas cognitivos asociados.

Existen multitud de modelos animales para la enfermedad de Alzheimer (Laurijssens et al. 2013), desde invertebrados como *Caenorhabditis elegans* (Alexander et al. 2014) o *Drosophila melanogaster* (Crowther et al. 2004; Bouleau and Tricoire 2015) hasta vertebrados como *Danio rerio* (Newman et al. 2014). Sin embargo, los animales más ampliamente empleados para el estudio de esta enfermedad son los modelos transgénicos murinos (ver revisión Drummond and Wisniewski 2016), entre los que se encuentran los dos modelos empleados para el desarrollo de este trabajo.

Los modelos murinos de EA recapitulan aspectos de la enfermedad, a menudo a través de mutaciones genéticas asociadas con el Alzheimer familiar, y pueden ayudarnos a dilucidar aspectos críticos de la patogénesis. Y aunque el Alzheimer familiar es menos común, los fenotipos patológicos son similares a la forma esporádica de la enfermedad.

En humanos una única mutación en el APP o las presenilinas es suficiente para dar lugar al desarrollo de toda la patología característica de la EA, sin embargo, en ratones esto no es suficiente y presentan una sintomatología incompleta de la enfermedad. Las diferencias en los procesos neuroinflamatorios así como en el envejecimiento cerebral entre ratones y humanos son factores importantes a tener en cuenta (Ashe and Zahs 2010). Por ello, a día de hoy



todavía no se ha conseguido generar un modelo animal capaz de reproducir todos los aspectos patológicos de la EA. Sin embargo, existen numerosos ratones transgénicos que nos permiten estudiar la evolución de la patología, desde los estadios más tempranos, para así encontrar biomarcadores de las etapas iniciales de la enfermedad.

A continuación, se comentan algunos de los principales modelos murinos para la enfermedad de Alzheimer (ver revisiones Drummond and Wisniewski 2016; Sasaguri et al. 2017).

### 1.6.1. Modelos transgénicos monogénicos

El descubrimiento de las mutaciones inductoras de la FAD permitió generar numerosos modelos animales transgénicos basados en la sobreexpresión de transgenes portadores de estas mutaciones. En el año 1995, Games y colaboradores (Games et al. 1995) crearon el primer ratón transgénico para APP (PDAPP) con la mutación *Indiana* (V717F) bajo el control del promotor PDGF (del inglés "*platelet-derived growth factor*") que desarrollaba placas, neuritas distróficas, pérdida sináptica y respuesta neuroinflamatoria desde los 6 meses de edad (Neha et al. 2014). Un año después, en 1996, se generó el modelo TG2576, que sobreexpresa la isoforma 695 del APP con la doble mutación Swedish (K670N, M671L) bajo el control del promotor PrP (proteína priónica de hámster) (Hsiao et al. 1996). Los modelos transgénicos para APP no suelen cubrir toda la patología de la EA, de manera que aunque tienen patología amiloide con placas neuríticas (de inicio tardío) no suelen presentar muerte neuronal (Elder et al. 2010).

De manera similar a los modelos transgénicos para APP, se han desarrollado algunas líneas transgénicas basadas en mutaciones en los genes de las presenilinas. Los animales transgénicos para PS1 presentan alto contenido de A $\beta$ 42, pero no desarrollan placas amiloides, astrogliosis, ni pérdida neuronal (Borchelt et al. 1997; Elder et al. 2010). Los elevados niveles de A $\beta$ 42 confirman el efecto de las mutaciones en PS sobre el procesamiento del APP, sin embargo la ausencia de placas en los modelos transgénicos para PS1 podría estar relacionada con las diferentes propiedades agregativas del A $\beta$  entre ratones y humanos (Jankowsky et al. 2007). La ausencia de placas amiloides ha resultado en un menor uso de los animales transgénicos para PS respecto a los de APP. Sin embargo, estos modelos animales si presentan pérdida neuronal y sináptica asociada a la edad.

Aunque no se han descrito mutaciones de tau asociadas al desarrollo de la EA, ha sido necesario generar modelos murinos con el transgén para la proteína tau humana mutada con el fin de desentrañar el papel de los NFTs durante la progresión de la patología. Estos modelos además de NFTs presentan también pérdida de memoria y fallos motores (Van Dam and De Deyn 2011).

### 1.6.2. Modelos transgénicos bigénicos

De la combinación de ratones transgénicos APP y PS1 surge el modelo doble transgénico (o bigénico) APP/PS1 en el que la patología amiloide aparece a edades más tempranas (4 meses) que en los animales que expresan sólo uno de los genes mutados (Borchelt et al. 1997; Elder et al. 2010).

Uno de los primeros modelos descritos fue el APPxPS1 (Holcomb et al. 1998), que sobreexpresa la mutación APP<sub>SWE</sub> y PS1<sub>M146L</sub> bajo el control de los promotores PrP y PDGF respectivamente. Este modelo presenta déficits cognitivos desde los 4-5 meses de edad (Dineley et al. 2002).

El modelo PS1<sub>dE9</sub>/APP<sub>SWE</sub> (PS1<sub>dE9</sub> bajo el control del promotor PDGF; APP<sub>SWE</sub> bajo el control del promotor PrP) presenta placas amiloides extracelulares desde los 4-6 meses de edad que aumentan progresivamente con el envejecimiento y presenta déficits cognitivos desde los 3 meses (Jankowsky et al. 2001). Este modelo tiene además una intensa respuesta inflamatoria y neuritis distróficas positivas para Tau (Kurt et al. 2003; Ruan et al. 2009).

Uno de los modelos empleados en este trabajo es el doble transgénico APP<sub>751SL</sub>/PS1<sub>M146L</sub>. Este modelo sobreexpresa PS1 con la mutación M146L bajo el promotor HMG-CoA reductasa junto con la isoforma 751 del APP con la doble mutación *Swedish* y *London* bajo el control del promotor Thy-1 (ver Apdo. 2.1 de Material y Métodos) (Blanchard et al. 2003). Las placas extracelulares de A $\beta$  aparecen a partir de los 3-4 meses de edad, mostrando una mayor localización en el hipocampo, subículo y corteza entorrinal (Ramos et al. 2006; Caballero et al. 2007; Moreno-Gonzalez et al. 2009; Trujillo-Estrada et al. 2014). Además, este modelo presenta también astrogliosis y microgliosis desde edades muy tempranas (4-6 meses) y aunque presenta proteína tau fosforilada, no desarrolla ovillos neurofibrilares intracelulares (Jimenez et al. 2008; Moreno-Gonzalez et al. 2009; Trujillo-Estrada et al. 2014). Por otro lado, la patología neurítica es principalmente de origen axonal/presináptico y aparece también desde los 4-6 meses de edad (Sanchez-Varo et al. 2012; Trujillo-Estrada et al. 2013, 2014). La principal característica de este modelo animal que lo diferencian del resto es la muerte neuronal selectiva de interneuronas GABAérgicas desde los 4-6 meses de edad, que aparece junto a una muerte de neuronas piramidales a edades tempranas (Ramos et al. 2006; Moreno-Gonzalez et al. 2009; Baglietto-Vargas et al. 2010; Trujillo-Estrada et al. 2014).

### 1.6.3. Modelos transgénicos trigénicos

Estos modelos surgen principalmente de la necesidad de generar modelos que presenten ovillos neurofibrilares mediante la introducción de mutaciones en la proteína Tau, a pesar de que no existen mutaciones de Tau en los pacientes de Alzheimer.

El primer modelo triple transgénico, así como el más usado actualmente, es el 3xTg-AD (Oddo et al. 2003), con mutaciones en PS1 (M146V), APP (mutación *Swedish* KM670/671NL) y Tau (P301L) bajo el control del promotor Thy-1. Este modelo presenta daños cognitivos desde edades tempranas (3-5 meses). El modelo 3xTg-AD es el primer ratón transgénico que

desarrolla la patología amiloide junto con ovillos neurofibrilares. La cascada de eventos patológicos comienza con la aparición de depósitos de A $\beta$  intracelular, seguidos por la aparición de la proteína Tau en su estado hiperfosforilado, deposición de péptido  $\beta$ -amiloide en forma de placas extracelulares y finalmente acumulación de Tau en NFTs. Estos animales desarrollan asimismo patología y pérdida sináptica (con la formación de neuritas distróficas), aunque no muestran muerte neuronal en el hipocampo (Oddo et al. 2003).

En 2004 se desarrolló un nuevo modelo triple transgénico PS1xAPPxTau que portaba las mutaciones PS1<sub>M146L</sub> y APP<sub>751SL</sub>, además de incluir la proteína Tau sin mutar por lo que presentan acumulación somatodendrítica de Tau y neuritas distróficas positivas para formas de Tau hiperfosforilado, pero no desarrollan NFTs (Boutajangout et al. 2004).

A pesar de que los modelos murinos mencionados anteriormente han sido y continuarán siendo muy valiosos para el estudio de los procesos patogénicos de la EA, los nuevos avances en la tecnología de edición del genoma, conocidos como CRISPR/Cas9, nos permitirá modificar genéticamente los ratones de forma mucho más eficiente, ya que pueden introducirse múltiples variaciones de genes simultáneamente. Esta tecnología será particularmente importante para el desarrollo de modelos murinos de Alzheimer esporádico, el cual probablemente involucre múltiples variaciones genéticas. Estos modelos predictivos mejorados deberían conducir a una mejor traslación entre los estudios preclínicos y clínicos, particularmente para la forma más común de la EA, de aparición tardía.

**Tabla 1.2. Resumen de los principales modelos transgénicos murinos para el estudio de la enfermedad de Alzheimer.** En la tabla se indica el tipo de animal, el nombre de la línea por el que es conocido, las mutaciones que expresan, sus características principales y las referencias bibliográficas. PS1: Presenilina 1; hAPP: proteína precursora amiloide humana; NFTs: ovillos neurofibrilares; S: mutación sueca (K670N/M671L); L: mutación londinense (V717I); I: mutación india (V717F); F: mutación florida (I716V); D: mutación *Dutch*; KO: *knockout*; KI: *knock-in*; 4R: isoforma de Tau con 4 repeticiones.

MODELOS MONOGÉNICOS				
ANIMAL	LÍNEA	MUTACIÓN	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIAS
PS1	S9	PS1DE9	Aumenta la formación de placas	(Thinakaran et al. 1996)
	S8-4	HuPS1	No presenta placas	(Borchelt et al. 1997)
	N-5	hAPP A246E	No presenta placas	(Borchelt et al. 1997)
	PS1 <sub>KO</sub>	Sin PS1	Inviable	(Shen et al. 1997)
APP	PDAPP	hAPP <sub>I</sub> (V717F)	Depósitos desde los 6 meses. Gliosis. Sin NFTs	(Games et al. 1995)
	Tg2576	hAPP695 <sub>S</sub>	Placas desde los 9-11 meses.	(Hsiao et al. 1996)

		(K670N/M671L)	Fallos sinápticos. Sin NFTs	
	<b>APP23</b>	hAPP751 <sub>S</sub>	Placas desde los 6 meses. Gliosis. Muerte celular. NFTs	(Sturchler-Pierrat et al. 1997)
	<b>C3-3</b>	hAPP695 <sub>S</sub>	No presenta placas	(Borchelt et al. 1997)
	<b>APP Dutch</b>	hAPP751 <sub>D</sub> (E693Q)	Angiopatía amiloide cerebral	(Herzig et al. 2001)
	<b>CRND8</b>	hAPP695 <sub>SI</sub>	Placas desde los 3 meses	(Chishti et al. 2001)
	<b>hAPP695</b>	hAPP695 <sub>SL</sub> inducible	Reducción del tamaño de los depósitos de A $\beta$ asociada a la inducción génica.	(Jankowsky et al. 2005)
	<b>J20</b>	APP <sub>SI</sub>	Placas desde los 5-7 meses. Déficits cognitivos desde 1-2 meses.	(Mucke et al. 2000)
<b>TAU</b>	<b>ALZ27</b>	Sobreexpresión de 4 repeticiones de Tau (4R)	Axonopatía. No NFTs.	(Götz et al. 1995)
	<b>JNPL3</b>	4R Tau P301L	NFT	(Lewis et al. 2000)
	<b>8c</b>	Expresión de tau humano	Tau presente en neuritas y sinapsis, no en los somas	(Duff et al. 2000)
	<b>P301S</b>	4R P301S	Fallos sinápticos. Microgliosis y muerte celular. NFTs a edades tempranas	(Allen et al. 2002)
	<b>Tau V337M</b>	4R V337M	NFTs desde 6 meses	(Tanemura et al. 2001)
	<b>P301L</b>	4R P301L	No muerte celular. NFTs a edades tempranas	(Götz 2001)
	<b>Tau R406W</b>	4R Tau R406W	NFT desde 18 meses	(Tatebayashi et al. 2002)
	<b>Htau</b>	TauKO x 8c	Muerte celular. Sin NFTs	(Andorfer et al. 2003)
	<b>rTg4510</b>	4R P301L inducible	NFTs y pérdida neuronal	(Ramsden et al. 2005)
	<b>DM-hTau</b>	2-3-4R Tau K257T/P301S	NFTs desde 6 meses	(Rosenmann et al. 2008)

MODELOS BIGÉNICOS				
ANIMAL	LÍNEA	MUTACIÓN	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIAS
APP/ PS1	AP/PS	C3-3Xn-5 APP <sub>S</sub> x HuPS1 A246E	Placas desde los 9 meses	(Borchelt et al. 1996)
	PSAPP	Tg2576 x PS1 <sub>M146L</sub>	Placas desde los 6 meses	(Holcomb et al. 1998)
	APP/PS1	PS1 <sub>M146I</sub> x APP <sub>751SL</sub>	Placas desde los 3-4 meses. Gliosis. Muerte de neuronas piramidales y de interneuronas	(Blanchard et al. 2003; Ramos et al. 2006)
	APP <sub>SL</sub> PS1 <sub>K1</sub>	APP <sub>751SL</sub> x PS1 <sub>K1</sub> (M233T/L235P)	Patología muy agresiva. Pérdida de neuronas CA1 desde los 6 meses.	(Casas et al. 2004)
	5xFAD	APP <sub>751SFL</sub> x PS1 (M146L y L286V)	Niveles muy altos de Aβ <sub>42</sub> desde 1,5 meses. Placas desde 2 meses	(Oakley et al. 2006)
APP/ TAU	TAPP	Tg2576 x TauJNPL3	Placas desde 8,5 meses. NFTs	(Lewis et al. 2001)
	APP <sub>SWE</sub> Tau <sub>VLW</sub>	APPs x Tau G272V/P301L/R406W	Placas desde 9 meses. NFTs a 25 meses. Muerte neuronal a 16 meses	(Ribé et al. 2005; DaRocha-Souto et al. 2011)

MODELOS TRIGÉNICOS				
ANIMAL	LÍNEA	MUTACIÓN	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIAS
APP/ PS1/ TAU	APP/PS1/Tau	PS1 <sub>M146L</sub> x APP <sub>751SL</sub> x hTau (3R)	Placas desde 2,5 meses. Sin NFTs	(Boutajangout et al. 2004)
	3xTg-AD	APPs x PS1 <sub>M146V</sub> x Tau <sub>P301L</sub>	Placas desde 6 meses. NFTs desde 9 meses. Fallos sinápticos	(Oddo et al. 2003)

## 1.7

## HIPOCAMPO

El hipocampo, situado dentro del lóbulo temporal medial, es una región cortical clave en los procesos de memoria. Específicamente, el hipocampo es responsable del componente declarativo de la memoria (la memoria “consciente” para hechos y eventos) que, a través de inter conexiones con la corteza adyacente y con la neocorteza, se establece y se consolida la memoria a largo plazo (Wolk et al. 2011; Henson et al. 2016; Hannula and Duu 2017).

Las áreas corticales del lóbulo temporal medial son precisamente las más susceptibles a los cambios patológicos de la EA. En concreto el hipocampo, es una de las regiones cerebrales que primera y más severamente se encuentra afectada por el proceso neurodegenerativo asociado a esta enfermedad. En este sentido, los déficits cognitivos que inicialmente se manifiestan en la EA, que comienzan con el deterioro de la memoria semántica en los estadios más tempranos de la enfermedad, se corresponden con los daños neuropatológicos que sufre el hipocampo durante la progresión de la patología. Con el curso de la enfermedad, se van implicando progresivamente otros dominios cognitivos relacionados con las funciones sensoriales, ejecutivas y motoras, debido a la acumulación de cambios patológicos en otras regiones del lóbulo temporal, y en los lóbulos frontal y parietal.

A nivel anatómico, el hipocampo se encuentra dentro de la formación hipocampal, la cual constituye una porción de la corteza cerebral, formando algo parecido a un cuerno a lo largo de la curvatura del ventrículo lateral, y forma parte del lóbulo temporal medial (Squire and Zola 1996). Clásicamente, la formación hipocampal ha sido definida como el conjunto del hipocampo propio o *cornu ammonis* (CA), el giro dentado (GD) y subículo, constituyendo todos ellos la allocorteza de Brodmann (revisado en Andersen 2007; Mai and Paxinos 2012; Duvernoy et al. 2013).

Estos tres componentes, hipocampo propio, giro dentado y subículo, se encuentran constituidos de manera característica por tres capas (revisado en Andersen 2007; van Strien et al. 2009b; Hannula and Duu 2017). El conjunto del hipocampo propio y el giro dentado ha sido tradicionalmente denominado como hipocampo. A partir de ahora, emplearemos esta terminología y nos referiremos al hipocampo como el conjunto formado por CA y el giro dentado.

Dentro del hipocampo propio encontramos:

- La capa externa, que se encuentra tradicionalmente dividida en dos estratos, el estrato radiado (*stratum radiatum, sr*) y el lagunoso-molecular (*stratum lacunosum moleculare, slm*). En esta capa se da la ramificación de las dendritas apicales de las células principales.
- La capa media o estrato piramidal (*stratum pyramidale, sp*), que contiene los somas de las neuronas principales o piramidales.
- La capa interna o estrato oriens (*stratum oriens, so*), donde encontramos las dendritas basales de las células piramidales. La parte más profunda de esta capa está ocupada por axones mielínicos que surgen de las neuronas situadas en el subículo y en el hipocampo. Esta capa de fibras recibe el nombre de *alveus*.

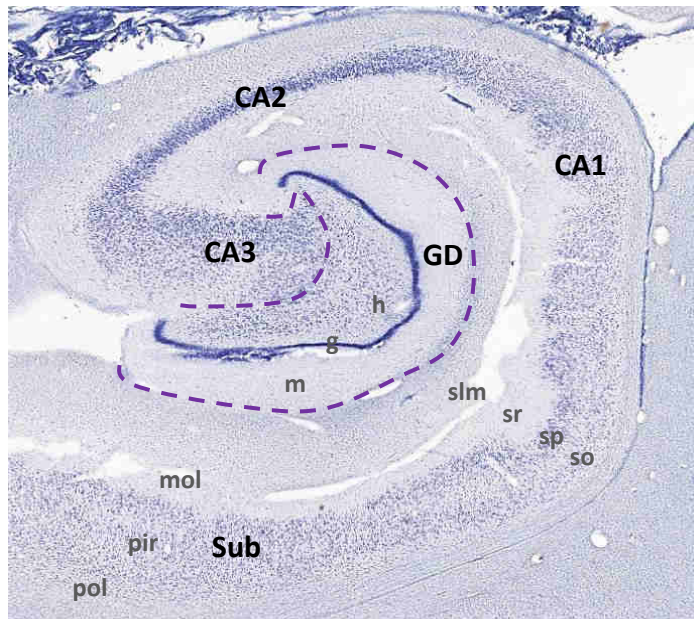
En el giro dentado distinguimos:

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

El subículo, área de transición entre el hipocampo y la corteza entorrinal (CE), consta de las siguientes capas:

- La capa molecular externa, que se continúa con el estrato lacunoso-molecular y radiado de CA1.
- La capa media, de células piramidales, que es amplia.
- La capa polimórfica, interna.

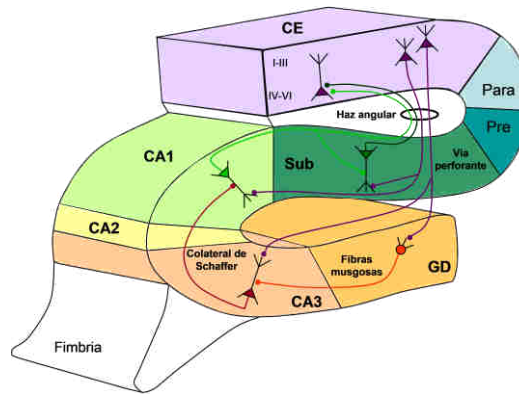
En cada una de las capas de la formación hipocámpal podemos encontrar diferentes tipos de interneuronas (IN), además de neuronas principales de naturaleza excitatoria o glutamatérgicas cuya localización se restringe a las capas piramidales del hipocampo propio y del subículo y a la capa granular del giro dentado (Andersen 2007).



**Figura 1.11. Formación hipocámpica.** En esta imagen se muestra la formación hipocámpica constituida por el hipocampo propio (CA1-3), el giro dentado (GD) y el subículo (Sub), en los que se aprecia la organización trilaminar. Además, se indican las diferentes capas, como son *stratum lacunosum-moleculare* (slm), *stratum radiatum* (sr), *stratum pyramidale* (sp) y *stratum oriens* (so) de hipocampo propio; capa molecular (m), granular (g) e hilio (h) de GD; y capa molecular (mol), piramidal (pir) y polimórfica (pol) de subículo. Tomado del Atlas *Allen Brain Atlas*, de la web [www.brain-map.org](http://www.brain-map.org).

La mayor inervación cortical del hipocampo la realiza la CE mediante dos vías: vía alvear y vía perforante, ambas descritas por Cajal en los años 1901 y 1911 respectivamente. La vía alvear es aquella que se encuentra de manera predominante a niveles septales y que discurre por el *alveus*, de manera que las fibras de la CE se desvían en el *alveus* y perforan la capa de células piramidales, llegando hasta el estrato lagunoso molecular de CA1 y CA3 (Deller et al. 1996). Por otro lado, el circuito trisináptico (Andersen 2007) constituye el mayor flujo de información a través del hipocampo, comenzando con la proyección desde la CE hacia el hipocampo propio y el giro dentado (vía perforante). Una vez en el GD, los axones de las células granulares (fibras musgosas) forman haces colaterales en el hilio y penetran en CA3, donde realizan sinapsis en las dendritas proximales de las células piramidales. Estas células piramidales de CA3 tienen axones muy colateralizados, pudiendo formar por un lado proyecciones de asociación longitudinal que terminan en CA3 y por otro lado proyecciones mayoritarias hacia CA1. El circuito finaliza con las proyecciones desde CA1 hacia la CE de manera directa o a través del subículo (van Strien et al. 2009b).





**Figura 1.12. Esquema básico de las conexiones del circuito trisináptico.** Se muestran las aferencias de la corteza entorrinal al hipocampo, según la secuencia: CE – células granulares del GD – CA3 – CA1. Las neuronas de la capa II de la CE proyectan hacia el GD y CA3 a través de la vía perforante. Las neuronas de capa III de la CE proyectan hacia CA1 y el subículo a través de la vía perforante y alvear. Las células granulares del GD contactan con CA3 a través de las proyecciones de las fibras musgosas. Las neuronas piramidales de CA3 viajan a CA1 a través de las colaterales de Schaffer. Las células piramidales de CA1 proyectan hacia el subículo. Tanto CA1 como el subículo proyectan hacia las capas profundas de la CE a través del haz angular. *CE: corteza entorrinal; números romanos: capas de la CE; CA1, CA2, CA3: regiones del hipocampo propio; GD: giro dentado; Sub: subículo; Para: parasubículo; Pre: presubículo.* Modificado de Andersen 2007.

Como ya hemos comentado, las principales aferencias a la formación hipocámpal proceden de la CE, pero el hipocampo también recibe conexiones de otras estructuras límbicas como la región septal y la amígdala. Más concretamente, el hipocampo recibe aferencias colinérgicas desde el encéfalo basal anterior, que provienen del *septum* y del núcleo vertical de la banda diagonal de Broca (Schäfer et al. 1998). Una de las principales funciones de esta proyección es la regulación de la actividad hipocámpal, concretamente de la generación y mantenimiento de los ritmos theta, y desempeña un papel importante en los procesos de memoria y aprendizaje (Dutar and Bassant 1995). Por otro lado, el hipocampo recibe inervación desde varios núcleos del tronco cerebral que también se encuentran afectados en la EA, e igualmente ocurre con la amígdala (Pitkänen et al. 2000), que con sus aferencias participa en la correcta estructuración de los comportamientos más adecuados en función de la información sensorial disponible. Además, el hipocampo también recibe proyecciones catecolaminérgicas, como, por ejemplo, terminales noradrenérgicas provenientes del *locus ceruleus*. La afectación de estas vías en los pacientes de EA está bien documentada (ver revisiones Mufson et al. 2003; Heneka y O'Banion 2007; Duyckaerts et al. 2009; Castellani et al. 2010). En cuanto a las proyecciones eferentes de la formación hipocámpal, éstas se originan principalmente en las neuronas del subículo y, en menor medida, en las del hipocampo propio. En ambos casos, los axones de estas neuronas entran en el *alveus*, confluyen para formar la fimbria del hipocampo y luego continúan su camino constituyendo el fórnix. El fórnix es la principal vía de conexión entre el hipocampo y otras estructuras cerebrales. La mayor parte de estas fibras terminan en el núcleo mamilar medial, aunque otras llegan al hipotálamo y al tálamo. También existen proyecciones eferentes desde el subículo que se dirigen a la CE, hacia la corteza cingulada y la amígdala (Andersen 2007; Mai and Paxinos 2012; Duvernoy et al. 2013; Hannula and Duu 2017).

## 1.8

## PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO Y OBJETIVOS

La enfermedad de Alzheimer, con más de 40 millones de afectados en el mundo incluyendo 7 millones en Europa y más de 800.000 en España constituye actualmente uno de los problemas socio-sanitarios más importantes de nuestra época. La etiología de la EA es desconocida hasta el momento y además no existen tratamientos farmacológicos efectivos para paliar o retrasar el curso de la patología. Esta ausencia de terapias efectivas se debe, en parte, a la ausencia de buenos modelos animales y al desconocimiento de los complejos mecanismos patogénicos. Esta enfermedad neurodegenerativa se caracteriza por alteración de la proteostasis neuronal con acumulación de Abeta y de fosfo-tau. Sin embargo, la replicación de estas dos proteinopatías en modelos animales ha sido poco útil para comprender el proceso neurodegenerativo en pacientes o para desarrollar una terapia neuroprotectora. Esto pone de manifiesto que existen otros mecanismos patogénicos sin resolver. En los últimos años, la respuesta neuroinflamatoria, mediada por microglía y astrocitos, se ha revelado un proceso clave. El conocimiento y control de la respuesta inmune cerebral aportará nuevas oportunidades terapéuticas para la prevención/retraso de esta enfermedad.

Nuestro grupo de investigación, perteneciente al CIBER de enfermedades neurodegenerativas (CIBERNED) del Instituto de Salud Carlos III, está centrado en el estudio de los mecanismos implicados en el proceso neurodegenerativo que tiene lugar en el Alzheimer con objeto de identificar biomarcadores y dianas terapéuticas de interés. Entre estos mecanismos, descifrar la naturaleza e implicación de la respuesta neuroinflamatoria (mediada por la activación microglial y astrogial) en la patología del Alzheimer es uno de los principales objetivos de nuestros proyectos actuales. Como modelo de estudio principal utilizamos un doble transgénico APP/PS1 que presenta una marcada respuesta inflamatoria, daño axonal/sináptico, déficits en el proceso de neurogénesis, y además, a diferencia de la mayoría de los modelos existentes, muerte neuronal (Ramos et al. 2006; Jimenez et al. 2008, 2011; Moreno-Gonzalez et al. 2009; Baglietto-Vargas et al. 2010; Sanchez-Varo et al. 2012; Torres et al., 2012; Trujillo-Estrada et al. 2013, 2014; Baglietto-Vargas et al., 2017).

La acumulación extracelular de Abeta en este modelo va acompañada de la activación de la microglía, con fenotipo alternativo neuroprotector, que se localiza rodeando las placas amiloides. El aumento con la edad de los niveles de A $\beta$  oligomérico soluble induce además la activación de la microglía inter-placa hacia un fenotipo clásico pro-inflamatorio citotóxico; por

el contrario, la respuesta microglial alrededor de las placas se mantiene con un fenotipo alternativo. Sin embargo, se desconoce aún la participación de estas células activadas, y de sus diversos fenotipos funcionales, en la progresión de la patología, si contribuyen o controlan el avance de la misma, si coexisten diversos tipos funcionales, o si sufren un proceso de degeneración. En ese sentido, recientemente nuestro grupo ha descrito un proceso degenerativo de la microglía en el hipocampo de pacientes de Alzheimer (Sanchez-Mejias et al. 2016). Por otro lado, el papel de los astrocitos en la patogénesis del Alzheimer es aún incluso más desconocido. La progresión de la patología va acompañada también de una fuerte reactividad astrogliar, y al igual que la microglía activada, los astrocitos reactivos se localizan alrededor de las placas amiloides. Sin embargo, aún se desconoce si la reactividad astrogliar es causa o consecuencia de la patología.

A pesar de que la hipótesis neuroinflamatoria del Alzheimer ha sido foco de investigación intenso durante la última década, los resultados no se han traducido en un éxito terapéutico. Entre los motivos de este fracaso se encuentra sin duda la complejidad de esta respuesta y la multitud de fenotipos funcionales, aún por identificar, que la microglía y la astrogliar podrían adoptar en función del estímulo patogénico. Por tanto, el conocimiento más profundo sobre las modificaciones patológicas que sufren tanto la microglía como la astrogliar es clave para explicar los procesos patológicos que se desarrollan durante la enfermedad, y absolutamente necesario antes de poder abordar cualquier nueva estrategia terapéutica.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, nuestra **hipótesis de trabajo** propone que la progresión de la patología en la enfermedad de Alzheimer está asociada a una disfunción de las células gliales. En este sentido, la modulación farmacológica de las células gliales se postula como una potencial estrategia terapéutica para modificar el curso de la enfermedad y reducir el daño neuronal.

El **objetivo general** de esta Tesis Doctoral es caracterizar, fundamentalmente a nivel ultraestructural, la heterogeneidad morfológica y funcional de las células microgliales y astrogliar reactivas, así como determinar su relación con la progresión de la patología, en el hipocampo del modelo transgénico APP/PS1. Los datos obtenidos en modelos se validarán en muestras humanas *post mortem* de pacientes. Los objetivos específicos son los siguientes:

**Objetivo 1.** Estudiar a nivel celular y subcelular la reactividad astrogliar asociada a las placas amiloides en el hipocampo del modelo APP/PS1

Se estudiará la respuesta inflamatoria mediada por las células astrogliar (astrogliosis) en el hipocampo de animales APP<sub>751SL</sub>/PS1<sub>M146L</sub>, así como su relación con la patología amiloide y neurítica. Para ello, se emplearán fundamentalmente técnicas inmunohistoquímicas a microscopía óptica y a microscopía electrónica de transmisión, análisis de imagen y estudios ultraestructurales 3D (mediante microscopía electrónica de doble haz; FIB/SEM). De manera

adicional, se emplearán muestras humanas *post mortem* de pacientes de Alzheimer con el fin de validar los resultados obtenidos en el modelo animal APP/PS1.

**Objetivo 2.** Estudiar a nivel celular y subcelular la activación microglial y su relación con la patología amiloide en el hipocampo del modelo transgénico APP/PS1

Se analizarán las células microgliales activadas que rodean las placas amiloides en el modelo APP/PS1 usando fundamentalmente técnicas inmunohistoquímicas a microscopía óptica y a microscopía electrónica de transmisión. Al igual que en el objetivo anterior, se emplearán muestras humanas *post mortem* de pacientes de Alzheimer para validar los resultados.

**Objetivo 3.** Determinar el efecto de la modulación de la vía de señalización de la interleuquina proinflamatoria IL1 $\beta$  sobre la función cognitiva y la patología utilizando un modelo triple transgénico (3xTgAD)

Con el fin de evaluar el papel del sistema inmune innato en la progresión de la patología del Alzheimer se estudiará la vía de señalización del receptor de tipo I de interleuquina 1 (IL-1R1) mediante modulación del sistema de endocitosis mediado por Tom/Tollip. Para ello, se inyectarán animales 3xTg-AD y controles con virus adeno-asociados con la finalidad de silenciar o sobreexpresar estas dos proteínas. Se evaluará la capacidad cognitiva de los animales y posteriormente mediante microscopía óptica y electrónica se analizará el efecto sobre la población glial y la patología Alzheimer. Este objetivo específico se ha llevado a cabo en colaboración con el laboratorio del Dr. LaFerla (California, EEUU) durante un periodo de estancia pre-doctoral.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alexander AG, Marfil V, Li C.** 2014. Use of *C. elegans* as a model to study Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Front Genet* **5**: 279.
- Allen B, Ingram E, Takao M, Smith MJ, Jakes R, Virdee K, Yoshida H, Holzer M, Craxton M, Emson PC, et al.** 2002. Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. *J Neurosci* **22**: 9340–9351.
- Andersen P.** 2007. *The hippocampus book*. Oxford University Press.
- Andorfer C, Kress Y, Espinoza M, De Silva R, Tucker KL, Barde YA, Duff K, Davies P.** 2003. Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms. *J Neurochem* **86**: 582–590.
- Andreeva T V., Lukiw WJ, Rogaev EI.** 2017. Biological basis for amyloidogenesis in Alzheimer's disease. *Biochem* **82**: 122–139.
- 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.
- Ashe KH, Zahs KR.** 2010. Probing the Biology of Alzheimer's Disease in Mice. *Neuron* **66**: 631–645.
- Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Sanchez-Varo R, 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- $\beta$  pathology in PS1/A $\beta$ PP Alzheimer mice hippocampus. *J Alzheimer's Dis* **21**: 119–132.
- Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E.** 2011. Alzheimer's disease. *Lancet* **377**: 1019–1031.
- Baron R, Babcock A a., Nemirovsky A, Finsen B, Monsonego A.** 2014. Accelerated microglial pathology is associated with A $\beta$  plaques in mouse models of Alzheimer's disease. *Aging Cell* **13**: 584–595.
- Bell KFS, Hardingham GE.** 2011. The influence of synaptic activity on neuronal health. *Curr Opin Neurobiol* **21**: 299–305.
- Bertram L, Lill CM, Tanzi RE.** 2010. The genetics of alzheimer disease: Back to the future. *Neuron* **68**: 270–281.
- Blanchard V, Moussaoui S, Czech C, Touchet N, Bonici B, Planche M, Canton T, Jedidi I, Gohin M, Wirths O, et al.** 2003. Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with A $\beta$  deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Exp Neurol* **184**: 247–263.
- Borchelt DR, Ratovitski T, Van Lare J, Lee MK, Gonzales V, Jenkins N a., Copeland NG, Price DL, Sisodia SS.** 1997. Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron* **19**: 939–945.
- Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, Prada C-M, Kim G, Seekins S, Yager D, et al.** 1996. Familial Alzheimer's Disease-Linked Presenilin 1 Variants Elevate A $\beta$ 1–42/1–40 Ratio In Vitro and In Vivo. *Neuron* **17**: 1005–1013.
- Bouleau S, Tricoire H.** 2015. Drosophila Models of Alzheimer's Disease: Advances, Limits, and Perspectives. *J Alzheimer's Dis* **45**: 1015–1038.
- 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.
- Bouvier DS, Jones E V., Quesseveur G, Davoli MA, A. Ferreira T, Quirion R, Mechawar N, Murai KK.** 2016. High Resolution Dissection of Reactive Glial Nets in Alzheimer's Disease. *Sci Rep* **6**: 24544.
- Bradshaw EM, Chibnik LB, Keenan BT, Ottoboni L, Raj T, Tang a, Rosenkrantz LL, Imboywa S, Lee M, Von Korff a, et al.** 2013. CD33 Alzheimer's disease locus: altered monocyte function and amyloid biology. *Nat Neurosci* **16**: 848–850.
- Brown GC, George-Hyslop St PH.** 2017. Deciphering microglial diversity in Alzheimer's disease. *Science (80- )* **356**: 1123–1124.
- Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS, Cialic R, Lanser AJ, Gabriely G, Koeglsperger T, Dake B, Wu PM, Doykan CE, et al.** 2014. Identification of a unique TGF- $\beta$ -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci* **17**: 131–43.
- Caballero C, Jimenez S, Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Gavilan**

- MP, Ramos B, del Rio JC, Vizuete M, Gutierrez A, et al.** 2007. Inter-individual variability in the expression of the mutated form of hPS1M146L determined the production of A $\beta$  peptides in the PS1xAPP transgenic mice. *J Neurosci Res* **85**: 787–797.
- Cacace R, Slegers K, Van Broeckhoven C.** 2016. Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimer's Dement* **12**: 733–748.
- Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS, Xing Y, Lubischer JL, Krieg PA, Krupenko SA, et al.** 2008. A Transcriptome Database for Astrocytes, Neurons, and Oligodendrocytes: A New Resource for Understanding Brain Development and Function. *J Neurosci* **28**: 264–278.
- Cai Y, An SSA, Kim S.** 2015. Mutations in presenilin 2 and its implications in Alzheimer's disease and other dementia-associated disorders. *Clin Interv Aging* **10**: 1163–1172.
- Cai Z, Hussain MD, Yan L-J.** 2014. Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *Int J Neurosci* **124**: 307–321.
- Calero M, G $\tilde{a}$ mez-Ramos A, Calero O, Soriano E, Avila J, Medina M.** 2015. Additional mechanisms conferring genetic susceptibility to Alzheimer's disease. *Front Cell Neurosci* **9**: 1–9.
- Calsolaro V, Edison P.** 2016. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. *Alzheimer's Dement* **12**: 719–732.
- Carrero I, Gonzalo MR, Martin B, Sanz-Anquela JM, Ar $\acute{e}$ valo-Serrano J, Gonzalo-Ruiz A.** 2012. Oligomers of beta-amyloid protein (A $\beta$ 1-42) induce the activation of cyclooxygenase-2 in astrocytes via an interaction with interleukin-1beta, tumour necrosis factor-alpha, and a nuclear factor kappa-B mechanism in the rat brain. *Exp Neurol* **236**: 215–227.
- Carter SF, Scholl M, Almkvist O, Wall A, Engler H, Langstrom B, Nordberg A.** 2012. Evidence for Astrocytosis in Prodromal Alzheimer Disease Provided by 11C-Deuterium-L-Deprenyl: A Multitracer PET Paradigm Combining 11C-Pittsburgh Compound B and 18F-FDG. *J Nucl Med* **53**: 37–46.
- Casas C, Sergeant N, Itier J-M, Blanchard V, Wirths O, van der Kolk N, Vingtdoux V, van de Steeg E, Ret G, Canton T, et al.** 2004. Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated Abeta42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. *Am J Pathol* **165**: 1289–300.
- Castellani RJ, Rolston RK, Smith M a.** 2010. Alzheimer disease. *Disease-a-Month* **56**: 484–546.
- Chishti MA, Yang DS, Janus C, Phinney AL, Horne P, Pearson J, Strome R, Zuker N, Loukides J, French J, et al.** 2001. Early-onset Amyloid Deposition and Cognitive Deficits in Transgenic Mice Expressing a Double Mutant Form of Amyloid Precursor Protein 695. *J Biol Chem* **276**: 21562–21570.
- Clarke LE, Barres B a.** 2013. Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nat Rev Neurosci* **14**: 311–21.
- Coleman P, Federoff H, Kurlan R.** 2004. A focus on the synapse for neuroprotection in Alzheimer disease and other dementias. *Neurology* **63**: 1155–62.
- Colonna M, Butovsky O.** 2017. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. 441–468.
- Colonna M, Wang Y.** 2016. TREM2 variants: new keys to decipher Alzheimer disease pathogenesis. *Nat Rev Neurosci* **17**: 201–207.
- Cristóvão JS, Santos R, Gomes CM.** 2016. Metals and Neuronal Metal Binding Proteins Implicated in Alzheimer's Disease. *Oxid Med Cell Longev* **2016**: 9812178.
- Crowther DC, Kinghorn KJ, Page R, Lomas DA.** 2004. Therapeutic targets from a Drosophila model of Alzheimer's disease. *Curr Opin Pharmacol* **4**: 513–516.
- Cruchaga C, Kauwe JSK, Harari O, Jin SC, Cai Y, Karch CM, Benitez BA, Jeng AT, Skorupa T, Carrell D, et al.** 2013. GWAS of cerebrospinal fluid tau levels identifies risk variants for alzheimer's disease. *Neuron* **78**: 256–268.
- Czech C, Tremp È, Pradier L.** 2000. Presenilins and Alzheimer's disease: biological functions and pathogenic mechanisms. **60**.
- Dá Mesquita S, Ferreira AC, Sousa JC, Correia-Neves M, Sousa N, Marques F.** 2016. Insights on the pathophysiology of Alzheimer's disease: The crosstalk between amyloid pathology, neuroinflammation and the peripheral immune system. *Neurosci Biobehav Rev* **68**: 547–562.
- DaRocha-Souto B, Scotton TC, Coma M, Serrano-Pozo A, Hashimoto T, Serenó L, Rodríguez M, Sánchez B, Hyman BT, Gómez-Isla T.** 2011. Brain oligomeric  $\beta$ -amyloid but not total



- amyloid plaque burden correlates with neuronal loss and astrocyte inflammatory response in amyloid precursor protein/tau transgenic mice. *J Neuropathol Exp Neurol* **70**: 360–376.
- De Strooper B.** 2010. Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process. *Physiol Rev* **90**: 465–494.
- De Strooper B, Iwatsubo T, Wolfe MS.** 2012. Presenilins and  $\gamma$ -secretase: structure, function, and role in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**: a006304.
- 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.
- Di Paolo C, Serritella E, Panti F, Falisi G, Manna F.** 2014. Heavy metals and pain in the dysfunctional patient. *Ann Stomatol (Roma)* **5**: 41–51.
- Dickson DW.** 1997. The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol* **56**: 321–39.
- Dickson TC, King CE, McCormack GH, Vickers JC.** 1999. Neurochemical diversity of dystrophic neurites in the early and late stages of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* **156**: 100–110.
- Dineley KT, Xia X, Bui D, David Sweatt J, Zheng H.** 2002. Accelerated plaque accumulation, associative learning deficits, and up-regulation of  $\alpha 7$  nicotinic receptor protein in transgenic mice co-expressing mutant human presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *J Biol Chem* **277**: 22768–22780.
- Drummond E, Wisniewski T.** 2016. Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol* **133**: 155–175.
- du L, Zhang Y, Chen Y, Zhu J, Yang Y, Zhang HL.** 2016. Role of Microglia in Neurological Disorders and Their Potentials as a Therapeutic Target. *Mol Neurobiol* **1**–18.
- Duff K, Knight H, Refolo LM, Sanders S, Yu X, Picciano M, Malester B, Hutton M, Adamson J, Goedert M, et al.** 2000. Characterization of pathology in transgenic mice over-expressing human genomic and cDNA tau transgenes. *Neurobiol Dis* **7**: 87–98.
- Dutar P, Bassant M.** 1995. The septohippocampal pathway: structure and function of a central cholinergic system. *Physiol ....*
- Duvernoy HM, Cattin F, Risold P-Y, Vannson JL, Gaudron M.** 2013. *The human hippocampus: functional anatomy, vascularization, and serial sections with MRI.* Springer.
- Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC.** 2009. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* **118**: 5–36.
- Elder G a, Gama Sosa M a, De Gasperi R.** 2010. Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Mt Sinai J Med* **77**: 69–81.
- Eskildsen SF, Coupé P, Fonov VS, Pruessner JC, Collins DL.** 2015. Structural imaging biomarkers of Alzheimer's disease: Predicting disease progression. *Neurobiol Aging* **36**.
- Evin G, Weidemann A.** 2002. Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease: A $\beta$  amyloid peptides. **23**: 1285–1297.
- Farina C, Aloisi F, Meini E.** 2007. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* **28**: 138–145.
- Forner S, Baglietto-Vargas D, Martini AC, Trujillo-Estrada L, LaFerla FM.** 2017. Synaptic Impairment in Alzheimer's Disease: A Dysregulated Symphony. *Trends Neurosci* **xx**: 1–11.
- Franco R, Fernández-Suárez D.** 2015. Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Prog Neurobiol* **131**: 65–86.
- 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.
- Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F.** 1995. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* **373**: 523–7.
- Garwood C., Ratcliffe L., Simpson J., Heath P., Ince P., Wharton S.** 2016. Review: Astrocytes in Alzheimer's disease and other age-associated dementias; a supporting player with a central role. *Neuropathol Appl Neurobiol*.
- Giri M, Zhang M, Lü Y.** 2016. Genes associated with Alzheimer's disease: An overview and current status. *Clin Interv Aging* **11**: 665–681.

- Gómez-Isla T, Price JL, McKeel DW, Morris JC, Growdon JH, Hyman BT.** 1996. Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci* **16**: 4491–4500.
- Gomez-Isla T, Spires T, De Calignon A, Hyman BT.** 2008. Neuropathology of Alzheimer's disease. *Handb Clin Neurol* **89**: 233–43.
- González H, Elgueta D, Montoya A, Pacheco R.** 2014. Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *J Neuroimmunol* **274**: 1–13.
- Götz J.** 2001. Tau and transgenic animal models. *Brain Res Rev* **35**: 266–286.
- Götz J, Probst A, Spillantini MG, Schäfer T, Jakes R, Bürki K, Goedert M.** 1995. Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform. *EMBO J* **14**: 1304–1313.
- Graham WV, Bonito-Oliva A, Sakmar TP.** 2017. Update on Alzheimer's Disease Therapy and Prevention Strategies. *Annu Rev Med* **68**: 413–430.
- Greter M, Lelios I, Croxford AL.** 2015. Microglia versus myeloid cell nomenclature during brain inflammation. *Front Immunol* **6**.
- Grieciuc A, Serrano-Pozo A, Parrado AR, Lesinski AN, Asselin CN, Mullin K, Hooli B, Choi S, Hyman BT, Tanzi RE.** 2013. Alzheimer's disease risk gene *cd33* inhibits microglial uptake of amyloid beta. *Neuron* **78**: 631–643.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung Y-C, Quinlan M, Wisniewski H, Binder L.** 1987. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Alzheimer Dis Assoc Disord* **1**: 202.
- Guerriero F, Sgarlata C, Francis M, Maurizi N, Faragli A, Perna S, Rondanelli M, Rollone M, Ricevuti G.** 2016. Neuroinflammation, immune system and Alzheimer disease: searching for the missing link. *Aging Clin Exp Res* **29**: 821–831.
- Guillot-Sestier M-V, Doty KR, Town T.** 2015. Innate Immunity Fights Alzheimer's Disease. *Trends Neurosci* **38**: 674–681.
- Haass C, Selkoe DJ.** 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 101–112.
- Haim L Ben, Rowitch D.** 2017. Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nat Rev Neurosci* **18**: 31–41.
- Hannula DE, Duu MC.** 2017. *The Hippocampus from Cells to Systems*.
- Hardy JA, Higgins GA.** 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **256**: 184–5.
- Hardy J, Allsop D.** 1991. Amyloid deposition as the central event in the etiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* **12**: 383–388.
- Hardy J, Selkoe DJ.** 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**: 353–356.
- 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**: 388–405.
- Heneka MT, O'Banion MK.** 2007. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol* **184**: 69–91.
- Heneka MT, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Dewachter I, Walter J, Klockgether T, Van Leuven F.** 2005. Focal glial activation coincides with increased BACE1 activation and precedes amyloid plaque deposition in APP[V717I] transgenic mice. *J Neuroinflammation* **2**: 22.
- Henson RN, Greve A, Cooper E, Gregori M, Simons JS, Geerligs L, Erzinçlioğlu S, Kapur N, Browne G.** 2016. The effects of hippocampal lesions on MRI measures of structural and functional connectivity. *Hippocampus* **26**: 1447–1463.
- Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B.** 2015. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci* **16**: 358–372.
- Herrup K.** 2015. The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nat Neurosci* **18**: 794–799.
- Herz J, Filiano AJ, Smith A, Yogev N, Kipnis J.** 2017. Myeloid Cells in the Central Nervous System. *Immunity* **46**: 943–956.
- Herzig MC, Winkler DT, Walker LC, Jucker M.** 2001. Transgenic mouse models of cerebral amyloid angiopathy. *Adv Exp Med Biol* **487**: 123–128.
- Hickman SE, El Khoury J.** 2014. TREM2 and the neuroimmunology of Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol* **88**: 495–498.



- Hickman SE, Kingery ND, Ohsumi TK, Borowsky ML, Wang L, Means TK, El Khoury J. 2013. The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nat Neurosci* **16**: 1896–905.
- Hiltunen M, van Groen T, Jolkkonen J. 2009. Functional roles of amyloid-beta protein precursor and amyloid-beta peptides: evidence from experimental studies. *J Alzheimers Dis* **18**: 401–412.
- 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.
- Holtzman DM, Carrillo MC, Hendrix JA, Bain LJ, Catafau AM, Gault LM, Goedert M, Mandelkow E, Mandelkow E-M, Miller DS, et al. 2016. Tau: From research to clinical development. *Alzheimers Dement* **12**: 1033–1039.
- Hong S, Beja-Glasser VF, Nfonoyim BM, Frouin A, Li S, Ramakrishnan S, Merry KM, Shi Q, Rosenthal A, Barres BA, et al. 2016. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science (80- )* **337**: 1–9.
- Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G. 1996. Correlative memory deficits, A $\beta$  elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science (80- )* **274**: 99–102.
- Huang K, Marcora E, Pimenova A, Di Narzo A, Kapoor M, Jin SC, Harari O, Bertelsen S, Fairfax B, Czajkowski J, et al. 2017. A common haplotype lowers PU.1 expression in myeloid cells and delays onset of Alzheimer's disease. *bioRxiv*.
- Iliff JJ, Nedergaard M. 2013. Is There a Cerebral Lymphatic System? *Stroke* **44**: S93–S95.
- Iqbal K, Grundke-Iqbal I. 2008. Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etipathogenesis, therapeutics and prevention. *J Cell Mol Med* **12**: 38–55.
- Iqbal K, Liu F, Gong C-X. 2015. Tau and neurodegenerative disease: the story so far. *Nat Rev Neurol* **12**: 1–14.
- Jankowsky JL, Slunt HH, Gonzales V, Savonenko A V, Wen JC, Jenkins NA, Copeland NG, Younkin LH, Lester HA, Younkin SG, et al. 2005. Persistent amyloidosis following suppression of A $\beta$  production in a transgenic model of Alzheimer disease. *PLoS Med* **2**: 1318–1333.
- Jankowsky JL, Slunt HH, Ratovitski T, Jenkins NA, Copeland NG, Borchelt DR. 2001. Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: A comparison of strategies. *Biomol Eng* **17**: 157–165.
- Jankowsky JL, Younkin LH, Gonzales V, Fadale DJ, Slunt HH, Lester HA, Younkin SG, Borchelt DR. 2007. Rodent A $\beta$  modulates the solubility and distribution of amyloid deposits in transgenic mice. *J Biol Chem* **282**: 22707–22720.
- Jha MK, Lee WH, Suk K. 2016. Functional polarization of neuroglia: Implications in neuroinflammation and neurological disorders. *Biochem Pharmacol* **103**: 1–16.
- 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  $\beta$  (A $\beta$ ) oligomers reverses the neuroprotective effect of soluble amyloid precursor protein- $\alpha$  (sAPP $\alpha$ ) by modulating phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt-GSK-3 $\beta$  pathway in Alzheimer mouse model. *J Biol Chem* **286**: 18414–18425.
- Kandalepas PC, Sadleir KR, Eimer WA, Zhao J, Nicholson DA, Vassar R. 2013. The Alzheimer's  $\beta$ -secretase BACE1 localizes to normal presynaptic terminals and to dystrophic presynaptic terminals surrounding amyloid plaques. *Acta Neuropathol* **126**: 329–352.
- Karch CM, Cruchaga C, Goate AM. 2014. Alzheimer's disease genetics: From the bench to the clinic. *Neuron* **83**: 11–26.
- Karran E, De Strooper B. 2016. The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? *J Neurochem* **139**: 237–252.
- Keren-shaul H, Spinrad A, Weiner A, Colonna M, Schwartz M, Amit I, Keren-shaul H, Spinrad A, Weiner A, Matcovitch-natan O, et al. 2017. Article A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease Article A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell* **169**: 1–15.
- Kim D, Tsai LH. 2009. Bridging Physiology and

- Pathology in AD. *Cell* **137**: 997–1000.
- 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.
- 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. *JAMA Neurol* **72**: 920.
- 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.
- Kurt MA, Davies DC, Kidd M, Duff K, Howlett DR.** 2003. Hyperphosphorylated tau and paired helical filament-like structures in the brains of mice carrying mutant amyloid precursor protein and mutant presenilin-1 transgenes. *Neurobiol Dis* **14**: 89–97.
- Kuruva CS, Reddy PH.** 2017. Amyloid beta modulators and neuroprotection in Alzheimer's disease: a critical appraisal. *Drug Discov Today* **22**: 223–233.
- Labzin LI, Heneka MT, Latz E.** 2017. Innate Immunity and Neurodegeneration. 1–13.
- Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, et al.** 1998. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci* **95**: 6448–6453.
- Laurijssens B, Aujard F, Rahman A.** 2013. Animal models of Alzheimer's disease and drug development. *Drug Discov Today Technol* **10**: e319–e327.
- 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**: 1487–91.
- Lewis J, McGowan E, Rockwood J, Melrose H, Nacharaju P, Van Slegtenhorst M, Gwinn-Hardy K, Paul Murphy M, Baker M, Yu X, et al.** 2000. Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet* **25**: 402–405.
- Li Y, Tan M-S, Jiang T, Tan L.** 2014. Microglia in Alzheimer's disease. *Biomed Res Int* **2014**: 437483.
- Liddelow SA, Barres BA.** 2017. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity* **46**: 957–967.
- Maccioni RB, Muñoz JP, Barbeito L.** 2001. The Molecular Bases of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *Arch Med Res* **32**: 367–381.
- Macleod R, Hillert E-K, Cameron RT, Baillie GS.** 2015. The role and therapeutic targeting of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase in Alzheimer's disease. *Futur Sci OA* **1**: 1–16.
- Mai JK, Paxinos G.** 2012. *The human nervous system*. Elsevier Academic Press.
- Malm TM, Koistinaho M, Pärepallo M, Vatanen T, Ooka A, Karlsson S, Koistinaho J.** 2005. Bone-marrow-derived cells contribute to the recruitment of microglial cells in response to  $\beta$ -amyloid deposition in APP/PS1 double transgenic Alzheimer mice. *Neurobiol Dis* **18**: 134–142.
- Masgrau R, Guaza C, Ransohoff RM, Galea E.** 2017. Should We Stop Saying "Glia" and "Neuroinflammation"? *Trends Mol Med* **xx**: 1–15.
- Masliah E, Mallory M, Hansen L, Alford M, Albright T, DeTeresa R, Terry R, Baudier J, Saitoh T.** 1991. Patterns of aberrant sprouting in alzheimer's disease. *Neuron* **6**: 729–739.
- Masuda T, Prinz M.** 2016. Microglia: A Unique Versatile Cell in the Central Nervous System. *ACS Chem Neurosci* **acschemneuro.5b00317**.
- McManus RM, Heneka MT.** 2017. Role of neuroinflammation in neurodegeneration: new insights. *Alzheimers Res Ther* **9**: 14.
- Medeiros R, LaFerla FM.** 2013. Astrocytes: Conductors of the Alzheimer disease neuroinflammatory symphony. *Exp Neurol* **239**: 133–138.
- Melanie Meyer-Luehmann1, Tara L. Spires-Jones1, Claudia Prada1, Monica Garcia-Alloza1, Alix de Calignon1, Anete Rozkalne1, Jessica Koenigsknecht-Talboo2 DMH, Brian J. Bacskai1 and BTH.** 2008. Rapid appearance and local toxicity of amyloid- $\beta$  plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature*

451: 720–724.

- Miners JS, Palmer JC, Tayler H, Palmer LE, Ashby E, Kehoe PG, Love S.** 2014. A $\beta$  degradation or cerebral perfusion? Divergent effects of multifunctional enzymes. *Front Aging Neurosci* **6**: 238.
- Minter MR, Taylor JM, Crack PJ.** 2016. The contribution of neuroinflammation to amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **136**: 457–474.
- Morales I, Guzman-Martinez L, Cerda-Troncoso C, Farias GA, Maccioni RB.** 2014. Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. *Front Cell Neurosci* **8**: 112.
- Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Del Rio JC, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, et al.** 2009. Extracellular amyloid- $\beta$  and cytotoxic glial activation induce significant entorhinal neuron loss in young PS1M146L/APP751SL mice. *J Alzheimer's Dis* **18**: 755–776.
- Morishima-Kawashima M, Ihara Y.** 2002. Alzheimer's disease: beta-Amyloid protein and tau. *J Neurosci Res* **70**: 392–401.
- Mosher KI, Wyss-Coray T.** 2014. Microglial dysfunction in brain aging and Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol* **88**: 594–604.
- Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K, McConlogue L.** 2000. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci* **20**: 4050–8.
- Mueller-Stainer S, Zhou Y, Arai H, Roberson ED, Sun B, Chen J, Wang X, Yu G, Esposito L, Mucke L, et al.** 2006. Anti-amyloidogenic and neuroprotective functions of Cathepsin B: Implications for Alzheimer's Disease. *Neuron* **51**: 703–714.
- Mufson EJ, Ginsberg SD, Ikonovic MD, DeKosky ST.** 2003. Human cholinergic basal forebrain: chemoanatomy and neurologic dysfunction. *J Chem Neuroanat* **26**: 233–242.
- Müller U, Winter P, Graeber MB.** 2013. Correspondence A presenilin 1 mutation in the first case of Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* **4422**: 10–11.
- Müller UC, Deller T, Korte M.** 2017. Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nat Rev Neurosci* **18**: 281–298.
- Musiek ES, Holtzman DM.** 2015. Three dimensions of the amyloid hypothesis: time, space and "wingmen." *Nat Neurosci* **18**: 800–806.
- Nagele RG, D'Andrea MR, Lee H, Venkataraman V, Wang H.** 2003. Astrocytes accumulate A beta 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains. *Brain Res* **971**: 197–209.
- Nasrallah IM, Wolk DA.** 2014. Multimodality Imaging of Alzheimer Disease and Other Neurodegenerative Dementias. *J Nucl Med* **55**: 2003–2011.
- Neha, Sodhi RK, Jaggi AS, Singh N.** 2014. Animal models of dementia and cognitive dysfunction. *Life Sci* **109**: 73–86.
- Newman M, Ebrahimie E, Lardelli M.** 2014. Using the zebrafish model for Alzheimer's disease research. *Front Genet* **5**: 189.
- Nguyen KV.** 2015. The human  $\beta$ -amyloid precursor protein: Biomolecular and epigenetic aspects. *Biomol Concepts* **6**: 11–32.
- Nikolaev A, McLaughlin T, O'Leary DDM, Tessier-Lavigne M.** 2009. APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature* **457**: 981–989.
- Nixon RA, Yang DS.** 2011. Autophagy failure in Alzheimer's disease-locating the primary defect. *Neurobiol Dis* **43**: 38–45.
- O'Brien RJ, Wong PC.** 2011. Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annu Rev Neurosci* **34**: 183–202.
- 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  $\beta$ -Amyloid Aggregates, Neurodegeneration, and Neuron Loss in Transgenic Mice with Five Familial Alzheimer's Disease Mutations: Potential Factors in Amyloid Plaque Formation. *J Neurosci* **26**: 10129–10140.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM.** 2003. Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles, Intracellular A $\beta$  and Synaptic Dysfunction. *Neuron* **39**: 409–421.
- Osborn LM, Kamphuis W, Wadman WJ, Hol EM.**

2016. Astroglisis: An integral player in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* **144**: 121–141.
- Perl DP.** 2010. Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med* **77**: 32–42.
- Pitkänen a, Pikkarainen M, Nurminen N, Ylinen a.** 2000. Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Ann N Y Acad Sci* **911**: 369–391.
- Price JL, Ko a I, Wade MJ, Tsou SK, McKeel DW, Morris JC.** 2001. Neuron number in the entorhinal cortex and CA1 in preclinical Alzheimer disease. *Arch Neurol* **58**: 1395–1402.
- Prince M, Comas-Herrera A, Knapp M, Guerchet M, Karagiannidou M.** 2016. *World Alzheimer Report 2016 Improving healthcare for people living with dementia*.
- Rajendran L, Annaert W.** 2012. Membrane Trafficking Pathways in Alzheimer's Disease. *Traffic* **13**: 759–770.
- Ramos B, Baglietto-Vargas D, Rio JC Del, Moreno-Gonzalez I, Santa-Maria C, Jimenez S, Caballero C, Lopez-Tellez JF, Khan ZU, Ruano D, et al.** 2006. Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1/APP transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **27**: 1658–1672.
- Ramsden M, Kotilinek L, Forster C, Paulson J, McGowan E, SantaCruz K, Guimaraes A, Yue M, Lewis J, Carlson G, et al.** 2005. Age-dependent neurofibrillary tangle formation, neuron loss, and memory impairment in a mouse model of human tauopathy (P301L). *J Neurosci* **25**: 10637–47.
- Ransohoff RM.** 2016. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat Neurosci* **19**: 987–91.
- 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.
- Riedel BC, Thompson PM, Brinton RD.** 2016. Age, APOE and sex: Triad of risk of Alzheimer's disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* **160**: 134–147.
- Rodríguez-Arellano JJ, Parpura V, Zorec R, Verkhatsky A.** 2016. Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience* **323**: 170–182.
- Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva E a, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T.** 1995. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* **376**: 775–778.
- Rosenberg RN, Lambracht-Washington D, Yu G, Xia W.** 2016. Genomics of Alzheimer Disease. *JAMA Neurol* **73**: 867.
- Rosenmann H, Grigoriadis N, Eldar-Levy H, Avital A, Rozenstein L, Touloumi O, Behar L, Ben-Hur T, Avraham Y, Berry E, et al.** 2008. A novel transgenic mouse expressing double mutant tau driven by its natural promoter exhibits tauopathy characteristics. *Exp Neurol* **212**: 71–84.
- Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerrière A, Vital A, Dumanchin C, Feuillette S, Brice A, Vercelletto M, et al.** 2006. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet* **38**: 24–6.
- Ruan L, Kang Z, Pei G, Le Y.** 2009. Amyloid deposition and inflammation in APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* **6**: 531–540.
- 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 A $\beta$  generation in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **132**: 1–22.
- Sakono M, Zako T.** 2010. Amyloid oligomers: Formation and toxicity of A $\beta$  oligomers. *FEBS J* **277**: 1348–1358.
- Salter MW, Stevens B.** 2017. Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat Med* **23**: 1018–1027.
- Sanchez-Mejias E.** 2015. Estudio neuropatológico del hipocampo y giro parahipocampal en la enfermedad de Alzheimer: de modelos transgénicos a humanos.
- Sanchez-Mejias E, Navarro V, Jimenez S, Sanchez-Mico M, Sanchez-Varo R, Nuñez-Díaz 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-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.
- 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**: e201797397.
- Schafer DP, Stevens B. 2015. Microglia function in central nervous system development and plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**: a020545.
- Schäfer MK-H, Eiden L, Weihe E. 1998. Cholinergic neurons and terminal fields revealed by immunohistochemistry for the vesicular acetylcholine transporter. I. Central nervous system. *Neuroscience* **84**: 331–359.
- 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.
- Schwartz M, Deczkowska A. 2016. Neurological Disease as a Failure of Brain-Immune Crosstalk: The Multiple Faces of Neuroinflammation. *Trends Immunol* **37**: 668–679.
- Selkoe DJ. 2001. Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. *Perspective* **81**: 741–767.
- Selkoe DJ. 2008. Biochemistry and Molecular Biology of Amyloid  $\beta$ -Protein and the Mechanism of Alzheimer's Disease. *Handb Clin Neurol* **89**: 245–260.
- Selkoe DJ, Hardy J. 2016. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* **8**: 1–14.
- Serrano-Pozo A, Mielke ML, Gómez-Isla T, Betensky R a., 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**: 462–71.
- Shen J, Bronson RT, Chen DF, Xia W, Selkoe DJ, Tonegawa S. 1997. Skeletal and CNS Defects in Presenilin-1-Deficient Mice. *Cell* **89**: 629–639.
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, et al. 1995. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* **375**: 754–760.
- Sims R, van der Lee SJ, Naj AC, Bellenguez C, Badarinarayan N, Jakobsdottir J, Kunkle BW, Boland A, Raybould R, Bis JC, et al. 2017. Rare coding variants in PLCG2, ABI3, and TREM2 implicate microglial-mediated innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat Genet* **49**: 1373–1384.
- Sochocka M, Diniz BS, Leszek J. 2016. Inflammatory Response in the CNS: Friend or Foe? *Molecular Neurobiology*, November 26.
- Sofroniew M V., Vinters H V. 2010. Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathol* **119**: 7–35.
- Squire LR, Zola SM. 1996. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 13515–13522.
- Streit WJ, Xue QS. 2009. Life and death of microglia. *J Neuroimmune Pharmacol* **4**: 371–379.
- Streit WJ, Xue QS, Braak H, del Tredici K. 2014. Presence of severe neuroinflammation does not intensify neurofibrillary degeneration in human brain. *Glia* **62**: 96–105.
- Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Bürki K, Frey P, Paganetti PA, et al. 1997. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 13287–92.
- Sun X, Chen WD, Wang YD. 2015.  $\beta$ -Amyloid: The key peptide in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Front Pharmacol* **6**: 221.
- Takahashi RH, Nagao T, Gouras GK. 2017. Plaque formation and the intraneuronal accumulation of  $\beta$ -amyloid in Alzheimer's disease. *Pathol Int* **67**: 185–193.
- Tanemura K, Akagi T, Murayama M, Kikuchi N, Murayama O, Hashikawa T, Yoshiike Y, Park JM, Matsuda K, Nakao S, et al. 2001. Formation of filamentous tau aggregations in transgenic mice expressing V337M human tau.



*Neurobiol Dis* **8**: 1036–1045.

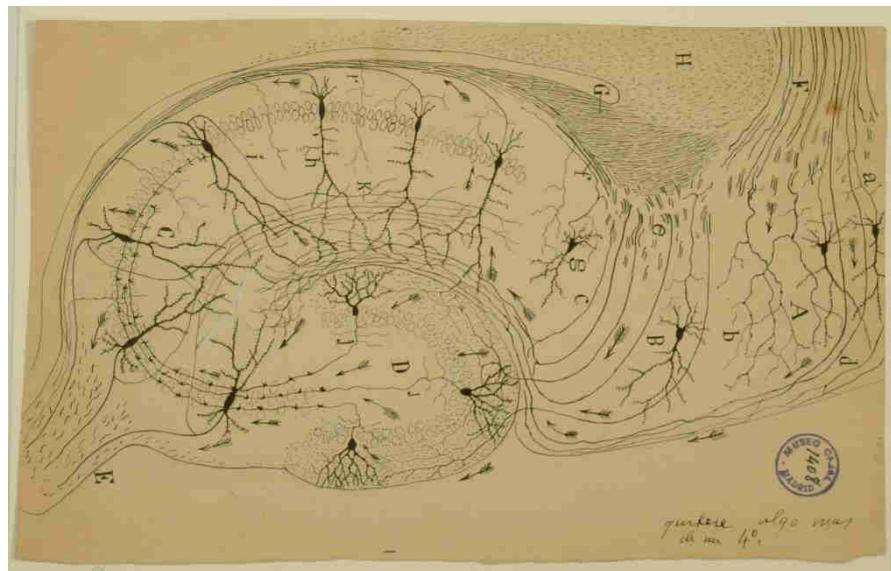
- Tang Y, Le W.** 2016. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol* **53**: 1181–1194.
- Tatarnikova OG, Orlov MA, Bobkova N V.** 2015. Beta-Amyloid and Tau-Protein: Structure, Interaction, and Prion-Like Properties. *Biochem* **80**: 1800–1819.
- Tatebayashi Y, Miyasaka T, Chui D-H, Akagi T, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Tanemura K, Murayama M, Ishiguro K, et al.** 2002. Tau filament formation and associative memory deficit in aged mice expressing mutant (R406W) human tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 13896–901.
- ter Laak HJ, Renkawek K, van Workum FP.** 1994. The olfactory bulb in Alzheimer disease: a morphologic study of neuron loss, tangles, and senile plaques in relation to olfaction. *Alzheimer Dis Assoc Disord* **8**: 38–48.
- Terry RD.** 2000. Cell Death or Synaptic Loss in Alzheimer Disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **59**: 1118–1119.
- Thinakaran G, Borchelt DR, Lee MK, Slunt HH, Spitzer L, Kim G, Ratovitsky T, Davenport F, Nordstedt C, Seeger M, et al.** 1996. Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron* **17**: 181–190.
- Thinakaran G, Koo EH.** 2008. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem* **283**: 29615–29619.
- Tomita T.** 2017. Aberrant proteolytic processing and therapeutic strategies in Alzheimer disease. *Adv Biol Regul.*
- 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- $\beta$  Accumulation in A $\beta$ PP/PS1 Alzheimer's Disease Mice Subiculum. *J Alzheimers Dis* **42**: 521–541.
- Trujillo-Estrada L, Jimenez S, De Castro V, Torres M, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Navarro V, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mejias E, Davila JC, et al.** 2013. In vivo modification of Abeta plaque toxicity as a novel neuroprotective lithium-mediated therapy for Alzheimer's disease pathology. *Acta Neuropathol Commun* **1**: 73.
- Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC.** 2003. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory.
- Van Dam D, De Deyn PP.** 2011. Animal models in the drug discovery pipeline for Alzheimer's disease. *Br J Pharmacol* **164**: 1285–1300.
- van Norden AGW, van Uden IWM, de Laat KF, van Dijk EJ, de Leeuw F-E.** 2012. Cognitive function in small vessel disease: the additional value of diffusion tensor imaging to conventional magnetic resonance imaging: the RUN DMC study. *J Alzheimer's Dis* **32**: 667–676.
- van Strien NM, Cappaert NLM, Witter MP.** 2009a. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat Rev Neurosci* **10**: 272–82.
- Vassar R, Kovacs DM, Yan R, Wong PC.** 2009. The - Secretase Enzyme BACE in Health and Alzheimer's Disease: Regulation, Cell Biology, Function, and Therapeutic Potential. *J Neurosci* **29**: 12787–12794.
- Vereecken THLG, Vogels OJM, Nieuwenhuys R.** 1994. Neuron loss and shrinkage in the amygdala in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **15**: 45–54.
- Verkhratsky A, Olabarria M, Noristani HN, Yeh CY, Rodriguez JJ.** 2010. Astrocytes in Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics* **7**: 399–412.
- Verkhratsky A, Parpura V, Pekna M, Pekny M, Sofroniew M.** 2014. Glia in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Biochem Soc Trans* **42**: 1291–1301.
- Vetrivel KS, Zhang Y, Xu H, Thinakaran G.** 2006. Pathological and physiological functions of presenilins. *Mol Neurodegener* **1**: 4.
- Villegas-Llerena C, Phillips A, Reitboeck PG, Hardy J, Pocock JM.** 2016. Microglial genes regulating neuroinflammation in the progression of Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol* **36**: 74–81.
- Viola KL, Klein WL.** 2015. Amyloid  $\beta$  oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. *Acta Neuropathol* **129**: 183–206.

- Vogels OJ, Broere CA, ter Laak HJ, ten Donkelaar HJ, Nieuwenhuys R, Schulte BP.** 1990. Cell loss and shrinkage in the nucleus basalis Meynert complex in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **11**: 3–13.
- von Bernhardt R, Eugenín-von Bernhardt L, Eugenín J.** 2015. Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration. *Front Aging Neurosci* **7**.
- Walsh DM, Selkoe DJ.** 2007. A $\beta$  oligomers - A decade of discovery. *J Neurochem* **101**: 1172–1184.
- Wang JZ, Xia YY, Grundke-Iqbal I, Iqbal K.** 2012. Abnormal hyperphosphorylation of tau: Sites, regulation, and molecular mechanism of neurofibrillary degeneration. *Adv Alzheimer's Dis* **3**: 123–139.
- Wilkins HM, Swerdlow RH.** 2017. Amyloid precursor protein processing and bioenergetics. *Brain Res Bull* **133**: 71–79.
- Wiseman FK, Al-Janabi T, Hardy J, Karmiloff-Smith A, Nizetic D, Tybulewicz VLJ, Fisher EMC, Strydom A.** 2015. A genetic cause of Alzheimer disease: mechanistic insights from Down syndrome. *Nat Rev Neurosci* **16**: 564–74.
- Wolk DA, Dunfee KL, Dickerson BC, Aizenstein HJ, Dekosky ST.** 2011. A medial temporal lobe division of labor: Insights from memory in aging and early Alzheimer disease. *Hippocampus* **21**: 461–466.
- Wu Y, Dissing-Olesen L, MacVicar BA, Stevens B.** 2015. Microglia: Dynamic Mediators of Synapse Development and Plasticity. *Trends Immunol* **36**: 605–613.
- Wyss-Coray T, Loike JD, Brionne TC, Lu E, Anankov R, Yan F, Silverstein SC, Husemann J.** 2003. Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med* **9**: 453–457.
- 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 a $\beta$  clearance and attenuates amyloid plaque pathogenesis. *J Neurosci* **34**: 9607–20.
- Yeh FL, Hansen D V., Sheng M.** 2017. TREM2, Microglia, and Neurodegenerative Diseases. *Trends Mol Med* **23**: 512–533.
- 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* **90**: 724–739.
- Zhang Y, Thompson R, Zhang H, Xu H.** 2011. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain* **4**: 3.
- Zuroff L, Daley D, Black KL, Koronyo-Hamaoui M.** 2017. Clearance of cerebral A $\beta$  in Alzheimer's disease: reassessing the role of microglia and monocytes. *Cell Mol Life Sci* **74**: 2167–2201.





## 2. MATERIAL Y MÉTODOS



Santiago Ramón y Cajal



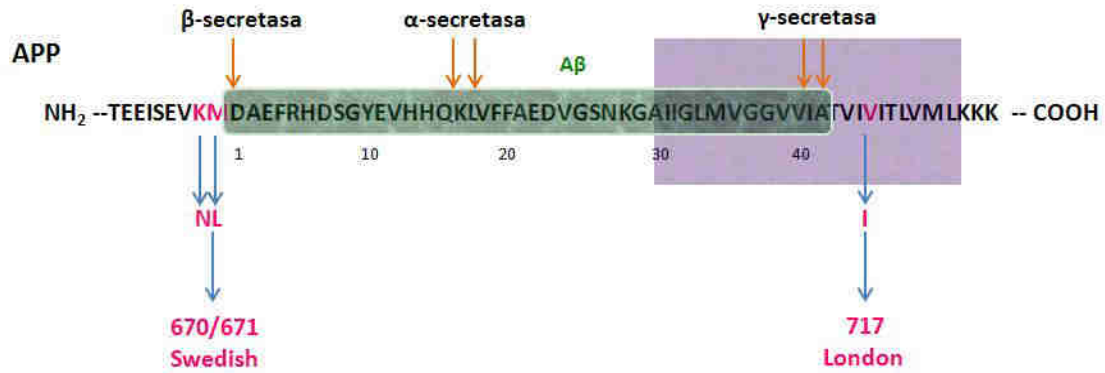
# 2.1 SUJETOS DE ESTUDIO

## 2.1.1. Animales de experimentación

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

- Ratones doble transgénicos APP<sub>751SL</sub>/PS1<sub>M146L</sub> (APP/PS1) con fondo genético C57BL/6 (Blanchard et al. 2003). Estos animales fueron obtenidos mediante cruces de ratones transgénicos homocigotos PS1<sub>M146L</sub>, con ratones transgénicos heterocigotos APP<sub>751SL</sub> (Fig. 2.1). Los ratones APP/PS1 se caracterizan por sobreexpresar la forma humana mutada (M146L) de la presenilina-1 bajo el control del promotor HMGCoA-reductasa, junto a la sobreexpresión del APP<sub>751</sub> humano con las mutaciones *Swedish* (KM670/671NL) y *London* (V717I) del Alzheimer familiar, bajo el control del promotor Thy-1. Los ratones pertenecen a la generación F6-F10 de los ratones transgénicos heterocigotos (ver esquema de los cruces en la Fig. 2.2)
- Ratones triple transgénicos PS1<sub>M146V</sub>/APP<sub>Swe</sub>/Tau<sub>P301L</sub> (3xTgAD). Estos ratones proceden de la microinyección conjunta del gen APP con la mutación *Swedish* (KM670/671NL) y el gen para la proteína humana Tau (en su isoforma 4R/2N) con la mutación P301L, ambos bajo el control del promotor Thy-1 en un animal PS1<sub>M146V</sub> KI (Oddo et al. 2003). Estos animales (con fondo genético C57BL/6) han sido generados en el laboratorio del Dr. Frank LaFerla, en el que se llevó a cabo el Objetivo 3 (Apdo. 1.7) durante una estancia pre-doctoral en la Universidad de California, Irvine (EEUU).

Además, como controles se han utilizado ratones no transgénicos (*wild type*, WT) del mismo fondo genético y edad. En cada diseño experimental, las muestras de diferentes genotipos y edades fueron procesadas de forma simultánea.



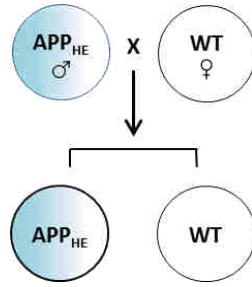
**Figura 2.1** Esquema de las mutaciones del Alzheimer familiar que contiene la proteína humana APP<sub>751</sub> en el modelo transgénico APP<sub>751SL</sub>/PS1<sub>M146L</sub>. En la figura se muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína humana APP, indicando la doble mutación presente en los animales transgénicos APP/PS1. Se trata de las mutaciones Swedish (doble mutación en los aminoácidos 670 y 671 [KM670/671NL]) y London (ocurre en el aminoácido 717 [V717I]). La secuencia resaltada de color verde indica los aminoácidos que dan lugar a la proteína β-amiloide tras su procesamiento proteolítico, esta secuencia no se ve afectada directamente por ninguna de las mutaciones anteriores. La zona morada corresponde a la fracción de membrana y las flechas naranjas están indicando las zonas de corte de las enzimas implicadas en el procesamiento de esta proteína. Se pueden producir hasta 8 isoformas diferentes de APP por procesamiento alternativo, siendo la isoforma 751 la que se sobreexpresa en nuestro modelo animal.

Los animales transgénicos APP<sub>751SL</sub>/PS1<sub>M146L</sub>, así como los parentales PS1 y APP para formar las correspondientes colonias y generar los dobles transgénicos, han sido suministrados por la industria farmacéutica Sanofi (París, Francia) a través de Charles-River Laboratories (Francia).

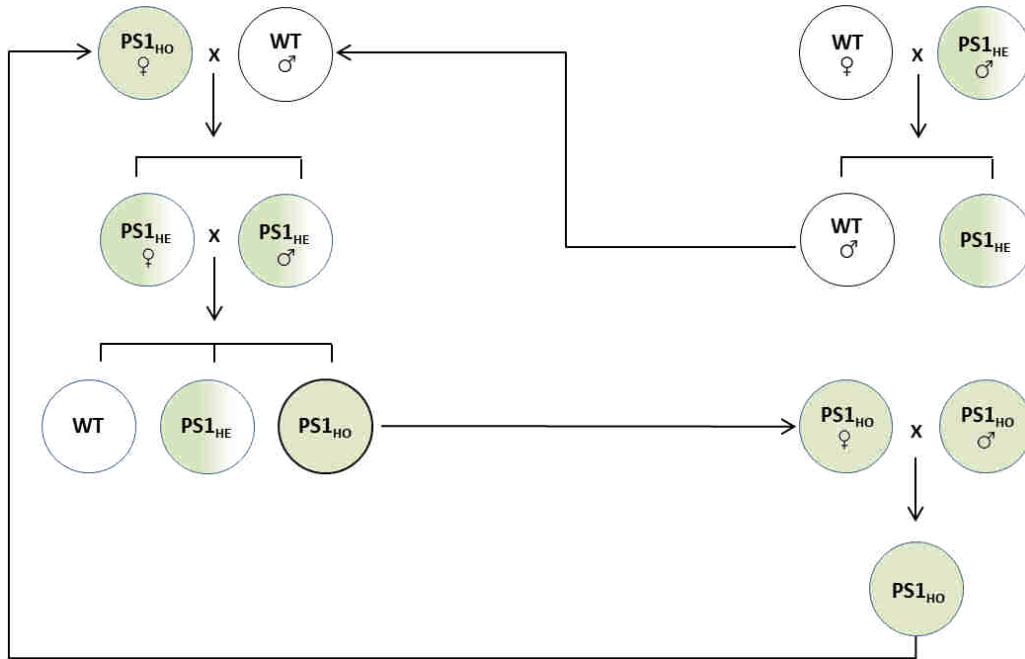
La generación y caracterización inicial de los ratones transgénicos APP<sub>751SL</sub>/PS1<sub>M146L</sub> ha sido previamente descrita (Blanchard et al. 2003; Ramos et al. 2006; Caballero et al. 2007; Jimenez et al. 2008, 2011; Moreno-Gonzalez et al. 2009; Sanchez-Varo et al. 2012; Torres et al. 2012; Trujillo-Estrada et al. 2013, 2014). Los animales se mantuvieron en el estabulario de los Servicios Centrales de Investigación de la Universidad de Málaga bajo condiciones de temperatura media controlada de 21±1°C y un fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 de oscuridad. Durante el tiempo de permanencia en el estabulario, los animales tuvieron libre acceso al agua y una dieta *ad libitum* estándar.

Para realizar el genotipado de los animales mediante PCR convencional, se tomaron muestras de ADN de las crías 8-9 días tras el parto. A la PCR le seguía una electroforesis en la que se comprobaba la presencia o ausencia de la banda correspondiente a los transgenes APP (cruces APP x WT y PS1 x APP) o PS1 (cruces PS1<sub>HE</sub> x WT y PS1<sub>HE</sub> x PS1<sub>HE</sub>).

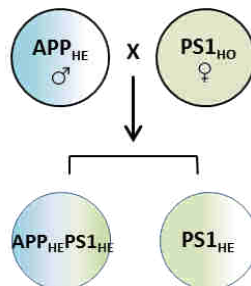
### A. Mantenimiento de parentales heterocigotos para APP ( $APP^{+/-}$ )



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



### C. Generación de animales $APP^{+/-}/PS1^{+/-}$



**Figura 2.2. Esquema del mantenimiento de parentales y generación de animales doble transgénicos APP/PS1.** Para el mantenimiento de los animales parentales (A) APP heterocigotos, únicamente es necesario cruzarlos con hembras WT, siendo la mitad de la descendencia APP heterocigota ( $APP_{HE}$ ). En cambio, para mantener los parentales PS1 (B) se requieren varios cruces sucesivos para recuperar la homocigosis de los mismos. Es importante, además, que cada cierto tiempo se vayan añadiendo en estos cruces nuevos animales WT para el mantenimiento del vigor híbrido. En cuanto a la generación de los animales doble transgénicos APP/PS1 (C) es suficiente con cruzar machos  $APP_{HE}$  con hembras  $PS1_{HO}$  resultantes de los cruces anteriores. HE, heterocigoto; HO, homocigoto.

El número total de animales empleado en este trabajo fue de 34, de los cuales 20 pertenecían al genotipo APP/PS1 (n=4, 8 y 8 animales APP/PS1 de 4, 6 y 12 meses de edad respectivamente) y 14 fueron animales controles, WT (n=4, 5 y 5 animales WT de 4, 6 y 12 meses de edad respectivamente).

Todos los experimentos se llevaron a cabo en la Universidad de Málaga de acuerdo con el RD 1201/2005 del 10 de octubre (BOE 21/10/2005) para el mantenimiento y uso de animales de laboratorio, y de acuerdo con el Real Decreto 53/2013 del 1 de febrero (BOE 08/02/2013) para la protección de los animales utilizados en experimentación. Además, los experimentos fueron aprobados por el Comité de Uso de Animales para la Investigación de la Universidad de Málaga. El número de animales utilizados, así como el estrés y sufrimiento de éstos durante la manipulación y experimentación fueron reducidos al máximo, de acuerdo a la regla de las 3R (reemplazar, reducir y refinar).

Los animales 3xTgAD empleados durante la estancia en el laboratorio del Dr. LaFerla (Tabla 2.1) fueron mantenidos en el estabulario del *Institute for Memory Impairments and Neurological Disorders* (UCI MIND) bajo condiciones estándar de temperatura ( $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) y un ciclo de 12 h de luz-oscuridad. Todos los experimentos con estos animales se llevaron a cabo de acuerdo a las normas del *National Institute of Health* (NIH).

**Tabla 2. 1. Relación de animales empleados para el objetivo 3 del presente trabajo de Tesis Doctoral**

Virus Adenoasociado	Genotipo		
	Ntg	3xTg-AD	
Ctrl-AAV	10	10	
Tollip-sh	10	10	
Tom-sh	10	10	
Tom-AAV	10	10	
<b>Total Animales</b>	<b>40</b>	<b>40</b>	<b>80</b>

### 2.1.2. Muestras humanas *post mortem*

Las muestras *post mortem* de cerebro humano (hipocampo) fueron obtenidas de los Biobancos de Barcelona (Instituto de Neuropatología, Servicio de Anatomía Patológica, perteneciente al IDIBELL-Hospital Universitario de Bellvitge) y de Madrid (Banco de Tejidos BT-CIEN, perteneciente a la Fundación CIEN del Instituto de Salud Carlos III), siguiendo las normas generales de la legislación española y del comité ético local.

Tras la autopsia de los pacientes, el tejido se procesó y se examinó para su clasificación de acuerdo a la patología de tau según los estadios de Braak (Braak and Braak 1991), una vez identificados los signos y cambios neuropatológicos asociados a la EA. Los cerebros controles

procedieron de individuos sin ninguna enfermedad psiquiátrica/neurológica conocida y no se observaron lesiones ni síntomas neurológicos tras realizar el examen neuropatológico.

**Tabla 2. 2. Relación de los casos humanos analizados en el presente estudio.** TPM, intervalo de tiempo *post mortem*; Braak, clasificación en los estadios de Braak (0-VI)

Braak	Género		Edad	TPM
	Hombre (%)	Mujer (%)		
<b>A. Muestras no fijadas</b>				
0 (n=8)	62,5	37,5	49 ± 6	8 ± 5
II (n=13)	61,54	38,46	78 ± 8,5	7 ± 4
III-IV (n=9)	44,44	55,56	80 ± 11	6 ± 5
V-VI (n=18)	38,89	61,11	79 ± 10	8 ± 4
<b>B. Muestras fijadas</b>				
III-IV (n=10)	50	50	79 ± 7	10 ± 5
V-VI (n=16)	43,8	56,20	78 ± 10	9 ± 5

## 2.2

## ESTUDIOS IN VIVO

### 2.2.1. Inyecciones estereotáxicas intrahipocampales

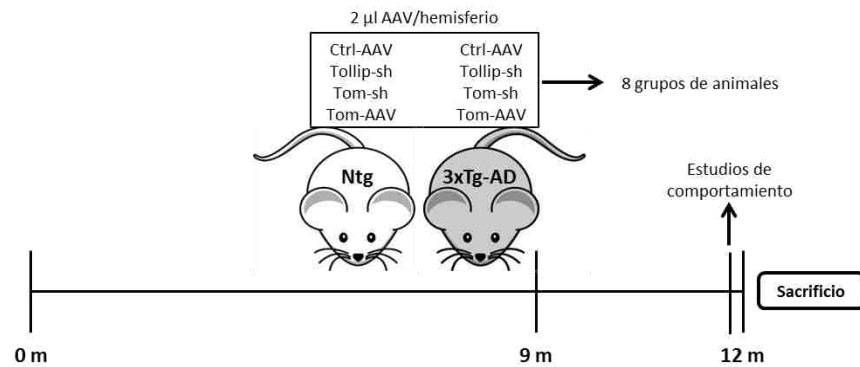
Para comprobar *in vivo* el papel de la endocitosis de IL-1 $\beta$  en la patología de A $\beta$  y Tau se emplearon animales transgénicos 3xTgAD en lo que se manipuló la expresión de las proteínas endosomales Tom1 y Tollip mediante virus adeno-asociados (AAV; del inglés *Adeno-Associated Virus*). Tollip (del inglés "*Toll-interacting protein*") es una proteína adaptadora localizada en los endosomas tempranos, implicada a través de su asociación con Tom1, en el tráfico de IL-1R1.

Se emplearon 4 tipos distintos de virus adeno-asociados: Tom-AAV para la sobreexpresión de Tom1, Tom-sh para silenciar la expresión de Tom1, Tollip-sh que permite silenciar la expresión de Tollip y Ctrl-AAV que es el virus adeno-asociado utilizado como control. Todos ellos son virus correspondientes al serotipo 1 (AAV1), caracterizados por presentar un tropismo neuronal, bajo el control de promotores no específicos neuronales U6 (Tom-sh, Tollip-sh y Ctrl-AAV) o CAG (Tom-AAV). Además, los vectores Tom-sh y Tollip-sh incorporan la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control de promotores constitutivos, lo que permite comprobar la correcta inyección del AAV. Los virus adeno-asociados para Tom-sh y Tollip-sh promueven la formación de una secuencia de ARN monocatenario, sh-ARN, cuya unión al ARNm correspondiente a Tom1 y Tollip promueve su degradación, resultando finalmente en el silenciamiento génico de Tom1 y Tollip. Por otro lado, Tom-AAV contiene la secuencia para la síntesis de Tom1 bajo el control del promotor constitutivo CAG, resultando en una elevada expresión de la proteína Tom1.

Los animales, tanto 3xTgAD, y sus respectivos controles WT, se dividieron en 4 grupos cada uno (A-D y E-H). Los grupos A-D estaban formados por animales 3xTgAD inyectados con Ctrl-AAV, Tom-AAV, Tom-sh o Tollip-sh respectivamente, mientras que los grupos E-H correspondían a animales WT inyectados con Ctrl-AAV, Tom-AAV, Tom-sh o Tollip-sh respectivamente. Cada grupo experimental estaba formado por 10 animales.

El procedimiento experimental consistió en una única inyección del AAV (Vector Biolabs, USA) ( $2,7 \times 10^{13}$  copias de genoma/ml; 2  $\mu$ l inyectados/hemisferio cerebral) mediante estereotaxia en la región CA1 del hipocampo en ambos hemisferios cerebrales. Los animales (transgénicos y controles) fueron inyectados a los 9 meses de edad y sacrificados a los 12 meses de edad. Para llevar a cabo este proceso, en primer lugar, el ratón fue anestesiado profundamente en una cámara anestésica con un flujo constante de isoflurano y O<sub>2</sub>. Cuando el animal estaba dormido y carecía de reflejos en las patas, se colocaba en el aparato de estereotaxia (Modelo 940, KOPF) y se le acoplaba una mascarilla por la que seguía pasando un flujo constante de isoflurano con el fin de evitar que el animal despertara durante la operación. A continuación, es necesario colocar y fijar correctamente la cabeza del animal para que el cerebro quede lo más recto posible y las coordenadas estereotáxicas sean las adecuadas, tras lo cual pasamos a localizar las coordenadas de Bregma y Lambda que nos servirán como punto de referencia. Una vez localizadas, establecemos en el aparato estereotáxico las coordenadas correspondientes a la región a inyectar, en este caso la región CA1 del hipocampo y es en este punto en el que realizamos un pequeño agujero en el cráneo con ayuda de un taladro quirúrgico. Seguidamente, procedemos de manera muy lenta a realizar la inyección del AAV correspondiente mediante una jeringa de inyección Hamilton (Modelo 1801 RN SYR, Hamilton Robotics). Este mismo proceso se realiza ahora en el otro hemisferio cerebral, de manera que realizamos la inyección en la misma región en ambos hipocampos. Por último y con ayuda de un pegamento veterinario cerramos la piel de la cabeza del animal.





**Figura 2.3.** Diseño experimental empleado para la sobreexpresión/supresión de las proteínas Tom1/Tollip en el hipocampo de animales nTg y 3xTgAD.

Tras la cirugía, dejamos a los animales en su jaula unos minutos para que despierten de la anestesia y se recuperen. En el agua que beben los ratones se les administra un analgésico para aliviar las molestias que puedan tener los días posteriores a la intervención. Este tratamiento analgésico se prolongó durante 3-4 días.

### 2.2.2. Evaluación cognitiva de ratones transgénicos 3xTgAD

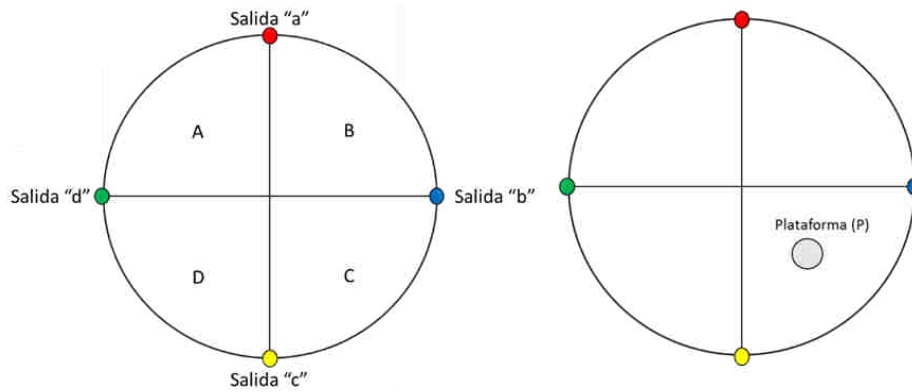
Los animales inyectados con AAV fueron evaluados cognitivamente con diferentes pruebas conductuales. Para estos estudios se empleó un total de 80 animales de diferentes grupos y/o genotipo, siendo todos los ratones empleados machos de la misma edad (12 meses) (Tabla 2.1).

Todos los animales se mantuvieron en grupos de 3 o 4/jaula, con comida y bebida *ad libitum* y manteniendo condiciones de temperatura y humedad constantes. Los experimentos de comportamiento se llevaron a cabo en las instalaciones del animalario de la Universidad de California, Irvine (EEUU), siempre en el periodo de luz del ciclo de luz/oscuridad y el experimentador desconocía siempre el genotipo y/o el grupo animal experimental.

#### 2.2.2.1 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 (Navarrete et al. 2008). La prueba se lleva a cabo en una piscina redonda donde los animales tienen que nadar con el fin de encontrar una plataforma oculta en el agua, guiándose para ello de una serie de claves espaciales (Morris 1984).

Para ello los animales fueron entrenados en una piscina circular (diámetro, 120 cm; altura, 60 cm), llena de agua (22-24°C) teñida con ténpera líquida blanca no tóxica (Q-Connect) a fin de que la plataforma no sea visible. La plataforma de escape (14 cm de diámetro) se mantiene a 30 cm del borde de la piscina y la piscina se divide en 4 cuadrantes imaginarios (A, B, C y D), situándose la plataforma en el centro del cuadrante C, sumergida 1.5 cm por debajo del nivel del agua (Fig. 2.4).



**Figura 2.4. Representación del laberinto acuático de Morris.** En el esquema se muestra la piscina con los 4 cuadrantes imaginarios y los 4 puntos de salida del animal (izquierda). A la derecha se muestra la situación de la plataforma en el cuadrante C.

Durante la fase de adquisición, la plataforma de escape se mantiene fija en el cuadrante establecido y se varía el punto de salida del animal de forma pseudo-aleatoria. Cada animal es sometido a 4 sesiones de entrenamiento diario separadas por intervalos de 25 segundos aproximadamente. Cada ratón se introduce por uno de los puntos de salida y se le deja libremente para que busque la plataforma. Después de que el animal haya encontrado la plataforma, se le deja durante 10s y se detiene el ensayo; en caso de no encontrar la plataforma se detiene el ensayo tras 60s y se guía al ratón hacia ella. La fase de adquisición se prolongó durante 5 días en total.

La fase de prueba o retención tiene lugar 24h tras el último ensayo. Durante esta fase se retira la plataforma y se permite al ratón buscarla durante 60s, mientras se monitoriza su actividad conductual con una cámara de video de forma computarizada mediante el sistema Ethovision XT 7 (Noldus, Holanda).

El parámetro analizado para los ensayos de la fase de adquisición fue la latencia de escape, es decir, el tiempo que transcurre desde que se sitúa al ratón en la piscina hasta que alcanza la plataforma. Durante la fase de prueba se tuvo en cuenta el tiempo que tardaron los animales en cruzar por primera vez por encima de la zona donde debería estar la plataforma, así como el tiempo que emplean nadando en el cuadrante donde originalmente estaba la plataforma. Para descartar problemas motores o visuales se midieron tanto la distancia total recorrida por los animales (cm) como la velocidad de nado (cm/s).

#### 2.2.2.2. Test del miedo condicionado

El test de miedo condicionado (CFC, del inglés *Contextual Fear Conditioning*) para roedores se basa en la asociación de un estímulo negativo, como una descarga eléctrica, a un estímulo no negativo como es una habitación iluminada (Curz et al. 2009). Este test se emplea fundamentalmente como medida de la memoria asociativa.

En primer lugar, se entrena a los animales (fase de aprendizaje) situándolos en un compartimento iluminado, donde reciben 3 pequeñas descargas eléctricas. Cada animal es sometido a un único entrenamiento, tras el cual se lleva a cabo la fase de retención. Así, la fase de prueba o retención tiene lugar 24h tras el aprendizaje y en ella se sitúa de nuevo al animal en la habitación iluminada durante 5 minutos, con el objetivo de determinar si recuerda el estímulo negativo que recibió allí el día anterior. El parámetro analizado para este test fue el *Freezing index*, consistente en contabilizar cada 10 segundos si el animal se quedaba totalmente paralizado (a excepción de la respiración) por el miedo o no. Esta medida se expresa después en unidades de % de tiempo que el animal ha estado paralizado.

## 2.3

# PROCESAMIENTO DEL TEJIDO

### 2.3.1. Fijación y conservación del tejido de ratón

Para la fijación de los cerebros por perfusión vascular, los animales se anestesiaron previamente mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (Dolethal®, Vetequinol; 60 mg/Kg) y posteriormente se perfundieron transcárdialmente con ayuda de una bomba de perfusión (Dinko, D25V). Primero, se realizó un lavado de todo el sistema vascular con tampón fosfato salino (PBS) a 0,1 M y pH 7,4 (ver apéndice 2.12.1) durante un minuto aproximadamente. Una vez drenada toda la sangre, se perfundió durante 30 minutos la cantidad de 180 ml de solución fijadora, compuesta por paraformaldehído al 4%, L-lisina 75 mM y meta-peryodato sódico 10 mM en tampón fosfato (PB) 0.1 M y pH 7,4 (ver apéndice 2.12.2). A continuación, se extrajeron los cerebros y se postfijaron por inmersión en la misma solución fijadora durante una noche a 4°C.

Tras la postfijación, los cerebros se lavaron 3 veces durante 10 minutos con tampón PBS y se sumergieron en una solución crioprotectora de sacarosa al 30% (ver apéndice 2.12.3) hasta que se hundieron por completo en dicha solución. Finalmente, los cerebros se congelaron con nieve carbónica y se almacenaron a -80°C hasta su posterior procesamiento.

### 2.3.2. Obtención de cortes de hipocampo de cerebro de ratón

Con ayuda de un micrótopo de congelación (Leica, CM-1325), los cerebros fueron cortados en secciones coronales de 40 µm de grosor siguiendo el eje rostro-caudal. Estas

secciones se recogieron de manera seriada en placas multipocillo (7 series por placa) que contenían PBS 0.1M y 0,02% de azida sódica para evitar el crecimiento de hongos. Así, en cada pocillo hay una representación rostro-caudal de una séptima parte del cerebro (con una distancia de 280  $\mu\text{m}$  entre secciones). Estas placas multipocillo conteniendo las series del cerebro se almacenaron a 4°C. Aquellos cerebros destinados a microscopía electrónica de transmisión tuvieron un procesamiento diferente y que se detallará en el apartado 2.7.1.

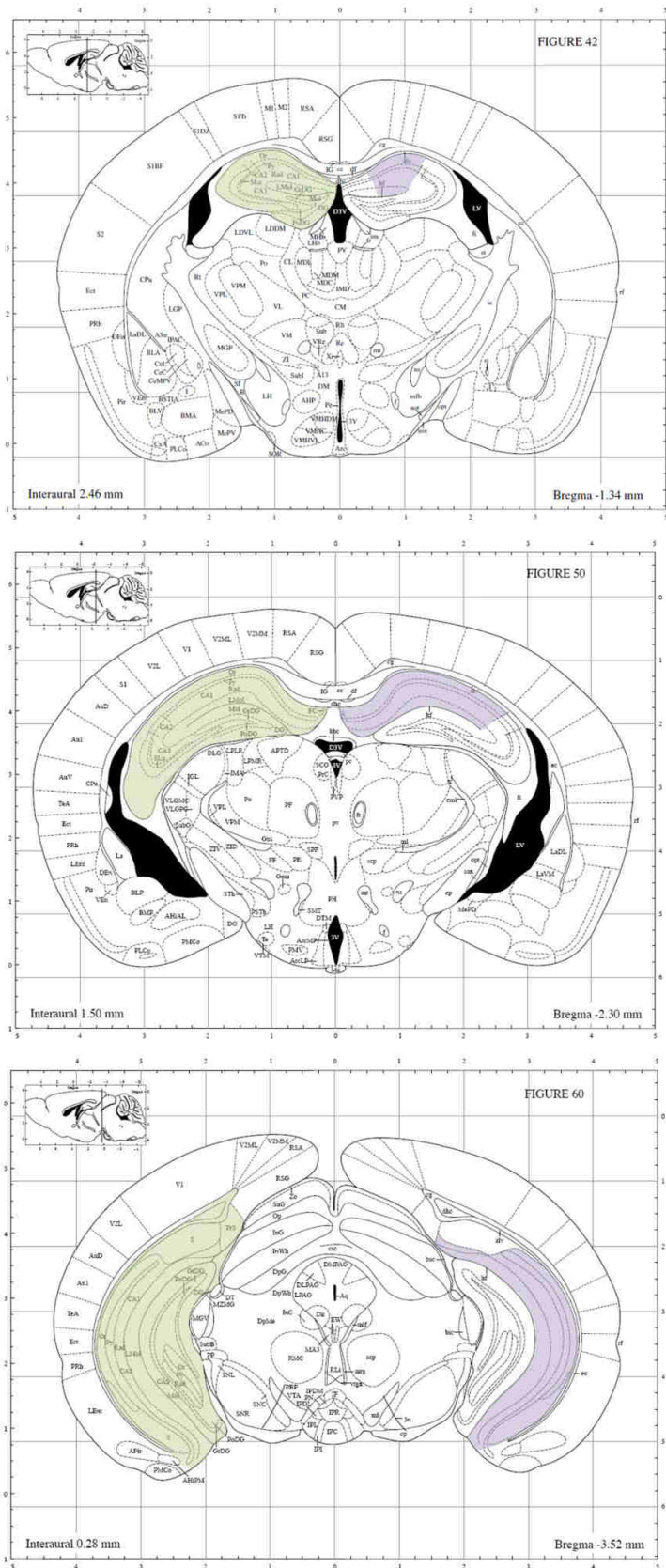
La región objeto de estudio de este trabajo es la formación hipocampal, área que se encuentra severamente afectada en la enfermedad de Alzheimer y que tiene una gran importancia en las funciones cognitivas de memoria y aprendizaje (ver revisiones Cooper and Lowenstein 2001; Bird and Burgess 2008; Moser et al. 2017; Voss et al. 2017; Eichenbaum 2017; Bird 2017). La formación hipocampal ocupa una porción de la corteza cerebral con forma de cuerno a lo largo de la curvatura del ventrículo lateral y se sitúa en el lóbulo temporal medial.

La formación hipocampal la constituyen el subículo, el hipocampo propio (o *cornu ammonis*, CA) y la circunvolución dentada o giro dentado, todos los cuales constituyen la alo corteza de Brodmann (Andersen 2007). La delimitación anatómica (Fig. 2.5) de esta región se ha realizado siguiendo el atlas de Franklin y Paxinos para cerebro de ratón (Franklin and Paxinos 2008). El hipocampo está presente entre los niveles Bregma -0,94 a -4,04 mm. De forma general, podemos decir que el hipocampo en su extremo rostral aparece en posición dorsal tras los niveles de los núcleos septales, delimitado ventralmente por el tálamo dorsal, dorsalmente por el cuerpo calloso y dorso-lateralmente por el córtex parietal. A niveles caudales, el hipocampo se curva y se extiende ventralmente hacia el área amigdalina, con las cortezas perirrinal y entorrinal, entre otras, definiendo sus límites laterales a estos niveles (Cassel et al. 1997).

### 2.3.3. Fijación de las muestras humanas y obtención de los cortes

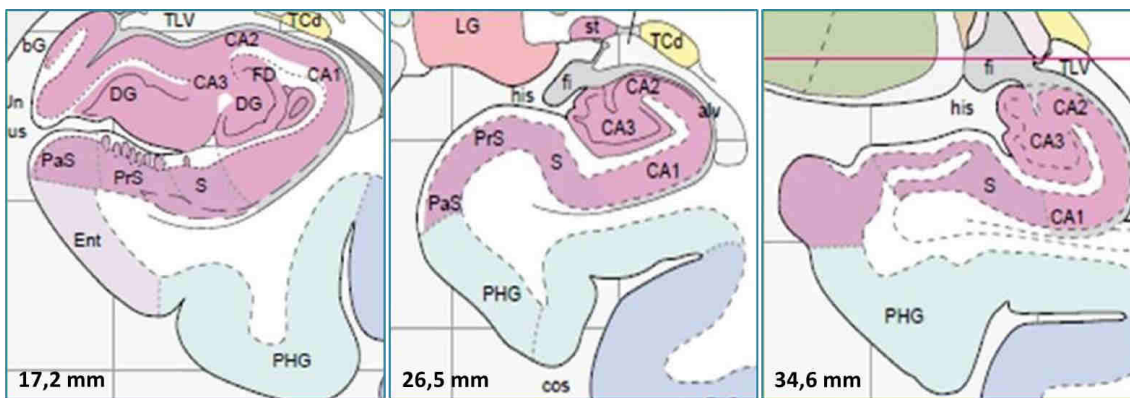
Tras la extracción del cerebro en la autopsia del paciente, el personal del Biobanco correspondiente procedió a la disección de las diferentes regiones cerebrales. Uno de los hemisferios cerebrales se fijó por inmersión en paraformaldehído al 4% en PB 0,1 M y pH 7,4. Tras dos horas de fijación, el hemisferio cerebral se cortó en pequeños bloques que se postfijaron a 4°C durante 24-48h. Posteriormente, las muestras se crioprotegieron en soluciones de sacarosa de concentraciones crecientes y se almacenaron a -80°C.

Tras recibir las muestras en nuestro laboratorio, el tejido previamente fijado y crioprotegido se cortó en secciones coronales de 30  $\mu\text{m}$  de grosor en el mismo micrótomo de congelación mencionado previamente. Las secciones se almacenaron *free-floating* de manera seriada en placas multipocillo (6 series por placa) con PBS 0,1 M y 0,02% de azida sódica, y se conservaron a 4°C hasta su posterior uso.



**Figura 2.5.** Delimitación anatómica de la formación hipocámpal, compuesta por el hipocampo propio (regiones CA), el giro dentado (GD) y el subículo (S). Esquemas tomados del atlas de Franklin y Paxinos (2007).

La delimitación del hipocampo y de la región parahipocampal en muestras humanas se realizó en relación a las estructuras corticales adyacentes con ayuda de un atlas de cerebro humano (Jürgen et al. 2008). La formación hipocampal se compone del hipocampo propio (CA1, CA2, CA3 y GD) y el subículo (S), cuyas coordenadas estereotáxicas lo localizan coronalmente en 6,7 mm y 44,9 mm. En cuanto a la región parahipocampal, se compone del presubículo (PrS), parasubículo (PaS), corteza entorrinal (CE), corteza perirrinal (CP) y corteza parahipocampal (CPH) y se localiza entre las coordenadas -10 mm y 50,3 mm. Debido a la limitación en el grosor del tejido empleado, así como a las diferencias en el nivel a lo largo del eje rostro-caudal, únicamente pudieron ser examinadas las áreas comprendidas entre las coordenadas 17 mm y 35 mm.



**Figura 2.6. Delimitación anatómica del lóbulo temporal medial de las muestras humanas empleadas en este trabajo.** Las muestras cedidas se situaron entre los niveles 17 mm y 35 mm. alv, alveo; CA, cuerno de Amón; cos, sulco colateral; DG, giro dentado; Ent, corteza entorrinal; fi, fimbria; FuG, giro fusiforme; PaS, parasubículo; PrS, presubículo; PHG, giro parahipocampal; rs, sulco rinal; S, Subículo.

# 2.4

## TINCIONES HISTOLÓGICAS

### 2.4.1. Violeta de Cresilo

El violeta de cresilo ( $C_{18}H_{15}N_3O_3$ ) es un colorante de carácter básico, que tiñe de color azul-violeta aquellas estructuras celulares que contienen ácidos nucleicos y proteínas asociadas, como el núcleo y el retículo endoplasmático rugoso (sustancia de Nissl). El violeta de cresilo se emplea a una dilución del 1% en agua desionizada. A esta mezcla se le añade ácido acético glacial, que actuará como mordiente, a una dilución del 1% también (ver apéndice 2.12.9). El protocolo llevado a cabo para esta tinción es el siguiente:

Los cortes de cerebros (mantenidos “*free-floating*” a 4°C en solución de PBS con 0.02% azida sódica) son montados sobre portaobjetos previamente gelatinizados (ver apéndice 2.12.4) y se dejan durante una noche en una estufa a 37°C para su correcta adhesión al vidrio.

- Se hidratan los cortes durante 20 minutos en PBS 0,1 M, seguido de 5 minutos en agua desionizada.
- Incubación en la solución de violeta de cresilo durante 5-10 minutos.
- Lavado en agua destilada (30 segundos) para eliminar el exceso de colorante.
- Proceso de deshidratación y aclaramiento consistente en pasar los cortes por: etanol 70° (1 minuto), etanol de 96° con ácido acético al 10% (2 minutos), etanol absoluto (5 minutos) y xileno (15 minutos).
- Montaje del cubreobjetos con el medio DPX (Sigma-Aldrich).

Esta tinción con violeta de cresilo también se empleó para teñir débilmente aquellas secciones destinadas a microscopía electrónica. En este caso, las secciones se obtienen mediante el vibratomo y posteriormente se incluyen en resina. La tinción en este caso permite identificar las secciones fácilmente ya que la resina las vuelve completamente translúcidas. Para ello, se siguió un protocolo similar al descrito anteriormente, aunque el tiempo de permanencia en la solución colorante osciló entre los 2 y los 5 minutos para que el tejido no adquiriera una tinción excesiva. A continuación, se realizaron 3 lavados en PBS 0,1 M y las secciones se redirigieron al protocolo general de deshidratación e inclusión en resina. Esta tinción nos permite por lo tanto visualizar el tejido mientras realizamos los cortes en el ultramicrotomo.



### 2.4.2. Azul de Toluidina

El azul de toluidina ( $C_{15}H_{16}ClN_3S$ ) $_2ZnCl_2$ , también conocido como cloruro de tolonio, es un colorante de carácter básico ampliamente usado en histología que tiñe la heterocromatina y la sustancia de Nissl de color azul. Este colorante presenta una propiedad conocida como metacromasia que permite que tenga color azul (colorante ortocromático) pero cuando se expone a estructuras ricas en grupos aniónicos es capaz de virar hacia un color violeta-rojo (colorante metacromático). El azul de toluidina es el colorante empleado para teñir los cortes semifinos (secciones de 1  $\mu m$  de grosor aproximadamente) obtenidos por ultramicrotomía y que se encuentran incluidos en resina. El colorante se une a los ácidos nucleicos y a todas las proteínas, tiñéndose todo el tejido de color azul con los núcleos celulares marcados de un color azul más intenso. A pesar de que todas las estructuras resultan teñidas, es posible visualizar los detalles estructurales gracias a la delgadez de la sección. El protocolo empleado para la tinción con azul de toluidina (ver apéndice 2.12.9) fue el siguiente:

- Montar sobre portaobjetos gelatinizados los cortes semifinos y dejar secar en una estufa a 80-100°C.
- Añadir unas gotas del colorante sobre el tejido durante 1 minuto aproximadamente. Realizar la tinción sobre la estufa a la misma temperatura anterior.
- Lavar con agua destilada para retirar el exceso de colorante.
- Dejar secar completamente las secciones.
- Montar el cubreobjetos con DPX.

### 2.4.3. Rojo Congo

El rojo Congo ( $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$ ) es un colorante que se une de manera específica a las fibras amiloides de las placas extracelulares con conformación de hoja plegada  $\beta$  (Wu et al. 2007). De igual manera, marca esta misma conformación en los ovillos neurofibrilares intracelulares. La tinción puede observarse tanto a microscopía óptica convencional como a microscopía de fluorescencia. Para llevarla a cabo se realizaron los siguientes pasos:

- 3 lavados de las secciones en PBS 0,1 M (10 minutos cada uno) con el fin de eliminar los restos de azida sódica.
- Incubación en la solución de rojo Congo al 20% (ver apéndice 2.12.9) durante 3 minutos.
- 3 lavados de 10 minutos en PBS 0,1 M para eliminar el exceso de colorante.
- Montar las secciones en portaobjetos gelatinizados y dejar secar.
- Deshidratación y montaje con DPX (ver apéndice 2.12.6)



#### 2.4.4. Tioflavina S

La Tioflavina S (TioS) es una fluoresceína verde que se une de manera específica a los agregados fibrilares de  $\beta$ -amiloide que tienen conformación de hoja plegada  $\beta$ , así como a los ovillos neurofibrilares. El protocolo empleado para llevar a cabo esta tinción fue el siguiente (Bussière et al. 2004):

- 3 lavados del tejido en PBS 0,1 M (10 minutos cada uno).
- 1 lavado de 10 minutos en agua destilada.
- Incubación durante 10 minutos en la solución de Tioflavina S (ver apéndice 2.12.9) en oscuridad.
- 2 lavados en etanol al 50% (5 minutos cada uno).
- 2 lavados en agua destilada (5 minutos cada uno).
- Montar las secciones sobre portaobjetos previamente gelatinizados y dejar secar unos minutos. A continuación, montar el cubreobjetos con DABCO (ver apéndice 2.12.7). Conservar las muestras en oscuridad a 4°C.

#### 2.4.5. DAPI

El fluorocromo azul DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorhídrico) se une de manera específica al ADN en aquellas regiones ricas en A-T. La tinción con DAPI nos permite visualizar los núcleos celulares en combinación con una inmunofluorescencia doble, obteniendo así un triple marcaje. El protocolo empleado para realizar esta tinción es el siguiente:

- Tras realizar la inmunofluorescencia doble, y antes de montar las secciones en los portaobjetos, se incubó el tejido en la solución de DAPI a una concentración de 1:250 (ver apéndice 2.12.9) en agua durante 10 segundos.
- Lavar en PBS 0,1 M (3x10 minutos).
- Montar las secciones sobre portaobjetos previamente gelatinizados y dejar secar unos minutos.
- Montar el cubreobjetos con el medio de montaje DABCO y conservar las muestras a 4°C y en oscuridad.

# 2.5

## INMUNOTINCIONES PARA MICROSCOPIA ÓPTICA

Las técnicas inmunohistoquímicas permiten detectar la presencia de moléculas de interés en el tejido de estudio gracias a la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo. Sin embargo, en la mayoría de los casos es necesario amplificar la señal para poder visualizarla fácilmente. En este trabajo, las secciones de cerebro de los diferentes animales (genotipos y/o grupos experimentales en su caso) y edades fueron siempre procesadas en paralelo, empleando las mismas soluciones en todas ellas para así minimizar las condiciones de variabilidad en el inmunomarcaje.

En determinados casos fue necesario realizar pre-tratamientos para aumentar o mejorar la exposición del antígeno a detectar:

- **Tratamiento con calor** (anticuerpos para A $\beta$ 42, ALDH1L1, APP, AQP4, EAAT2, IL1-R1, Tollip, Tom1): tras lavar las secciones con PBS 0,1 M (3x10 minutos) para eliminar los restos de azida, se incubó el tejido en tampón citrato sódico pH 6 (ver apéndice 2.12.1) a 80°C durante 30 minutos. A continuación, se dejó enfriar las secciones durante 10 minutos, se realizaron 3 lavados en PBS 0,1 M (3x10 minutos) y se procedió con el protocolo general.
- **Tratamiento con ácido fórmico** (anticuerpos para  $\beta$ -amiloide): tras lavar las secciones con PBS 0,1 M (3x10 minutos) para eliminar los restos de azida, se incubó el tejido en ácido fórmico al 85% durante 5 minutos. A continuación, se realizaron 3 lavados en PBS 0,1 M (3x10 minutos) y se procedió con el protocolo general.

En caso de utilizar el método de la peroxidasa para el revelado de la inmunorreacción (inmunoperoxidasa), como paso previo a la incubación en el anticuerpo primario, las secciones eran tratadas previamente para evitar tinción de fondo no deseada:

- Lavar el tejido en PBS 0,1 M para eliminar los restos de azida sódica (3x10 minutos).
- Inactivación de la peroxidasa endógena con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% y metanol al 10% en PBS 0,1 M durante 20 minutos.

- Lavar con PBS (3x10 minutos)
- Bloqueo de la avidina, biotina y las proteínas de unión a biotina que se encuentran en el tejido de manera endógena, mediante el kit de bloqueo de avidina-biotina durante 30 minutos en cada solución, con un paso intermedio de lavado de 10 minutos en PBS.
- Lavar con PBS 10 minutos.
- Incubación en el anticuerpo primario (ver apartado siguiente)

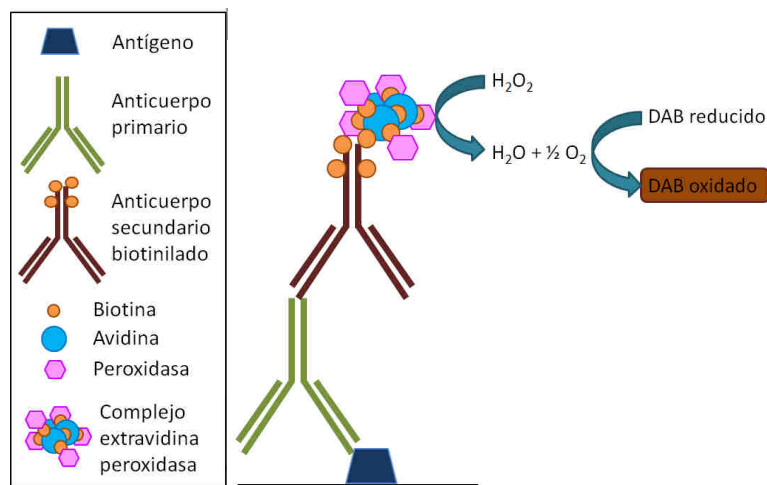
Nota: todos los pasos de incubación y lavado de la técnica inmunohistoquímica se realizaron con agitación constante (agitador de rotación circular Nahita 685 y asimétrico tridimensional Heidolph Polymax 1040).

A continuación, se describen los diferentes protocolos seguidos para la inmunotinción en función de si el marcaje era simple o múltiple, y de si el revelado se realizaba con el método de la peroxidasa (microscopía óptica convencional) o con fluorocromos (microscopía confocal o epifluorescencia).

#### 2.5.1. Marcaje inmunohistoquímico simple para microscopía óptica convencional

- En función del marcador a estudiar (ver Tabla 2.3), se incuban las secciones a 22°C en agitación continua en uno de los anticuerpos primarios (Tabla 2.4) usando como diluyente PBS 0,1 M con 0,2% Tritón X-100 y 0,1% azida sódica. El tiempo de incubación fue variable (ver tabla 2.4). En aquellos casos en los que el anticuerpo estaba desarrollado en ratón, se realizó un paso previo de bloqueo con PBS 0,1 M, 0,2% de Tritón X-100 y BSA al 5% durante 30 minutos, con el objeto de minimizar reacciones inespecíficas.
- Lavar con PBS 0,1 M (3x10 minutos)
- Incubación del tejido a temperatura ambiente y durante 70 minutos en el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente (Tabla 2.5). El diluyente empleado es el mismo que para el anticuerpo primario y la dilución de uso es de 1/500.
- Lavar con PBS 0,1 M (3x10 minutos)
- Incubación en una solución de estreptavidina (ExtrAvidin®). Esta solución se encuentra conjugada a la peroxidasa de rábano y se emplea a una dilución de 1/2000 diluida en PBS 0,1 M y 0,2% Tritón X-100 durante 90 minutos.
- Lavar con PBS 0,1 M (3x10 minutos).

- Para visualizar la reacción de la peroxidasa (Fig. 2.7), se incuban las secciones en una solución de revelado, 3-3´diaminobencidina tetrahidroclorhídrico (DAB) al 0,05% en tampón Tris clorhídrico 50 mM, 0,03% de níquel sulfato amónico y 0,03% de peróxido de hidrógeno en PBS (ver apéndice 2.12.5). La reacción proporciona un precipitado insoluble de color azul oscuro.
- Montar las secciones sobre portaobjetos previamente gelatinizados y dejar secar durante una noche.
- Deshidratación y montaje del cubreobjetos con DPX.



**Figura 2.7. Esquema de la inmunoperoxidasa para microscopía óptica convencional.** En el esquema se muestra el proceso de unión antígeno-anticuerpo primario, seguido de su correspondiente anticuerpo secundario biotinilado al que se acopla el complejo extravidina-peroxidasa mediante el cual se lleva a cabo la reacción de tipo redox que dará lugar a un precipitado de color marrón.

**Tabla 2.3. Marcadores analizados en los estudios inmunohistoquímicos y sus características**

MARCADOR	CARACTERÍSTICAS
<b>β-amiloide</b>	Fragmento peptídico de entre 39 y 43 aminoácidos que es generado mediante el procesamiento proteolítico de la proteína precursora amiloide (APP) por la vía amiloidogénica. Anticuerpo 6E10: reconoce los 17 primeros residuos aminoácidos del péptido Aβ, por lo que reconoce también formas precursoras. Anticuerpo 4G8: reconoce un fragmento que incluye los aminoácidos 17 a 24 del péptido β-amiloide. Reconoce también las formas precursoras.
<b>Aβ42</b>	Péptido amiloide de 42 aminoácidos con gran capacidad de agregación. Es el principal componente de las placas extracelulares.
<b>Aβ oligomérico</b>	Agregados de Aβ considerados las especies más neurotóxicas. Anticuerpo OC: reconoce la conformación que adquieren las fibras de oligómeros.

MARCADOR	CARACTERÍSTICAS
<b>ALDH1L1</b>	Del inglés <i>Aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1</i> . Proteína de la familia de las aldehído deshidrogenasas. Marcador específico de células astrogliales.
<b>APP</b>	Proteína precursora amiloide. Tras su procesamiento proteolítico se generan los péptidos $\beta$ -amiloide. El anticuerpo empleado reconoce el fragmento C-terminal.
<b>Acuaporina 4 (AQP4)</b>	Proteína transmembrana osmorreceptora que regula el balance de agua en las células. Es abundante en el sistema nervioso central, fundamentalmente en las células astrogliales.
<b>BLBP</b>	Del inglés <i>Brain-lipid binding protein</i> , se expresa durante el desarrollo en la glía radial. Marcador específico de células astrogliales reactivas.
<b>CD45</b>	Receptor de membrana expresado por linfocitos, macrófagos y microglía. Implicado en la activación de las células T. Marcador específico de macrófagos infiltrados y microglía.
<b>EAAT2</b>	Del inglés <i>Excitatory amino-acid transporter 2</i> . Molécula transportadora de glutamato, esencial para la eliminación del exceso de glutamato de la hendidura sináptica. Marcador específico de astrocitos.
<b>GFAP</b>	Proteína glial fibrilar ácida que constituye los filamentos intermedios de las células astrogliales. Marcador específico de astrocitos.
<b>GS</b>	Glutamina sintetasa. Implicada en la producción de glutamina a partir de amoníaco y glutamato. En el cerebro se expresa fundamentalmente en astrocitos.
<b>Iba1</b>	Del inglés <i>Ionized calcium binding adapter molecule</i> . Molécula del citoesqueleto de membrana implicada en los cambios morfológicos que se producen tanto en la microglía como en los macrófagos.
<b>IL1-R1</b>	Del inglés <i>Interleukin 1 receptor, type 1</i> . Receptor de la interleuquina 1, producida por macrófagos como mediador en la respuesta inflamatoria.
<b>Megf10</b>	Del inglés <i>Multiple epidermal growth factor-like domains protein 10</i> . Altamente expresado en cerebro, participa en la fagocitosis de células apoptóticas.
<b>NeuN</b>	Marcador específico de núcleos de neuronas maduras de vertebrados.
<b>Sinaptofisina</b>	Glicoproteína ácida que se une a $Ca^{++}$ , forma parte de la membrana de las vesículas sinápticas. Se utiliza como marcador de sinapsis, al encontrarse en los terminales sinápticos.
<b>Tom1</b>	Implicado en el tráfico intracelular. Se ha relacionado con los procesos de endocitosis del receptor IL1-R1.
<b>Tollip</b>	Del inglés <i>Toll interacting protein</i> , es una proteína adaptadora inhibitoria que forma parte del sistema inmune innato. Su interacción con Tom1 la relacionan también con la endocitosis del receptor IL1-R1.
<b>VGlut1</b>	Transportador vesicular de glutamato. Se encarga del transporte de glutamato al interior de las vesículas sinápticas. Marcador de sinapsis glutamatérgicas.

Tabla 2.4. Relación de anticuerpos empleados en los estudios inmunohistoquímicos

ANTICUERPO PRIMARIO	DILUCIÓN DE USO	INCUBACIÓN (TIEMPO Y TEMPERATURA)	ANIMAL DE OBTENCIÓN	CASA COMERCIAL; REFERENCIA
Anti-A $\beta$ 42	1:5000	24h; 22°C	Conejo	Abcam; Ref: 39377
Anti-A $\beta$ oligomérico (OC)	1:5000	24h; 22°C	Conejo	Millipore; Ref: AB2286
Anti-A $\beta$ 1-17 (6E10)	1:1000	72h; 4°C	Ratón	Covance; Ref: SIG-39320
Anti-A $\beta$ (4G8)	1:2000	24h; 22°C	Ratón	Covance; Ref: SIG-39240
Anti-ALDH1L1	1:2000	48h; 22°C	Ratón	Merck-Millipore; Ref: MABN495
Anti-APP	1:200000	24h; 22°C	Cabra	Meridian life Sciences; Ref: Q2B100G
Anti-APP	1:20000	24h; 22°C	Conejo	Sigma; Ref: A8717
Anti-AQP4	1:1000	48h; 22°C	Conejo	Sigma; Ref: A5971
Anti-BLBP	1:2000	72h; 22°C	Conejo	Abcam; Ref: ab32423
Anti-CD45	1:1000	48h; 22°C	Conejo	Abcam; Ref: ab10558
Anti-EAAT2	1:10000	24h; 22°C	Conejo	Abcam; Ref: ab41621
Anti-GFAP	1:2000	24h; 22°C	Pollo	Chemicon; Ref: AB5541
Anti-GFAP	1:10000	24h; 22°C	Conejo	Dako; Ref: z0334
Anti-GS	1:20000	24h; 22°C	Conejo	Abcam; Ref: ab49873
Anti-Iba1	1:2000	24h; 22°C	Cabra	Abcam; Ref: ab5076
Anti-Iba1	1:1000	24h; 22°C	Conejo	Wako; Ref: 019-19741
Anti-IL1R1	1:500	48h; 4°C	Conejo	Abcam; Ref: ab106278
Anti-Megf10	1:500	24h; 22°C	Conejo	Sigma; Ref: HPA026876
Anti-Megf10	1:1000	24h; 22°C	Conejo	Millipore; Ref: ABC10
Anti-NeuN	1:1000	24h; 22°C	Ratón	Chemicon; Ref: MAB377
Anti-Sinaptofisina	1:1000	24h; 22°C	Conejo	Abcam; Ref: ab14692
Anti-TOM1	1:500	48h; 4°C	Conejo	Abcam; Ref: ab170928
Anti-Tollip	1:500	48h; 4°C	Conejo	Abcam; Ref: ab187198
Anti-VGlut1	1:10000	72h; 22°C	Cobaya	Chemicon; Ref: AB5905

**Tabla 2.5.** Relación de anticuerpos secundarios empleados en los estudios inmunohistoquímicos de microscopía óptica de campo claro

ANTICUERPO SECUNDARIO	DILUCIÓN DE USO	INCUBACIÓN (TIEMPO Y TEMPERATURA)	ANIMAL DE OBTENCIÓN	CASA COMERCIAL; REFERENCIA
Anti-IgG de cabra	1:500	70 min; 22°C	Caballo	Vector Lab; BA-9500
Anti-IgG de conejo	1:500	70 min; 22°C	Cabra	Vector Lab; BA-1000
Anti-IgG de pollo	1:500	70 min; 22°C	Cabra	Vector Lab; BA-9010
Anti-IgG de cobaya	1:500	70 min; 22°C	Cabra	Vector Lab; BA-7000
Anti-IgG de ratón	1:500	70 min; 22°C	Cabra	Vector Lab; BA-9200

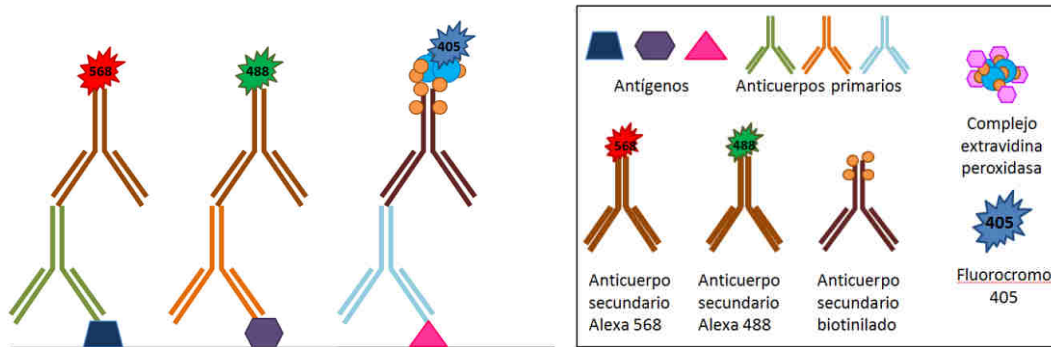
### 2.5.2. Marcaje inmunohistoquímico doble para microscopía óptica convencional (DAB-Níquel/DAB)

El inmunomarcaje doble mediante el método de la peroxidasa con dos anticuerpos primarios diferentes requiere la utilización de un método de revelado que nos permita obtener productos de reacción de diferente color para cada anticuerpo. El protocolo llevado a cabo para el marcaje inmunohistoquímico doble fue el siguiente:

- Realizar el protocolo de inmunohistoquímico para el primer antígeno a detectar con el anticuerpo primario y secundario correspondientes.
- Tras el revelado con la solución de DAB-Níquel, lavar con PBS 0,1 M (3x10 minutos). Este primer marcaje será de color azul oscuro.
- A continuación, se realiza la incubación en el segundo anticuerpo primario, seguido de su correspondiente anticuerpo secundario y Extravidin-peroxidasa, de acuerdo al protocolo estándar para inmunohistoquímica.
- Para el revelado de este segundo antígeno emplearemos la solución con DAB, pero sin Níquel de manera que podremos visualizar este segundo marcador de color marrón.
- Tras lavar con PBS 0,1 M (3x10 minutos), montar las secciones en portaobjetos gelatinizados y dejar secar durante la noche.
- Deshidratación y montaje con DPX.

### 2.5.3. Marcaje inmunofluorescente múltiple para microscopía confocal

Mediante microscopía confocal es posible realizar estudios de colocación de distintos marcadores empleando diversas combinaciones de anticuerpos primarios. Los diferentes marcajes se ponen de manifiesto con anticuerpos secundarios y/o estreptavidinas acopladas a diferentes fluorocromos (Fig. 2.8)



**Figura 2.8. Esquema de la inmunofluorescencia triple.** En el esquema se muestra la manera de evidenciar los diferentes marcajes en una inmunofluorescencia triple mediante anticuerpos secundarios y/o estreptavidinas acoplados a diferentes fluorocromos.

- Se realiza un protocolo similar al descrito anteriormente para la inmunohistoquímica, hasta la incubación del anticuerpo primario.
- Lavar con PBS 0,1 M (3x10 minutos)
- Incubación en el segundo anticuerpo primario durante el tiempo correspondiente.
- Lavar con PBS 0,1 M (3x10 minutos)
- En el caso de que queramos realizar una inmunohistoquímica triple, incubaremos ahora en el tercer anticuerpo primario durante el tiempo que le corresponda.
- Lavar con PBS 0,1 M (3x10 minutos)
- Incubación en el primer anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo Alexa 568 a una dilución 1:1000 (Tabla 2.6) durante 1 hora.
- Lavar con PBS 0,1 M (3x10 minutos)
- Incubación en el segundo anticuerpo secundario-Alexa 488 (1:1000) durante 1 hora (Tabla 2.6).
- Lavar con PBS 0,1 M (3x10 minutos)
- En el caso de un marcaje triple, el tercer anticuerpo secundario se usa biotinilado y se realiza la incubación durante 1 hora y 10 minutos.



- Lavar con PBS 0,1 M (3x10 minutos)
- Incubar en la estreptavidina fluorescente (Alexa 405, 1:1000; Molecular Probes; S32351) durante 1 hora.
- Lavar con PBS 0,1 M (3x10 minutos)
- Montar las secciones en portaobjetos gelatinizados.
- En el caso de tejido de animales viejos, debido a la acumulación de gránulos de lipofucsina autofluorescentes, es necesario realizar un proceso de eliminación de autofluorescencia. Para ello, se sumergen los portaobjetos con las secciones en alcohol de 70° durante 5 minutos, a continuación, se añade la solución comercial *Autofluorescence Eliminator Reagent* (Millipore) durante 5 minutos y por último se realizan lavados con etanol de 70° para eliminar el exceso de producto.
- Lavar con PBS 0,1 M (3x10 minutos)
- Montaje con DABCO.

**Tabla 2.6. Relación de anticuerpos secundarios empleados en los estudios de inmunofluorescencia.** Alexa Fluor® 488<sup>1</sup>, la longitud de onda de absorción es de 495 nm y la de emisión es de 519 nm (verde); Alexa Fluor® 568<sup>2</sup>, la longitud de onda de absorción es de 578 nm y la de emisión es de 603 nm (rojo).

ANTICUERPO SECUNDARIO	FLUOROCROMO	DILUCIÓN DE USO	ANIMAL DE OBTENCIÓN	CASA COMERCIAL; REFERENCIA
Anti-IgG de conejo	Alexa Fluor® 488 <sup>1</sup>	1:1000	Burro	Molecular Probes; A21206
Anti-IgG de conejo	Alexa Fluor® 488 <sup>1</sup>	1:1000	Cabra	Molecular Probes; A11008
Anti-IgG de ratón	Alexa Fluor® 488 <sup>1</sup>	1:1000	Burro	Molecular Probes; A21202
Anti-IgG de cabra	Alexa Fluor® 488 <sup>1</sup>	1:1000	Burro	Molecular Probes; A11055
Anti-IgG de pollo	Alexa Fluor® 488 <sup>1</sup>	1:1000	Cabra	Molecular Probes; A11039
Anti-IgG de conejo	Alexa Fluor® 568 <sup>2</sup>	1:1000	Burro	Molecular Probes; A10042
Anti-IgG de conejo	Alexa Fluor® 568 <sup>2</sup>	1:1000	Cabra	Molecular Probes; A11011
Anti-IgG de ratón	Alexa Fluor® 568 <sup>2</sup>	1:1000	Burro	Molecular Probes; A10037
Anti-IgG de cabra	Alexa Fluor® 568 <sup>2</sup>	1:1000	Burro	Molecular Probes; A11057

#### 2.5.4. Inmunofluorescencia doble para células en cultivo

En el presente trabajo también hemos realizado estudios de colocación de diferentes marcadores en astrocitos primarios en cultivo, mediante la combinación de anticuerpos primarios y el uso de microscopía confocal. El marcaje se ha revelado con anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromos (Fig. 2.8), de forma similar al proceso empleado en secciones de tejido (ver apartado 2.5.3). El protocolo realizado se detalla a continuación:

- Lavar el cultivo en PBS 0,1 M y 0,1% Tritón X-100 durante 12 minutos para eliminar los restos de azida sódica y permeabilizar ligeramente las células.
- Bloqueo en una solución de PBS 0,1 M, 0,1% Tritón X-100 y 1% BSA durante 1 hora.
- Incubación en el primer anticuerpo primario 24h. Se emplea la solución de bloqueo anterior como diluyente de los anticuerpos primarios y secundarios.
- Lavar con PBS 0,1 M (3x5 minutos)
- Incubación en el segundo anticuerpo primario durante 24 horas.
- Lavar con PBS 0,1 M (3x5 minutos)
- Incubación en el primer anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo Alexa 568 a una dilución 1:500 (Tabla 2.6) durante 1 hora.
- Lavar con PBS 0,1 M (3x5 minutos)
- Incubación en el segundo anticuerpo secundario-Alexa 488 (1:500) durante 1 hora (Tabla 2.6).
- Lavar con PBS 0,1 M (3x5 minutos)
- Montaje del cubreobjetos con solución DABCO.

#### 2.5.5. Controles de la inmunohistoquímica/inmunofluorescencia

Como controles negativos, y para demostrar la especificidad de los anticuerpos empleados, se procesaron de manera simultánea secciones en las que se omitió la incubación en el anticuerpo/s primario/s. En su lugar la incubación se realizó en el mismo diluyente de los anticuerpos primarios. En ningún caso los controles negativos presentaron inmunotinción.

Como controles positivos se utilizaron secciones de tejido donde se encuentra el antígeno a determinar.

# 2.6

## OBTENCIÓN DE IMÁGENES DE MICROSCOPIA ÓPTICA

### 2.6.1. Imágenes de microscopía óptica de campo claro

Las secciones inmunoteñidas con el método de la inmunoperoxidasa (marcaje simple o doble) y aquellas procesadas con tinciones histológicas generales se fotografiaron en un microscopio óptico Nikon, modelo Eclipse 80i, con una cámara fotográfica digital Nikon DS-5M de 5 mega-píxeles. Esta cámara se encuentra conectada a un ordenador que contiene el software ACT-2U (Auto Camera Tame To You; Imaging Software, Nikon Corporation 2004). Las imágenes se tomaron con un tamaño 2560x1920 en formato jpg.

### 2.6.2. Imágenes de microscopía de fluorescencia

Las imágenes de fluorescencia a microscopía confocal (secciones de tejido o cultivos celulares) fueron obtenidas con un microscopio láser confocal Leica Sp5 II (Servicios Centrales de la Universidad de Málaga), conectado a un ordenador que ejecutaba el programa Leica TCS-NT. Las imágenes digitales se tomaron con un tamaño 1024x1024 en formato tiff. Se trata de un microscopio óptico que tiene acoplado un láser como fuente de iluminación, así como un sistema electrónico que permite la obtención de imágenes digitales. Entre otras muchas aplicaciones, este sistema permite analizar la colocalización de dos o más moléculas en una misma célula.

### 2.6.3. Procesamiento de imágenes

Las imágenes digitales fueron procesadas con el programa informático Adobe PhotoShop CS2, modificándose el tamaño y el brillo/contraste de la imagen completa en las ocasiones que se consideró necesario. Posteriormente, se montaron en láminas con la aplicación Power Point del programa Microsoft Office (Microsoft).

# 2.7

## MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

### 2.7.1. Fijación y conservación del tejido

Para la fijación del tejido destinado a la microscopía electrónica de transmisión (MET), se procedió de la manera indicada en el apartado 2.3.1. Tras la postfijación y los lavados con tampón PBS para eliminar los restos de fijador, estos cerebros se almacenaron en una solución de PBS con 0,02% de azida sódica a 4°C hasta su procesamiento posterior.

### 2.7.2. Obtención de las secciones

Los cerebros conservados en PBS a 4°C se encastraron previamente en agarosa al 3% (ver apéndice 2.12.8). Con un vibratomo (Leica, VT1000S) se realizaron las secciones en el plano coronal y se recogieron en placas multipocillos que contenían PBS+0,02% azida sódica. Se realizaron secciones de dos grosores diferentes; secciones de 250 µm para la microscopía electrónica convencional, y secciones de 50 µm para las técnicas de inmunomarcaje con oro coloidal para microscopía electrónica (inmuno-oro). Estas placas multipocillo con las secciones de ambos grosores se almacenaron a 4°C hasta su uso posterior.

### 2.7.3. Postfijación, deshidratación e inclusión en resina de las secciones

Tras la obtención de las secciones con el vibratomo, se seleccionaron cortes con distintos niveles hipocampales para su procesamiento y su visualización posterior en el microscopio electrónico de transmisión. En el caso de las secciones destinadas a la técnica de inmuno-oro para MET, el protocolo que se indica a continuación se realizó una vez finalizado el proceso de inmunomarcaje (ver apartado 2.7.7):

- Lavar con PBS 0,1 M (3x10 minutos)
- Postfijación con tetróxido de osmio 1% en PB 0,1 M a 4°C en oscuridad. El tiempo de incubación varía en función del grosor de las secciones; 1h 30 minutos para las secciones de 250 µm y 20 minutos para las secciones de 50 µm tratadas con la técnica de inmuno-oro.
- Lavar con PBS 0,1 M (3x10 minutos)

- Deshidratación en acetona y contraste en bloque. Se comienza sumergiendo los cortes en acetona al 30%, seguido de acetona al 50% durante 30 minutos en cada paso para las secciones de 250  $\mu\text{m}$  y 15 minutos para las de 50  $\mu\text{m}$ . A continuación, y para el contraste del tejido, se emplea una solución de acetato de uranilo al 1% en acetona al 70%, durante 1 hora o 30 minutos respectivamente, seguido de acetona al 80% y 90% durante 30/15 minutos dependiendo del grosor de las secciones. Por último, se realizan 2 cambios en acetona al 100% (2x30 minutos / 2x15 minutos respectivamente).
- Infiltración de las secciones en una mezcla de acetona 100% - resina (1:1) durante 1 hora (ver Apdo. 2.12.8)
- Infiltración de las secciones en resina pura a temperatura ambiente durante 2 horas.
- Inclusión en plano. A continuación, y con sumo cuidado, se colocan 2 o 3 piezas de tejido entre dos portaobjetos forrados con papel de aluminio y se añade una pequeña cantidad de resina pura. Se presionan los portaobjetos con cuidado para eliminar las posibles burbujas y se introduce todo ello en una estufa a 60°C durante 48 horas para permitir la correcta polimerización de la resina. Con este sencillo método conseguimos obtener las secciones de tejido incluidas en plano.

#### 2.7.4. Montaje y tallado de las secciones incluidas en resina

Transcurridas las 48 horas para la polimerización de la resina, separamos los dos portaobjetos y obtenemos una fina lámina de resina con nuestras secciones incluidas. A continuación, y con ayuda de unas tijeras separamos la zona de tejido que sea de nuestro interés y la pegamos con pegamento de secado rápido a un bloque de resina polimerizada, dejando secar a temperatura ambiente antes de pasar a realizar el tallado del bloque.

Una vez tenemos el bloque de resina con la muestra de tejido bien pegada, se monta todo en el soporte del ultramicrotomo en el cual vamos a realizar el tallado. Para ello usamos una cuchilla muy afilada y vamos retirando poco a poco distintas porciones tanto de resina como de tejido superfluo. El objetivo final de este procedimiento es obtener un bloque de resina en el cual tengamos una pirámide de base trapezoidal cuya cara superior sea toda la región de interés para nuestro estudio. El tamaño de la superficie de la muestra dependerá del tipo de corte que se vaya a realizar, semifinos para microscopía óptica o ultrafinos para microscopía electrónica, siendo en este último caso muy pequeña (0,5  $\text{mm}^2$  aproximadamente).

### 2.7.5. Ultramicrotomía

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

Se realizan, en primer lugar, cortes semifinos (1  $\mu\text{m}$  de grosor) que se tiñen con el colorante azul de toluidina (ver apéndice 2.12.9) para su observación al microscopio óptico. Con ello lo que perseguimos es la determinación del área final de interés que vamos a volver a tallar antes de realizar los cortes ultrafinos.

Los cortes ultrafinos para MET se realizaron de un grosor de 50-90 nm y se pasaron directamente de la balsa de la cuchilla a rejillas de níquel de 150 agujeros. También se realizaron algunos cortes semifinos de la misma superficie sobre la que se hicieron los ultrafinos, para su tinción posterior con azul de toluidina y para la obtención de fotografías que nos sirvan de referencia durante la observación en el microscopio electrónico de transmisión.

### 2.7.6. Procesamiento de células en cultivo para MET

La fijación de los cultivos primarios astroglicales se llevó a cabo tal y como se detalla en el apartado 2.11.3. Tras la fijación y con el fin de eliminar los restos de glutaraldehído, se realizaron 3 lavados (de 10 minutos cada uno), tras lo cual se procedió a postfijar las células con tetróxido de osmio 1% en PB 0,1 M a 4°C y en oscuridad durante 20 minutos. A continuación, se realizaron 3 lavados (3x10 minutos) con PB 0,1 M y se tiñeron las células con azul de toluidina (ver apéndice 2.12.9) durante 1 minuto para poder visualizar y así seleccionar la zona del cultivo de mayor interés. Las células se lavan nuevamente en PB 0,1 M (3x10 minutos) para eliminar el exceso de colorante y se procedió a la deshidratación e inclusión en resina según el protocolo siguiente:

- Etanol 30° 15 minutos
- Etanol 50° 15 minutos
- Etanol 70° + Uranilo 1% 15 minutos
- Etanol 90° 15 minutos
- Etanol 100° 2 x 10 minutos
- Infiltración del cultivo en una mezcla de etanol 100°-resina (1:1) durante 1 hora (ver apéndice 2.12.8)
- Infiltración del cultivo en resina pura a temperatura ambiente durante 1 hora.
- Inclusión en resina a 57°C durante 72 horas para permitir la correcta polimerización de la resina.

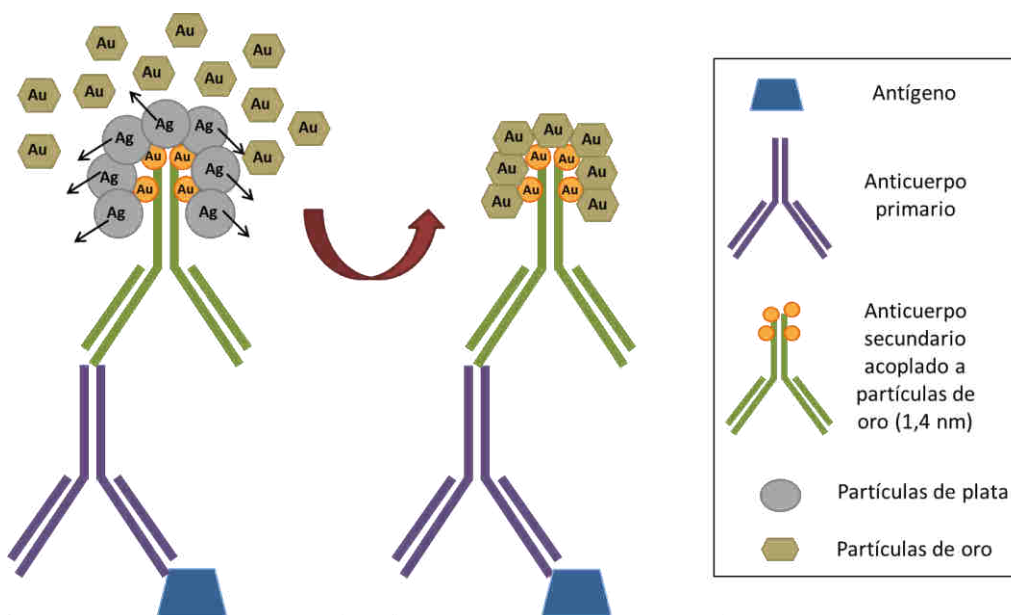
Transcurridas las 72 horas para la polimerización, desmoldamos la lámina de resina con las células en cultivo incluidas y seleccionamos y cortamos la zona de interés. A partir de este momento el montaje del bloque de resina, así como el corte mediante ultramicrotomía es el detallado en los apartados 2.7.4 y 2.7.5.

### 2.7.7. Protocolo general de la técnica de inmuno-oro para MET

- Lavar con PBS 0,1 M (3x10 minutos)
- Solo en aquellos casos en que sea necesario para el anticuerpo primario (ver apartado 2.5), se realizó un pretratamiento con tampón citrato, tras el cual se vuelven a realizar los lavados con PBS 0,1 M (3x10 minutos).
- Incubar las secciones en una solución de glicina 50 mM en PBS 0,1 M durante 5 minutos, a temperatura ambiente y con agitación, para romper los grupos aldehídos del fijador y facilitar la penetración del anticuerpo en el tejido.
- Lavar con PBS 0,1 M (3x10 minutos)
- Para aumentar la penetración del anticuerpo, se realiza un proceso de congelación/descongelación mediante el que se permeabilizan las membranas celulares, pero sin alterar la morfología de la célula a nivel ultraestructural. Para ello:
  - Introducir las secciones en solución de crioprotección (ver apéndice 2.11.8) al 100% durante 20 minutos a temperatura ambiente.
  - Mantener las secciones en la misma solución crioprotectora durante 20 minutos a -80°C.
  - Tras atemperar las secciones, se colocan ahora en soluciones de crioprotección diluidas en PBS de concentraciones decrecientes y a temperatura ambiente, empezando en la solución al 100%, 70%, 50% y 30% finalmente (10 minutos en cada una de ellas)
- Lavar con PBS 0,1 M (1x10 minutos)
- Pasar las secciones a la solución de bloqueo 1 (PBS 0,1 M, azida sódica 0,1%, BSA 1%; ver apéndice 2.11.8) y mantener durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Incubación en el anticuerpo primario (utilizando como diluyente la Solución de Bloqueo 1) durante 48 horas (Anticuerpos Tabla 2.4).
- Lavar con PBS 0,1 M (3x10 minutos)
- Pasar las secciones a la solución de bloqueo 2 (PBS 0,1 M, BSA 0,8%, gelatina de pescado 0,1%; ver apéndice 2.11.8) durante 30 minutos.

- Colocar las secciones en el anticuerpo secundario (Tabla 2.7) conjugado con partículas de oro de 1,4 nm (Nanogold), a una dilución 1/100 en solución de bloqueo 1 durante una noche a temperatura ambiente.
- Lavar con la solución de bloqueo 2 (3x5 minutos)
- Lavar con PBS 0,1 M (3x5 minutos)
- Postfijar las secciones con glutaraldehído (2%) en PBS 0,1 M durante 10 minutos.
- Lavar con agua destilada (2x3 minutos)
- Lavar con citrato sódico 0,02 M, pH 7,0 (3x5 minutos).
- Preparar el kit HQ Silver™ (intensificador de la señal) usando cantidades iguales de cada uno de los tres componentes. Para ello se mezcla el mismo volumen de la solución iniciadora y moderadora y a continuación se añade la misma cantidad de la solución activadora. Revelar durante un tiempo variable entre 5-10 minutos. Este kit se vuelve inestable con la temperatura y precipita, por ello en función de la temperatura de la sala el tiempo de revelado oscilará entre 5-10 minutos, pero en ningún caso se dejará más de 11 minutos.
- Lavar en agua destilada (2x3 minutos)
- Lavar en PB 0,1 M, durante 10 minutos.
- Virado al oro (*Gold toning*): es el proceso por el cual partículas de oro sustituyen a las partículas de plata manteniendo así la amplificación de la señal, pero evitando su eliminación por el tratamiento posterior con tetróxido de osmio, ya que el oro no se altera con este reactivo. Para ello se incubó primero en una solución de cloruro de oro 0,05% en agua destilada, en condiciones de oscuridad y a 4°C durante 10 minutos, seguido de una incubación en tiosulfato sódico 0,3% en agua destilada, en las mismas condiciones de luz y temperatura (2x10 minutos).
- Lavar en PB 0,1 M (3x10 minutos)
- Tratar las secciones con una solución del 1% de tetróxido de osmio en PB a 4°C y oscuridad durante 20 minutos.
- Continuar con el protocolo indicado en el Apartado 2.7.3





**Figura 2.9.** Representación esquemática de la inmuno-oro para microscopía electrónica de transmisión. Se muestra la unión específica entre el anticuerpo primario y el anticuerpo secundario acoplado a partículas de oro de 1,4 nm. A continuación, la señal se amplifica mediante la unión de partículas de plata, que posteriormente son sustituidas por partículas de oro (*gold-toning*).

**Tabla 2.7.** Relación de anticuerpos secundarios conjugados con oro empleados en los estudios de inmunomarcaje para MET.

ANTICUERPO SECUNDARIO	DILUCIÓN DE USO	INCUBACIÓN (TIEMPO Y TEMPERATURA)	ANIMAL DE OBTENCIÓN	CASA COMERCIAL; REFERENCIA
Anti-IgG de conejo	1:100	24h; 22°C	Cabra	NanoProbes; Ref: 2004
Anti-IgG de cabra	1:100	24h; 22°C	Conejo	NanoProbes; Ref: 2005
Anti-IgG de ratón	1:100	24h; 22°C	Cabra	NanoProbes; Ref: 2001
Anti-IgG de cobaya	1:100	24h; 22°C	Cabra	NanoProbes; Ref: 2054

### 2.7.8. Observación y obtención de las imágenes

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

### 2.7.9. Estudio ultraestructural 3D. Microscopía FIB-SEM

Mediante un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo con haz de iones focalizado (FIB-SEM) podemos obtener imágenes seriadas de un pequeño bloque de tejido previamente incluido en resina (ver apartado 2.7.3). Esto nos permite obtener imágenes seriadas a nivel ultraestructural con una separación de 30 nm entre ellas. Para ello, el tejido previamente incluido en un bloque de resina se adhiere en un portamuestras mediante cinta adhesiva de carbono que facilita la conductividad. A continuación, el portamuestras se recubre primero con iridio y más tarde con platino durante 10 minutos para permitir la disipación de la carga. Este portamuestras adecuadamente tratado, se introduce ahora en el microscopio de doble haz Helios Nanolab 650 (FEI Company) con detectores EDX y EBSD (Oxford) del Centro de Bioinnovación de la Universidad de Málaga. Tras la obtención de imágenes ultraestructurales seriadas se empleó el programa informático Reconstruct 1.1.0.0 (<https://synapseweb.clm.utexas.edu/software-0>) para realizar la reconstrucción tridimensional de nuestras imágenes.

## 2.8

## ESTUDIOS CUANTITATIVOS POR ANÁLISIS DE IMAGEN

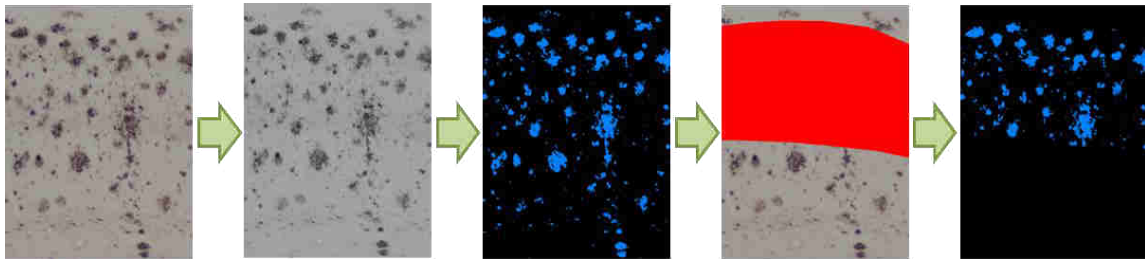
### 2.8.1. Carga amiloide y carga astrogial:

Las secciones de hipocampo del modelo APP/PS1 inmunoteñidas con el anticuerpo OC (carga amiloide) o con los anticuerpos GFAP o BLBP (astrogial) fueron fotografiadas utilizando un microscopio Nikon modelo Eclipse 80i con el programa ACT-2U tal y como se ha descrito en el apartado 2.6.1, manteniendo la misma intensidad de luz y sin variar ni el brillo ni el contraste, con el objetivo de 10x. Se analizaron una media de 4 secciones para cada animal APP/PS1 (n=4 animales/edad), de cada una de las edades (4, 6 y 12 meses).

Las imágenes seleccionadas fueron calibradas en el programa Visilog 6.3 (Noesis, Francia) y se delimitó el área de interés a cuantificar (región CA1 del hipocampo). Esta imagen se binarizó determinando siempre el mismo umbral, establecido en 123 de un rango que oscila entre 0 y 255, de manera que solamente aparecen visibles en la pantalla (siendo así cuantificables) las zonas teñidas. Se realizó la suma del área seleccionada y la imagen que resultó de la binarización, de manera que se obtiene una zona de punteado que corresponde a la zona teñida. Para conocer el porcentaje de área teñida se realiza una relación entre el área total de la zona seleccionada (100%) y el área de la zona obtenida tras la binarización. Esta

medida permite establecer comparaciones entre diferentes individuos. Así, la carga amiloide se definió como el porcentaje del área total de la región de interés teñida con OC.

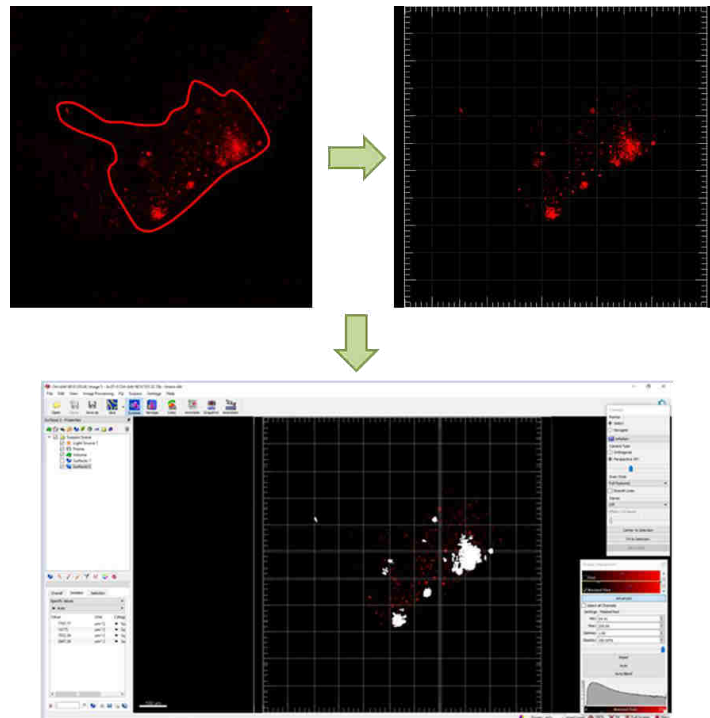
Para la cuantificación de la carga astrogliar (% del área ocupada por células GFAP-positivas, respecto a un área de referencia) y de la carga de la astrogliá reactiva (% del área ocupada por células BLBP-positivas, respecto a un área de referencia), se empleó el mismo procedimiento que para la carga amiloide.



**Figura 2.10. Proceso de binarización con el programa de análisis de imagen Visilog 6.3.** En la imagen de la izquierda se observa la fotografía original sin procesar de una sección hipocampal de un ratón APP/PS1 inmunoteñida con el anticuerpo OC para A $\beta$  oligomérico; a continuación, vemos la imagen transformada en monocromática y la misma imagen tras el proceso de binarización, de manera que la inmunotinción aparece de color azul. Esta imagen se combina ahora con la imagen en la que se selecciona el área de interés y se obtiene la última imagen en la que tenemos el área inmunopositiva para la región de interés. La carga amiloide corresponderá a la relación entre esta última área y el área total de la región (señalada en rojo)

En el caso de las secciones de hipocampo del modelo 3xTgAD procesadas con la técnica de inmunofluorescencia para el anticuerpo 6E10 fueron fotografiadas utilizando un microscopio confocal Leica Sp5 empleando el programa de captura de imágenes Leica TCS-NT, manteniendo las mismas condiciones de luz y sin modificar ni el brillo ni el contraste, con el objetivo de 10x. Se analizaron una media de 3-4 secciones para cada animal, en un total de 3 animales por cada grupo experimental estudiado (Ctrl-AAV, Tom-AAV, Tom-sh y Tollip-sh).

Las imágenes obtenidas fueron calibradas en el programa Imaris 7.2.3 (Bitplane Scientific Software) y se delimitó el área de interés a cuantificar. A estas imágenes se les aplicó siempre el mismo umbral, en un rango que oscila entre 0 y 255, de manera que únicamente quedan en la imagen (siendo así cuantificables) las zonas teñidas. Utilizando ahora el comando *Surface* del programa obtenemos los datos del área de cada una de las placas presentes en nuestra imagen (Fig. 2.11). De esta manera podemos establecer comparaciones entre los diferentes grupos de tratamientos en relación al número de placas, al área total ocupada por placas y a la distribución de las placas en función de su tamaño.

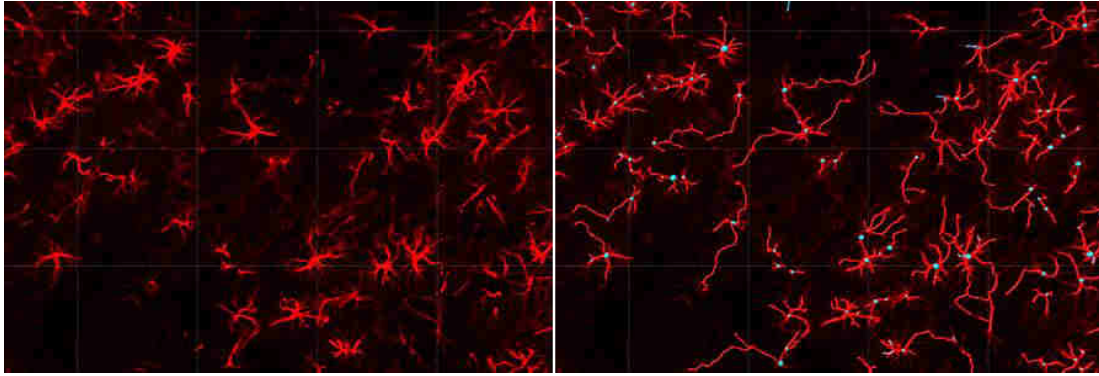


**Figura 2.11.** Análisis de las placas de Abeta con el programa de análisis de imagen Imaris 7.2.3. En la primera imagen observamos la fotografía original sin procesar tomada con el microscopio confocal, sobre la que seleccionamos el área de interés, obteniendo así la imagen de la derecha. A continuación, y tras aplicar los parámetros necesarios, el programa detecta las placas amiloides de nuestra región de interés (última imagen). Además, este programa nos genera un documento Excel con los datos referidos al área de cada una de las placas detectadas.

### 2.8.2. Estudio de la morfología de células gliales:

Para el análisis de la morfología microglial y astrogial, se realizaron tinciones con los marcadores Iba1 (microglía) y GFAP (astroglía) y se fotografiaron las secciones con un microscopio confocal Leica Sp5, empleando el programa de captura de imágenes Leica TCS-NT. Tanto las condiciones para la toma de imágenes como el número de secciones y animales se mantuvieron igual al empleado para la cuantificación de placas de Abeta.

Las imágenes obtenidas se calibraron en el programa Imaris 7.2.3 (Bitplane Scientific Software) y se delimitó el área de interés para nuestro estudio. A todas las imágenes se les aplicó el mismo umbral de detección, en un rango entre 0 y 255, y mediante las herramientas *Spot* y *Filaments* obtenemos los datos del número de células y de su morfología (área ocupada por microglía o astroglía, número de prolongaciones y longitud total de las prolongaciones) respectivamente (Fig. 2.12).

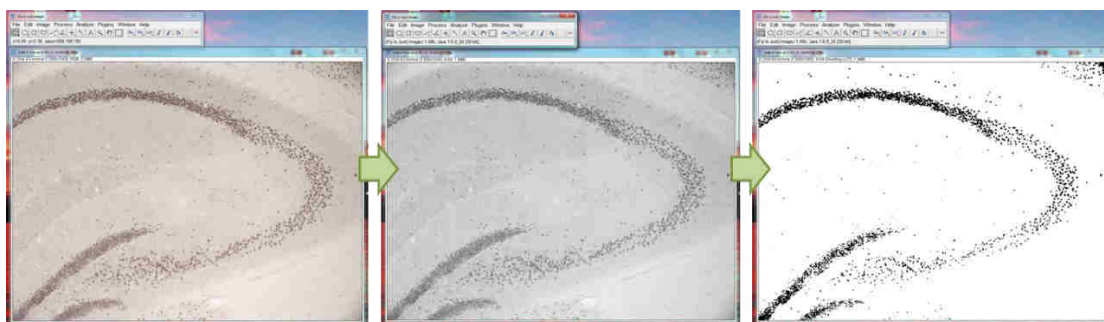


**Figura 2.12.** Análisis de la morfología astrogliar con el programa de análisis de imagen Imaris 7.2.3. En la imagen de la izquierda se puede observar la fotografía original sin procesar y en la de la derecha observamos el resultado obtenido tras el procesamiento con el software Imaris, obteniendo así datos referentes al número y morfología de las células gliales.

### 2.8.3. Cuantificación de la inmunotinción para IL-1R1 por densitometría:

Las secciones teñidas para el receptor de interleuquina 1 (IL-1R1) se fotografiaron utilizando un microscopio Nikon Eclipse 80i (ver Apartado 2.6.1), con el objetivo de 10x. Se mantuvo el mismo número tanto de secciones como de animales que en el apartado 2.8.1.

Las imágenes obtenidas se procesaron con el programa Fiji ImageJ 1.45v; Java 1.6.0\_20 (*National Institute of Health, NIH*) (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>). Estas imágenes se binarizaron determinando siempre el mismo umbral, establecido en 15 de un rango que oscila entre 0 y 255 (Fig. 2.13), de manera que únicamente aparecen visibles en la pantalla (y son por tanto cuantificables) las zonas teñidas. La variable cuantificada en este caso fue la densidad óptica (DO), basada en la medida de la intensidad de una imagen digitalizada referida a una escala de grises. Esta escala oscila en el rango indicado anteriormente donde el 0 es el blanco y el 255 el negro. De esta manera, el valor total de la DO de la imagen correspondería a la media aritmética de la intensidad del número total de píxeles que componen la imagen. Esta medida es adimensional y se puede emplear como variable de referencia cuantitativa que nos permite establecer comparaciones entre grupos o individuos.



**Figura 2.13.** Análisis de IL1R1 total mediante densidad óptica. En la imagen de la izquierda observamos la fotografía original sin procesar, y en el centro, la misma imagen tras el proceso de binarización. A continuación, se aplica un umbral establecido entre 0 y 255 (imagen de la derecha).

#### 2.8.4. Cuantificación de neuritas distróficas y prolongaciones astrogliales

Los estudios cuantitativos del proceso de recubrimiento y fagocitosis de neuritas distróficas se llevaron a cabo tanto a microscopía confocal como a microscopía electrónica de transmisión.

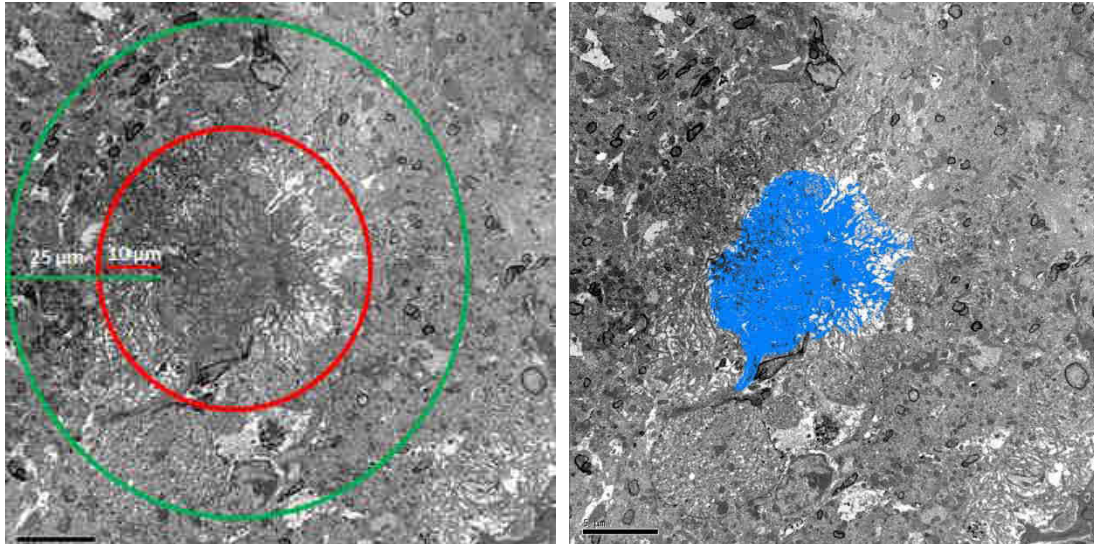
Las secciones doblemente teñidas con un marcador de células astrogliales (GFAP) y de neuritas distróficas (APP) fueron fotografiadas utilizando un microscopio confocal Leica Sp5 empleando el programa de captura de imágenes Leica TCS-NT. Se analizaron un total de 120 placas para los animales APP/PS1 de 6 y 12 meses. De cada una de las placas se tomaron imágenes consecutivas con una distancia de separación de 0.3  $\mu\text{m}$  en el eje Z, de manera que finalmente se obtiene una serie de 25-30 imágenes en la que podemos ver la progresión de la placa amiloide. El proceso de cuantificación consistió en contabilizar el número de neuritas distróficas, prolongaciones astrogliales y neuritas distróficas rodeadas casi en su totalidad por prolongaciones de astrocitos.

Para la cuantificación a microscopía electrónica, los cortes ultrafinos fueron fotografiados utilizando un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1400. De esta manera se analizaron al azar un total de 40 placas en los animales APP/PS1 de 6 y 12 meses de edad. En cada una de las placas se tomaba en primer lugar una imagen panorámica (x2000), seguida de todas las imágenes que fueran necesarias para obtener un registro a mayores aumentos (x4000) de la zona alrededor de la placa en un radio de 25  $\mu\text{m}$  medido desde el borde de la placa amiloide. Estas imágenes obtenidas en el MET se analizaron en un estudio ciego para determinar las siguientes variables:

- ✓ Número de neuritas distróficas: se contabilizaron todas las neuritas distróficas presentes dentro del radio indicado anteriormente.
- ✓ Número de prolongaciones astrogliales: se contabilizaron todas aquellas prolongaciones astrogliales que tuvieran una longitud superior a 2  $\mu\text{m}$  y se encontraran dentro del radio de 25  $\mu\text{m}$ .
- ✓ Número de neuritas distróficas presentes en el interior de células astrogliales: únicamente se consideraron aquellas neuritas distróficas que se encontraban totalmente insertas en el interior de prolongaciones astrogliales.
- ✓ Área de placa: utilizando el programa de análisis de imagen Visilog 6.3 (Noesis, Francia), se estableció un umbral que se mantuvo constante a lo largo de todo el experimento y de manera manual se delimitó la región de interés (en este caso la placa amiloide) para obtener la medida del área de placa en  $\mu\text{m}^2$  (Fig.2.14).



- ✓ Área de recubrimiento astrogial: se realizó de manera análoga a la empleada para medir el área de placa amiloide. En este caso se realizaron 2 medidas, la primera de ellas en un radio de 10  $\mu\text{m}$  alrededor de la placa y la segunda en un radio de 25  $\mu\text{m}$  alrededor de la placa de abeta.



**Figura 2.14.** Método de cuantificación de neuritas distróficas asociadas a prolongaciones astrogiales. En la imagen de la izquierda se muestran los dos radios establecidos alrededor de la placa para cuantificar el recubrimiento astrogial. A la derecha, mediante el programa Visilog 6.3 se establece un umbral y se delimita la zona correspondiente a la placa de la que vamos a obtener la medida de su área.

### 2.8.5. Cuantificación del tamaño de las neuritas distróficas

Las secciones procedentes de animales APP/PS1 de 12 meses de edad y muestras humanas *post mortem* en estadios Braak V-VI fueron inmunoteñidas con anti-APP. Estos 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). Las imágenes se tomaron de la región CA1 del hipocampo empleando el objetivo de 10x.

A continuación, y para el análisis de imagen se empleó el programa Visilog 6.3 (Noesis, Francia). Las imágenes se calibraron y las neuritas distróficas APP-positivas se delimitaron manualmente. Finalmente, la zona delimitada se binarizó y se obtuvo el área de las distrofias en unidades de  $\mu\text{m}^2$ .

### 2.8.6. Cuantificación del tamaño de las células astrogiales

El método empleado para obtener la medida de las células astrogiales GFAP-positivas en muestras humanas y en modelos animales fue el mismo que el mencionado en el apartado 2.8.5 para la medida de las neuritas distróficas. La única variante introducida fue la inmunotinción con anti-GFAP en lugar de anti-APP.

### 2.8.7. Cuantificación del número y grosor de las prolongaciones astrogliales

Las secciones inmunoteñidas con anti-GFAP procedentes de muestras *post mortem* humanas y de modelos animales empleadas en el apartado 2.8.6 fueron también empleadas para la cuantificación del número y el grosor de las prolongaciones astrogliales. Para ello se seleccionaron al azar 20 células astrogliales por individuo/animal ( $n=3$ ), por lo que se emplearon un total de 60 astrocitos de muestras de pacientes en estadio Braak V-VI y 60 astrocitos procedentes de animales APP/PS1 de 12 meses de edad.

A continuación, se contabilizó manualmente el número de procesos astrogliales y con ayuda de la herramienta de medición del programa informático NewCast (Olympus) se tomaron medidas del grosor de las prolongaciones astrogliales a una distancia fija de 5  $\mu\text{m}$  del cuerpo celular.

La selección al azar de los astrocitos GFAP-positivos se realizó con la ayuda de un sistema de computación interactivo que comprende un microscopio convencional (Olympus BX61), una cámara digital (Olympus DP71), el programa informático NewCast (Olympus) con el sistema VIS 2.61.1.0 (Visiopharm Integrator System, Visiopharm®) y un microcaptor (Prior ProScan), que monitoriza los movimientos del eje Z.

Así mediante este sistema es posible realizar un muestreo uniforme consistente en un área determinada en la que cada objeto tiene la misma probabilidad de ser contado. Para ello es necesario delimitar el área de la región de interés (CA1 en nuestro caso) y determinar el porcentaje de la muestra que se quiere estudiar (un 20% del total). El área de la región se selecciona de manera manual con el objetivo de 4x y el muestreo se realiza con un objetivo de 100x.



# 2.9

## ESTUDIOS BIOQUÍMICOS

### 2.9.1. Disección de hipocampo

Para los estudios moleculares del hipocampo fue necesario llevar a cabo la disección de esta región del cerebro de ratón. Así, tras anestésiar y perfundir transcárdialmente con PBS 0,1 M a los animales, se extrajo el cerebro para, sobre una placa de hielo, diseccionar el hipocampo, la corteza y el cerebelo con ayuda de unas pinzas y una hoja de bisturí. Las muestras se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso. Para los estudios detallados en la presente Tesis Doctoral únicamente se empleó el hipocampo, conservando el cerebelo y la corteza para estudios posteriores si fuera necesario.

### 2.9.2. Aislamiento de proteínas a partir del hipocampo

Este método de solubilización nos permite separar la fracción soluble de proteínas extracelulares y citosólicas del contenido de membranas lipídicas del tejido procesado mediante ultracentrifugación diferencial.

El proceso consiste en pesar nuestras muestras de hipocampo en una balanza de precisión y pasarlas a un tubo apto para la ultracentrifuga. A continuación, debemos preparar una solución de extracción de proteínas que contiene 10 ml de T-PER<sup>®</sup>, 1 pellet de inhibidor de proteasas y 100  $\mu\text{l}$  de inhibidor de fosfatasa. Una vez tenemos la solución de extracción de proteínas, debemos añadir 1 ml de esta solución para cada 150 mg de tejido que hemos pesado previamente y lo machacamos con ayuda de una varilla de plástico. A continuación, realizamos una ultracentrifugación (Óptima tlx ultracentrifuge, Beckman Coulter) a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora y a una velocidad de 44000 rpm, obteniendo así una solución bifásica de la cual retiraremos el sobrenadante que se corresponde con la fracción soluble. Al precipitado se le añade ácido fórmico al 70% (0.5 ml de ácido fórmico por cada 1 ml de T-PER<sup>®</sup> que usamos previamente) y se realiza una segunda centrifugación en las mismas condiciones anteriores, reservando el precipitado o fracción insoluble. Ambas fracciones se guardan por separado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### 2.9.3. Ensayo de proteínas. Método de Bradford

Para determinar la concentración de proteínas de nuestra muestra realizamos un ensayo colorimétrico según el método de Bradford (Bradford 1976), basado en el cambio de

color del colorante azul de Coomassie (*Coomassie brilliant blue G-250*) en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. Este colorante tiene la propiedad de presentarse en dos formas con colores diferentes, rojo y azul, de manera que la forma roja se convierte en azul cuando el colorante se une a proteínas debido a que la unión a aminoácidos básicos provoca un cambio en su máximo de absorción, pasando de 465 a 595 nm.

Resulta necesario realizar una curva patrón en la que conozcamos las concentraciones de proteínas para así interpolar los datos de absorbancia obtenidos posteriormente en nuestras muestras. La curva patrón se realiza añadiendo en una placa multipocillo cantidades conocidas de una solución de BSA 0.2 mg/ml (0,2,4,6,8 y 10  $\mu$ l), agua destilada hasta completar 160  $\mu$ l y 40  $\mu$ l del colorante (Bio-Rad Protein assay). Por otro lado, realizamos la preparación de nuestras muestras de manera análoga a la curva patrón, mezclando 2  $\mu$ l de muestra, 158  $\mu$ l de agua destilada y 40  $\mu$ l de colorante. Incubamos durante 5 minutos y leemos la absorbancia a 595 nm. Correlacionando ahora los datos obtenidos con la ecuación procedente de la curva patrón, obtendremos la concentración de proteínas de nuestra muestra en  $\mu$ g/ $\mu$ l.

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

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

En este trabajo se han empleado dos kits comerciales de ELISA (*Meso Scale Diagnostics, USA*) que se caracterizan por la posibilidad de medir la concentración de varias proteínas diferentes en cada pocillo. Así se ha empleado el *V-PLEX A $\beta$  peptide Panel 1 Kit*, para medir la concentración de A $\beta$ 38, A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 y el *V-PLEX Neuroinflammation Panel 1 Kit*, para medir la concentración de numerosas interleuquinas como la IL-1 $\beta$ , IL-4 o IL-10.

El protocolo empleado para llevar a cabo estas reacciones comienza con la preparación de la curva patrón con el estándar y el tampón de dilución suministrado por el kit. A continuación, se preparan nuestras muestras según las indicaciones específicas del kit y se añade cada una de las muestras, así como la curva patrón a la placa multipocillos de ELISA que ya contiene los anticuerpos de captura unidos. Tras mantener la reacción durante 2 horas, se realizan 3 lavados con el tampón de lavado suministrado por el kit y se reincuba con el anticuerpo de detección durante 2 horas. Transcurrido este tiempo se repiten los 3 lavados y se añade el tampón de lectura suministrado con el kit. La lectura de la placa multipocillo debe realizarse inmediatamente después de añadir el buffer de lectura.

# 2.10

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

En este trabajo los valores han sido representados como la media del grupo  $\pm$  la desviación estándar (SD).

El análisis estadístico de los datos se realizó introduciendo los datos en el programa estadístico GraphPad 5.01 (GraphPad Software, Inc.) o Sigma Stat32 3.5 (Advisory Statistics for Scientist). Para determinar la existencia de diferencias significativas entre los diferentes grupos se realizaron diferentes test estadísticos en función de si los datos siguen o no una distribución normal. Para aquellos datos que se distribuían de manera normal se aplicaron test paramétricos como el análisis de la varianza (ADEVA) de una o dos vías, seguido de un test de comparaciones múltiples (Tukey o Bonferroni) o la prueba t de *student* para comparaciones independientes entre dos grupos. Cuando los datos no presentan una distribución normal, se aplicaron pruebas no paramétricas como Kruskal-Wallis para comparaciones múltiples o la prueba Mann-Whitney para comparaciones independientes entre dos grupos.

Los análisis estadísticos de correlaciones entre variables se realizaron mediante el coeficiente de correlación de Pearson (para datos cuya distribución sigue la normalidad) o Spearman (datos que no siguen una distribución normal) seguidos por un análisis de regresión lineal.

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

## MATERIAL Y MÉTODOS SUPLEMENTARIOS

Para complementar los resultados obtenidos en el capítulo 3.1, se han realizado estudios *in vitro* en colaboración con el laboratorio del Dr. Javier Vitorica (Universidad de Sevilla; IBIS)

### 2.11.1. Cultivos astrogiales primarios

Los cultivos astrogiales primarios se obtienen a partir de su aislamiento de un cocultivo de microglía y astrocitos, empleando ratones neonatales de 1-3 días. El hipocampo diseccionado se homogeneiza en un medio compuesto por tripsina y EDTA. Tras la disociación, se hace pasar el homogeneizado por un filtro de 40  $\mu\text{m}$  con el fin de eliminar los restos celulares de la preparación. Las células obtenidas se cultivan ahora en placas tratadas con poli-D-lisina, con medio de cultivo DMEM-F12 (Biowest) + FBS (suplementado con glutamina, aminoácidos no esenciales, y 1% penicilina-estreptomicina) a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo se renueva cada 4 días. Tras 20-25 días de cultivo, se procede al aislamiento de los astrocitos. Para ello se incuban las placas en un medio compuesto por DMEM-F12 y 0,25% tripsina – 1mM EDTA (3:1) durante 10-45 minutos a 37°C, obteniendo un medio de cultivo rico en células astrogiales.

### 2.11.2. Obtención de neurosinaptosomas

El método empleado para el aislamiento de neurosinaptosomas de animales WT y APP/PS1 de 12 meses de edad está basado en el protocolo desarrollado por Puighermanal (Puighermanal et al. 2016) para el aislamiento de neurosinaptosomas estriatales.

En primer lugar, se sacrifican los animales por dislocación cervical, se extrae el cerebro y se diseccionan la corteza e hipocampo. A cada hemisferio cerebral se le añade 1 ml de tampón de neurosinaptosomas (2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 124 mM NaCl, 3,2 mM KCl, 1,06 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1,3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM D(+)Glucosa y 20 mM Hepes (pH = 7,4)) y se homogeneiza (homogeneizador Dounce's, Wheaton) empleando 10 pases del pistilo con menor diámetro (paso de luz: 0,089-0,14 mm) y 10 pases del que tiene mayor diámetro (paso de luz: 0,025-0,076). El homogeneizado obtenido se filtra ahora de forma secuencial a través de tres filtros de nylon con un tamaño de poro de 100  $\mu\text{m}$  y una membrana de filtro Mitex de 10  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. A continuación, es necesario centrifugar el homogeneizado a 4000g durante 1 minuto y volver a centrifugar el sobrenadante a 14000g durante 4 minutos. Por último, se resuspende el pellet (que contiene los neurosinaptosomas) en 300  $\mu\text{l}$  de medio completo. El proceso completo de aislamiento de neurosinaptosomas se realiza a una temperatura de 4°C.

### 2.11.3. Ensayos de estimulación de cultivos astrogiales primarios

Los astrocitos primarios obtenidos mediante el procedimiento detallado en el apartado 2.11.1, se siembran a 30.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos y se tratan durante 3 horas a 37°C de acuerdo a 3 condiciones experimentales diferentes:

- Control negativo: 3 µl medio completo sin neurosinaptosomas
- 3 µl neurosinaptosomas procedentes de animales WT
- 3 µl neurosinaptosomas procedentes de animales APP/PS1

Posteriormente se retira el medio de cultivo y se fijan las células con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos. Tras la fijación, se realizan tres lavados en PBS (3 x 5 minutos) y las células se almacenan a 4°C en PBS + 0,02% azida sódica hasta su posterior uso para inmunocitoquímica (ver apartado 2.5.4) o microscopía electrónica de transmisión (ver apartado 2.7.6).

### 2.11.4. Aislamiento de ARN y proteínas a partir de muestras de cerebro

El aislamiento de ARN y proteínas se basa en las diferencias de la solubilidad de las distintas biomoléculas (ARN, ADN, proteínas y lípidos) en disolventes orgánicos. El procedimiento comienza con el pesaje de las muestras, a las cuales se les añade 1 ml de Tripure® por cada 50-100 mg de tejido, y se homogeneiza la muestra durante 20 segundos. Con objeto de disociar completamente los complejos núcleo-proteínas, se incuba el homogeneizado durante 5 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se añaden 0,2 ml de cloroformo por cada ml de Tripure® empleado anteriormente. La mezcla se agita y se incuba 10 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se lleva a cabo una centrifugación a 12000g durante 15 minutos, a 4°C. El resultado es una solución con 3 fases bien diferenciadas: fase superior acuosa en la que se encuentra el ARN, interfase en la que encontramos el ADN y fase inferior que contiene las proteínas.

Para obtener el ARN, extraemos la fase superior acuosa y se realiza una precipitación con 0,5 ml de isopropanol por cada ml inicial de Tripure® durante 10 minutos. Por último, el ARN precipitado se purifica mediante el sistema *ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation* (Applied Biosystems). A continuación, el ARN purificado se cuantifica mediante un espectrofotómetro y se almacena a -80°C hasta su posterior uso.

Por otro lado, si lo que nos interesa extraer son las proteínas, nos quedamos con la fase inferior de la homogeneización con Tripure®. Es necesario realizar ahora una precipitación del ADN con 0,3 ml de etanol al 100% por cada ml de Tripure® empleado, incubando durante 3 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifuga la muestra a 2000g durante 5 minutos a 4°C y se retira el sobrenadante y se pasa a un nuevo tubo donde las proteínas se precipitan con 1,5 ml de isopropanol por cada ml inicial de Tripure®. La mezcla se incuba

durante 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga a 12000g durante 10 minutos a 4°C. El precipitado de proteínas se lava con 2 ml de guanidina (por cada ml de Tripure®) 0,3 M en 95% (v/v) de etanol y se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se centrifuga a 7500g durante 5 minutos a 4°C. Este proceso se repite dos veces y finalmente se realiza un último lavado con 2 ml de etanol absoluto para eliminar completamente los restos de guanidina. El precipitado se deja secar a temperatura ambiente hasta que se evapora todo el etanol.

Para solubilizar las proteínas, el precipitado se resuspende en urea 8M-SDS 4% taponado con Tris-HCl pH 7,4 y se incuba durante toda la noche a temperatura ambiente. Finalmente, se determinó la cantidad de proteínas y las muestras se almacenaron a -40°C hasta su posterior uso.

#### 2.11.5. Comprobación de la integridad del ARN purificado

Para comprobar la integridad del ARN previamente purificado se empleó 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 un software especializado, el RIN (*RNA Integrity Number*). Así se clasifica numéricamente la calidad del ARN desde 1, ARN totalmente degradado, hasta el 10 correspondiente al ARN perfectamente conservado.

#### 2.11.6. Retrotranscripción

Con el objetivo de obtener ADNc a partir de ARN, se llevó a cabo un proceso de retrotranscripción mediante la enzima transcriptasa inversa, capaz de sintetizar una hebra de ADN complementaria a un molde de ARN en presencia de un cebador complementario, obteniendo así un híbrido ARN-ADN que, mediante la degradación del ARN, quedará como ADN monocatenario. Para ello se ha empleado el kit *High-Capacity cDNA Archive* de retrotranscripción (Applied Biosystems). La combinación de los reactivos del kit da lugar a una mezcla de reacción que se mezcla con nuestra muestra en proporción 1:1. Esta mezcla se lleva al termociclador (MasterCycler Gradient, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) para efectuar un ciclo de 10 minutos a 25°C (para permitir el apareamiento de los cebadores a sus secuencias complementarias), seguido de 2 horas a 37°C (para permitir la síntesis del ADNc) y un calentamiento final durante 30 segundos a 85°C (para favorecer la degradación de las hebras de ARN). El ADNc obtenido se conserva a -40°C hasta su uso.

#### 2.11.7. RT-PCR en tiempo real

La RT-PCR consiste en el análisis de las muestras (partiendo de ADNc obtenido mediante retrotranscripción de ARN) amplificadas durante la propia reacción de PCR, mediante la monitorización de una señal fluorescente asociada al producto de la reacción.

El sistema *ABI-Prism 7900* (Applied Biosystems) empleado en este trabajo, combina un termociclador con un detector de fluorescencia y un software específico de amplificación. Para inducir la fluorescencia durante la PCR, se distribuye una luz procedente de una lámpara de tungsteno-halógena a los 96 pocillos a través de una matriz de fibras ópticas. La fluorescencia resultante vuelve de forma secuencial a través de las fibras y se dirige hacia un espectrógrafo con una cámara CCD (*charge-coupled device*). La señal fluorescente emitida por los productos de PCR se detecta por el lector acoplado en el termociclador y la señal es proporcional a la cantidad de copias generadas durante la reacción.

Para llevar a cabo la PCR a tiempo real, se emplearon 40 ng de ADNc, que fueron mezclados con una mezcla de reacción universal Taqman 2x (Taqman Universal Master Mix; Applied Biosystems) y con sondas Taqman 20x (Taqman Gene Expression; Applied Biosystems). A continuación, se lleva a cabo la reacción de PCR mediante el sistema *ABI Prism 7900HT* descrito previamente y los niveles de ADNc se determinaron empleando como GAPDH y beta-actina como genes *housekeeper*.

#### 2.11.8. Western-Blot (WB)

Mediante esta técnica podemos cuantificar los niveles de proteínas específicas en el tejido de interés. Para ello se realiza primero una electroforesis de las proteínas en geles desnaturalizantes para separar las proteínas en función de su movilidad electroforética, de manera que las proteínas de mayor peso molecular migrarán a una distancia menor que aquellas con un peso molecular inferior.

De manera previa a la electroforesis, las muestras se prepararon ajustando la cantidad de proteína a cargar en el gel y se mezclaron con el tampón de disociación 8x, que contiene 2,3% de SDS, 10% de  $\beta$ -mercaptoetanol, 20% de glicerol y 0,005% de azul de bromofenol, todo ello en un tampón de 10 mM Tris-HCl a pH 6,8. Las muestras se corrieron en el gel a un voltaje constante de 160V. Tras la separación electroforética, las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa mediante un sistema en sándwich (Bio-Rad) en una cubeta con tampón de transferencia, durante 90 minutos a 310 mA. Una vez realizada la transferencia, la membrana se lava con PBS y se bloquea con leche al 5% en 0,1% (v/v) de Tween-20 en PBS 0,1 M (TPBS) pH 7,4 durante 30 minutos. Tras el bloqueo, la membrana se incuba con el anticuerpo primario (GFAP) en TPBS-leche al 1,5% durante toda la noche a 4°C. Pasado este tiempo, la membrana se lava 3 veces con TPBS y se incuba en el anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa de rábano durante 1 hora. Esta enzima es capaz de procesar un sustrato (ECL-plus) dando lugar a un producto quimioluminiscente cuya señal será proporcional a la cantidad de proteína específica de la muestra. Esta señal se revela en una habitación en oscuridad mediante el uso de películas fotográficas (Hyperfil-ECL, Amersham; revelador y fijador Kodak). La señal es recogida mediante el sistema de captación IQ LAS 4000 mini gold. Por último, la intensidad de las bandas se determina mediante el software PCBAS v2.0 sobre las imágenes previamente escaneadas.

# 2.12

## APÉNDICE

### 2.12.1. Tampones para inmunohistoquímica

- Tampón fosfato (PB) 0.4M pH 7,4

Dihidrogenofosfato sódico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ )	13,6 g
Hidrogenofosfato disódico ( $\text{NaHPO}_4\text{-2H}_2\text{O}$ )	53,4 g
H <sub>2</sub> O desionizada	hasta 1000 ml
Disolver, ajustar el pH a 7,4	

- Tampón fosfato salino (PBS) 0.1M pH 7,4

Cloruro sódico (NaCl)	9 g
PB 0.4M pH 7,4	250 ml
H <sub>2</sub> O desionizada	hasta 1000 ml

- Tampón citrato sódico 50mM pH 6

Citrato sódico $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7\text{-2H}_2\text{O}$	1,47 g
--	--------

Una vez ajustado el pH a 6 con NaOH, enrasar con H<sub>2</sub>O desionizada hasta un volumen final de 100 ml.

- Tampón TBS

Tris 2M	50 ml
NaCl 5M	30 ml
H <sub>2</sub> O desionizada	920 ml

- Tampón TBST

TBS	200 ml
Tritón X-100	0,2 ml



### 2.12.2. Solución fijadora

- Paraformaldehído 4%, L-lisina 75mM, Metaperyodato sódico 10 mM (PLP) (McLean and Nakane 1974) en PB 0.1M, pH 7,4

Paraformaldehído (CH <sub>2</sub> O) <sub>n</sub>	4 g
L-lisina monoclóhidrato (C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	1,37 g
Metaperyodato sódico (INaO <sub>4</sub> )	0,21 g
PB 0.2M, pH 7,4	50 ml
H <sub>2</sub> O desionizada	50 ml

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

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

### 2.12.3. Solución crioprotectora

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

Sacarosa C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	30 g
Azida sódica	20 µl
PBS 0,1M pH 7,4	hasta 100 ml

### 2.12.4. Portaobjetos gelatinizados

- Solución de Gelatina

Gelatina oro	1 g
Alumbre de cromo (KCr(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·12H <sub>2</sub> O)	0,1 g
H <sub>2</sub> O desionizada	200 ml

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

- Gelatinizado de los portaobjetos
  - Desengrasar los portaobjetos en una mezcla de alcohol absoluto: éter (1:1) durante al menos un día.
  - Secar los portaobjetos
  - Sumergirlos en la solución de gelatina, preparada minutos antes, durante 10 segundos, dejar secar y sumergir de nuevo otros 10 segundos más.
  - Dejar secar en la estufa a 37°C durante 24 horas. Los portaobjetos gelatinizados mediante este procedimiento son viables durante al menos dos meses desde el momento de su preparación

#### 2.12.5. Solución de revelado

- Preparación 3'3 –diaminobencidina (DAB) tetrahidro-clorhídrico al 0,05%
  - Tampón Tris-Clorhídrico 0.1M, pH 7,4:
 

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

Una vez preparado el DAB-Tris, se filtró y almacenó en alícuotas de 500 µl que se mantuvieron a – 20 °C.

- Preparación solución revelado DAB 0,05%-Níquel 0,03%:

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

Diluir previamente el Níquel en el tampón; a continuación, se añade el DAB-Tris (una vez que se ha descongelado) y se filtra toda la solución antes de usarla. Para que la reacción se inicie, añadimos peróxido de hidrógeno al 0,01% en PBS 0,1M.

#### 2.12.6. Protocolo de deshidratación y montaje

PBS 0,1M pH 7,4	10 min
H <sub>2</sub> O desionizada	10 min
Etanol 50º	10 min
Etanol 70º	10 min

Etanol 96º	10 min
Etanol 100º	10 min
Disolvente natural (xileno)	10 min
Montaje con DPX	

### 2.12.7. Medio de montaje para inmunofluorescencia

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

### 2.12.8. Preparación de microscopía electrónica de transmisión (MET)

- Agarosa al 3% en H<sub>2</sub>O desionizada

Agarosa	3g
H <sub>2</sub> O desionizada	100 ml

Añadir la agarosa al agua desionizada previamente calentada y agitar de manera constante hasta conseguir su solubilización. A continuación, verter la agarosa en el molde y dejar enfriar unos segundos antes de introducir el tejido fijado a encastrar.

- Tetróxido de osmio 1% en PB 0,1 M pH 7,4

Tetróxido de osmio 4%
PB 0,1 M

Mezclar ambos compuestos en proporción 1:3. El volumen a preparar dependerá de la necesidad en cada momento.

- Resina para inclusión de tejido (Araldita)

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

Es necesario preparar la resina inmediatamente antes de usarla. Para ello se añade primero la araldita, a continuación, el DDSA y se mezclan bien ambos componentes con una varilla de vidrio hasta que estén totalmente mezclados y sin

burbujas. Por último, se añade el acelerador DMP-30 y se mezcla de la misma manera que los componentes anteriores.

- Resina para inclusión de cultivos celulares (Durcupan)

Componente A	10 ml
Componente B	10 ml
Componente C	0,3 ml
Componente D	0,3 ml

La resina debe prepararse en el momento de su uso. Se van añadiendo los componentes por orden y uno a uno, mezclando bien cada uno de ellos con ayuda de una varilla de vidrio hasta que obtengamos una mezcla homogénea y sin burbujas.

- Contrastado en bloque del tejido

Acetona 70%  
Uranilo 1%

Se debe preparar inmediatamente antes de usarlo, en 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. Se mezclan ambos compuestos mediante agitación. La cantidad a preparar depende de la necesidad.

- Solución de crioprotección

H <sub>2</sub> O desionizada	77,5 ml
Azida sódica (al 10%)	200 µl
Glicerol	10 ml
PB (0,1 M)	12,5 ml
Sacarosa	25 g

- Solución de bloqueo 1 (diluyente de los anticuerpos)

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

- Solución de bloqueo 2

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

PBS 0,1 M

### 2.12.9. Tinciones

- Violeta de cresilo 1%

Violeta de cresilo	1 g
Ácido acético glacial	1 ml
H <sub>2</sub> O desionizada	99 ml

- Azul de toluidina

Azul de toluidina	0,5 g
Tetraborato sódico decahidratado (Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> 10H <sub>2</sub> O)	0,5 g
H <sub>2</sub> O desionizada	100 ml

Disolver primero el azul de toluidina en 50 ml de agua desionizada. A continuación, se disuelve el tetraborato sódico en 50 ml de agua desionizada y por último se mezclan a partes iguales ambas disoluciones y se filtra.

- Rojo Congo 20%

Rojo Congo (C <sub>32</sub> H <sub>22</sub> N <sub>6</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub> )	2 ml
NaCl 0,03% p/v	0,3 ml
Etanol 100º	8 ml
Filtrar antes de usar	

- Tioflavina S 0,02%

Tioflavina S	0,02 g
Etanol 50º	100 ml

- DAPI

DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorhídrico)	10 µl
H <sub>2</sub> O desionizada	2,5 ml

**2.12.10. Listado de reactivos**

Acetato de uranilo (Idistec, Ref. #22400)

Acetona (Panreac, Ref. 141007.1211)

Ácido acético glacial (Panreac, Ref. 141008.1611)

Ácido bórico (Sigma, Ref. B7901)

Ácido fórmico 85% (Panreac, Ref. 141029.1611)

Adenovirus asociados (Vector Biolabs)

Adhesivo veterinario (3M™ Vetbond™ Tissue Adhesive, 3M)

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 Coomassie (Bradford Protein Assay, Bio-Rad)

Azul de Toluidina (Farmitalia Carlo Erba, Ref. 429282)

Citrato Sódico (Panreac, Ref. 131655)

Cloruro sódico (Panreac, Ref. 131659)

(DAB) 3-3' –diaminobencidina tetrahidro-clorhídrico (Sigma-Aldrich, Ref. D5637)

DABCO (Sigma-Aldrich, Ref. D-2522)

DDSA (Dodecenyl succinic anhydride) (Idistec, Ref. #13700)

Dihidrogenofosfato sódico (Merck, Ref. 1.06346.1000)

DMP-30 (Tri D-Metilaminoetilfenol) (Electron Microscopy Science, Ref. 13600)

DPX medio de montaje (Sigma-Aldrich, Ref. 06522)

Durcupan (Sigma-Aldrich, Ref. 44610)

Etanol absoluto parcialmente desnaturalizado (Panreac, Ref. 212801. 1214)

Etanol absoluto deshidratado (Merck, Ref. 1.00983.1000)

Éter dietílico (Panreac, Ref. 212770. 0311)

ExtrAvidin® conjugada a peroxidasa (Sigma-Aldrich, E-2886)

Gel para electroforesis (NuPAGE® Bis-Tris Precast, Thermo Fisher Scientific)

Gelatina oro (Panreac, Ref. 251336)

Glicerol (Panreac, Ref. 141339)

Glicina (Applichem, Ref. A1377)

Glutaraldehído 25% (Electron Microscopy Science, Ref. 16210)

Hidrogenofosfato disódico (Merck, Ref. 1.06580)

Hidróxido sódico (Panreac, Ref. 131687.1211)

Inhibidores de fosfatasa:  $\text{VO}_4 \text{Na}_3$  1mM y FNa 50 mN (Sigma)

Inhibidores de proteasas (Roche, Ref. 11697498001)

Kit de bloqueo Avidina-Biotina (Vector Labs, Ref. SP-2001)

Kit HQ SILVER™ (Nanoprobes, Ref. 2012)

L-lisina monoclorhidrato (Merck, Ref. 1.05700)

Membranas nitrocelulosa (Amersham, Hybond-C extra)

Metaperyodato sódico (Merck, Ref. 1.06597)

Metanol (Panreac, Ref. 141091.1211)

Níquel Sulfato amónico (Farmitalia Carlo Erba, Ref. 464545)

Paraformaldehído (Merck, Ref. 1.04005)

Pentobarbital sódico 20% (Dolethal®, Vetoquinol S.A)

Peroxidasa de rábano quimioluminiscente (Pierce™ ECL-plus, Thermo Fisher Scientific, Ref. 32132)

Peróxido de Hidrógeno 30% (Panreac, Ref. 107210.0250)

Rojo Congo (Sigma-Aldrich, Ref. C6277)

Sacarosa (Panreac, Ref. 131621)

SDS (Applichem, Ref. A2263)

Tampón de extracción de proteínas (T-PER™, Thermo Fisher Scientific, Ref. 78510)

Tetraborato sódico decahidratado (Panreac, Ref. 1.06303. 1000)

Tetróxido de Osmio, solución 4% (Electron Microscopic Sciences, Ref. 19150)

Tioflavina S (Sigma-Aldrich, Ref. T1892)

Tris-clorhídrico 50 mM (Sigma-Aldrich, Ref. T1503 Trizma®)

Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, Ref. T9284)

Violeta de Cresilo (Certistain®, Merck, Ref. 115940)

Xileno (Panreac, Ref. 141769.2711)

## BIBLIOGRAFÍA

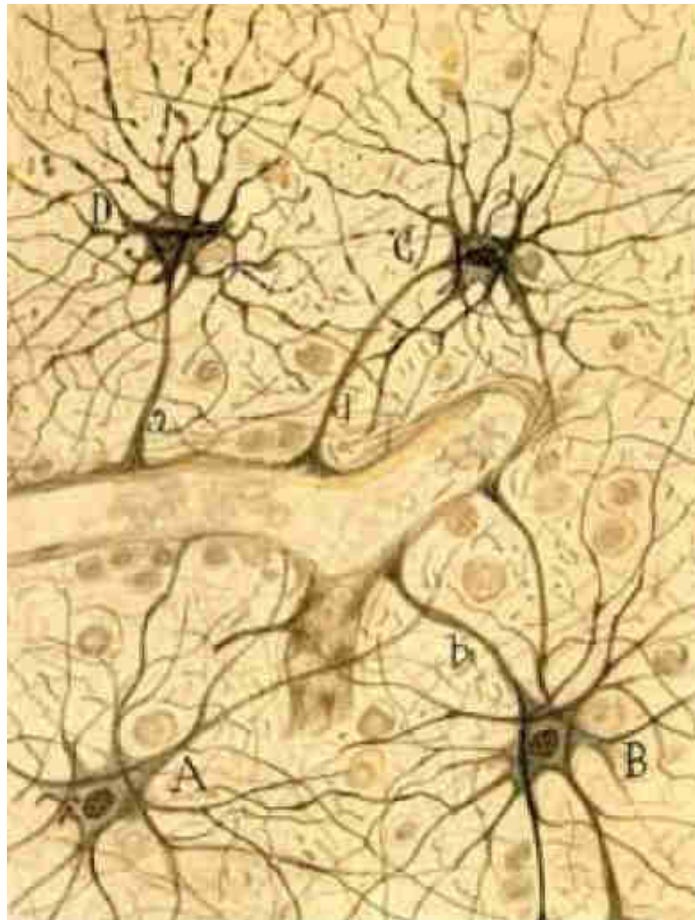
- Andersen P.** 2007. *The hippocampus book*. Oxford University Press.
- Bird CM.** 2017. The role of the hippocampus in recognition memory. *Cortex* **93**: 155–165.
- Bird CM, Burgess N.** 2008. The hippocampus and memory: insights from spatial processing. *Nat Rev Neurosci* **9**: 182–194.
- Blanchard V, Moussaoui S, Czech C, Touchet N, Bonici B, Planche M, Canton T, Jedidi I, Gohin M, Wirths O, et al.** 2003. Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with A $\beta$  deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Exp Neurol* **184**: 247–263.
- Braak H, Braak E.** 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* **82**: 239–259.
- Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254.
- Bussi re 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 Abeta immunotherapy on their clearance. *Am J Pathol* **165**: 987–995.
- Caballero C, Jimenez S, Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Gavilan MP, Ramos B, del Rio JC, Vizuete M, Gutierrez A, et al.** 2007. Inter-individual variability in the expression of the mutated form of hPS1M146L determined the production of A $\beta$  peptides in the PS1xAPP transgenic mice. *J Neurosci Res* **85**: 787–797.
- 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.
- Cooper EC, Lowenstein DH.** 2001. *Hippocampus*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester.
- Curz P, Rustay NR, Browman KE.** 2009. Chapter 2 Cued and Contextual Fear Conditioning f or Rodents. *Methods Behav Anal Neurosci* 1–12.
- Eichenbaum H.** 2017. Prefrontal–hippocampal interactions in episodic memory. *Nat Rev Neurosci* **18**: 547–558.
- Franklin KBJ, Paxinos G.** 2008. *Paxinos and Franklin’s The mouse brain in stereotaxic coordinates*.
- 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  $\beta$  (A $\beta$ ) oligomers reverses the neuroprotective effect of soluble amyloid precursor protein- $\alpha$  (sAPP $\alpha$ ) by modulating phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt-GSK-3 $\beta$  pathway in Alzheimer mouse model. *J Biol Chem* **286**: 18414–18425.
- Jürgen KM, George P, Voss VT.** 2008. *Atlas of the Human Brain*.
- McLean IW, Nakane PK.** 1974. Periodate-Lysine-Paraformaldehyde Fixative A New Fixative For Immunoelectron Microscopy. *J Histochem Cytochem* **22**: 1077–83.
- Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Del Rio JC, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, et al.** 2009. Extracellular amyloid- $\beta$  and cytotoxic glial activation induce significant entorhinal neuron loss in young PS1M146L/APP751SL mice. *J Alzheimer’s Dis* **18**: 755–776.
- Morris R.** 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* **11**: 47–60.
- Moser EI, Moser M-B, Mcnaughton B.** 2017. Spatial representation in the hippocampal formation : a history. *Nat Neurosci* **20**: 1448–1464.
- Navarrete F, Pérez-Ort z J., Femen a T, García-Gutiérrez M., García-Pay  ME, Leiva-santana C, Manzanares J.** 2008. Methods to evaluate cognitive disorders in animal models Métodos de evaluación de trastornos cognitivos en modelos animales. *Rev Neurol*.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde**



- TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM. 2003. Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles Intracellular  $A\beta$  and Synaptic Dysfunction. *Neuron* **39**: 409–421.
- Puighermanal E, Biever A, Valjent E. 2016. Synaptoneurosome preparation from C57BL/6 striata. *Bio Protoc* **6**: e1735.
- 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.
- 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.
- 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- $\beta$  Accumulation in A $\beta$ PP/PS1 Alzheimer's Disease Mice Subiculum. *J Alzheimers Dis* **42**.
- Trujillo-Estrada L, Jimenez S, De Castro V, Torres M, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Navarro V, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mejias E, Davila JC, et al. 2013. In vivo modification of Abeta plaque toxicity as a novel neuroprotective lithium-mediated therapy for Alzheimer's disease pathology. *Acta Neuropathol Commun* **1**: 73.
- Voss JL, Bridge DJ, Cohen NJ, Walker JA. 2017. A Closer Look at the Hippocampus and Memory. *Trends Cogn Sci* **21**: 577–588.
- Wu C, Wang Z, Lei H, Zhang W, Duan Y. 2007. Dual binding modes of Congo red to amyloid protofibril surface observed in molecular dynamics simulations. *J Am Chem Soc* **129**: 1225–1232.



# 3. RESULTADOS



Santiago Ramón y Cajal



La finalidad principal de este trabajo de Tesis Doctoral ha sido profundizar, desde una perspectiva celular y subcelular, en la respuesta glial (microglía y astrogliá) asociada a la enfermedad de Alzheimer con objeto de entender mejor su implicación en el desarrollo/progresión de la patología. El conocimiento y control de la respuesta glial podría aportar nuevas oportunidades terapéuticas para la prevención/retraso de esta enfermedad. Para ello, se han empleado dos modelos murinos diferentes, un doble transgénico APP/PS1 (modelo amiloidogénico) y un triple transgénico 3xTgAD (recapitula la patología amiloide y tau), así como muestras humanas *post mortem* en diferentes estadios Braak (0, II, III-IV, V-VI). El modelo APP<sub>751S</sub>L/PS1<sub>M146L</sub> ha sido ampliamente utilizado por nuestro grupo de investigación desde el año 2003 en colaboración con la compañía farmacéutica Sanofi (Francia) donde fue generado dicho modelo bigénico. Durante estos últimos 15 años, y en el marco de diferentes proyectos de investigación subvencionados por el Instituto de Salud Carlos III, CIBERNED, Junta de Andalucía y más recientemente la Fundació La Marato, nuestro grupo ha estudiado los mecanismos asociados con la muerte neuronal y la pérdida sináptica, así como la respuesta neuroinflamatoria en este modelo transgénico. Esta Tesis Doctoral ha contribuido a aumentar nuestro conocimiento en relación a los fenotipos funcionales de la glía reactiva en el hipocampo durante la progresión de la patología amiloide característica de la EA, así como a la modulación de una de las vías inflamatorias de mayor importancia durante la progresión de la enfermedad. Los resultados referentes a la función de las células astrogliales reactivas asociadas a las placas amiloides se recogen en el Capítulo 3.1 del bloque de Resultados y han sido ya aceptados para publicación en la revista científica GLIA (ver *Anexo 1*). Asimismo, y en colaboración con el laboratorio del Dr. LaFerla de la Universidad de California en Irvine (USA), se ha profundizado en el conocimiento de la respuesta inflamatoria mediada por la IL-1 $\beta$  en el modelo 3xTgAD (Capítulo 3.3), cuyos resultados se espera que sean publicados en revistas científicas en los próximos meses. Además, durante la realización de la Tesis Doctoral he colaborado de manera activa en otras investigaciones del grupo íntimamente relacionadas con la temática de este trabajo empleando para ello el modelo transgénico APP/PS1. Estas investigaciones complementarias, así como trabajos previos del grupo de investigación han sido el eje primordial para el planteamiento y desarrollo del presente trabajo de Tesis. Los resultados de algunas de estas investigaciones complementarias se han publicado como artículos en diferentes revistas científicas (*Anexos 2 y 3*) y sus principales aportaciones se resumen a continuación:

1. Siguiendo con la caracterización del modelo APP/PS1, se ha estudiado el efecto del A $\beta$  sobre la proliferación de diferentes tipos celulares en la región hipocampal. Así, se ha mostrado que la neurogénesis se encuentra alterada en nuestro modelo desde edades tempranas como consecuencia de la disminución de células progenitoras en la región subgranular del giro dentado. Además, mediante el uso de cultivos celulares se ha demostrado la inhibición de la proliferación y crecimiento de neuroesferas en presencia de especies solubles de A $\beta$ . Estas especies tóxicas de A $\beta$  estimulan la proliferación de la

microglía, pero no muestran efecto alguno sobre la astroglia. Por tanto, estos resultados sugieren un efecto diferencial del amiloide sobre las distintas poblaciones celulares del hipocampo (Baglietto-Vargas et al. 2017; *Anexo 2*).

2. Hemos profundizado en la caracterización del proceso neurodegenerativo en la región hipocampal del subículo del modelo APP/PS1. Esta región además de ser una de las que primero se afectan durante la enfermedad, juega un papel fundamental en el flujo de información que tiene lugar entre el hipocampo y la corteza entorrinal. La patología amiloide se inicia de manera temprana en esta región para después propagarse a otras regiones hipocampales. La rápida deposición amiloide tiene lugar de forma paralela a la muerte de neuronas piramidales e interneuronas así como al desarrollo característico de una patología axonal/sináptica. En su conjunto estos resultados demuestran la acusada patología que tiene lugar en el subículo, postulándolo como región de gran interés para la evaluación de terapias dirigidas a la protección del daño neuronal y/o a la modificación del curso de la enfermedad de Alzheimer (Trujillo-Estrada et al. 2014; *Anexo 3*).

En base a estos trabajos y, fundamentalmente, a los trabajos previos del grupo en relación a la respuesta inflamatoria de modelos transgénicos y pacientes (ver Planteamiento del Trabajo, Apartado 1.8) (Jimenez et al. 2008; Moreno-Gonzalez et al. 2009; Trujillo-Estrada et al. 2013; Sanchez-Mejias et al. 2016) se planteó el presente trabajo de Tesis Doctoral. Los resultados han sido divididos en 3 capítulos específicos, acompañados cada uno de ellos de la discusión correspondiente y el listado de referencias bibliográficas empleadas:

# 3.1

## REACTIVIDAD ASTROGLIAL EN EL HIPOCAMPO DE MODELOS ANIMALES Y PACIENTES DE ALZHEIMER

### INTRODUCCIÓN

Las células astrogliales constituyen el tipo celular glial más abundante del sistema nervioso central, donde se estima su población en un 30% del total celular (Liddelw and Barres 2017; John Lin et al. 2017). Los astrocitos, esenciales para la homeostasis cerebral, extienden sus prolongaciones en conformación no solapante, dando lugar a dominios astrogliales, de manera que cada uno de ellos es capaz de contactar entre 20.000 y 140.000 sinapsis en el hipocampo murino y hasta 2 millones de sinapsis en el hipocampo humano (ver revisiones Sofroniew and Vinters 2010; Verkhratsky et al. 2016; Allen and Eroglu 2017; Singh and Abraham 2017; Haim and Rowitch 2017; Ferrer 2017).

En la última década ha sido ampliamente estudiado el papel de la microglía en la progresión de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, sin embargo, no podemos decir lo mismo de los astrocitos cuya contribución a la patología de la EA está aún por determinar (Heneka et al. 2015; Heppner et al. 2015). A pesar de la gran variedad de funciones en las que intervienen estas células en el SNC, como la modulación del procesamiento de la información, la regulación de la plasticidad sináptica y neuronal, el soporte metabólico a las neuronas o la recuperación del tejido nervioso tras un daño, entre muchas otras, su participación en la respuesta neuroinflamatoria asociada a la EA sigue generando controversia. En este sentido, ha sido ampliamente descrito un fuerte proceso de activación astrogliar caracterizado por la hipertrofia de las prolongaciones principales y la sobreexpresión de la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) en las regiones cerebrales más vulnerables (Osborn et al. 2016; Verkhratsky et al. 2016; Liddelw and Barres 2017). Los astrocitos son células inmunocompetentes capaces de detectar señales de peligro y responder con la secreción de citoquinas y quimioquinas, y activar la defensa inmune (ver revisión Colombo and Farina 2016).

En modelos animales, la reactividad astrogliar se ha correlacionado con las diferentes etapas de la EA, sin embargo en humanos esta respuesta inflamatoria parece no sólo estar asociada con la enfermedad sino también con el envejecimiento (Ugbode et al. 2017). A pesar de la aparición de nuevos datos que apoyan la diversidad molecular y funcional de los astrocitos en el cerebro adulto (Haim and Rowitch 2017; John Lin et al. 2017), lo cierto es que se conoce bastante poco acerca de la activación astrogliar en condiciones patológicas. El proceso de activación astrocítica ha sido considerado tradicionalmente una respuesta

neuroinflamatoria de carácter tóxico en respuesta a la EA, sin embargo en la actualidad esta visión está dando paso a la idea de la función neuroprotectora e incluso ha cobrado fuerza la hipótesis de pérdida de función de los astrocitos (Masgrau et al. 2017). En algunos modelos transgénicos de Alzheimer la activación de los astrocitos ocurre de manera previa a la detección de las placas amiloides, por lo que se ha sugerido que el péptido  $\beta$ -amiloide podría ser uno de los desencadenantes de esta activación (Medeiros and LaFerla 2013; Ugbo et al. 2017). En este sentido, la función de la astrogliá reactiva en respuesta al A $\beta$  sigue aún en debate ya que por un lado se ha demostrado la fagocitosis del  $\beta$ -amiloide de las placas en un intento de disminuir su toxicidad pero por otro lado, los astrocitos secretan moléculas proinflamatorias en respuesta a los depósitos amiloides, causando así un efecto citotóxico perjudicial (Wyss-Coray et al. 2003; Heneka et al. 2005; Medeiros and LaFerla 2013; Xiao et al. 2014).

La modulación de la respuesta inflamatoria hacia un efecto neuroprotector en lugar de citotóxico podría constituir una buena diana terapéutica, por lo que la caracterización de la respuesta astrogliá durante la patología de la EA resulta necesaria. Es imprescindible para ello conocer los diferentes fenotipos funcionales que adquieren los astrocitos, así como la ganancia o pérdida de función en respuesta a un daño como el péptido  $\beta$ -amiloide.

Por todo lo expuesto anteriormente, en este capítulo de resultados se llevará a cabo una caracterización de la reactividad astrogliá durante la progresión de la EA en un modelo doble transgénico APP/PS1. Además, algunos de los resultados más relevantes se compararán con los obtenidos en muestras *post-mortem* humanas de estadios Braak III-IV y Braak V-VI. Para este estudio se emplearon principalmente técnicas inmunohistoquímicas con marcadores específicos de este tipo celular, estudios de microscopía láser confocal, así como estudios ultraestructurales a microscopía electrónica de transmisión y FIB-SEM, y técnicas de cuantificación por análisis de imagen.

## RESULTADOS

### 3.1.1. Estructura y organización del hipocampo de los animales APP/PS1

Como primera aproximación al estudio histopatológico del hipocampo, se ha analizado la citoarquitectura del hipocampo mediante una tinción general con violeta de cresilo (colorante tipo Nissl) en animales doble transgénicos APP/PS1 de 6 y 12 meses, empleando como controles animales WT de la misma edad. Esta tinción nos permite visualizar los núcleos celulares (color azul-violeta), de manera que podemos diferenciar la organización laminar hipocámpal al delimitar las capas de somas neuronales presentes en el hipocampo (células granulares del giro dentado y células piramidales de CA1, CA2 y CA3). Además, de color rosado podemos ver también las placas de  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ) en los animales APP/PS1 debido a un fenómeno metacromático.

En la Figura 3.1.1 se muestran imágenes comparativas del hipocampo de animales WT



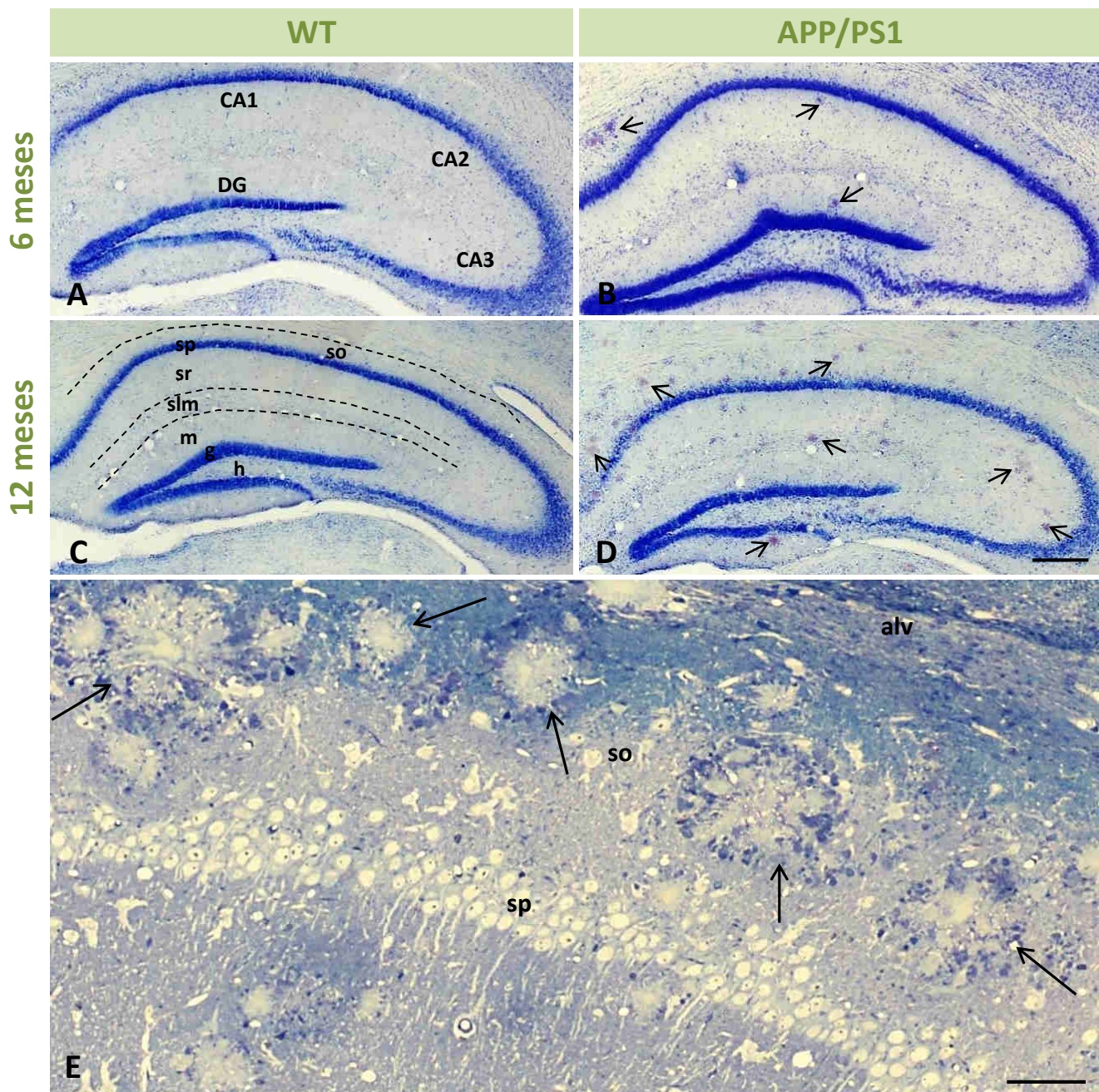
(Fig. 3.1.1A y C) y APP/PS1 (Fig. 3.1.1B y D) a 6 y 12 meses de edad. Se puede observar un patrón citoarquitectónico del hipocampo similar en los animales APP/PS1 y WT, sin embargo, es notable la presencia de depósitos de péptido  $\beta$ -amiloide en animales doble transgénicos desde edades tempranas (4 meses, no mostrado). La localización inicial de las placas de A $\beta$  fue el *stratum oriens* de la región CA1, así como el hilio del giro dentado. El número de estos depósitos fue aumentando progresivamente con la edad (ver Apdo. 3.1.2) y extendiéndose a otras capas del hipocampo. Mediante la tinción con azul de toluidina de un corte semifino (Fig. 3.1.1E) se pueden observar en mayor detalle las numerosas placas amiloides del *stratum oriens* en un animal APP/PS1 de 12 meses de edad.

### 3.1.2. La patología amiloide va acompañada de una notable respuesta astrogliar

Para analizar la progresión de la patología amiloide con la edad se realizó un estudio inmunohistoquímico con el anticuerpo OC (reconoce formas oligoméricas que adquieren una conformación proteica fibrilar (Sarsoza et al. 2009)) en el hipocampo de animales APP/PS1 de 4, 6 y 12 meses de edad.

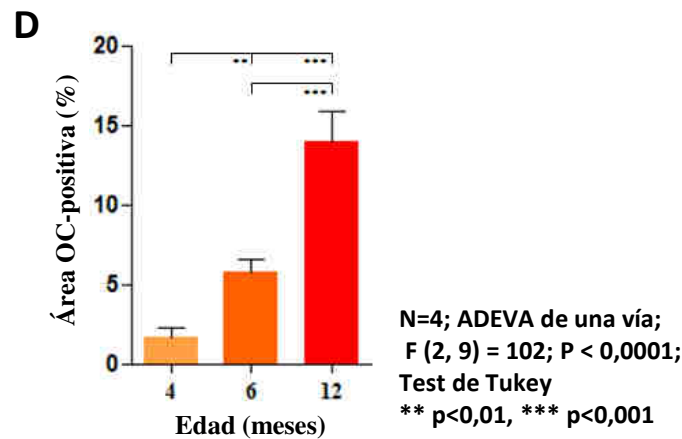
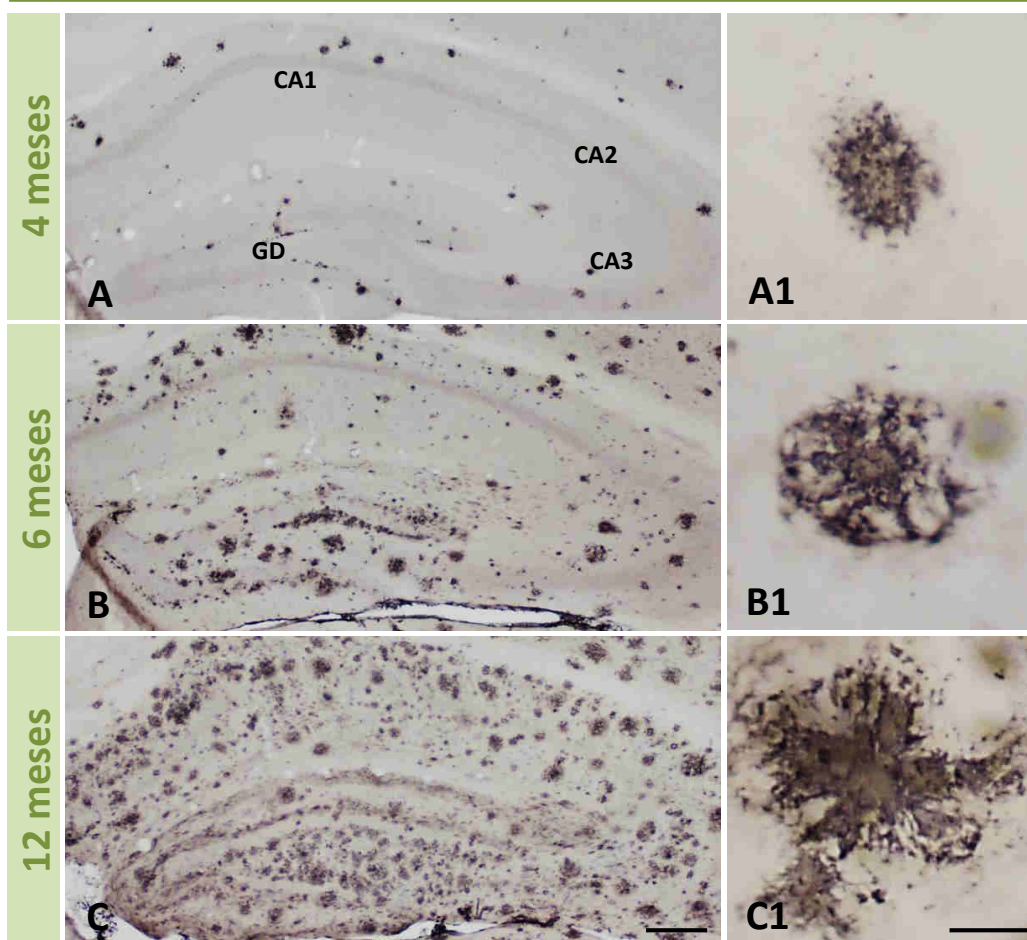
Los depósitos extracelulares de A $\beta$  se observaron desde los 4 meses de edad (Fig. 3.1.2 A) principalmente en el *stratum oriens* de CA1 y en el hilio del giro dentado. El número de placas amiloides aumentó de manera progresiva con la edad (Fig. 3.1.2B y C), así como su tamaño (ver detalles en Fig. 3.1.2A1-C1). Además, la distribución de los depósitos de  $\beta$ -amiloide ya no se restringió al *stratum oriens* y al hilio, sino que se empezaron a encontrar placas en el *stratum radiatum* y en CA3 a los 6 meses de edad para finalmente distribuirse por la totalidad del hipocampo a 12 meses de edad. Con el objetivo de corroborar estos resultados obtenidos mediante inmunohistoquímica, se llevó a cabo la cuantificación de la carga amiloide en la región CA1 del hipocampo expresada como el porcentaje de área ocupada por placas OC-positivas respecto al área total analizada. De esta manera se observó un incremento significativo de la carga amiloide dependiente de la edad, siendo  $3,47 \pm 0,49$  veces mayor a 6 meses y  $8,78 \pm 0,93$  a 12 meses con respecto a los animales APP/PS1 de 4 meses de edad (Fig. 3.1.2D). Por lo tanto, aunque entre 4 y 6 meses existen diferencias significativas en la carga amiloide, es entre 6 y 12 meses cuando se produce el mayor incremento de este parámetro en este modelo animal transgénico.

A continuación, y para analizar la reacción astrogliar a la acumulación extracelular de amiloide se realizó un estudio inmunohistoquímico empleando un anticuerpo para GFAP (marcador de astrocitos) en el hipocampo de animales APP/PS1 y controles de 4, 6 y 12 meses de edad. Los resultados revelaron un fuerte proceso de astrogliosis asociado a la edad, tanto en animales no transgénicos (Fig. 3.1.3A, C y E) como en los APP/PS1 (Fig. 3.1.3B, D y F), aunque fue más pronunciado en los transgénicos donde los astrocitos reactivos se concentraron alrededor de zonas inmunonegativas que corresponden con placas amiloides (ver detalle en Fig. 3.1.3F1-F2). De esta manera los depósitos extracelulares de A $\beta$  quedan completamente rodeados por células GFAP-positivas.



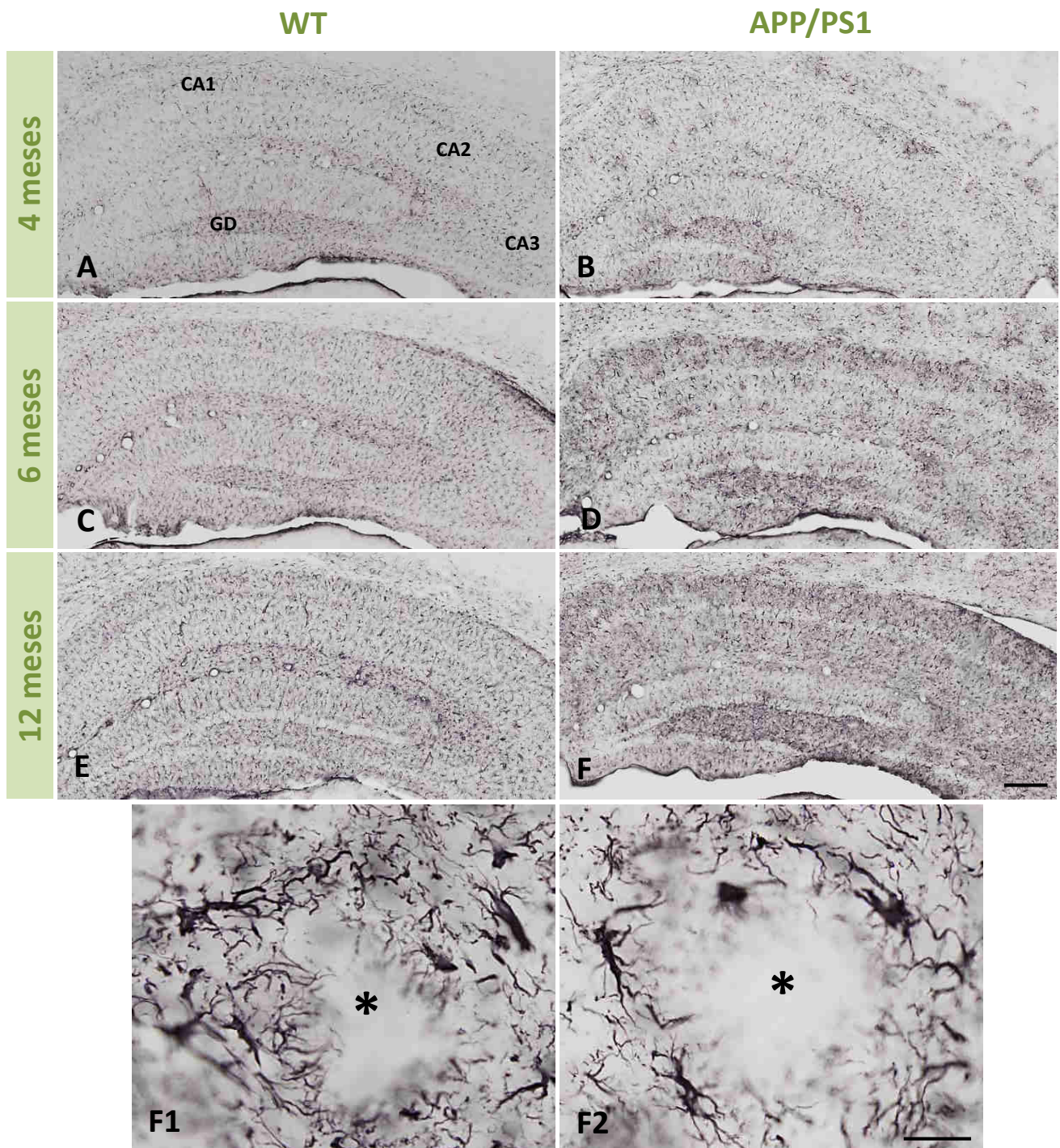
**Figura 3.1.1. Citoarquitectura del hipocampo de animales WT y APP/PS1 de 6 y 12 meses de edad.** Tinción con violeta de cresilo del hipocampo de animales de 6 (A-B) y 12 (C-D) meses de edad. Este colorante permite visualizar la estructura laminar de las diferentes regiones hipocampales. Se distingue la capa de células principales (sp) de las regiones CA1, CA2 y CA3, y la capa de células granulares (g) del giro dentado (GD). En los animales APP/PS1 se pueden distinguir los depósitos de  $\beta$ -amiloide de un color ligeramente rosado (flechas). Estos depósitos (flechas) se pueden ver con mayor detalle en un corte semifino teñido con azul de toluidina (E). alv: alveus; so: *stratum oriens*; sp: *stratum pyramidale*; sr: *stratum radiatum*; slm: *stratum lacunosum-moleculare*; g: *capa granular*; h: *hilio*; m: *capa molecular*. Barras de escala: A-D: 200  $\mu$ m; E: 50  $\mu$ m.

OC



**Figura 3.1.2. Patrón de expresión temporal de Aβ oligomérico extracelular en el hipocampo de animales APP/PS1 de 4 (A), 6 (B) y 12 (C) meses de edad.** Los depósitos extracelulares de Aβ (teñidos con el anticuerpo OC) empiezan a observarse desde los 4 meses de edad (A). El número y el tamaño de las placas (detalle en A1-C1) aumenta gradualmente con la edad, de manera que la carga amiloide es significativamente mayor en los animales de mayor edad (D). Aunque entre 4 y 6 meses ya existe un aumento significativo, es entre 6 y 12 meses donde hay el mayor aumento en la carga amiloide. Barras de escala: A-C: 200 μm; A1-C1: 25 μm



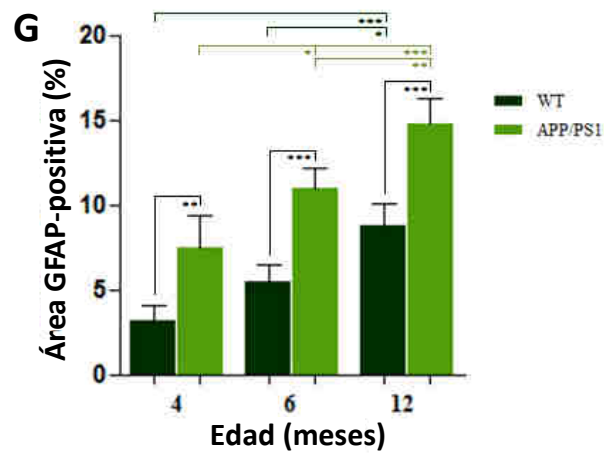
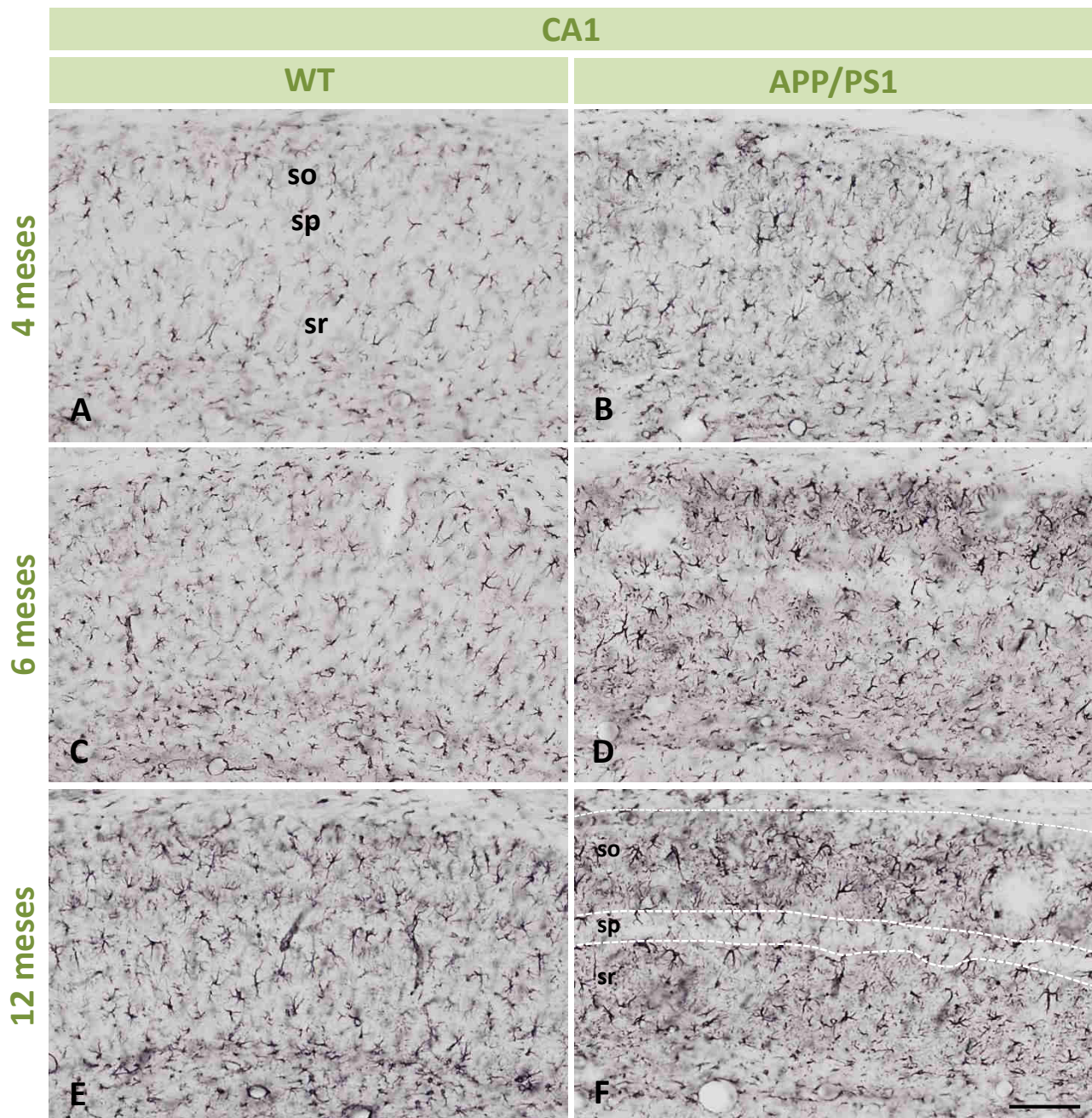


**Figura 3.1.3. Patrón de astrogliosis en el hipocampo de ratones APP/PS1 y WT a 4, 6 y 12 meses de edad.** Inmunohistoquímica para GFAP en animales WT (A, C y E) y APP/PS1 (B, D y F). Desde los 4 meses de edad se observa una mayor reactividad astrocitaria en los animales APP/PS1 respecto a los WT. En F1-F2 se muestran células astrocitarias rodeando depósitos de Abeta (no teñidos e indicados con asterisco). CA1-CA3, regiones del asta de Ammon. Barras de escala: A-F: 200  $\mu$ m; F1-F2: 25  $\mu$ m

Al igual que para la carga amiloide, se realizó el estudio cuantitativo por análisis de imagen del área ocupada por la astrogliá GFAP-positiva en la región CA1 del hipocampo de animales WT y APP/PS1 a 4, 6 y 12 meses de edad (Fig. 3.1.4). En los animales no transgénicos se detectó un aumento significativo ( $180,73 \pm 25,92\%$ ) del área GFAP-positiva entre los 4 y los 12 meses de edad, asociado al proceso normal de envejecimiento. En animales APP/PS1 se observó también un incremento significativo entre 4, 6 ( $45,68 \pm 5,32\%$ ) y 12 ( $97,26 \pm 9,73\%$ ) meses de edad. Además, se encontraron diferencias significativas a todas las edades analizadas al comparar los animales doble transgénicos con sus respectivos controles (incremento de  $139,81 \pm 34,61\%$ ;  $101,49 \pm 11,83\%$  y  $68,51 \pm 6,85\%$  a 4, 6 y 12 meses respectivamente), de manera que el aumento del área ocupada por la astrogliá GFAP-positiva no es debido únicamente al envejecimiento, sino que estaba asociado con la progresión de la patología de la EA (Fig. 3.1.4G).

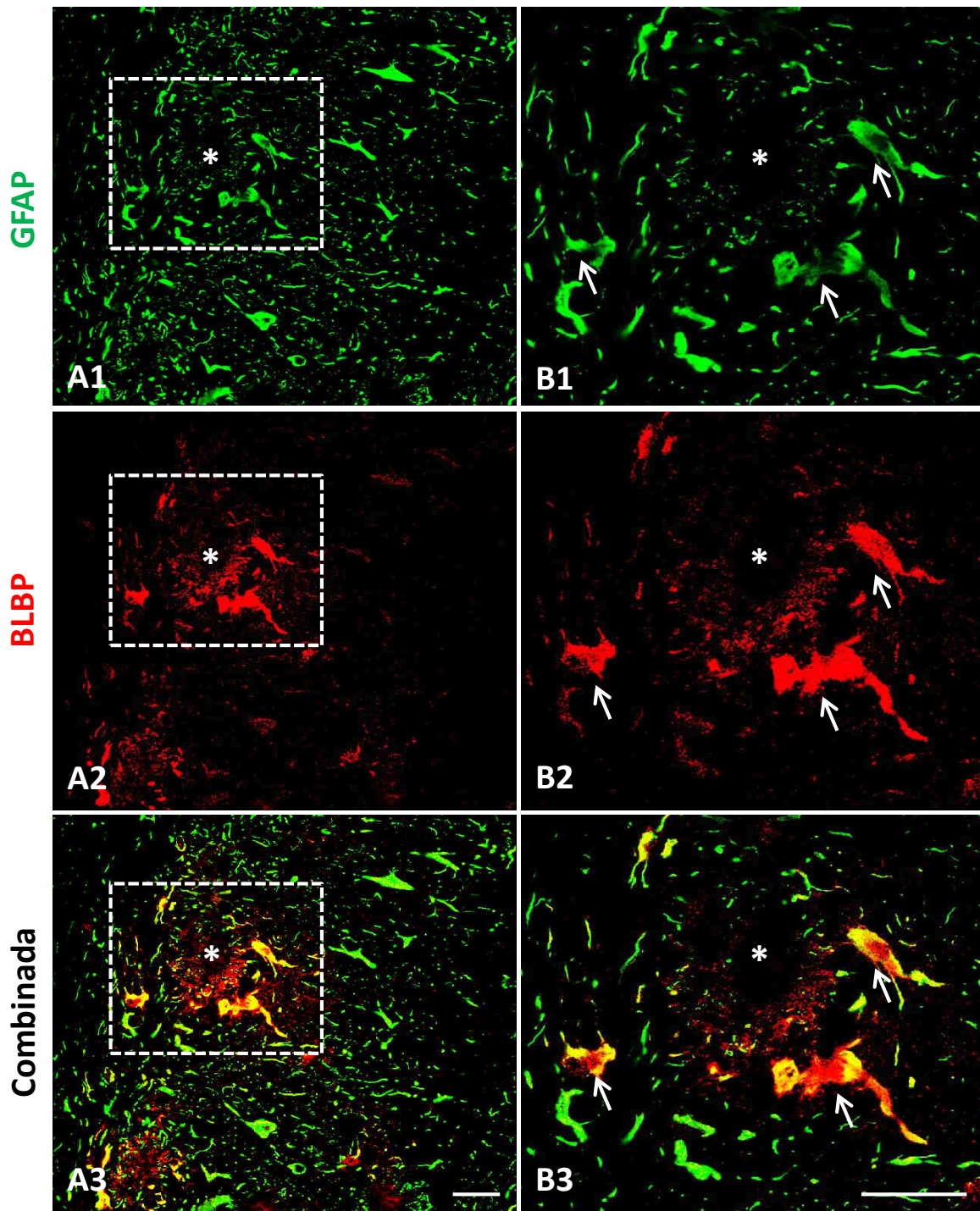
Aunque el uso de GFAP como marcador específico de astrocitos reactivos está muy extendido y la mayoría de las células astrogliales del hipocampo expresan esta proteína del citoesqueleto, únicamente aquellos astrocitos localizados cerca de placas de A $\beta$  muestran aumento de la expresión de GFAP y presentan un fenotipo reactivo con morfología hipertrófica y prolongaciones gliales orientadas hacia los depósitos amiloides. Por ello, para diferenciar selectivamente los astrocitos en un estado activado frente a los no activados, hemos empleado un anticuerpo para BLBP (del inglés "*Brain Lipid-Binding Protein*") como marcador de reactividad astrogliá (Gotz et al. 2015). Para comprobar que efectivamente en nuestro modelo este marcador era específico de la astrogliá reactiva realizamos un doble marcaje fluorescente con anticuerpos para GFAP y BLBP en el hipocampo de animales APP/PS1 de 12 meses de edad (Fig. 3.1.5), empleando WT de 12 meses como controles (no mostrado). Tal y como esperábamos, únicamente los astrocitos que se encontraban rodeando las placas amiloides eran positivos para ambos marcadores (Fig. 3.1.5A1-A3; ver detalle en B1-B3) en la región CA1 del hipocampo. En los animales controles únicamente las células progenitoras de la región subgranular del giro dentado fueron doblemente positivas para BLBP y GFAP (Fig. Suplementaria 3.1). El BLBP se ha descrito como un marcador de células progenitoras de tipo 1 en la región subgranular del giro dentado (SGZ). Estas células progenitoras, SGZ, se pueden clasificar en dos subtipos, SGZ-tipo 1 y SGZ-tipo 2, siendo el primero de estos subtipos células con la capacidad de autorrenovarse y producir tanto células neuronales como gliales. (Baglietto-Vargas et al. 2017). Además este marcador parece conservarse en la astrogliá reactiva pero no en la astrogliá madura en un estado no reactivo (Götz and Barde 2005; Gotz et al. 2015).





N=4; ADEVA de una vía;  $F(5, 18) = 38,18$ ;  $P < 0,0001$ ;  
 Test de Tukey, \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

**Figura 3.1.4. Aumento significativo de reactividad astrocitaria con la edad en la región CA1 del hipocampo de animales APP/PS1.** La inmunohistoquímica para GFAP revela un aumento de la reactividad astrogial con la edad en los animales WT (A, C y E) y APP/PS1 (B, D y F). Destaca la mayor astrogliosis de los animales APP/PS1 respecto a los WT de la misma edad. El estudio cuantitativo (G) confirma un aumento significativo del área ocupada por astrocitos GFAP-positivos en animales APP/PS1 con la edad, y con respecto a los animales controles. so: *stratum oriens*; sp: *stratum pyramidale*; sr: *stratum radiatum*. Barras de escala: A-F: 100  $\mu$ m.



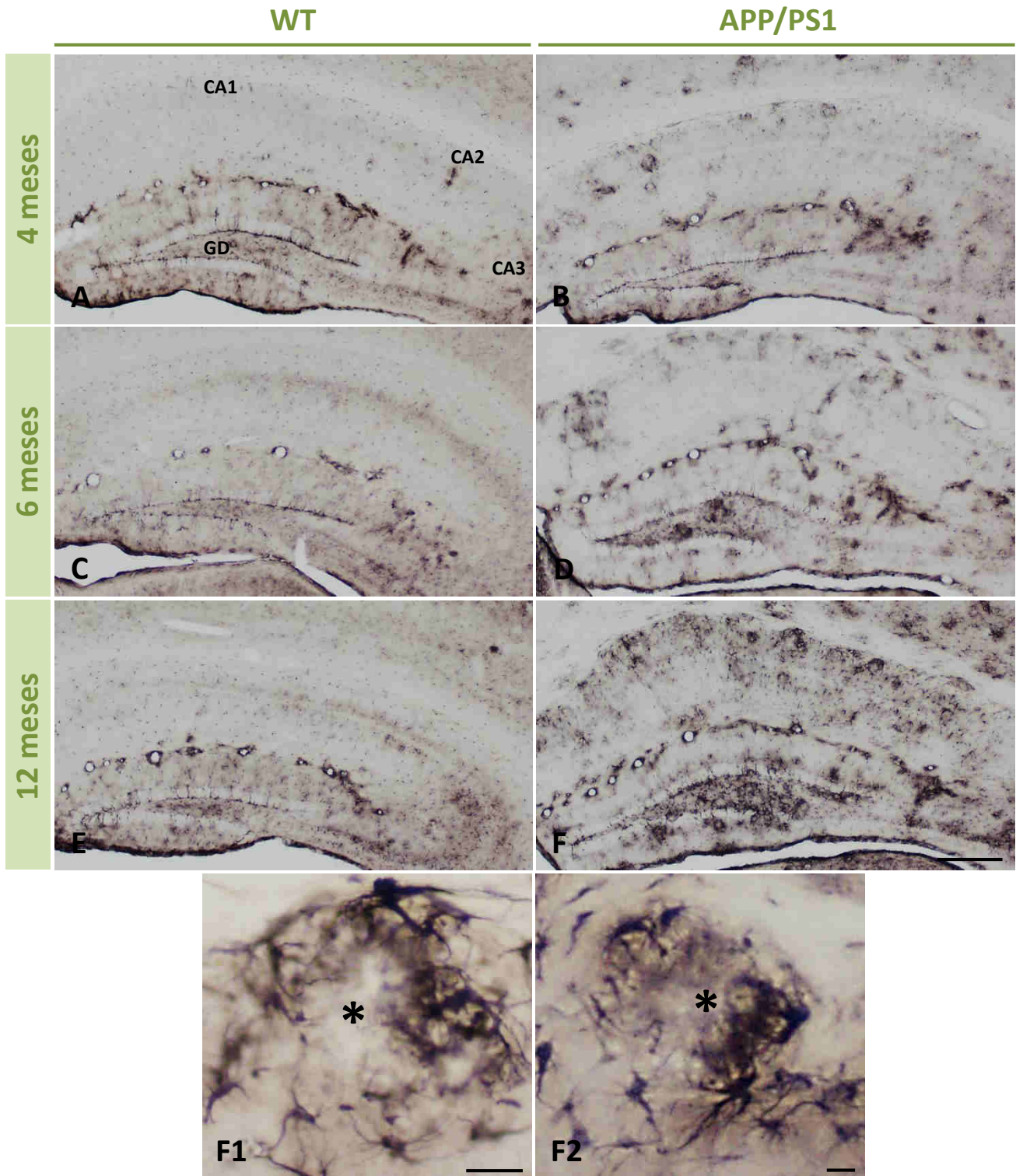
**Figura 3.1.5. Los astrocitos reactivos expresan selectivamente el marcador BLBP.** Inmunohistoquímica fluorescente doble para el marcador astrogial GFAP (verde) y el marcador de reactividad astrogial BLBP (rojo). La co-localización de estos dos marcadores astrogiales nos permite identificar la población de astrocitos reactivos en el hipocampo de animales APP/PS1. Los astrocitos reactivos se concentran de manera específica alrededor de las placas amiloides (no teñidas, e indicadas con asteriscos). Barras de escala: A1-B3: 25  $\mu$ m



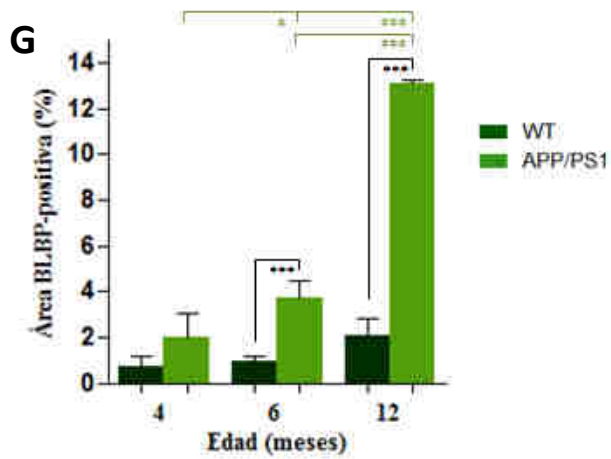
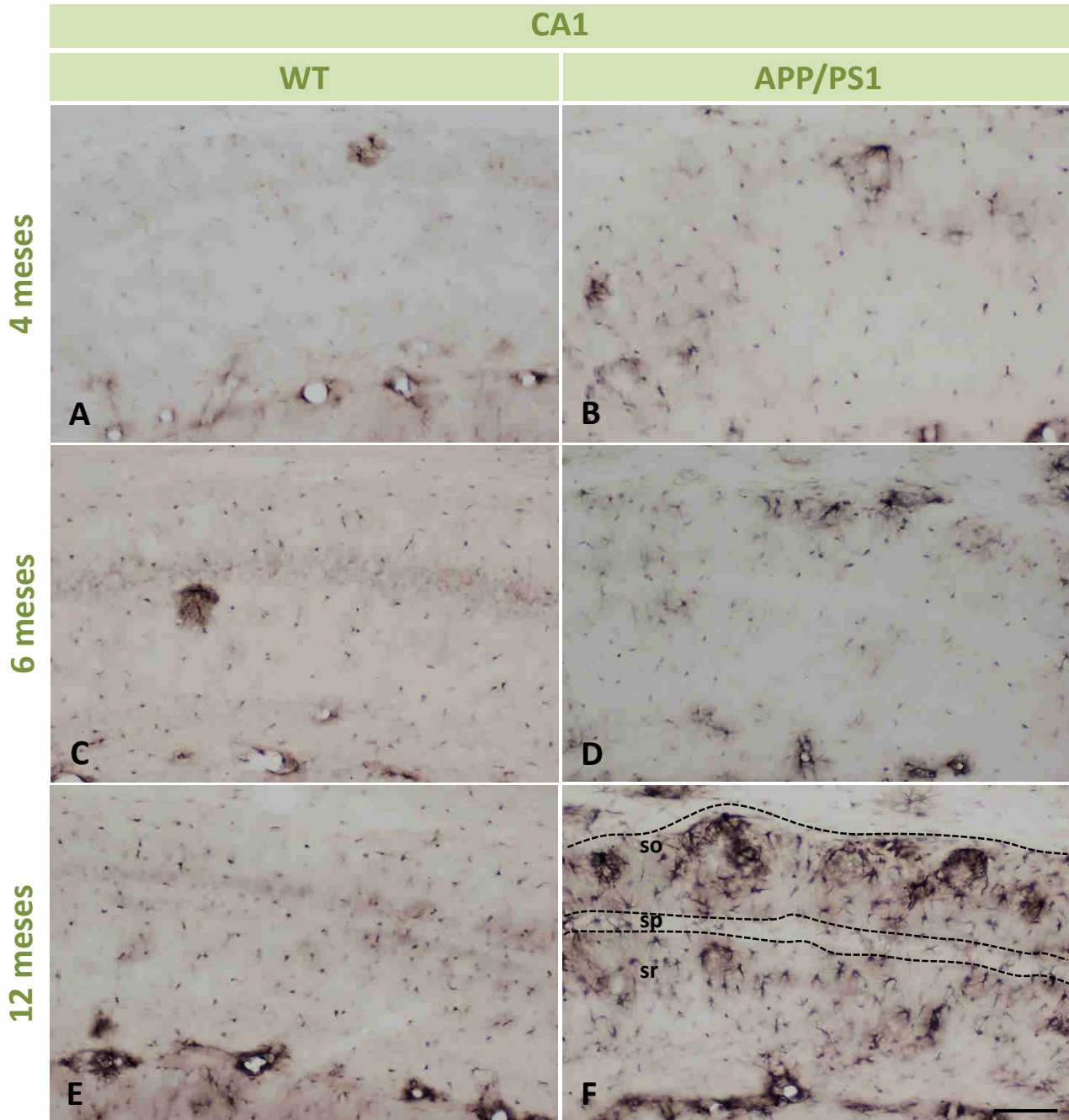
Tras la comprobación de la especificidad del BLBP como marcador de reactividad astrogliar, se realizó el estudio comparativo mediante marcaje inmunohistoquímico con el anticuerpo anti-BLBP en animales APP/PS1 y WT de 4, 6 y 12 meses de edad. En los animales controles sólo las células progenitoras de la capa subgranular del giro dentado aparecen intensamente teñidas (Fig. 3.1.6A, C y E y Fig. Suplementaria 3.1) a las edades analizadas, exceptuando algunos astrocitos de la región CA3 que empiezan a ser visibles a partir de los 12 meses de edad. Sin embargo, en los animales doble transgénicos desde edades tempranas (4 meses) es posible visualizar células astrogliales en estado activado (Fig. 3.1.6B, D y F), mayoritariamente alrededor de zonas inmunonegativas correspondientes a depósitos amiloides extracelulares (ver detalle en Fig. 3.1.6F1-F2). Debido a que el BLBP no es un marcador exclusivo de astrogliá reactiva, sino también de las células progenitoras que se encuentran en el giro dentado del hipocampo, resultó necesario centrar nuestros estudios en la región CA1 hipocampal (Fig. 3.1.7). Así la cuantificación (Fig. 3.1.7G) del área ocupada por astrogliá reactiva (área BLBP-positiva en relación al área total analizada) en CA1 no mostró variaciones significativas en los animales controles a 4, 6 y 12 meses de edad. Por otro lado, en los animales APP/PS1 existe un fuerte proceso de activación astrogliar estadísticamente significativo desde edades tempranas (aumento del  $89,52 \pm 16,4\%$  entre 4 y 6 meses y aumento del  $248,92 \pm 2,48\%$  entre 6 y 12 meses). Las diferencias fueron también significativas al comparar los animales doble transgénicos con sus respectivos controles tanto a 6 (aumenta  $4,06 \pm 0,74$  veces) como a 12 (aumenta  $6,39 \pm 0,063$  veces) meses de edad. De manera sorprendente, el incremento de la reactividad astrogliar observado en el modelo APP/PS1 no tiene lugar de manera progresiva como el observado con GFAP, sino que a edades avanzadas (12 meses) esta reactividad glial se incrementa drásticamente.

Por ello resultó necesario comprobar en estos animales el efecto de la patología amiloide sobre la respuesta de activación astrogliar. El patrón temporal para el área BLBP-positiva resultó ser coincidente (correlación positiva) con el de la deposición amiloide (expresado como área OC-positiva). Además, ambos parámetros mostraron tener una relación lineal significativa entre ellos ( $r=0,9567$ ;  $***p<0,0001$ ) (Fig. 3.1.8).

En resumen, en el hipocampo de los animales APP/PS1 existe un fuerte proceso de activación astrogliar en paralelo con la progresión de la patología. Esta reactividad glial está directamente relacionada con la carga amiloide, cuyo aumento es progresivo con la edad.

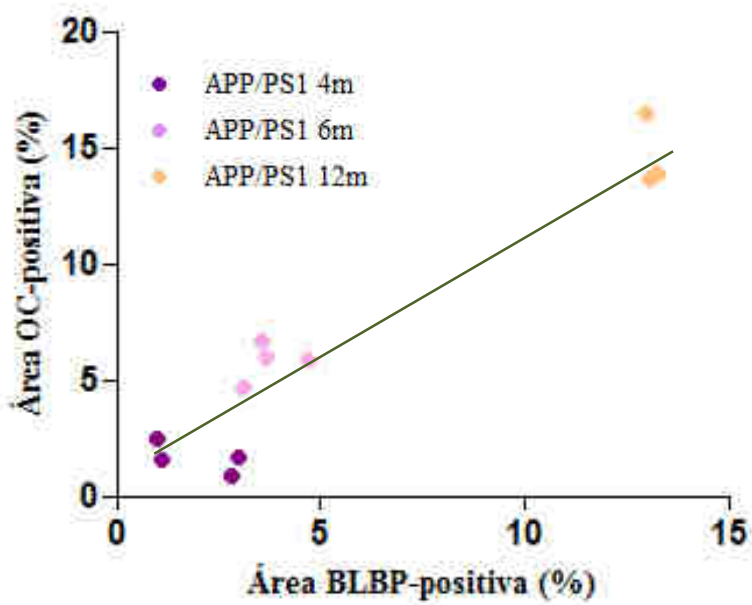


**Figura 3.1.6. Estudio comparativo de la reactividad astrogliar en el hipocampo de ratones APP/PS1 y WT a 4, 6 y 12 meses de edad.** Marcaje inmunohistoquímico con el anticuerpo BLBP. La reactividad astrogliar en los animales WT (A, C y E) en general es mucho menor que en los animales APP/PS1 (B, D y F), independientemente de su edad. En los animales transgénicos se observa un claro aumento de la reactividad astrogliar con la edad. En F1 y F2 se muestra a mayores aumentos astrocitos reactivos BLBP-positivos alrededor de placas de A $\beta$  (indicadas con asteriscos). Barras de escala: A-F: 300  $\mu$ m; F1-F2: 25  $\mu$ m



N=4; ADEVA de una vía;  $F(5, 16) = 149,3$ ;  $P < 0,0001$ ;  
 Test de Tukey, \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$

**Figura 3.1.7. Aumento de la reactividad astrogial en la región CA1 del hipocampo de animales APP/PS1.** Mediante inmunohistoquímica para BLBP se aprecia un aumento de marcaje positivo en los ratones APP/PS1 (B, D y F) con la edad. En los animales WT (A, C y E) la inmunotinción está restringida a los cuerpos celulares y apenas hay cambios con la edad. El estudio cuantitativo (G) confirma el incremento del área ocupada por los astrocitos BLBP-positivos con la edad en los animales APP/PS1, así como con respecto a los animales controles de la misma edad. so: *stratum oriens*; sp: *stratum pyramidale*; sr: *stratum radiatum*. Barras de escala: A-F: 100  $\mu$ m.



N=11; Test de Pearson;  $r = 0,9567$   
 \*\*\*  $P < 0,0001$

**Figura 3.1.8.** El aumento de la reactividad astrogliar con la edad en el hipocampo de los animales APP/PS1 se correlaciona con el aumento de la carga amiloide. El estudio de la correlación entre la carga amiloide (área ocupada por placas amiloides positivas para OC) y la reactividad astrogliar (área ocupada por astrogliá positiva para BLBP) en animales APP/PS1 de 4, 6 y 12 meses muestra una relación lineal significativa.

### 3.1.3. Identificación ultraestructural de células astrogiales en el hipocampo del modelo APP/PS1

Los astrocitos se identifican a microscopía electrónica como células con un citoplasma poco electrodenso y la presencia de filamentos intermedios en su interior. Sin embargo, en numerosas ocasiones es difícil identificar con claridad las delgadas prolongaciones astrogiales en el complejo entramado del parénquima nervioso, por lo que es necesario utilizar técnicas de inmunomarcaje. En este trabajo para poder realizar el estudio ultraestructural de la astroglia reactiva hemos tenido que poner previamente a punto el marcaje con inmuno-oro para distintos anticuerpos específicos de la astroglia.

Tal y como ha sido mencionado previamente, aunque el uso de GFAP como marcador de reactividad astrogial está ampliamente aceptado y extendido, esta proteína es expresada por la mayoría de los astrocitos y no únicamente por aquellos en un estado activado (Ridet et al. 1997; Serrano-Pozo et al. 2013a). Además, esta proteína del citoesqueleto abunda especialmente en las prolongaciones más gruesas de los astrocitos, que contienen mayor cantidad de filamentos intermedios, tal y como se observa en la Figura 3.1.9 mediante el marcaje de inmuno-oro para microscopía electrónica de transmisión con un anticuerpo anti-GFAP. Sin embargo, los procesos astrogiales más finos no suelen poseer filamentos y por lo tanto la GFAP no nos permite visualizar la célula astrogial al completo. Por ello, el siguiente paso en el estudio de la respuesta astrogial del hipocampo del modelo transgénico APP/PS1 consistió en la identificación y caracterización a nivel ultraestructural de otros marcadores específicos astrogiales diferentes al GFAP.

Para ello, en primer lugar, se llevó a cabo el marcaje para microscopía electrónica de transmisión mediante la técnica de inmuno-oro con un anticuerpo para la aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1L1) en el hipocampo de animales APP/PS1 a 6 meses de edad. La ALDH1L1 es una isoforma enzimática glicolítica cuya expresión cerebral es específica de células astrogiales (Cahoy et al. 2008; Serrano-Pozo et al. 2013a). El inmunomarcaje obtenido en las células astrogiales mediante el uso de este anticuerpo no es tan abundante como el de GFAP (Fig. 3.1.10A-C); sin embargo, su distribución por todo el citoplasma astrogial, incluyendo zonas/prolongaciones en las que no se visualizan los filamentos gliales, permite identificar de manera más completa todas las prolongaciones astrocitarias (Fig. 3.1.10C1).

Por otro lado, las acuaporinas constituyen una familia de pequeñas proteínas integrales de membrana implicadas en el transporte de agua. La acuaporina 4 (AQP4) es la forma mayoritaria en el SNC, cuya expresión es muy notable en las prolongaciones de los astrocitos que rodean los vasos sanguíneos cerebrales (Hubbard et al. 2017). Así, la inmuno-oro con anti-AQP4 en el hipocampo de animales APP/PS1 de 6 meses de edad reveló un intenso marcaje en la membrana de los pies perivasculares astrogiales (Fig. 3.1.11A-B), concretamente en la zona de contacto astrocito-célula endotelial (Fig. 3.1.11C) tal y como era de esperar. Sin embargo, no sólo los pies perivasculares se marcaron con anti-AQP4, sino que



toda la membrana plasmática de los astrocitos resultó positiva para acuaporina 4 (Fig. 3.1.12A y C). El intenso marcaje astroglial de AQP4 en animales transgénicos APP/PS1 contrasta con el observado en los animales no transgénicos (Fig. Suplementaria 3.2), en los que la cantidad de marcaje AQP4-positivo era muy inferior. A diferencia de los marcadores empleados anteriormente (GFAP y ALDH1L1) cuya distribución era citoplasmática, el inmunomarcaje para AQP4 se encontró asociado de manera preferente y específica a la membrana plasmática de las células astrogliales (ver detalle en Fig. 3.1.12B). El marcaje de AQP4 nos permitió identificar en el neuropilo aquellos perfiles celulares de origen astroglial que de otra manera no sería posible diferenciar.

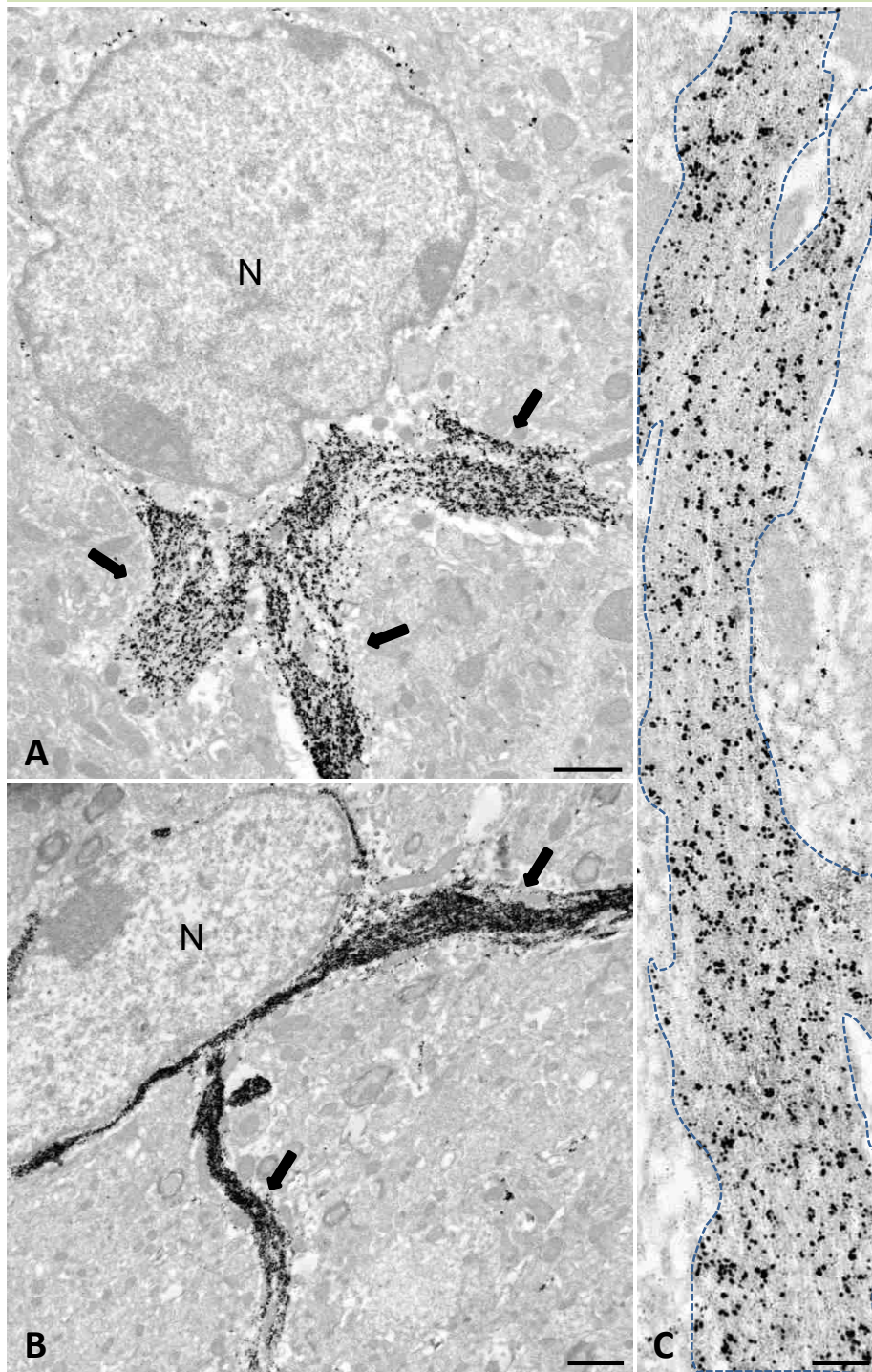
Otro marcador ampliamente usado para la identificación específica de astrocitos es la glutamina sintetasa (GS), implicada en la transformación de amonio y glutamato procedente del medio extracelular en glutamina (Ridet et al. 1997; Suárez et al. 2002). La astroglía del modelo APP/PS1 expresa abundantemente esta enzima a nivel citoplasmático, tal y como se puede observar mediante el inmunomarcaje para microscopía electrónica de transmisión con anti-GS (Fig. 3.1.13A y C). No se ha observado una asociación clara de la glutamina sintetasa a ningún orgánulo celular, aunque esta enzima parece acumularse en las regiones donde se encuentran los filamentos intermedios característicos de los astrocitos (Fig. 3.1.13B).

La actividad de la glutamina sintetasa en la eliminación del exceso de glutamato es dependiente de la capacidad de los astrocitos para captar e internalizar este neurotransmisor. Esta función es llevada a cabo mediante proteínas transportadoras de aminoácidos excitadores (EAATs; del inglés "*excitatory amino acid transporters*"), dentro de las cuales el EAAT2 es el principal regulador de los niveles de glutamato (Simpson et al. 2010a). Su distribución, restringida a la membrana plasmática de las células astrogliales en nuestro modelo APP/PS1, es muy similar a la observada previamente mediante el marcaje con AQP4. Sin embargo, la señal obtenida mediante EAAT2 (Fig. 3.1.14) fue notablemente inferior a la de AQP4 por lo que en algunos casos puede resultar más difícil su visualización.

En resumen, los astrocitos hipocampales del modelo transgénico APP/PS1 expresan los marcadores GFAP, ALDH1L1, AQP4, GS y EAAT2, por lo que el empleo de anticuerpos para alguna de estas moléculas nos permitirá identificar específicamente a esta población glial. Además, debido a su localización diferencial en el astrocito podremos visualizar de manera específica los filamentos gliales, el citoplasma o la membrana plasmática astroglial. De los diversos marcadores utilizados, la AQP4 resultó ser el mejor marcador de astrocitos reactivos a EM, ya que esta molécula se encontraba distribuida de forma muy abundante por la membrana plasmática de estas células.



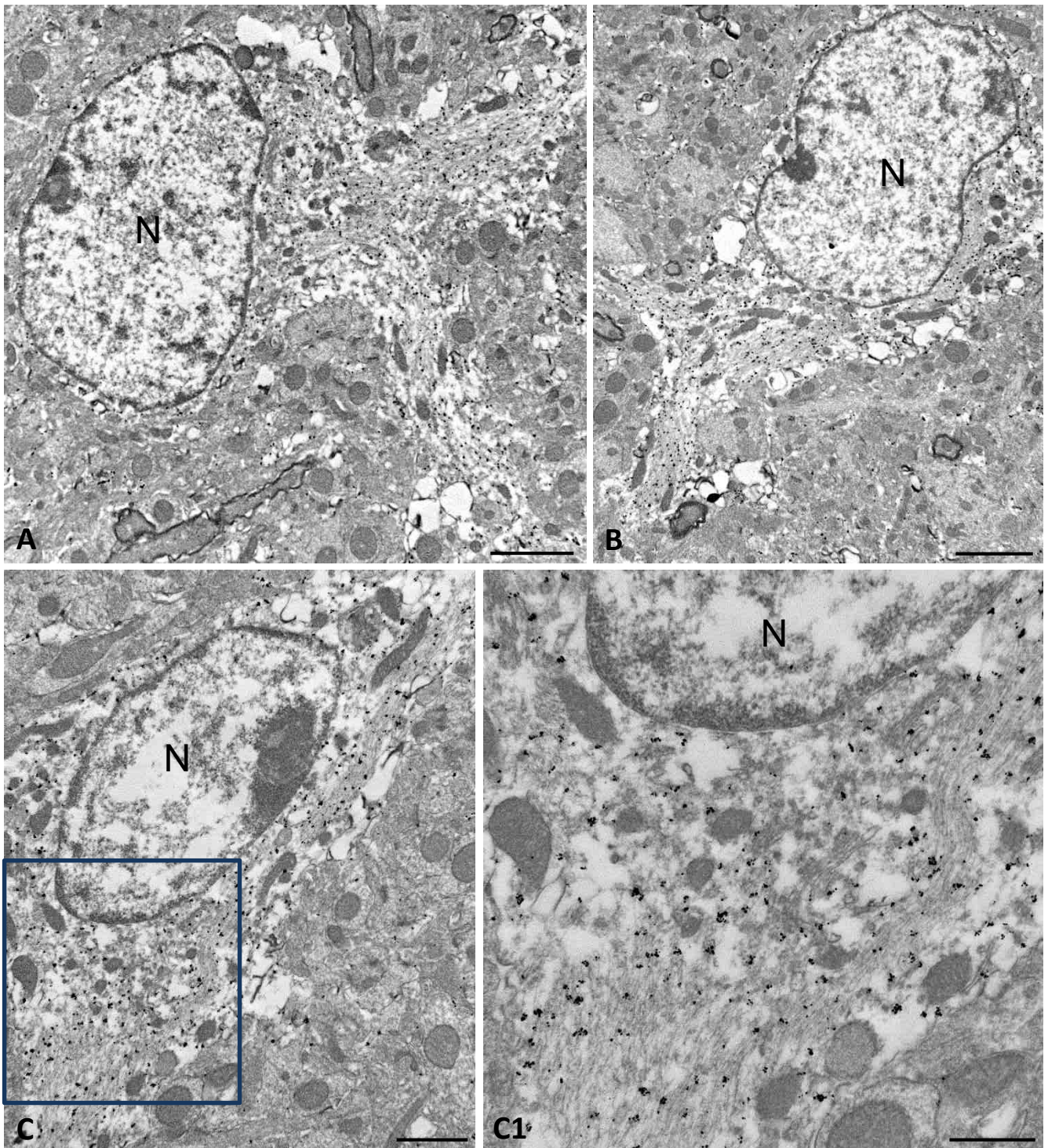
## GFAP



**Figura 3.1.9. Identificación a microscopía electrónica de transmisión de astrocitos mediante inmunomarcaje de GFAP con oro coloidal.** Inmunotinción de astrocitos en el hipocampo de animales APP/PS1 de 6 meses de edad. Las partículas de inmuno-oro se localizan en el citoplasma astroglial (A-C) preferentemente en las prolongaciones (flechas). En C se muestra en mayor detalle una prolongación astrocitaria con abundantes filamentos intermedios marcados para GFAP. N, núcleo astroglial. Barras de escala: A-B: 1  $\mu$ m; C: 0,2  $\mu$ m.



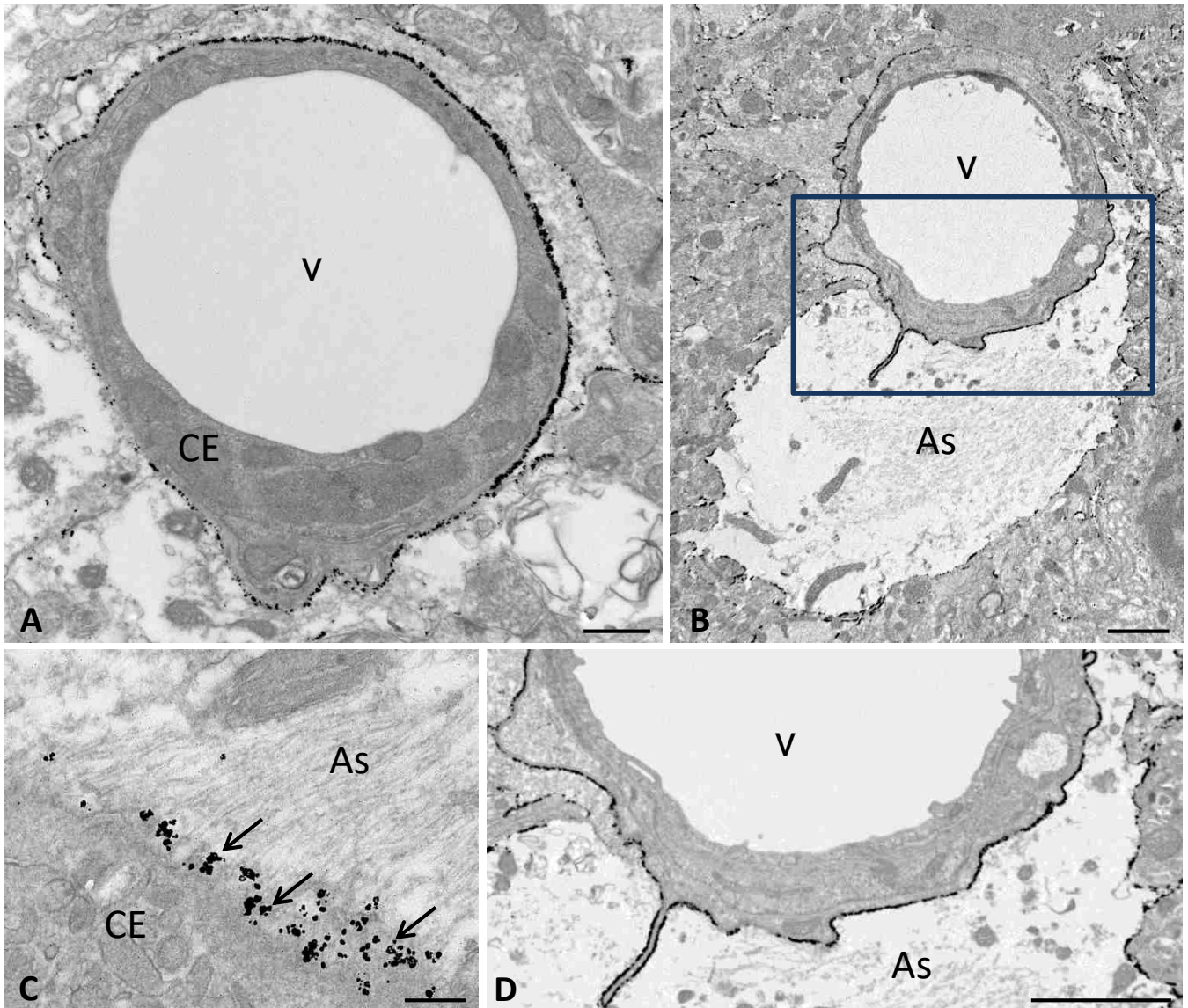
## ALDH1L1



**Figura 3.1.10. Identificación a microscopía electrónica de transmisión de células astrogiales inmunomarcadas para ALDH1L1 en el hipocampo de ratones APP/PS1.** La tinción inmuno-oro se localiza específicamente en el citoplasma de los astrocitos (A-C). En C1 se puede ver a mayores aumentos un detalle del citoplasma del astrocito (recuadro en C) donde se distingue claramente las partículas de oro coloidal en el citoplasma. N, núcleo astrocitario. Barras de escala: A: 2  $\mu\text{m}$ ; B-C1: 0,2  $\mu\text{m}$ .

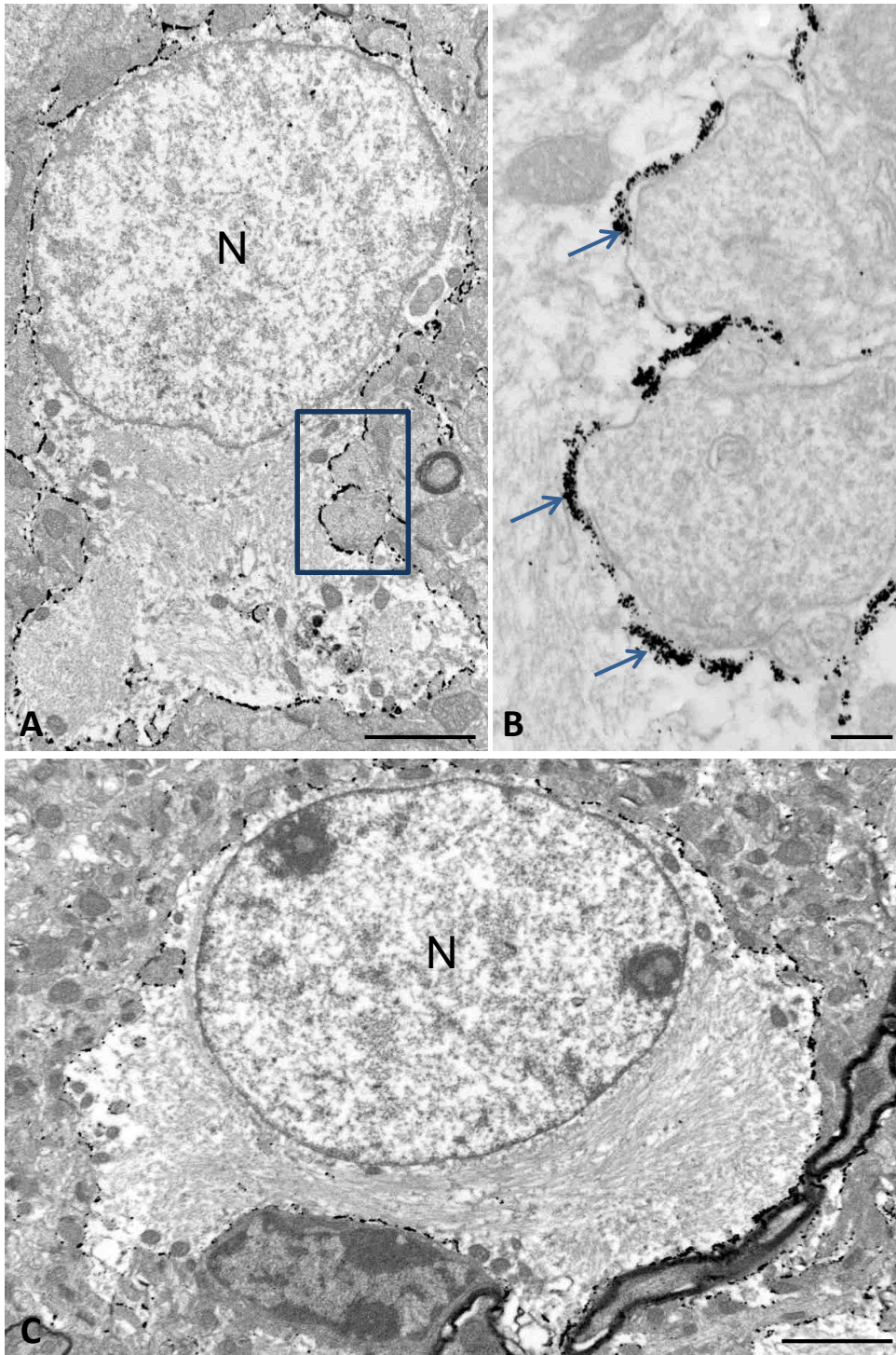


## AQP4



**Figura 3.1.11. Localización ultraestructural de AQP4 en pies perivasculares astrocitarios.** Inmunomarcaje a microscopía electrónica de transmisión con la técnica de inmuno-oro para acuaporina 4 (AQP4) en el hipocampo de animales APP/PS1 de 6 meses de edad. La membrana plasmática de las prolongaciones astrocitarias que rodean los vasos sanguíneos expresan abundante AQP4 (A y B; D es un detalle a mayores aumentos de B). La membrana AQP4-positiva del astrocito (flechas) se encuentra en íntimo contacto con las células endoteliales del vaso (C). As: citoplasmas astrocito; CE: célula endotelial; V, vaso sanguíneo. Barras de escala: B, D: 2  $\mu$ m; A: 0,5  $\mu$ m; C: 0,2  $\mu$ m

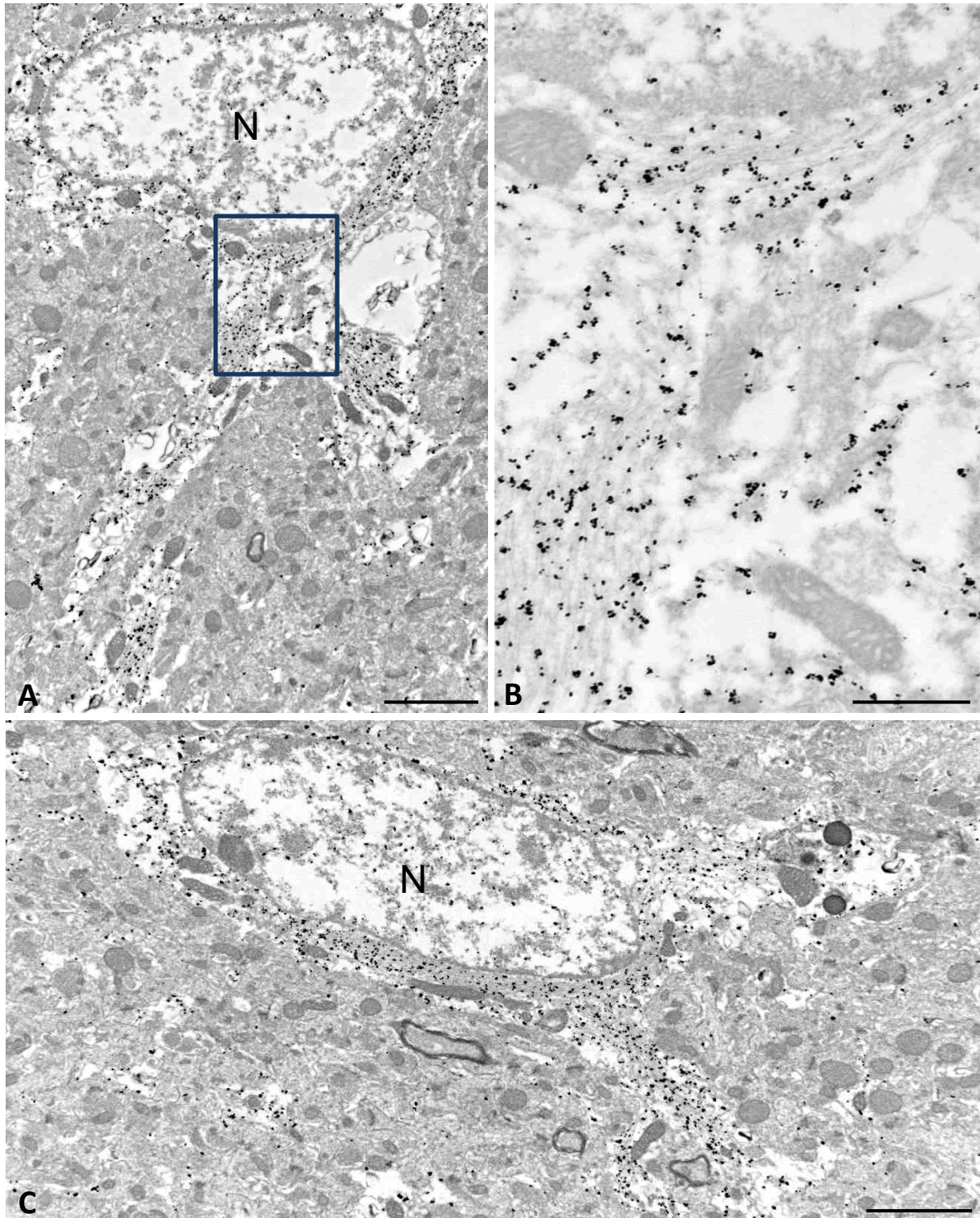
## AQP4



**Figura 3.1.12. La membrana plasmática de los astrocitos reactivos presenta un alto contenido en AQP4.** Inmunolocalización a microscopía electrónica de transmisión con la técnica de inmuno-oro para acuaporina 4 (AQP4) en el hipocampo de animales APP/PS1. La localización de la AQP4 en los astrocitos del hipocampo se restringe a la membrana plasmática (A y C; detalle en B), por lo que permite delimitar perfectamente los perfiles de los cuerpos y prolongaciones astrocitarias en las imágenes ultraestructurales. N, núcleo astrocitario. Barras de escala: A, C: 2  $\mu$ m; B: 0,2  $\mu$ m



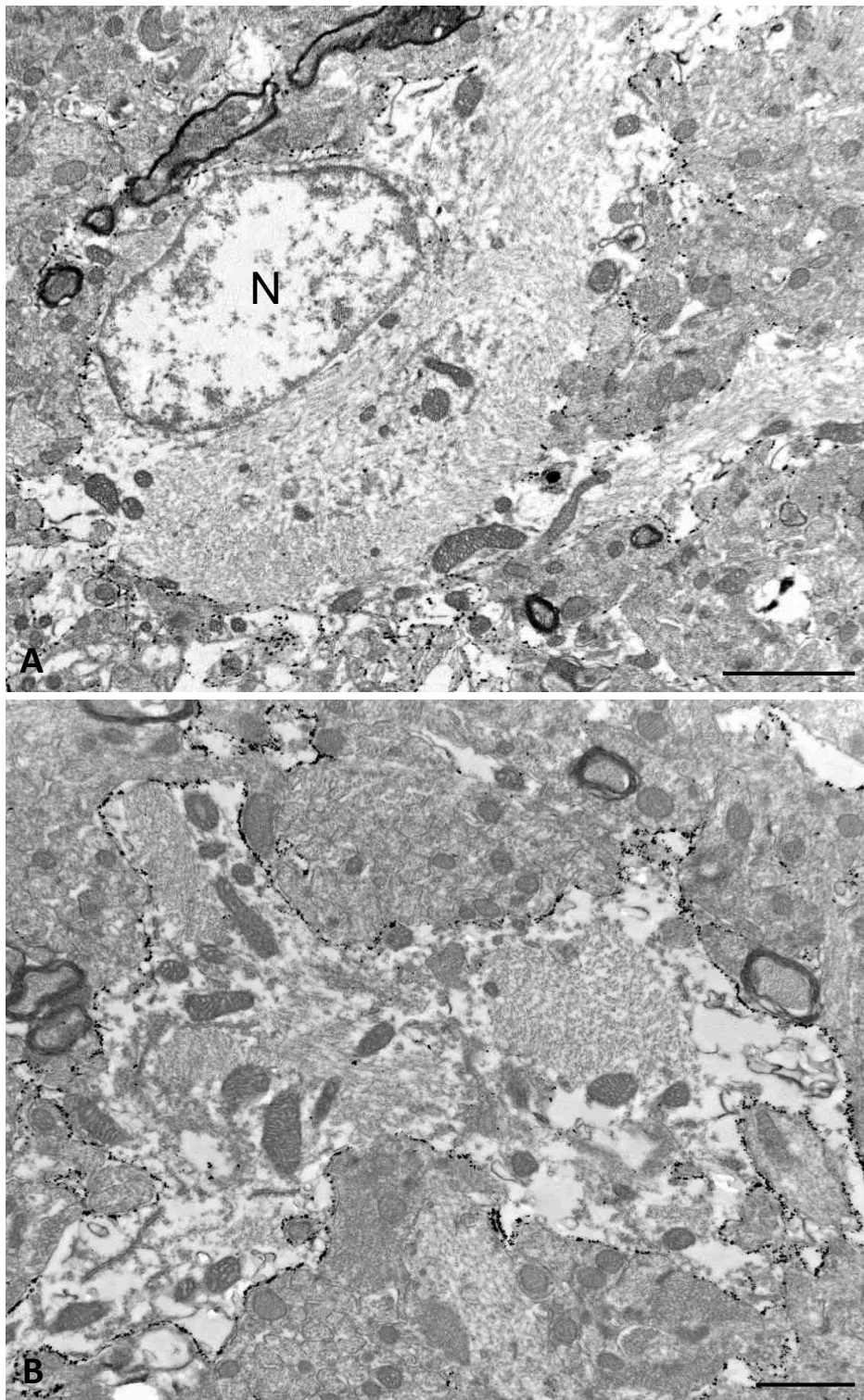
## Glutamina Sintetasa



**Figura 3.1.13. Identificación a microscopía electrónica de transmisión de astrocitos inmunomarcados para GS en el hipocampo de ratones APP/PS1.** La inmunotinción con oro coloidal para glutamina sintetasa (GS) se localiza de manera dispersa por todo el citoplasma de los astrocitos (A y C). La imagen B muestra un detalle a mayores aumentos de la zona recuadrada en A donde se puede ver claramente las partículas de oro coloidal en el citoplasma astrocitario. N, núcleo astrocitario. Barras de escala: A, C: 2  $\mu$ m; B: 0,5  $\mu$ m



## EAAT2



**Figura 3.1.14. Identificación de astrocitos a nivel ultraestructural mediante inmunotinción para EAAT2 en secciones de hipocampo de ratones APP/PS1.** Inmunomarcaje del transportador de glutamato (EAAT2) a microscopía electrónica de transmisión mediante la técnica de inmuno-oro coloidal (A y B). La localización de EAAT2 es preferentemente en la membrana plasmática de los astrocitos permitiendo delimitar bien los límites anatómicos de estas células gliales. N, núcleo astrocitario. Barras de escala: A: 2  $\mu$ m; B: 1  $\mu$ m

### 3.1.4. Los astrocitos reactivos se asocian con los depósitos extracelulares de A $\beta$

En resultados previos de este trabajo se ha mostrado la presencia de astrogliá reactiva alrededor de zonas inmunonegativas correspondientes con placas de A $\beta$ , así como una relación directa entre la reactividad astrogliá y la deposición amiloide (ver Apdo. 3.1.2). Por ello, resulta necesario profundizar en la naturaleza de esta interacción astrogliá-placa, así como tratar de dilucidar la función de la astrogliá reactiva alrededor de las placas amiloides en el hipocampo de animales APP/PS1.

Por ello, en primer lugar, se realizó un estudio mediante microscopía láser confocal con los 5 anticuerpos astrogliáles descritos previamente (GFAP, ALDH1L1, AQP4, GS y EAAT2) y Tioflavina S como marcador de placas fibrilares. En todos los casos se observó una intensa acumulación de prolongaciones astrogliáles rodeando el núcleo fibrilar de las placas. Aunque el marcaje con GFAP, ALDH1L1 o GS (Fig. 3.1.15A, B y D) nos permite visualizar de forma más completa la célula astrogliá en relación a la placa, al tratarse de una tinción citoplasmática, los anticuerpos para AQP4 o EAAT2 son los que muestran mejor el íntimo contacto entre las prolongaciones astrogliáles y las fibras amiloides (Fig. 3.1.15C y E). Además, la interacción astrogliá-placa no solo se establece con el componente fibrilar de los depósitos, sino que los astrocitos se encuentran también contactando tanto el A $\beta$ 42 (componente mayoritario de las placas) como el A $\beta$  oligomérico situado en la periferia de estos depósitos (Fig. 3.1.16B-C).

Las reconstrucciones pseudo-3D obtenidas a partir de series de imágenes confocales permiten analizar las placas amiloides desde diferentes planos. Esta técnica junto a la resolución que ofrece la microscopía electrónica de transmisión nos ha permitido estudiar en detalle el estrecho contacto astrogliá-placa. Tanto el cuerpo celular como las prolongaciones más gruesas de los astrocitos se encuentran rodeando completamente los depósitos amiloides, formando una estructura similar a una cicatriz glial (Fig. 3.1.17). Sin embargo, son las prolongaciones astrogliáles más finas las que penetran en el interior de las placas y contactan directamente con las fibrillas de A $\beta$  (Fig. 3.1.17A1-A7), por lo que el centro de la placa se encuentra totalmente rodeado de estas pequeñas prolongaciones astrogliáles que, en la mayoría de los casos, se caracterizan por la escasez, o incluso ausencia de filamentos gliales y otros orgánulos (Fig. 3.1.17B-C). En ocasiones, la prolongación del astrocito que entra en contacto con la placa presenta numerosos filamentos intermedios (ver detalle en la Figura 3.1.18) que parecen continuarse con las fibrillas amiloides, debido a que la membrana plasmática del astrocito no se observa con claridad. Las regiones claras que se interdigitan con la placa corresponden a porciones del citoplasma astrogliá, inmunopositivas para los marcadores de astrocitos descritos previamente, EAAT2, GS, ALDH1L1 y AQP4, en las no hay prácticamente orgánulos ni filamentos gliales (Fig. 3.1.19).

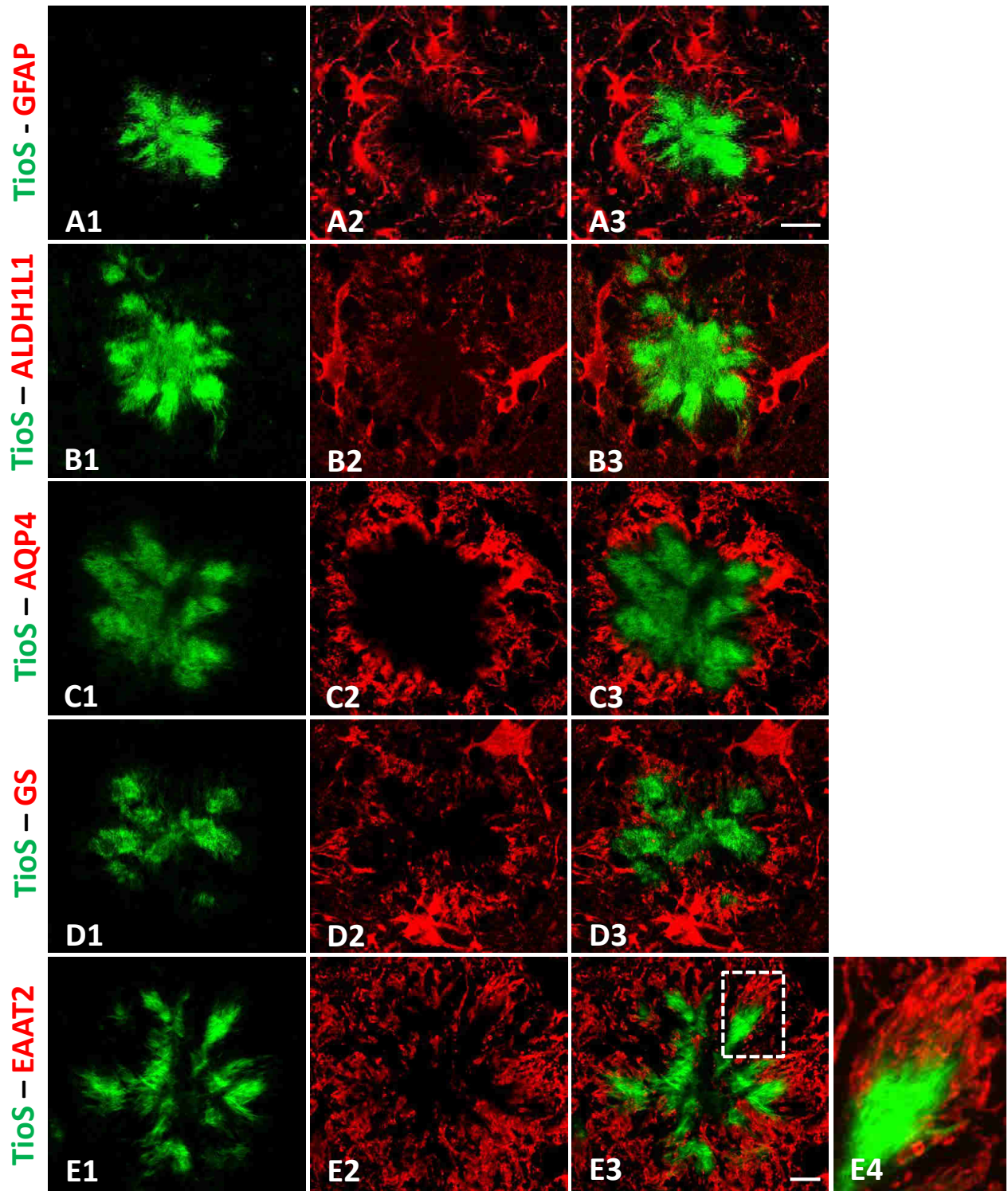
Además, tal y como se describió previamente (Fig. 3.1.15C y E), los anticuerpos anti-EAAT2 y anti-AQP4 (debido a su localización en la membrana plasmática) son los más adecuados para el estudio de la interacción astrocito-placa. Así, mediante la obtención de series de imágenes de planos confocales y las correspondientes imágenes ortogonales (X-Y-Z),



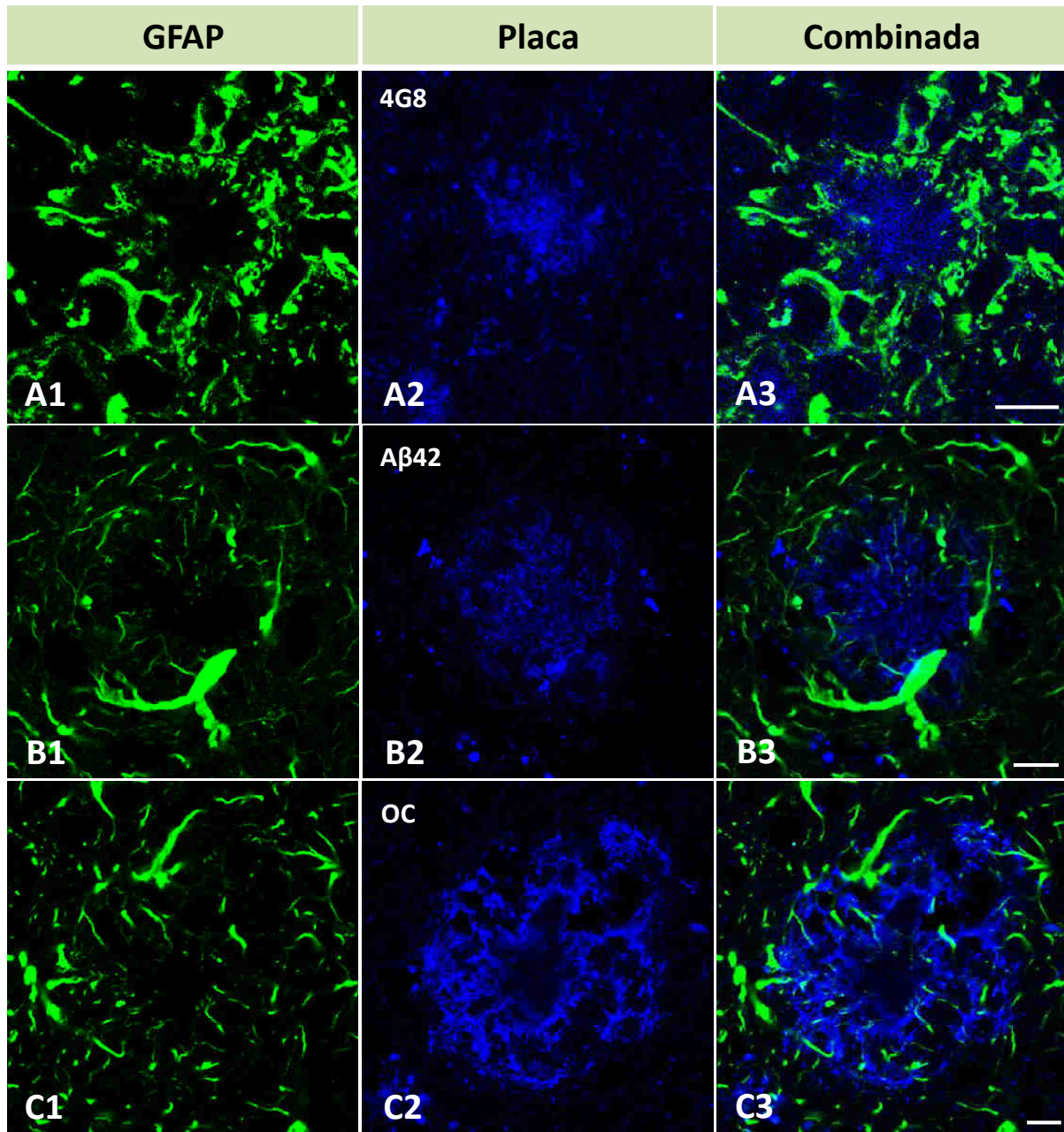
se observaron depósitos de A $\beta$  fibrilar de pequeño tamaño rodeados en su totalidad por prolongaciones astrogliales (Fig. 3.1.20A). La inmuno-oro para acuaporina 4 nos reveló además la presencia de pequeños acúmulos fibrilares de  $\beta$ -amiloide en el interior de las prolongaciones astrogliales que se encontraba contactando una placa amiloide. Destaca el inmunomarcaje de AQP4 en la membrana que rodea las fibrillas de A $\beta$  en el interior del citoplasma astrogliar (Fig. 3.1.20B; detalle en B1), sugiriendo así procesos de internalización/fagocitosis de este componente fibrilar por parte de los astrocitos reactivos.

Para determinar la posible actividad fagocítica astrogliar de las fibrillas amiloides se decidió analizar en nuestro modelo APP/PS1 la presencia y localización de Megf10, receptor astrogliar ampliamente relacionado con procesos de fagocitosis (Singh et al. 2010; Scheib et al. 2012; Chung et al. 2013; Iram et al. 2016). El doble marcaje inmunofluorescente con anti-GFAP y anti-Megf10 no mostró colocalización entre estos dos marcadores (Fig. 3.1.21A). Sin embargo, sí se hallaron regiones de colocalización en la zona de contacto con la placa al emplear ALDH1L1 como marcador astrogliar (Fig. 3.1.21B-C). Así, las prolongaciones más delgadas de los astrocitos (suelen ser las que se infiltran en la placa) carecen de filamentos gliales por lo que el GFAP no nos permite visualizarlas, al contrario del ALDH1L1 que se encuentra ampliamente distribuido por todo el citoplasma astrogliar. La localización del receptor fagocítico Megf10 es coincidente también con la zona más externa del núcleo fibrilar de los depósitos amiloides, tal y como se puede comprobar mediante el doble marcaje inmunofluorescente con Tioflavina S y Megf10 (Fig. 3.1.22). El estudio ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión reveló la presencia de Megf10 en la zona de contacto entre las prolongaciones astrogliales y las fibras amiloides, que se encuentran totalmente interdigitadas en los animales APP/PS1 de 6 y 12 meses de edad (Fig. 3.1.23).

En su conjunto estos resultados son indicativos de la estrecha relación entre los astrocitos reactivos y los depósitos amiloides extracelulares. La presencia de Megf10 en las prolongaciones astrogliales en contacto con las fibras de A $\beta$  sugiere un posible papel fagocítico de las fibrillas amiloides por parte estas células gliales.



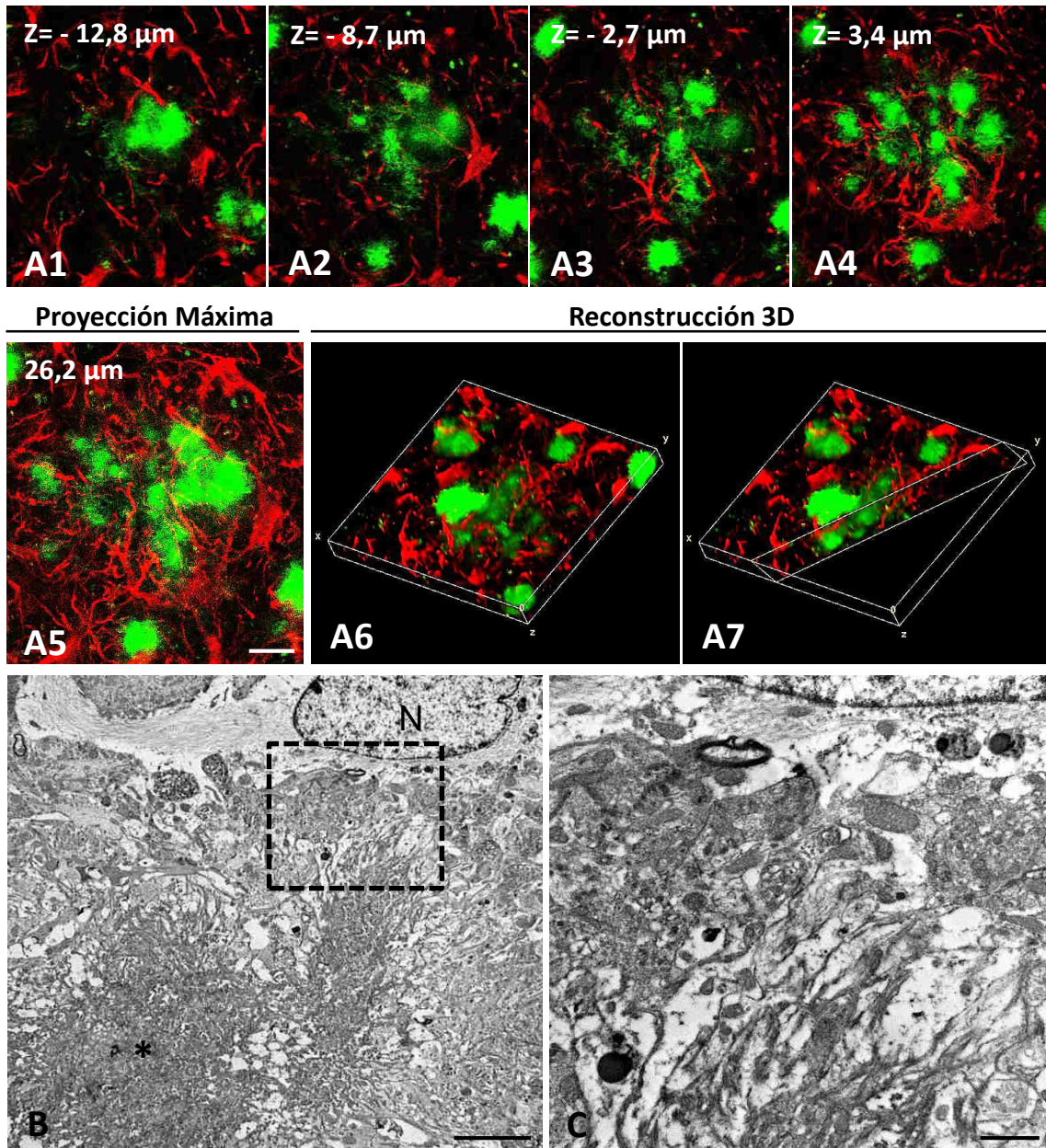
**Figura 3.1.15. Estrecha relación entre las placas fibrilares y la astrogliosis reactiva en el hipocampo del modelo transgénico APP/PS1.** Marcaje fluorescente doble a microscopía láser confocal para Tioflavina-S (TioS; Abeta fibrilar) y diversos anticuerpos específicos de astrocitos. Los astrocitos reactivos que rodean las placas fibrilares son inmunopositivos para GFAP (A1-A3), ALDH1L1 (B1-B3), AQP4 (C1-C3), GS (D1-D3) y EAAT2 (E1-E3). Las prolongaciones gliales se entremezclan y contactan con las fibras de A $\beta$  (detalle en E4). Barras de escala: A1-A3: 20  $\mu$ m; B1-E3: 10  $\mu$ m.



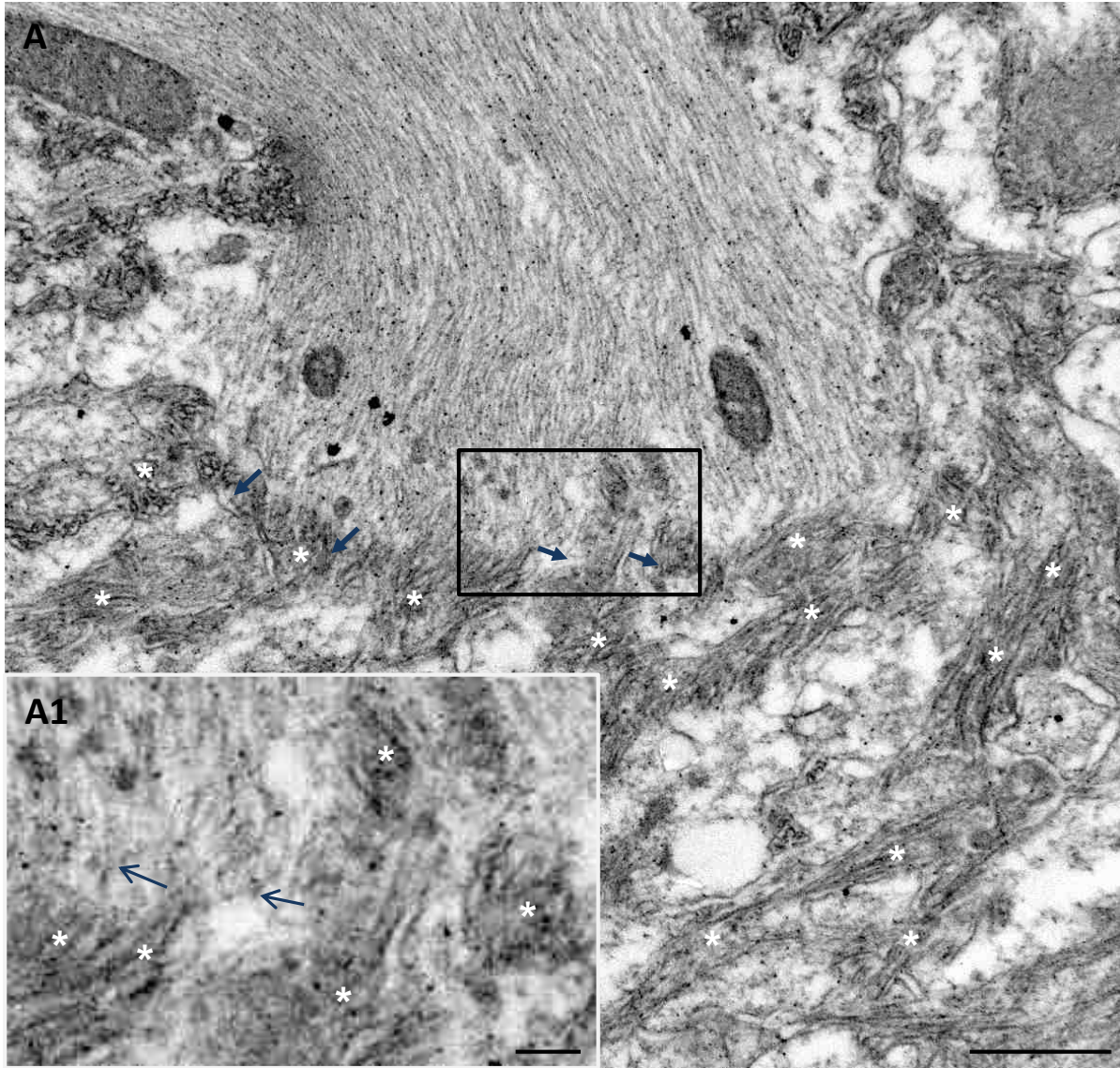
**Figura 3.1.16. Asociación entre la astrogliá reactiva y la placa amiloide en el hipocampo de animales APP/PS1.** Los astrocitos reactivos (GFAP-positivos) rodean la placa amiloide inmunoteñida con diferentes anticuerpos para A $\beta$ , como son 4G8 para el A $\beta$ a total (A1-A3), anti-A $\beta$ 42 para la isoforma más hidrofóbica (B1-B3), y OC para el A $\beta$  oligomérico (C1-C3). Las células astrogliales interaccionan con todas las formas de A $\beta$  analizadas, rodeando periféricamente a la placa y enviando sus prolongaciones hacia el interior entremezclándose con las fibras. Barras de escala: A1-C3: 10  $\mu$ m



GFAP - TioS



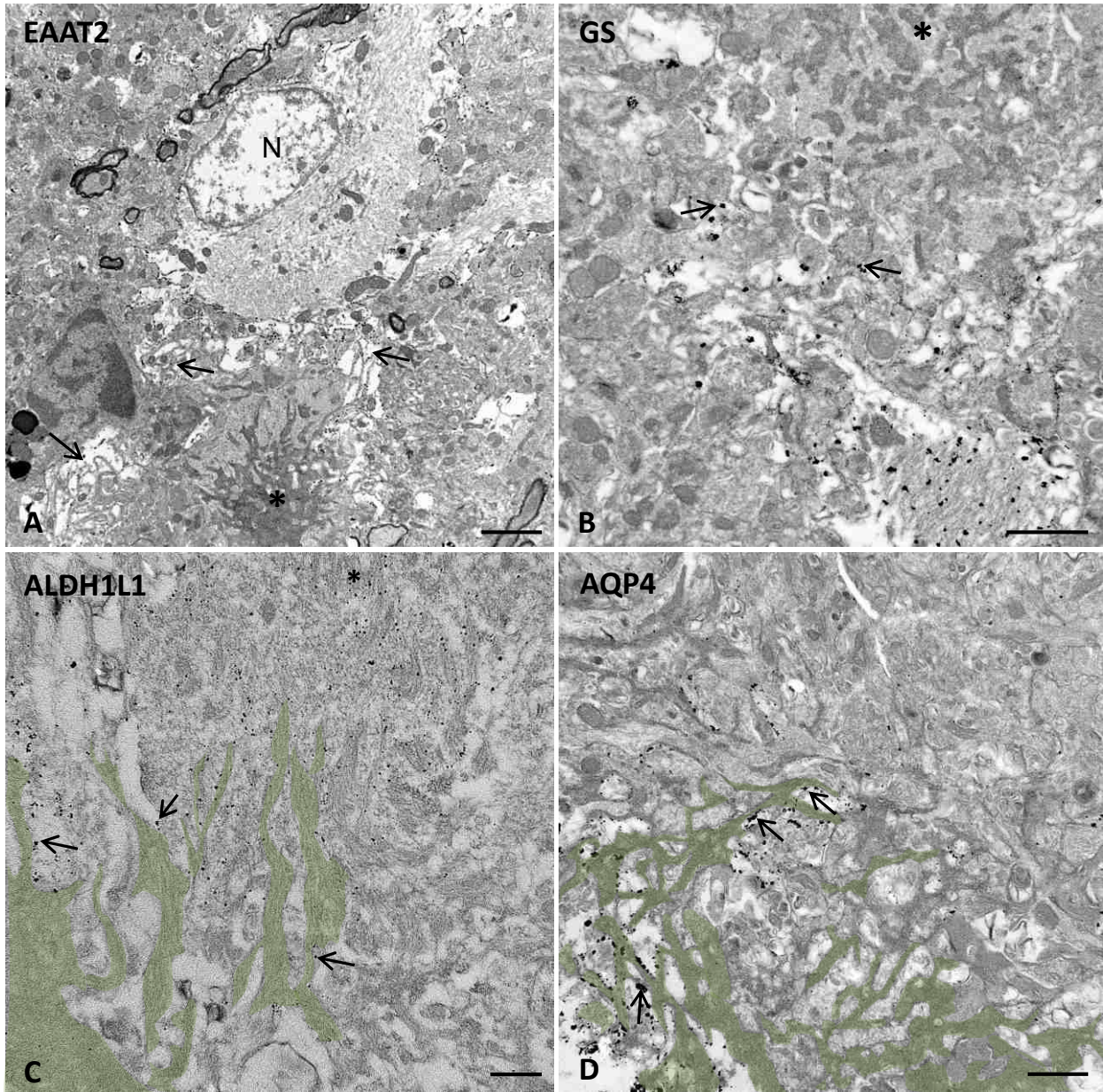
**Figura 3.1.17. Las prolongaciones de los astrocitos reactivos alcanzan el centro fibrilar de las placas neuríticas.** Inmunofluorescencia doble a microscopía láser confocal para astrocitos (GFAP, color rojo) y A $\beta$  fibrilar (TioS, color verde) en hipocampo del modelo APP/PS1. La serie de imágenes A1-A4 muestra diferentes planos confocales de un depósito amiloide fibrilar en íntimo contacto con células astrogiales. Las células astrogiales envían sus prolongaciones hacia el centro fibrilar de las placas, interdigitándose con las fibras amiloides (A5-A7). El centro de la placa está completamente rodeado de prolongaciones astrocitarias de escasa electrodensidad caracterizadas por una ausencia de filamentos gliales y otros orgánulos, tal y como se puede ver en las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (B-C). \*depósito amiloide; N, núcleo astrocito. Barras de escala: A1-A5: 20 μm; B: 5 μm; C: 1 μm.



**Figura 3.1.18. Contacto entre los filamentos intermedios astrogliales y las fibras de A $\beta$ .** Mediante microscopía electrónica de transmisión se observa la existencia de contacto íntimo entre el citoplasma de una célula astroglial (identificada por los filamentos intermedios) y las fibrillas de A $\beta$  (asteriscos blancos) que irradian de una placa amiloide (A). Las flechas azules (ver inserto A1 para mayor detalle) indican las zonas de contacto entre los filamentos astrogliales (de menor electrodensidad) y las fibras de A $\beta$  (de mayor electrodensidad). En esta área de contacto astroglíaplaca, la membrana del astrocito no es visible. Barras de escala: A: 0,5  $\mu$ m; A1: 0,1  $\mu$ m

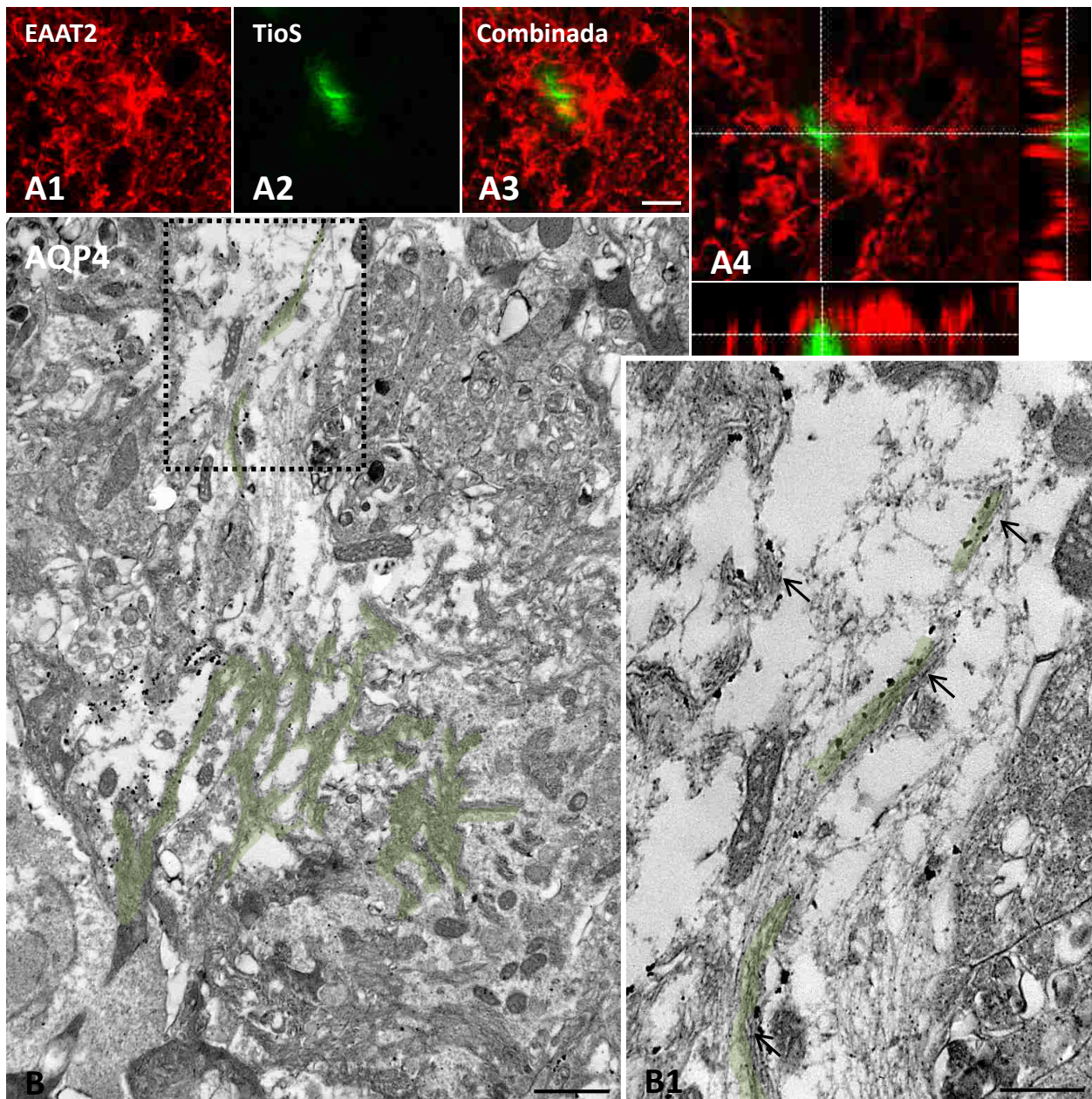


### Prolongaciones astrogliales / A $\beta$



**Figura 3.1.19. Identificación ultraestructural de prolongaciones de astrocitos en íntimo contacto con fibras de A $\beta$ .** Inmuno-oro a microscopía electrónica de transmisión para diversos marcadores de astrocitos -transportador de glutamato (EAAT2; A), glutamina sintetasa (GS; B), aldehído deshidrogenasa (ALDH1L1; C) y acuaporina 4 (AQP4; D)- en el hipocampo del modelo APP/PS1. A pesar de la ausencia de filamentos y orgánulos en la zona de contacto astroglia/placa, las prolongaciones astrocitarias se identifican bien mediante estos marcadores. Las imágenes C-D muestran en mayor detalle la zona de contacto (flechas negras) entre las fibras de la placa (algunas coloreadas en verde) y las prolongaciones astrogliales (citoplasma de muy baja electrodensidad con partículas de oro). N, núcleo astrocito. Barras de escala: A: 2  $\mu$ m; B-D: 1  $\mu$ m; C: 0,5  $\mu$ m.

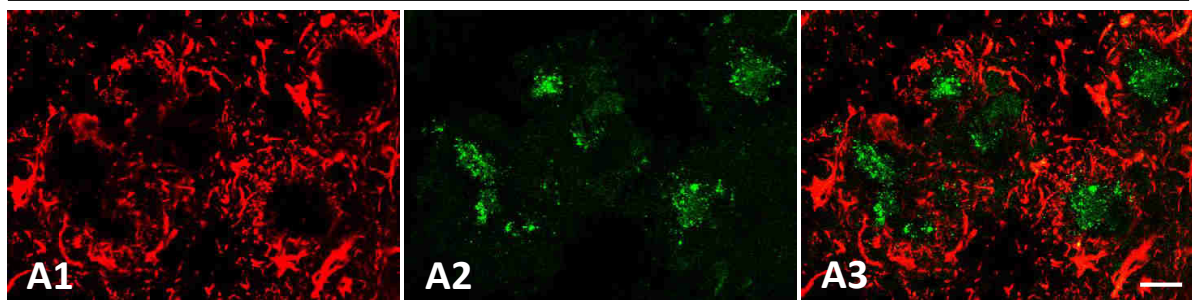




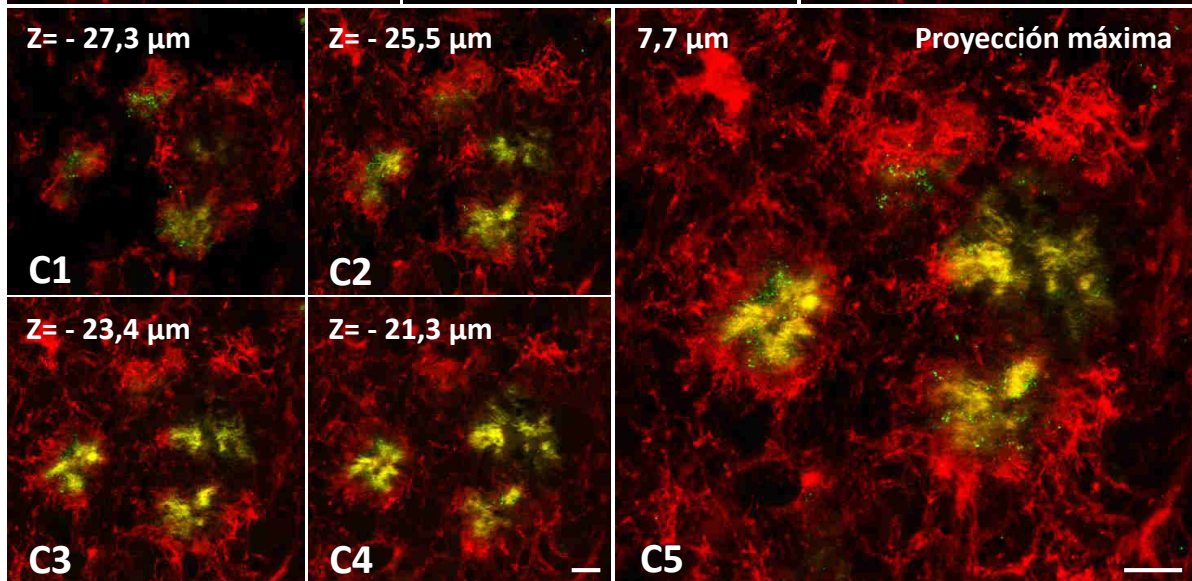
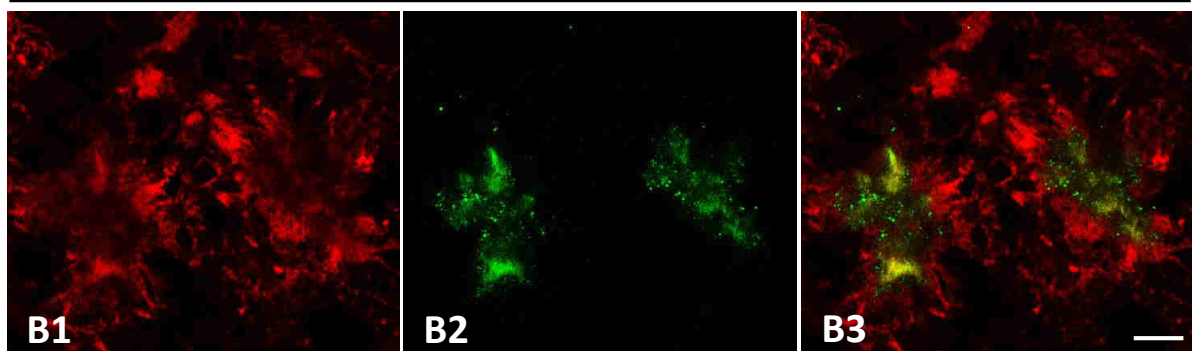
**Figura 3.1.20. Presencia de A $\beta$  fibrilar en el interior de astrocitos de ratones APP/PS1.** Marcaje fluorescente doble a microscopía confocal con anti-EAAT2 (astrocito) y Tioflavina-S (A $\beta$  fibrilar). Se observa un depósito pequeño de A $\beta$  fibrilar rodeado por prolongaciones astrogliales (A1-A3). La imagen ortogonal (X-Y-Z) de una serie de planos confocales (A4) evidencia que el A $\beta$  fibrilar esta completamente envuelto por astroglia. Mediante microscopía electrónica de transmisión combinada con inmuno-oro para AQP4 se visualizan fibras de A $\beta$  (algunas coloreadas en verde) rodeadas por membrana plasmática AQP4-positiva (B). Imagen a mayores aumentos (B1) de una prolongación astrogliar con pequeños acúmulos fibrilares de A $\beta$  (coloreados en verde) en su interior. Las flechas negras señalan la marca de AQP4 alrededor de las fibras de A $\beta$  posiblemente como resultado de un proceso de internalización/fagocitosis. Barras de escala: A1-A3: 5  $\mu$ m; B: 1  $\mu$ m; B1: 0,5  $\mu$ m.



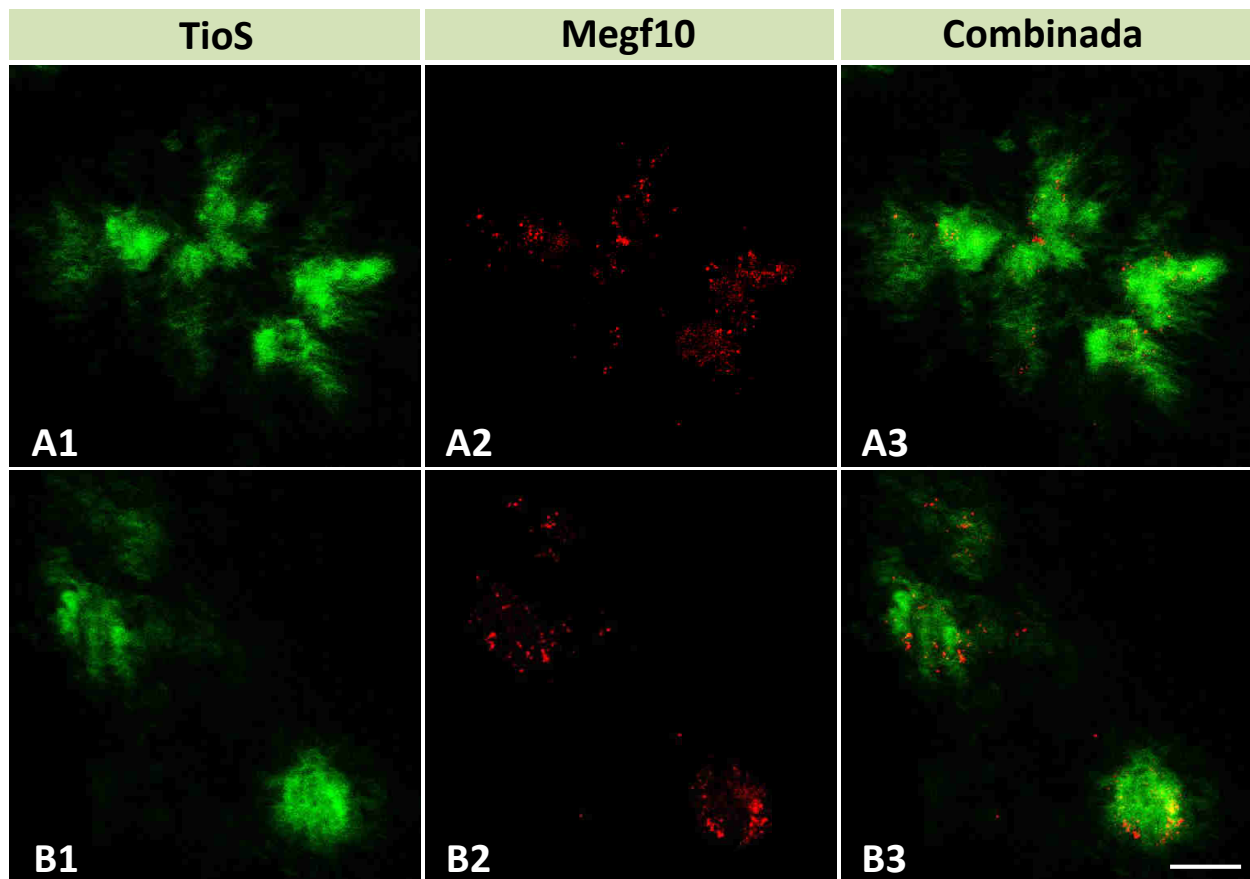
**GFAP – Megf10**



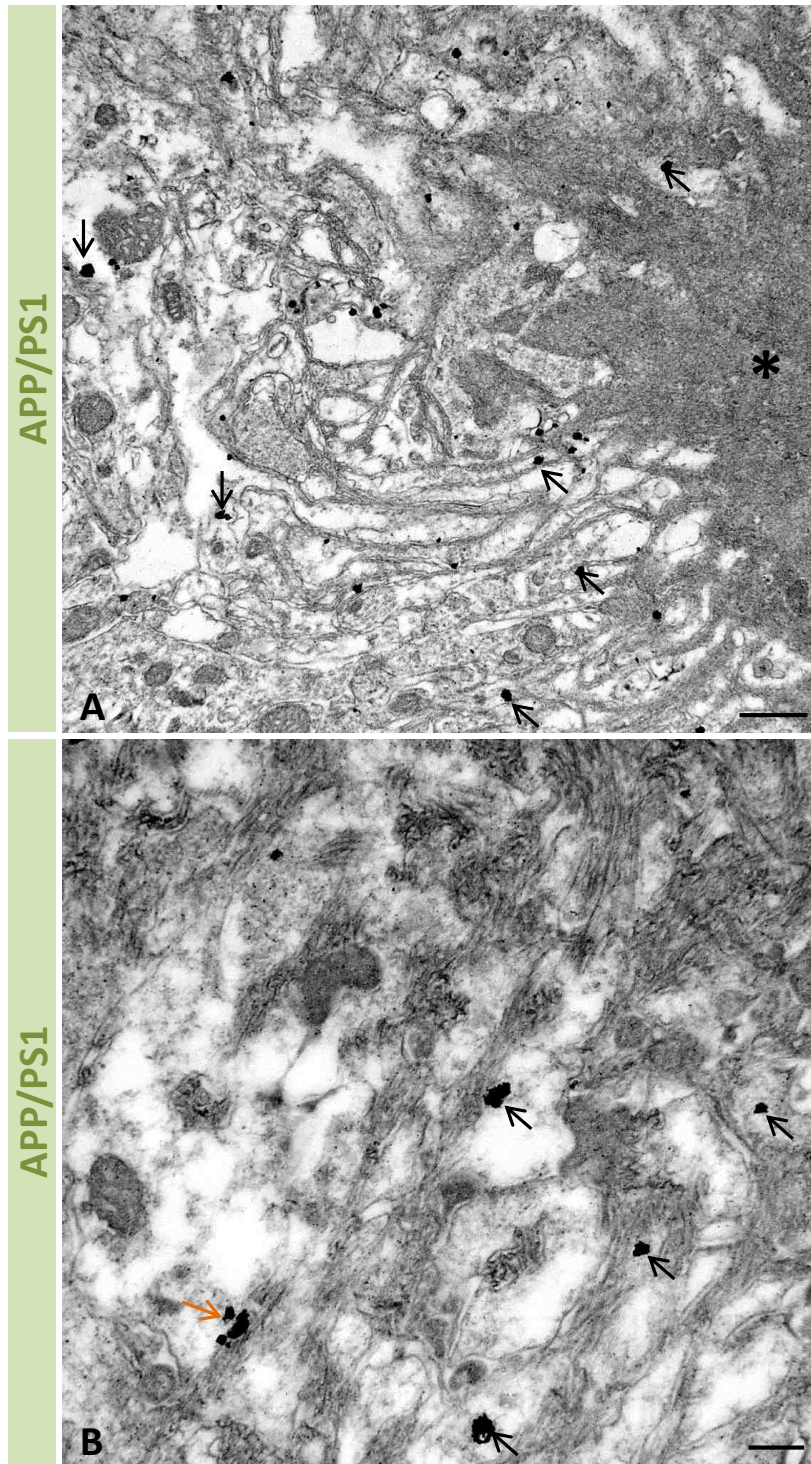
**ALDH1L1 – Megf10**



**Figura 3.1.21. Inmunolocalización del receptor de fagocitosis Megf10 en el hipocampo de animales APP/PS1.** Inmunofluorescencia doble a microscopía confocal para GFAP/Megf10 (A1-A3) y ALDH1L1/Megf10 (B1-C5). Las prolongaciones astrogliales más finas, inmunopositivas para ALDH1L1 pero no para GFAP, co-localizan con el receptor Megf10 en la zona de contacto con la placa amiloide. Barras de escala: A1-A3: 20 μm; B1-C5: 10 μm.



**Figura 3.1.22. Megf10 se localiza en la periferia del centro fibrilar de las placas neuríticas.** Marcaje fluorescente doble a microscopía confocal para A $\beta$  fibrilar (Tioflavina S; verde) y el marcador de fagocitosis astrogliol Megf10 (inmunolocalización en rojo) en el hipocampo de animales APP/PS1. El receptor Megf10 se detecta alrededor del centro fibrilar de las placas amiloides (ver imágenes combinadas A3 y B3). Barras de escala: A1-B3: 10  $\mu$ m.



**Figura 3.1.23. Localización ultraestructural de Megf10 en la zona de contacto astroglía-fibras de A $\beta$  en el hipocampo de animales APP/PS1 de 6 y 12 meses de edad.** El análisis a microscopía electrónica de transmisión con inmuno-oro para Megf10 (A) revela la presencia de este receptor en las zonas donde las prolongaciones astrogliales contactan íntimamente a las fibras de A $\beta$  (flechas negras) que parecen irradiar desde el centro de la placa (asterisco). A mayores aumentos (B) se aprecia mejor esta interacción, observando también marcaje de Megf10 en el A $\beta$  fibrilar (flecha naranja). Barras de escala: A: 0,5  $\mu$ m; B: 0,2  $\mu$ m.

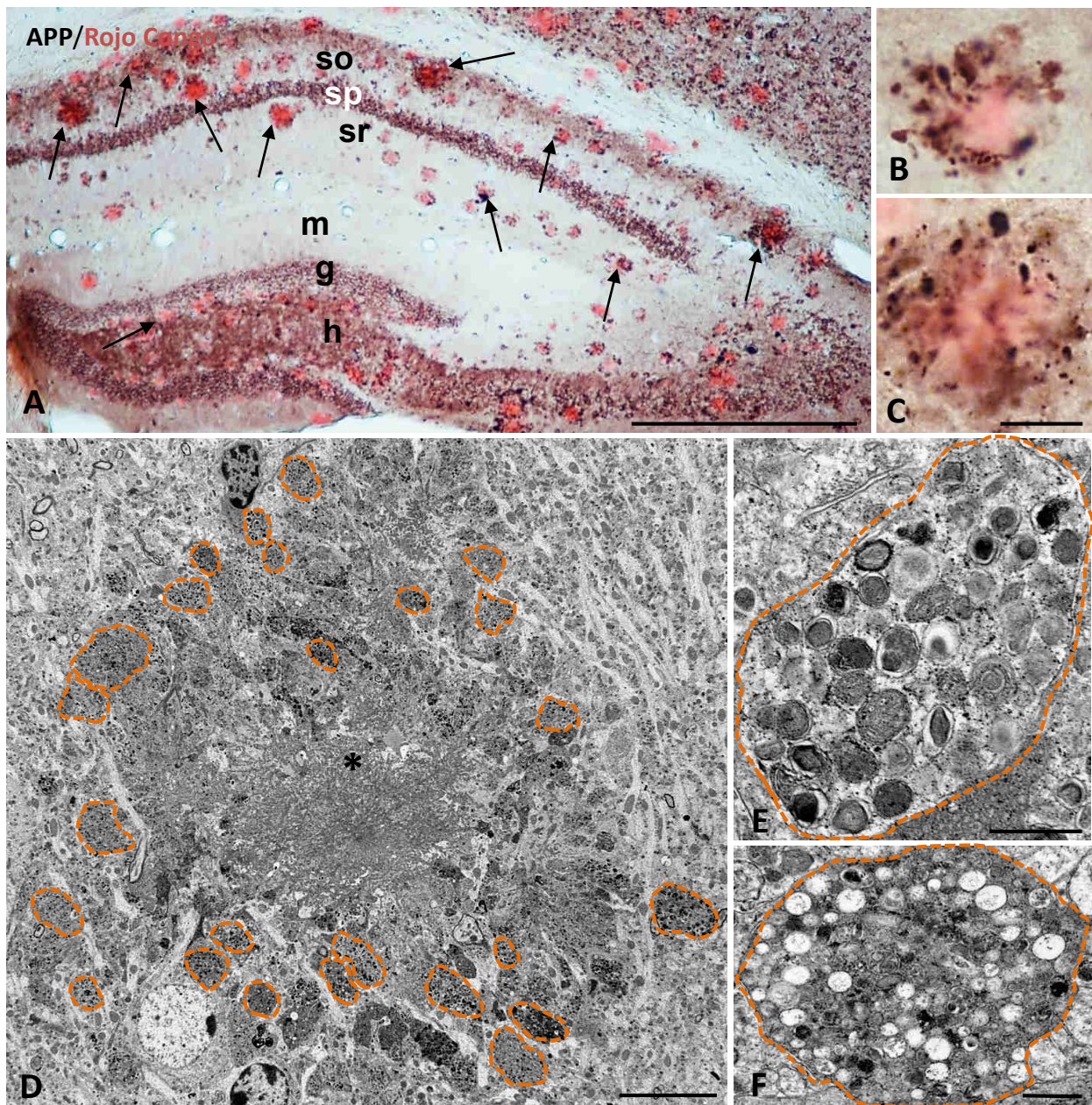


### 3.1.5. Los astrocitos reactivos envuelven e internalizan neuritas distróficas

Tanto en pacientes como en modelos animales para la EA se ha detectado la presencia de neuritas distróficas (prolongaciones axonales/elementos presinápticos engrosadas) en relación a los depósitos de A $\beta$ . Estas estructuras patológicas neuronales son positivas para numerosos marcadores, como el APP, VGlut, ubiquitina, somatostatina, sinaptofisina, etc (Sanchez-Varo et al. 2012; Trujillo-Estrada et al. 2014). Las placas de nuestro modelo animal APP/PS1 se caracterizan por ser de tipo neurítico, es decir, desarrollan una gran cantidad de neuritas distróficas a su alrededor, tal y como se muestra en la Figura 3.1.24A-F (ver también Blanchard et al. 2003; Ramos et al. 2006; Moreno-Gonzalez et al. 2009; Baglietto-Vargas et al. 2010; Sanchez-Varo et al. 2012; Trujillo-Estrada et al. 2014). El inmunomarcaje de las distrofias se ha realizado con un anticuerpo anti-APP (diseñado de forma específica contra el fragmento C-terminal de la proteína precursora amiloide humana y por tanto no reconoce la secuencia de A $\beta$ ) mientras que las placas se han puesto de manifiesto con la tinción de rojo Congo (Fig. 3.1.24A-C). Mediante microscopía electrónica de transmisión las neuritas distróficas se identifican fácilmente por su gran tamaño (algunas pueden alcanzar diámetros similares a los somas neuronales) y su heterogéneo contenido vesicular. En el interior de estas estructuras es frecuente encontrar mitocondrias y numerosas vesículas de naturaleza autofágica (Fig. 3.1.24D-F). Aunque en el hipocampo prácticamente la totalidad de las placas están rodeadas por neuritas distróficas, de manera independiente a la subregión analizada o al tamaño de placa, se ha observado un aumento del número de neuritas distróficas con la edad. En animales APP/PS1 a edades tempranas (6 meses) las placas suelen ser de menor tamaño que a edades avanzadas (12 meses) y presentan menor cantidad de neuritas distróficas asociadas a ellas (Fig. 3.1.25A-B). Esta observación se corroboró mediante el análisis cuantitativo (llevado a cabo mediante microscopía láser confocal) del número de distrofias por placa a 6 ( $8,93\pm 3,81$ ) y 12 ( $11,18\pm 5,08$ ) meses, mostrando así un incremento significativo ( $25,24\pm 1,02\%$ ) en este parámetro ( $n=59$ /edad; t-test,  $p<0,05$ ).

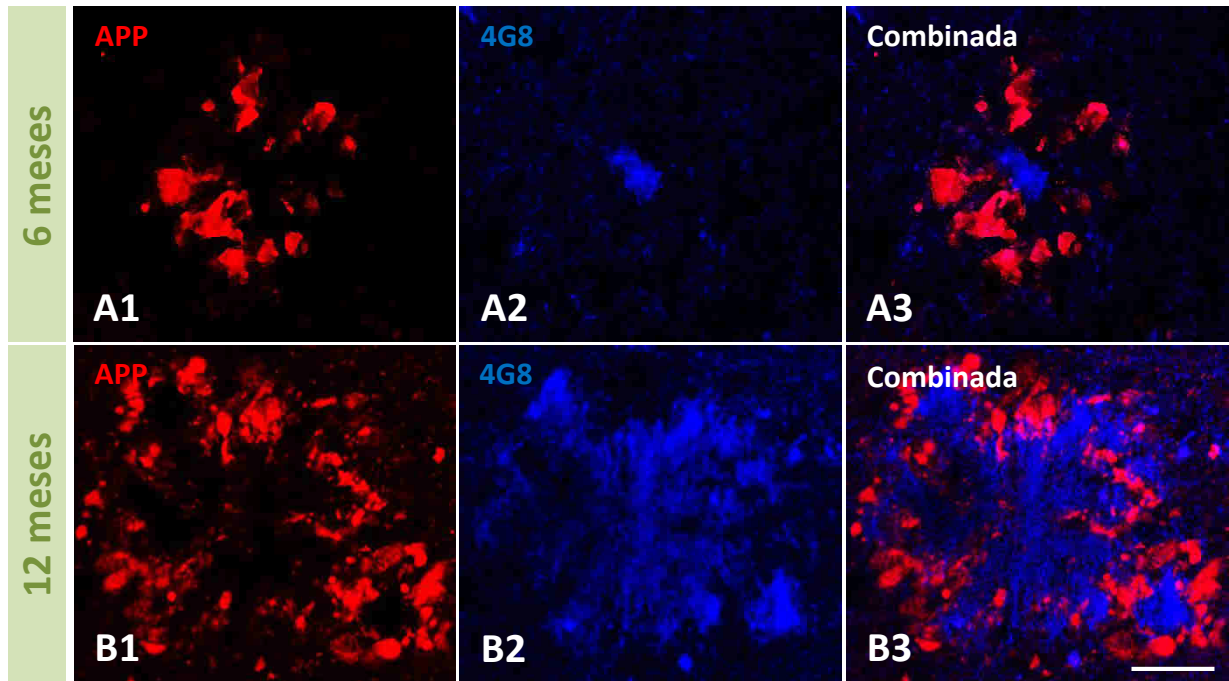
De igual manera que previamente analizamos la relación entre la astrogliá y las placas amiloides, también se ha realizado el estudio de la relación entre los astrocitos reactivos y las neuritas distróficas en el modelo transgénico APP/PS1. Mediante triple marcaje inmunofluorescente con anti-GFAP, anti-APP y anti-OC, se observaron numerosas prolongaciones astrogliales, así como neuritas distróficas en relación a las placas amiloides desde los 6 meses de edad (Fig. 3.1.26A). Los astrocitos reactivos parecen extender sus prolongaciones hacia el núcleo fibrilar de los depósitos amiloides, interdigitándose con las neuritas distróficas y estableciendo contacto con ellas (Fig. 3.1.26B). A pesar de que los astrocitos se localizan en la proximidad de las placas amiloides, no hay estudios que detallen la relación entre estas células gliales y las distrofias características de las placas neuríticas.

## Neuritas Distróficas / Placas amiloides



**Figura 3.1.24.** Las placas amiloides en el hipocampo del modelo APP/PS1 son de tipo neurítico con numerosas neuritas distróficas a su alrededor. A, marcaje inmunohistoquímico para hAPP y contratinción con rojo Congo en la región de CA1; numerosas placas neuríticas (flechas) se localizan en el stratum oriens. B y C, detalles a mayores aumentos de dos placas neuríticas caracterizadas por la presencia de neuritas distróficas (en color marrón oscuro) rodeando el centro fibrilar de la placa (en color rojo). En la imagen de microscopía electrónica (D) se muestra una placa amiloide (asterisco) con neuritas distróficas a su alrededor (delimitadas con línea de color naranja). E y F, detalles a mayores aumentos de dos distrofias. sp, *stratum pyramidale*; so, *stratum oriens*; sr, *stratum radiatum*; g, capa granular; h, *hilio*; m, capa molecular. Barras de escala: A: 500  $\mu$ m; B-C: 20  $\mu$ m; D: 10  $\mu$ m; E-F: 0,5  $\mu$ m.

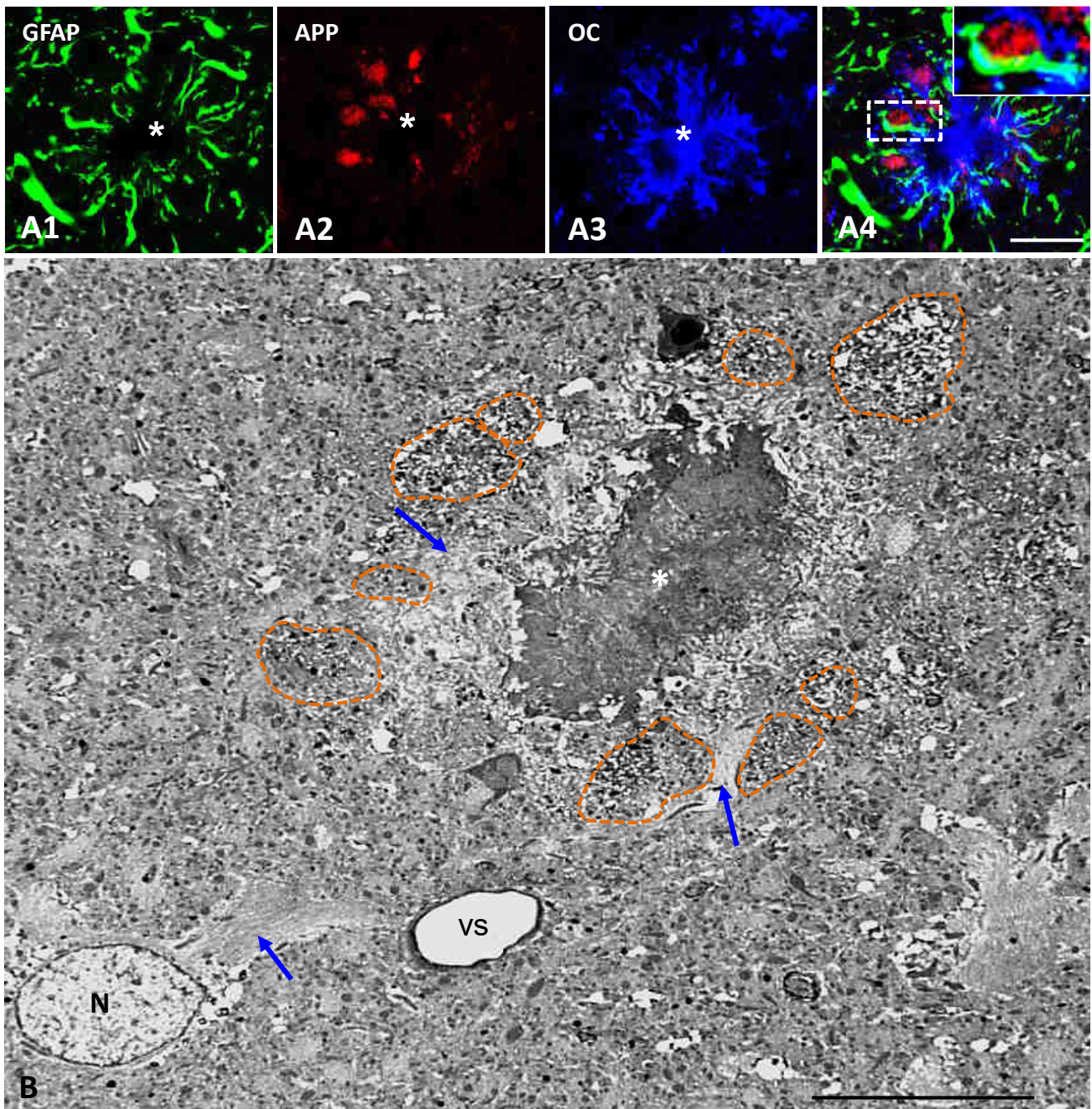




**Figura 3.1.25. La patología neurítica aumenta en paralelo con el progreso de la patología amiloide en el hipocampo del modelo APP/PS1.** Inmunofluorescencia doble para marcar las distrofias (anticuerpo para hAPP; rojo) y el Abeta (anticuerpo 4G8; azul) a microscopía confocal en secciones de hipocampo de animales APP/PS1 a 6 (A1-A3) y 12 (B1-B3) meses de edad. El número y tamaño de las placas amiloides en el parénquima hipocampal aumenta con la edad y en paralelo la cantidad de neuritas distróficas, un reflejo del aumento del daño neuronal (axonal) en esta región. Barra de escala: 20  $\mu\text{m}$



### Astroglía/Neuritas/A $\beta$

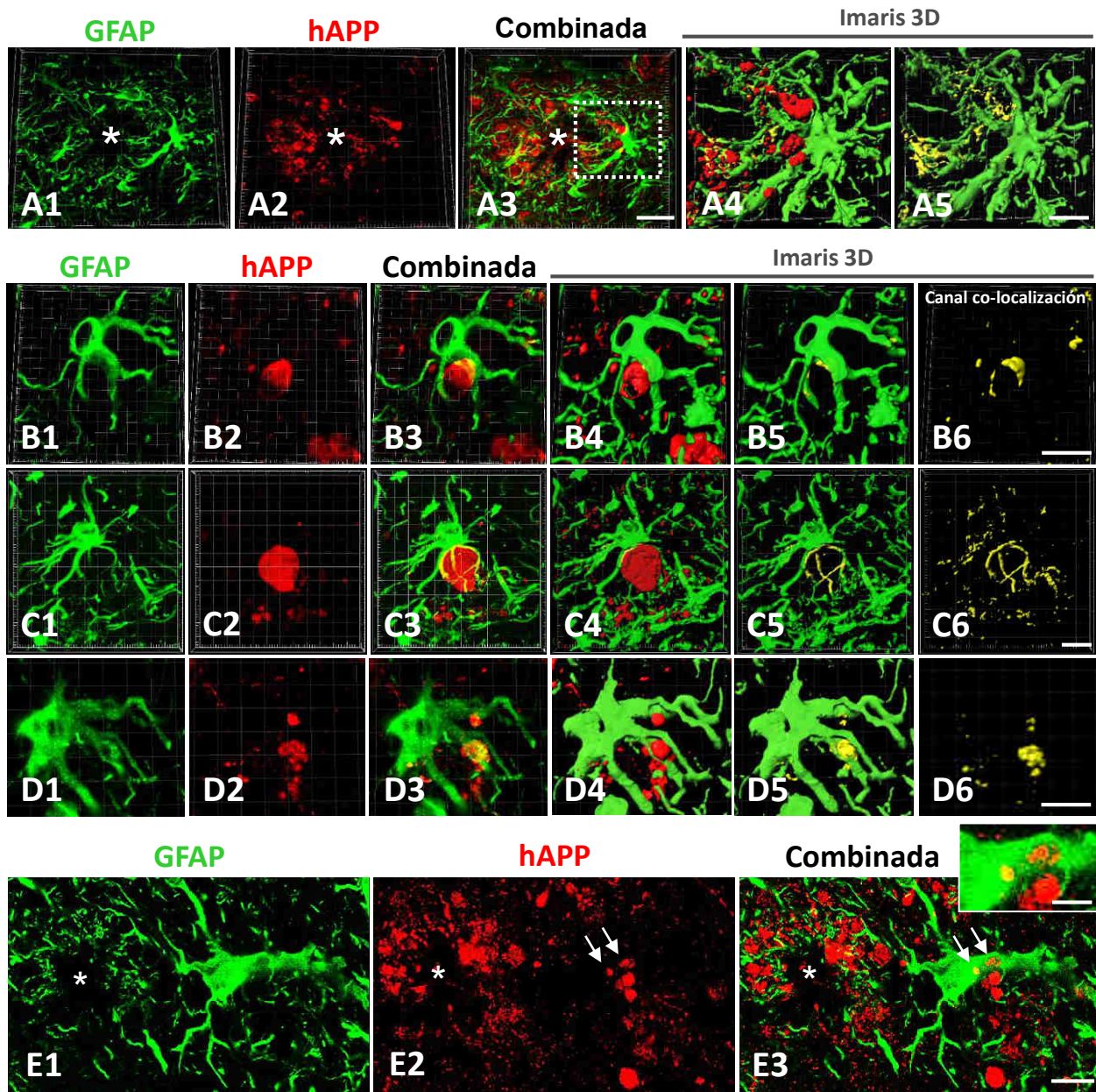


**Figura 3.1.26. Estrecha relación de la astrogía reactiva con las placas amiloides y las neuritas distróficas.** A1-A4, inmunofluorescencia triple a microscopía confocal para astrogía (GFAP), neuritas distróficas (hAPP) y A $\beta$  (OC) en el hipocampo de animales APP/PS1 de 6 meses de edad. Numerosas prolongaciones astrocitarias se proyectan hacia la placa (asterisco) y se infiltran en su zona periférica, además hacen contacto, y parcialmente rodean, las neuritas distróficas (A4 e inserto). B, imagen a MET de una placa neurítica (asterisco) y donde se puede ver a un astrocito que extiende sus prolongaciones (flechas azules) hacia la placa envolviendo a las neuritas distróficas (delimitadas con línea naranja). El citoplasma astrocital se caracteriza por su baja electrodensidad y la presencia de filamentos intermedios N, núcleo astrocital. VS, vaso sanguíneo. Barras de escala: A1-A4: 20  $\mu$ m; B: 10  $\mu$ m.

Debido a que las prolongaciones astrogliales que contactan e interaccionan con las neuritas distróficas son aquellas de mayor tamaño y éstas se visualizan mejor mediante el anticuerpo para GFAP en comparación con el ALDH1L1 (Fig. Suplementaria 3.3), en este estudio analizamos la relación morfológica entre los astrocitos reactivos y las neuritas distróficas empleando el marcador de filamentos gliales GFAP.

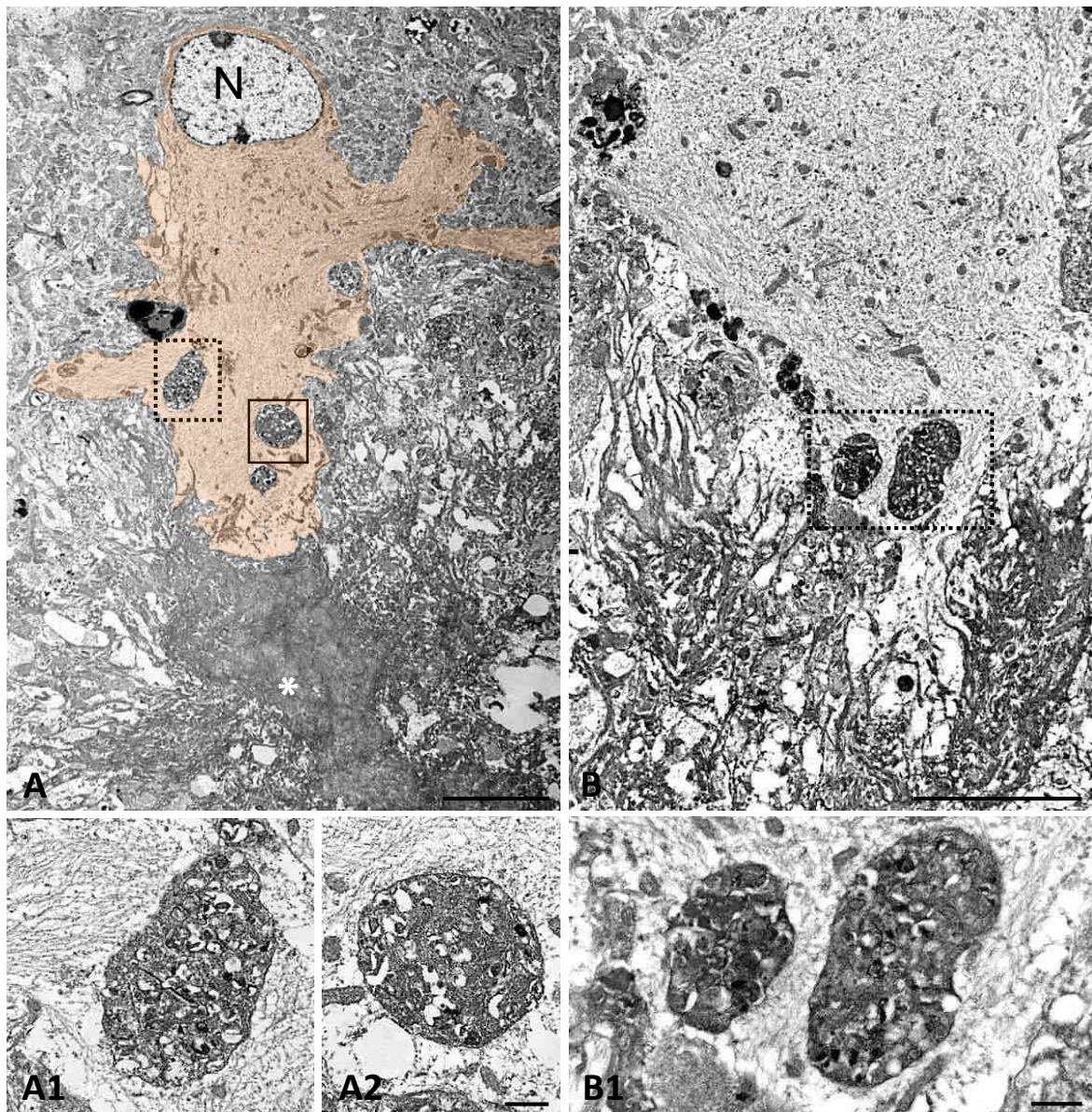
Por ello, para estudiar la naturaleza de esta interacción se llevaron a cabo análisis mediante microscopía láser confocal y reconstrucciones tridimensionales empleando el software de análisis de imagen Imaris (Bitplane Scientific Software). Tal y como se muestra en la Figura 3.1.27, las prolongaciones astrogliales asociadas a placas establecen contacto y rodean numerosas neuritas distróficas inmunopositivas para APP. Mediante el software Imaris se generaron imágenes de superficie tridimensionales (además de un canal de colocalización) que pusieron de manifiesto la estrecha asociación entre la superficie de las prolongaciones astrogliales y las neuritas distróficas (Fig. 3.1.27A4-A5, B4-B6, C4-C6 y D4-D6). La cuantificación de este evento se realizó en imágenes obtenidas mediante microscopía láser confocal tras el doble marcaje con anti-GFAP y anti-APP, revelando que la mayoría de las placas amiloides a 6 y 12 meses de edad ( $84,74 \pm 36,26\%$  y  $89,83 \pm 30,48\%$  respectivamente) presentan esta asociación astrogliá-distrofia ( $n=60$  placas procedentes de 3 animales/edad). El estudio ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión reveló la presencia de neuritas distróficas (identificadas por su contenido heterogéneo en numerosas vesículas autofágicas) en el interior citoplasmático de astrocitos reactivos asociados a placas amiloides. Las prolongaciones astrogliales en las que se encontraron las neuritas se caracterizaron por su elevado tamaño, así como por estar repletas de filamentos intermedios (filamentos gliales), muchos de los cuales se encontraron rodeando estas estructuras aberrantes (Fig. 3.1.28), en contraste a la zona de contacto astrogliá-placa que aparecía carente de filamentos y orgánulos celulares (ver Apdo. 3.1.4). Posteriormente, se empleó la microscopía electrónica de alta resolución (FIB/SEM) con la que se pueden obtener reconstrucciones tridimensionales a partir de imágenes seriadas de microscopía electrónica. Así, se confirmó la localización intracelular de las neuritas distróficas en células astrogliales (Fig. 3.1.29A-H). En las imágenes de detalle (Fig. 3.1.29A1, E2 y G3) se puede ver con claridad el contenido de la distrofia y la estrecha relación con los filamentos gliales.





**Figura 3.1.27. Los astrocitos reactivos contactan, envuelven e internalizan neuritas distróficas.** A-E, inmunofluorescencia doble GFAP/hAPP en el hipocampo del modelo transgénico APP/PS1. A1-A5, los astrocitos reactivos (en color verde) establecen contacto y envuelven parcialmente las neuritas distróficas (en color rojo). Este contacto íntimo astrocito-distrofia se muestra en las imágenes de co-localización (A3, B3, C3, D3 y E3). Las imágenes de superficie 3D generadas con el programa IMARIS (A4 y A5; B4-6; C4-6 y D4-6) muestran la estrecha asociación entre las membranas de las prolongaciones astrocitarias y las de las distrofias (color amarillo en el canal de co-localización). En E1-E3 se muestra un astrocito reactivo que además de contactar numerosas distrofias presenta algunas en su interior (flechas; ver inserto). Barras de escala: A1-A3: 20  $\mu$ m; A4-A5 y B1-E3: 10  $\mu$ m; inserto E3: 5  $\mu$ m.

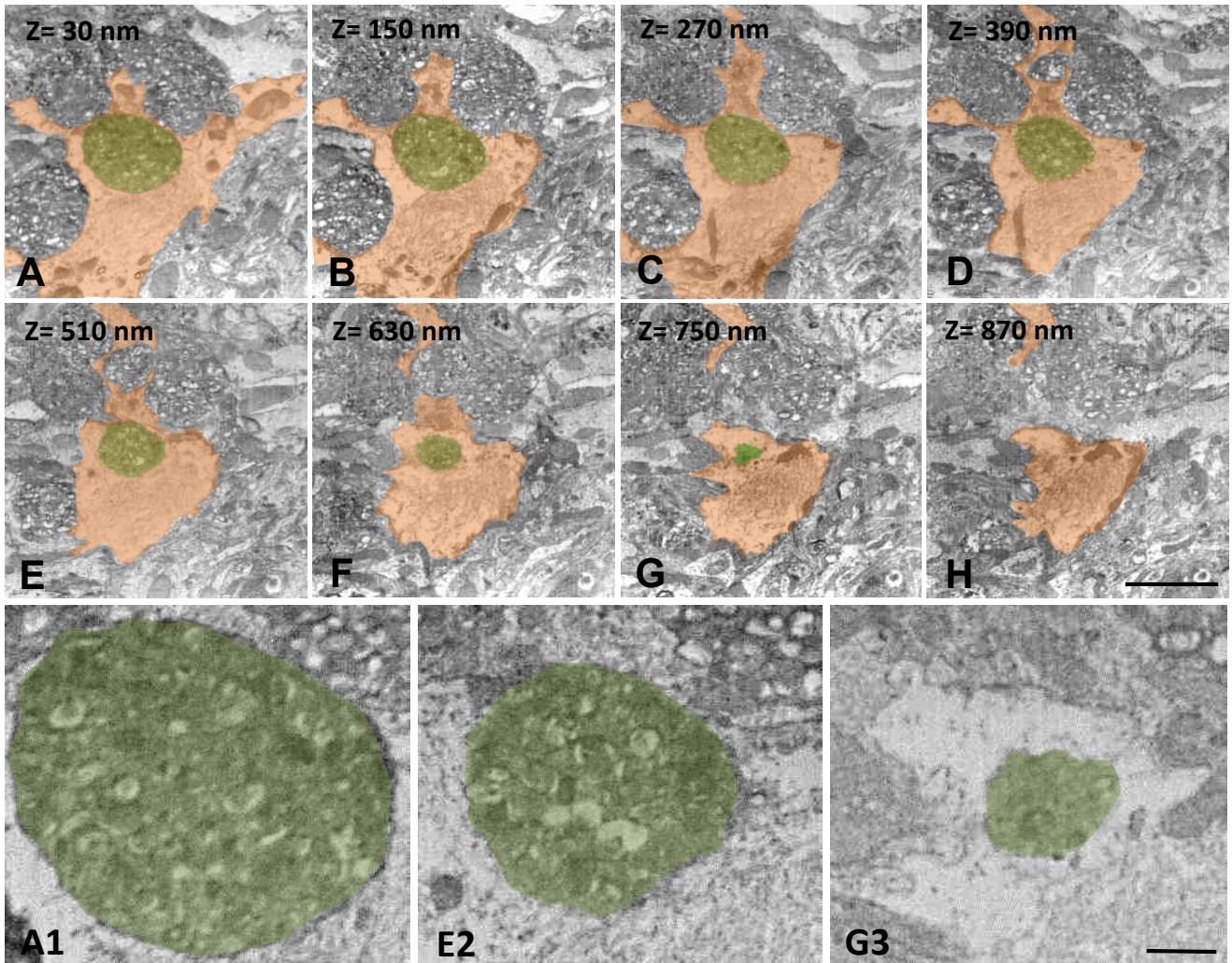




**Figura 3.1.28. Identificación ultraestructural de neuritas distróficas en el interior de astrocitos reactivos asociados a placas amiloides.** A y B, el estudio mediante microscopía electrónica de transmisión en el hipocampo del modelo APP/PS1 reveló la presencia de neuritas distróficas (enmarcadas en rectángulos) en el citoplasma de astrocitos reactivos (coloreado de naranja en A) asociados a las placas amiloides (asterisco). En las microfotografías A1, A2 y B1 se muestran a mayor detalle distrofias internalizadas por los astrocitos reactivos y que se caracterizan por la presencia de múltiples vesículas autofágicas. El citoplasma del astrocito se identifica por su baja electrodensidad y la presencia de filamentos intermedios. Estos filamentos rodean las distrofias. N, núcleo astrocitario. Barras de escala: A y B: 5  $\mu\text{m}$ ; A1-A2 y B1: 0,5  $\mu\text{m}$ .



### FIB-SEM

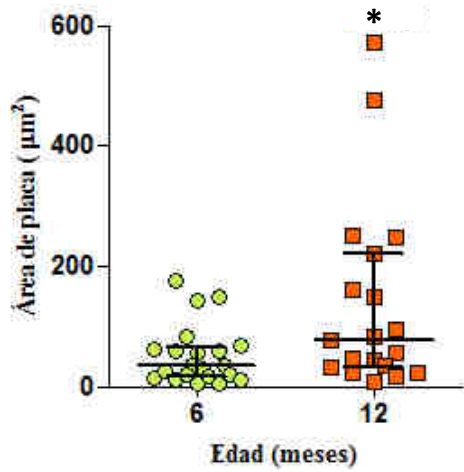


**Figura 3.1.29. Estudio ultraestructural del proceso de internalización astrogliar de una neurita distrófica.** A-H, secuencia de imágenes seriadas obtenidas a microscopía electrónica FIB/SEM en el hipocampo del modelo APP/PS1 en las que se puede seguir a una neurita distrófica (coloreada en verde) localizada en el citoplasma de la prolongación de un astrocito reactivo (en color naranja). A1-G3, detalles a mayores aumentos de esta distrofia a distintos niveles de la secuencia de imágenes. Barras de escala: A-H: 3  $\mu\text{m}$ ; A1-G1: 0,5  $\mu\text{m}$ .

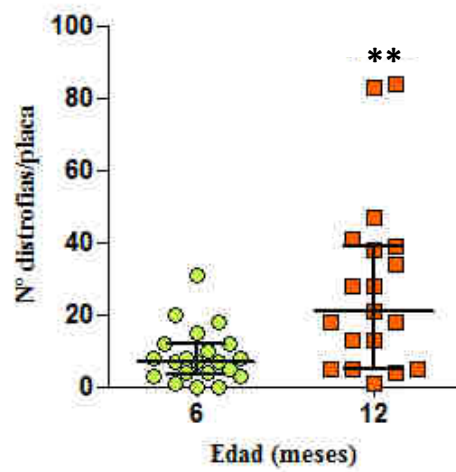
Nuevamente se llevó a cabo un estudio cuantitativo para determinar la importancia de este fenómeno, aunque en este caso la cuantificación se realizó sobre imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión en animales APP/PS1 a 6 y 12 meses de edad (n=19-21 placas procedentes de 3 animales/edad). Tal y como esperábamos, se encontraron incrementos significativos asociados a la edad en el área de placa (área media 51,42  $\mu\text{m}^2$  (rango de 5,02 a 82,67) y 137,68  $\mu\text{m}^2$  (rango de 6,7 a 571,30) a 6 y 12 meses de edad respectivamente) y en el número de neuritas distróficas asociadas a ellas (3,3 veces entre 6 y 12 meses de edad) (Fig. 3.1.30A y B). Este incremento fue acompañado de un aumento significativo en el número de prolongaciones astrogliales asociadas a la placa entre 6 (13,80 $\pm$ 5,49%) y 12 (29,15 $\pm$ 19,17%) meses de edad (Fig. 3.1.30C). El análisis de la correlación entre el área de las placas neuríticas y el área de recubrimiento astrogliar mostró una relación lineal significativa entre ambos parámetros (Fig. 3.1.30D) ( $r=0,7445$ ;  $***p<0,0001$ ). En consecuencia, observamos también un aumento significativo de 3,16 veces en el número total de neuritas distróficas internalizadas por prolongaciones astrogliales (Fig. 3.1.31A) y 2,27 veces en el número de distrofias internalizadas en relación al tamaño de placa (Fig. 3.1.31B). Además, las neuritas distróficas fagocitadas (4,84 $\pm$ 3,17  $\mu\text{m}^2$ ) tienen un tamaño significativamente inferior que aquellas que no han sido internalizadas (14,01 $\pm$ 12,97  $\mu\text{m}^2$ ) (n=30 distrofias internalizadas/no internalizadas) (Fig. 3.1.31C). Resultó también relevante la diferencia (aunque no significativa estadísticamente) entre 6 (35%) y 12 meses (68,40%) en el porcentaje de placas amiloides que presentan este proceso de internalización de neuritas distróficas por los astrocitos (resultados no mostrados). Sin embargo, y a pesar de los datos cuantitativos anteriores, la proporción de neuritas distróficas internalizadas por prolongaciones astrogliales respecto al número total de distrofias fue muy bajo en ambas edades (6,25 $\pm$ 10,14% o 7,72 $\pm$ 10,95% a 6 y 12 meses respectivamente).

Es importante mencionar que no se han encontrado neuritas distróficas en el interior de células microgliales, a pesar de ser la principal población fagocítica en el cerebro (Fig. Suplementaria 3.4). Tampoco se han encontrado otras estructuras neuronales, como axones mielínicos o dendritas, en el interior de astrocitos. Estas observaciones junto a los datos mostrados anteriormente demuestran la existencia de un proceso de internalización selectiva de neuritas distróficas por parte de las células astrogliales reactivas asociadas a placas amiloides en los animales APP/PS1.

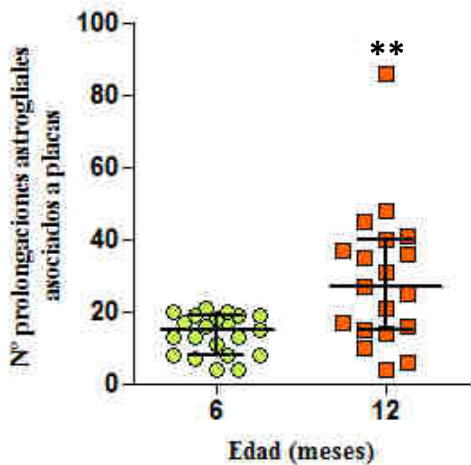


**A**

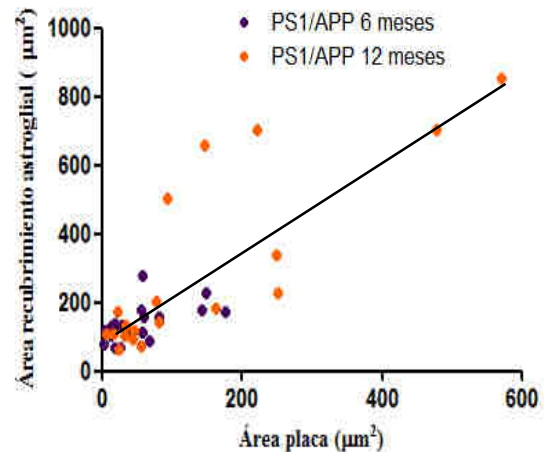
test U Mann-Whitney; P=0,0370

**B**

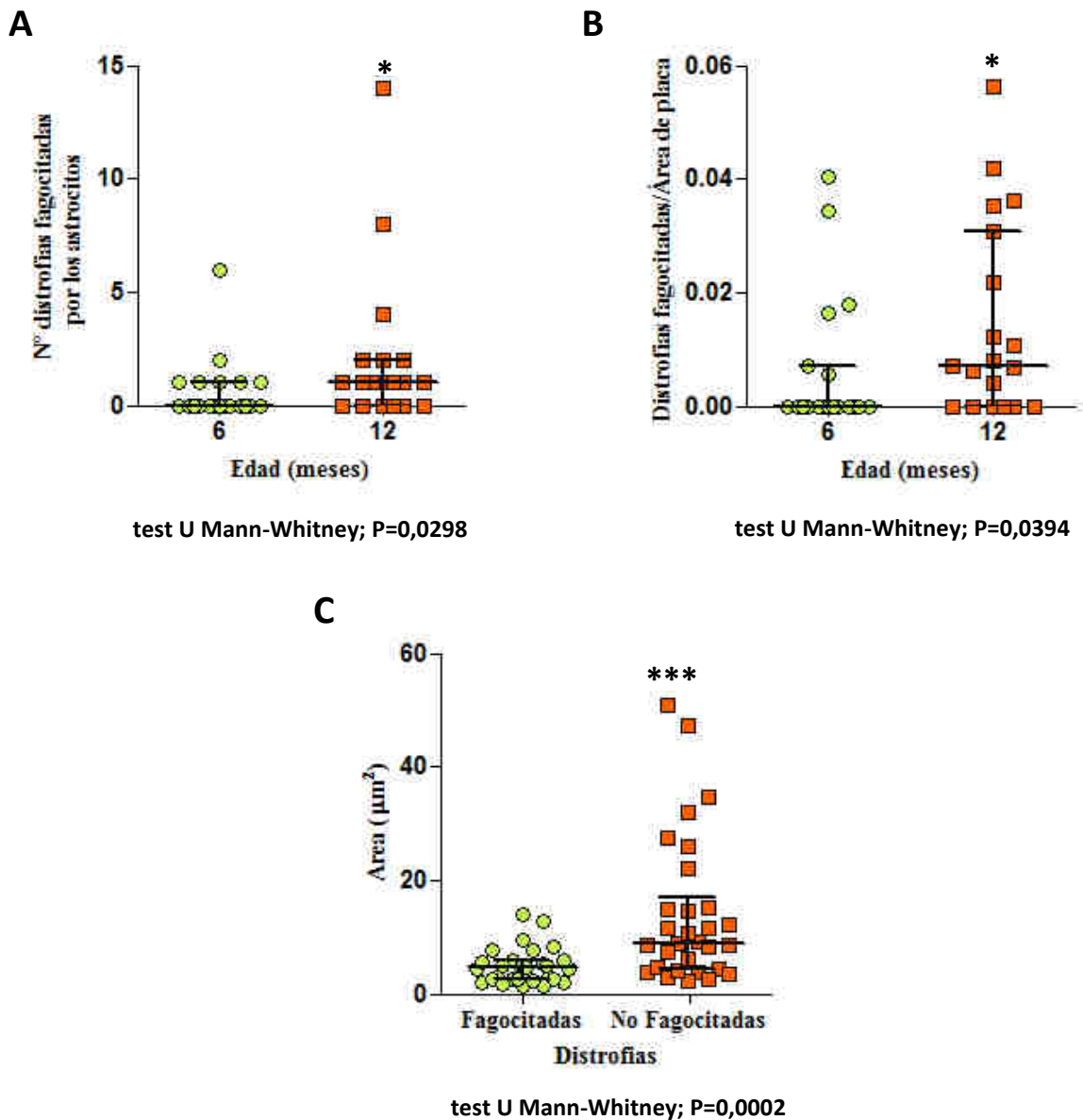
test U Mann-Whitney; P=0,0031

**C**

test U Mann-Whitney; P=0,0042

**D**Spearman  $r = 0,7445$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ 

**Figura 3.1.30. Aumento con la edad de la patología neurítica y del recubrimiento astroglial asociado a las placas amiloides en el hipocampo de animales APP/PS1.** Estudio cuantitativo en imágenes de microscopía electrónica de transmisión. Existe un aumento significativo ( $n=19-21$  placas de 3 animales/edad) con la edad de A) el tamaño de las placas, B) el número de neuritas distróficas que rodean las placas, y C) el número de prolongaciones astrogliales asociadas a las placas. Existe una correlación positiva ( $n=19$  placas de 3 animales/edad) entre el tamaño de las placas neuríticas y el área de recubrimiento astroglial, medido desde el extremo de la placa amiloide hasta una distancia de  $25 \mu\text{m}$ . La significancia y el test estadístico aplicado se indica en cada gráfica.



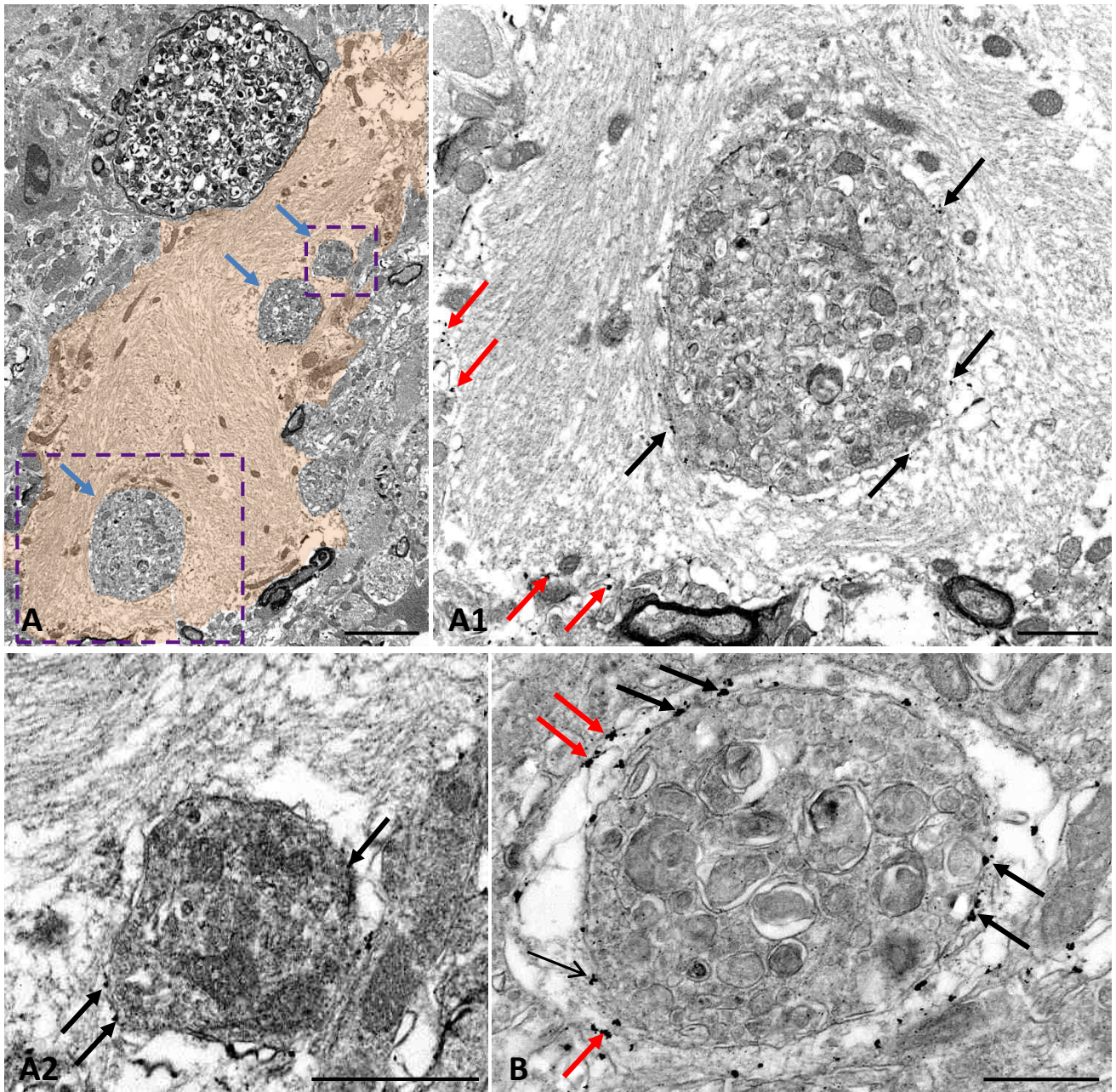
**Figura 3.1.31. Aumento con la edad del proceso de fagocitosis de neuritas distróficas por los astrocitos reactivos asociados a las placas amiloides.** Estudio cuantitativo realizado en imágenes de microscopía electrónica de transmisión del hipocampo de animales APP/PS1 de 6 y 12 meses de edad. Existe un aumento significativo (n=19-21 placas de 3 animales/edad) con la edad del número de neuritas distróficas fagocitadas por astrocitos reactivos (A) y del número de neuritas distróficas internalizadas por astrocitos por placa (B). El tamaño de las neuritas distróficas fagocitadas es significativamente menor (n=30 distrofias) al de las no fagocitadas (C). La significancia y el test estadístico utilizado se indican en cada gráfica.

### 3.1.6. La astrogliá reactiva fagocita y degrada neuritas distróficas en el modelo transgénico APP/PS1

Con objeto de confirmar y visualizar mejor el proceso de internalización de neuritas distróficas por los astrocitos se llevaron a cabo diferentes marcajes inmunohistoquímicos para microscopía electrónica de transmisión, empleando los dos anticuerpos descritos previamente específicos de proteínas de la membrana astrogliá, anti-EAAT2 y anti-AQP4. Dado que estas proteínas se distribuyen ampliamente por la membrana de los astrocitos reactivos en el hipocampo de animales APP/PS1, se pueden identificar fácilmente los límites de la célula astrogliá. De esta manera se observó que la morfología de las neuritas distróficas internalizadas por la astrogliá permanecía intacta y, además, que estas neuritas estaban rodeadas por membrana inmunopositiva para EAAT2 y AQP4 (Fig. 3.1.32 y Fig. 3.1.33 respectivamente), lo que sugiere que son producto de procesos de endocitosis. El citoplasma adyacente a las distrofias fagocitadas estaba repleto de filamentos intermedios gliales y en numerosas ocasiones se observaron mitocondrias asociadas a la membrana del fagosoma. Normalmente, las neuritas internalizadas aparecían como estructuras rodeadas por una doble membrana, la suya propia y la membrana plasmática del astrocito (positiva para EAAT2 y AQP4). Sin embargo, en ciertas ocasiones se observaron distrofias en las que la membrana presentaba interrupciones o incluso había desaparecido por completo (Fig. 3.1.34A1 y B). Se encontraron también algunas neuritas en el citoplasma astrogliá cuyo interior presentaba un estado avanzado de digestión (Fig. 3.1.34C y D). Además, fue muy frecuente encontrar numerosos lisosomas cercanos a las neuritas distróficas fagocitadas, entrando incluso en contacto con la membrana exterior positiva para acuaporina 4 (Fig. 3.1.35). El conjunto de estos resultados apoya la hipótesis de que los astrocitos llevan a cabo la fagocitosis y degradación de estructuras axonales aberrantes.

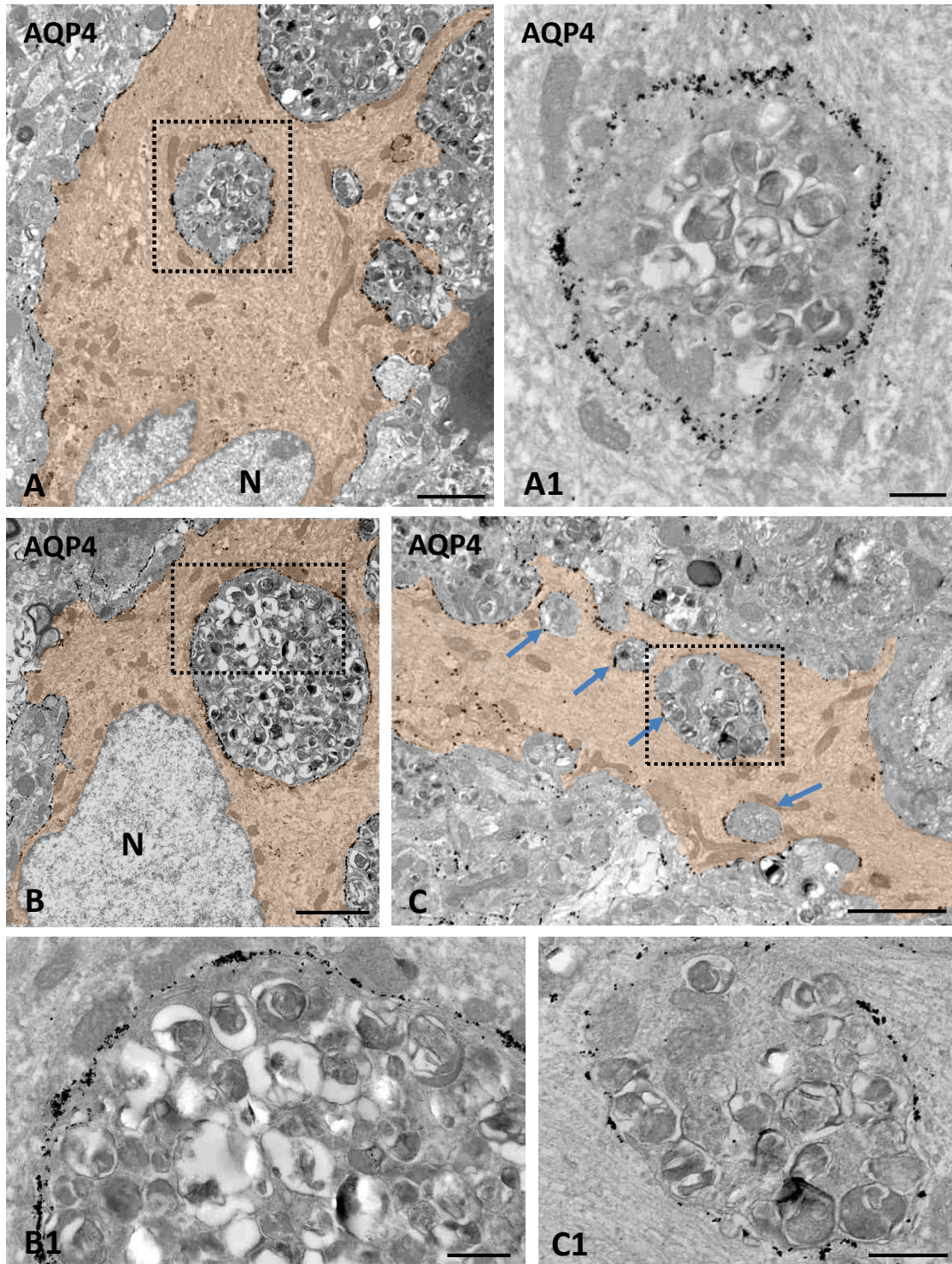
Aunque en resultados previos de nuestro grupo de investigación se demostró el origen presináptico de las neuritas distróficas (Sanchez-Varo et al. 2012), resulta totalmente necesario comprobar el origen neuronal de las estructuras fagocitadas por las células de la astrogliá. Para ello, hemos empleado técnicas de marcaje inmunohistoquímico para microscopía láser confocal y microscopía electrónica de transmisión con anticuerpos que reconocen moléculas neuronales (anti-APP) y sinápticas (anti-VGlut1, anti-Syn). Así, la proyección máxima y el plano ortogonal obtenidos a partir de imágenes consecutivas de diferentes planos focales nos muestran astrocitos reactivos (positivos para GFAP) en cuyo interior se encuentra una neurita distrófica de origen sináptico, inmunopositiva para VGlut1 (Fig. 3.1.36A-C). Esto mismo se observó también mediante el uso de anticuerpos para sinaptofisina (Fig. 3.1.36D1-D3). La microscopía electrónica de transmisión corroboró estos resultados ya que se hallaron numerosas neuritas distróficas fagocitadas por la astrogliá reactiva inmunomarcadas para APP (Fig. 3.1.37A-B) y VGlut1 (Fig. 3.1.37C-D).





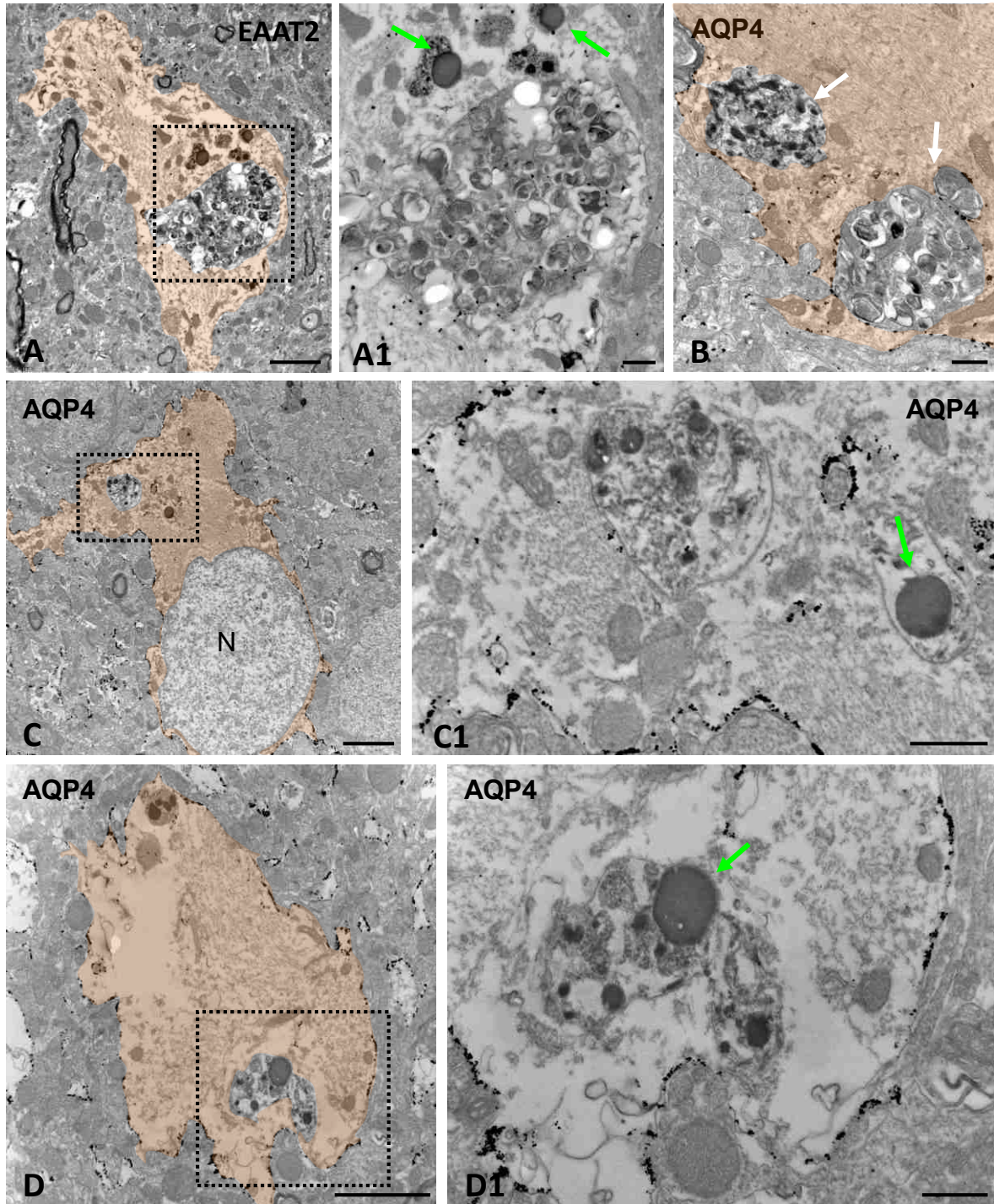
**Figura 3.1.32. Las neuritas distróficas internalizadas por los astrocitos reactivos están rodeadas por membrana plasmática astrogliar EAAT2-positiva.** Inmunomarcaje a microscopía electrónica de transmisión (inmuno-oro) para el transportador de glutamato EAAT2 en el hipocampo de ratones APP/PS1 a 6 meses de edad. A, astrocito (citoplasma coloreado de naranja) con varias neuritas distróficas (flechas azules) en su interior (ver detalles en A1 y A2 de los recuadros en A). El citoplasma del astrocito reactivo se identifica por la presencia de numerosos filamentos intermedios. La membrana plasmática astrogliar es inmunopositiva para EAAT2 (flechas rojas) (A1-B). Las neuritas distróficas fagocitadas se encuentran rodeadas por membrana EAAT2-positiva (flechas negras). Barras de escala: A: 2  $\mu$ m; A1-A2: 1  $\mu$ m; B: 0,5  $\mu$ m.





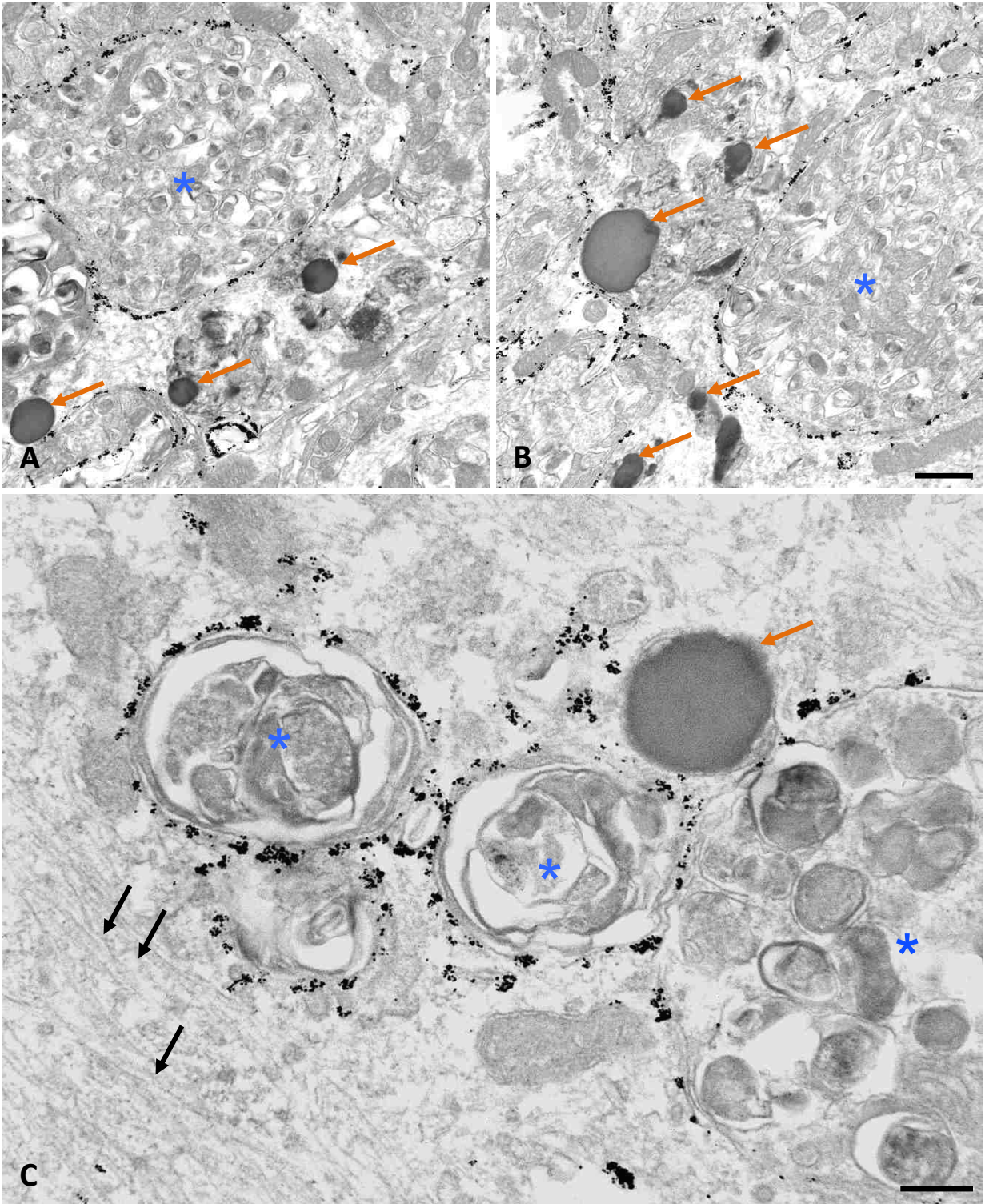
**Figura 3.1.33. Las neuritas distróficas fagocitadas están rodeadas por membrana plasmática astrogliar AQP4-positiva.** Inmunolocalización de acuaporina 4 (AQP4) a microscopía electrónica de transmisión con la técnica de inmuno-oro en el hipocampo de animales APP/PS1 de 12 meses de edad. Las partículas de oro coloidal se localizan preferentemente en la membrana plasmática de los astrocitos reactivos (A, B y C). Las neuritas distróficas internalizadas se encuentran completamente rodeadas por membrana astrogliar identificada por su marcaje específico para AQP4 (ver detalles en A1, B1 y C1). N: núcleo astrogliar. Barras de escala: A, B, C: 2  $\mu$ m; A1, B1, C1: 0,5  $\mu$ m.



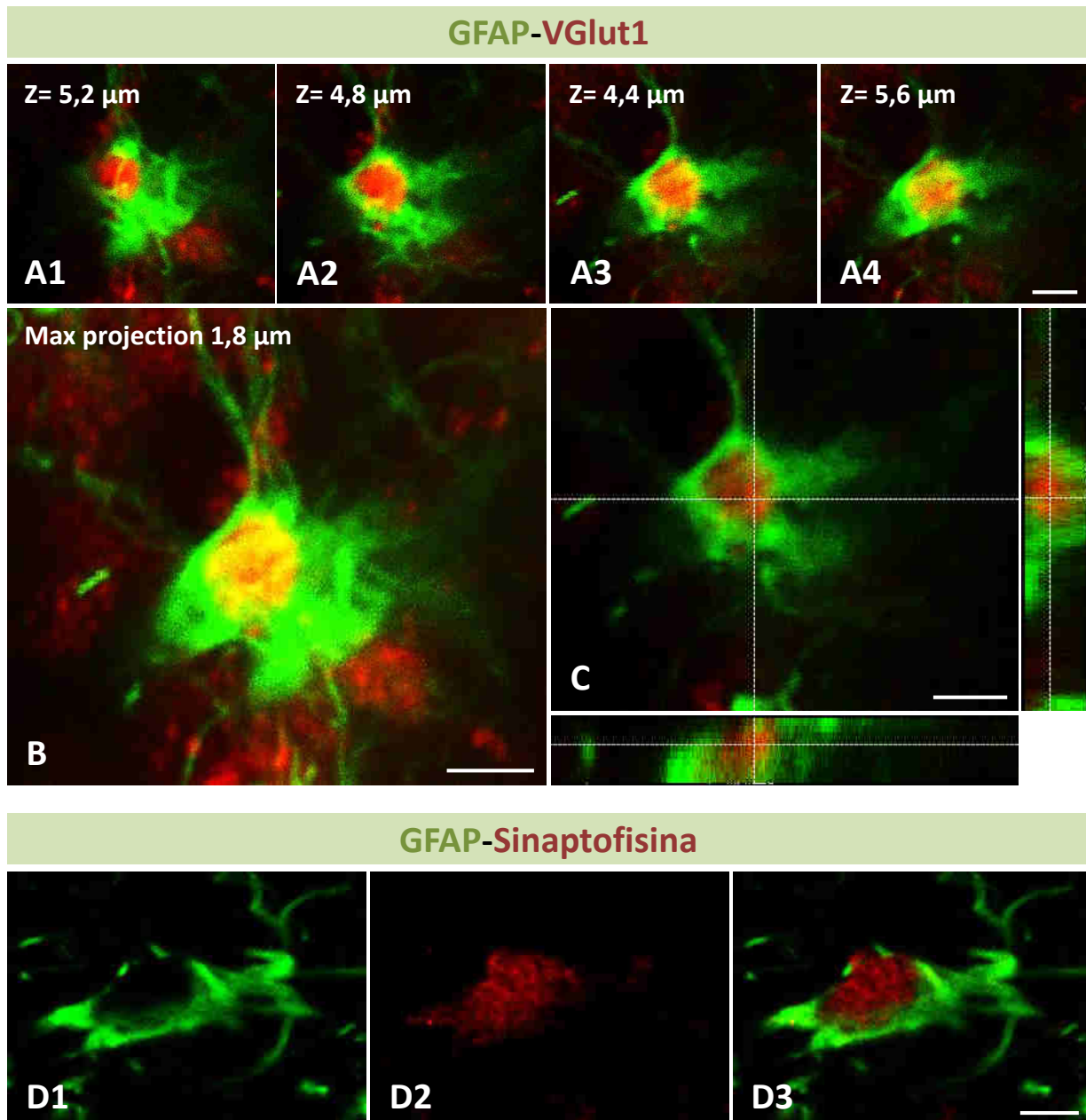


**Figura 3.1.34. Digestión intracelular de neuritas distróficas por astrocitos reactivos.** Microscopía electrónica de transmisión con inmuno-oro para EAAT2 (A-A1) y para AQP4 (B-D) en el hipocampo de animales APP/PS1 de 12 meses de edad. Se muestran astrocitos reactivos con neuritas distróficas en su citoplasma (coloreado de naranja en A, B, C y D) en distintas fases de degradación. En algunos casos, la membrana astrocitaria que rodea a las distrofias aparece interrumpida o ausente (A1 y B; flechas blancas señalan distrofias fagocitadas), mientras otros astrocitos presentan material en avanzado estado digestión (C y D). A1, C1 y D1 son detalles a mayores aumentos de la zona recuadrada en A, C y D, respectivamente. Las flechas verdes señalan lisosomas. N, núcleo astroglial. Barras de escala: A, C y D: 2  $\mu\text{m}$ ; B, A1, C1 y D1: 0,5  $\mu\text{m}$ .



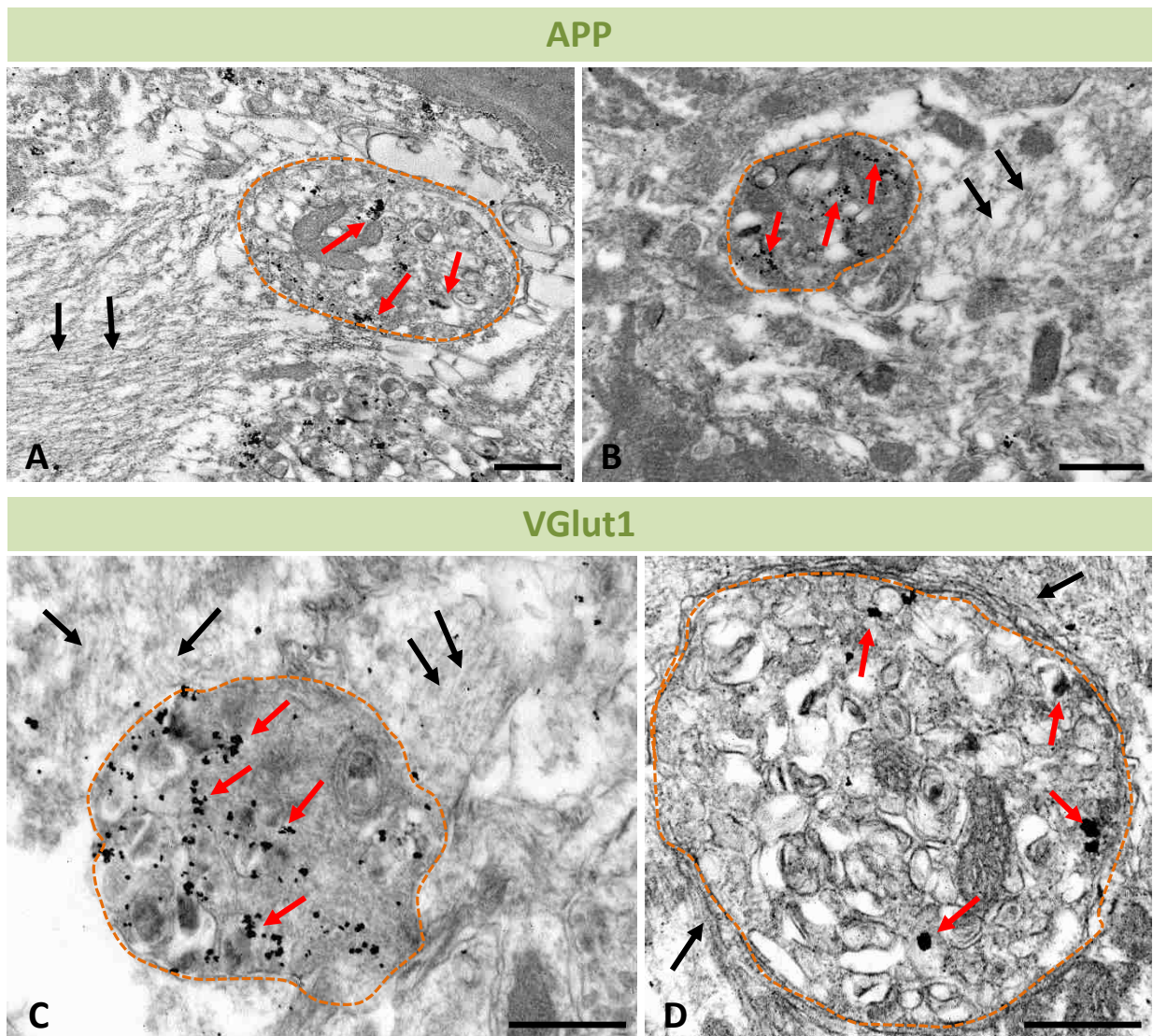


**Figura 3.1.35. Digestión intracelular de neuritas distróficas.** Microscopía electrónica de transmisión con la técnica de inmuno-oro para AQP4. A-C, Las imágenes muestran el citoplasma de astrocitos reactivos conteniendo neuritas distróficas (asteriscos) rodeadas de membrana astroglial AQP4-positiva y con varios lisosomas (flechas naranjas) en su cercanía. En la imagen C a mayores aumentos se observa un lisosoma muy próximo a la membrana astroglial inmunopositiva que rodea las neuritas distróficas fagocitadas. Las flechas negras señalan filamentos intermedios. Barras de escala: A-B: 0,5  $\mu\text{m}$ ; C: 0,2  $\mu\text{m}$ .



**Figura 3.1.36. Las neuritas distróficas fagocitadas por los astrocitos reactivos son de naturaleza presináptica.** Inmunofluorescencia doble para el marcador astrogial GFAP (en verde) y los marcadores sinápticos (en rojo) VGlut1 (A-C) y sinaptofisina (D) a microscopía confocal. A1-A4 muestra diferentes planos confocales de un astrocito conteniendo una neurita distrófica positiva para el transportador vesicular de glutamato VGlut1. La presencia de la distrofia presináptica en el interior del astrocito reactivo se aprecia mejor en la imagen resultado de la suma de varios planos confocales (B), y en un plano ortogonal (C). En D1-D3 se muestra una neurita distrófica inmunopositiva para sinaptofisina en el interior de un astrocito reactivo. Barras de escala: A1-C: 2  $\mu$ m; D1-D3: 5  $\mu$ m





**Figura 3.1.37. Origen neuronal de las neuritas distróficas fagocitadas por los astrocitos reactivos.** Microscopía electrónica de transmisión con la técnica de inmuno-oro para hAPP (A-B) y para VGlut1 (C-D) en el hipocampo de ratones APP/PS1. Se muestran imágenes del citoplasma de astrocitos reactivos donde se identifican neuritas distróficas (delimitadas con línea naranja) por su contenido en vacuolas autofágicas. Estas estructuras distróficas fagocitadas son inmunopositivas para el marcador neuronal hAPP (A-B) y para el marcador presináptico VGlut1 (C-D). Las flechas rojas señalan partículas de oro coloidal, y las flechas negras a los filamentos intermedios. Barras de escala: A-D: 0,5  $\mu$ m

Estas distrofias no sólo se encontraron en el interior citoplasmático de los astrocitos, sino que en algunos casos se observó también su asociación con los filamentos gliales, despejando así cualquier duda sobre su localización intracelular. Además, se observó la presencia de terminales presinápticos distróficos rodeados por prolongaciones astrogliales (Fig. 3.1.38A). En la imagen de detalle A1 (Fig. 3.1.38) se puede observar como el botón presináptico distrófico sigue manteniendo contacto sináptico con el elemento postsináptico de aspecto normal, no distrófico. Mediante la cuantificación del tamaño de las neuritas distróficas se determinó que las distrofias internalizadas fueron significativamente (test Mann Whitney;  $p=0,0002$ ) menores (área media  $4,23 \mu\text{m}^2$  (rango  $2-9,4 \mu\text{m}^2$ )  $n=28$ ) que aquellas no fagocitadas (área media  $14,01 \mu\text{m}^2$  (rango  $2,9-50,8 \mu\text{m}^2$ )  $n=28$ ).

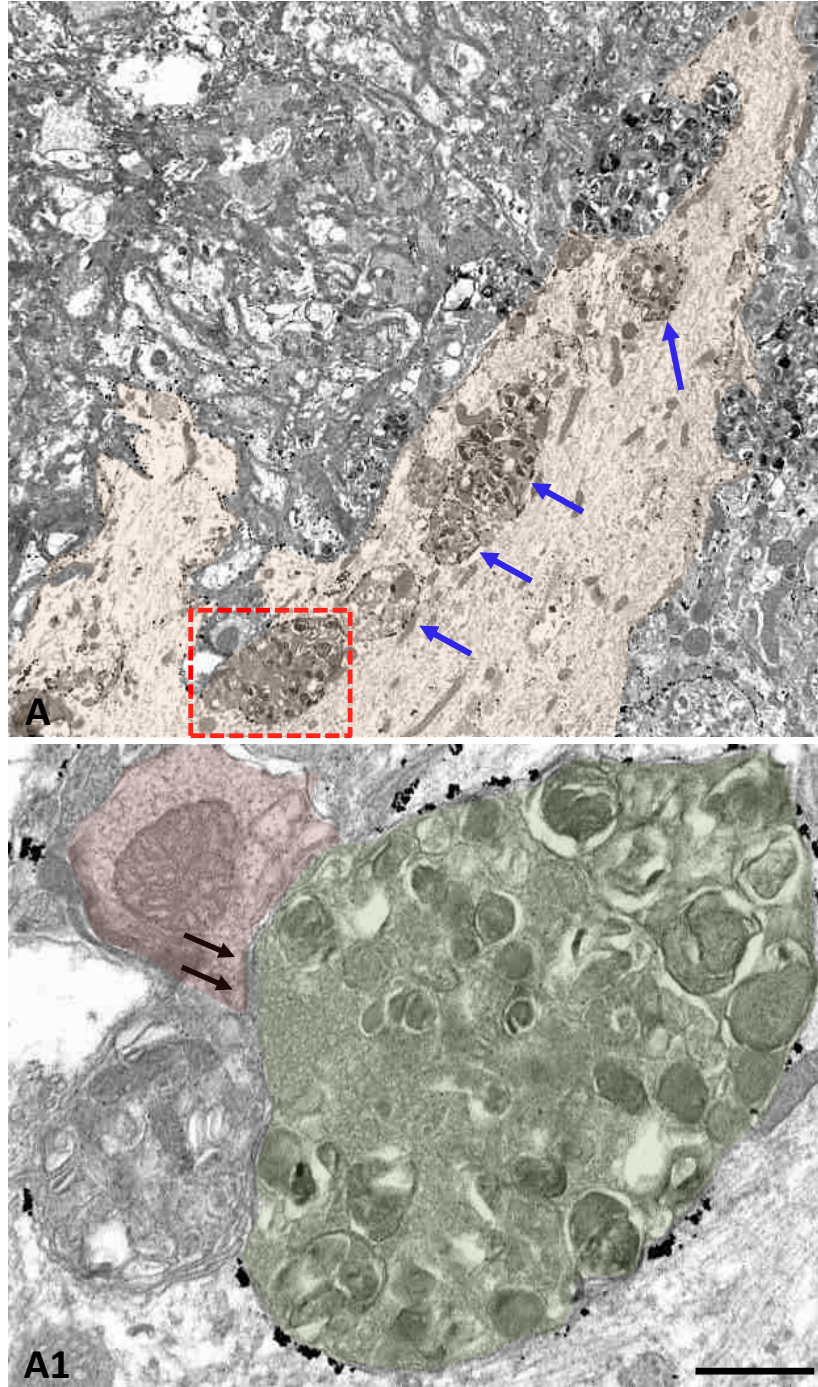
Por tanto, la astrogliosis reactiva en el hipocampo del modelo transgénico APP/PS1 no solo internaliza neuritas distróficas, sino que parece llevar a cabo la degradación de estas estructuras aberrantes de origen neuronal.

### 3.1.7. El proceso de fagocitosis astrogliosis de neuritas distróficas también ocurre en el hipocampo de pacientes de Alzheimer

Igual que ocurre en modelos animales para la EA, la astrogliosis es también un evento importante en el hipocampo de pacientes de Alzheimer en estadios Braak V-VI. En estudios previos en colaboración con el grupo del Dr. Vitorica (Universidad de Sevilla) hemos demostrado la existencia de un incremento significativo en la reactividad astrogliosis hipocámpal mediante Western blots, qPCR y cuantificación por análisis de imagen de secciones inmunoteñidas con GFAP de pacientes en estadios Braak V-VI con respecto a individuos controles en estadios Braak II (ver Fig. Suplementaria 3.5 y Sanchez-Mejias 2015)

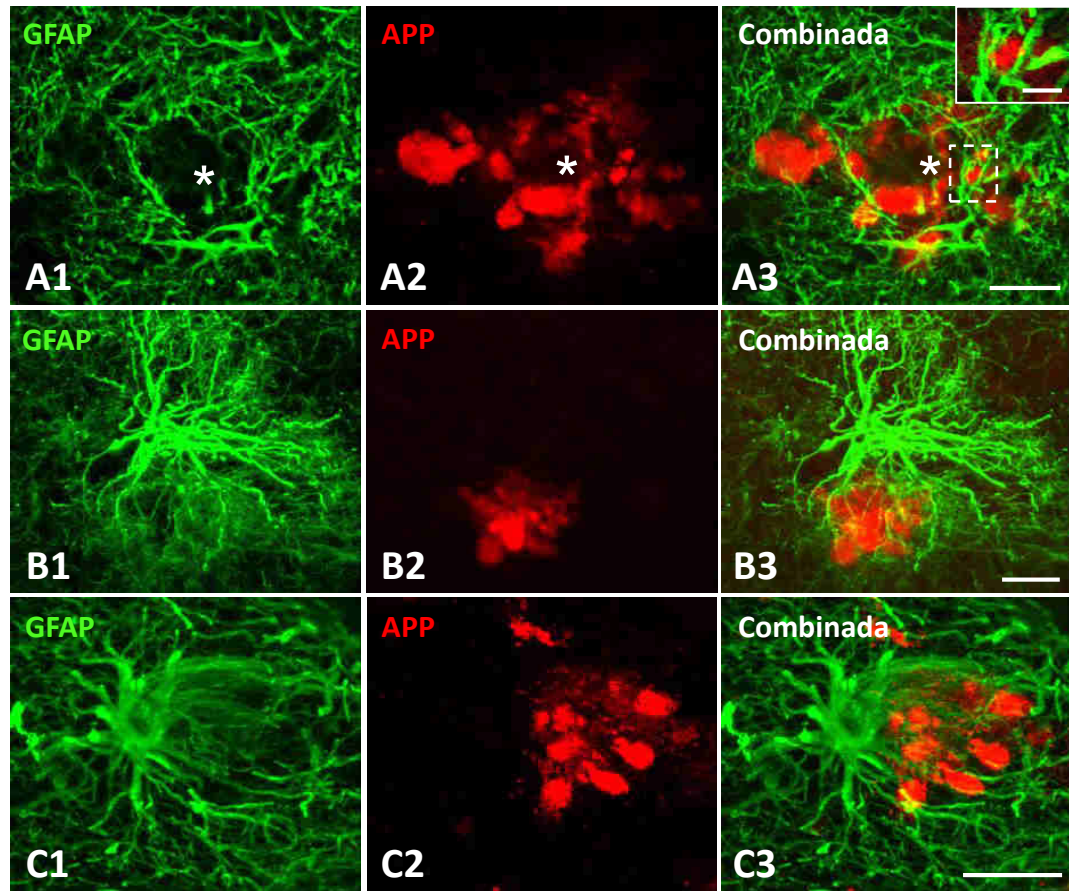
En base a estos resultados, a continuación, se decidió investigar la respuesta astrogliosis en las muestras humanas *post mortem* disponibles en nuestro laboratorio procedentes de biobancos nacionales para así comparar/validar los resultados con los obtenidos previamente en el modelo transgénico APP/PS1. En primer lugar, realizamos un doble marcaje inmunofluorescente para astrocitos (anti-GFAP) y neuritas distróficas (anti-APP) en secciones de hipocampo de pacientes en estadios Braak III-IV (Fig. 3.1.39A-C) y Braak V-VI (Fig. 3.1.39D-E). En individuos en estadios anteriores (Braak II o Braak O) no se detectan placas amiloides en el hipocampo y, por tanto, tampoco neuritas distróficas. De manera similar a lo observado previamente en animales APP/PS1, las neuritas distróficas APP-positivas aparecieron en contacto y rodeadas por prolongaciones astrogliosis GFAP-positivas en el hipocampo de muestras *post mortem* humanas desde estadios tempranos de la enfermedad (Braak III-IV) (Fig. 3.1.39). Los astrocitos reactivos parecen enviar sus prolongaciones hacia las neuritas, adoptando una conformación claramente polarizada hacia la dirección en la que se encuentran estas estructuras (Fig. 3.1.39C1-C3).



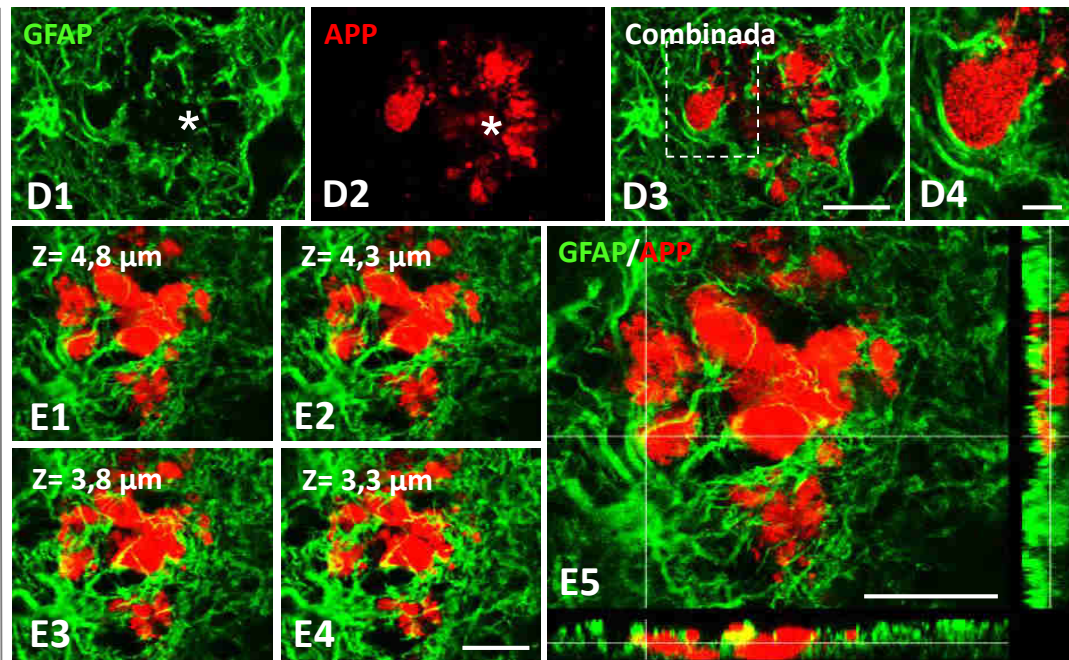


**Figura 3.1.38. Los astrocitos reactivos envuelven terminales presinápticos distróficos.** Microscopía electrónica de transmisión con inmuno-oro para AQP4. A) se muestra una célula astrogial (citoplasma coloreado de naranja) con numerosas distrofias fagocitadas en su interior (flechas azules). En A1 se muestra en mayor detalle (zona del recuadro rojo en A) un terminal presináptico distrófico con numerosas vesículas autofágicas en su interior rodeado casi completamente por membrana plasmática AQP4-positiva del astrocito. El terminal presináptico distrófico (coloreado en verde) mantiene contacto sináptico (flechas negras señalan la densidad postsináptica) con el elemento postsináptico (coloreado en rojo) de aspecto normal. Barras de escala: A: 2  $\mu$ m; A1: 0,5  $\mu$ m

Braak III-IV



Braak V-VI



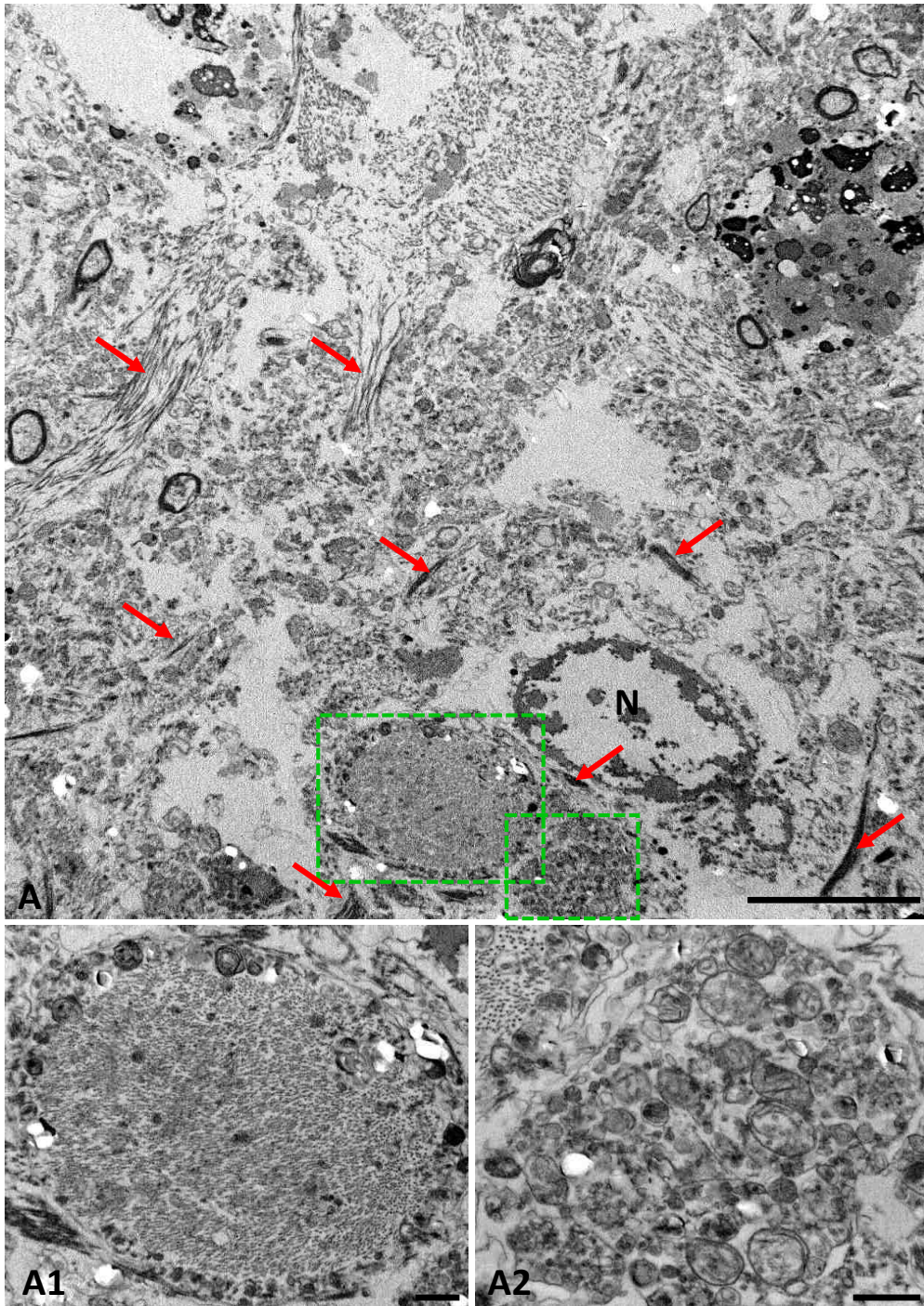


**Figura 3.1.39. Los astrocitos reactivos envuelven neuritas distróficas en el hipocampo de pacientes de Alzheimer.** Inmunofluorescencia doble para GFAP (verde) y APP (rojo) en muestras *post mortem* de hipocampo de individuos Braak III-IV (A1-3, B1-3 y C1-3) y Braak V-VI (D1-4 y E1-5). A1-3, prolongaciones de astrocitos reactivos en estrecho contacto con neuritas distróficas (ver inserto) que rodean una placa amiloide (asterisco) ). B1-3 y C1-3, astrocitos reactivos envolviendo múltiples neuritas distróficas APP-positivas, con una evidente polarización de las prolongaciones astrogliales hacia las neuritas (C1-3). D1-4, placa neurítica (asterisco) de un paciente Braak V-VI con distrofias envueltas por astrocitos reactivos (ver detalle en D4). E1-4, distintos planos focales de una agrupación de neuritas distróficas en estrecha contacto con prolongaciones astrogliales. E5, vista ortogonal de los planos focales anteriores donde se observan distrofias APP-positivas internalizadas por los astrocitos. Barras de escala: A1-E5: 20  $\mu\text{m}$ ; insertos en A3 y D4: 5  $\mu\text{m}$

La obtención de planos confocales consecutivos y la generación de la correspondiente imagen ortogonal nos muestra no solo el contacto astrocito-distrofia sino la internalización astrogliar de algunas de estas pequeñas neuritas APP-positivas en muestras de pacientes en estadios Braak V-VI (Fig. 3.1.39E1-E5). Mediante microscopía electrónica de transmisión en muestras hipocampales de pacientes en estadios Braak V-VI, se corroboraron los resultados anteriores al identificar diversas neuritas distróficas en el interior citoplasmático astrogliar (Fig. 3.1.40). Las microfotografías de mayores aumentos permiten visualizar el elevado contenido en filamentos helicoidales pareados formados por fosfo-tau (Fig. 3.1.40A1) o en vesículas autofágicas (Fig. 3.1.40A2) de las distrofias internalizadas. Sin embargo, las imágenes comparativas entre muestras de ratón y muestras humanas denotaban notables diferencias respecto al tamaño de las neuritas distróficas y las prolongaciones astrogliales (Fig. 3.1.41). Para comprobar si esta diferencia era normal, se realizó el estudio cuantitativo del tamaño de las neuritas distróficas (marcadas con el anticuerpo anti-APP) en animales APP/PS1 de 12 meses y muestras humanas de pacientes en estadio Braak VI (Fig. 3.1.42A). Se observó que en el modelo transgénico la mayoría de las distrofias tenían un tamaño inferior a  $50 \mu\text{m}^2$  ( $93,35 \pm 19,48\%$ ) mientras que en muestras de pacientes Braak VI las neuritas distróficas más abundantes eran aquellas cuyo tamaño superaba las  $50 \mu\text{m}^2$  ( $60,14 \pm 15,39\%$ ). La distribución de las distrofias en 5 rangos de tamaño, ordenados de menor a mayor, mostró diferencias significativas en cada uno de ellos al comparar los animales transgénicos con las muestras humanas, existiendo aumentos significativos en los dos rangos inferiores ( $1-10 \mu\text{m}^2$  y  $10-50 \mu\text{m}^2$ ) y disminución en los dos rangos siguientes ( $50-100 \mu\text{m}^2$  y  $100-200 \mu\text{m}^2$ ) en ratones APP/PS1 en relación con las muestras humanas Braak VI (Fig. 3.1.42A). Además, las distrofias de un tamaño superior a  $200 \mu\text{m}^2$  se encontraron únicamente en muestras *post-mortem* Braak VI (Fig. 3.1.42B). A continuación, se llevó a cabo el estudio morfológico cuantitativo de las células astrogliales (empleando GFAP como marcador astrogliar) con el fin de determinar si existen o no diferencias en este tipo celular entre ratones y humanos. Se encontraron diferencias significativas en el tamaño astrogliar, el número de prolongaciones de cada célula y el grosor de estas prolongaciones. Así, las células astrogliales humanas ( $n=15$  células procedentes de 3 animales/individuos) eran más grandes ( $31,70 \pm 2,99\%$ ) que las de ratón (Fig. 3.1.43C) y presentaban un mayor número de prolongaciones ( $n=60$  células procedentes de 3 animales/individuos) ( $46,62 \pm 2,83\%$ ) (Fig. 3.1.43D). Sin embargo, el grosor de las prolongaciones astrocíticas ( $n=180$  prolongaciones procedentes de 3 animales/individuos) resultó significativamente menor ( $58,6 \pm 8,79\%$ ) en muestras humanas Braak VI respecto a animales APP/PS1 de 12 meses de edad (Fig. 3.1.43E).

Por todo ello, en el hipocampo de pacientes de Alzheimer los astrocitos reactivos internalizan neuritas distróficas de manera similar a lo observado en el modelo APP/PS1. Estas células astrogliales presentan diferencias morfológicas con respecto a la astrogliar murina, lo cual unido al mayor tamaño de las neuritas podría dificultar la capacidad de estas células para fagocitar las distrofias en muestras *post mortem* procedentes de pacientes de Alzheimer.

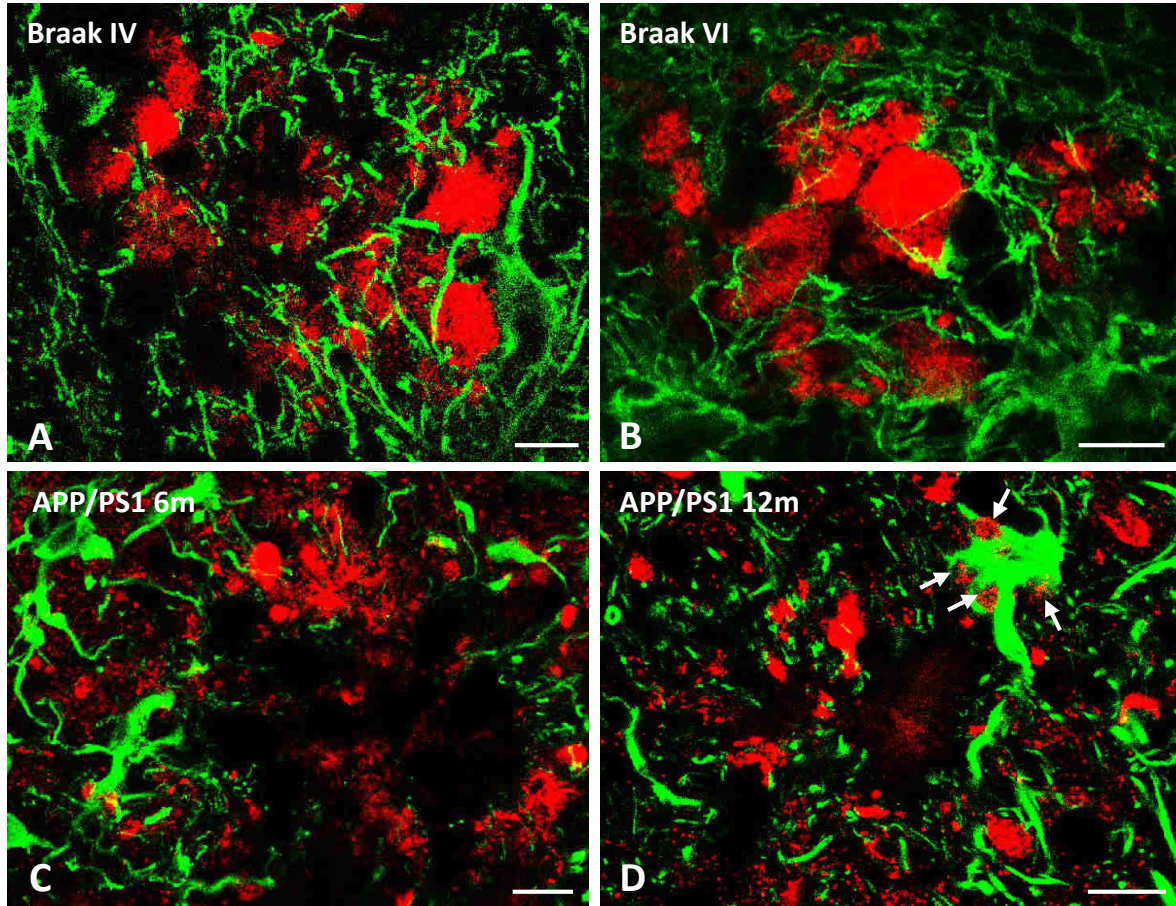
### Braak V-VI



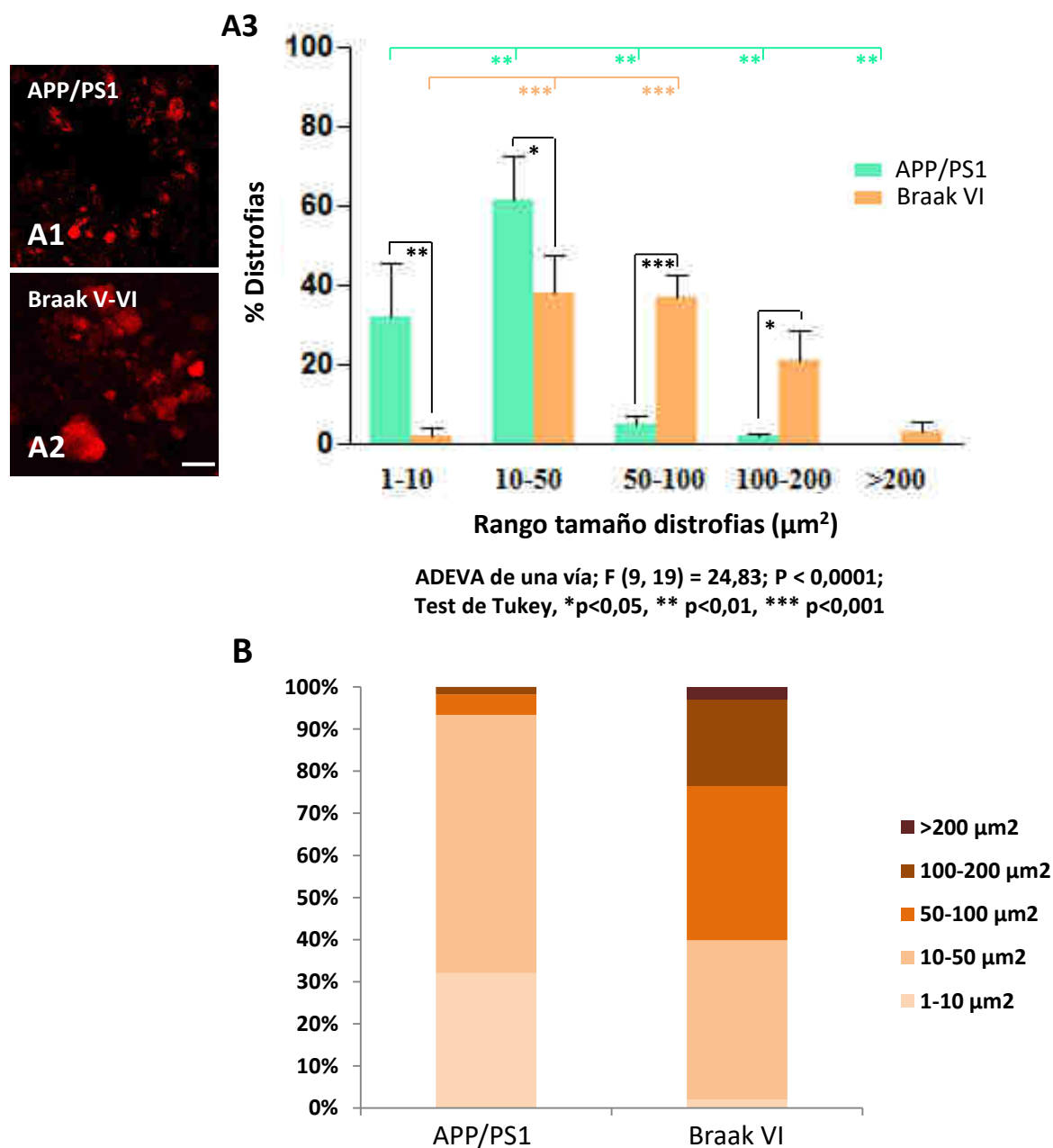
**Figura 3.1.40. Identificación ultraestructural de neuritas distróficas en el interior de astrocitos reactivos en el hipocampo de pacientes de Alzheimer.** Microscopía electrónica de transmisión en tejido *post mortem* de hipocampo humano en estadio Braak V. A, citoplasma de un astrocito reactivo con abundantes haces de filamentos intermedios (flechas rojas) y con dos neuritas distróficas (recuadrados verdes) junto al núcleo astroglial (N). A1 y A2, detalles a mayores aumentos de las neuritas distróficas fagocitadas, conteniendo filamentos pareados helicoidales de fosfo-tau (A1) y numerosas vacuolas autofágicas (A2). Barras de escala: A: 5  $\mu\text{m}$ ; A1-A2: 0,5  $\mu\text{m}$ .



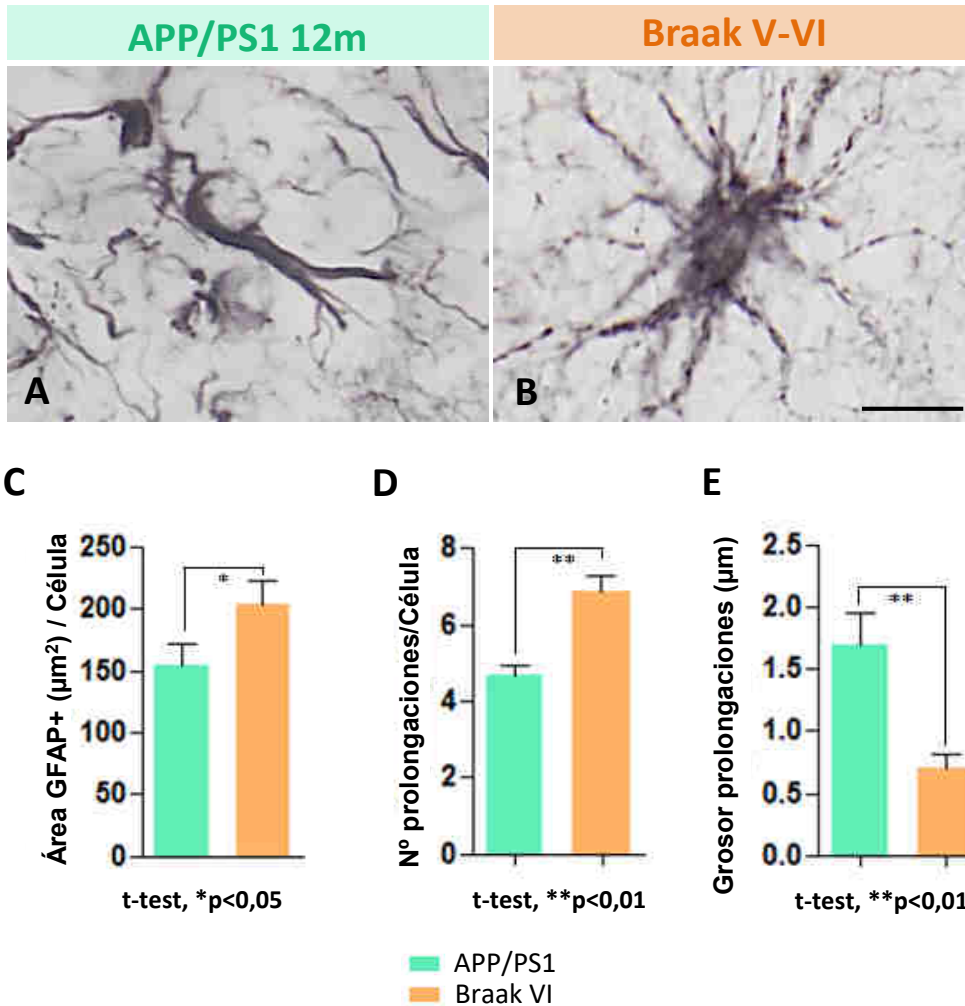
## GFAP – hAPP



**Figura 3.1.41. Comparativa de la interacción entre neuritas distróficas y astrocitos reactivos en el hipocampo de pacientes de Alzheimer (A y B) y del modelo APP/PS1 (C y D).** Inmunofluorescencia doble a microscopía láser confocal para el marcador de astrocitos (GFAP; en verde) y de neuritas distróficas (hAPP; en rojo). En pacientes, al igual que en el modelo transgénico, las distrofias neuronales que rodean las placas amiloides están en estrecho contacto y parcialmente envueltas por las prolongaciones de astrocitos reactivos. Es de destacar que en el cerebro de los pacientes las neuritas distróficas presentan un tamaño bastante superior a las de ratón. Las flechas blancas en D señalan varias distrofias envueltas por un mismo astrocito reactivo. Barras de escala: A-D: 10  $\mu$ m.



**Figura 3.1.42. Las neuritas distróficas del hipocampo de pacientes de Alzheimer son de mayor tamaño que las del modelo APP/PS1.** A, imágenes representativas de agrupaciones de neuritas distróficas APP-inmunopositivas en hipocampo de ratones APP/PS1 de 12 meses de edad (A1) y de individuos Braak V-VI (A2); el estudio del tamaño de las neuritas distróficas (A3) revela que el modelo transgénico posee mayoritariamente distrofias pequeñas ( $<50 \mu\text{m}^2$ ), mientras que los pacientes distrofias más grandes ( $>50 \mu\text{m}^2$ ). B, comparativa del porcentaje de los diferentes grupos de neuritas según el rango de tamaños en el modelo y en pacientes; las neuritas distróficas de  $>200 \mu\text{m}^2$  se encuentran de manera exclusiva en los pacientes.  $n=3$  ratones APP/PS1 o individuos Braak V-VI. La significancia y el test estadístico utilizado se indica en la gráfica. Barra de escala: A1-A2:  $10 \mu\text{m}$



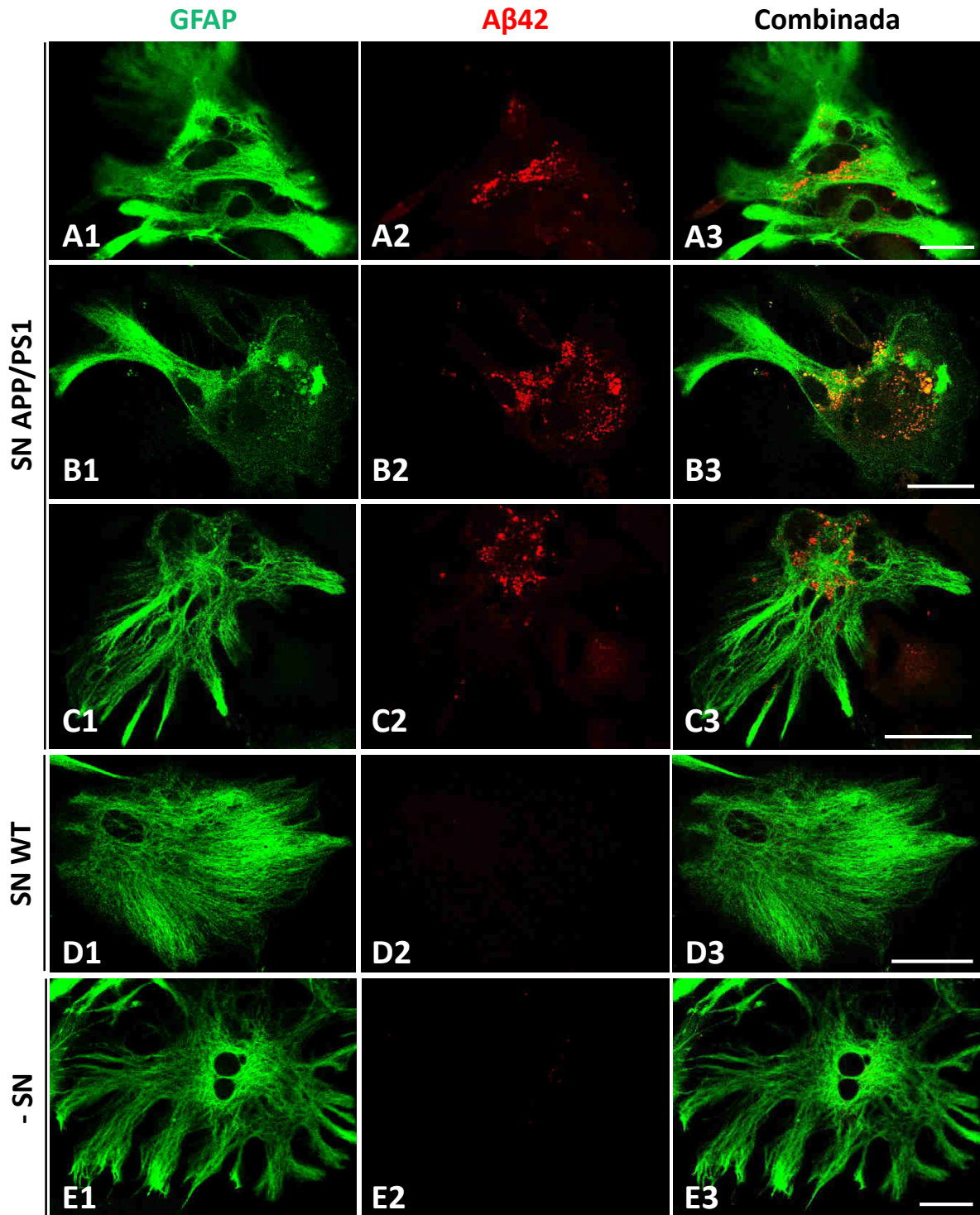
**Figura 3.1.43. Estudio morfométrico comparativo de los astrocitos reactivos en el hipocampo de animales APP/PS1 de 12 meses de edad y de pacientes de Alzheimer (Braak V-VI.)** Células astrogliales representativas de animales APP/PS1 (A) y pacientes Braak VI (B) inmunomarcadas para GFAP. El análisis cuantitativo (C) revela diferencias significativas entre los astrocitos humanos (Braak VI) y los del modelo transgénico. Los astrocitos de individuos Braak VI presentan mayor tamaño (C) y también mayor número de prolongaciones (D), aunque el grosor de éstas prolongaciones es significativamente inferior (E) al del modelo transgénico. La significancia y el test estadístico se indican en las gráficas.  $n=3$  ratones APP/PS1 o individuos Braak V-VI. Barra de escala: A-B:  $20 \mu\text{m}$

### 3.1.8. Los astrocitos en cultivo fagocitan neurosinaptosomas procedentes de animales WT y APP/PS1

Finalmente, para comprobar los resultados *in vivo* obtenidos previamente, es decir la capacidad fagocítica de los astrocitos de sinapsis distróficas, se llevaron a cabo estudios *in vitro* utilizando cultivos de astrocitos primarios en colaboración con el laboratorio del Dr. Vitorica (Universidad de Sevilla) (Fig. 3.1.44 y Fig. 3.1.45). Brevemente, las células astrogliales en cultivo se trataron durante 3 horas a 37°C de acuerdo a 3 condiciones experimentales diferentes: control negativo, neurosinaptosomas de hipocampo de animales WT y neurosinaptosomas de animales APP/PS1, tras lo cual se llevó a cabo la inmunocitoquímica (Fig. 3.1.44) o el procesamiento para microscopía electrónica de transmisión (Fig. 3.1.45). La tinción inmunofluorescente doble para GFAP y A $\beta$ 42, mostró la localización intracelular de pequeñas estructuras inmunopositivas para A $\beta$ 42 en astrocitos en cultivo tratados con neurosinaptosomas procedentes de animales APP/PS1, demostrando así la fagocitosis astrogliar de estas estructuras patológicas de origen sináptico conteniendo A $\beta$  (Fig. 3.1.44A-C). Como controles a esta técnica se han empleado células tratadas con neurosinaptosomas de animales WT (Fig. 3.1.44D) o células sin tratar (Fig. 3.1.44E), ambas carentes de péptido  $\beta$ -amiloide. El análisis ultraestructural de las células en cultivo en las condiciones experimentales previas mostró numerosas inclusiones citoplasmáticas de aspecto autofágico en las células tratadas con neurosinaptosomas de APP/PS1 (Fig. 3.1.45A). En las imágenes de detalle destaca la presencia de estructuras multilaminares, cuerpos multivesiculares y estructuras multimembrana de elevada electrodensidad, lo cual demuestra la naturaleza distrófica de los neurosinaptosomas de APP/PS1. Sin embargo, los astrocitos tratados con neurosinaptosomas de animales WT presentaron menor cantidad de inclusiones citoplasmáticas (Fig. 3.1.45B), no presentando éstas un aspecto autofágico sino fagocítico (Fig. 3.1.45B1). Por último, las células sin tratamiento mostraron un aspecto ultraestructural normal, sin inclusiones citoplasmáticas de carácter autofágico o fagocítico (Fig. 3.1.45C-C1).

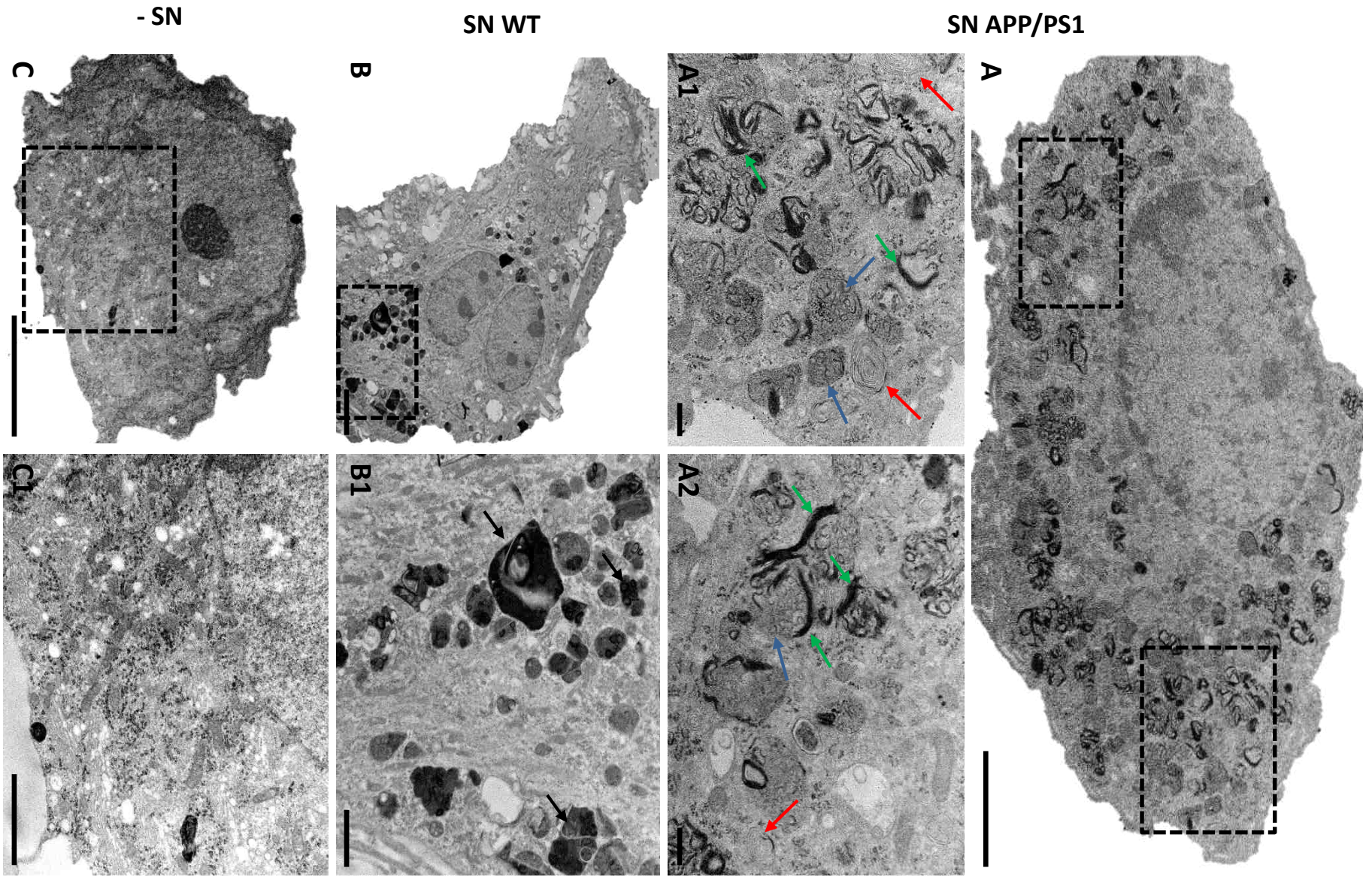
En su conjunto, estos datos corroboran la capacidad de las células astrogliales para fagocitar estructuras sinápticas normales (neurosinaptosomas de WT) y patológicas (neurosinaptosomas de APP/PS1). Además, a nivel ultraestructural se demuestra la apariencia autofágica de las inclusiones intracitoplasmáticas en las células tratadas con neurosinaptosomas de animales APP/PS1, lo cual es altamente indicativo de la naturaleza distrófica de los neurosinaptosomas del modelo transgénico.





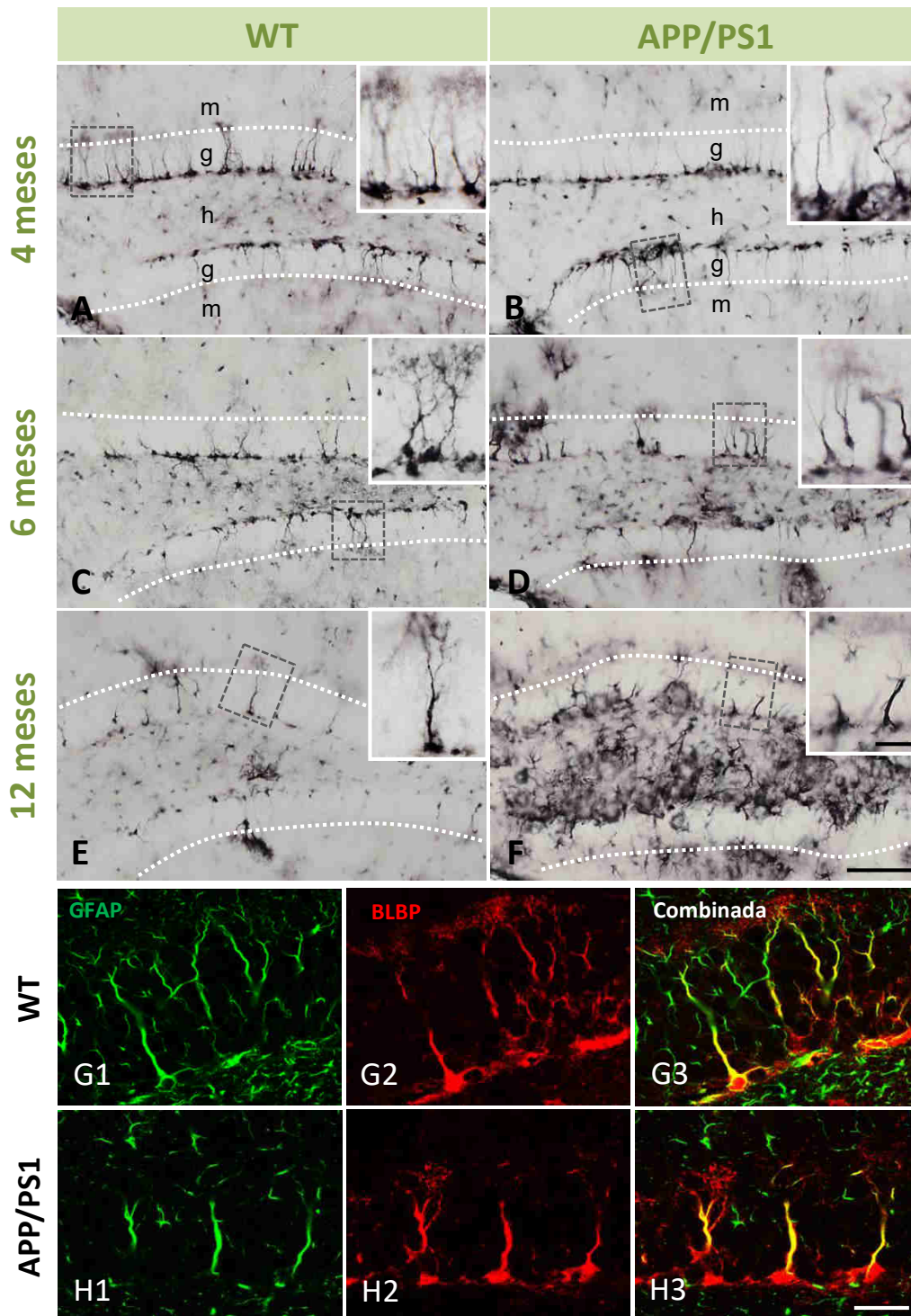
**Figura 3.1.44.** Los astrocitos primarios fagocitan *in vitro* neurosinaptosomas aislados de hipocampo de animales APP/PS1. Inmunocitoquímica doble a microscopía confocal para el marcador astrogial GFAP (verde) y para A $\beta$ 42 (rojo). Los astrocitos son capaces de fagocitar *in vitro* neurosinaptosomas (SN) de ratones APP/PS1 (A1-3, B1-3, C1-3); estos neurosinaptosomas se pueden monitorizar a microscopía por la acumulación de A $\beta$  en su interior. Como control se incubaron astrocitos con neurosinaptosomas que carecen de A $\beta$  procedentes de animales WT (D1-D3). Además, se analizaron astrocitos cultivados en ausencia de neurosinaptosomas (-SN; E1-E3). Barras de escala: A1-E3: 30  $\mu$ m.





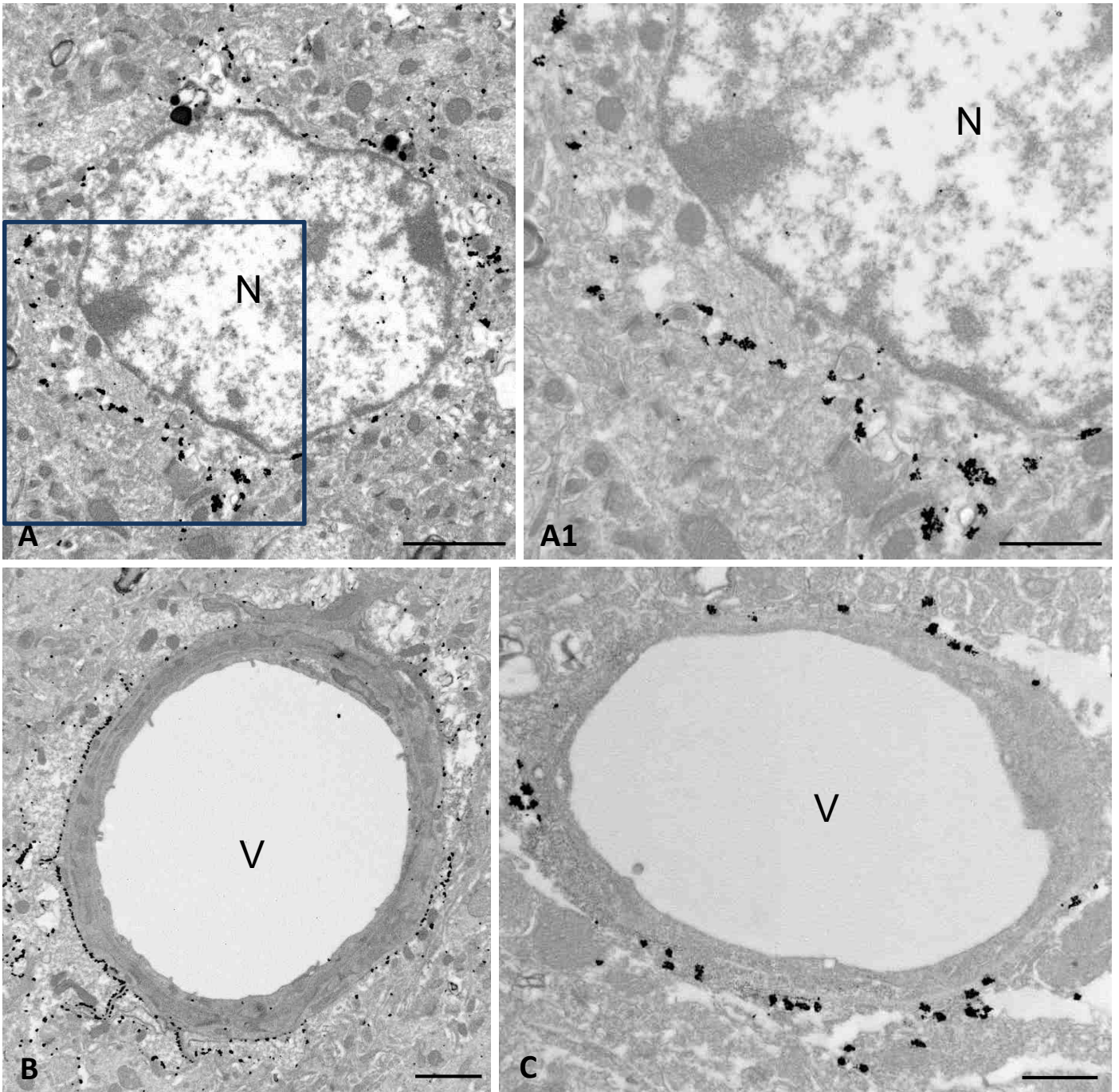
**Figura 3.1.45. La fagocitosis de neurosinaptosomas APP/PS1 induce la acumulación de inclusiones membranosas heterogéneas en el citoplasma astroglial.** Microscopía electrónica de transmisión de astrocitos primarios incubados con neurosinaptosomas de animales APP/PS1 (A, A1 y A2), de animales WT (B y B1) o en ausencia de neurosinaptosomas (C y C1). A, presencia de numerosas estructuras, de carácter aparentemente autofágico, en el citoplasma astroglial. A1-A2 muestran detalles del contenido vesicular de la célula en A, destacando la presencia de estructuras multilaminares (flechas rojas), cuerpos multivesiculares (flechas azules) y estructuras multimembrana altamente electrodensas (flechas verdes). Las células incubadas con neurosinaptosomas de animales WT (B y detalle en B1) presentan inclusiones citoplasmáticas de aspecto fagocítico (flechas negras en B1), mientras que las células que no recibieron tratamiento alguno tienen un aspecto ultraestructural normal (C y detalle en C1). Barras de escala: A, B y C: 5  $\mu\text{m}$ ; A1-A2, B1 y C1: 2  $\mu\text{m}$ .





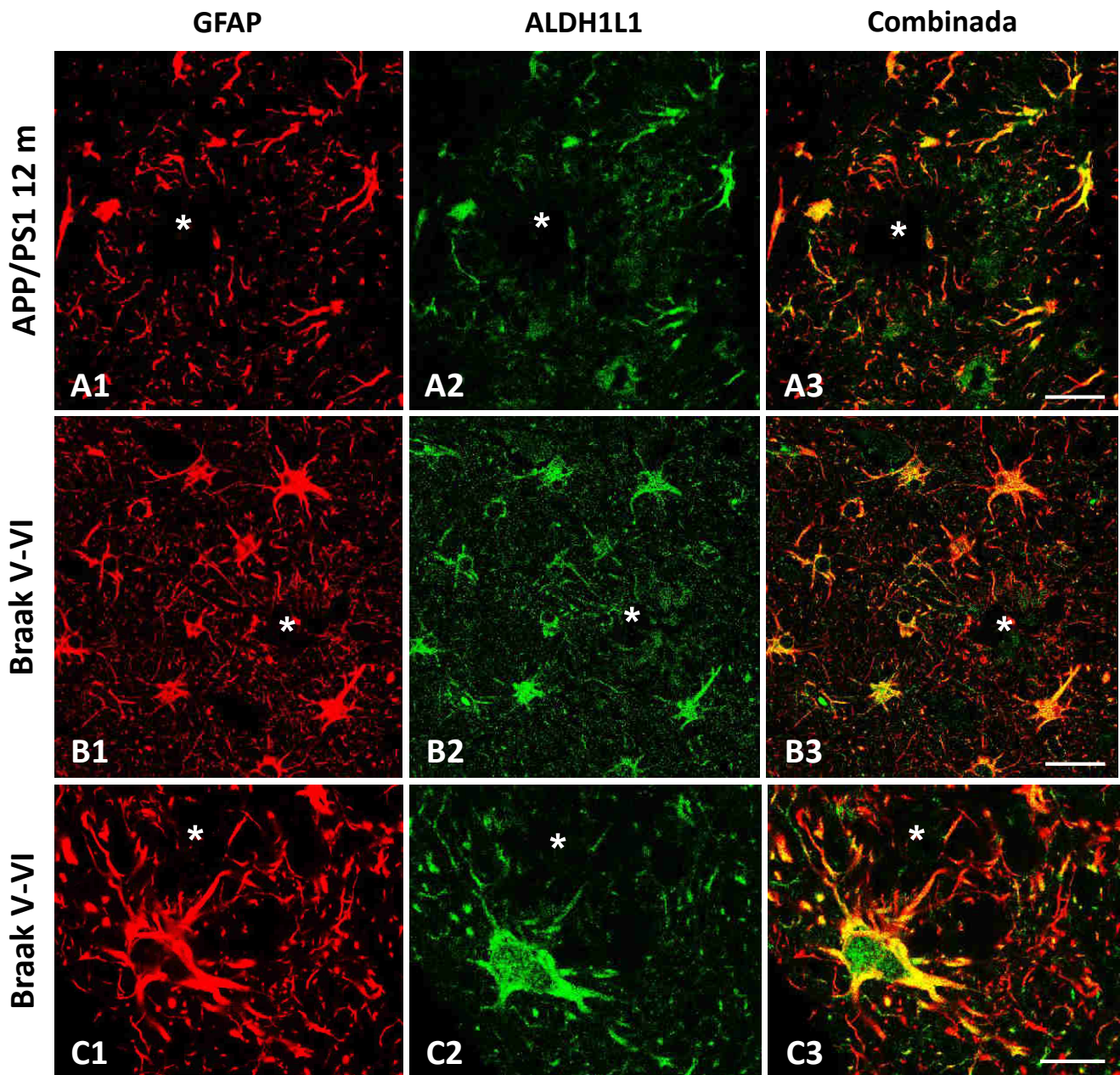
**Figura Suplementaria 3.1. Expresión de BLBP en la región subgranular del giro dentado en animales WT y APP/PS1.** Inmunohistoquímica de campo claro para BLBP en animales WT (A, C y E) y APP/PS1 (B, D y F) a 4, 6 y 12 meses de edad. La doble inmunofluorescencia (G-H) en esta región hipocámpal muestra la presencia de células progenitoras doblemente positivas para GFAP y BLBP (*radial glial-like stem cell*). m: capa molecular; g: capa granular; h: hilio. Barras de escala: A-F: 100  $\mu$ m; G1-H3 e insertos: 25  $\mu$ m.

## AQP4



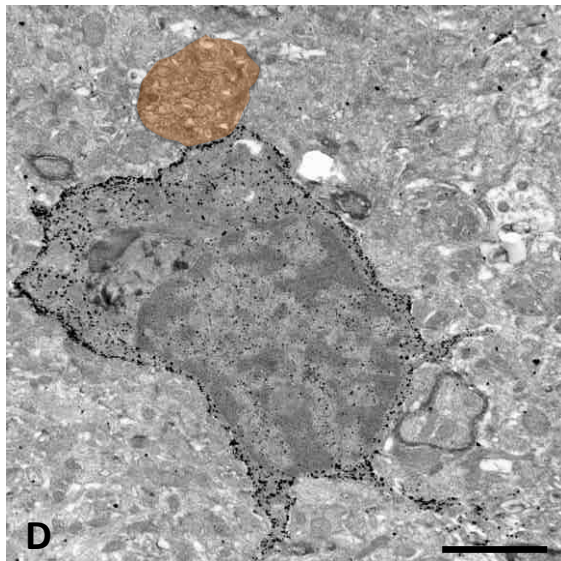
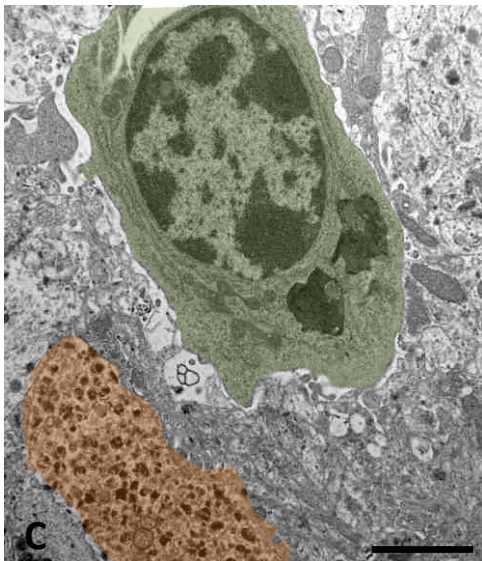
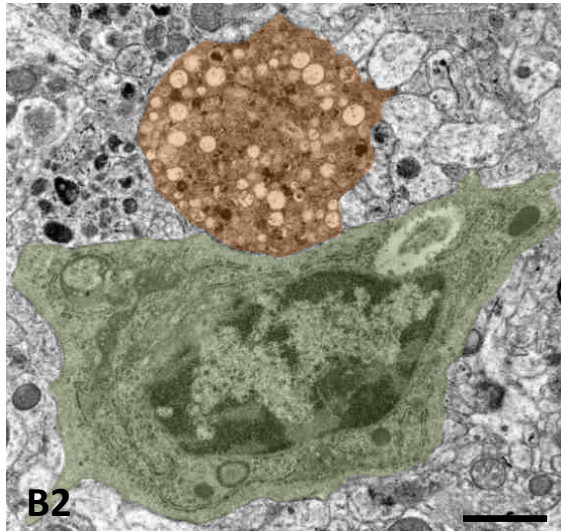
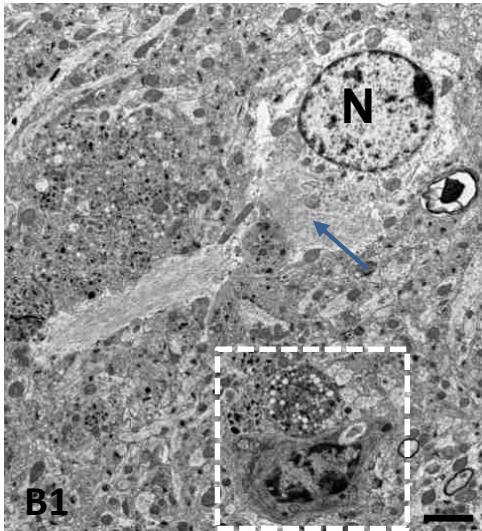
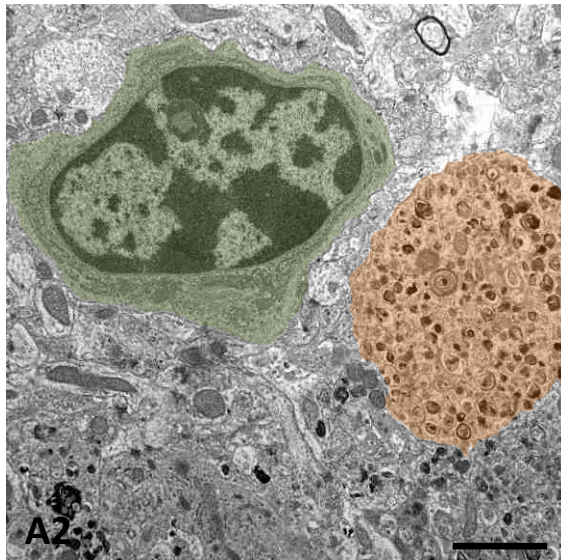
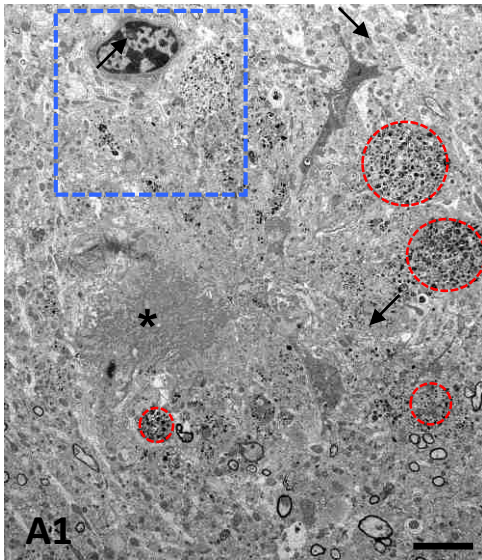
**Figura suplementaria 3.2. Inmunolocalización de AQP4 en el hipocampo de animales WT.** Marcaje a microscopía electrónica de transmisión de acuaporina 4 (AQP4) con la técnica de inmuno-oro coloidal. Los astrocitos (no reactivos) de los animales no transgénicos presentan AQP4 en la membrana plasmática de los cuerpos (A) y prolongaciones aunque en menor cantidad en comparación con los animales APP/PS1 (ver figuras 3.1.11 y 3.1.12). Las partículas de oro coloidal se concentran en pequeños acúmulos en la membrana plasmática (ver detalle en A1). AQP4 es abundante en los pies perivascular astrocitarios (B y C). N, núcleo astrocitario; V, vaso sanguíneo. Barras de escala: A, B: 2  $\mu\text{m}$ ; A1: 1  $\mu\text{m}$ ; C: 0,5  $\mu\text{m}$



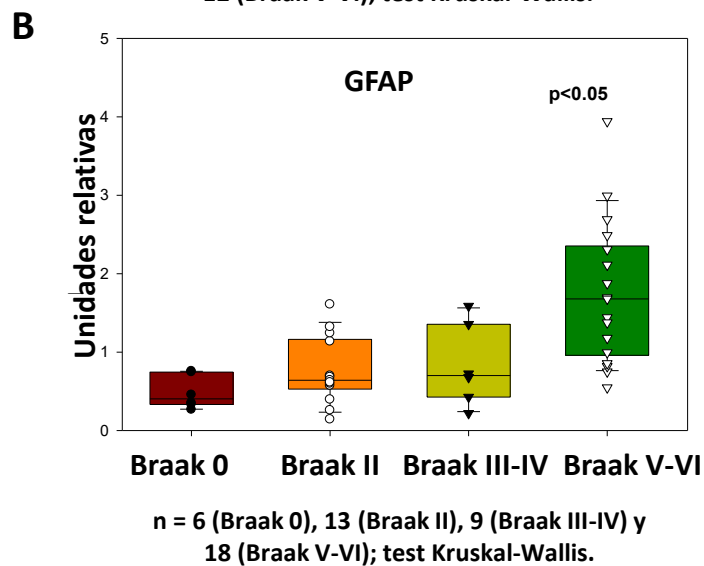
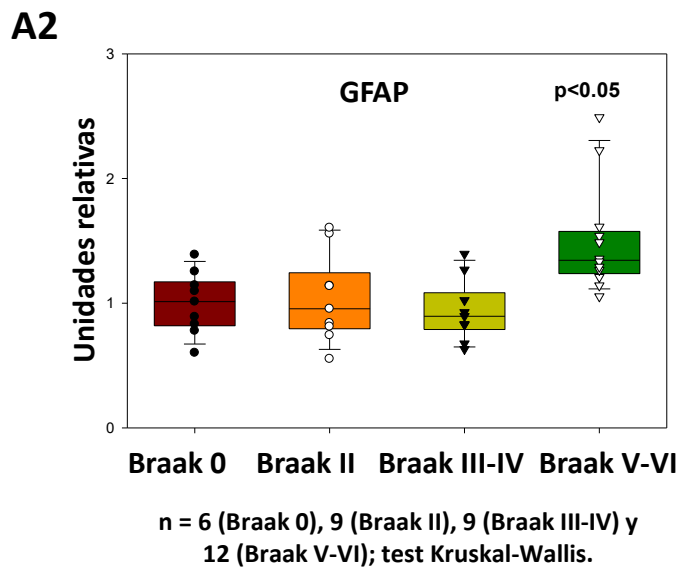
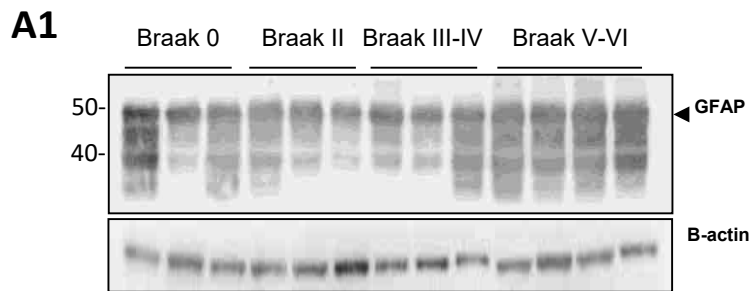


**Figura Suplementaria 3.3. La astrogli a reactiva expresa los marcadores GFAP y ALDH1L1.** Inmunofluorescencia doble a microscopía l aser confocal para GFAP (rojo) y ALDH1L1 (verde) en el hipocampo de animales APP/PS1 de 12 meses de edad (A1-A3) y de pacientes de Alzheimer (B1-B3 y C1-C3). Como muestran las imágenes combinadas (A3, B3 y C3), todos los astrocitos reactivos situados en la periferia de las placas amiloides (indicadas con asterisco) expresan ambos marcadores astrogliales (GFAP y ALDH1L1) tanto en modelos animales como en pacientes. Sin embargo, el marcador GFAP da una señal más intensa en la mayoría de las prolongaciones astrogliales, especialmente aquellas de mayor grosor. Barras de escala: A1-B3: 30  $\mu$ m; C1-C3: 15  $\mu$ m.





**Figura Suplementaria 3.4. No hay evidencias ultraestructurales de la internalización de neuritas distróficas por parte de la microglía.** Imágenes representativas a microscopía electrónica de transmisión de células microgliales asociadas a placas amiloides en el hipocampo de animales APP/PS1 de 6 meses de edad. A, placa neurítica (asterisco) rodeada de neuritas distróficas (delimitadas por líneas rojas) y células microgliales (flechas). A1, detalle del recuadro en A donde se observa una célula microglial (coloreada de verde) de apariencia no fagocítica muy próxima a una neurita distrófica (coloreada de naranja). B1, astrocito reactivo con una distrofia fagocitada (flecha azul), cerca de una célula microglial (detalle en B2) en íntimo contacto con una distrofia. C, célula microglial (coloreada de verde) con contenido fagocítico en su citoplasma de apariencia ultraestructural totalmente diferente al de las neuritas distróficas. D, otro ejemplo de célula microglial (inmunomarcada con oro coloidal para Iba1) en contacto con una distrofia (coloreada de naranja) pero sin internalizarla. Las células microgliales están en contacto estrecho con las distrofias pero no las envuelven. N: núcleo astroglial. Barras de escala: A1: 5  $\mu\text{m}$ ; A2, B1, C y D: 2  $\mu\text{m}$ ; B2: 1  $\mu\text{m}$ .



**Figura Suplementaria 3.5. La expresión del marcador astrocítico GFAP aumenta significativamente en las muestras de pacientes en estadio Braak V-VI.** Se muestra un marcado aumento en los niveles de GFAP a nivel proteico (A1-A2) y de RNAm (A3) en muestras humanas *post mortem* en estadio Braak V-VI respecto a estadios más tempranos de la patología (Braak II, Braak III-IV) o a individuos control (Braak 0), medidos mediante Western Blot (A1-A2) y qPCR (B). La estadística y la significancia se indican en las gráficas.

## DISCUSIÓN

En este bloque de resultados hemos demostrado a microscopía óptica y electrónica que los astrocitos reactivos que rodean las placas amiloides tienen capacidad fagocítica. Por un lado, fagocitan fibrillas amiloides de la periferia de la placa, y además neuritas distróficas. La eliminación de estas porciones axonales/presinápticas patológicas que rodean las placas amiloides por parte de astrocitos reactivos es la primera vez que se describe. Es relevante destacar que este proceso tiene lugar tanto en modelos transgénicos como en el cerebro de pacientes. A continuación, discutiremos algunos de los aspectos más relevantes en relación a estos resultados y la implicación de los astrocitos reactivos en la patología del Alzheimer.

La existencia de una marcada reactividad glial (microglial y astrogial), y en consecuencia una respuesta neuroinflamatoria, constituye, junto con las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares, una de las lesiones histopatológicas más características en el cerebro de pacientes de Alzheimer. Sin embargo, y a pesar de los numerosos estudios realizados en la última década en este campo, aún no se conoce por completo el efecto beneficioso o perjudicial de esta respuesta glial en el parénquima nervioso durante la progresión de la patología (Griffin et al. 1998; Akiyama et al. 2000; McGeer and McGeer 2001; Dudal et al. 2004; Sastre et al. 2006; Wyss-Coray 2006; Heneka and O'Banion 2007; Reinisch et al. 2014; Heneka et al. 2015; Zhang and Jiang 2015; Regen et al. 2017). La microglía ha recibido una atención especial durante los últimos años en la investigación del Alzheimer por su condición de macrófagos residentes del cerebro, y actores fundamentales en las respuestas inflamatorias. La microglía, elementos principales de la inmunidad innata cerebral, elimina desechos celulares y sinapsis no deseadas/degeneradas, y agrega proteínas (Heneka et al. 2015). La identificación de polimorfismos asociados a la EA esporádica en genes microgliales (Korvatska et al. 2015; Colonna and Wang 2016; Huang et al. 2017), avalan un papel predominante de estas células gliales en la patogénesis de la EA, aunque aún no esclarecido. La visión más generalizada es la de una microglía activada de carácter citotóxico productora de factores pro-inflamatorios (Heneka et al. 2015). Sin embargo, los estudios más recientes implican un mal funcionamiento de la respuesta microglial con el desarrollo del Alzheimer (Korvatska et al. 2015; Wang et al. 2015; Yuan et al. 2016). En apoyo a esta hipótesis, nuestro grupo ha descrito recientemente la existencia de degeneración microglial en el hipocampo de pacientes de Alzheimer (Sanchez-Mejias et al. 2016). En el siguiente capítulo abordaremos más ampliamente esta discusión sobre el papel de la disfunción/degeneración microglial en la patología del Alzheimer.

A diferencia de la microglía, los astrocitos no presentan signos de degeneración ni en modelos transgénicos de Alzheimer ni en pacientes (trabajo actual; Sanchez-Mejias 2015). Muy al contrario, los astrocitos en los pacientes presentan un fenotipo activo, caracterizado por el aumento en la expresión de proteínas como ALDH1L1, GFAP o vimentina. De nuevo, al



igual que con la microglía, el papel de la reactividad astrogliar en la patología de la EA no es conocido. En este sentido, también se ha propuesto la diversidad fenotípica y funcional de los astrocitos reactivos (Zamanian et al. 2012; Liddelow et al. 2017). Así, la astrogliar reactiva puede estar llevando a cabo funciones de neuroprotección mediante la liberación de factores neurotróficos o por el contrario puede secretar citoquinas proinflamatorias, dando lugar a una respuesta inflamatoria de carácter citotóxico (Avila-Muñoz and Arias 2014; Verkhratsky et al. 2014; Heppner et al. 2015; Heneka et al. 2015; Bagyinszky et al. 2017; Liddelow et al. 2017). En este sentido, recientemente se ha descrito la existencia de dos fenotipos funcionales de los astrocitos, denominados A1 y A2, siendo el primero de ellos fundamentalmente citotóxico y el segundo de carácter neuroprotector. El fenotipo astrogliar A1, inducido mediante activación por la microglía, parece perder la mayoría de las funciones que llevan a cabo las células astrogliar regularmente y adquiere nuevas funciones neurotóxicas mediante la regulación transcripcional de genes para la eliminación de sinapsis. Por el contrario, los astrocitos A2 parecen estar implicados en funciones de neuroprotección mediante la regulación de numerosos factores neurotróficos (Liddelow et al. 2017; Liddelow and Barres 2017). Esta visión de astrocitos “malos” (A1) frente a astrocitos “buenos” (A2), basada en la clasificación de los fenotipos microgliales M1/M2, probablemente no englobe la diversidad real de potenciales fenotipos astrogliar. De hecho, es muy probable que al igual que está ocurriendo para la microglía, esta división en solo dos fenotipos sea reemplazada, a medida que se describan sus perfiles moleculares, por clasificaciones más complejas con múltiples subtipos.

En el presente trabajo hemos profundizado en la caracterización celular y subcelular de los astrocitos reactivos con objeto de aportar nuevos datos que permitan descifrar su papel funcional en la patología de la EA. Como sabemos, una de las primeras lesiones histopatológicas en la enfermedad, y que comienza a desarrollarse en el cerebro en fases presintomáticas años antes de la aparición de síntomas, es la acumulación extracelular del péptido A $\beta$  en forma de placas seniles. La patología amiloide ha sido relacionada con procesos de astrogliosis tanto en modelos animales para la EA (Jimenez et al. 2008; Moreno-Gonzalez et al. 2009; Yeh et al. 2011; Kamphuis et al. 2015) como en muestras *post mortem* de pacientes de Alzheimer (Simpson et al. 2010b; Serrano-Pozo et al. 2013a; Sanchez-Mejias 2015). En este trabajo de Tesis Doctoral, y trabajos previos del grupo (Jimenez et al. 2008; Baglietto-Vargas et al. 2010; Jimenez et al. 2011; Sanchez-Varo et al. 2012; Torres et al. 2012; Trujillo-Estrada et al. 2013, 2014) hemos demostrado un incremento significativo en la carga amiloide del hipocampo de los animales APP/PS1 asociado a la edad y progresión de la patología. En nuestro modelo transgénico la acumulación extracelular de amiloide en el hipocampo comienza a edades tempranas (4 meses), en las regiones del *stratum oriens* de CA1 y la región del hilio del giro dentado, e incrementa de manera progresiva con la edad, aumentando el número y tamaño de los depósitos extracelulares en todas las subregiones hipocampales.

Tal y como esperábamos (Jimenez et al. 2008; Moreno-Gonzalez et al. 2009; Serrano-Pozo et al. 2013b, 2016; Trujillo-Estrada et al. 2013; Acosta et al. 2017) el aumento de la



patología amiloide lleva asociado un aumento de la astrogliosis (expresado mediante el área ocupada por los astrocitos GFAP-positivos) en el hipocampo de animales APP/PS1 desde edades tempranas. La astrogliosis (manifestada por una hipertrofia celular e incremento de la expresión de la proteína ácida fibrilar glial, GFAP; ver Liddelow and Barres 2017) se asocia con una serie de eventos celulares, incluyendo la liberación de óxido nítrico (NO), especies reactivas de oxígeno, citoquinas pro-inflamatorias (tales como TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) y prostaglandinas, los cuales puede tener efectos deletéreos sobre la función neuronal. Previamente, nuestro grupo de investigación describió la existencia de una respuesta inflamatoria temprana, asociada espacial y temporalmente a las placas de A $\beta$ , tanto en el hipocampo como en la corteza entorrinal de este mismo modelo transgénico (Jimenez et al. 2008; Moreno-Gonzalez et al. 2009). En este sentido existe mucha controversia (Rodríguez-Arellano et al. 2016) ya que numerosos autores defienden que durante la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer se produce una acumulación notable de astrocitos en las regiones más afectadas por la patología amiloide, como la corteza entorrinal y la formación hipocampal (Wegiel et al. 2001a; Nagele et al. 2003b, 2004). Sin embargo, estudios recientes utilizando técnicas estereológicas, de nuestro grupo (Baglietto-Vargas et al. 2017) y de otro autores (Serrano-Pozo et al. 2013a), demuestran que el número de células astrogliales no se ve incrementado durante el curso de la EA, siendo la reactividad (aumento de expresión de GFAP) de esta población celular lo único que aumenta. En este trabajo demostramos un incremento significativo de la astrogliosis en el hipocampo del modelo APP/PS1, si bien es cierto que los animales controles (WT) también presentan este aumento con la edad, aunque en menor medida. Por lo tanto, el incremento de expresión de GFAP parece ser la suma de los procesos normales de envejecimiento unido al efecto que ejerce la patología amiloide sobre los astrocitos. El incremento de la reactividad astrogliar no solo engloba cambios morfológicos (engrosamiento del cuerpo celular y de las prolongaciones) sino también cambios a nivel molecular (Osborn et al. 2016).

Con el objetivo de validar los datos obtenidos en modelos animales, nuestro grupo mantiene una línea de investigación con muestras humanas *post mortem* procedentes de pacientes de Alzheimer. En este sentido, hemos descrito el incremento del área ocupada por la población GFAP-positiva en el giro dentado, CA1 y CA3 de pacientes dementes (Braak V-VI) con respecto a individuos no dementes en estadios iniciales Braak II (Sanchez-Mejias 2015). Esta respuesta inflamatoria mediada por los astrocitos tiene lugar en relación a las placas amiloides, de manera similar a lo descrito previamente en el modelo murino APP/PS1. Del mismo modo en este trabajo se ha extendido este estudio realizando un análisis por Western blot y qPCR en muestras de hipocampo humano, con un aumento significativo de GFAP y otros marcadores astrogliales (como vimentina, no mostrado) en las muestras Braak V-VI (individuos dementes) respecto a individuos en estadios de Braak anteriores.

Además del incremento en la expresión de GFAP, en este trabajo hemos mostrado la expresión selectiva de BLBP (del inglés "*Brain lipid-binding protein*") por los astrocitos reactivos asociados a placas amiloides. Este marcador ha sido ampliamente usado para el estudio de las células progenitoras neuronales en el cerebro tanto en estadios embrionarios como adultos (Götz and Barde 2005). Sin embargo, la expresión de BLBP constituye también una marca molecular específica de astrocitos reactivos en diferentes condiciones patológicas (Robel et al. 2011). En este sentido, hemos mostrado un incremento muy acusado en la expresión de BLBP en la región hipocampal CA1 del modelo APP/PS1 de manera paralela al aumento de la patología amiloide. A diferencia de lo ocurrido con el GFAP, los animales no transgénicos apenas muestran inmunorreactividad para BLBP en astrocitos, indicando una vez más la especificidad de la expresión de este marcador por los astrocitos reactivos. El hecho de que la astrogliosis asociada a las placas amiloides exprese altos niveles de un marcador, típico de progenitores neurales, podría sugerir que esta glía en estado reactivo adquiere características propias de las células madre, sin embargo en nuestro modelo transgénico estas células tienen limitada su capacidad proliferativa (Serrano-Pozo et al. 2013a; Galea et al. 2015; Baglietto-Vargas et al. 2017).

La expresión de BLBP de manera específica por los astrocitos asociados a placas (reactivos) y no por aquellos más alejados (no reactivos), nos permite hacernos una idea de la heterogeneidad de esta población glial. En este sentido, la diversidad funcional y molecular de la astrogliosis en condiciones normales y/o patológicas constituye uno de los principales temas de investigación en la actualidad (Haim and Rowitch 2017). La gran variedad de funciones que lleva a cabo este tipo celular apoyaría la existencia de diferentes subpoblaciones astrogliales; de hecho recientemente se han descrito hasta 5 subtipos funcionales diferentes de astrocitos murinos basados en sus perfiles moleculares (John Lin et al. 2017).

En relación al perfil molecular de la astrogliosis, hemos observado que los astrocitos reactivos del hipocampo de animales APP/PS1 son inmunopositivos no sólo para GFAP sino también para ALDH1L1, AQP4, GS y EAAT2, pudiendo emplear cualquiera de estos marcadores para su identificación ultraestructural.

De manera tradicional se ha empleado el GFAP como marcador de astrocitos reactivos, sin embargo esta proteína es expresada por todas las células astrogliales y no únicamente por las reactivas (Ridet et al. 1997; Serrano-Pozo et al. 2013a) por lo que es el incremento en la expresión de GFAP lo que se debe tener en cuenta como indicativo de astrogliosis (Eng et al. 2000; Osborn et al. 2016). Así, tal y como comentamos previamente, hemos descrito la existencia de un fuerte proceso de activación astrogliosis en el modelo APP/PS1 (con respecto a los WT) asociado a la patología amiloide. Es por ello que, en este modelo doble transgénico, el GFAP constituye a priori un buen marcador astrogliosis. Sin embargo, las prolongaciones astrogliales más distales de cuerpo, más finas, tienen baja cantidad de filamentos intermedios por lo que el uso de alguno de los marcadores alternativos mencionados previamente puede resultar más adecuado.

Aunque los astrocitos de ratones expresan numerosas moléculas, entre ellas ALDH1L1, GS o EAAT2, que pueden ser empleadas como marcadores específicos astrogiales, la AQP4 presentó una mayor expresión en los animales transgénicos en comparación con los controles WT. En este trabajo hemos mostrado mediante microscopía electrónica de transmisión un aumento notable de la inmunoreactividad para acuaporina 4 en los animales transgénicos APP/PS1 frente a los WT. La importancia de las acuaporinas, y especialmente la AQP4 por ser la mayoritaria en el CNS (Hubbard et al. 2017), radica en su función crítica para el mantenimiento de la homeostasis del agua en el cerebro. Por ello de manera reciente se ha sugerido la importancia de las células astrogiales en el denominado “sistema glinfático” (Iff and Nedergaard 2013; Jessen et al. 2015; Hubbard et al. 2017). Este sistema es el encargado de la distribución de moléculas como glucosa, lípidos, aminoácidos y neurotransmisores por el parénquima cerebral. Su función en la eliminación de proteínas y metabolitos solubles que ya no resultan necesarios o pueden incluso ser perjudiciales para el correcto funcionamiento celular le ha otorgado también una gran relevancia (Jessen et al. 2015). Es por ello que la localización específica de la acuaporina 4 en los pies perivasculares tiene un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis cerebral (Iff et al. 2012). Estudios en modelos animales con delección del gen para la AQP4 mostraron también su participación en funciones tan diversas como la plasticidad sináptica (Skucas et al. 2011; Scharfman and Binder 2013; Szu and Binder 2016), la migración astrogial (Saadoun et al. 2005) o la homeostasis del potasio (Binder et al. 2006a, 2006b), por lo que la desregulación de esta proteína integral de membrana en condiciones patológicas podría tener consecuencias negativas (revisado en Hubbard et al. 2017). En relación a la EA, la AQP4 parece tener un papel fundamental (revisado en Yang et al. 2016). En este sentido, muchos de los pacientes presentan depósitos amiloides en las paredes vasculares, condición conocida como angiopatía amiloide cerebral o CAA, en los que se ha descrito un descenso en la inmunoreactividad para AQP4 (Wilcock et al. 2009; Zeppenfeld et al. 2017). Esta misma pérdida de acuaporina 4 en los pies vasculares astrocitarios ha sido descrita en modelos animales para la enfermedad de Alzheimer que presentan CAA (Wilcock et al. 2009). De hecho en el modelo APP/PS1 se ha relacionado la delección de AQP4 con una disminución de la captación de A $\beta$  por parte de los astrocitos, conducente al aumento de la deposición amiloide y finalmente a la pérdida sináptica, atrofia astrogial y déficits cognitivos (Xu et al. 2015). Los procesos de activación de los astrocitos en diversas enfermedades neurodegenerativas pueden dar lugar a una deslocalización de la acuaporina y por lo tanto a un aumento de la toxicidad mediada por las células astrogiales (Hubbard et al. 2017). Aunque son necesarios experimentos complementarios para analizar la expresión de AQP4 en el modelo APP/PS1, los datos preliminares obtenidos mediante inmunohistoquímica para microscopía electrónica de transmisión revelan, de manera opuesta a lo esperado, un aumento de la inmunoreactividad para la AQP4 tanto en los pies vasculares como en los astrocitos reactivos que aparecen asociados a las placas amiloides. El aumento de esta acuaporina en los astrocitos reactivos podría estar relacionado con la captación y eliminación del A $\beta$  en un intento por aliviar la carga amiloide y sugiere por tanto un papel

beneficioso neuroprotector de la activación astrogliar en este modelo transgénico. Aunque estos resultados puedan contradecir algunos de los estudios mencionados previamente, la existencia de mecanismos de compensación en respuesta a un daño, como puede ser la elevada deposición amiloide, es un evento relativamente común en las células gliales.

Debido a la importancia de caracterizar la respuesta inflamatoria mediada por los astrocitos durante la enfermedad de Alzheimer, nuestro grupo de investigación junto a otros grupos nacionales del área (Dr. Vitorica, Dr. Comella y Dra. Galea) se encuentra llevando a cabo un proyecto bajo la subvención de La Marato. El objetivo principal del proyecto consiste en descifrar los perfiles funcionales de los astrocitos reactivos desde múltiples aproximaciones experimentales.

En relación a la captación de A $\beta$ , ha sido ampliamente descrita la capacidad de los astrocitos reactivos para eliminar el péptido  $\beta$ -amiloide (Osborn et al. 2016) y limitar así el avance de la patología amiloide (Xiao et al. 2014). La astrogliá reactiva ha sido considerada uno de los tipos celulares más importantes en la internalización y eliminación del A $\beta$  de las placas amiloides (Akiyama et al. 2000; Wegiel et al. 2001b; Nagele et al. 2003a; Wyss-Coray et al. 2003; Koistinaho et al. 2004; Heneka and O'Banion 2007; Kraft et al. 2013). De hecho, a pesar de que la microglía es la principal célula fagocítica en el SNC, algunos autores han mostrado una mayor eficiencia en la captación de A $\beta$  por parte de los astrocitos en comparación con la microglía (Nielsen et al. 2010; Söllvander et al. 2016). Tal y como comentamos previamente, la astrogliá lleva a cabo la eliminación del péptido amiloide presente en el cerebro a través del fluido cerebroespinal mediante la acuaporina 4 localizada en su membrana (Iff et al. 2012). Además, el transplante de astrocitos previamente marcados con GFP en el hipocampo de modelos murinos para la enfermedad de Alzheimer mostró su localización alrededor de las placas así como la internalización y eliminación de A $\beta$  (Pihlaja et al. 2008). Por otro lado, las células astrogliales en cultivo han mostrado ser altamente fagocíticas (Roldán et al. 1997; Tansey and Cammer 1998; Nielsen et al. 2010). Es más, la astrogliá parece expresar un amplio abanico de potenciales receptores fagocíticos que se han relacionado con la unión al amiloide, como el CD36, CD47, LRP1 (del inglés "*low density lipoprotein receptor-related protein*") SCARB1 y RAGE (del inglés "*receptor for advanced glycation end products*") (Husemann and Silverstein 2001; Sokolowski et al. 2011; Jones et al. 2013; Li et al. 2014; Villarreal et al. 2014; Batarese et al. 2016). La posterior degradación intracelular de este péptido podría estar directamente relacionada con las vías de degradación lisosomal, ya que la estimulación de la biogénesis de los lisosomas incrementa la eliminación de A $\beta$  y reduce la carga amiloide (Xiao et al. 2014). Otros autores, sin embargo, apuntan a una posible eliminación extracelular del amiloide por parte de los astrocitos, mediada por la liberación de enzimas degradadoras de este péptido, como la neprilisina (Mohajeri et al. 2002; Apelt et al. 2003) o las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9 (Yin et al. 2006), cuya inhibición parece disminuir los niveles de degradación del A $\beta$  (revisado en Batarese et al. 2016; Acosta et al. 2017). La elevada expresión astrocitaria del factor de riesgo ApoE en su isoforma  $\epsilon$ 4 también parece estar relacionada con la captación

e internalización del A $\beta$ . Así, la internalización de A $\beta$  por células astrogliales en cultivo se ve drásticamente reducida en presencia del factor ApoE (Nielsen et al. 2010). Aunque no se establece interacción directa entre el ApoE y el  $\beta$ -amiloide soluble, ambos parecen competir por las mismas vías de internalización en astrocitos (Nielsen et al. 2010; Mulder et al. 2014; Osborn et al. 2016).

En relación a ello, los datos experimentales obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral muestran una estrecha interacción astrogliá-placa en el hipocampo de animales transgénicos APP/PS1 tanto a 6 como a 12 meses de edad. Es más, hemos mostrado la presencia de fibras de péptido  $\beta$ -amiloide en el interior de células astrogliales sugiriendo así que los astrocitos participan en procesos de fagocitosis de este péptido en un modelo doble transgénico para la enfermedad de Alzheimer. Además, la colocalización mostrada entre el receptor Megf10 (implicado en procesos fagocíticos) con marcadores típicos astrogliales y con Tioflavina S como marcador de placas corrobora la internalización fagocítica de A $\beta$  por estas células gliales.

Megf10 (del inglés "*multiple epidermal growth factor-like domains protein 10*") es una proteína transmembrana de tipo I ortóloga de los receptores Draper y CED-1 (implicados en etapas tempranas del proceso fagocítico) de invertebrados, ampliamente relacionada con la eliminación de células apoptóticas (Wu et al. 2009; Scheib et al. 2012; Iram et al. 2016). Aunque se expresa en precursores gliales en general, su expresión parece estar enriquecida en los astrocitos concretamente (Chung et al. 2013; Iram et al. 2016). Además de participar en la eliminación de células apoptóticas, recientemente se le ha relacionado con la remodelación sináptica llevada a cabo por los astrocitos durante las etapas de desarrollo del sistema nervioso (Chung et al. 2013; Pekny et al. 2016). La sobreexpresión de este receptor ha sido también implicado en el aumento de la captación del amiloide en cultivos de células Hela y N2A mediante procesos endocíticos (Singh et al. 2010). Por lo tanto, parece claro el importante papel de este receptor en los procesos fagocíticos mediados por las células astrogliales, aunque poco se conoce todavía de su papel en la captación de A $\beta$  durante la patología del Alzheimer.

Por todo lo expuesto anteriormente, y los datos mostrados en este trabajo proponemos la participación de las células astrogliales en la internalización/eliminación de fibrillas amiloides, mediada entre otros por el receptor fagocítico Megf10.

Continuando con los procesos fagocíticos en astrocitos, en este trabajo hemos mostrado, por primera vez, evidencias de la capacidad de la astrogliá reactiva para internalizar elementos distróficos de origen axonal/presináptico en el hipocampo de ratones APP/PS1 y en muestras de pacientes de Alzheimer. Las prolongaciones astrogliales rodean e internalizan terminales presinápticos distróficos (dilatados debido al acúmulo de vesículas autofágicas) localizados alrededor de los depósitos amiloides. Estas estructuras endocitadas son posteriormente digeridas, tal y como evidencian las imágenes ultraestructurales en las que aparecen asociadas a lisosomas y en estadios iniciales de degradación. A pesar de los numerosos estudios existentes en relación a la actividad fagocítica de los astrocitos, no existen



trabajos previos en los que se reporte la internalización y degradación de las neuritas distróficas características de la enfermedad de Alzheimer. Así, la participación de la astrogliá en procesos de internalización y degradación de distrofias presinápticas en el hipocampo de animales APP/PS1 podría ser una extensión de, la ya mencionada previamente, capacidad para fagocitar sinapsis como parte del refinamiento de los circuitos neuronales que ocurre normalmente, tanto en etapas embrionarias del desarrollo (Chung et al. 2015) como en el sistema nervioso central adulto (Chung et al. 2013).

En apoyo a este papel fagocítico de los astrocitos reactivos se encuentran las evidencias que sugieren su participación en la eliminación del amiloide (Xiao et al. 2014; resultados de este trabajo), tal y como hemos discutido previamente. Otros autores han demostrado la capacidad astrogliá para internalizar células apoptóticas completas tras una lesión cerebral, protegiendo así a las neuronas sanas de la muerte celular por contacto con células en apoptosis (Lööv et al. 2012) e incluso de manera muy reciente se ha observado la fagocitosis mediada por este tipo celular de restos de mielina originados en respuesta a un daño (Ponath et al. 2017). Además, los astrocitos reactivos adquieren propiedades fagocíticas e internalizan restos neuronales tras episodios de isquemia cerebral transitoria (Morizawa et al. 2017). Por tanto, la degradación astrogliá de neuritas distróficas podría constituir un mecanismo de supervivencia neuronal o, de manera alternativa, reducir la liberación de A $\beta$  que tiene lugar en los elementos presinápticos distróficos. En este sentido, nuestro grupo de investigación describió la acumulación de la proteína precursora amiloide (APP) y la posible liberación de A $\beta$  por los terminales distróficos presinápticos (Sanchez-Varo et al. 2012; Torres et al. 2012). Es más, la acumulación de BACE1 en las distrofias presinápticas que se encuentran en la periferia de las placas pueden provocar un aumento del procesamiento proteolítico del APP, con la consecuente liberación de  $\beta$ -amiloide (Torres et al. 2012; Sadleir et al. 2016). Por otro lado, el aislamiento de las neuritas distróficas del resto de componentes celulares en un estado no patológico puede también tener un efecto beneficioso en la respuesta neuroinflamatoria al reducir sus posibles efectos citotóxicos. Esta función concuerda con la cicatriz glial que forman las células astrogliáles alrededor de las placas amiloides en un intento de aislarlas y disminuir su efecto perjudicial sobre las neuronas adyacentes. Por todo ello, los astrocitos reactivos pueden estar llevando a cabo funciones protectoras mediante la fagocitosis de las distrofias axonales/sinápticas en un intento de controlar la producción de A $\beta$  y/o prevenir la respuesta inflamatoria.

Recientemente, se ha descrito la existencia de hasta 5 subpoblaciones astrogliáles de las cuales una de ellas está enriquecida en genes relacionados con la actividad sináptica (tipo C) y dos de estos subtipos muestran numerosos genes asociados a procesos fagocíticos (tipos B y C) (John Lin et al. 2017). A pesar de este reciente descubrimiento, la contribución de cada uno de los subtipos astrogliáles a la enfermedad de Alzheimer no se conoce todavía.

La idea de que la pérdida de función astrogliá podría contribuir a la progresión de las patologías neurodegenerativas, y de que las terapias deberían estar dirigidas a la recuperación

funcional de la astrogliá son ideas emergentes (revisado en Khakh et al. 2017; Masgrau et al. 2017). En apoyo a la idea de la disfunción astrogliá, recientemente se ha propuesto que el factor de riesgo ApoE4 disminuye notablemente la capacidad fagocítica de los astrocitos para llevar a cabo los procesos de remodelación sináptica (Chung et al. 2016). Además, estos autores muestran como el alelo ApoE2, por el contrario, parece incrementar la tasa de fagocitosis de las sinapsis por parte de los astrocitos (Chung et al. 2016). Por lo tanto, la modulación del factor de riesgo ApoE expresado por los astrocitos podría contribuir a aumentar los procesos de fagocitosis de las neuritas distróficas.

En línea con la idea de disfunción astrogliá, nuestros resultados no muestran incremento significativo de la actividad fagocítica con la progresión de la patología en los animales APP/PS1. Aunque la proporción de placas amiloides que presentan este tipo de procesos fagocíticos es mayor a 12 meses (68%) que a 6 meses (35%) de edad, la cantidad de neuritas distróficas internalizadas representa una cantidad bastante reducida (alrededor del 7%) respecto al total de distrofias que se desarrollan alrededor de los depósitos de A $\beta$ . Si tenemos en cuenta que la cantidad de placas y de distrofias muestra un incremento significativo con la edad de los animales APP/PS1, de igual manera que ocurre con la activación astrogliá, cabría esperar que los procesos de fagocitosis mediados por astrocitos se incrementaran también de manera significativa. Debido a que la actividad fagocítica es un proceso dinámico, sería posible encontrar una proporción reducida de neuritas internalizadas en un determinado momento, sin embargo, la elevada acumulación de distrofias alrededor de las placas amiloides en animales de edad avanzada es indicativo de la baja eficiencia de la actividad fagocítica astrogliá. Por lo tanto, nuestros datos parecen indicar una limitación de la capacidad fagocítica de estas células gliales durante el curso de la enfermedad de Alzheimer. Por otro lado, desconocemos la eficiencia de los astrocitos para llevar a cabo los procesos de degradación de las estructuras aberrantes internalizadas. En este sentido y como ya hemos comentado previamente, el estudio ultraestructural a microscopía electrónica de transmisión nos mostró la existencia de material internalizado y parcialmente degradado en el interior astrogliá, aunque la observación de estas estructuras en proceso de degradación resultó bastante menos frecuente que la observación de las neuritas distróficas intactas y totalmente rodeadas por membrana astrogliá. Resulta bastante probable que la tasa de digestión de las células astrogliales sea notablemente inferior a la de otras células típicamente fagocíticas como la microglía.

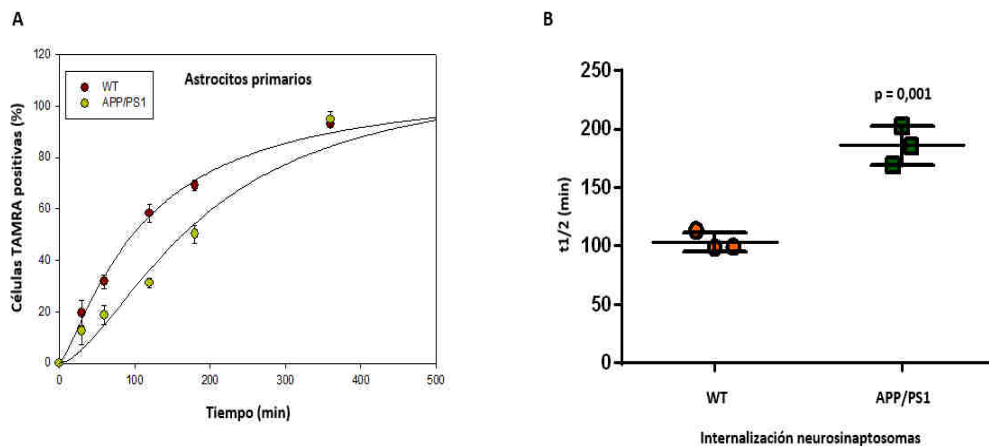
En este sentido, otros autores han descrito la reducida capacidad astrogliá para llevar a cabo la eliminación completa de las células apoptóticas previamente fagocitadas (Lööv et al. 2012). En estudios posteriores, estos mismos autores señalan la presencia de anillos de actina alrededor de los fagosomas durante largos periodos de tiempo como la causa principal de la limitada capacidad de los astrocitos para llevar a cabo la digestión del material fagocitado. Estos anillos de actina podrían impedir físicamente la fusión de los fagolisosomas (Lööv et al. 2015). Además, la astrogliá expresa niveles elevados de Rab27a, proteína conocida por su capacidad para disminuir la acidez de los lisosomas mediante el reclutamiento de Nox2, lo cual

podría también explicar una tasa reducida de degradación del material fagocitado por parte de los astrocitos (Lööv et al. 2015). Aunque en este trabajo no hemos analizado los niveles de Rab27a en los astrocitos hipocampales del nuestro modelo transgénico APP/PS1, es importante destacar que en numerosas ocasiones hemos detectado la presencia de neuritas distróficas fagocitadas totalmente rodeadas por filamentos gliales (filamentos intermedios), lo cual podría explicar la reducida capacidad astrogliar para la fusión de los lisosomas y en última instancia para la degradación del material internalizado.

Además, en este trabajo hemos mostrado (mediante microscopía electrónica) la presencia en el interior citoplasmático astrogliar, de muestras humanas *post mortem* de pacientes de Alzheimer en estadios Braak V-VI, de estructuras similares a las neuritas distróficas caracterizadas por un elevado contenido en vesículas autofágicas e incluso filamentos helicoidales apareados. Aunque resultan necesarios estudios posteriores para cuantificar la prevalencia de este fenómeno en muestras de pacientes, parece que la fagocitosis de distrofias podría ocurrir de manera similar a lo que hemos descrito en el modelo murino APP/PS1. Sin embargo y, a pesar de estas observaciones ultraestructurales, los estudios mediante microscopía láser confocal mostraron grandes diferencias entre los astrocitos y las distrofias observadas en el APP/PS1 frente a las muestras humanas. Por un lado, la astrogliar reactiva en humanos es de un tamaño notablemente superior y con mayor cantidad de prolongaciones GFAP-positivas que la de ratón. Sin embargo, el grosor de estas prolongaciones astrogliales es significativamente inferior en humanos con respecto a los observados en el modelo murino. Estos datos junto al gran tamaño de las neuritas distróficas APP-positivas en muestras humanas (respecto a las del APP/PS1) podría en cierta medida explicar la reducida capacidad de los astrocitos reactivos humanos para internalizar estas estructuras aberrantes de origen neuronal. Los datos cuantitativos del tamaño de las neuritas distróficas en muestras humanas y de ratón muestran una gran escasez de distrofias APP-positivas de pequeño tamaño en las muestras de pacientes, por lo que no podemos descartar que esto sea debido a la gran pérdida sináptica que tiene lugar durante la progresión de la enfermedad de Alzheimer. Todo ello apoyaría la idea de la disfunción astrogliar durante la patología de la EA. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha demostrado recientemente que las células microgliales en el hipocampo de pacientes de Alzheimer muestran un fenotipo degenerativo (Sanchez-Mejias et al. 2016), apoyando la idea de que las células gliales en un estado disfuncional pueden contribuir al desarrollo y progresión de la patología característica de la enfermedad de Alzheimer.

Por último, hemos demostrado *in vitro* la capacidad fagocítica de las células astrogliales. Datos procedentes del laboratorio del Dr. Vitorica (Universidad de Sevilla) muestran la menor cinética de internalización de neurosinaptosomas procedentes de animales APP/PS1 frente a aquellos obtenidos de animales WT (Fig. 3.1.46A). Debido a que el porcentaje máximo de fagocitosis de neurosinaptosomas es similar en ambos casos, pero la velocidad de internalización es significativamente menor en los procedentes de animales transgénicos (Fig.

3.1.46B), las células astrogliales muestran alteraciones en el procesamiento/eliminación de estas estructuras sinápticas de animales APP/PS1. En línea con estos datos, nuestros resultados habían demostrado previamente una aparente baja eficiencia en la internalización astrogliar de las neuritas distróficas en el modelo APP/PS1.



**Figura 3.1.46. Ensayos de fagocitosis de neurosinaptosomas procedentes de animales WT y APP/PS1 en cultivos astrogliales primarios.** En A se muestra el ensayo de cinética de internalización de neurosinaptosomas por parte de los astrocitos primarios. En B se representa el tiempo que tardan las células astrogliales en alcanzar el 50% de astrocitos primarios fagocíticos (positivos para TAMRA) con neurosinaptosomas de WT y APP/PS1. Datos cedidos por el grupo del Dr. Vitorica (Universidad de Sevilla).

Tomando en conjunto los datos *in vivo* e *in vitro* parece evidente la dificultad de la astrogliá para internalizar y eliminar estas estructuras aberrantes de origen neuronal, apoyando la hipótesis previa de la disfunción astrogliar en condiciones patológicas (Lööv et al. 2015; Masgrau et al. 2017; Acosta et al. 2017). Además de la presencia de anillos de actina y el elevado contenido en la proteína Rab27a que parecen retrasar la eliminación de restos neuronales fagocitados por la astrogliá (Lööv et al. 2012, 2015), es posible que el elevado contenido en  $\beta$ -amiloide de las neuritas distróficas de APP/PS1 sea también uno de los causantes de la reducida capacidad fagocítica astrogliar. Estudios recientes mostraron alteraciones en el sistema endosomal/lisosomal causadas por la acumulación prolongada de protofibrillas de A $\beta$ 42 (Söllvander et al. 2016). De hecho, el A $\beta$ 42 podría inducir disfunción de los procesos de autofagia y la degradación lisosomal (Ling et al. 2009; Ling and Salvaterra 2011). Estas alteraciones de los sistemas de transporte celular podrían explicar la acumulación anormal de vesículas autofágicas que mostraron las imágenes de microscopía electrónica de transmisión en las células astrogliales cultivadas con neurosinaptosomas de animales APP/PS1.

Este es el primer estudio que describe la eliminación de las neuritas distróficas por parte de los astrocitos reactivos que rodean las placas tanto en el modelo APP/PS1 como en pacientes de Alzheimer. Nuestros datos apoyan la idea de que esta capacidad fagocítica puede verse afectada durante la progresión de la patología, y, por tanto, la restauración de esta función astrogliar podría constituir una novedosa terapia para el tratamiento de la EA.

Resumiendo, en el hipocampo del modelo APP/PS1 tiene lugar un fuerte proceso de activación astrogliar caracterizado por el incremento significativo de GFAP y del marcador de reactividad astrogliar BLBP. Este proceso de astrogliosis ocurre en paralelo a la progresión de la patología amiloide. La estrecha relación entre los astrocitos reactivos y los depósitos amiloides puede estar relacionada con funciones de aislamiento y/o eliminación del A $\beta$  en un intento por aliviar la carga amiloide y así reducir su efecto citotóxico sobre las neuronas adyacentes. Además, demostramos que los astrocitos reactivos están implicados en el aislamiento/eliminación de las neuritas distróficas que rodean los depósitos amiloides en modelos y pacientes, en un intento de contener el daño asociado a la patología axonal/sináptica. Sin embargo, nuestros estudios *in vivo* e *in vitro*, demuestran disfuncionalidad en esta actividad fagocítica de la astrogliá reactiva. Por tanto, nuestro estudio apoya la idea de disfunción astrogliar en la EA y abre un nuevo escenario patogénico de potencial interés terapéutico.



## BIBLIOGRAFÍA

- Acosta C, Anderson HD, Anderson CM. 2017. Astrocyte dysfunction in Alzheimer disease. *J Neurosci Res* **0**.
- Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, et al. 2000. *Inflammation and Alzheimer's disease*.
- Allen NJ, Eroglu C. 2017. Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions. *Neuron* **96**: 697–708.
- Apelt J, Ach K, Schliebs R. 2003. Aging-related down-regulation of neprilysin, a putative  $\beta$ -amyloid-degrading enzyme, in transgenic Tg2576 Alzheimer-like mouse brain is accompanied by an astroglial upregulation in the vicinity of  $\beta$ -amyloid plaques. *Neurosci Lett* **339**: 183–186.
- Avila-Muñoz E, Arias C. 2014. When astrocytes become harmful: Functional and inflammatory responses that contribute to Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* **18**: 29–40.
- Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, Vizuete M, et al. 2010. Calretinin interneurons are early targets of extracellular amyloid- $\beta$  pathology in PS1/A $\beta$ PP 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 A $\beta$  in proliferative processes in an amyloidogenic model of Alzheimer's disease. *Sci Rep* **7**: 10085.
- Bagyinszky E, Giau V Van, Shim K, Suk K, An SSA, Kim S. 2017. Role of inflammatory molecules in the Alzheimer's disease progression and diagnosis. *J Neurol Sci* **376**: 242–254.
- Batarseh YS, Duong QV, Mousa YM, Al Rihani SB, Elfakhri K, Kaddoumi A. 2016. Amyloid- $\beta$  and astrocytes interplay in amyloid- $\beta$  related disorders. *Int J Mol Sci* **17**: 1–19.
- Binder DK, Oshio K, Ma T, Verkman AS, Geo T. 2006a. Increased seizure threshold in mice lacking aquaporin-4 water channels. *Neuroreport* **15**: 59–62.
- Binder DK, Yao X, Verkman AS, Manley GT. 2006b. Increased seizure duration in mice lacking aquaporin-4 water channels. *Acta Neurochir Suppl* **389–392**.
- Blanchard V, Moussaoui S, Czech C, Touchet N, Bonici B, Planche M, Canton T, Jedidi I, Gohin M, Wirths O, et al. 2003. Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with A $\beta$  deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Exp Neurol* **184**: 247–263.
- Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS, Xing Y, Lubischer JL, Krieg P a, Krupenko S a, et al. 2008. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci* **28**: 264–78.
- Chung W-S, Clarke LE, Wang GX, Stafford BK, Sher A, Chakraborty C, Joung J, Foo LC, Thompson A, Chen C, et al. 2013. Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature* **504**: 394–400.
- Chung W-S, Verghese PB, Chakraborty C, Joung J, Hyman BT, Ulrich JD, Holtzman DM, Barres BA. 2016. Novel allele-dependent role for APOE in controlling the rate of synapse pruning by astrocytes. *Proc Natl Acad Sci* **113**: 10186–10191.
- Chung WS, Allen NJ, Eroglu C. 2015. Astrocytes control synapse formation, function, and elimination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**.
- Colombo E, Farina C. 2016. Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. *Trends Immunol* **37**: 608–620.
- Colonna M, Wang Y. 2016. TREM2 variants: new keys to decipher Alzheimer disease pathogenesis. *Nat Rev Neurosci* **17**: 201–207.
- Dudal S, Morissette C, Lacombe D, Tremblay P, Gervais F. 2004. Differences in the amyloid- $\beta$ -induced inflammatory response in microglia from C57BL/6 and A/J strains of mice. *J Neuroimmunol* **153**: 26–35.
- Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. 2000. Glial Fibrillary Acidic Protein : GFAP-Thirty-One Years (1969-2000). *Neurochem Res* **25**: 1439–1451.
- Ferrer I. 2017. Diversity of astroglial responses across human neurodegenerative disorders and brain aging. *Brain Pathol* **27**: 645–674.
- Galea E, Morrison W, Hudry E, Arbel-Ornath M, Bacsikai BJ, Gómez-Isla T, Stanley HE, Hyman BT. 2015. Topological analyses in APP/PS1 mice

- reveal that astrocytes do not migrate to amyloid- $\beta$  plaques. *Proc Natl Acad Sci* **112**: 15556–15561.
- Götz M, Barde Y-A.** 2005. Radial Glial Cells. *Neuron* **46**: 369–372.
- Gotz M, Sirko S, Beckers J, Irmeler M.** 2015. Reactive astrocytes as neural stem or progenitor cells: In vivo lineage, In vitro potential, and Genome-wide expression analysis. *Glia* **63**: 1452–1468.
- Griffin WS, Sheng JG, Royston MC, Gentleman SM, McKenzie JE, Graham DI, Roberts GW, Mrak RE.** 1998. Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a "cytokine cycle" in disease progression. *Brain Pathol* **8**: 65–72.
- Haim L Ben, Rowitch D.** 2017. Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nat Rev Neurosci* **18**: 31–41.
- Heneka MT, Carson MJ, Houry 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**: 388–405.
- Heneka MT, O'Banion MK.** 2007. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol* **184**: 69–91.
- Heneka MT, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Dewachter I, Walter J, Klockgether T, Van Leuven F.** 2005. Focal glial activation coincides with increased BACE1 activation and precedes amyloid plaque deposition in APP[V717I] transgenic mice. *J Neuroinflammation* **2**: 22.
- Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B.** 2015. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci* **16**: 358–372.
- Huang K, Marcora E, Pimenova A, Di Narzo A, Kapoor M, Jin SC, Harari O, Bertelsen S, Fairfax B, Czajkowski J, et al.** 2017. A common haplotype lowers PU.1 expression in myeloid cells and delays onset of Alzheimer's disease. *bioRxiv*.
- Hubbard JA, Szu JI, Binder DK.** 2017. The role of aquaporin-4 in synaptic plasticity, memory and disease. *Brain Res Bull*.
- Husemann J, Silverstein SC.** 2001. Expression of scavenger receptor class B, type I, by astrocytes and vascular smooth muscle cells in normal adult mouse and human brain and in Alzheimer's disease brain. *Am J Pathol* **158**: 825–32.
- Iliff JJ, Nedergaard M.** 2013. Is There a Cerebral Lymphatic System? *Stroke* **44**: S93–S95.
- Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, Benveniste H, Vates GE, Deane R, Goldman SA, et al.** 2012. A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow Through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid. *Sci Transl Med* **4**: 147ra111–147ra111.
- Iram T, Ramirez-Ortiz Z, Byrne MH, Coleman UA, Kingery ND, Means TK, Frenkel D, El Khoury J.** 2016. Megf10 Is a Receptor for C1Q That Mediates Clearance of Apoptotic Cells by Astrocytes. *J Neurosci* **36**: 5185–5192.
- Jessen NA, Munk ASF, Lundgaard I, Nedergaard M.** 2015. The Glymphatic System: A Beginner's Guide. *Neurochem Res* **40**: 2583–2599.
- 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  $\beta$  (A $\beta$ ) oligomers reverses the neuroprotective effect of soluble amyloid precursor protein- $\alpha$  (sAPP $\alpha$ ) by modulating phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt-GSK-3 $\beta$  pathway in Alzheimer mouse model. *J Biol Chem* **286**: 18414–18425.
- John Lin C-C, Yu K, Hatcher A, Huang T-W, Lee HK, Carlson J, Weston MC, Chen F, Zhang Y, Zhu W, et al.** 2017. Identification of diverse astrocyte populations and their malignant analogs. *Nat Neurosci*.
- Jones RS, Minogue AM, Connor TJ, Lynch MA.** 2013. Amyloid- $\beta$ -induced astrocytic phagocytosis is mediated by CD36, CD47 and RAGE. *J Neuroimmune Pharmacol* **8**: 301–311.
- Kamphuis W, Kooijman L, Orre M, Stassen O, Pekny M, Hol EM.** 2015. GFAP and vimentin deficiency alters gene expression in astrocytes and microglia in wild-type mice and changes the transcriptional response of reactive glia in mouse model for Alzheimer's disease. *Glia* **63**: 1036–1056.
- Khakh BS, Beaumont V, Cachope R, Munoz-Sanjuan I, Goldman SA, Grantyn R.** 2017. Unravelling and Exploiting Astrocyte Dysfunction in

- Huntington's Disease. *Trends Neurosci* 1–16.
- Koistinaho M, Lin S, Wu X, Esterman M, Koger D, Hanson J, Higgs R, Liu F, Malkani S, Bales KR, et al.** 2004. Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-beta peptides. *Nat Med* 10: 719–726.
- 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. *JAMA Neurol* 72: 920.
- Kraft AW, Hu X, Yoon H, Yan P, Xiao Q, Wang Y, Gil SC, Brown J, Wilhelmsson U, Restivo JL, et al.** 2013. Attenuating astrocyte activation accelerates plaque pathogenesis in APP/PS1 mice. *FASEB J* 27: 187–198.
- Li Y, Cheng D, Cheng R, Zhu X, Wan T, Liu J, Zhang R.** 2014. Mechanisms of U87 astrocytoma cell uptake and trafficking of monomeric versus protofibril Alzheimer's disease amyloid- $\beta$  proteins ed. S.T. Ferreira. *PLoS One* 9: e99939.
- Liddelow SA, Barres BA.** 2017. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity* 46: 957–967.
- Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, Bennett ML, Münch alexandra E, Chung W-S, Peterson TC, et al.** 2017. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541: 481–487.
- Ling D, Salvaterra PM.** 2011. Brain aging and A $\beta$ 1-42 neurotoxicity converge via deterioration in autophagy-lysosomal system: A conditional Drosophila model linking Alzheimer's neurodegeneration with aging. *Acta Neuropathol* 121: 183–191.
- Ling D, Song HJ, Garza D, Neufeld TP, Salvaterra PM.** 2009. A $\beta$ 42-induced neurodegeneration via an age-dependent autophagic-lysosomal injury in Drosophila. *PLoS One* 4: e4201.
- Lööv C, Hillered L, Ebendal T, Erlandsson A.** 2012. Engulfing astrocytes protect neurons from contact-induced apoptosis following injury. *PLoS One* 7.
- Lööv C, Mitchell CH, Simonsson M, Erlandsson A.** 2015. Slow degradation in phagocytic astrocytes can be enhanced by lysosomal acidification. *Glia* 63: 1997–2009.
- Masgrau R, Guaza C, Ransohoff RM, Galea E.** 2017. Should We Stop Saying "Glia" and "Neuroinflammation"? *Trends Mol Med* xx: 1–15.
- McGeer PL, McGeer EG.** 2001. Polymorphisms in inflammatory genes and the risk of Alzheimer disease. *Arch Neurol* 58: 1790–1792.
- Medeiros R, LaFerla FM.** 2013. Astrocytes: Conductors of the Alzheimer disease neuroinflammatory symphony. *Exp Neurol* 239: 133–138.
- Mohajeri MH, Wollmer MA, Nitsch RM.** 2002. A $\beta$ 42-induced increase in neprilysin is associated with prevention of amyloid plaque formation in vivo. *J Biol Chem* 277: 35460–35465.
- Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Del Rio JC, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, et al.** 2009. Extracellular amyloid- $\beta$  and cytotoxic glial activation induce significant entorhinal neuron loss in young PS1M146L/APP751SL mice. *J Alzheimer's Dis* 18: 755–776.
- Morizawa YM, Hirayama Y, Ohno N, Shibata S, Shigetomi E, Sui Y, Nabekura J, Sato K, Okajima F, Takebayashi H, et al.** 2017. Reactive astrocytes function as phagocytes after brain ischemia via ABCA1-mediated pathway. *Nat Commun* 8: 28.
- Mulder SD, Nielsen HM, Blankenstein MA, Eikelenboom P, Veerhuis R.** 2014. Apolipoproteins E and J interfere with amyloid-beta uptake by primary human astrocytes and microglia in vitro. *Glia* 62: 493–503.
- Nagele RG, D'Andrea MR, Lee H, Venkataraman V, Wang H.** 2003a. Astrocytes accumulate A beta 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains. *Brain Res* 971: 197–209.
- Nagele RG, D'Andrea MR, Lee H, Venkataraman V, Wang H-Y.** 2003b. Astrocytes accumulate A beta 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains. *Brain Res* 971: 197–209.
- Nagele RG, Wegiel J, Venkataraman V, Imaki H, Wang KC, Wegiel J.** 2004. Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 25: 663–674.
- Nielsen HM, Mulder SD, Beliën JAM, Musters RJP, Eikelenboom P, Veerhuis R.** 2010. Astrocytic A $\beta$ 1-42 uptake is determined by A $\beta$ -aggregation state and the presence of amyloid-

- associated proteins. *Glia* **58**: 1235–1246.
- 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.
- Pekny M, Pekna M, Messing A, Stein??user C, Lee JM, Parpura V, Hol EM, Sofroniew M V., Verkhratsky A.** 2016. Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathol* **131**: 323–345.
- Pihlaja R, Koistinaho J, Malm T, Sikkilä H, Vainio S, Koistinaho M.** 2008. Transplanted astrocytes internalize deposited  $\beta$ -amyloid peptides in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Glia* **56**: 154–163.
- Ponath G, Ramanan S, Mubarak M, Housley W, Lee S, Sahinkaya FR, Vortmeyer A, Raine CS, Pitt D.** 2017. Myelin phagocytosis by astrocytes after myelin damage promotes lesion pathology. *Brain* **140**: 399–413.
- 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.
- Regen F, Hellmann-Regen J, Costantini E, Reale M.** 2017. Neuroinflammation and Alzheimer's Disease: Implications for Microglial Activation. *Curr Alzheimer Res* **14**: 1–1.
- Reinisch VM, Krause DL, Müller N.** 2014. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. In *Neuroinflammation and Neurodegeneration*, Vol. 9781493910 of, pp. 161–177.
- Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH.** 1997. Reactive astrocytes: Cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* **20**: 570–577.
- Robel S, Berninger B, Gotz M.** 2011. The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis. *Nat Rev Neurosci* **12**: 88–104.
- Rodríguez-Arellano JJ, Parpura V, Zorec R, Verkhratsky A.** 2016. Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience* **323**: 170–182.
- Roldán A, Gogg S, Ferrini M, Schillaci R, De Nicola AF.** 1997. Glucocorticoid regulation of in vitro astrocyte phagocytosis. *Biocell* **21**: 83–89.
- Saadoun S, Papadopoulos M, Watanabe H, Yan D, Manley GT, Verkman AS.** 2005. Involvement of aquaporin-4 in astroglial cell migration and glial scar formation. *J Cell Sci* **118**: 5691–5698.
- 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 A $\beta$  generation in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **132**: 1–22.
- Sanchez-Mejias 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-Díaz 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-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.
- Sarsoza F, Saing T, Kayed R, Dahlin R, Dick M, Broadwater-Hollifield C, Mobley S, Lott I, Doran E, Gillen D, et al.** 2009. A fibril-specific, conformation-dependent antibody recognizes a subset of A $\beta$  plaques in Alzheimer disease, Down syndrome and Tg2576 transgenic mouse brain. *Acta Neuropathol* **118**: 505–517.
- Sastre M, Klockgether T, Heneka MT.** 2006. Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: Molecular mechanisms. *Int J Dev Neurosci* **24**: 167–176.
- Scharfman HE, Binder DK.** 2013. Aquaporin-4 water channels and synaptic plasticity in the hippocampus. *Neurochem Int* **63**: 702–711.
- Scheib JL, Sullivan CS, Carter BD.** 2012. Jedi-1 and MEGF10 signal engulfment of apoptotic neurons through the tyrosine kinase Syk. *J Neurosci* **32**: 13022–31.
- Serrano-Pozo A, Betensky RA, Frosch MP, Hyman BT.** 2016. Plaque-associated local toxicity increases over the clinical course of Alzheimer disease. *Am J Pathol* **186**: 375–384.

- Serrano-Pozo A, Gómez-Isla T, Growdon JH, Frosch MP, Hyman BT. 2013a. A phenotypic change but not proliferation underlies glial responses in Alzheimer disease. *Am J Pathol* **182**: 2332–2344.
- Serrano-Pozo A, Muzikansky A, Gómez-Isla T, Growdon JH, Betensky R a, Frosch MP, Hyman BT. 2013b. Differential relationships of reactive astrocytes and microglia to fibrillar amyloid deposits in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **72**: 462–71.
- Simpson JE, Ince PG, Lace G, Forster G, Shaw PJ, Matthews F, Savva G, Brayne C, Wharton SB. 2010a. Astrocyte phenotype in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. *Neurobiol Aging* **31**: 578–590.
- Singh A, Abraham WC. 2017. Astrocytes and synaptic plasticity in health and disease. *Exp Brain Res*.
- Singh TD, Park SY, Bae J sung, Yun Y, Bae YC, Park RW, Kim IS. 2010. MEGF10 functions as a receptor for the uptake of amyloid- $\beta$  *FEBS Lett* **584**: 3936–3942.
- Skucas VA, Mathews IB, Yang J, Cheng Q, Treister A, Duffy AM, Verkman AS, Hempstead BL, Wood MA, Binder DK, et al. 2011. Impairment of Select Forms of Spatial Memory and Neurotrophin-Dependent Synaptic Plasticity by Deletion of Glial Aquaporin-4. *J Neurosci* **31**: 6392–6397.
- Sofroniew M V., Vinters H V. 2010. Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathol* **119**: 7–35.
- Sokolowski JD, Nobles SL, Heffron DS, Park D, Ravichandran KS, Mandell JW. 2011. Brain-specific angiogenesis inhibitor-1 expression in astrocytes and neurons: Implications for its dual function as an apoptotic engulfment receptor. *Brain Behav Immun* **25**: 915–921.
- Söllvander S, Nikitidou E, Brolin R, Söderberg L, Sehlin D, Lannfelt L, Erlandsson A. 2016. Accumulation of amyloid- $\beta$  by astrocytes result in enlarged endosomes and microvesicle-induced apoptosis of neurons. *Mol Neurodegener* **11**: 38.
- Suárez I, Bodega G, Fernández B. 2002. Glutamine synthetase in brain: Effect of ammonia. *Neurochem Int* **41**: 123–142.
- Szu JI, Binder DK. 2016. The Role of Astrocytic Aquaporin-4 in Synaptic Plasticity and Learning and Memory. *Front Integr Neurosci* **10**.
- Tansey FA, Cammer W. 1998. Differential uptake of dextran beads by astrocytes, macrophages and oligodendrocytes in mixed glial-cell cultures from brains of neonatal rats. *Neurosci Lett* **248**: 159–162.
- 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- $\beta$  Accumulation in A $\beta$ PP/PS1 Alzheimer's Disease Mice Subiculum. *J Alzheimers Dis* **42**: 521–541.
- Trujillo-Estrada L, Jimenez S, De Castro V, Torres M, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Navarro V, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mejias E, Davila JC, et al. 2013. In vivo modification of Abeta plaque toxicity as a novel neuroprotective lithium-mediated therapy for Alzheimer's disease pathology. *Acta Neuropathol Commun* **1**: 73.
- Ugbode C, Hu Y, Whalley B, Peers C, Rattray M, Dallas ML. 2017. Astrocytic transporters in Alzheimer's disease. *Biochem J* **474**: 333–355.
- Verkhatsky A, Parpura V, Pekna M, Pekny M, Sofroniew M. 2014. Glia in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Biochem Soc Trans* **42**: 1291–1301.
- Verkhatsky A, Zorec R, Rodriguez JJ, Parpura V. 2016. Astroglia dynamics in ageing and Alzheimer's disease. *Curr Opin Pharmacol* **26**: 74–79.
- Villarreal A, Seoane R, Torres AG, Roszczewski G, Angelo MF, Rossi A, Barkert PA, Ramos AJ. 2014. S100B protein activates a RAGE-dependent autocrine loop in astrocytes: Implications for its role in the propagation of reactive gliosis. *J Neurochem* **131**: 190–205.
- Wang Y, Cella M, Mallinson K, Ulrich JD, Young KL, Robinette ML, Gilfillan S, Krishnan GM, Sudhakar S, Zinselmeyer BH, et al. 2015. TREM2 Lipid Sensing Sustains the Microglial Response in an Alzheimer's Disease Model. *Cell* **160**: 1061–1071.
- Wegiel J, Wang KC, Imaki H, Rubenstein R, Wronska A, Osuchowski M, Lipinski WJ, Walker LC,



- LeVine H.** 2001a. The role of microglial cells and astrocytes in fibrillar plaque evolution in transgenic APPSW mice. *Neurobiol Aging* **22**: 49–61.
- Wilcock DM, Vitek MP, Colton CA.** 2009. Vascular amyloid alters astrocytic water and potassium channels in mouse models and humans with Alzheimer's disease. *Neuroscience* **159**: 1055–1069.
- Wu H-H, Bellmunt E, Scheib JL, Venegas V, Burkert C, Reichardt LF, Zhou Z, Fariñas I, Carter BD.** 2009. Glial precursors clear sensory neuron corpses during development via Jedi-1, an engulfment receptor. *Nat Neurosci* **12**: 1534–41.
- Wyss-Coray T.** 2006. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat Med* **12**: 1005–1015.
- Wyss-Coray T, Loike JD, Brionne TC, Lu E, Anankov R, Yan F, Silverstein SC, Husemann J.** 2003. Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med* **9**: 453–457.
- 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 a $\beta$  clearance and attenuates amyloid plaque pathogenesis. *J Neurosci* **34**: 9607–20.
- Xu Z, Xiao N, Chen Y, Huang H, Marshall C, Gao J, Cai Z, Wu T, Hu G, Xiao M.** 2015. Deletion of aquaporin-4 in APP/PS1 mice exacerbates brain A $\beta$  accumulation and memory deficits. *Mol Neurodegener* **10**: 58.
- Yang C, Huang X, Huang X, Mai H, Li J, Jiang T, Wang X, Lü T.** 2016. Aquaporin-4 and Alzheimer's Disease ed. G. Arendash. *J Alzheimer's Dis* **52**: 391–402.
- Yeh C, Vadhwana B, Verkhatsky A, Rodríguez JJ.** 2011. Early astrocytic atrophy in the entorhinal cortex of a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *ASN Neuro* **3**: 271–279.
- Yin K-J, Cirrito JR, Yan P, Hu X, Xiao Q, Pan X, Bateman R, Song H, Hsu F-F, Turk J, et al.** 2006. Matrix Metalloproteinases Expressed by Astrocytes Mediate Extracellular Amyloid-beta Peptide Catabolism. *J Neurosci* **26**: 10939–10948.
- 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* **90**: 724–739.
- Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, Barres BA.** 2012. Genomic Analysis of Reactive Astroglia. *J Neurosci* **32**: 6391–6410.
- Zeppenfeld DM, Simon M, Haswell JD, D'Abreo D, Murchison C, Quinn JF, Grafe MR, Woltjer RL, Kaye J, Iliff JJ.** 2017. Association of Perivascular Localization of Aquaporin-4 With Cognition and Alzheimer Disease in Aging Brains. *JAMA Neurol* **74**: 91.
- Zhang F, Jiang L.** 2015. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat* **9781493910**: 243.



## 3.2

ESTUDIO DE LA MICROGLÍA  
ACTIVADA EN EL HIPOCAMPO  
DEL MODELO APP/PS1

## INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso central (SNC) cuenta con un sistema inmune propio en el que las células mieloides residentes o células microgliales constituyen el 10% del total celular. Estas células de la microglía no sólo participan en la lucha contra los posibles patógenos sino que además llevan a cabo funciones esenciales como el mantenimiento de la homeostasis, el establecimiento y maduración de los circuitos neuronales, la remodelación y plasticidad sináptica o la fagocitosis de células apoptóticas (Prinz and Priller 2014; Wu et al. 2015; Schafer and Stevens 2015; Crotti and Ransohoff 2016; Wolf et al. 2017). En respuesta a un daño o evento patológico, la microglía posee la capacidad de migrar hacia la zona dañada e iniciar una cascada de señales que conducen a una respuesta inflamatoria controlada cuyo fin es restaurar las condiciones fisiológicas óptimas (Salter and Stevens 2017). Sin embargo, cuando el daño o agente patológico desencadenante de la respuesta inflamatoria permanece de manera prolongada en el parénquima nervioso, la neuroinflamación se cronifica y las células microgliales activadas liberan grandes cantidades de citoquinas pro-inflamatorias y especies reactivas de oxígeno (Sochocka et al. 2016). En la enfermedad de Alzheimer la activación microglial podría ayudar a restringir la patología amiloide (mediante fagocitosis y compactación de las placas) en las fases iniciales, sin embargo, en fases más avanzadas la función microglial podría perder eficacia o incluso volverse perjudicial contribuyendo a la neurotoxicidad. Así, la identificación de polimorfismos en genes microgliales asociados con un aumento del riesgo de padecer Alzheimer esporádico, como TREM2 o CD33, avalan el papel crucial de la microglía en la patogénesis de la EA, aunque aún se desconoce la función protectora o citotóxica de estas células gliales (Korvatska et al. 2015; Colonna and Wang 2016; Huang et al. 2017). En la EA, el receptor TREM2 está implicado en el proceso de microgliosis inducido por A $\beta$ , así como en la eliminación de A $\beta$  (Wang et al. 2015). En ausencia de TREM2, no se produce activación microglial. En el modelo transgénico 5xFAD, la deficiencia de TREM2 da lugar a un aumento de la acumulación de A $\beta$  como consecuencia de una respuesta microglial defectuosa (Wang et al. 2016). Por tanto, una deficiente actividad microglial neuroprotectora, en lugar de un fenotipo activado citotóxico, podría ser responsable de la progresión de la patología del Alzheimer.

En este sentido, nuestro grupo ha descrito recientemente que, a diferencia de lo que ocurre en los modelos transgénicos amiloidogénicos, en el hipocampo de los pacientes de Alzheimer existe una activación microglial muy limitada (exclusivamente rodeando las placas amiloides) y lo que es más importante, hay un proceso de degeneración microglial siguiendo un patrón regional (giro dentado>CA3>CA1) (Sanchez-Mejias et al. 2016). Este proceso degenerativo incluye la pérdida de microglía, así como la presencia de microglía patológica con prolongaciones fragmentadas, distróficas, desramificación, etc., conllevando a una reducción del dominio microglial (área que cada célula microglial se encarga de vigilar y proteger) y, consecuentemente, de la protección inmunológica del hipocampo. Estos datos difieren notablemente con los resultados obtenidos en modelos animales, donde la microglía sufre un fuerte proceso de activación, y no de degeneración, que progresa en paralelo a la patología amiloide (Drummond and Wisniewski 2017). Resultados previos de nuestro grupo de investigación en el hipocampo del modelo APP/PS1 demostraron la existencia de un cambio fenotípico de la microglía dependiente de la edad (Jimenez et al. 2008). A edades tempranas (4-6 meses), en las etapas iniciales de la patología amiloide, las células microgliales activadas se localizan alrededor de las placas amiloide y adoptan un fenotipo de activación alternativo con capacidad fagocítica y productor de factores neurotróficos (IGF1), sin embargo, a edades avanzadas (18 meses de edad) y coincidente con un aumento de los niveles de amiloide oligomérico soluble (Jimenez et al. 2011), se produce la activación de la microglía interplaca, con un fenotipo clásico o citotóxico caracterizado por la producción de citoquinas pro-inflamatorias (TNF $\alpha$ ). Estos resultados indican que los modelos amiloidogénicos desarrollan una fuerte activación microglial que progresa con el avance de la patología amiloide, no recapitulando por tanto la patología microglial observada en los pacientes. De estos resultados se deduce la necesidad de reproducir en estos modelos animales la disfunción/degeneración microglial con objeto de aumentar su valor predictivo para evaluar tratamientos eficaces en humanos.

En relación al agente tóxico causante de la degeneración microglial en los pacientes de Alzheimer, los resultados de nuestro grupo revelan que se trata de fosfo-tau soluble (Sanchez-Mejias et al. 2016); los experimentos *in vitro* corroboraron la toxicidad de las fracciones solubles ricas en estas formas tóxicas de tau procedentes de hipocampo de individuos Braak V-VI sobre la microglía en cultivo. Los estudios de inmunodepleción de estas fracciones solubles con anticuerpos específicos demostraron que era fosfo-tau y no A $\beta$  el agente tóxico. Es más, las fracciones solubles de hipocampo de ratones APP/PS1 no producían ningún efecto sobre la microglía en cultivo, mientras que las procedentes de un modelo tau (Thy-tau22) eran altamente tóxicas. Por tanto, la ausencia de fosfo-tau soluble en animales APP/PS1 explicaría la ausencia de degeneración microglial en estos modelos amiloidogénicos.

Las consecuencias de esta degeneración microglial en pacientes de Alzheimer sobre la evolución de la patología no son conocidas en la actualidad. El conocimiento más profundo sobre las modificaciones patológicas que sufren tanto la microglía (como la astrogliá) son

fundamentales para explicar los procesos patológicos que se desarrollan durante la enfermedad y se postulan como un aspecto principal antes de poder abordar cualquier nueva estrategia terapéutica.

En base a todo lo expuesto, en este capítulo de resultados se analizó a nivel celular y subcelular la respuesta microglial y su implicación en la progresión de la patología en el hipocampo del modelo APP/PS1. Estos resultados se compararon además con los obtenidos en muestras *post mortem* de pacientes de Alzheimer.

## RESULTADOS

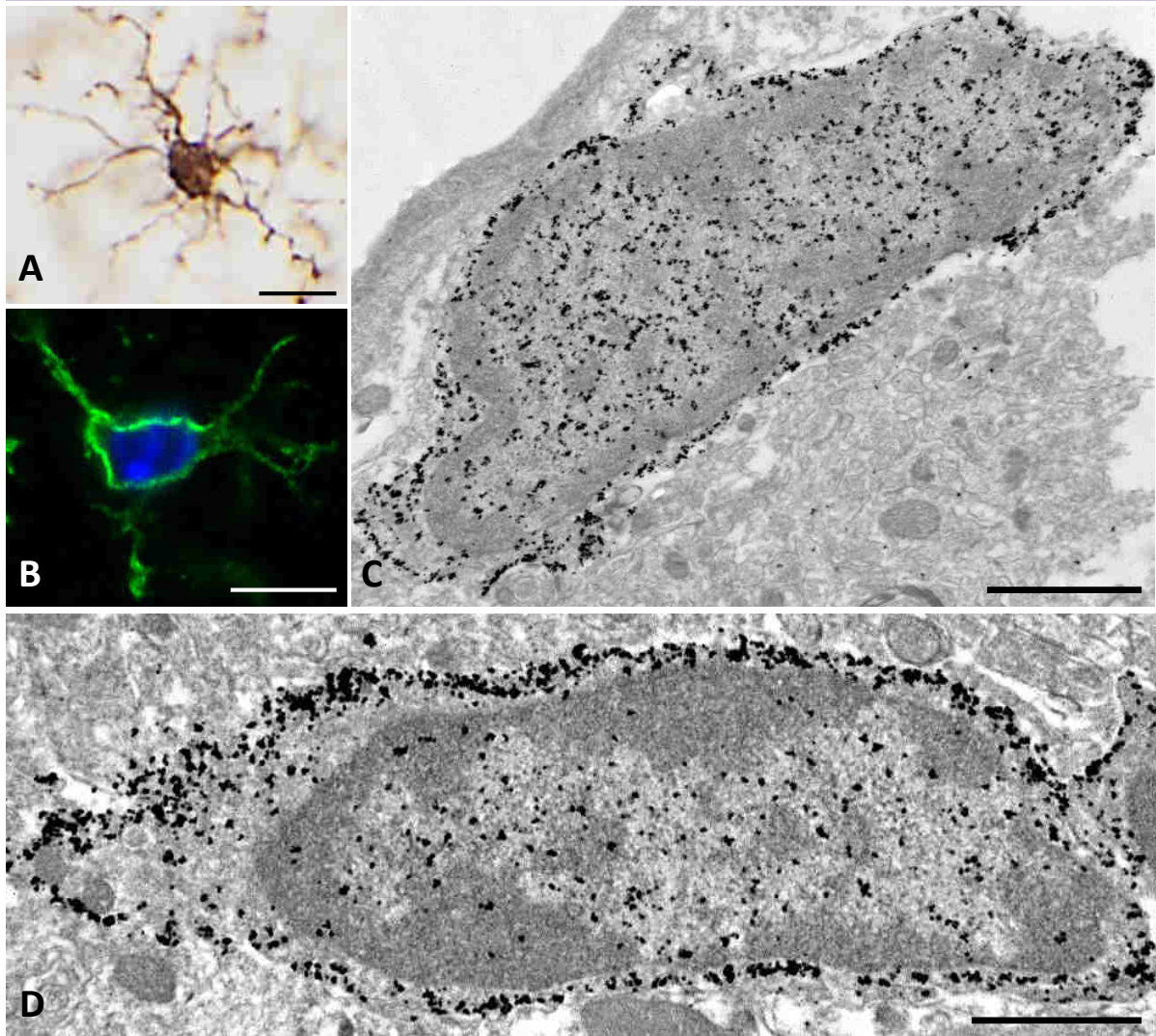
### 3.2.1. La microglía activada se localiza rodeando el centro fibrilar denso de las placas amiloides

El marcador Iba1 (del inglés “*ionized calcium binding adapter molecule*”) es el más ampliamente utilizado para identificar células microgliales mediante inmunotinción. Además de utilizar este marcador para visualizar la microglía a microscopía óptica de campo claro y microscopía confocal, ha sido una herramienta clave para la caracterización ultraestructural de esta población glial a microscopía electrónica de transmisión (Fig. 3.2.1). La inmuno-oro con Iba1 resultó muy específica, localizándose las partículas de oro asociadas preferentemente con la membrana plasmática, aunque también se detectaron algunas partículas en el citoplasma y en la eucromatina nuclear.

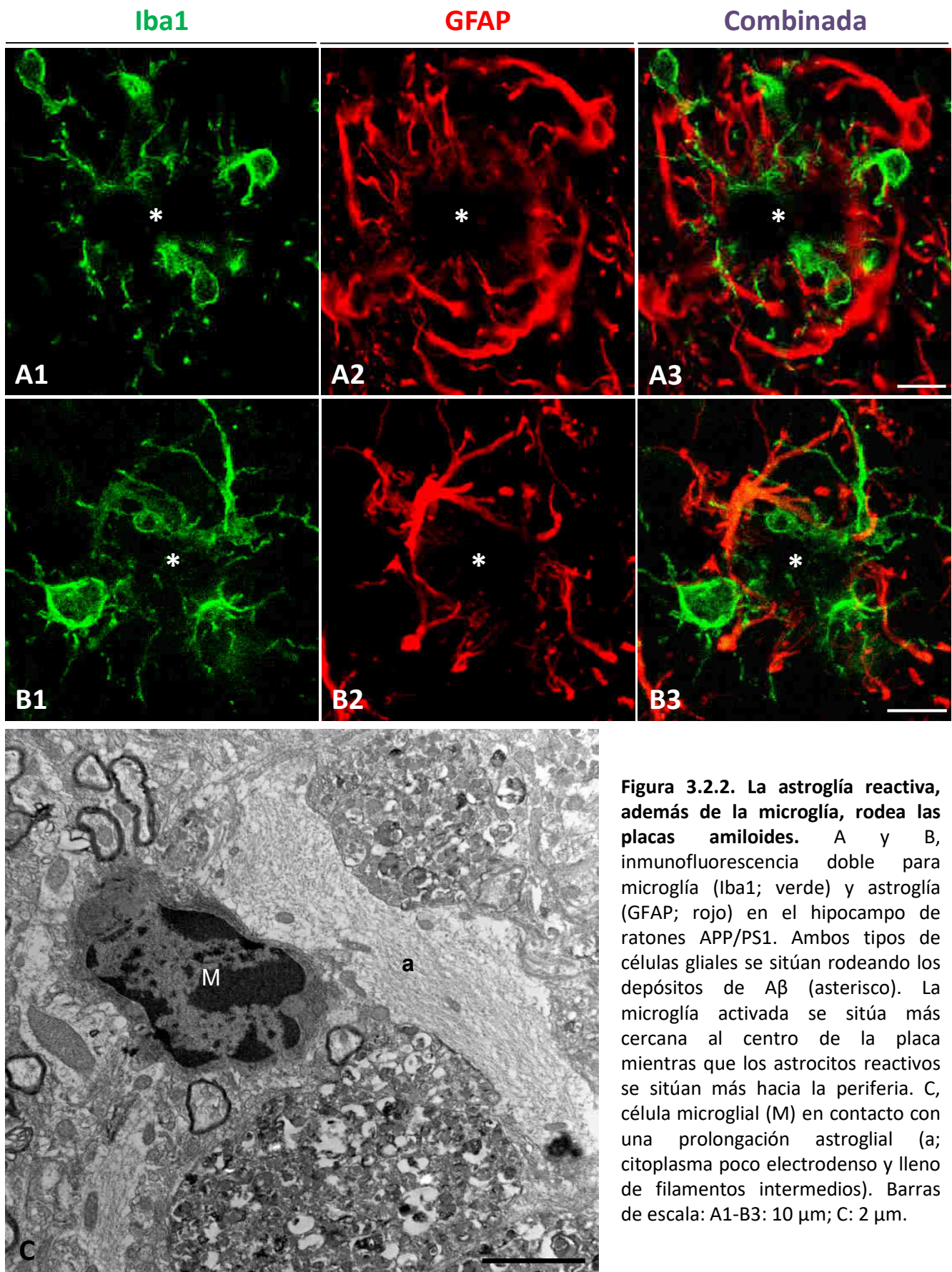
Para estudiar la respuesta microglial en el modelo APP/PS1, analizamos en primer lugar el patrón de distribución de las células microgliales en el hipocampo de ratones de 6 meses de edad mediante inmunoperoxidasa con anti-Iba1. Las células de la microglía se distribuyeron homogéneamente por toda la región hipocampal (Fig. 3.2.3A), sin embargo, la microglía activada se concentró en pequeños acúmulos correspondientes a las placas amiloides (ver detalle en A1). Puesto que Iba1 se expresa tanto en la microglía no activada como en la activada, fue necesario emplear un marcador específico de activación microglial como es CD45. La inmunotinción con anti-CD45 puso de manifiesto exclusivamente a la microglía activada y localizada alrededor de los depósitos de A $\beta$  (Fig. 3.2.3B). Las imágenes de detalle A2 y B2 (Fig. 3.2.3) ponen de manifiesto las diferencias morfológicas entre una célula microglial quiescente (en reposo) y otra activada, respectivamente. La microglía no reactiva se caracterizó por tener el cuerpo celular de pequeño tamaño con numerosas ramificaciones y prolongaciones muy finas y alargadas. En el estado activado, sin embargo, presentó un cuerpo celular hipertrófico y engrosado, con acortamiento y pérdida de prolongaciones. El estudio a microscopía confocal de secciones doblemente marcadas para Iba1 y Tioflavina-S permite ver una estrecha asociación de las células microgliales con las placas amiloides, rodeando completamente el centro fibrilar de las placas (Fig. 3.2.3C1-C3).



## IBA1

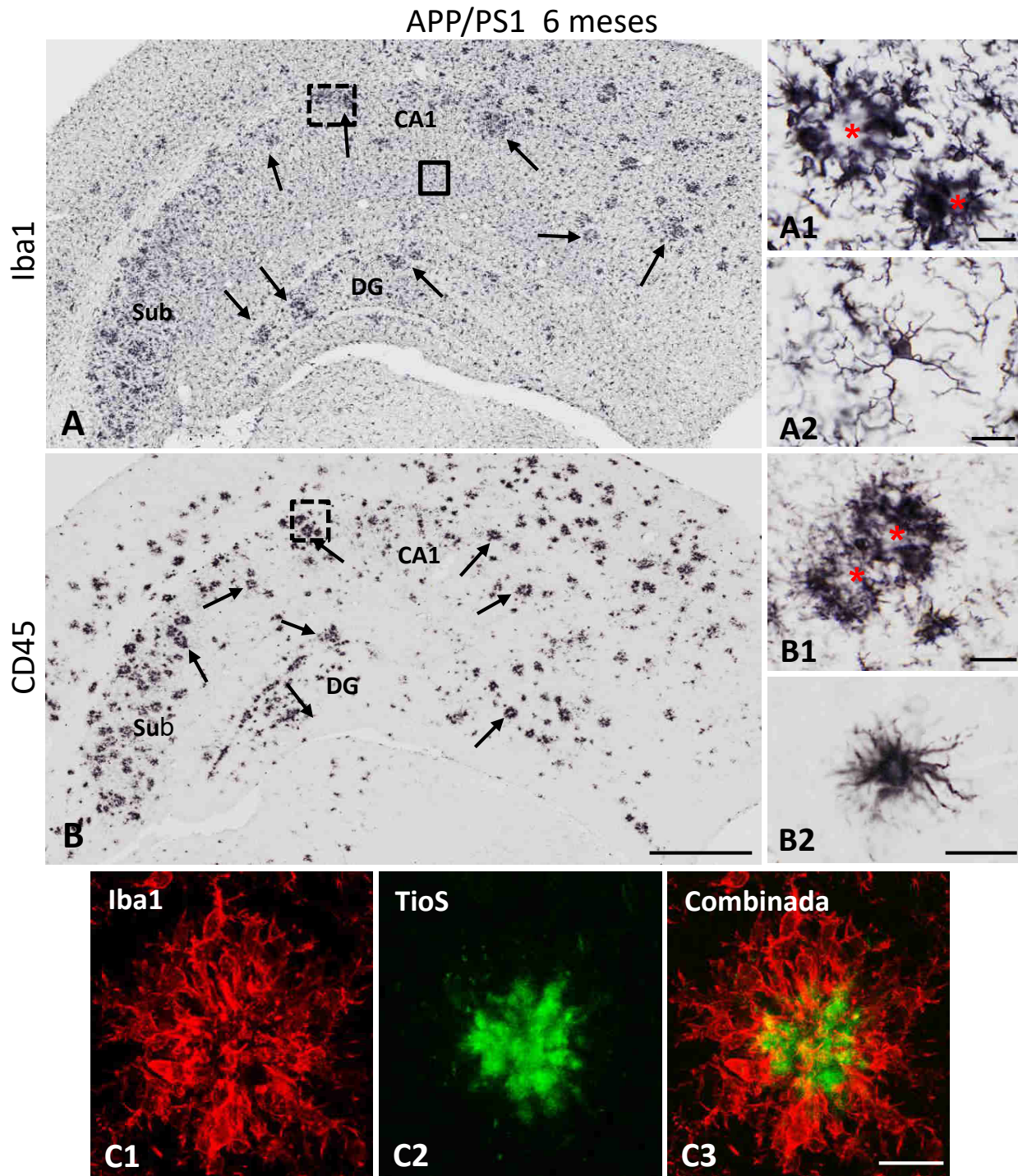


**Figura 3.2.1. Inmunomarcaje con anti-Iba1 para la identificación de células microgliales a microscopía óptica y electrónica.** A, célula microglial teñida mediante la técnica de inmunoperoxidasa mostrando marcaje en el cuerpo y en prolongaciones. B, inmunofluorescencia para Iba1 (verde) combinada con tinción nuclear con DAPI (azul). C y D, marcaje a microscopía electrónica de transmisión con la técnica de inmuno-oro; las partículas de oro se localizan de forma preferente asociadas a la membrana plasmática aunque también se detectan en el citoplasma y en el núcleo. Barras de escala: A: 10  $\mu\text{m}$ ; B: 5  $\mu\text{m}$ ; C-D: 1  $\mu\text{m}$ .



**Figura 3.2.2.** La astrogliá reactiva, además de la microglía, rodea las placas amiloides. A y B, inmunofluorescencia doble para microglía (Iba1; verde) y astrogliá (GFAP; rojo) en el hipocampo de ratones APP/PS1. Ambos tipos de células gliales se sitúan rodeando los depósitos de A $\beta$  (asterisco). La microglía activada se sitúa más cercana al centro de la placa mientras que los astrocitos reactivos se sitúan más hacia la periferia. C, célula microglial (M) en contacto con una prolongación astrogliá (a; citoplasma poco electrodensó y lleno de filamentos intermedios). Barras de escala: A1-B3: 10  $\mu$ m; C: 2  $\mu$ m.





**Figura 3.2.3. La microglía activada se localiza específicamente rodeando las placas amiloides.** Inmunohistoquímica para Iba1 (A) y para CD45 (B) en el hipocampo de ratones APP/PS1 de 6 meses de edad. Se observan numerosos acúmulos de microglía (flechas) por toda la región. Iba1 es marcador de la microglía activada y no activada, sin embargo CD45 es un marcador específico de activación microglial. En A1 y B1 se muestra a mayores aumentos grupos de células microgliales activadas rodeando placas amiloides (asteriscos). En A2 se muestra una célula microglial no activada (Iba1-positiva), mientras en B2 se muestra una célula activada (CD45-positiva). C, doble marcaje fluorescente para Iba1 (rojo) y Tioflavina S (verde) a microscopía láser confocal. Barras de escala: A-B: 500  $\mu$ m; A1-C3: 20  $\mu$ m.

Como hemos descrito previamente, en el capítulo 3.1 de Resultados, las placas amiloides también están rodeadas de astrogliá reactiva. Por ello, con el objetivo de establecer si existen diferencias en la localización espacial de estas células en torno a las placas de A $\beta$ , se llevó a cabo un marcaje doble fluorescente para microglía (Iba1) y astrogliá (GFAP) en el hipocampo de animales doble transgénicos APP/PS1 (Fig. 3.2.2). Se observó así que la microglía se encuentra en la zona más interna y cercana al núcleo fibrilar de la placa. Los astrocitos, por otra parte, se localizan de manera más periférica que las células de la microglía. Sin embargo y aunque el cuerpo celular de los astrocitos se encuentra más alejado del núcleo fibrilar de las placas, las prolongaciones astrogliales se entremezclan con la microglía hasta contactar este centro fibrilar de A $\beta$ .

En resumen, la acumulación extracelular de amiloide induce una fuerte activación de la microglía y de la astrogliá. Ambos tipos gliales reactivos presentan una localización espacial diferencial, estando la microglía en contacto más íntimo con el núcleo fibrilar denso de las placas.

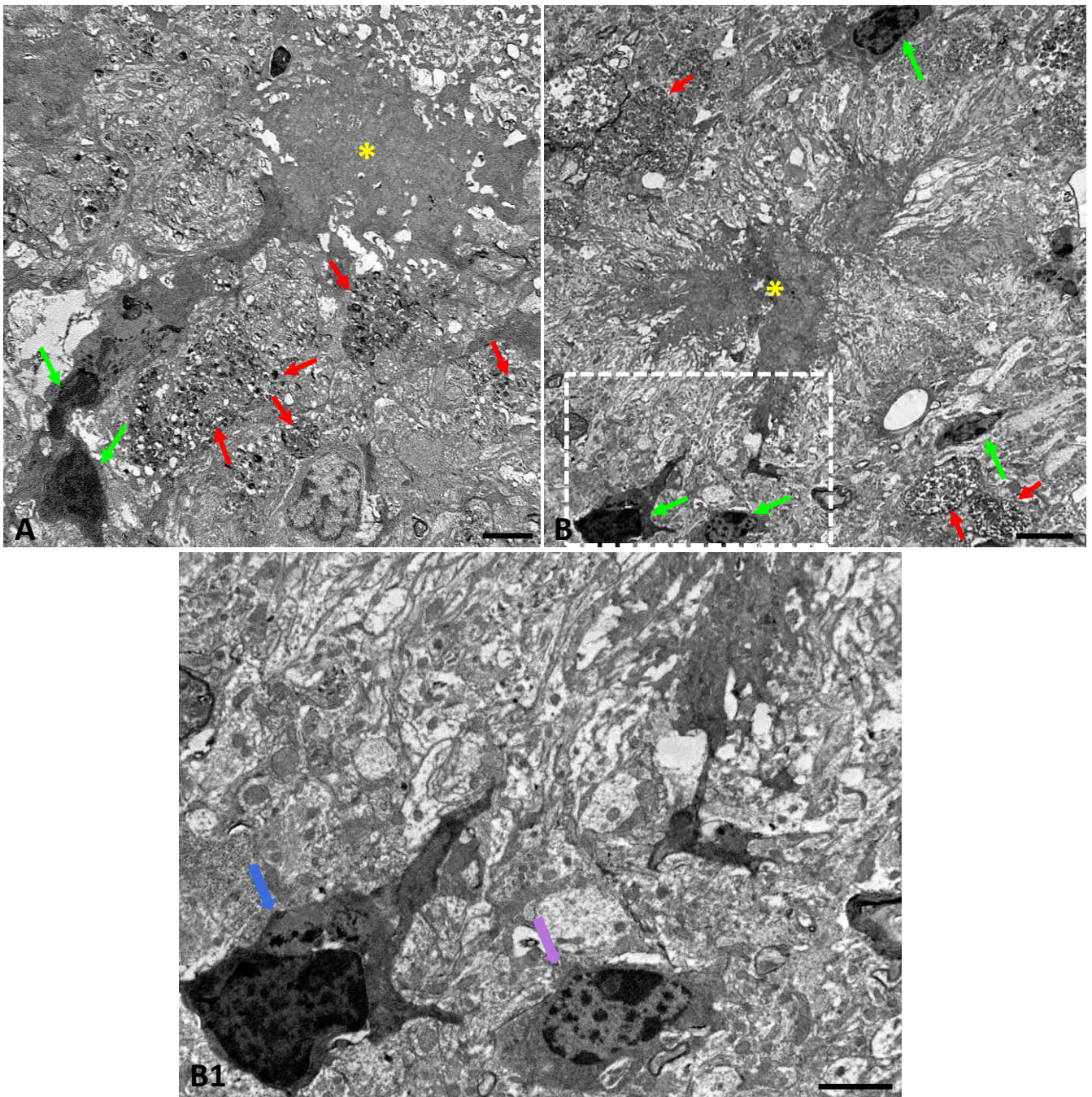
### 3.2.2. El estudio ultraestructural de la microglía activada que rodea las placas amiloides revela subpoblaciones funcionales distintas

El estudio ultraestructural del hipocampo de animales APP/PS1 de 12 meses de edad mostró numerosas células microgliales situadas en la periferia de placas extracelulares de A $\beta$ . Estas células, caracterizadas por tener el citoplasma moderadamente electrodenso, se disponían de manera muy cercana al núcleo fibrilar de la placa y además dirigían sus prolongaciones hacia las fibrillas de  $\beta$ -amiloide (Fig. 3.2.4). Sorprendentemente, y a pesar de la naturaleza fagocítica de la microglía, no se observó una relación estrecha con las neuritas distróficas que también rodean las placas amiloides (para más detalle, ver Apdo. 3.1.5). En la periferia de los depósitos amiloides se identificaron ultraestructuralmente al menos dos tipos morfológicos diferentes (Fig. 3.2.4 y 3.2.5): células de elevada electrodensidad, denominadas por otros autores como microglía oscura (del inglés "dark microglía", ver Bisht et al. 2016), así como otras células microgliales cuya electrodensidad era mucho menor. Las células microgliales de moderada electrodensidad presentaban numerosas cisternas de retículo endoplasmático rugoso (Fig. 3.2.5A), mientras las células microgliales de elevada electrodensidad, tanto en el núcleo como en el citoplasma, presentaban normalmente fagolisosomas en su citoplasma (Fig. 3.2.5B-E). Estos datos sugieren diferencias fenotípicas funcionales, de forma que las células poco electrodensas muestran un perfil más biosintético mientras que las más electrodensas poseen características fagocíticas.

Todos estos datos indican que la activación microglial se asocia con los depósitos de amiloide en el hipocampo de animales APP/PS1 de 12 meses, y que existen diferentes poblaciones funcionales identificables a nivel ultraestructural.

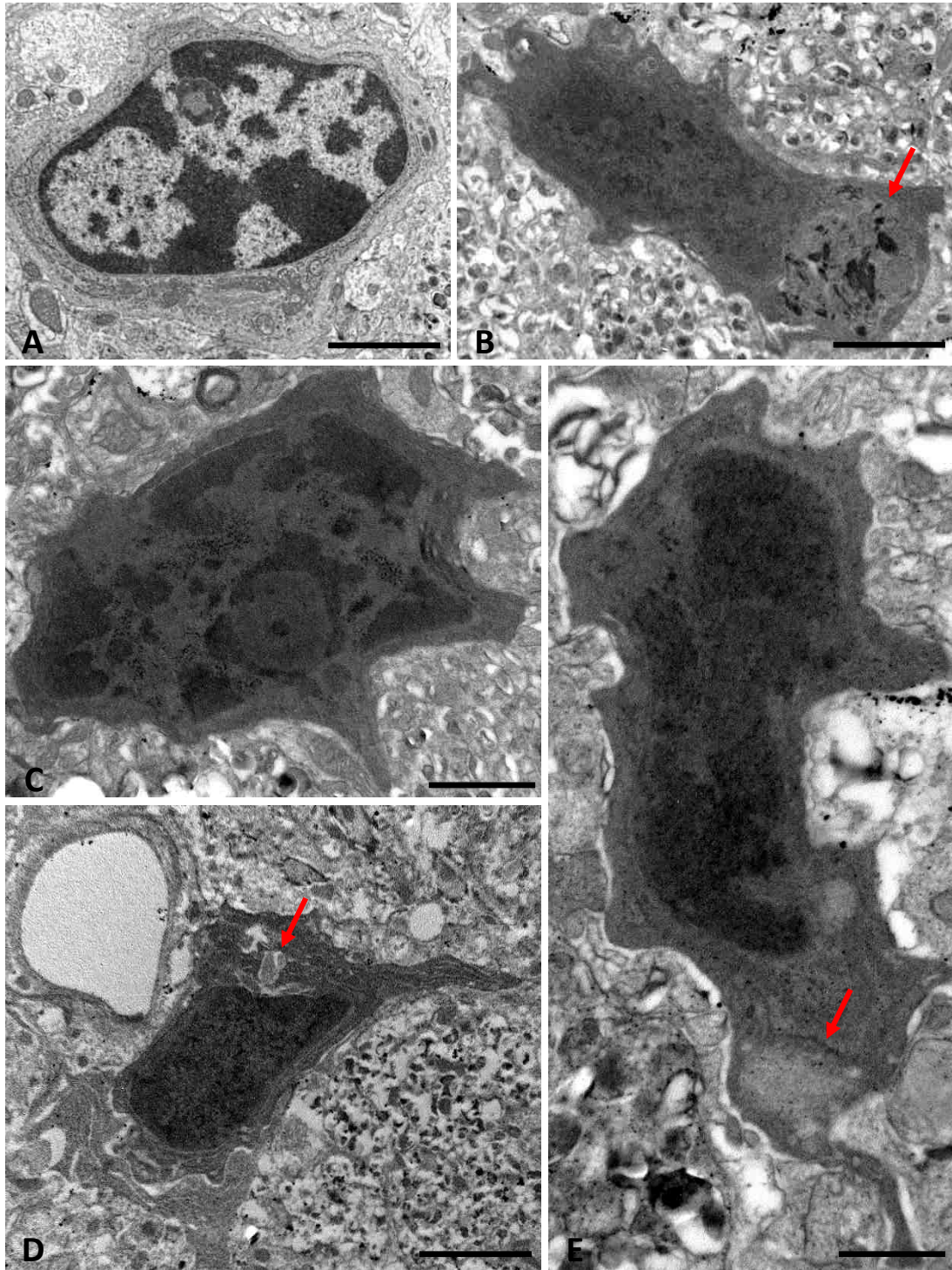


## Relación placa-microglía



**Figura 3.2.4. Estudio ultraestructural de la microglía en el hipocampo del modelo transgénico APP/PS1.** Microscopía electrónica de transmisión. A y B son imágenes representativas de placas neuríticas en el hipocampo de animales de 12 meses de edad. Se observan varias células microgliales (flechas verdes) caracterizadas por un citoplasma electrodensito y con prolongaciones que se extienden (ver detalle en B1) hacia la placa amiloide (asterisco amarillo). En B1 se identifican células microgliales con distintas características, una muy electrodensa (flecha azul) y otra de menor electrodensidad (flecha violeta). Las flechas rojas señalan a neuritas distróficas alrededor de las placas. Barras de escala: A y B1: 2  $\mu\text{m}$ ; B: 5  $\mu\text{m}$ .



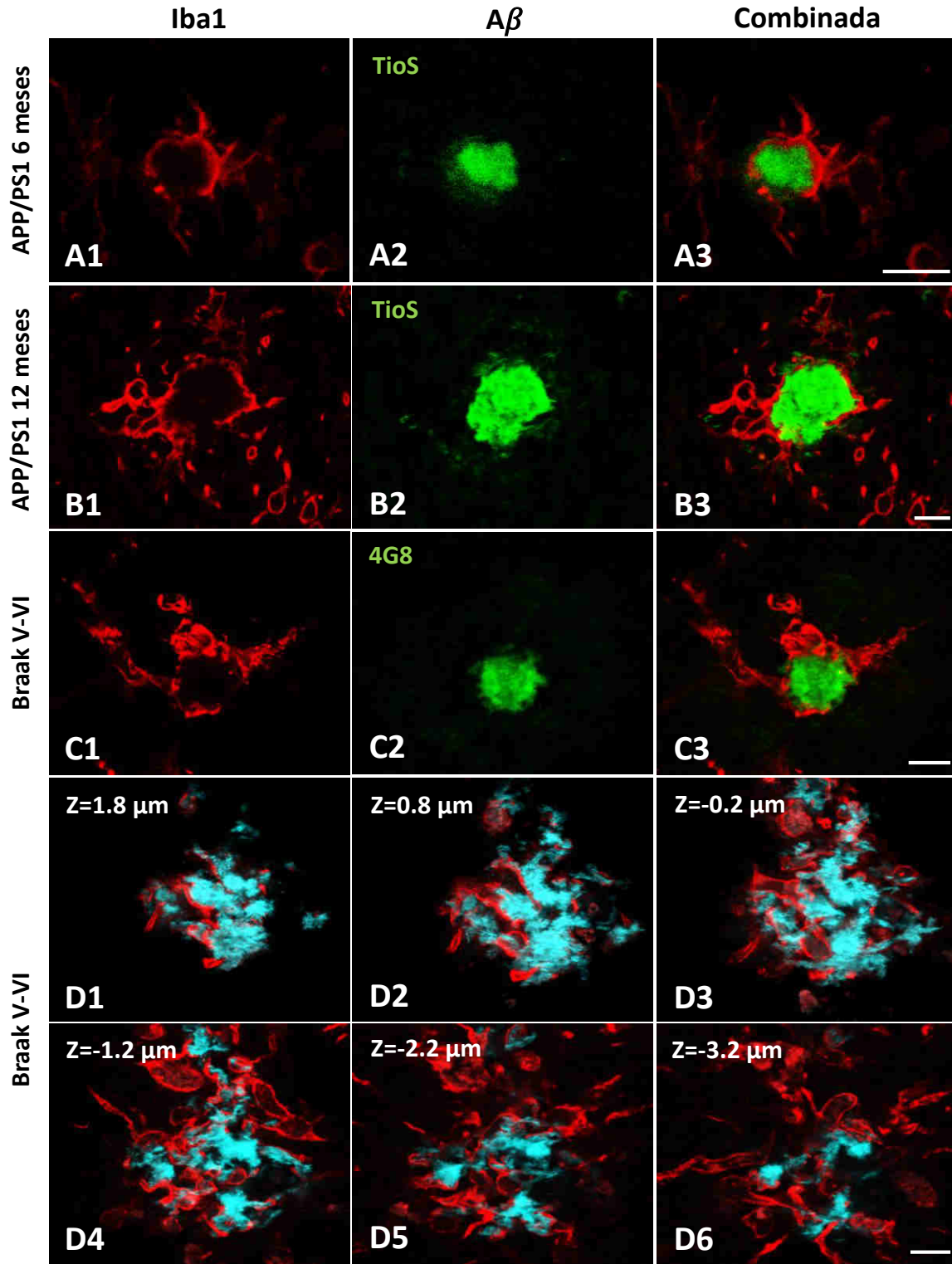


**Figura 3.2.5. Diversidad ultraestructural de la microglía.** A, microglia de electrodensidad moderada y citoplasma rico en retículo endoplasmico rugoso. B-E, diferentes ejemplos de células microgliales caracterizadas por una elevada electrodensidad de su núcleo y citoplasma, así como presencia de fagolisosomas (flechas rojas). Barras de escala: A, B y D: 2  $\mu\text{m}$ ; C: 1  $\mu\text{m}$ ; E: 0,5  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.3 La microglía activada parece participar en la formación/compactación de las placas amiloides

Para poder analizar en detalle la naturaleza de la relación entre la microglía y los depósitos amiloides, se realizaron diversos marcajes dobles fluorescentes para microglía (Iba1) y A $\beta$  (TioS o 4G8) en el hipocampo de animales APP/PS1 a 6 y 12 meses de edad y en muestras humanas *post mortem* en estadio Braak V-VI (pacientes dementes). Como se muestra en las imágenes de la Figura 3.2.6, el núcleo compacto y fibrilar de los depósitos amiloides se encuentra totalmente rodeado y en estrecho contacto por prolongaciones microgliales, tanto en el modelo APP/PS1 como en las muestras de pacientes de Alzheimer. La serie de imágenes de diferentes planos confocales (Fig. 3.2.6D1-D6) nos permite visualizar mejor la interacción microglía-placa a lo largo de su estructura tridimensional, observando que la microglía rodea y contacta los depósitos amiloides en todos sus niveles. El marcaje de Iba1 mediante inmunoro a microscopía electrónica de transmisión permitió un análisis en mayor detalle del íntimo contacto entre la microglía y las fibrillas amiloides (Fig. 3.2.7). Así, en la imagen A de la Figura 3.2.7 se muestra una célula microglial proyectando su prolongación hacia un pequeño agregado amiloide. A mayores aumentos se observa el inmunomarcaje de Iba1 a lo largo de toda la membrana plasmática microglial, lo que nos permite seguir y visualizar cómo las extensiones celulares se interdigitan con las fibrillas amiloides (de mayor electrodensidad que el citoplasma microglial) en la región periférica de la placa (ver detalles en Fig. 3.2.7B).

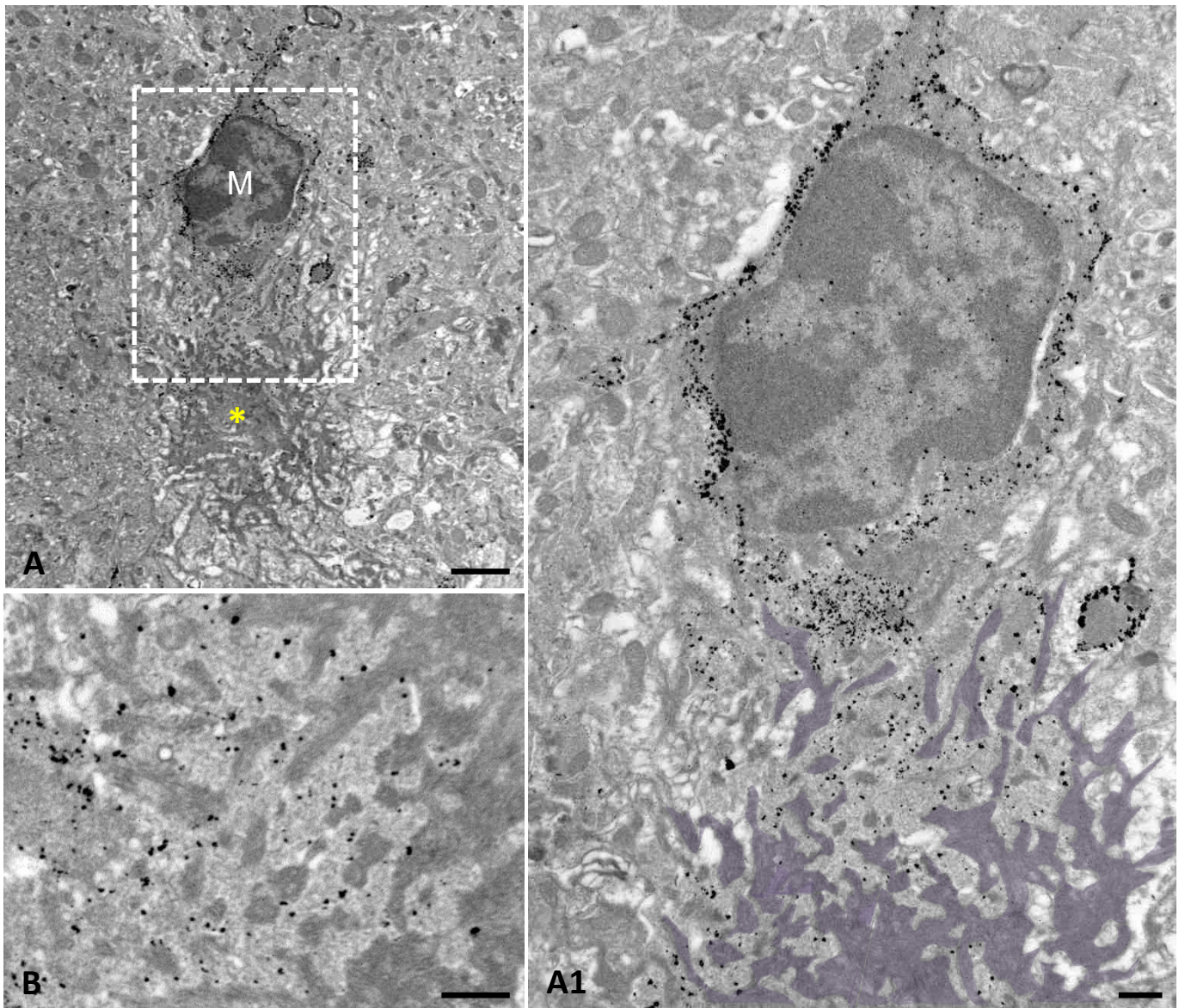
Para asegurarnos de la naturaleza amiloide de las fibrillas que irradian de la periferia de la placa, y además así diferenciar con claridad las porciones microgliales de las fibrillas amiloides, se analizó la distribución diferencial de Iba1 y OC (anticuerpo que reconoce las formas oligoméricas pre-fibrilares de A $\beta$ , y que se localizan preferentemente en la periferia de la placa). El citoplasma microglial (inmunopositivo para Iba1) aparecía rodeando completamente los haces de fibrillas que irradiaban del depósito amiloide (Fig. 3.2.8A1-A3). Esta región central de los depósitos de A $\beta$  se distingue a nivel ultraestructural por su aspecto fibrilar (ver detalle a grandes aumentos) y ser más electrodensa que el citoplasma microglial (moderadamente electrodenso) y el astrogial (de baja electrodensidad). El inmunomarcaje para OC se encontró asociado a lo que hemos identificado como fibrillas amiloides (Fig. 3.2.8B1-B2 y Fig. 3.2.9B-B2) localizadas fundamentalmente en la periferia de las placas, tal y como evidencian las imágenes de fluorescencia doble para A $\beta$  oligomérico (OC) y fibrilar (Tioflavina-S), donde el centro fibrilar de la placa es negativo para OC (Fig. 3.2.9A1-A3). Por tanto, el inmunomarcaje con el anticuerpo OC demostró que el Abeta oligomérico se localiza rodeando el componente fibrilar de las placas en nuestro modelo APP/PS1, y que las estructuras filamentosas que se observan al electrónico que irradian de las mismas son de hecho fibrillas amiloides.



**Figura 3.2.6. Estrecha relación entre la microglía activada y el núcleo fibrilar de las placas amiloides.** Marcaje fluorescente doble Iba1-TioS (A1-A3 y B1--B3) e Iba1-4G8 (C1-C3 y D1-D6) en hipocampo de ratones APP/PS1 de 6 (A1-A3) y 12 (B1-B3) meses de edad y en muestras humanas *post mortem* en estadio Braak V-VI (C1-C3 y D1-D6). El centro fibrilar compacto de las placas amiloides está totalmente rodeado por prolongaciones microgliales tanto en modelos animales como en pacientes de Alzheimer. Barras de escala: A1-D6: 10  $\mu$ m.

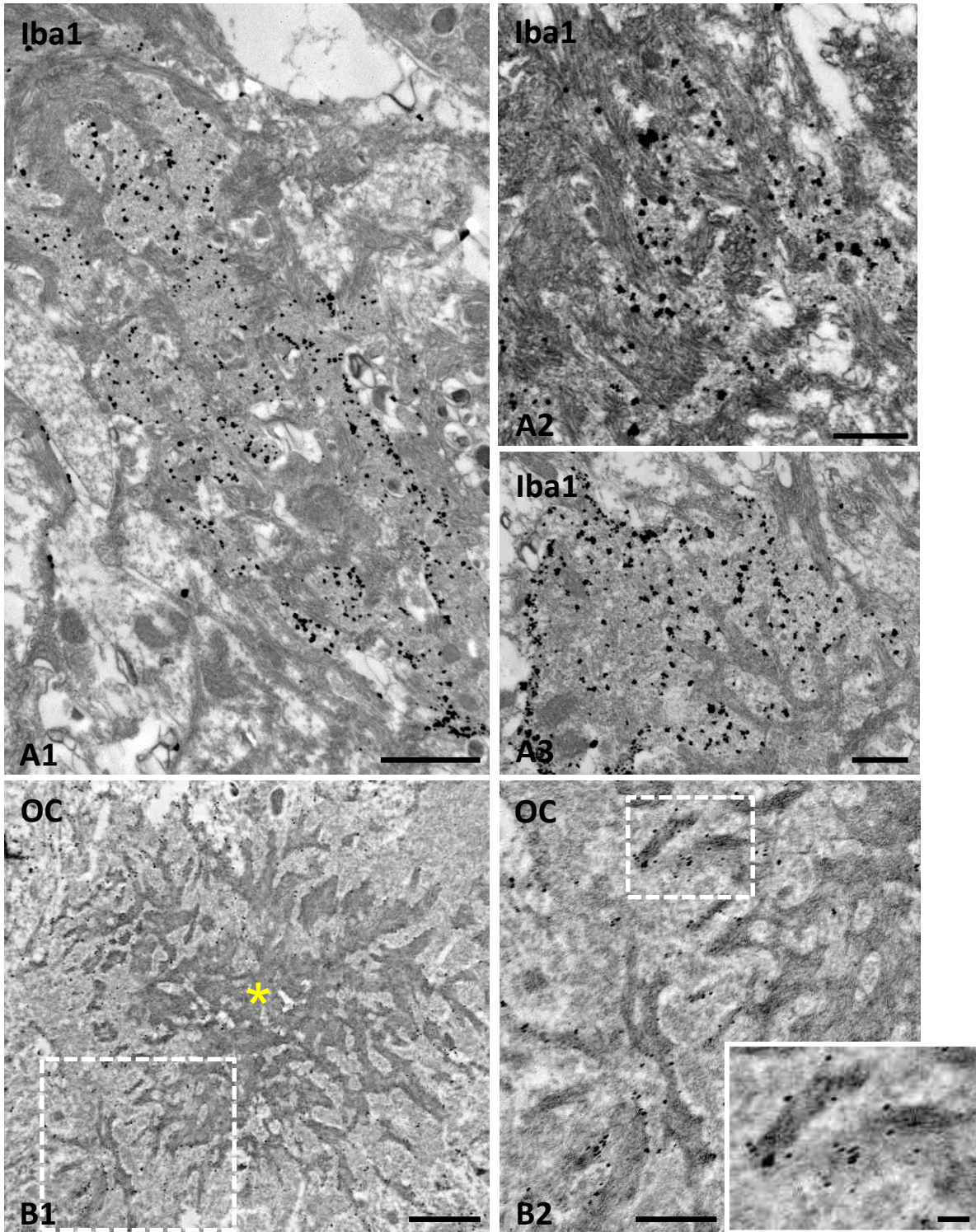


## Iba1



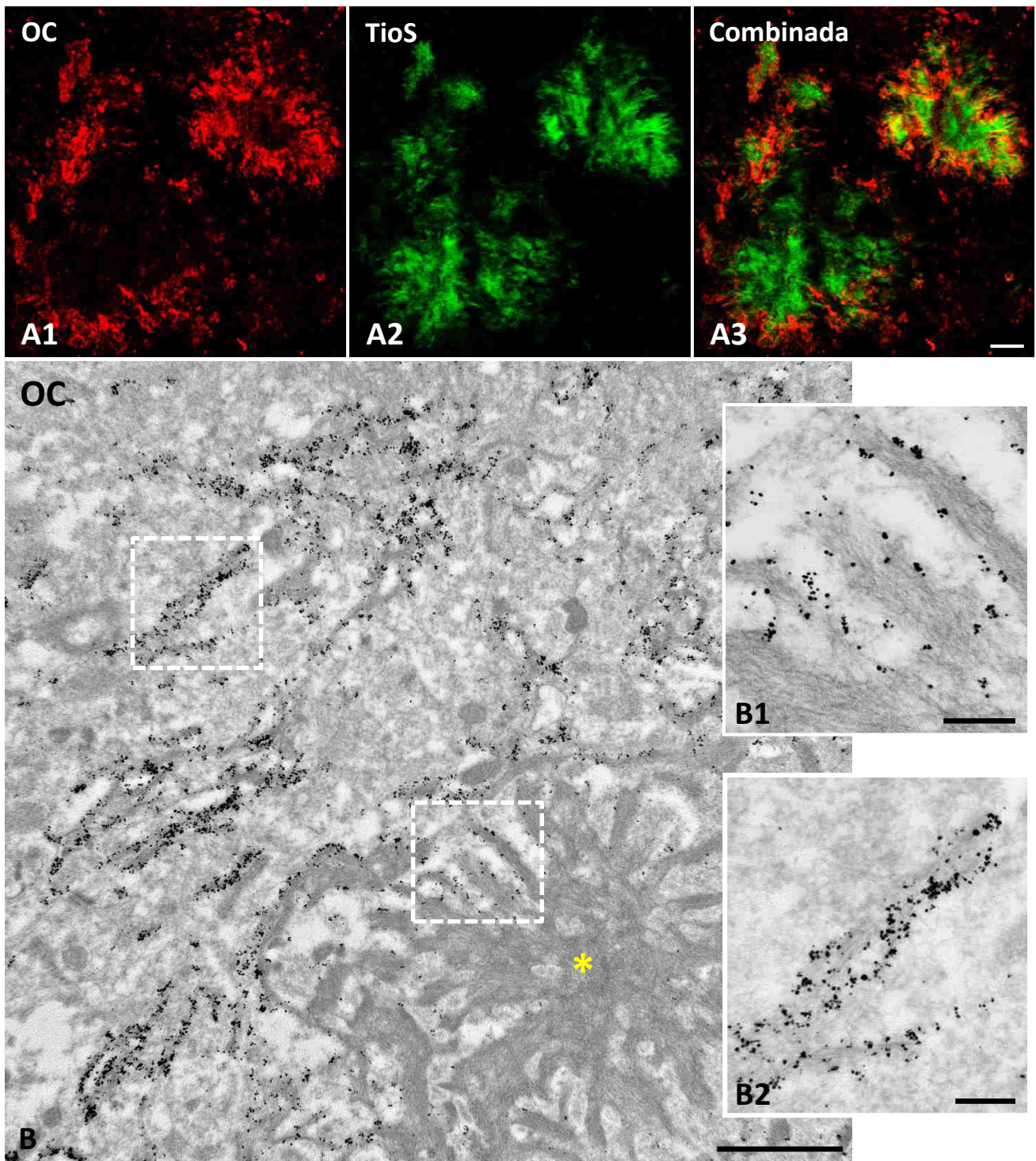
**Figura 3.2.7. El citoplasma microglial se entremezcla con las fibrillas amiloides de las placas.** Inmuno-oro para Iba1 a microscopía electrónica de transmisión. A, célula microglial (M) en contacto con un pequeño núcleo amiloide (asterisco). A1, detalle a mayores aumentos de la zona recuadrada en A donde se observa como la célula microglial (citoplasma marcado con partículas de oro) se interdigita con las fibrillas de amiloide (coloreadas en morado). B, detalle de la zona de interacción entre la microglía y las fibrillas, donde se identifica el citoplasma microglial por la presencia de partículas de oro coloidal. Barras de escala: A: 2  $\mu\text{m}$ ; A1-B: 0,5  $\mu\text{m}$ .





**Figura 3.2.8. Marcaje diferencial de microglía y de A $\beta$  a microscopía electrónica de transmisión.** Inmuno-oro para Iba1 (microglía; A1-A3) y para OC (A $\beta$  oligomérico; B1-B2) en el hipocampo de ratones APP/PS1. Las regiones inmunopositivas para Iba1 se corresponden con el citoplasma microglial, mientras que el marcaje para OC se localiza en las fibrillas amiloides (asterisco), de aspecto más electrodenso que el citoplasma microglial. Ambos marcadores permiten diferenciar la parte microglial de las fibrillas amiloides, estrechamente entremezcladas. Barras de escala: A1, B1: 1  $\mu$ m; A2-A3 y B2: 0,5  $\mu$ m; Inserto en B2: 0,1  $\mu$ m





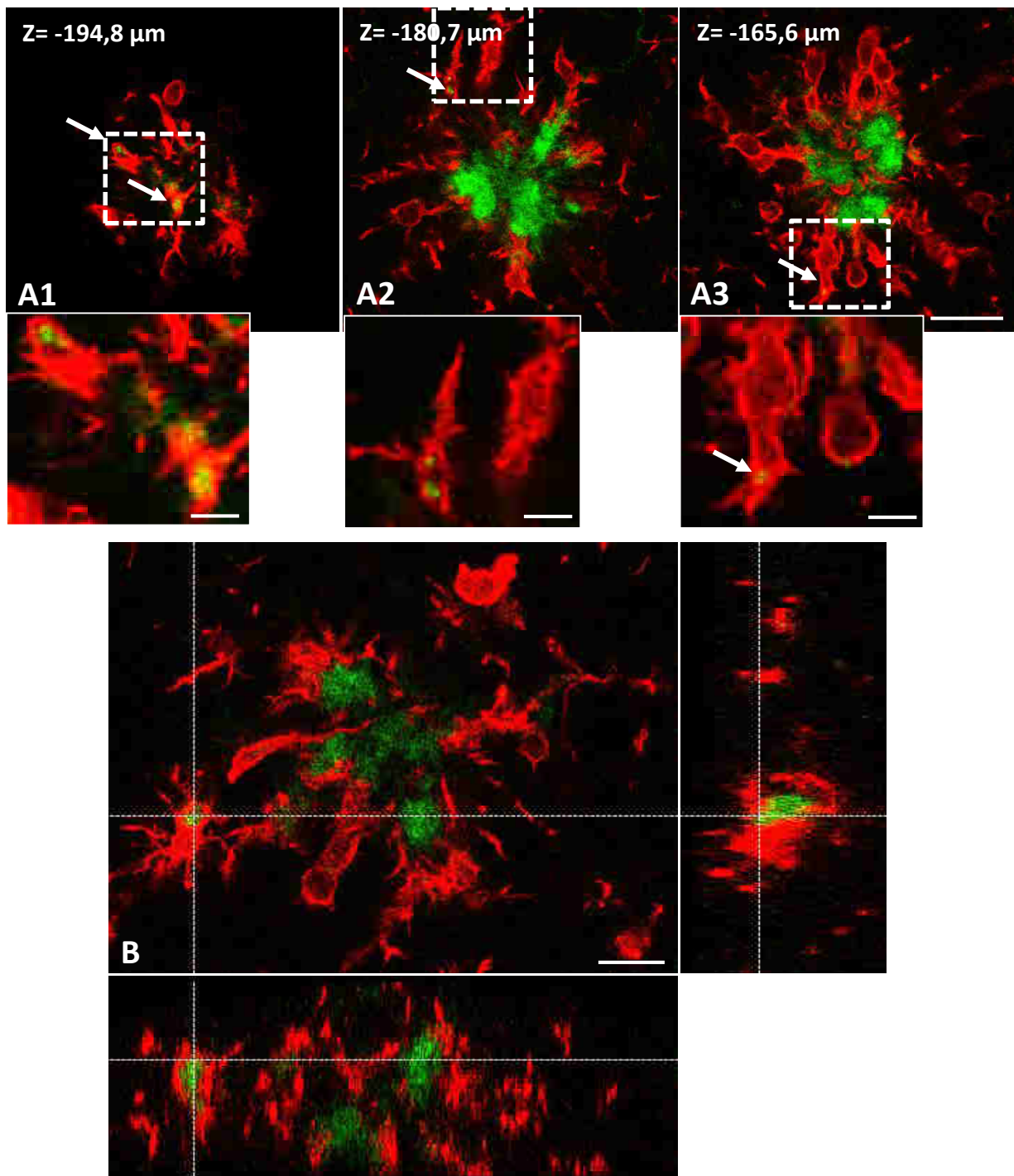
**Figura 3.2.9. El Aβ oligomérico se localiza preferentemente en la periferia de las placas amiloides.** A, marcaje fluorescente doble para Aβ oligomérico (anticuerpo OC) y fibrilar (Tioflavina-S) a microscopía láser confocal; los oligómeros de Aβ se localizan e en la periferia de la placa mientras el centro fibrilar es negativo. B, Identificación a microscopía electrónica de transmisión de Aβ oligomérico mediante inmuno-oro con el anticuerpo OC. Las partículas de oro se concentran en los haces de fibrillas de amiloide más periféricos de la placa (asterisco). En B1 y B2 se muestran detalles a mayores aumentos de las zonas recuadradas en B. Barras de escala: A1-A3: 10 μm; B: 1 μm; B1-B2: 0,2 μm.

Las células microgliales que se asocian con las placas contienen A $\beta$  fibrilar en su interior. El estudio mediante microscopía láser confocal de secciones doblemente teñidas para Iba1 y Tioflavina S, reveló el íntimo contacto de las placas amiloides con las células microgliales y, lo que es más importante, la presencia de A $\beta$  fibrilar en el interior de la microglía (Fig. 3.2.10). La reconstrucción ortogonal, obtenida a partir de los diferentes planos confocales, confirmó la presencia de amiloide fibrilar, teñido con Tioflavina S, completamente rodeado por la microglía, lo que indicaba una localización intracelular sugiriendo un posible papel de la microglía en los procesos de fagocitosis/compactación del A $\beta$ . Este estudio, realizado en el modelo transgénico APP/PS1, se llevó también a cabo en muestras humanas *post mortem* procedentes de pacientes de Alzheimer en estadio Braak V-VI y los resultados obtenidos mostraron también la presencia de A $\beta$  en el interior de las células microgliales reactivas que rodean las placas amiloides (Fig. 3.2.11). Por tanto, nuestro modelo recapitula lo observado en pacientes.

Con objeto de verificar la presencia de A $\beta$  fibrilar en el interior de la microglía, y obtener evidencias ultraestructurales de la implicación funcional de la microglía en la patología amiloide (formación/compactación/eliminación de las placas), realizamos un análisis a microscopía electrónica de transmisión. La Figura 3.2.12 muestra un pequeño depósito amiloide (cuyo tamaño es similar al de las células microgliales que lo rodean) totalmente rodeado por citoplasma microglial. Es más, las imágenes de detalle (Figura 3.2.12A1-A2) evidencian la localización intracelular de fibrillas amiloides, al encontrarse éstas completamente rodeadas por el citoplasma microglial. La Figura 3.2.13 muestra otro ejemplo de la localización intracitoplasmática de estos pequeños núcleos amiloides, donde, además, la célula microglial presenta abundantes cisternas de retículo endoplasmático rugoso en la zona limítrofe con las fibrillas amiloides, sugiriendo procesos microgliales activos de síntesis de proteínas. Estas imágenes (Fig. 3.2.12 y Fig. 3.2.13) sugieren la posible participación de la microglía en la formación de fibrillas amiloides y la generación/compactación de placas amiloides. En estos casos, resultó llamativa la ausencia de prolongaciones astrogliales en contacto directo con las fibrillas amiloides, tal y como habíamos observado previamente.

En la Figura 3.2.14 presentamos una composición de imágenes a microscopía confocal y microscopía electrónica del hipocampo de APP/PS1 para ilustrar esta hipótesis. Las imágenes a microscopía confocal con doble marcaje Iba1/Tioflavina S son demostrativas de la presencia de A $\beta$  fibrilar dentro de la microglía, y además se aprecian fibrillas tioflavina positivas que conectan el citoplasma microglial con la placa. Las imágenes a microscopía electrónica permitieron establecer esta relación entre el citoplasma microglial y las fibrillas amiloides, observándose pequeñas porciones fibrilares de A $\beta$  que estaban completamente rodeadas por citoplasma microglial, sin que en muchos casos se pudiera identificar la membrana citoplasmática (Fig. 3.2.14B-B2). Por último, se observó también (Fig. 3.2.15) una estrecha asociación entre el amiloide fibrilar y las cisternas de retículo endoplasmático pertenecientes a la microglía.

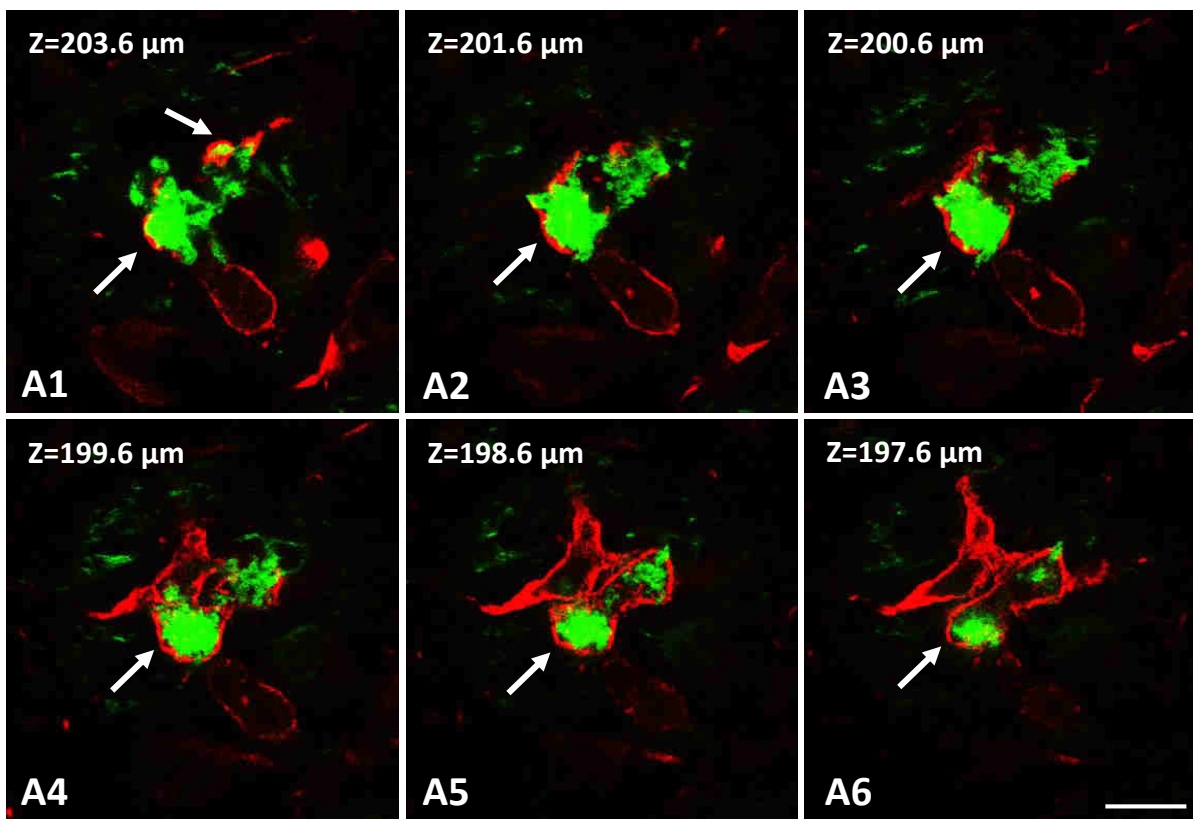
En conjunto, estos resultados sugieren con fuerza la posible formación de fibrillas amiloides por parte de las células microgliales. Por consiguiente, aunque la presencia de A $\beta$  en el interior de las células microgliales podría deberse en parte a procesos fagocíticos, nuestro estudio ultraestructural apoya la hipótesis del papel crucial de la microglía en la formación/compactación de las placas, mediante la generación de fibrillas amiloides. Esta función de síntesis o compactación del amiloide podría constituir un intento de la microglía para reducir el efecto de las especies tóxicas de A $\beta$  y así proteger el parénquima nervioso.



**Figura 3.2.10. La microglía activada que rodea las placas amiloides presenta A $\beta$  fibrilar en su interior.** Fluorescencia doble a microscopía láser confocal con anti-Iba1 (rojo) y Tioflavina S (verde). La serie de imágenes A1-A3 muestra diferentes planos confocales de un mismo depósito amiloide fibrilar rodeado por células microgliales activadas, algunas de las cuales (flechas blancas) muestra marcaje fibrilar en su interior. La imagen ortogonal (B) de un plano confocal de un depósito amiloide demuestra la presencia de A $\beta$  fibrilar en el interior de la microglía. Barras de escala: A1-A3: 20  $\mu$ m; B: 10  $\mu$ m; Insertos A1-A3: 5  $\mu$ m

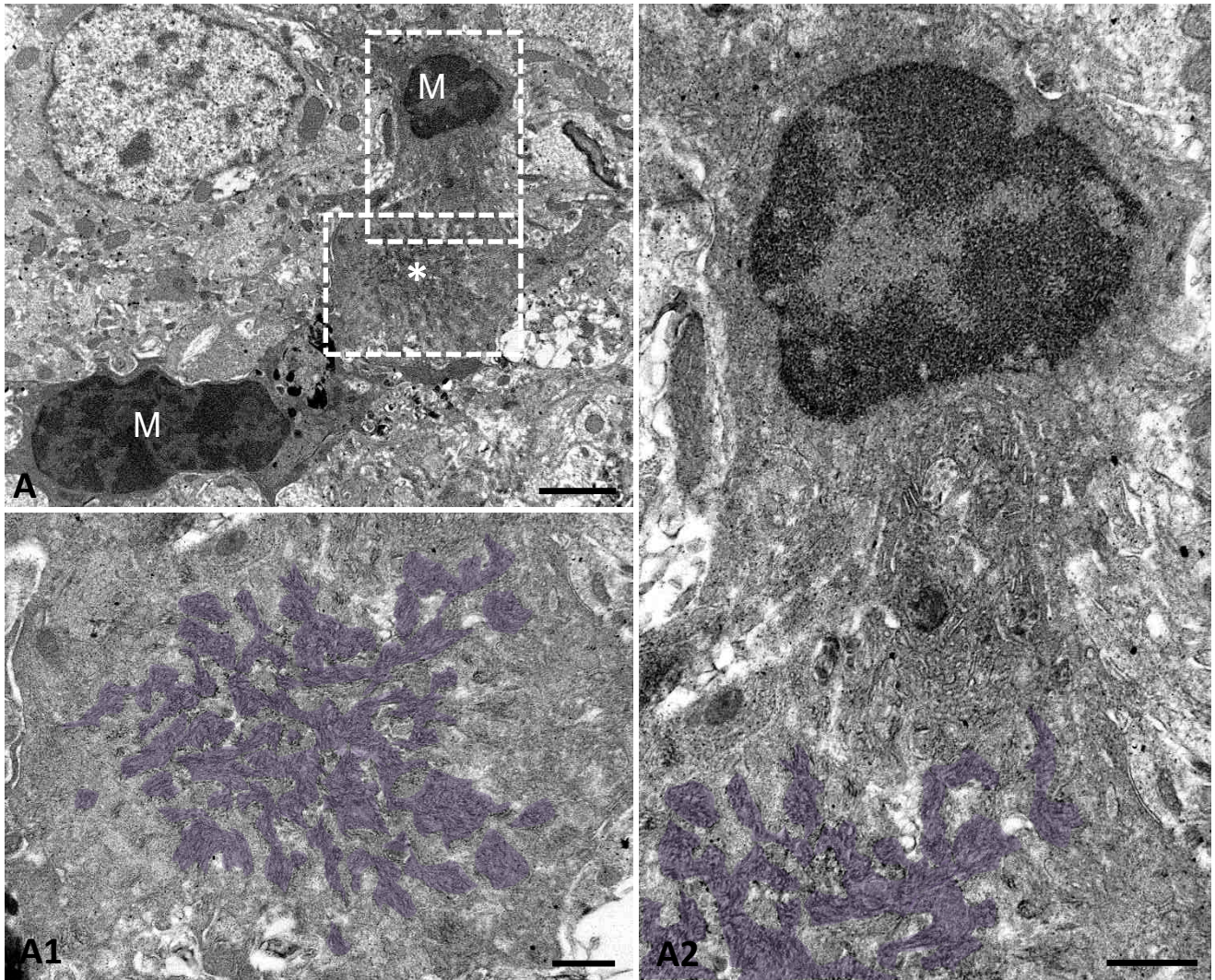


### Iba1 – A $\beta$



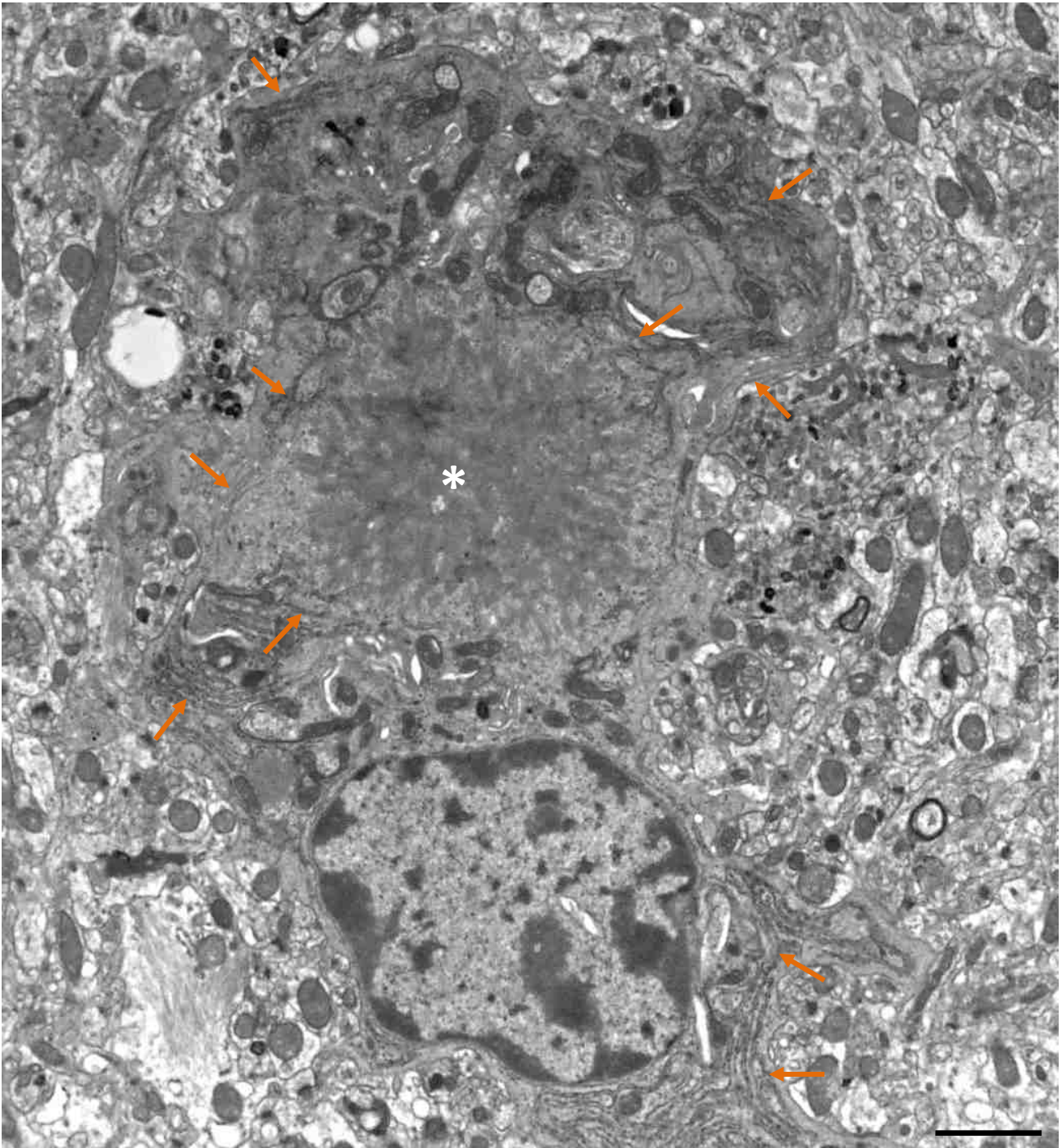
**Figura 3.2.11. Presencia de A $\beta$  intracelular en células microgliales de pacientes de Alzheimer.** Inmunofluorescencia doble a microscopía láser confocal con anti-Iba1 (rojo) y 4G8 (verde) en muestras *post mortem* de hipocampo de individuos Braak V-VI. La serie de imágenes A1-A6 corresponde a diferentes planos confocales de un pequeño grupo de células microgliales activadas con A $\beta$  en su interior (flechas). Barra de escala: A1-A6: 10  $\mu$ m.





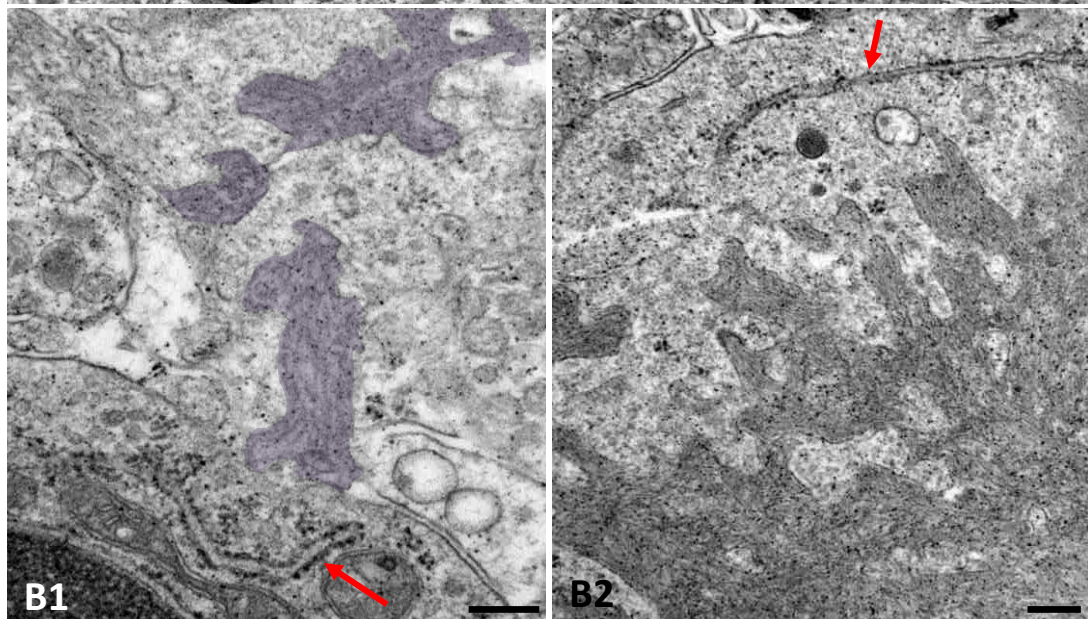
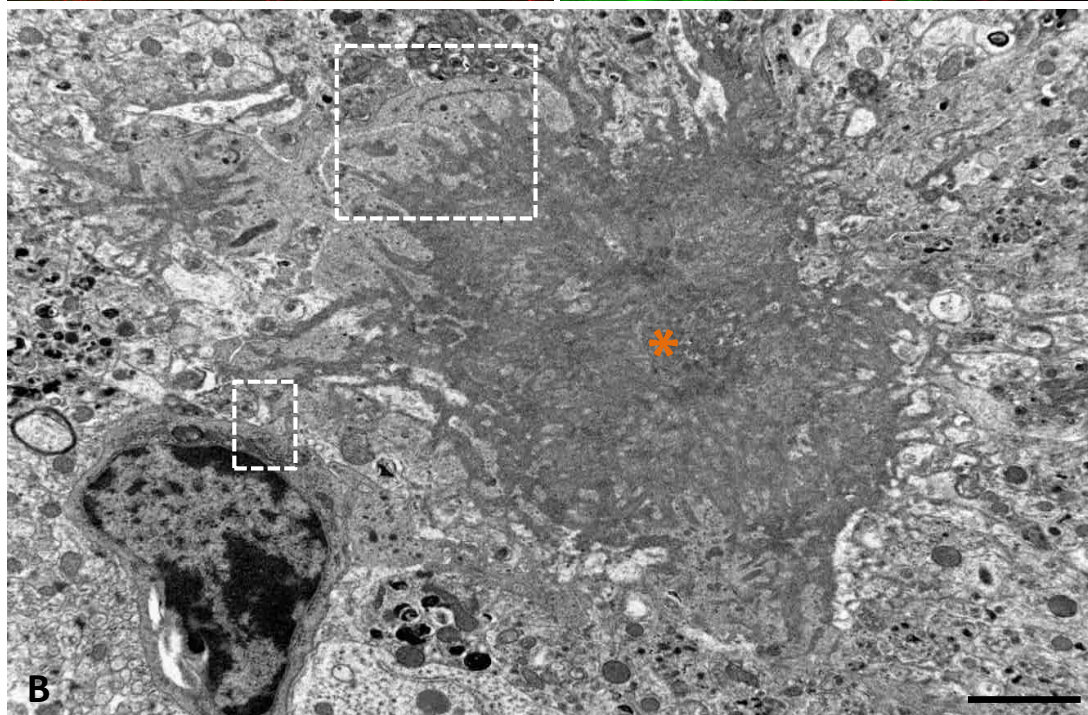
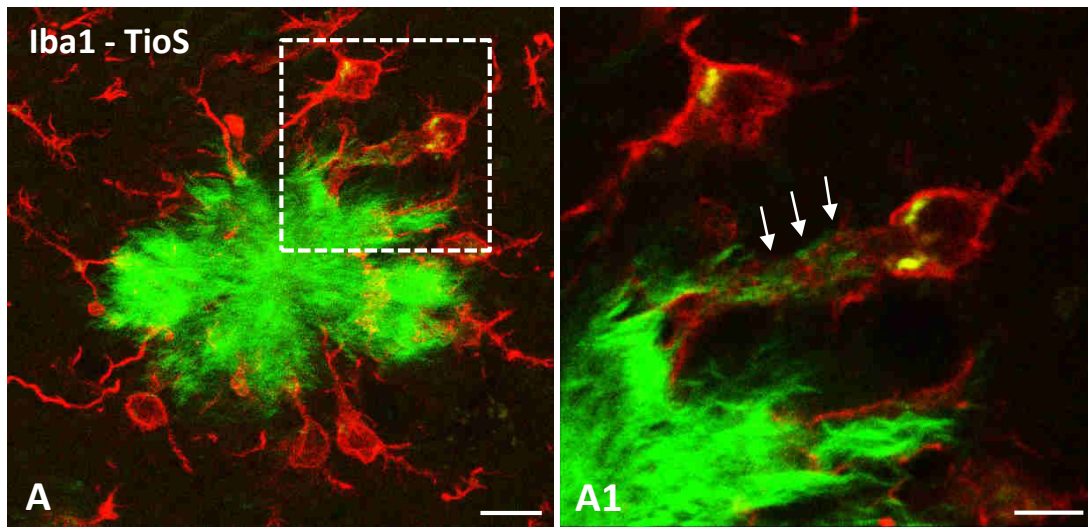
**Figura 3.2.12. Identificación ultraestructural de fibrillas amiloides en el interior de la microglía.** Microscopía electrónica de transmisión. En A se observan dos células microgliales (M) junto a un pequeño depósito amiloide (asterisco), que se encuentra completamente rodeado por el citoplasma de una de ellas. A1 y A2 son detalles de la imagen A en la que se observa las fibrillas amiloides (coloreadas de morado) intercaladas con el citoplasma microglial. Barras de escala: A: 2  $\mu\text{m}$ ; A1-A2: 0,5  $\mu\text{m}$ .





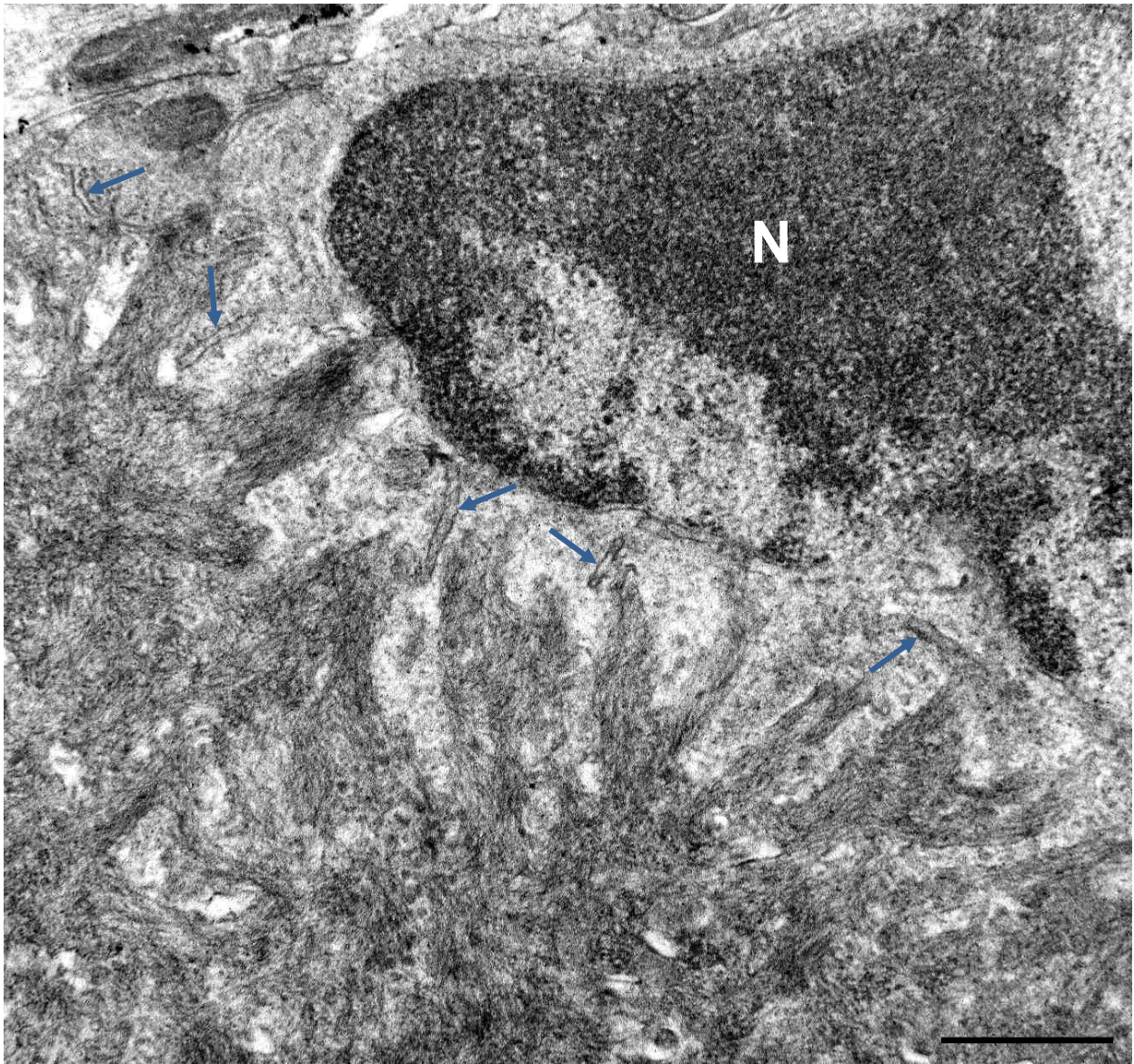
**Figura 3.2.13. Evidencia ultraestructural de fibrillas amiloides en el citoplasma microglial.** Imagen a microscopía electrónica de transmisión mostrando agregados de fibrillas de  $A\beta$ , con aspecto de un núcleo amiloide (asterisco), en el interior de una célula microglial. Esta célula presenta numerosas cisternas de retículo endoplasmático rugoso (flechas) en su citoplasma, lo que sugiere una activa síntesis de proteínas. Barra de escala: 2  $\mu$ m.





**Figura 3.2.14. La microglía activada parece participar en la formación de fibrillas de A $\beta$ .** A y A1, doble marcaje fluorescente con anti-Iba1 (rojo) y Tioflavina S (verde) en el hipocampo del modelo APP/PS1 de 6 meses de edad. En A se muestra una placa fibrilar rodeada de células microgliales activadas, donde se observan células con A $\beta$  fibrilar intracelular y una estrecha relación con las fibrillas amiloides que irradian de la placa (detalle en A1). El estudio ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión (B) revela la estrecha relación entre el citoplasma microglial y las fibrillas de A $\beta$  (B1; coloreadas de morado). En los detalles a mayores aumentos (B1 y B2), se observa la gran extensión de la zona de contacto entre el citoplasma microglial y las fibrillas amiloides así como la proximidad de retículo endoplásmico rugoso en estas regiones (flechas). Barras de escala: A: 10  $\mu$ m; A1: 5  $\mu$ m; B: 2  $\mu$ m; B1-B2: 0,2  $\mu$ m.





**Figura 3.2.15. El retículo endoplasmático de la microglía se asocia con las fibrillas amiloides.** Microscopía electrónica de transmisión. Las cisternas de retículo endoplasmático (flechas) de la célula microglial se encuentran en contacto íntimo con las fibrillas amiloides lo que evidencia una posible formación de éstas por parte de la microglía N: núcleo microglial. Barra de escala: 0,5  $\mu$ m.



## DISCUSIÓN

La activación microglial como parte fundamental de los procesos neuroinflamatorios asociados a la enfermedad de Alzheimer es un hecho ampliamente conocido y ha constituido una de las principales líneas de investigación de esta enfermedad durante la última década. Sin embargo, la implicación de la microglía reactiva en el desarrollo de una respuesta inflamatoria de carácter citotóxico o con función neuroprotectora sigue siendo a día de hoy objeto de amplio debate en la comunidad científica (Cunningham 2013; Aguzzi et al. 2013; Latta et al. 2014; McManus and Heneka 2017). La visión más generalizada sobre el papel microglial en la EA se ha centrado en la producción de factores pro-inflamatorios (como TNF-alfa, IL-1 $\beta$  e IL-6) y daño neurotóxico (ver revisión Heneka et al. 2015). Esta idea deriva del estudio de modelos transgénicos productores de A $\beta$  (modelos amiloidogénicos), donde la microglía muestra una fuerte activación alrededor de las placas. Sin embargo, actualmente esta idea está siendo cuestionada. A continuación, describiremos los principales resultados de nuestro estudio y los discutiremos en el contexto actual.

En nuestro trabajo hemos analizado la relación de la microglía activada con la patología amiloide, principalmente desde una perspectiva ultraestructural, en el hipocampo del modelo transgénico murino APP/PS1. En este modelo y desde los 4 meses de edad, coincidente con el inicio de la patología amiloide, existe una marcada reactividad microglial alrededor de los depósitos amiloides. Esta microglía activada que rodea las placas exhibe una morfología típica (cuerpo celular hipertrófico y prolongaciones cortas y gruesas), claramente diferente a la microglía “quiescente” localizada alejada de las placas. Estudios previos de nuestro grupo demostraron que la microglía que rodea las placas presenta un fenotipo alternativo “M2”, de carácter neuroprotector potencialmente fagocítico y capaz de producir factores neurotróficos (Jimenez et al. 2008). De hecho, esta microglía tipo “M2” se mantiene durante toda la progresión de la patología amiloide a medida que envejece el modelo. Es de destacar que es la microglía interplaca la que adquiere un fenotipo citotóxico “M1” productor de TNFalfa y por tanto la que podría contribuir directamente a la neurotoxicidad. La activación microglial interplaca es coincidente con el aumento de los niveles de Abeta oligomérico soluble. La microglía asociada a las placas, potencialmente beneficiosa, no es capaz de frenar la patología amiloide ya que ésta progresa de forma gradual con el tiempo, por tanto, podría constituir una población microglial defectuosa, o que pierde actividad con el tiempo, promoviendo el avance de la enfermedad.

Recientemente, se ha definido transcripcionalmente la respuesta microglial en modelos APP “*disease-associated microglia* (DAM)” (Keren-Shaul et al. 2017), que implica la activación de genes asociados con el riesgo de desarrollar EA (TREM2, ApoE, Tyrobp) y rutas como lisosoma/fagocitosis, respuesta inmune y endocitosis. Esta respuesta microglial depende de la presencia del receptor TREM2 (del inglés “*triggering receptor expressed on myeloid cells*

2'') perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Curiosamente, mutaciones asociadas a AD en este receptor (Korvatska et al. 2015) implican un mal funcionamiento de la respuesta microglial (Wang et al. 2015; Yuan et al. 2016). En modelos APP con deficiencia de TREM2 se inhibe la activación microglial produciéndose un aumento de la patología (placas amiloides y distrofias axonales) y apoptosis microglial (Yuan et al. 2016). En consecuencia, deficiencias en la función microglial y/o su degeneración están implicadas en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. En apoyo a esta hipótesis, nuestro grupo de investigación ha descrito recientemente la existencia de disfunción/degeneración microglial en el hipocampo de pacientes de Alzheimer utilizando muestras *post mortem* (Sanchez-Mejias et al. 2016). Los datos obtenidos difieren notablemente de lo que ocurre en modelos amiloidogénicos. Primero, la activación microglial en los pacientes es muy moderada, y está restringida a las placas neuríticas. Segundo, y más destacado, existe una grave degeneración microglial, caracterizada por fragmentación/distrofias en las prolongaciones, disminución en la densidad numérica de la población microglial y una reducción del dominio microglial (área del parénquima nervioso que protege cada célula microglial). Esta degeneración microglial está asociada a la acumulación de fosfo-tau soluble en el hipocampo de los pacientes. De hecho, los estudios *in vitro* demostraron que la fracción soluble obtenida de hipocampos de pacientes fueron tóxicas para la microglía. Esta toxicidad se eliminó al inmunodepletar las fracciones solubles con anticuerpos para fosfo-tau (AT8 y/o AT100), lo que validó a fosfo-tau como el agente tóxico. Estos resultados fueron reproducidos utilizando fracciones solubles de modelos transgénicos de tau (thy-tau22). La presencia de fosfo-tau soluble no es detectable en modelos APP, lo que explicaría el diferente comportamiento de la microglía. La microglía es capaz de fagocitar tau soluble (Bolós et al. 2017) lo que conllevaría a su degeneración. De hecho, utilizando la línea neuronal SH-SY5Y que sobre-expresa tau humana (y que acumula fosfo-tau soluble) hemos demostrado que la fagocitosis de dichas células por la microglía provoca su degeneración. Las consecuencias de esta degeneración microglial sobre la evolución de la patología no son conocidas en la actualidad. Esta vulnerabilidad microglial en los pacientes de Alzheimer proporciona nuevas evidencias de la implicación de mecanismos inmunológicos en la progresión de la enfermedad.

En su conjunto, todos estos datos reflejan profundas diferencias en la respuesta neuroinflamatoria mediada por la microglía entre modelos animales (amiloidogénicos) y pacientes de Alzheimer, lo cual podría ser responsable del fracaso de las terapias anti-inflamatorias para tratar la enfermedad, a pesar del éxito descrito en los estudios preclínicos en modelos (Miguel-Alvarez et al. 2015; Graham et al. 2017; Sasaguri et al. 2017). Para garantizar el éxito en la traslación de resultados obtenidos en modelos a la clínica humana es fundamental que estos modelos animales recapitulen la respuesta microglial de los pacientes. Por tanto, proponemos la necesidad de inducir disfunción microglial en los modelos basados en la sobre-expresión de APP y acumulación de Abeta, de hecho, esta es una de las líneas de investigación actuales de nuestro grupo de investigación. En concreto, hemos evaluado ya

(resultados sin publicar) el impacto de la inmunosupresión, mediante tratamiento con ciclosporina y prednisona (desde los 9 meses de edad hasta los 12 meses) sobre el desarrollo de la patología de Abeta en el modelo transgénico PS1delta9-APP<sup>Swe</sup>. Los resultados muestran un aumento muy considerable en la acumulación de Abeta y un aumento en la degeneración neuronal. En consecuencia, la ausencia de activación microglial, parece ser perjudicial para el desarrollo del Alzheimer.

Para entender mejor la implicación de la microglía activada en el desarrollo/progresión de la patología amiloide, así como las consecuencias de su disfuncionalidad, es necesario determinar las características moleculares y morfológicas de estas células. En esta Tesis Doctoral hemos profundizado en la caracterización celular y subcelular de esta población glial mediante estudios a microscopía láser confocal y microscopía electrónica de transmisión. Desde el punto de vista ultraestructural, hemos distinguido dos poblaciones de microglía activada alrededor de las placas, una de menor electrodensidad y con abundante retículo endoplásmico rugoso indicativo de una actividad sintética elevada, y una segunda población de mayor electrodensidad conteniendo fagolisosomas en su interior lo que le atribuye una capacidad fagocítica. Estas poblaciones podrían representar la evolución temporal de la microglía tras asociarse a la placa. Recientemente, se ha descrito un fenotipo microglial, fundamentalmente asociado a estados patológicos, que han denominado como microglía oscura (del inglés *dark microglia*) (Bisht et al. 2016), y cuyas características ultraestructurales son coincidentes con la población celular electrodensa identificada en el hipocampo de nuestro modelo transgénico. Es de destacar que nuestros datos revelan la presencia de A $\beta$  fibrilar en el interior de la microglía, lo que sugiere la participación de estas células en la fagocitosis y/o síntesis de fibrillas de Abeta. Estas actividades son compatibles con los dos subtipos de microglía identificados, de tal forma que la microglía electrodensa se ajusta al fenotipo fagocítico, mientras que la microglía menos electrodensa al fenotipo biosintético. Una actividad fagocítica del  $\beta$ -amiloide tendría el objetivo de restringir el tamaño de las placas, tal y como ha sido ampliamente descrito por numerosos autores (Bolmont et al. 2008; Serrano-Pozo et al. 2013; Condello et al. 2015; Daria et al. 2016; Zuroff et al. 2017). A nivel intracelular, la degradación del A $\beta$  por la microglía se puede llevar a cabo a través de procesos de internalización, autofagia o mediante el sistema del proteosoma (Ries and Sastre 2016; Zuroff et al. 2017). En apoyo a la idea de la fagocitosis de A $\beta$  por parte de la microglía, se conocen numerosos receptores de membrana encargados de la internalización de este péptido (ver revisión Yu and Ye 2015), CD14, CD36, CD47, SCARAI (receptor *scavenger* de clase AI), SCARABI (receptor *scavenger* de clase BI), RAGE (del inglés "receptor for advanced glycosylation end products") y receptores de tipo *toll* (TLRs) (El Houry et al. 1996; Paresce et al. 1996; Du Yan et al. 1997; Fassbender et al. 2004; Koenigsnecht and Landreth 2004; Thanopoulou et al. 2010; Sheedy et al. 2013; Frenkel et al. 2013; Heppner et al. 2015; Colonna and Butovsky 2017; Wolf et al. 2017). En nuestro modelo APP/PS1 la expresión de marcadores microgliales de superficie

o lisosomales (CD11b, Iba1, Cd45, TREM2 and CD68) sufren un incremento significativo en comparación con controles WT de la misma edad (Sanchez-Mejias et al. 2016).

Sin embargo, durante el envejecimiento la capacidad de la microglía para llevar a cabo procesos de fagocitosis de A $\beta$  parece reducirse notablemente, tal y como muestran estudios *in vitro* y en modelos de amiloidosis cerebral (Krabbe et al. 2013; Mosher and Wyss-Coray 2014). Además, en los últimos años está cobrando relevancia TREM2 como importante factor de riesgo para la enfermedad de Alzheimer (Guerreiro et al. 2013; Neumann and Daly 2013; Wolf et al. 2017; Zuroff et al. 2017). TREM2 es un receptor presente en la membrana de las células microgliales implicado en procesos de fagocitosis, cuyas mutaciones asociadas a pérdida de función (Lue et al. 2015) o a la disminución de su expresión en la membrana (Lue et al. 2016) parecen aumentar el riesgo de padecer EA. Las mutaciones en este receptor (Korvatska et al. 2015) dan lugar a un mal funcionamiento de la respuesta microglial (Wang et al. 2016; Yuan et al. 2016; Yeh et al. 2017). Alteraciones en TREM2, con pérdida de función como consecuencia, han sido asociadas a alteraciones de la capacidad microglial para fagocitar A $\beta$  *in vitro* (Kleinberger et al. 2014; Schlepckow et al. 2017); sin embargo, diversos modelos animales haplodeficientes para TREM2 muestran resultados contradictorios al respecto (Ulrich et al. 2014; Jay et al. 2015; Wang et al. 2015). En modelos animales para APP con deficiencias en TREM2 se produce una inhibición de la activación microglial, originando un aumento de la patología amiloide y neurítica, así como procesos de apoptosis microglial (Yuan et al. 2016). No se puede concluir, por tanto, que el aumento del riesgo de padecer Alzheimer debido a mutaciones en TREM2 esté únicamente relacionado con alteraciones de los procesos fagocíticos microgliales, tal y como se discutirá más adelante.

Por otro lado, la presencia de A $\beta$  fibrilar en el interior de la microglía podría indicar un posible papel de la microglía activada en procesos de fibrilación/compactación de las placas, también como un mecanismo para restringir la patología amiloide y reducir la toxicidad de las placas. Otros autores también han descrito la presencia de elevadas cantidades de cisternas de retículo endoplasmático rugoso en la microglía asociada a placas en otro modelo transgénico APP (Wegiel et al. 2001). Sin embargo, estos autores proponen un modelo de crecimiento de las placas amiloides mediado por las células microgliales. Además, otros estudios han mostrado también la capacidad de la microglía para convertir las formas de A $\beta$  oligomérico soluble en especies de amiloide fibrilar (Nagele et al. 2004), apoyando así un papel de las células microgliales en la fibrilación/compactación de las placas.

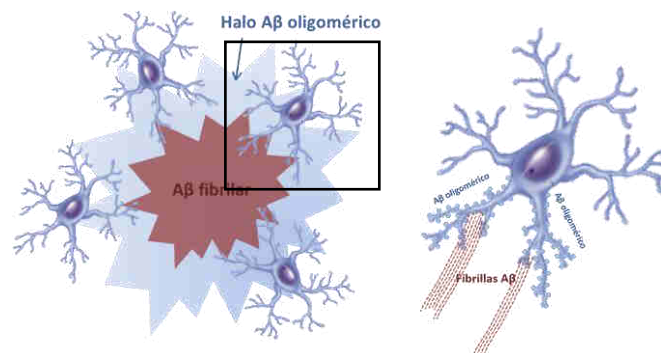
Estudios *in vivo* mediante microscopía de excitación de dos fotones y microscopía confocal de alta resolución postulan la capacidad de la microglía para formar una barrera en torno a los depósitos amiloides. Esta barrera, formada por prolongaciones microgliales que envuelven las placas de A $\beta$ , previene la agregación de especies tóxicas de A $\beta$ 42, limitando así el crecimiento de los depósitos extracelulares (Condello et al. 2015). Dicho efecto protector mediado por la microglía se ve drásticamente reducido durante el envejecimiento (Condello et al. 2015) y en pacientes con la mutación de riesgo R47H de TREM2, y se restauró a valores previos mediante inmunoterapia en modelos animales para la EA (Yuan et al. 2016; Wang et al.



2016). Es más, la inducción de haplodeficiencia para TREM2 en ratones 5xFAD resultó en placas amiloides menos compactas, así como un incremento de la patología neurítica asociada a ellas (Yuan et al. 2016; Jevtic et al. 2017). Todo ello indica un posible papel microglial en la formación de una barrera neuroprotectora capaz de regular la compactación y limitar el crecimiento de las placas amiloides. Por otro lado, en este mismo modelo transgénico, 5xFAD, otros autores han postulado una teoría acerca del crecimiento de las placas amiloides según la cual serían las propias células microgliales las que tras sufrir procesos de muerte celular, contribuirían al aumento del tamaño de estos depósitos extracelulares (Baik et al. 2016). Así, la microglía sería la encargada de internalizar grandes cantidades de A $\beta$  mediante procesos de fagocitosis en un intento por aliviar la carga amiloide; sin embargo, cuando la capacidad microglial para internalizar el péptido amiloide se ve excedida la microglía muere, liberando el A $\beta$  intracelular que contenía y contribuyendo así al crecimiento de las placas extracelulares (Baik et al. 2016). Además, y de manera muy reciente, Spangenberg y colaboradores han mostrado la implicación de la microglía en la compactación de las placas mediante la eliminación de estas células gliales en el modelo 5xFAD (Spangenberg et al. 2017). Sus resultados muestran la reducción del núcleo fibrilar (Tioflavina-S positivos) de los depósitos amiloides tras la eliminación de las células microgliales (Spangenberg et al. 2017), estableciendo así una relación directa entre las células microgliales y los procesos de compactación de las placas de A $\beta$ .

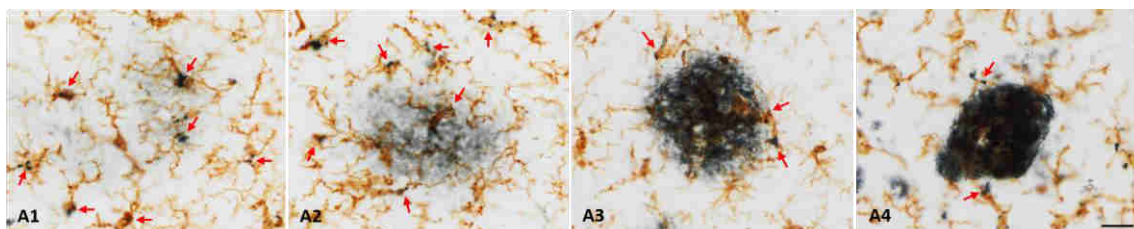
Por todo lo expuesto anteriormente, aunque no podemos descartar la existencia de procesos de fagocitosis de A $\beta$  por parte de la microglía en el hipocampo de nuestro modelo transgénico APP/PS1, las observaciones ultraestructurales parecen indicar la participación mayoritaria de este tipo celular reactivo en los procesos de compactación de las placas. Así, la microglía ejercería su función protectora mediante la fibrilación/compactación de los oligómeros tóxicos solubles de A $\beta$  en formas fibrilares insolubles de menor toxicidad. De esta manera se evitaría la difusión de los oligómeros tóxicos por el parénquima cerebral, reduciendo el daño sináptico y neuronal, por lo que la microglía ejercería una función protectora sobre las neuronas hipocampales, al menos en las fases iniciales de la patología amiloidea. Esta función microglial coincide con el fenotipo de activación alternativa y su función neuroprotectora radica en el hecho de que las placas más compactas muestran una toxicidad inferior debido a la disminución del halo oligomérico de A $\beta$ , que es el que tiene un efecto más perjudicial sobre las células neuronales. En este sentido, aunque no existen demasiados estudios acerca del grado de compactación de las placas amiloides en modelos animales, nuestro grupo de investigación demostró que el tratamiento con carbonato de litio modifica las propiedades tóxicas de las placas amiloides en nuestro modelo APP/PS1 (Trujillo-Estrada et al. 2013; Trujillo-Estrada 2015). En este estudio se demostró el aumento del nivel de compactación de los depósitos amiloides extracelulares de manera paralela a una reducción de las neuritas distróficas axonales, por lo que la compactación está directamente relacionada con la reducción de la toxicidad neuronal.

Por tanto, y teniendo en consideración los datos obtenidos, así como todos los aspectos discutidos previamente proponemos que la microglía activada en el hipocampo del modelo APP/PS1 que rodea las placas amiloides estaría participando activamente en la captación de oligómeros solubles y tóxicos de A $\beta$ , convirtiéndolos en formas fibrilares menos tóxicas, y dando lugar a un efecto de compactación (y reducida toxicidad) de las placas amiloides (Fig. 3.2.16). Sin embargo, es posible que esta capacidad de la microglía de restringir la toxicidad de las placas se vea afectada con el tiempo de forma que se produciría la disfuncionalidad de estas células, contribuyendo a la progresión de la patología amiloide y a la neurodegeneración.



**Figura 3.2.16. Esquema representativo del proceso de fibrilación/compactación del péptido  $\beta$ -amiloide.** Se muestra una representación de nuestra hipótesis de compactación del A $\beta$  por parte de la microglía. Las células microgliales activadas son reclutadas a las inmediaciones de los depósitos extracelulares, con los que entran en íntimo contacto. Esta microglía estaría llevando a cabo funciones de compactación de las placas mediante la conversión de los oligómeros tóxicos solubles de A $\beta$  en formas fibrilares de menor toxicidad.

En apoyo de la participación microglial en la formación/compactación de las placas es importante destacar que en muestras *post mortem* de pacientes de Alzheimer en estadio Braak V-VI, hemos identificado también células microgliales con A $\beta$  en su interior. Además, el análisis de las imágenes microscópicas es muy sugerente de la activa participación de la microglía en este proceso en el hipocampo de pacientes (Fig. 3.2.17).



**Figura 3.2.17. Hipótesis de formación/compactación de las placas amiloides en el hipocampo de pacientes de Alzheimer.** Marcaje inmunohistoquímico para 4G8 (azul oscuro) e Iba1 (marrón) en el giro parahipocampal de un individuo en estadio Braak IV. Se muestra una secuencia de imágenes de diferentes grados de compactación de las placas amiloides, sugerentes de un posible proceso de formación de las placas con la participación activa de las células de la microglía. Las flechas rojas indican células microgliales alrededor de las placas con un marcado contenido intracelular de péptido  $\beta$ -amiloide. Tomado de Sanchez-Mejias 2015.

Las consecuencias de una disfunción/degeneración microglial serían sin duda perjudiciales para la homeostasis cerebral contribuyendo al avance de la patología del Alzheimer. Por un lado, produciría un incremento de la toxicidad de las placas afectando así a la viabilidad neuronal y sináptica. Además, podría tener un efecto deletéreo directo sobre las neuronas. Se conoce que la microglía está en comunicación con las neuronas, tiene receptores para neurotransmisores y moduladores neuronales, y además ejerce efectos sobre las sinapsis y circuitos neuronales (revisado en Werneburg et al. 2017). Recientemente, se ha descrito la eliminación de sinapsis por la microglía, actividad mediada por C1q, en modelos transgénicos de EA que acumulan A $\beta$  (Hong et al. 2016). En relación a esto, las células microgliales oscuras (*dark microglia*), abundantes en los ratones transgénicos APP/PS1, han sido relacionadas con la fagocitosis de espinas dendríticas y terminales presinápticos (Bish et al. 2016). Todo esto, apoya la idea de pérdida de función microglial asociada a la progresión del Alzheimer.

Por último, la activación microglial podría ser la responsable de la reactividad astrogliar descrita en el capítulo anterior. En apoyo a esta interacción microglía-astrocito, recientemente se ha descrito la capacidad de la microglía activada de inducir la polarización de los astrocitos reactivos hacia un fenotipo perjudicial (Liddel et al. 2017) o neuroprotector (Shinozaki et al. 2017) en función del contexto patológico. Por tanto, la disfunción de la microglía en la enfermedad de Alzheimer podría estar asociada a una respuesta astrogliar anómala, promoviendo de forma conjunta el avance de la patología. Descifrar cómo estas células gliales cooperan entre sí y cómo esta interacción contribuye a la patofisiología del Alzheimer será sin duda materia de intensa investigación en los próximos años, y abrirá nuevas oportunidades terapéuticas para modificar el curso de la enfermedad.

---

La acumulación extracelular de amiloide induce una activación microglial, muy marcada en los modelos animales y moderada en los pacientes de Alzheimer. La íntima asociación entre la microglía y las placas amiloides sugiere la participación de este tipo celular en funciones de fibrilación/compactación del A $\beta$  con el objetivo de reducir la toxicidad de las placas y limitar su crecimiento, protegiendo así a las neuronas. Sin embargo, no podemos descartar la existencia de procesos de fagocitosis de A $\beta$ . La progresión de la enfermedad podría estar asociada a una disfuncionalidad de la microglía.

Los modelos animales basados en la sobre-expresión de APP no contextualizan la degeneración microglial que tiene lugar en los pacientes. Es, por tanto, necesario reformular los actuales modelos murinos para mimetizar la patología de pacientes y permitir ensayar soluciones terapéuticas realmente efectivas en su traslación a humanos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aguzzi a., Barres B a., Bennett ML.** 2013. Microglia: Scapagoat, Saboteur, or Something Else? *Science (80- )* **339**: 156–161.
- Baik SH, Kang S, Son SM, Mook-Jung I.** 2016. Microglia contributes to plaque growth by cell death due to uptake of amyloid  $\beta$  in the brain of Alzheimer's disease mouse model. *Glia* **64**: 2274–2290.
- 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* n/a-n/a.
- Bolmont T, Haiss F, Eicke D, Radde R, Mathis C a, Klunk WE, Kohsaka S, Jucker M, Calhoun ME.** 2008. Dynamics of the microglial/amyloid interaction indicate a role in plaque maintenance. *J Neurosci* **28**: 4283–4292.
- 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**: 59.
- Colonna M, Butovsky O.** 2017. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. 441–468.
- Colonna M, Wang Y.** 2016. TREM2 variants: new keys to decipher Alzheimer disease pathogenesis. *Nat Rev Neurosci* **17**: 201–207.
- Condello C, Yuan P, Schain A, Grutzendler J.** 2015. Microglia constitute a barrier that prevents neurotoxic protofibrillar A $\beta$ 42 hotspots around plaques. *Nat Commun* **6**: 6176.
- Crotti A, Ransohoff RM.** 2016. Microglial Physiology and Pathophysiology: Insights from Genome-wide Transcriptional Profiling. *Immunity* **44**: 505–515.
- Cunningham C.** 2013. Microglia and neurodegeneration: The role of systemic inflammation. *Glia* **61**: 71–90.
- Daria A, Colombo A, Llovera G, Hampel H, Willem M, Liesz A, Haass C, Tahirovic S.** 2016. Young microglia restore amyloid plaque clearance of aged microglia. *EMBO J* **36**: e201694591.
- Drummond E, Wisniewski T.** 2017. The use of localized proteomics to identify the drivers of Alzheimer's disease pathogenesis. *Neural Regen Res* **12**: 912–913.
- Du Yan S, Zhu H, Fu J, Yan SF, Roher A, Tourtellotte WW, Rajavashisth T, Chen X, Godman GC, Stern D, et al.** 1997. Amyloid-beta peptide-receptor for advanced glycation endproduct interaction elicits neuronal expression of macrophage-colony stimulating factor: a proinflammatory pathway in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 5296–301.
- El Khoury J, Hickman SE, Thomas CA, Cao L, Silverstein SC, Loike JD.** 1996. Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils. *Nature* **382**: 716–719.
- Fassbender K, Walter S, Kühl S, Landmann R, Ishii K, Bertsch T, Stalder AK, Muehlhauser F, Liu Y, Ulmer AJ, et al.** 2004. The LPS receptor (CD14) links innate immunity with Alzheimer's disease. *FASEB J* **18**: 203–205.
- Frenkel D, Wilkinson K, Zhao L, Hickman SE, Means TK, Puckett L, Farfara D, Kingery ND, Weiner HL, El Khoury J.** 2013. Scara1 deficiency impairs clearance of soluble amyloid- $\beta$  by mononuclear phagocytes and accelerates Alzheimer's-like disease progression. *Nat Commun* **4**: 2030.
- Graham WV, Bonito-Oliva A, Sakmar TP.** 2017. Update on Alzheimer's Disease Therapy and Prevention Strategies. *Annu Rev Med* **68**: 413–430.
- 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**: 117–27.
- 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**: 388–405.
- Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B.** 2015. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci* **16**: 358–372.
- Hong S, Beja-Glasser VF, Nfonoyim BM, Frouin A, Li S, Ramakrishnan S, Merry KM, Shi Q, Rosenthal A, Barres BA, et al.** 2016. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science (80- )* **8373**: 1–9.
- Huang K, Marcora E, Pimenova A, Di Narzo A, Kapoor M, Jin SC, Harari O, Bertelsen S, Fairfax B, Czajkowski J, et al.** 2017. A common haplotype lowers PU.1 expression in myeloid cells and delays onset of Alzheimer's disease. *bioRxiv*.

- Jay TR, Miller CM, Cheng PJ, Graham LC, Bemiller S, Broihier ML, Xu G, Margevicius D, Karlo JC, Sousa GL, et al. 2015. TREM2 deficiency eliminates TREM2 + inflammatory macrophages and ameliorates pathology in Alzheimer's disease mouse models. *J Exp Med* **212**: 287–295.
- Jevtic S, Sengar AS, Salter MW, McLaurin J. 2017. The role of the immune system in Alzheimer disease: Etiology and treatment. *Ageing Res Rev* **40**: 84–94.
- 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  $\beta$  (A $\beta$ ) oligomers reverses the neuroprotective effect of soluble amyloid precursor protein- $\alpha$  (sAPP $\alpha$ ) by modulating phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt-GSK-3 $\beta$  pathway in Alzheimer mouse model. *J Biol Chem* **286**: 18414–18425.
- 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.
- 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**: 243ra86.
- Koenigsknecht J, Landreth G. 2004. Microglial Phagocytosis of Fibrillar  $\beta$ -Amyloid through a 1 Integrin-Dependent Mechanism. *J Neurosci* **24**: 9838–9846.
- 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. *JAMA Neurol* **72**: 920.
- Krabbe G, Halle A, Matyash V, Rinnenthal JL, Eom GD, Bernhardt U, Miller KR, Prokop S, Kettenmann H, Heppner FL. 2013. Functional Impairment of Microglia Coincides with Beta-Amyloid Deposition in Mice with Alzheimer-Like Pathology. *PLoS One* **8**.
- Latta CH, Brothers HM, Wilcock DM. 2014. Neuroinflammation in Alzheimer's disease; A source of heterogeneity and target for personalized therapy. *Neuroscience* **302**: 103–111.
- Liddel SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, Bennett ML, Münch AE, Chung W-S, Peterson TC, et al. 2017. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*.
- Lue L-F, Schmitz CT, Sorrano G, Sue LI, Beach TG, Walker DG. 2016. TREM2 protein expression changes correlate with Alzheimer's disease neurodegenerative pathologies in postmortem temporal cortices. **25**: 469–480.
- Lue LF, Schmitz C, Walker DG. 2015. What happens to microglial TREM2 in Alzheimer's disease: Immunoregulatory turned into immunopathogenic? *Neuroscience* **302**: 138–150.
- McManus RM, Heneka MT. 2017. Role of neuroinflammation in neurodegeneration: new insights. *Alzheimers Res Ther* **9**: 14.
- Miguel-Alvarez M, Santos-Lozano A, Sanchis-Gomar F, Fiuza-Luces C, Pareja-Galeano H, Garatachea N, Lucia A. 2015. Non-steroidal anti-inflammatory drugs as a treatment for Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of treatment effect. *Drugs Aging* **32**: 139–147.
- Mosher KI, Wyss-Coray T. 2014. Microglial dysfunction in brain aging and Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol* **88**: 594–604.
- Nagele RG, Wegiel J, Venkataraman V, Imaki H, Wang KC, Wegiel J. 2004. Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **25**: 663–674.
- Neumann H, Daly M. 2013. Variant TREM2 as Risk Factor for Alzheimer's Disease. *N Engl J Med* **2**–4.
- Paresce DM, Ghosh RN, Maxfield FR. 1996. Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid  $\beta$ -protein via a scavenger receptor. *Neuron* **17**: 553–565.
- Prinz M, Priller J. 2014. Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin



- to neuropsychiatric disease. *Nat Rev Neurosci* **15**: 300–12.
- Ries M, Sastre M. 2016. Mechanisms of A $\beta$  clearance and degradation by glial cells. *Front Aging Neurosci* **8**: 160.
- Salter MW, Stevens B. 2017. Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat Med* **23**: 1018–1027.
- Sanchez-Mejias E, Navarro V, Jimenez S, Sanchez-Mico M, Sanchez-Varo R, Nuñez-Díaz 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.
- 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* **4621111**: e201797397.
- Schafer DP, Stevens B. 2015. Microglia function in central nervous system development and plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**: a020545.
- Schlepckow K, Kleinberger G, Fukumori A, Feederle R, Lichtenthaler SF, Steiner H, Haass C. 2017. An Alzheimer-associated TREM2 variant occurs at the ADAM cleavage site and affects shedding and phagocytic function. *EMBO Mol Med* **201707672**.
- Serrano-Pozo A, Muzikansky A, Gómez-Isla T, Growdon JH, Betensky R a, Frosch MP, Hyman BT. 2013. Differential relationships of reactive astrocytes and microglia to fibrillar amyloid deposits in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **72**: 462–71.
- Sheedy FJ, Grebe A, Rayner KJ, Kalantari P, Ramkhalawon B, Carpenter SB, Becker CE, Ediriweera HN, Mullick AE, Golenbock DT, et al. 2013. CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. *Nat Immunol* **14**: 812–20.
- Shinozaki Y, Shibata K, Yoshida K, Shigetomi E, Gachet C, Ikenaka K, Tanaka KF, Koizumi S. 2017. Transformation of Astrocytes to a Neuroprotective Phenotype by Microglia via P2Y1 Receptor Downregulation. *Cell Rep* **19**: 1151–1164.
- Sochocka M, Diniz BS, Leszek J. 2016. Inflammatory Response in the CNS: Friend or Foe? *Molecular Neurobiology*, November 26.
- Spangenberg EE, West BL, Green KN. 2017. Microglial modulation of astrogliosis and A $\beta$  plaque compaction in 5xFAD mice. *Alzheimer's Dement* **13**: P981.
- Thanopoulou K, Fragkouli A, Stylianopoulou F, Georgopoulos S. 2010. Scavenger receptor class B type I (SR-BI) regulates perivascular macrophages and modifies amyloid pathology in an Alzheimer mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 20816–20821.
- Trujillo-Estrada L. 2015. Caracterización neuropatológica y evaluación preclínica de potentes estrategias terapéuticas en modelos animales transgénicos de la enfermedad de Alzheimer. Tesis Doctoral.
- Trujillo-Estrada L, Jimenez S, De Castro V, Torres M, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Navarro V, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mejias E, Davila JC, et al. 2013. In vivo modification of Abeta plaque toxicity as a novel neuroprotective lithium-mediated therapy for Alzheimer's disease pathology. *Acta Neuropathol Commun* **1**: 73.
- Ulrich JD, Finn M, Wang Y, Shen A, Mahan TE, Jiang H, Stewart FR, Piccio L, Colonna M, Holtzman DM. 2014. Altered microglial response to A $\beta$  plaques in APPS1-21 mice heterozygous for TREM2. *Mol Neurodegener* **9**: 20.
- Wang Y, Cella M, Mallinson K, Ulrich JD, Young KL, Robinette ML, Gilfillan S, Krishnan GM, Sudhakar S, Zinselmeyer BH, et al. 2015. TREM2 Lipid Sensing Sustains the Microglial Response in an Alzheimer's Disease Model. *Cell* **160**: 1061–1071.
- 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**: 667–75.
- Wegiel J, Wang KC, Imaki H, Rubenstein R, Wronska A, Osuchowski M, Lipinski WJ, Walker LC, LeVine H. 2001. The role of microglial cells and astrocytes in fibrillar plaque evolution in transgenic APPSW mice. *Neurobiol Aging* **22**: 49–61.
- Werneburg S, Feinberg PA, Johnson KM, Schafer DP. 2017. A microglia-cytokine axis to modulate synaptic connectivity and function. *Curr Opin Neurobiol* **47**: 138–145.
- Wolf SA, Boddeke HWGM, Kettenmann H. 2017. Microglia in Physiology and Disease. *Annu Rev*

*Physiol* **79**: 619–643.

**Wu Y, Dissing-Olesen L, MacVicar BA, Stevens B.** 2015. Microglia: Dynamic Mediators of Synapse Development and Plasticity. *Trends Immunol* **36**: 605–613.

**Yeh FL, Hansen D V., Sheng M.** 2017. TREM2, Microglia, and Neurodegenerative Diseases. *Trends Mol Med* **23**: 512–533.

**Yu Y, Ye RD.** 2015. Microglial A $\beta$  Receptors in Alzheimer's Disease. *Cell Mol Neurobiol* **35**: 71–83.

**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* **90**: 724–739.

**Zuroff L, Daley D, Black KL, Koronyo-Hamaoui M.** 2017. Clearance of cerebral A $\beta$  in Alzheimer's disease: reassessing the role of microglia and monocytes. *Cell Mol Life Sci* **74**: 2167–2201.

# 3.3

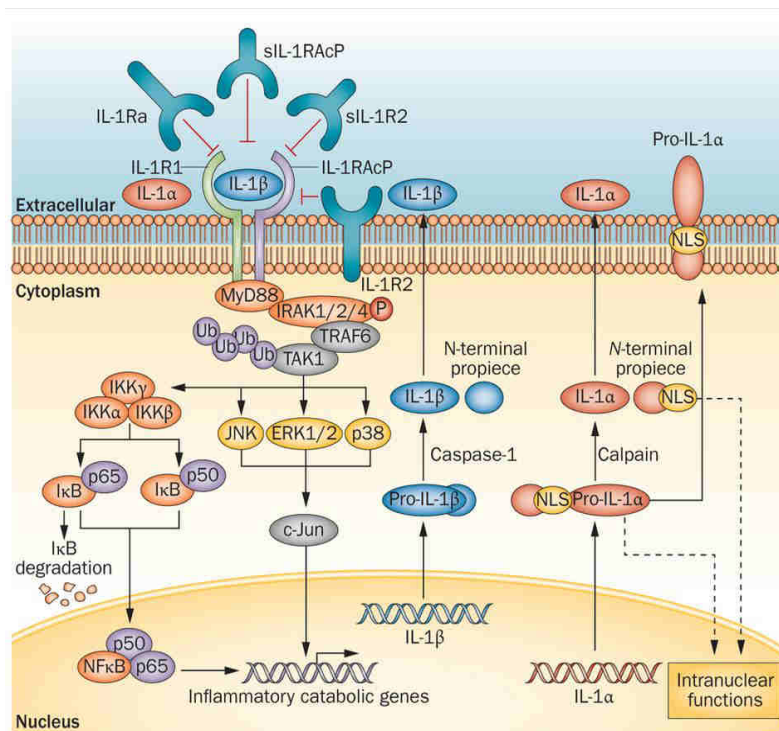
## EFFECTO DE LA MODULACIÓN DE TOM1/TOLLIP SOBRE LA PROGRESIÓN DE LA PATOLOGÍA EN UN MODELO TRIPLE TRANSGÉNICO DE ALZHEIMER

### INTRODUCCIÓN

La existencia de un fuerte proceso inflamatorio mediado por la activación de células astrogliales y microgliales durante el curso de la EA ha sido ampliamente descrito en los capítulos previos de este trabajo. Muchos de los polimorfismos genéticos que han sido relacionados con el riesgo de padecer Alzheimer, como las mutaciones en TREM2 (Guerreiro et al. 2013) o la clusterina (CLU) (Harold et al. 2009; Lambert et al. 2009), se localizan en genes relacionados con el sistema inmune. Además, tanto en pacientes de Alzheimer como en los modelos transgénicos de la enfermedad se han encontrado niveles elevados de citoquinas proinflamatorias, como la interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleuquina-6 (IL-6) o el factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ), mientras que los niveles de algunas citoquinas anti-inflamatorias estaban reducidos (Akiyama et al. 2000; Heppner et al. 2015). Por ello, en los últimos años numerosos grupos de investigación han centrado sus estudios en tratar de modular la respuesta inflamatoria hacia un perfil neuroprotector en lugar de citotóxico con idea de modular el curso de la enfermedad y reducir el daño neurodegenerativo.

En este sentido, una de las líneas de investigación del grupo del Dr. LaFerla (Universidad de California, Irvine) está centrada en determinar la relación entre la respuesta inflamatoria y el desarrollo de la patología de A $\beta$  y de Tau (Kitazawa et al. 2005; Sy et al. 2011), estableciendo una relación directa entre la IL-1 $\beta$  y la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (Kitazawa et al. 2011). La actividad proinflamatoria de esta interleuquina se puede regular a diferentes niveles: regulando su síntesis y liberación, regulando la activación y degradación del receptor de membrana (IL-1R1) o bien regulando la cascada de señalización intracelular. Alteraciones en estas vías de regulación de la IL-1 $\beta$  han sido identificadas durante la progresión del Alzheimer. Datos preliminares de este grupo mostraron elevados niveles del receptor IL-1R1 en ratones 3xTgAD desde edades tempranas, junto a un descenso en la expresión de Tom1 y Tollip. Todo ello unido al hecho de que bloqueando la expresión de IL-1 consiguen modular la respuesta inflamatoria y revertir los déficits cognitivos (Kitazawa et al. 2011) nos lleva a tratar de profundizar en la cascada de señalización de la IL-1 $\beta$  con el objetivo de dilucidar la importancia de Tom1 y Tollip durante la progresión de la patología.

La cascada de señalización da comienzo con la unión de la IL-1 $\beta$  al receptor IL-1R1, dando lugar al reclutamiento de la subunidad IL-1RAcP. La formación del heterodímero induce una cascada de señales con intermediarios como MyD88, IRAK4 y TRAF6. Esta activación de TRAF6 resulta finalmente en la regulación transcripcional de genes proinflamatorios entre los que se incluyen la pro-IL-1 $\beta$  (O'Neill 2008), que mediante procesamiento proteolítico dará lugar finalmente a la IL-1 $\beta$  (Fig. 3.3.1).



**Figura 3.3.1. Representación esquemática de la cascada de señalización de la IL-1.** Las interleuquinas IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  son sintetizadas como proteínas precursoras (pro-IL-1 $\alpha$  y pro-IL-1 $\beta$ ) y son procesadas proteolíticamente para producir las formas maduras, que en el caso de la IL-1 $\beta$  es la única forma activa. La unión de estas proteínas maduras al receptor IL-1R1 permite el reclutamiento de la subunidad IL-1RAcP, lo que resulta en la generación de una cascada de eventos en la que participan proteínas de señalización importantes, como las quinasas JNK, ERK1/2 o p38, así como factores de transcripción entre los que se encuentran NF $\kappa$ B, que controla la expresión de un gran número de genes relacionados con la respuesta inflamatoria.

El equilibrio entre la producción de IL-1 $\beta$  y su eliminación mediante el sistema del proteosoma es crucial para evitar el exceso de secreción de IL-1 $\beta$ . Por otro lado, la subunidad IL-1R1 se une a Tollip, que junto con Tom1 promueven la internalización endosomal de IL-1R1 necesaria para su posterior degradación (Fig. 3.3.2)





recibieron los mismos virus adeno-asociados ( $n=10/\text{grupo}$ ). Todas las pruebas conductuales tuvieron lugar durante la misma hora del día y fueron llevados a cabo por un experimentador “ciego” al genotipo del animal.

En primer lugar y con el fin de analizar los efectos de la modulación de Tom1/Tollip en la memoria espacial (Navarrete et al. 2008), se llevaron a cabo las pruebas del laberinto acuático de Morris (MWM, del inglés *Morris Water Maze*). Esta prueba se basa en la existencia de una plataforma de escape oculta en un tanque de agua, que el animal debe localizar sirviéndose de una serie de claves externas (Morris 1984).

Durante la primera etapa del experimento se llevó a cabo la fase de aprendizaje o fase de retención, con una duración total de 5 días (ver Apdo. 2.2.2), durante la cual los ratones son entrenados para encontrar la plataforma en el menor tiempo posible. Para el estudio de la fase de aprendizaje se llevó a cabo un análisis ADEVA de doble vía con medidas repetidas (día de aprendizaje/grupo) de las latencias de escape. Así, se detectaron diferencias significativas entre los días de aprendizaje ( $F(7, 63) = 10,93$ ;  $p < 0,0001$ ) y entre los distintos grupos ( $F(4, 36) = 87,22$ ;  $p < 0,0001$ ), aunque no se observó efecto de interacción ( $F(28, 252) = 1.485$ ;  $P = 0,0604$ ). Se observaron diferencias significativas debidas a los virus inyectados en los animales nTg-Tollip-sh y nTg-Ctrl-AAV (en los días 3 y 4) y entre los animales 3xTgAD-Tollip-sh y 3xTgAD-Ctrl-AAV (en el día 5). Además, también se observaron diferencias entre genotipos (3xTgAD y nTg) que fueron inyectados con el mismo tipo de virus adeno-asociado, concretamente entre los nTg-Tom-sh y 3xTgAD-Tom-sh (en los días 2, 3, 4 y 5) y entre los nTg-Tollip-sh y 3xTgAD-Tollip-sh (en el día 5) (Fig. 3.3.3A). En términos generales todos los grupos de tratamiento (tanto 3xTgAD como nTg) muestran una reducción progresiva en el tiempo empleado en encontrar la plataforma oculta a lo largo de los diferentes días, a excepción del 3xTgAD-Tollip-sh cuya curva de latencia no muestra signos de aprendizaje.

Una vez finalizada esta primera etapa, se procedió a llevar a cabo la fase de retención o de prueba, en la cual tratamos de observar si existen diferencias entre los grupos tanto en el tiempo que emplean nadando en el cuadrante diana, como en el tiempo que emplean en encontrar por primera vez la plataforma. Durante la prueba se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los ratones 3xTgAD-Ctrl-AAV y sus respectivos nTg; así como entre los grupos 3xTgAD-Tom-sh y nTg-Tom-sh (Fig. 3.3.3B). Además, se contabilizaron también el número de veces que los ratones cruzaban por encima de la zona donde debía estar la plataforma, revelando de nuevo cambios significativos entre los mismos grupos mencionados previamente, 3xTgAD-Ctrl-AAV/nTg-Ctrl-AAV y 3xTgAD-Tom-sh/nTg-Tom-sh (Fig. 3.3.3C). Por último, se analizó el tiempo de latencia (del mismo modo que durante la fase de aprendizaje) y se detectaron diferencias significativas entre el grupo 3xTgAD-Tollip-sh con respecto al nTg del mismo tratamiento (Fig. 3.3.3D). Este conjunto de datos demuestra la existencia de déficits cognitivos tanto en el 3xTgAD-Tom-sh como en el 3xTgAD-Tollip-sh, siendo este último grupo el que presenta mayores déficits cognitivos debido a que obtuvo los peores resultados en los parámetros analizado ya que tarda demasiado tiempo en encontrar la

plataforma, el tiempo empleado en el cuadrante diana es inferior al de todos los demás grupos y cruza muy pocas veces por encima del lugar donde estaría la plataforma. Además, los animales 3xTgAD-Tom-AAV muestran tanto en la fase de aprendizaje como en la fase de retención unos resultados similares a su grupo control nTg-Tom-AAV, por lo que la sobre-expresión de Tom1 parece revertir los déficits asociados a la memoria espacial en los animales triple transgénicos.

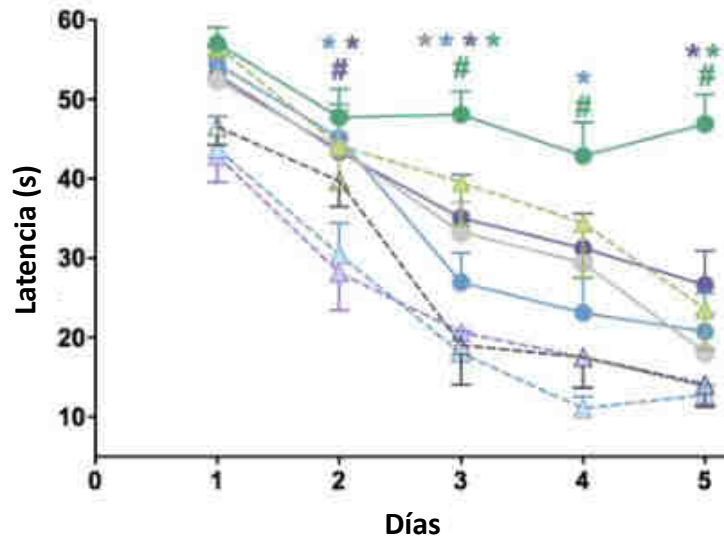
Para descartar problemas motores o visuales en los sujetos de estudio, se analizaron también la distancia total recorrida por los animales (Fig. 3.3.4A) y la velocidad de nado (Fig. 3.3.4B). No hubo diferencias entre ninguno de los grupos experimentales, ni entre genotipos en ninguno de estos dos parámetros, indicando así que las diferencias observadas durante la fase de aprendizaje y de retención son debidas exclusivamente a déficits cognitivos y no a problemas de motilidad en los ratones.

Con el objetivo de analizar la memoria asociativa, se llevó a cabo el test de miedo condicionado (CFC, del inglés *Contextual Fear Conditioning*) en el que tratamos de asociar un estímulo negativo (en este caso una pequeña descarga eléctrica) para el animal a un estímulo no negativo, como una habitación iluminada. Durante la fase de aprendizaje situamos al animal en el compartimento iluminado y éste recibe 3 descargas eléctricas. 24h tras el aprendizaje se llevó a cabo la fase de retención en la que el animal vuelve a la misma habitación iluminada y durante 5 minutos se contabilizan las veces que el animal se queda completamente paralizado por el miedo, entendiendo este parámetro como el comportamiento por el cual el animal se queda totalmente inmóvil a excepción de la respiración. De esta manera podemos determinar si el animal recuerda o no que en la habitación iluminada recibió varias descargas eléctricas. Tras la fase experimental se calcula el tiempo total que el animal pasó paralizado por el miedo, expresándolo en unidades de tanto por ciento.

Se observó una reducción significativa en el índice de asociación tanto en el grupo 3xTgAD-Tom-sh respecto al nTg-Tom-sh como en el 3xTgAD-Tollip-sh respecto al nTg-Tollip-sh (Fig. 3.3.5), indicando así la existencia en estos animales de un déficit cognitivo asociado a la región hipocampal y a la amígdala.

En resumen, el silenciamiento génico de Tom1 o de Tollip en el modelo 3xTgAD dio como resultado la aparición de déficits cognitivos asociados fundamentalmente a la región hipocampal. Por el contrario, parece que la sobre-expresión de Tom1 mejora notablemente la memoria espacial en los animales 3xTgAD-Tom-AAV, restaurando sus valores a niveles similares a los de animales no transgénicos.

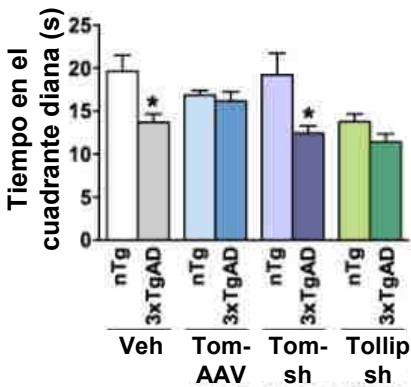
**A**



- △ nTg: Vehículo
- △ nTg: AAV1-CAG-mTOM1-WPRE
- △ nTg: AAV1-GFP-U6-mTOM1-shRNA
- △ nTg: AAV1-GFP-U6-mTollip-shRNA
- 3xTgAD: Vehículo
- 3xTgAD: AAV1-CAG-mTOM1-WPRE
- 3xTgAD: AAV1-GFP-U6-mTOM1-shRNA
- 3xTgAD: AAV1-GFP-U6-mTollip-shRNA

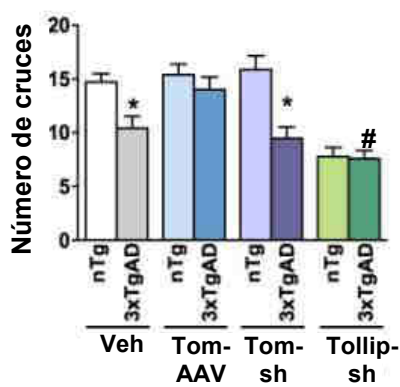
N=10/grupo; ADEVA de dos vías;  $F(28, 252) = 1485$ ;  $P = 0,0604$ ;  
 Test de Bonferroni, \*  $p < 0,05$ , #  $p < 0,05$

**B**



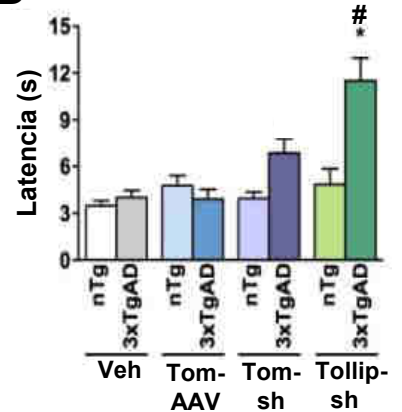
N=10/grupo; ADEVA de una vía;  
 $F(7, 68) = 5,036$ ;  $P = 0,0001$ ;  
 Test de Tukey, \*  $p < 0,05$

**C**



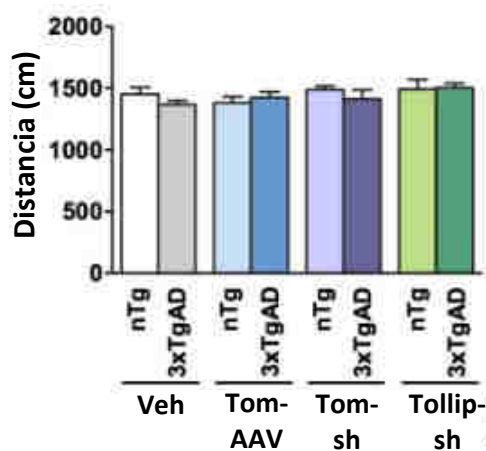
N=10/grupo; ADEVA de una vía;  
 $F(7, 66) = 14,77$ ;  $P < 0,0001$ ;  
 Test de Tukey, \*  $p < 0,05$  #  $p < 0,05$

**D**

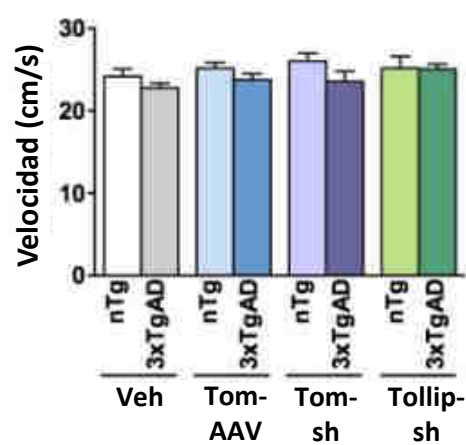


N=10/grupo; ADEVA de una vía;  
 $F(7, 61) = 7,317$ ;  $P < 0,0001$ ;  
 Test de Tukey, \*  $p < 0,05$  #  $p < 0,05$

**Figura 3.3.3. La sobreexpresión de Tom1 revierte los déficits de memoria espacial en el modelo 3xTgAD mientras que el silenciamiento de Tollip los agrava significativamente.** Estudio mediante laberinto acuático de Morris. A, representación de las latencias de cada grupo por día de aprendizaje. B, representación del tiempo invertido en el cuadrante diana por los distintos grupos durante la prueba (fase de obtención). C, representación del número de veces que el animal cruza por el lugar donde estaba la plataforma. D, representación del tiempo empleado para encontrar la plataforma en cada uno de los grupos. Los animales 3xTgAD inyectados con Tom-AAV muestran en cada uno de los parámetros analizados un comportamiento muy similar a los no transgénicos (nTg) que recibieron el mismo virus. Los 3xTgAD Tom-sh muestran un descenso significativo en el tiempo que pasaron en el cuadrante diana, así como el número de veces que cruzaron por la plataforma con respecto a los nTg Tom-sh. Los animales inyectados con Tollip-sh muestran un fuerte descenso en ambos parámetros analizados al compararlo con el resto de grupos, aunque no hay diferencias entre 3xTgAD y nTg. Los animales 3xTgAD que recibieron Tom-sh o Tollip-sh muestran un aumento significativo en el tiempo para encontrar la plataforma respecto a los nTg de este grupo. \*  $p < 0,05$  cuando se comparan 3xTgAD con nTg del mismo grupo. #  $p < 0,05$  cuando se compara el 3xTgAD Tom-AAV con el resto de grupos del 3xTgAD. La estadística y significancia se indican en las gráficas. Resultados en colaboración con el laboratorio del Dr. Frank LaFerla (Universidad de California, Irvine, USA).

**A**

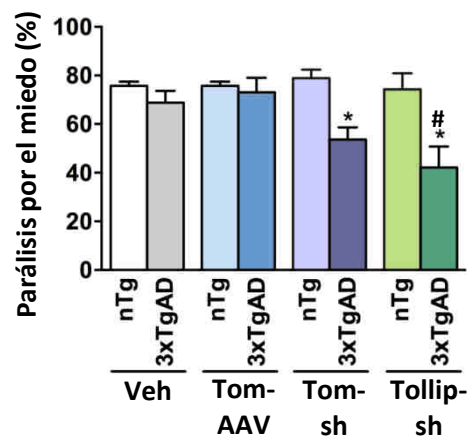
N=10/grupo; ADEVA de una vía;  $F(7, 72) = 0,9684$ ;  $P = 0,4608$ ; Test de Tukey,

**B**

N=10/grupo; ADEVA de una vía;  $F(7, 72) = 1,153$ ;  $P = 0,3406$ ; Test de Tukey,

**Figura 3.3.4. No existen diferencias de motilidad entre los ratones 3xTgAD y los no transgénicos (nTg) en la prueba del laberinto acuático de Morris . A, representación de la distancia total recorrida por los animales. B, representación de la velocidad de nado de cada uno de los grupos. No se detectan diferencias en la motilidad entre ninguno de los grupos analizados. La estadística y significancia se indican en la gráfica. Resultados en colaboración con el laboratorio del Dr. Frank LaFerla (Universidad de California, Irvine, USA).**





N=10/grupo; ADEVA de una vía;  $F(7, 71) = 5,585$ ;  $P < 0,001$ ; Test de Tukey, \*  $p < 0,05$  #  $p < 0,05$

**Figura 3.3.5. El silenciamiento de Tom1 o de Tollip induce deficiencias cognitivas en el modelo 3xTgAD en respuesta al miedo condicionado.** En la gráfica se representa el tiempo que el animal está paralizado por el miedo en respuesta a un estímulo adverso. Los ratones 3xTgAD inyectados con Tom-sh y Tollip-sh muestran una disminución significativa en la prueba de condicionamiento al miedo en comparación a los correspondientes controles nTg, indicando así dificultades para recordar el estímulo negativo que se les ha suministrado. La estadística y significancia se indican en las gráficas. Resultados obtenidos en colaboración con el laboratorio del Dr. Frank LaFerla (Universidad de California, Irvine, USA).

### 3.3.2. Análisis cualitativo de la expresión de Tom1 y Tollip en los diferentes grupos de tratamiento.

Con el fin de dilucidar el efecto de los distintos virus adeno-asociados en el patrón de expresión de Tom1 y Tollip, se realizó un análisis mediante técnicas inmunohistoquímicas en los diferentes grupos experimentales 3xTgAD y sus respectivos controles nTg.

La tinción inmunohistoquímica con un anticuerpo para la proteína Tollip en secciones hipocampales de animales 3xTgAD y nTg que recibieron los virus adeno-asociados Ctrl-AAV, Tom-sh y Tom-AAV no mostró cambios aparentes entre los diferentes grupos (Fig. 3.3.6). El patrón de inmunomarcaje para Tollip fue homogéneo en toda la región hipocampal, a excepción de la región CA3 que en algunos grupos aparece con una inmunorreactividad ligeramente mayor. Además, se observó la presencia de inmunotinción alrededor de las placas amiloides en los 3xTgAD inyectados con Ctrl-AAV y Tom-sh (Fig. 3.3.6D y E; detalle en inserto de la Fig. 3.3.6D).

Todo ello indica que la reacción inmunohistoquímica se ha desarrollado correctamente, aunque las posibles diferencias de Tollip entre los distintos grupos no han sido visibles mediante esta técnica. Esto puede ser debido a la localización endosomal de Tollip, lo cual dificulta la accesibilidad al antígeno. Estudios mediante Western blots serían necesarios para poder cuantificar posibles diferencias en la expresión de esta proteína.

A continuación, se analizó el patrón de expresión de Tom1 en los diferentes grupos experimentales. En este caso la tinción inmunohistoquímica se llevó a cabo con un anticuerpo para la proteína Tom1 en secciones hipocampales de ratones pertenecientes a los grupos mencionados previamente. Se observaron pequeñas diferencias de inmunorreactividad entre los 3xTgAD-Ctrl-AAV y nTg-Ctrl-AAV, siendo los ratones no transgénicos los que mostraron mayor reactividad para Tom1 en el hipocampo (Fig. 3.3.7A y D) tal y como esperábamos, ya que resultados preliminares del grupo del Dr. LaFerla indicaron que los niveles de Tom1 están reducidos en los animales 3xTgAD respecto a los nTg. Se observó también un aumento notable en la expresión de Tom1 en los animales 3xTgAD-Tom-AAV al compararlo de nuevo con el resto de 3xTgAD y con el grupo control nTg-Tom-AAV (Fig. 3.3.7C y F). El patrón de inmunomarcaje observado en el 3xTgAD-Tom-AAV (Fig. 3.3.7F) no fue homogéneo como en los demás grupos, mostrando la región CA1-CA2-CA3 una tinción muy intensa, que contrasta con la región del GD en la que no se observó marcaje. Posteriormente, y mediante la inmunofluorescencia para Tom1 en diferentes animales 3xTgAD-Tom-AAV (Fig. 3.3.9A1), se confirmó el patrón de inmunomarcaje. Las inyecciones estereotáxicas se realizaron en la región hipocampal CA1, por lo que resulta lógico pensar que la propia difusión del virus adeno-asociado es la principal causante de estas diferencias en la expresión de Tom1. Además, las imágenes microscópicas mostraron también acúmulos inmunopositivos para Tom1 alrededor

de las placas amiloides que comienzan a aparecer en el subículo de los animales triple transgénicos (Fig. 3.3.7D y E; detalle en el inserto de la Fig. 3.3.7D).

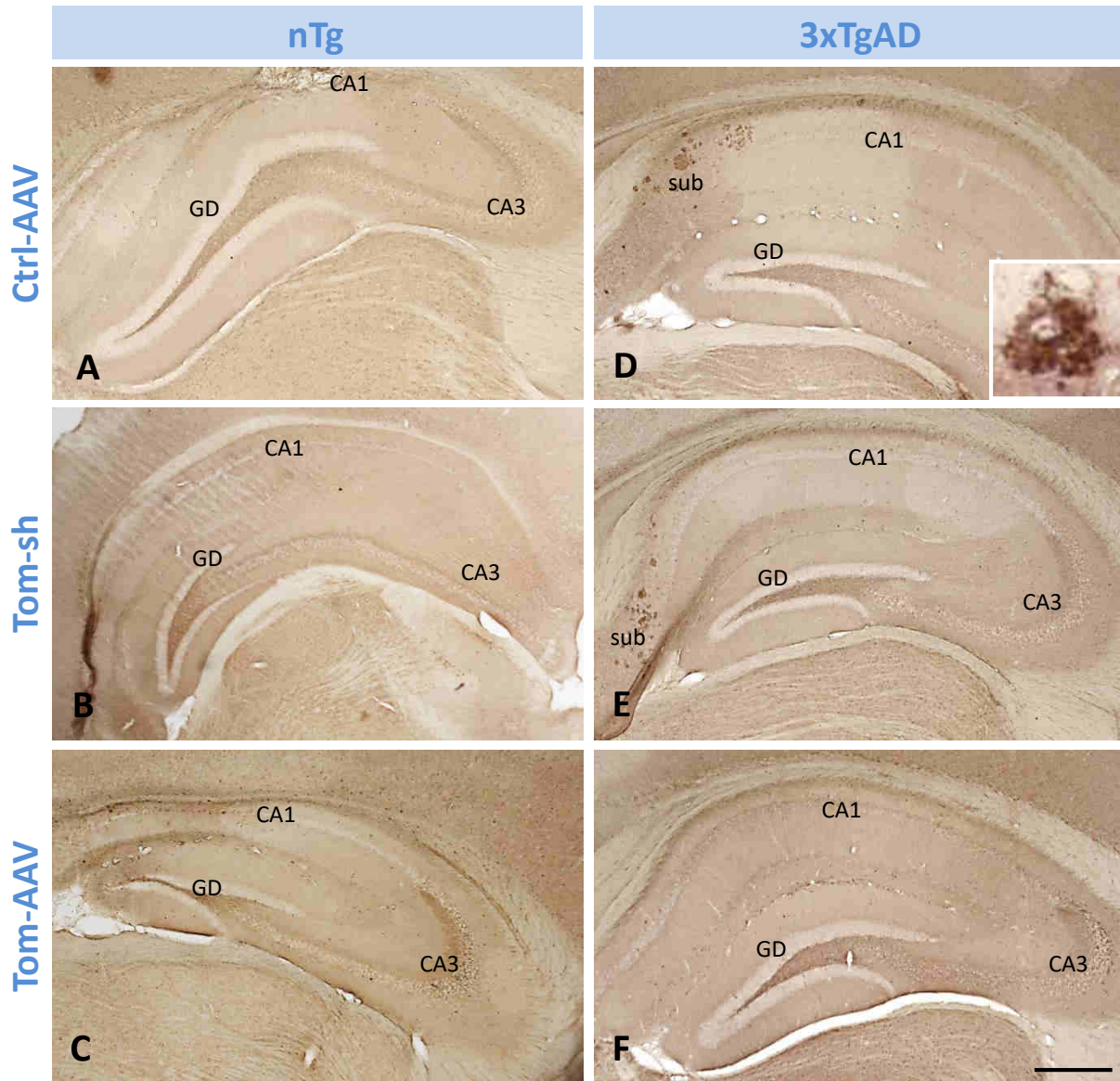
En la Fig. 3.3.8 se muestran los controles a los experimentos de inmunohistoquímica para Tollip y Tom1. Así, mediante el inmunomarcaje para Tollip en animales nTg-Tollip-sh y 3xTgAD-Tollip-sh (Fig. 3.3.8A-B) y Tom1 en ratones nTg-Tom-sh y 3xTgAD-Tom-sh (Fig. 3.3.8C-D) se observó la reducción de la inmunorreactividad para estas proteínas tras haber llevado a cabo el respectivo silenciamiento génico.

En relación a lo descrito anteriormente en la Fig. 3.3.7 acerca de la presencia de Tom1 alrededor de las placas amiloides, decidimos analizar la relación entre ambos. Para ello realizamos un marcaje inmunofluorescente doble con Tom1 y 6E10 como marcador de A $\beta$  en animales 3xTgAD-Tom-AAV. Las imágenes obtenidas mediante microscopía láser confocal mostraron estructuras globulares inmunopositivas para Tom1 alrededor de las placas de A $\beta$  (positivas para 6E10) (Fig. 3.3.9). Estas estructuras son en apariencia muy similares a las neuritas distróficas que habitualmente se encuentran rodeando las placas de tipo neurítico. En apoyo a esto, se encontró además que algunas de estas estructuras positivas para Tom1 eran también positivas para 6E10, que reconoce no sólo A $\beta$  sino también a las formas procesadas y sin procesar de APP (Fig. 3.3.9C1-C3). Las neuritas distróficas acumulan APP, por tanto, las estructuras Tom1-positivas y 6E10-positivas se corresponden con estas estructuras neuronales patológicas.

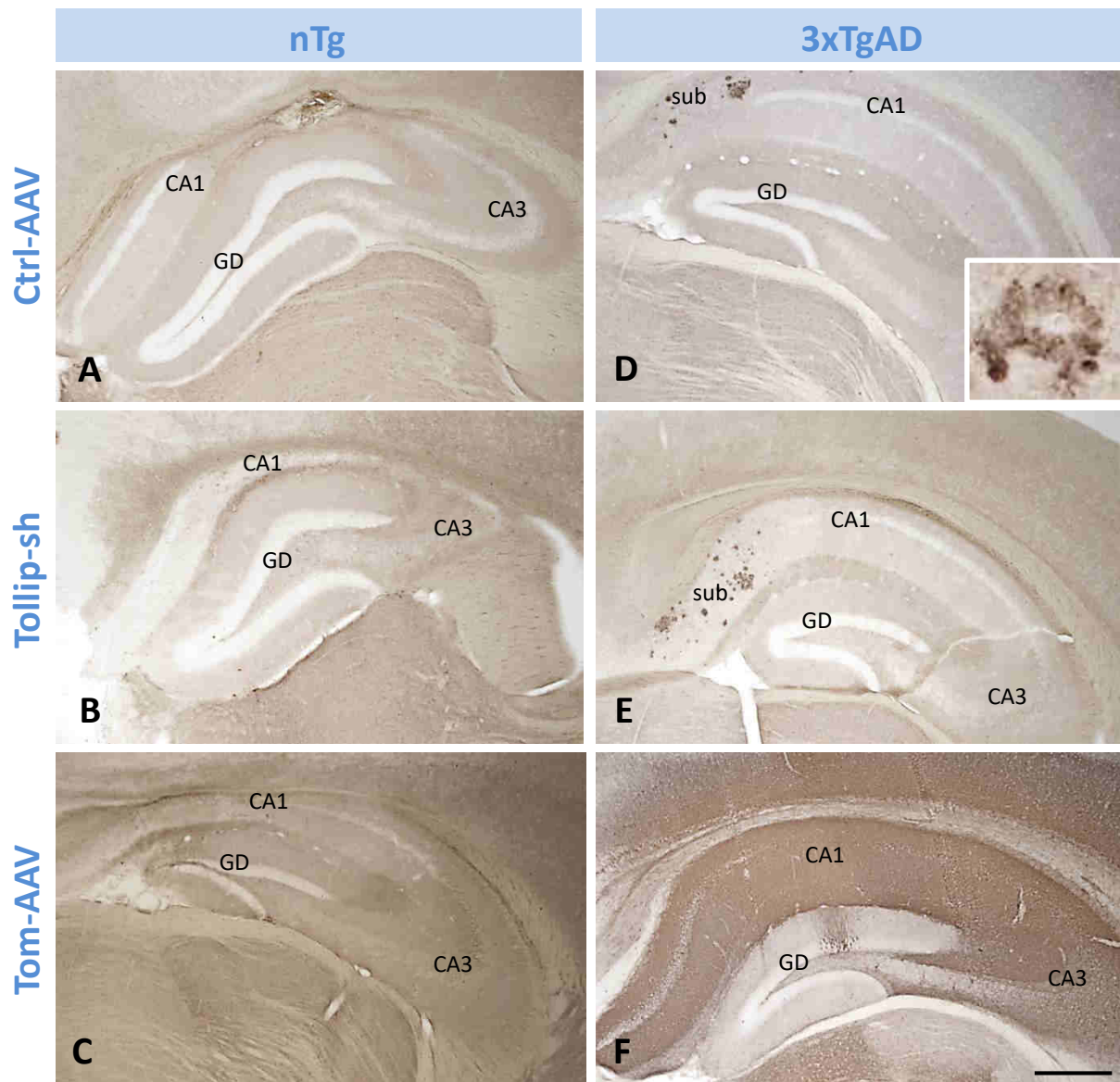
### 3.3.3. Aumento de la expresión de IL-1R1 en animales 3xTgAD-Tollip-sh y 3xTgAD-Tom-sh.

Con el objetivo de conocer el papel de Tom1/Tollip en la modulación de la respuesta inflamatoria mediada por la interleuquina-1 $\beta$  y debido al papel crucial que tiene IL-1R1 en su cascada de señalización (O'Neill 2008), analizamos la expresión de este receptor en el hipocampo de ratones triple transgénicos de los diferentes grupos experimentales inyectados con los virus adeno-asociados.

Para ello, se realizó un análisis inmunohistoquímico con un anticuerpo para IL-1R1 en secciones hipocampales de ratones 3xTgAD inyectados con Ctrl-AAV, Tollip-sh, Tom-sh y Tom-AAV. Las imágenes obtenidas mediante microscopía de campo claro mostraron una mayor inmunorreactividad tanto en las células piramidales de la región CA1 como en las células granulares del giro dentado de los animales 3xTgAD-Tollip-sh y 3xTgAD-Tom-sh frente al grupo control 3xTgAD-Ctrl-AAV y al grupo con sobreexpresión de Tom1, 3xTgAD-Tom-AAV (Fig. 3.3.10A-D).



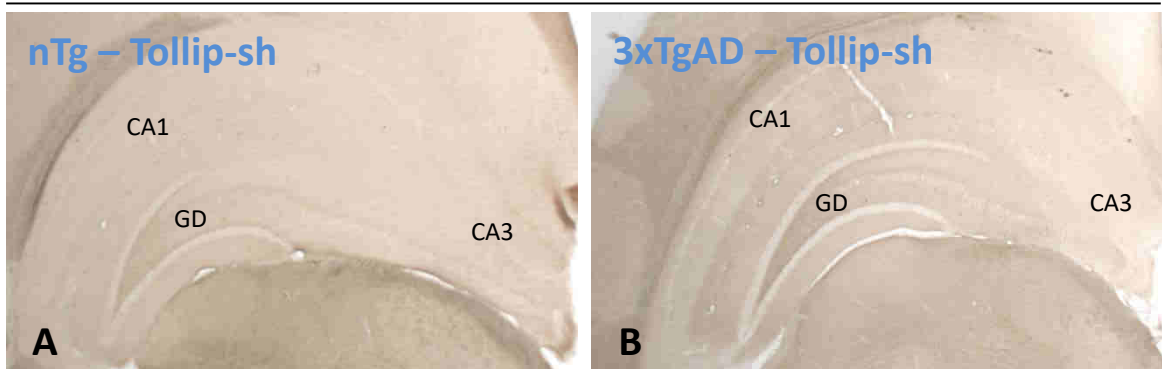
**Figura 3.3.6. Expresión de la proteína Tollip en el hipocampo de animales 3xTgAD y no transgénicos (nTg) en los diferentes grupos experimentales.** Inmunohistoquímica a microscopía óptica de campo claro para la proteína Tollip en ratones nTg (A-C) y 3xTgAD (E-F) en los grupos con vehículo (Ctrl-AAV; A y D), silenciamiento génico de Tom1 (Tom-Sh; B y E) y sobreexpresión de Tom1 (Tom-AAV; C y F). No se detectan diferencias en la expresión de Tollip entre los diferentes grupos experimentales. En el inserto de D se muestra el marcaje para Tollip alrededor de placas amiloides. GD, giro dentado; CA1, CA3, regiones del asta de Ammon; sub, subículo. Barra de escala: 400  $\mu$ m



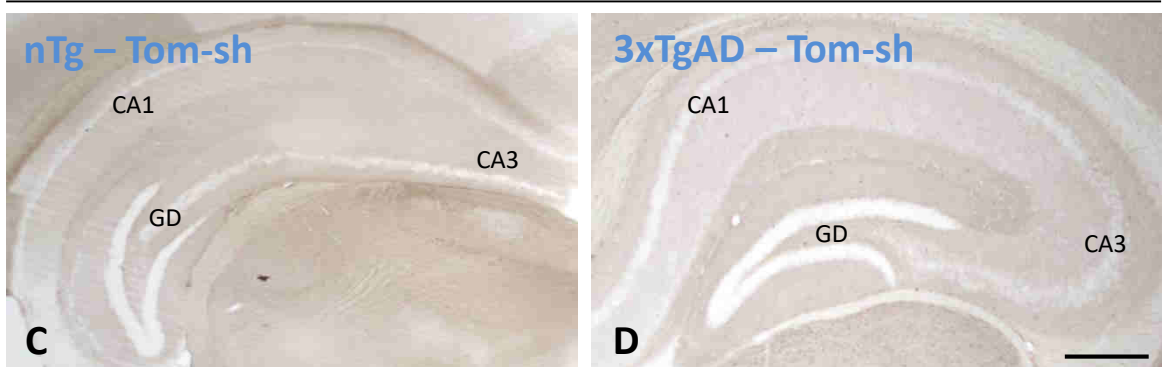
**Figura 3.3.7. Expresión de la proteína Tom1 en el hipocampo de animales 3xTgAD y no transgénicos (nTg) en los diferentes grupos experimentales.** Inmunohistoquímica para Tom1 en ratones nTg (A-C) y 3xTgAD (D-F) en los grupos con vehículo (Ctrl-AAV; A y D), silenciamiento génico de Tollip (Tollip-sh; B y E) y sobre-expresión de Tom1 (Tom-AAV; C y F). Los animales 3xTgAD (D) expresan menos Tom1 que los no transgénicos (A). En los animales inyectados con Tom-AAV (C y F) aumenta notablemente su expresión. En el inserto de D se muestra la acumulación de Tom1 alrededor de placas amiloides. GD, giro dentado; CA1, CA3, regiones del asta de Ammon; sub, subículo. Barra de escala: 400  $\mu$ m



## Tollip

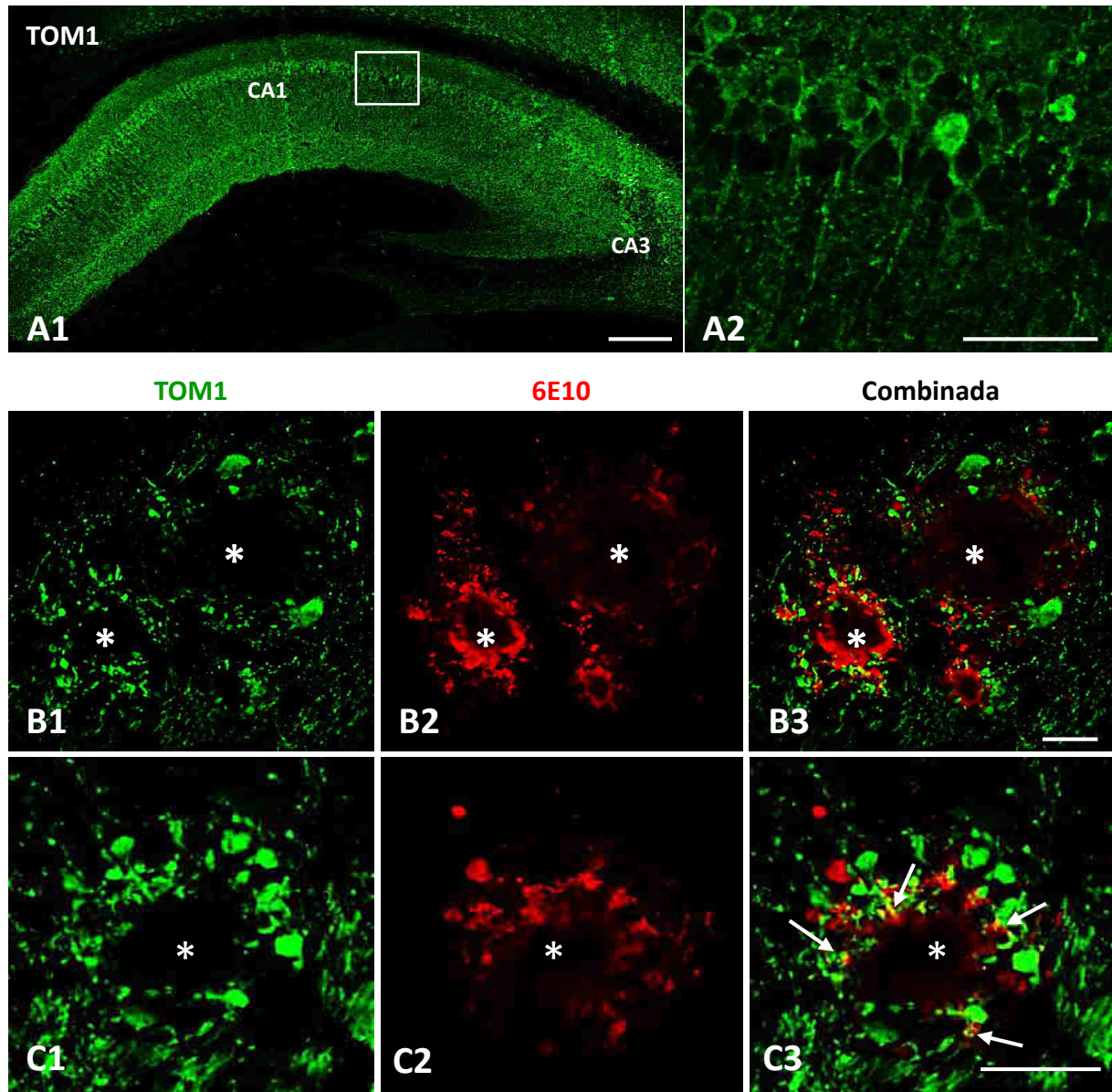


## Tom1

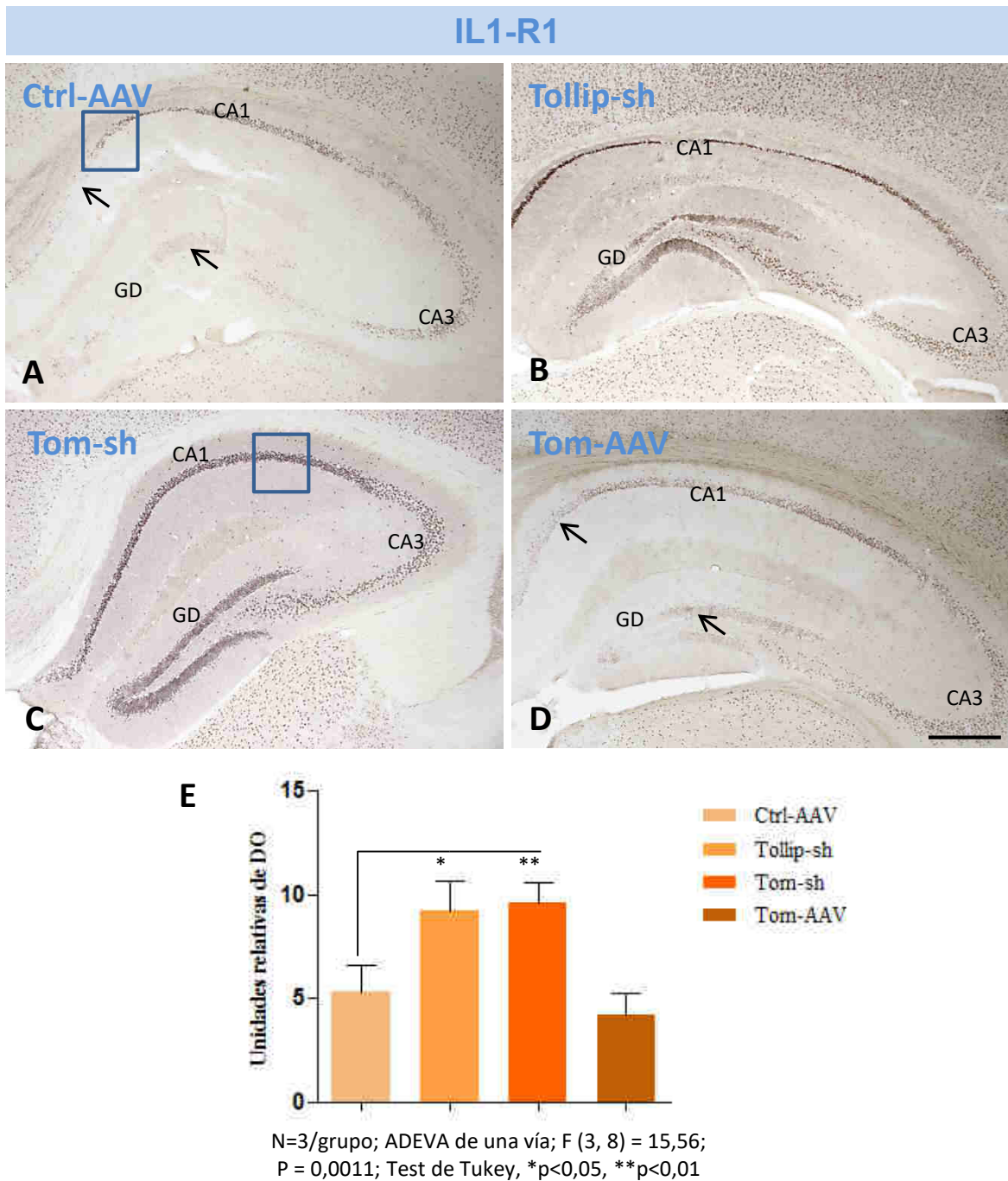


**Figura 3.3.8. Controles inmunohistoquímicos del silenciamiento génico para Tollip (A-B) y Tom1 (C-D).** Inmunohistoquímica para Tollip y Tom1 en el hipocampo de animales nTg-Tollip-sh (A), 3xTgAD-Tollip-sh (B), nTg-Tom-sh (C) y 3xTgAD-Tom-sh (D). La inmunorreactividad para estas proteínas se encuentra significativamente disminuida en los correspondientes grupos silenciados de ambos genotipos. GD, giro dentado; CA1, CA3, regiones del asta de Ammon. Barra de escala: 400  $\mu$ m

### 3xTgAD Tom-AAV



**Figura 3.3.9. Las neuronas piramidales del hipocampo de ratones 3xTgAD Tom-AAV sobreexpresan Tom1.** Inmunofluorescencia simple para Tom1 (A1 y A2) y doble para Tom1 y 6E10 (B1-3 y C1-3). En los ratones 3xTgAD inyectados con Tom-AAV se incrementa significativamente la expresión de Tom1 en las células piramidales del hipocampo (A1 y detalle de la capa piramidal en A2). Los depósitos de A $\beta$  (indicados con asteriscos en B2 y C2) se encuentran rodeados de neuritas distróficas inmunopositivas para Tom1, algunas de las cuales son también positivas para 6E10 (C3; flechas). CA1, CA3, regiones del asta de Ammon. Barras de escala: A1: 200  $\mu$ m; A2: 50  $\mu$ m; B1-C3: 20  $\mu$ m



**Figura 3.3.10. El silenciamiento génico de Tollip (Tollip-sh) y de Tom1 (Tom-sh) induce un incremento de la expresión de receptor tipo I de interleuquina 1 (IL-1R1) en el hipocampo del modelo 3xTgAD.** Inmunohistoquímica para IL-1R1 en animales 3xTgAD de los diferentes grupos experimentales: Ctrl-AAV (A), Tollip-sh (B), Tom-sh (C) y Tom-AAV (D). La capa piramidal de la región CA1 así como la capa granular del giro dentado muestran una intensa inmunorreactividad en los grupos Tollip-sh y Tom-sh respecto al grupo control. El estudio cuantitativo (E) de la intensidad de la inmunotinción (densidad óptica, DO) para IL-1R1 revela un aumento significativo en los grupos Tollip-sh y Tom-sh respecto al grupo control. La estadística y significancia se indican en la gráfica. GD, giro dentado; CA1, CA3, regiones del asta de Ammon. Barra de escala: 400  $\mu$ m

El siguiente paso consistió en la cuantificación de la inmunotinción para IL-1R1 en las secciones de tejido por análisis de imagen (densidad óptica) con el objetivo de corroborar cuantitativamente las observaciones realizadas previamente. El estudio cuantitativo mostró un aumento significativo del inmunomarcaje para IL-1R1 en los grupos 3xTgAD-Tollip-sh ( $174,45 \pm 27,7\%$ ) y 3xTgAD-Tom-sh ( $182,26 \pm 17,72\%$ ) frente al grupo control 3xTgAD-Ctrl-AAV (Fig. 3.3.10E). Además, se observó una ligera disminución del 21% (no significativa estadísticamente) en la densidad óptica al comparar el grupo 3xTgAD-Tom-AAV con el grupo control 3xTgAD-Ctrl-AAV.

En su conjunto, estos datos confirman la relación directa entre el receptor de interleuquina-1 y el sistema Tom1/Tollip.

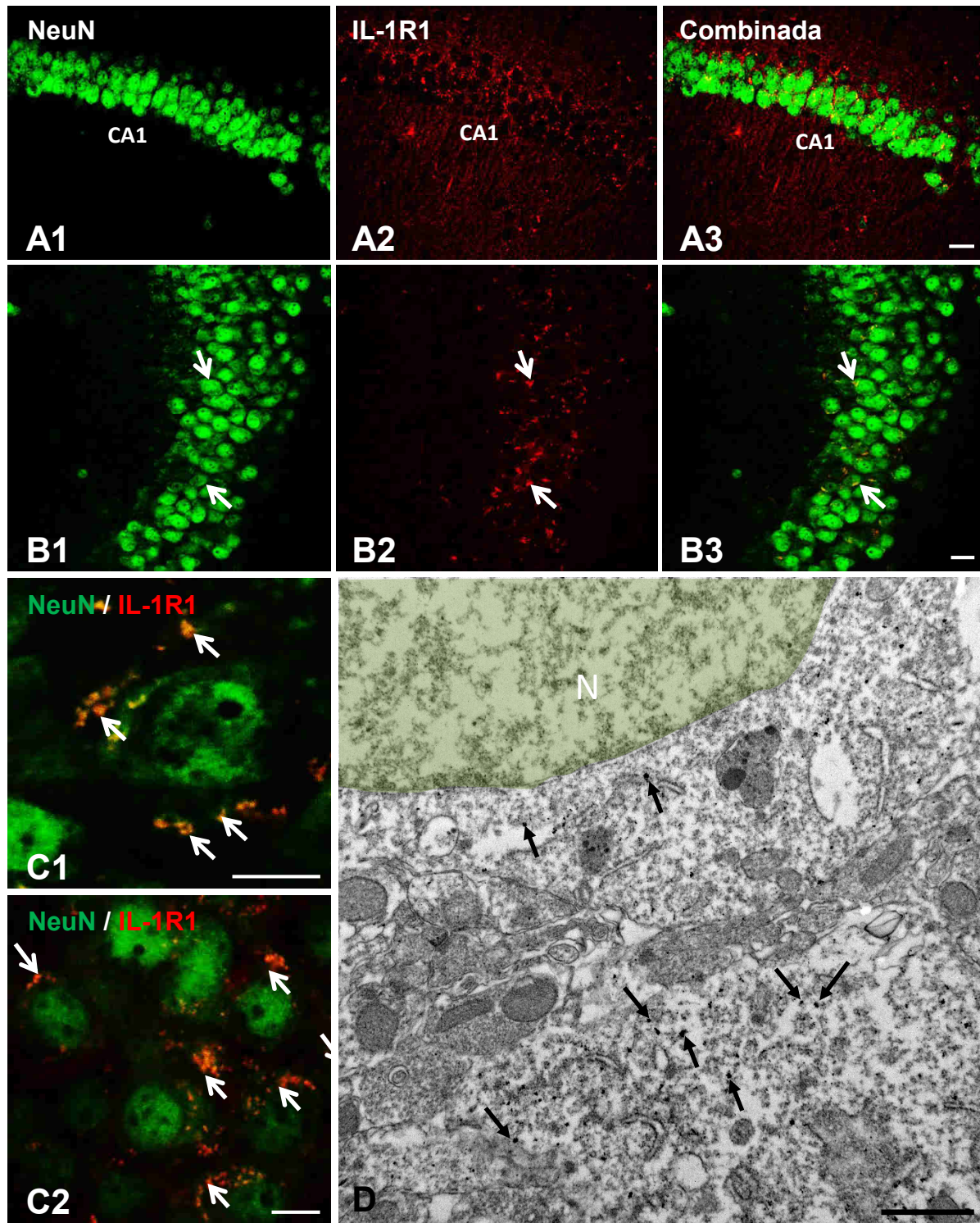
#### 3.3.4. Localización celular y subcelular del receptor de interleuquina 1 (IL-1R1).

Numerosos estudios acerca del receptor de interleuquina-1, así como de la propia IL- $1\beta$ , se han llevado a cabo en los últimos años. Diferentes autores han tratado de esclarecer la localización celular de este receptor en el tejido cerebral, sin embargo la gran mayoría de estos estudios han sido llevados a cabo modelos animales de rata (Ericsson et al. 1995; Friedman 2001). Por ello, y debido a la importancia del IL-1R1 en el presente estudio de modulación de la respuesta inmune y su relación con la patología Alzheimer, se llevaron a cabo diferentes experimentos con el objetivo de visualizar este receptor y tratar de establecer su localización celular y subcelular en el modelo triple transgénico 3xTgAD.

En primer lugar, se realizó una inmunofluorescencia doble para IL-1R1 y NeuN (marcador neuronal) en secciones hipocampales de animales 3xTgAD de los cuatro grupos experimentales. Las imágenes de microscopía láser confocal muestran expresión de IL-1R1 en neuronas principales de la región CA1 (Fig. 3.3.11A1-A3, detalle en C1) y CA3 (Fig. 3.3.11B1-B3, detalle en C2) del hipocampo (ver Apdo. 3.3.3). A pesar de que ambas regiones presentan expresión del receptor, son las neuronas piramidales de CA1 las que muestran una mayor inmunotinción con este anticuerpo en todos los grupos.

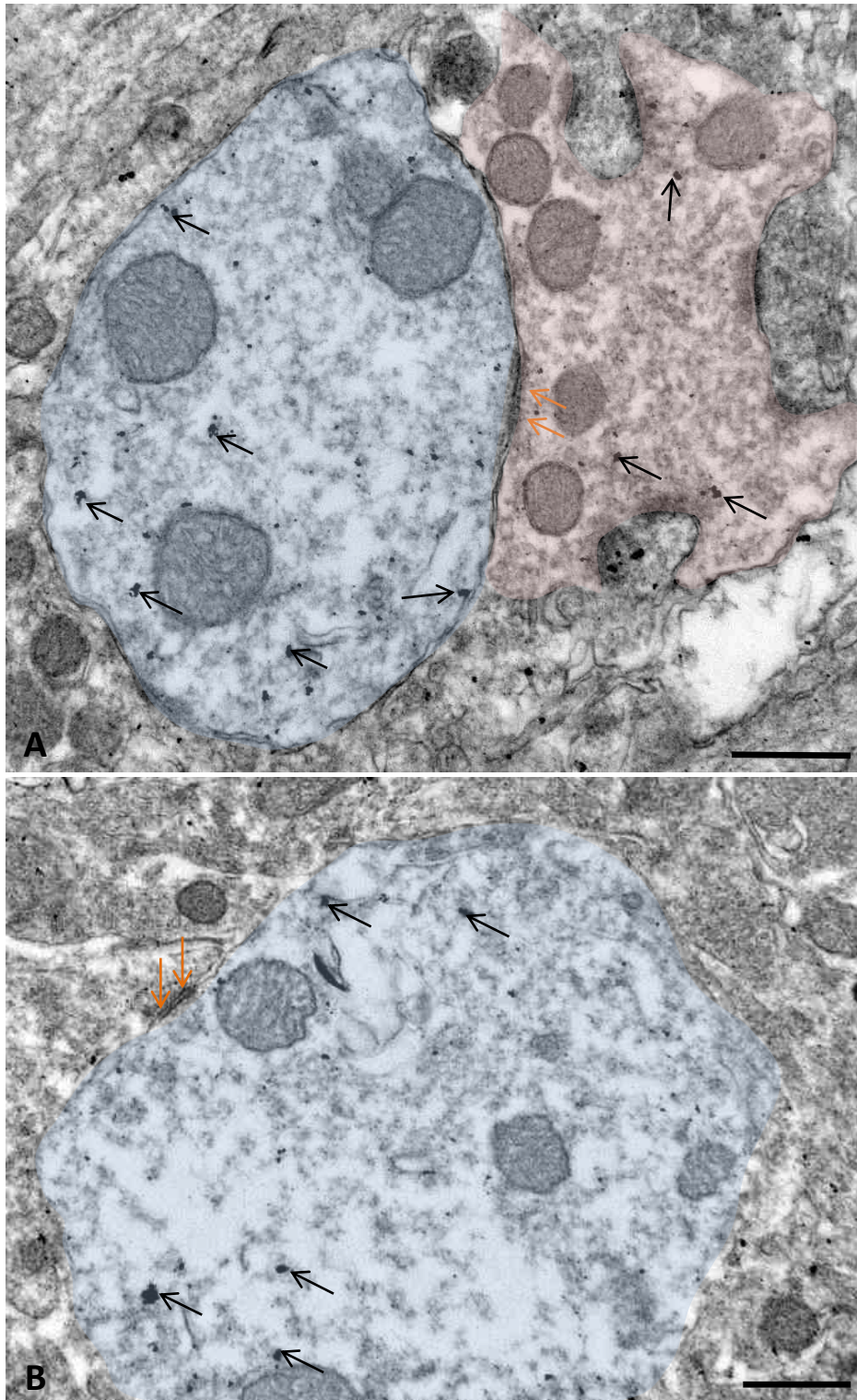
A continuación, se realizó inmunomarcaje para microscopía electrónica de transmisión (*inmuno-oro*) con un anticuerpo para IL-1R1. En la Fig. 3.3.11D se muestra una célula piramidal con marcaje citoplasmático para el receptor de IL-1, confirmando así los estudios previos mediante microscopía confocal. Además, se determinó la presencia del receptor en botones pre-sinápticos, aunque de forma mayoritaria en se localizó en porciones postsinápticas (Fig. 3.3.12). Es de destacar, que el inmunomarcaje (cantidad de partículas de oro) fue notablemente superior en estas regiones postsinápticas que en los pocos botones pre-sinápticos que se observaron (Fig. 3.3.12).





**Figura 3.3.11. Expresión del receptor tipo I de interleuquina 1 (IL-1R1) en neuronas del hipocampo del modelo 3xTgAD.** A-C, doble marcaje inmunofluorescente para NeuN (verde) e IL-1R1 (rojo) a microscopía confocal en animales 3xTgAD Ctrl-AAV. La expresión de este receptor se localiza en la capa piramidal de la región CA1 (A1-A3; detalle en C1) y CA3 (B1-B3; detalle en C2). D, inmuno-oro para IL-1R1 a microscopía electrónica de transmisión; se muestra una célula piramidal (N indica el núcleo coloreado de verde) con marcaje en el citoplasma (las flechas señalan partículas de oro coloidal). CA1, CA3, regiones del asta de Ammon. Barras de escala: A1-A3, B1-B3: 20  $\mu\text{m}$ ; C1-C2: 10  $\mu\text{m}$ ; D: 1  $\mu\text{m}$





**Figura 3.3.12. Localización ultraestructural del receptor tipo I de interleuquina 1 (IL-1R1) en el hipocampo del modelo 3xTgAD.** Inmuno-oro a microscopía electrónica de transmisión para IL-1R1 en el hipocampo de animales 3xTgAD. El marcaje de oro coloidal (flechas) se encuentra localizado mayoritariamente en elementos post-sinápticos (A y B; coloreados de azul), aunque también está presente en algunos botones pre-sinápticos (A; coloreado de rosa). Las flechas naranjas señalan la zona activa de la sinapsis. Barras de escala: A y B, 0,5  $\mu$ m

El estudio ultraestructural reveló también diferencias en el patrón de distribución del receptor IL-1R1 en el interior de las dendritas post-sinápticas entre los diferentes grupos de inyección. De esta manera, los animales 3xTgAD-Ctrl-AAV, así como los 3xTgAD-Tom-AAV mostraron un inmunomarcaje para IL-1R1 principalmente en el interior de las dendritas post-sinápticas (Fig. 3.3.13A y F). Sin embargo, los ratones 3xTgAD-Tollip-sh y 3xTgAD-Tom-sh presentaron mayoritariamente inmunomarcaje asociado a la membrana de las dendritas post-sinápticas. Por lo que además de diferencias cuantitativas para IL-1R1 entre los diferentes grupos de tratamiento (ver Apdo. 3.3.3), existen también diferencias en la distribución intracelular de IL-1R1, indicando un posible papel de Tom y Tollip en los procesos mediados por este receptor.

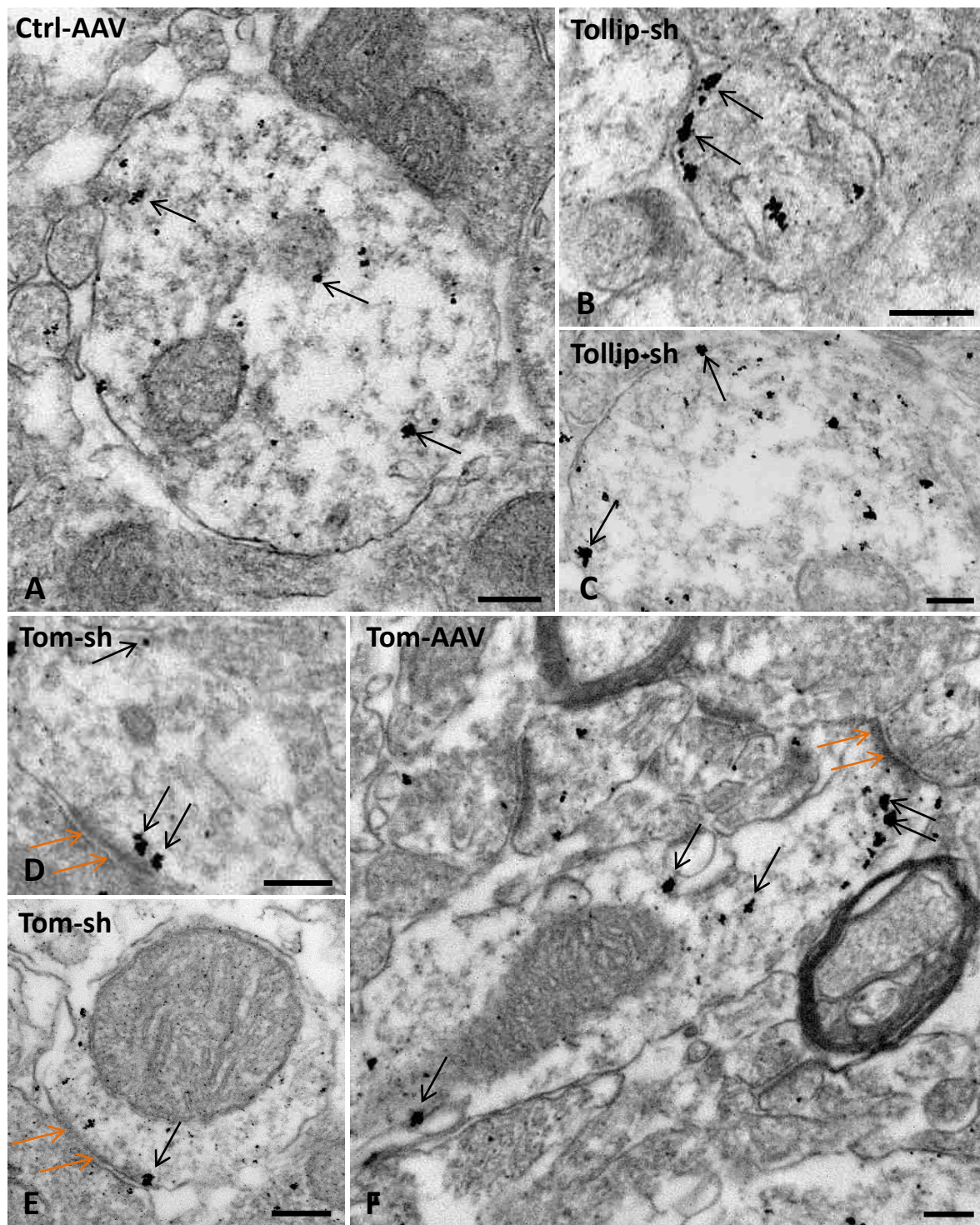
El siguiente paso consistió en determinar si las células gliales, responsables de la respuesta inmunitaria en el cerebro (microglía y astrogía) expresan IL-1R1. Las imágenes de microscopía confocal para la inmunofluorescencia doble de IL-1R1 e Iba1 (marcador microglial) en los distintos grupos de animales 3xTgAD, confirmó la expresión del receptor por parte de estas células (Fig. 3.3.14). Se observó la colocalización de estos dos marcadores en la gran mayoría de las células microgliales del hipocampo. El mismo procedimiento experimental fue llevado a cabo para las células astrogiales mediante el uso del marcador específico GFAP. Aunque se encontraron algunas células de la astrogía que mostraban colocalización con el IL-1R1 (Fig. 3.3.15), su número fue muy reducido, a diferencia de lo mostrado para la microglía.

En resumen, en todos los grupos experimentales analizados del modelo 3xTgAD existe expresión de IL-1R1 por parte de las neuronas principales del hipocampo, así como por la mayoría de células de la microglía y algunas células astrogiales. Además, en los grupos 3xTgAD-Tollip-sh y 3xTgAD-Tom-sh el receptor se encontró asociado fundamentalmente a la membrana de las dendritas post-sinápticas.

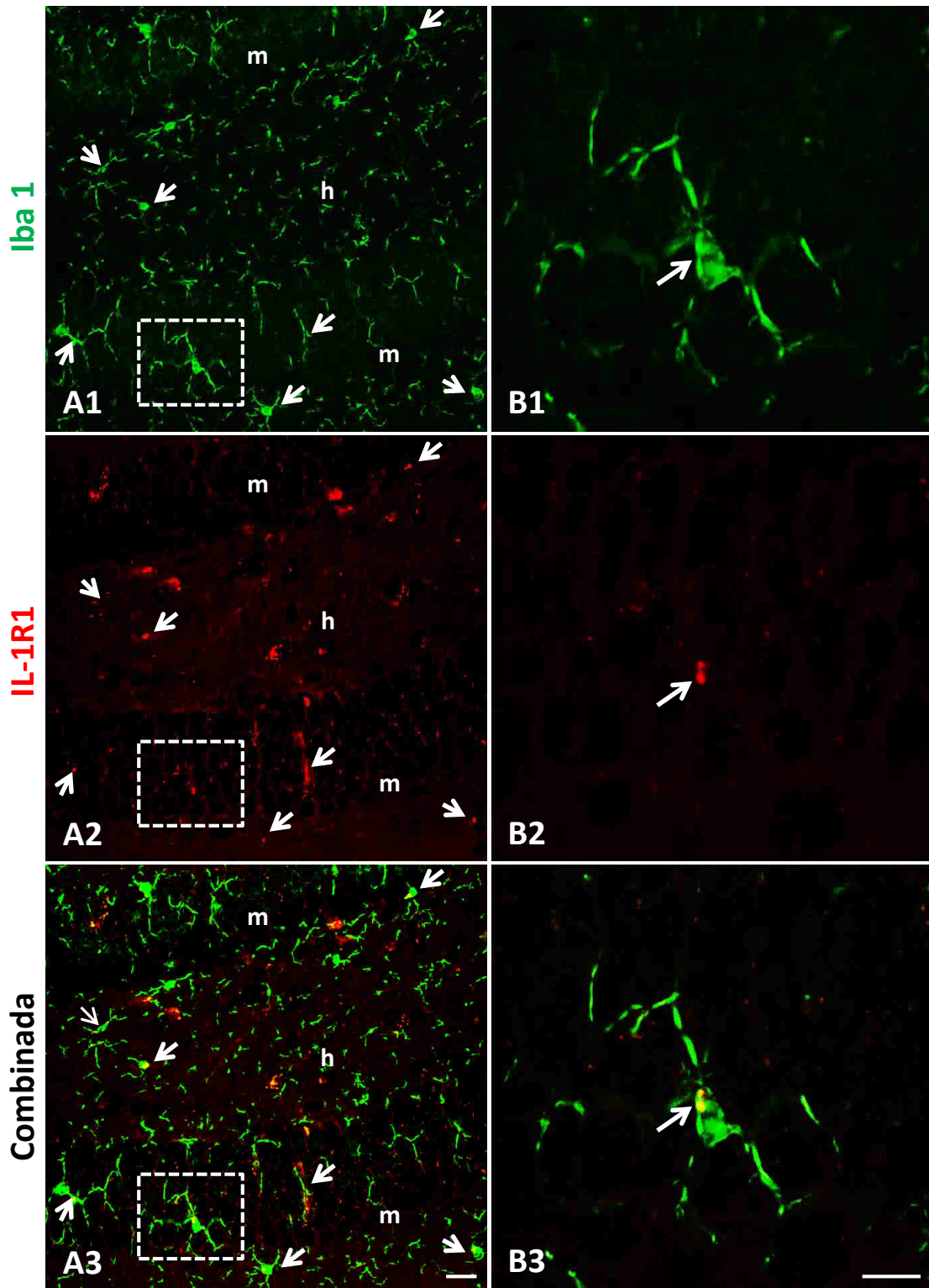
### 3.3.5. El silenciamiento génico de Tom1 y de Tollip produce un aumento de la patología amiloide en animales 3xTgAD.

El modelo animal 3xTgAD empleado en este estudio presenta acumulación intracelular de A $\beta$  desde los 3-4 meses de edad en áreas corticales, y a partir de los 6 meses en áreas hipocampales. Además, este modelo se caracteriza por desarrollar placas amiloides extracelulares a partir de los 6 meses de edad en áreas corticales, apareciendo los primeros depósitos de A $\beta$  en el hipocampo a los 12 meses aproximadamente (Oddo et al. 2003). El efecto de la respuesta inflamatoria sobre la patología amiloide no es conocido, por tanto, en este estudio se planteó analizar el papel de la citoquina pro-inflamatoria IL-1 $\beta$  (mediante la modulación de su receptor IL-1R1 a través de la ruta endocítica mediada por Tom1/Tollip) en la acumulación de péptidos de A $\beta$  en el hipocampo de estos animales.

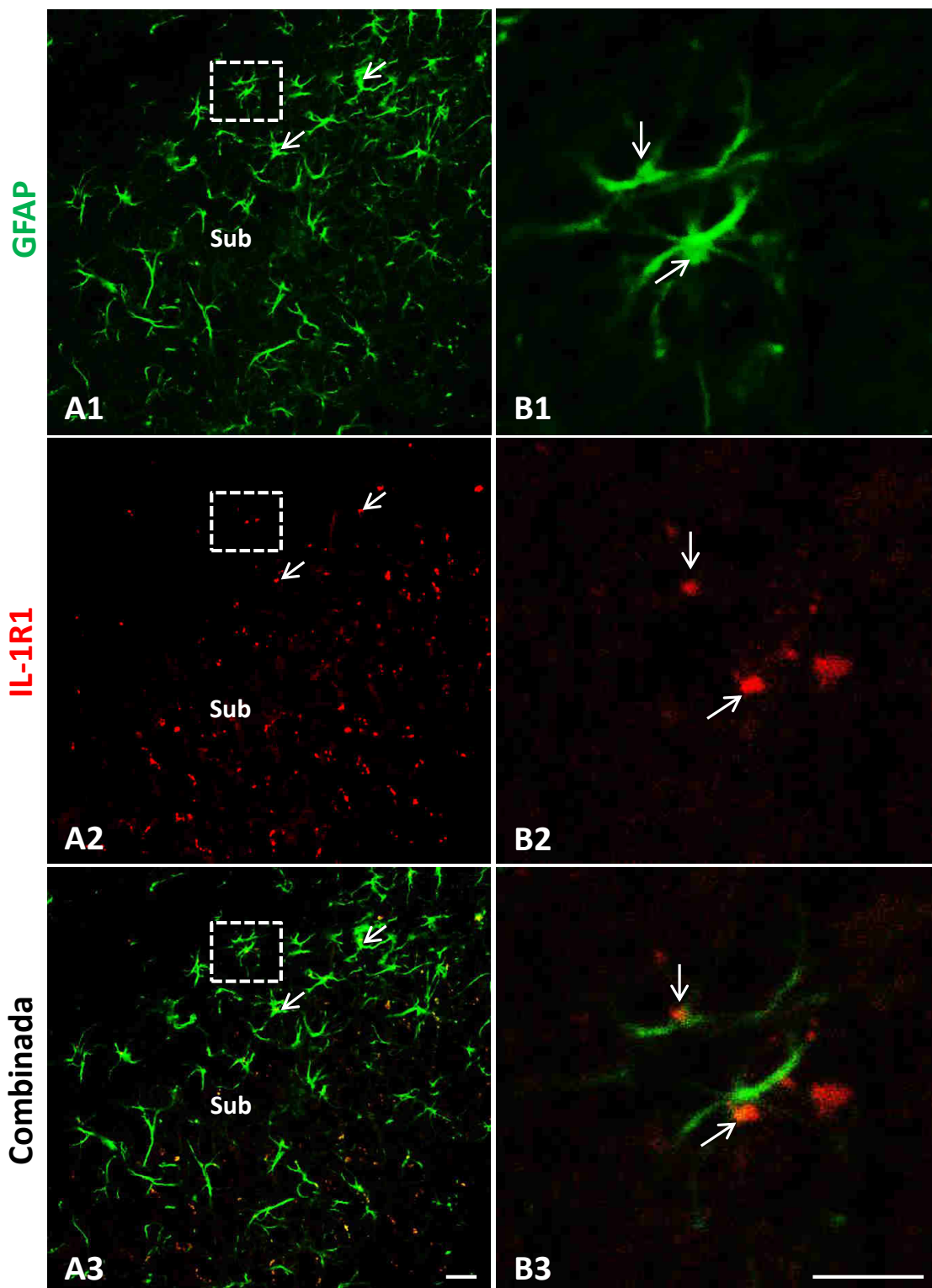




**Figura 3.3.13. El receptor tipo I de interleuquina 1 (IL-1R1) se localiza en la membrana plasmática y en el citoplasma neuronal.** Inmuno-oro a microscopía electrónica de transmisión para IL-1R1 en el hipocampo del modelo 3xTgAD en diferentes grupos experimentales. En el grupo control (A; Ctrl-AAV) el marcaje para IL-1R1 se encuentra principalmente en el citoplasma de las dendritas, al igual que ocurre en los animales inyectados con Tom-AAV (F). Sin embargo, en los grupos Tollip-sh (B-C) y Tom-sh (D-E) el receptor se asocia a la membrana plasmática, con frecuencia muy próxima a zonas sinápticas (D, E). Las flechas negras indican el marcaje con oro coloidal, y las flechas naranjas señalan zonas activas de las sinapsis. Barras de escala: A-D, F: 0,2  $\mu\text{m}$ ; E: 200 nm



**Figura 3.3.14. El receptor tipo I de interleuquina 1 (IL-1R1) se expresa en células microgliales.** Inmunofluorescencia doble para el marcador microglial Iba1 (verde; A1 y B1) y para IL-1R1 (rojo; A2 y B2) a microscopía confocal en el hipocampo de animales 3xTgAD. Como se ve en las imágenes combinadas (A3 y B3) este receptor se expresa en células microgliales (flechas). En B1-B3 se muestra a mayor detalle una célula microglial inmunopositiva para IL-1R1 (flecha). m: capa molecular del giro dentado; h: hilio del giro dentado. Barras de escala: A1-A3: 20  $\mu$ m; B1-B3: 10  $\mu$ m



**Figura 3.3.15. El receptor tipo I de interleuquina 1 (IL-1R1) se expresa en células astrogliales.** Inmunofluorescencia doble para el marcador astrogliar GFAP (verde; A1 y B1) y para IL-1R1 (rojo; A2 y B2) a microscopía cofocal en el hipocampo (subículo) del modelo 3xTgAD. Las imágenes combinadas (A3 y B3) muestran astrocitos con marcaje para IL-1R1 (flechas). En B1-B3 se muestra a mayor detalle astrocitos inmunopositivos para IL-1R1 (flechas). Barras de escala: A1-A3: 20  $\mu$ m; B1-B3: 10  $\mu$ m



El análisis inmunohistoquímico con un anticuerpo para el A $\beta$  (6E10), en secciones seriadas representativas de todo el hipocampo de los diversos grupos experimentales 3xTgAD (Ctrl-AAV, Tollip-sh, Tom-sh y Tom-AAV) mostró un incremento de la patología amiloide (tanto a nivel intracelular como en los depósitos extracelulares) en los animales 3xTgAD-Tollip-sh y 3xTgAD-Tom-sh respecto al grupo control 3xTgAD-Ctrl-AAV (Fig. 3.3.16). El aumento de la acumulación intracelular resultó muy evidente en la capa de células piramidales de la región CA1 del hipocampo de animales 3xTgAD-Tollip-sh respecto al grupo control (Fig. 3.3.16B; detalle en inserto), así como en los 3xTgAD-Tom-sh (Fig. 3.3.16C) aunque en menor medida. La inyección con el virus adeno-asociado Tom-AAV no parece inducir diferencias claramente visibles con respecto al grupo control (Fig. 3.3.16D).

Del mismo modo que para el A $\beta$  intracelular, los ratones 3xTgAD-Tollip-sh y 3xTgAD-Tom-sh mostraron un incremento en el número de placas con respecto a los animales controles (Fig. 3.3.16A-C). Las imágenes de detalles corroboraron este aumento, mostrando además un mayor tamaño de las placas en los animales 3xTgAD-Tollip-sh con respecto al grupo control (Fig. 3.3.16A1-B1). Los niveles de A $\beta$  en los animales inyectados con Tom-AAV fueron similares a los del grupo control (Fig. 3.3.16 A y D).

El estudio cuantitativo de la carga amiloide, así como del número de placas fue llevado a cabo en secciones de hipocampo de los mismos animales 3xTgAD analizados previamente. La cuantificación se realizó mediante el software de análisis de imagen Imaris (Bitplane) en un total de 4 secciones/animal, n=2-3 ratones/grupo de inyección, mediante el marcaje inmunofluorescente con el anticuerpo 6E10. En la Fig. 3.3.17A-D se muestran imágenes representativas de secciones de ratones 3xTgAD de los 4 diferentes grupos, corroborando así los resultados mostrados en la Fig. 3.3.16.

La cuantificación de la carga amiloide (Fig. 3.3.17E) reveló un incremento significativo ( $294,16 \pm 16,64\%$ ) en los niveles de A $\beta$  en los animales 3xTgAD-Tollip-sh respecto al grupo control. Sin embargo, el grupo tratado con Tom-sh, aunque muestra un incremento en la carga amiloide ( $149,3 \pm 49\%$ ) con respecto al grupo control, esta diferencia no resultó estadísticamente significativa. De nuevo se obtuvieron niveles inferiores de A $\beta$  en los animales 3xTgAD-Tom-AAV con respecto a los 3xTgAD-Ctrl-AAV (reducción del  $21,8 \pm 10,58\%$ ).

Para determinar si este aumento de la carga amiloide se debió a un incremento en el número de placas o en el tamaño de las mismas, se procedió a realizar el estudio cuantitativo del número total de placas de A $\beta$  en las mismas secciones y animales anteriores. Los resultados (Fig. 3.3.17F) mostraron un incremento significativo en el número de placas entre los 3xTgAD-Tollip-sh y 3xTgAD-Ctrl-AAV ( $244,65 \pm 22,72\%$ ), aunque este aumento no resultó tan drástico como el obtenido mediante la cuantificación de la carga amiloide. Además, el número de placas amiloides contabilizadas en los 3xTgAD-Tom-sh ( $233,92 \pm 68,18\%$ ) fue similar a las del 3xTgAD-Tollip-sh, aunque la variabilidad entre los animales Tom-sh podría ser la causa por la cual las diferencias no fueron estadísticamente significativas entre este grupo y el grupo control. No se observaron diferencias en el número de placas entre los animales 3xTgAD-Tom-

AAV (96,43±30,30%) y los 3xTgAD-Ctrl-AAV.

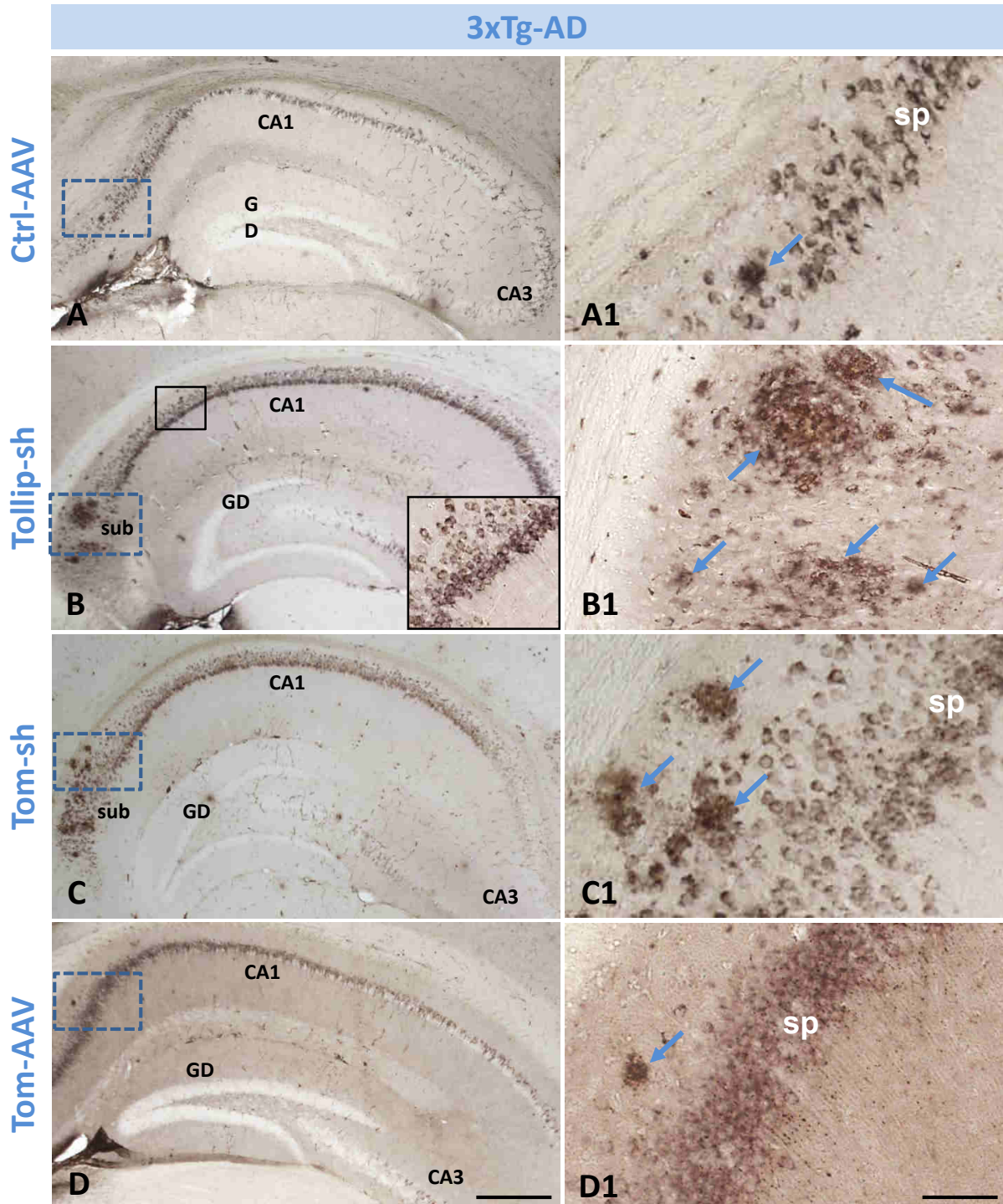
El análisis morfométrico de las placas amiloides (Fig. 3.3.18A) se realizó mediante su clasificación en 4 rangos de tamaño (<500, 500-1000, 1000-5000 y >5000  $\mu\text{m}^2$ ). Se observaron diferencias significativas entre los 3xTgAD-Ctrl-AAV y 3xTgAD-Tollip-sh para las placas de menor tamaño (<500  $\mu\text{m}^2$ ) (3xTgAD-Ctrl-AAV: 52,4±7,98%; 3xTgAD-Tollip-sh: 33,04±4,1%) y para las de tamaño medio-grande (1000-5000  $\mu\text{m}^2$ ) (3xTgAD-Ctrl-AAV: 16,11±6,40%; 3xTgAD-Tollip-sh: 35,09±1,19%). De esta manera, los animales inyectados con Tollip-sh presentan simultáneamente una reducción significativa del número de placas de pequeño tamaño (<500  $\mu\text{m}^2$ ) y un incremento (también significativo) en las de mayor tamaño (>500  $\mu\text{m}^2$ ) con respecto al grupo control. No se observaron otras diferencias significativas en el tamaño de placa entre grupos de tratamiento. La distribución del porcentaje de las placas según su tamaño (Fig. 3.3.18B) permite apreciar con mayor claridad estas diferencias entre los grupos experimentales.

Para corroborar los datos obtenidos por inmunohistoquímica y estudios cuantitativos de análisis de imagen, se cuantificó la cantidad de oligómeros de A $\beta$ 42 en la fracción soluble hipocampal de los 4 grupos de animales 3xTgAD mediante un ensayo ELISA. Se observó un incremento significativo en el nivel de oligómeros solubles en los animales 3xTgAD-Tom-sh con respecto al grupo control y al grupo inyectado con Tom-AAV (Fig. Suplementaria 3.6). Al contrario de lo esperado, los animales 3xTgAD-Tollip-sh no mostraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de A $\beta$ 42, aunque la cantidad de estos oligómeros solubles en la fracción S1 fue superior a la del grupo control.

Así, el silenciamiento génico de Tollip (grupo 3xTgAD-Tollip-sh) produce un incremento de la patología amiloide con respecto al grupo control, como consecuencia de un aumento en el número de placas y en el tamaño de éstas. El silenciamiento de Tom (grupo 3xTgAD-Tom-sh) produce un aumento del número de placas y de los niveles de A $\beta$ 42 oligomérico, aunque no se traduce un incremento significativo de la carga amiloide. Por último, la sobre-expresión de Tom (grupo 3xTgAD-Tom-AAV) produce una ligera disminución de la carga amiloide, aunque no se evidenciaron diferencias ni en el número de placas ni en el tamaño de las mismas.

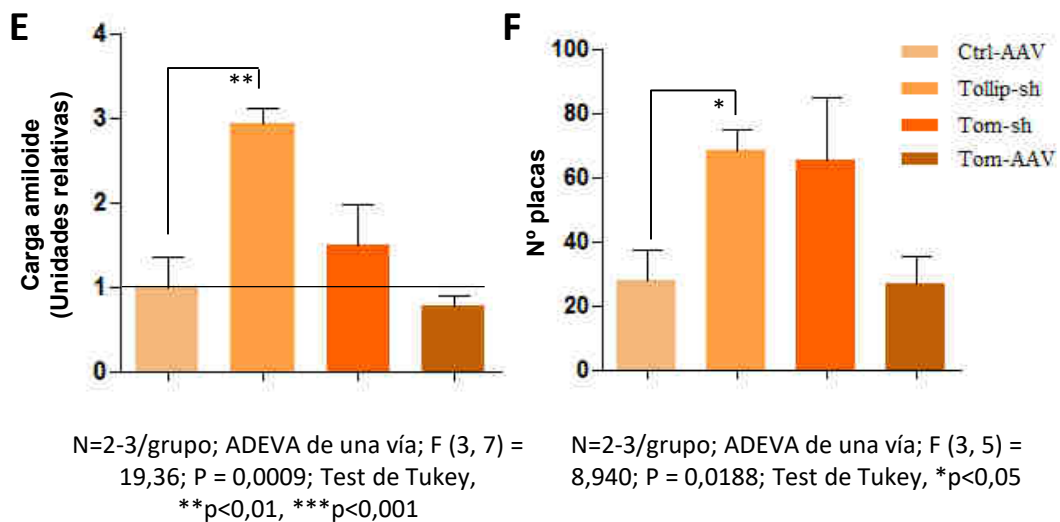
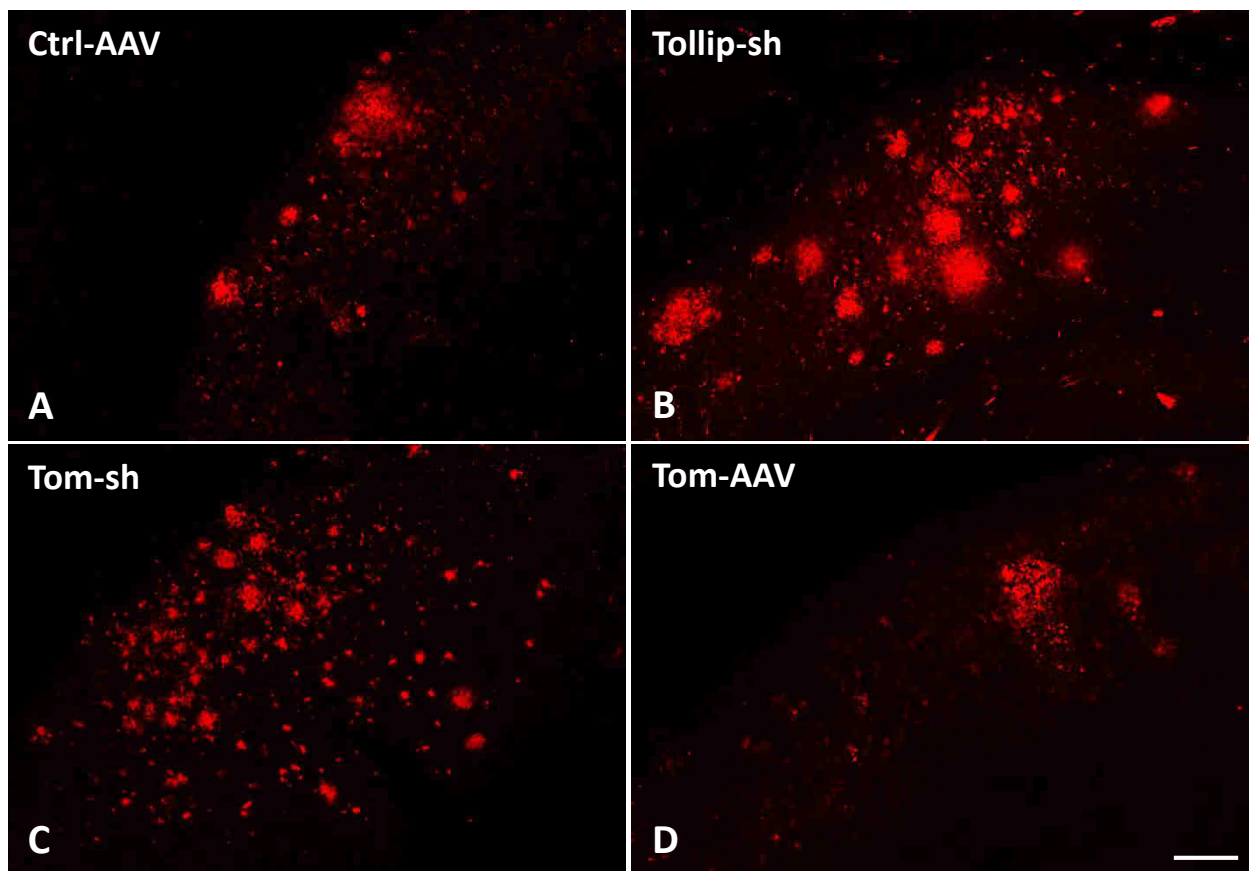
### 3.3.6. Efectos de la modulación de Tom1/Tollip sobre la reactividad glial en el modelo 3xTgAD.

Tal y como ha sido descrito previamente en este trabajo, una de las principales características histopatológicas de la EA es la presencia de células gliales reactivas (microglía y astrogía) alrededor de las placas amiloides. Esta respuesta glial comienza a partir de los 12 meses de edad en los animales triple transgénicos (Kitazawa et al. 2011).

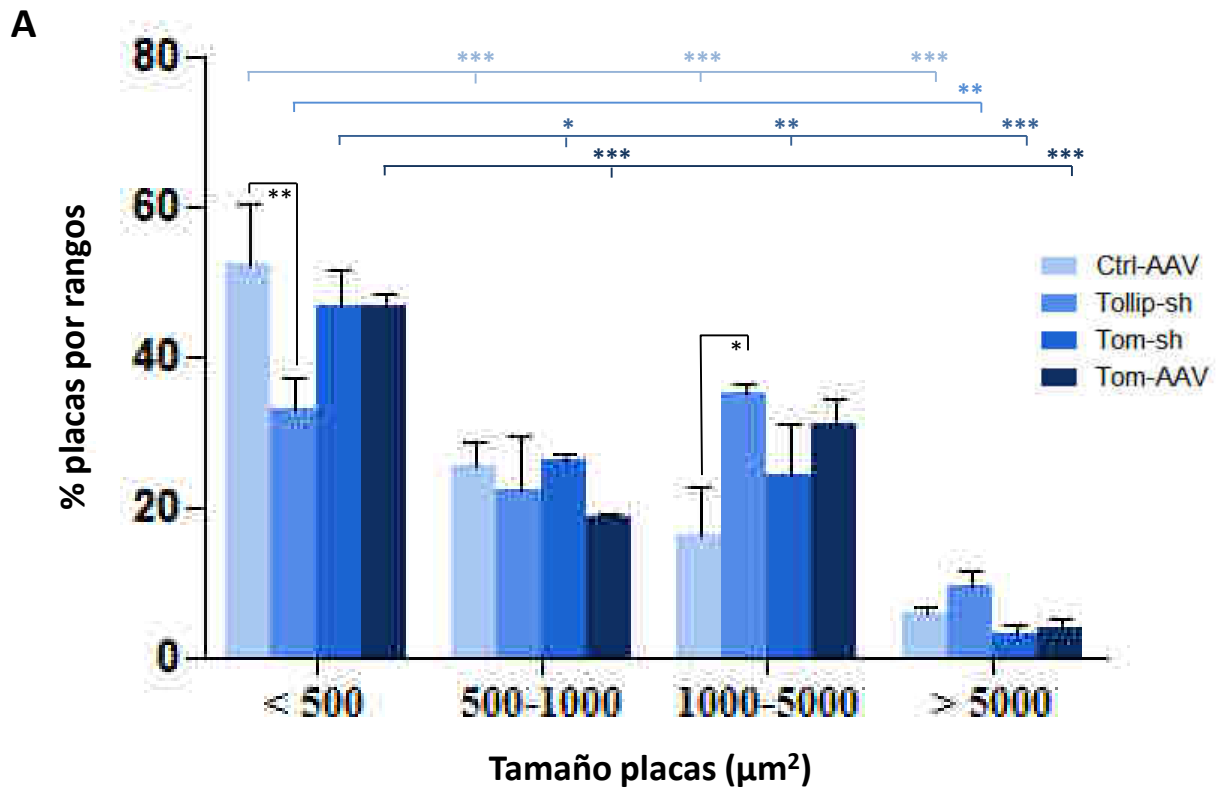


**Figura 3.3.16. Patología amiloide en el hipocampo de animales 3xTgAD de los diferentes grupos experimentales.** Inmunohistoquímica con el anticuerpo 6E10 en los grupos con vehículo (Ctrl-AAV; A y A1), silenciamiento génico de Tollip (Tollip-sh; B y B1) o Tom (Tom-Sh; C y C1) y sobreexpresión de Tom (Tom-AAV; D y D1). El inmunomarcage para 6E10 se localiza en las placas amiloides (flechas) y en las células piramidales de CA1 y subículo en todos los grupos experimentales (ver detalles en A1-C1). El grupo Tollip-sh presenta una mayor intensidad de inmunotinción que el resto de grupos. GD, giro dentado; CA1, CA3, regiones del asta de Ammon; sp, estrato piramidal; sub, subículo. Barras de escala: A-D: 400  $\mu$ m; A1-D1: 100  $\mu$ m

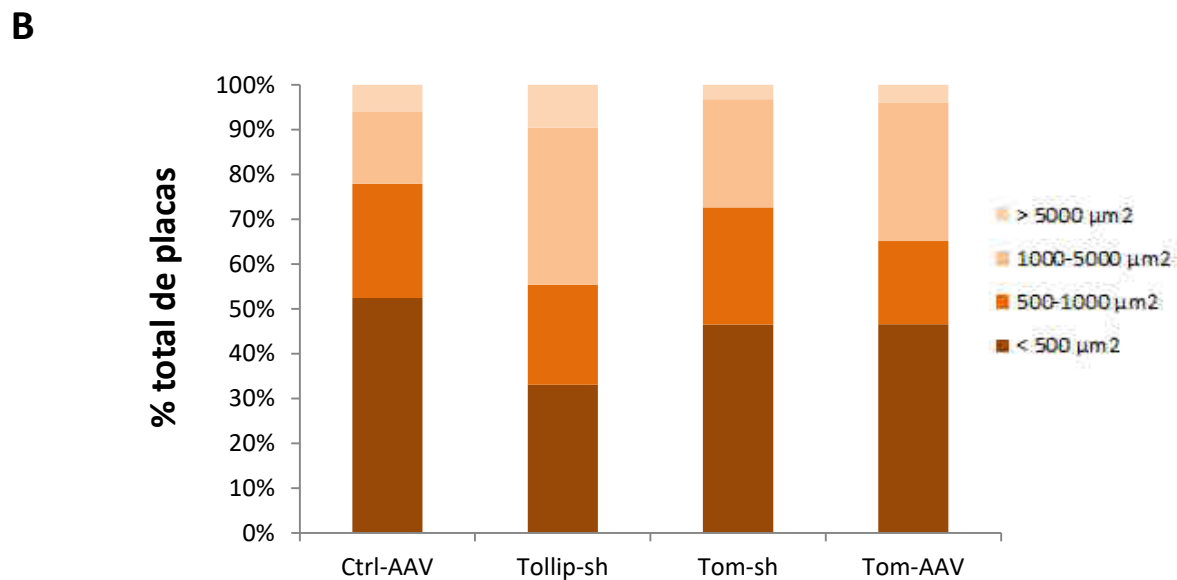
## 6E10



**Figura 3.3.17. Estudio comparativo de la patología amiloide en la región del subículo del modelo 3xTgAD en los diferentes grupos experimentales.** Inmunofluorescencia con el anticuerpo 6E10 en los grupos control (Ctrl-AAV; A), silenciamiento génico de Tollip (Tollip-sh; B) o Tom (Tom-Sh; C) y sobreexpresión de Tom1 (D). Existen diferencias visibles tanto en el número como en el tamaño de las placas amiloides entre los diversos grupos. El estudio cuantitativo de la acumulación extracelular de A $\beta$  - carga amiloide- (E) y el número de placas (F) muestra un incremento significativo en el grupo Tollip-sh respecto al grupo control. La estadística y significancia se indican en las gráficas. Barra de escala: A-D: 100  $\mu$ m



N=2-3/grupo; ADEVA de una vía;  $F(15, 20) = 26,69$ ;  $P < 0,0001$ ; Test de Tukey, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$



**Figura 3.3.18. Estudio cuantitativo del número y tamaño de las placas de A $\beta$  en el hipocampo del modelo 3xTgAD en los grupos control (Ctrl-AAV), de silenciamiento génico de Tollip (Tollip-sh) o de Tom1 (Tom-Sh) y de sobreexpresión de Tom1 (Tom-AAV). Las placas amiloides han sido distribuidas en cuatro rangos de tamaño: <500  $\mu\text{m}^2$ , 500-1000  $\mu\text{m}^2$ , 1000-5000  $\mu\text{m}^2$ , >5000  $\mu\text{m}^2$ . Los animales controles presentan un gran número de placas pequeñas (<500  $\mu\text{m}^2$ ) mientras que el grupo Tollip-sh posee una mayor proporción de placas superiores a 5000  $\mu\text{m}^2$ . La estadística y significancia se indican en la gráfica.**



Con el objetivo de analizar el efecto de la modulación de Tom1/Tollip en la respuesta microglial asociada a las placas seniles, se llevó a cabo el estudio inmunofluorescente empleando el anticuerpo Iba1 en animales 3xTgAD inyectados con los 4 tipos de virus adeno-asociados mencionados previamente en este trabajo. El uso de animales nTg para este objetivo no fue necesario al no presentar patología amiloide, por lo que los animales 3xTgAD-Ctrl-AAV se emplearon como grupo control.

Se observó, de forma cualitativa, un descenso del inmunomarcaje para Iba1 en el hipocampo de los animales 3xTgAD-Tollip-sh y 3xTgAD-Tom-sh con respecto al grupo control (Fig. 3.3.19A-C). Además, no se detectaron cambios en la intensidad del marcaje en los animales inyectados con Tom-AAV con respecto los animales empleados como control (Fig. 3.3.19A y D), mostrando ambos grupos niveles muy similares de inmunofluorescencia.

El análisis detallado de las células inmunomarcadas reveló diferencias morfológicas entre los diferentes grupos experimentales. La morfología microglial de los animales 3xTgAD-Ctrl-AAV se caracterizó por tener numerosas ramificaciones y prolongaciones largas y finas (Fig. 3.3.19A1), compatible con un fenotipo no activado. Por otro lado, las células microgliales de los grupos 3xTgAD-Tollip-sh y 3xTgAD-Tom-sh mostraron una morfología microglial caracterizada por el engrosamiento del cuerpo celular y la retracción de sus prolongaciones, que se acortan, engrosan y se desramifican (Fig. 3.3.19B1-C1). Esta morfología microglial es característica de la microglía activada y/o senescente. Por último, no se observaron diferencias morfológicas en la microglía de los animales inyectados con Tom-AAV con respecto al grupo control (Fig. 3.3.19D1).

A continuación, y para evaluar estos cambios se realizó un análisis cuantitativo de la población microglial (número de células microgliales, área total ocupada por la microglía y el número y longitud total de las prolongaciones microgliales) en la región CA1 del hipocampo de los diferentes grupos experimentales. No se observaron diferencias significativas en el número de células Iba1-positivas/mm<sup>2</sup> en ninguno de los 4 grupos analizados (Fig. 3.3.20A), sin embargo, el análisis del área ocupada por la población microglial Iba1-positiva mostró una reducción significativa en los grupos 3xTgAD-Tollip-sh (54,2±10,2%) y 3xTgAD-Tom-sh (50,37±7,81%) con respecto al grupo 3xTgAD-Ctrl-AAV (Fig. 3.3.20B). Además, estos dos grupos mostraron también una reducción significativa en el número (Fig. 3.3.20C) (3xTgAD-Tollip-sh: 72,61±9,65%; 3xTgAD-Tom-sh: 69,63±2,18%) y la longitud (Fig. 3.3.20D) (3xTgAD-Tollip-sh: 54,78±7,95%; 3xTgAD-Tom-sh: 49,04±7,52%) de las prolongaciones microgliales en comparación con el grupo control, lo que sugiere la existencia de un proceso de activación/senesencia microglial en los grupos inyectados con Tollip-sh y Tom-sh. Por último, en los animales pertenecientes al grupo Tom-AAV no se observaron cambios significativos en ninguno de los parámetros microgliales analizados (Fig. 3.3.20B y D) con respecto al grupo control, sugiriendo así que la sobre-expresión de Tom1 no induce cambios en la población microglial.

A continuación, se comprobó si los cambios en Tom1/Tollip tuvieron efecto alguno sobre las células astrogliales. La inmunofluorescencia con el anticuerpo para GFAP no reveló cambios aparentes entre los diferentes grupos experimentales (Fig. 3.3.21A-D). Sin embargo, las imágenes de detalle de microscopía confocal mostraron la existencia de diferencias morfológicas entre las células astrogliales de los grupos inyectados con Tollip-sh o Tom-sh (Fig. 3.3.21B1-C1) y los astrocitos del grupo control (Fig. 3.3.21A1). Estas diferencias incluyeron el engrosamiento del cuerpo celular y el acortamiento y la reducción del número de las prolongaciones astrogliales, compatibles con un fenotipo reactivo o senescente.

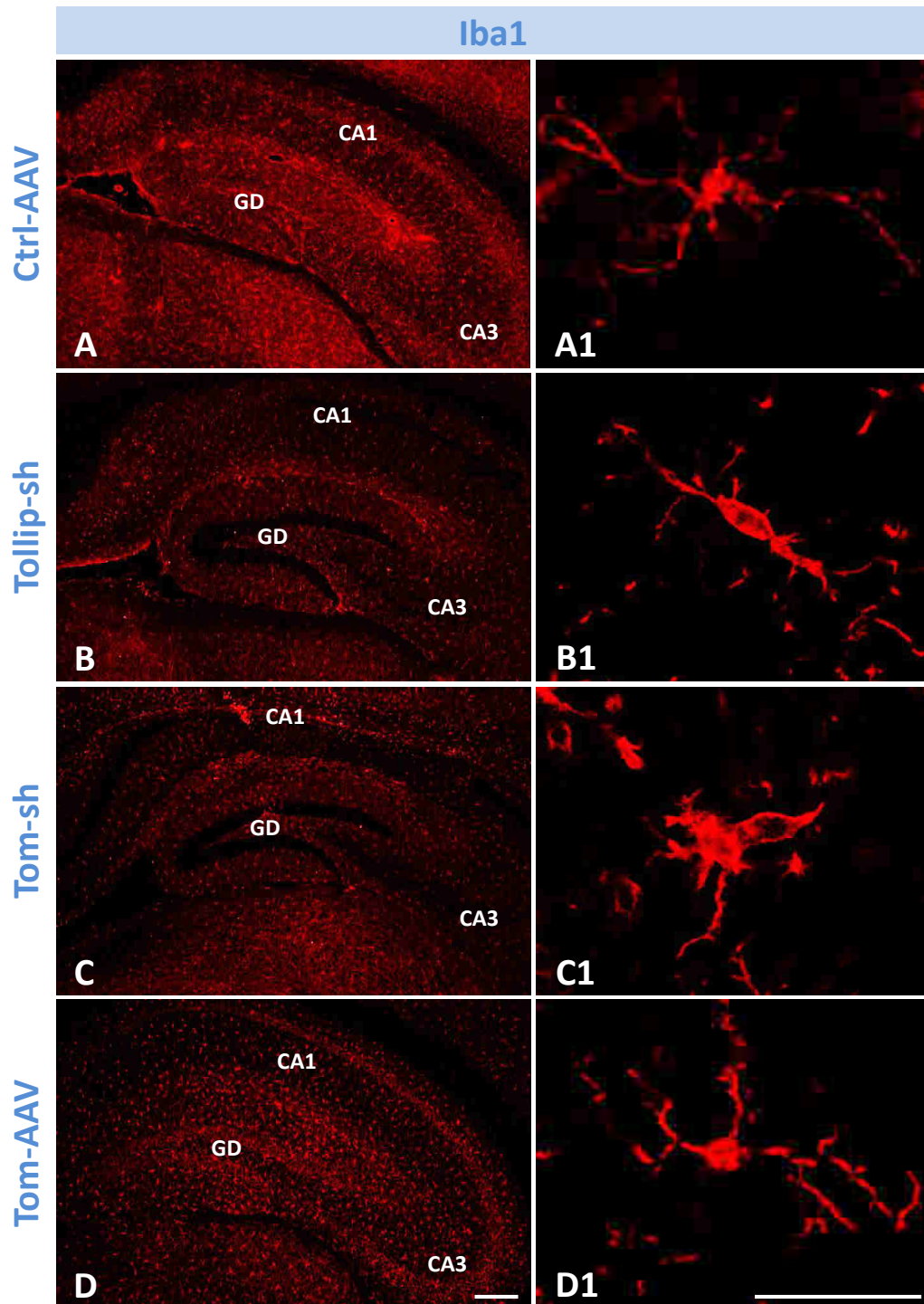
De la misma manera que para la microglía, se realizó un estudio cuantitativo de diversas características de esta población glial (número de células astrogliales, área total ocupada por la astroglia y número y longitud total de las prolongaciones) en la región CA1 del hipocampo. El número de astrocitos se vio ligeramente reducido en los grupos 3xTgAD-Tollip-sh y 3xTgAD-Tom-sh con respecto al grupo control 3xTgAD-Ctrl-AAV, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Fig. 3.3.22A). El área astrogliar GFAP-positiva por otro lado, si mostró una reducción significativa en los grupos inyectados con Tollip-sh ( $33,67 \pm 16,66\%$ ) y Tom-sh ( $36,16 \pm 5,05\%$ ) frente al grupo control (Fig. 3.3.22B). Además, el número de prolongaciones astrogliales sufrió también una reducción significativa en los animales 3xTgAD-Tom-sh ( $42,54 \pm 3,68\%$ ) con respecto al grupo control (Fig. 3.3.22C). En los animales inyectados con Tollip-sh la reducción en el número de prolongaciones astrocitarias no fue significativa a pesar de que mostraron un 25,4% menos de prolongaciones astrogliales que los controles, pero la gran variabilidad entre animales ( $\pm 21,21\%$ ) podría ser la causante de ello. Ambos grupos, 3xTgAD-Tollip-sh ( $37,52 \pm 14,33\%$ ) y 3xTgAD-Tom-sh ( $37,09 \pm 7,1\%$ ), presentaron también una reducción significativa en la longitud total de las prolongaciones astrogliales con respecto a los 3xTgAD-Ctrl-AAV (Fig. 3.3.22D). Para finalizar, los animales inyectados con Tom-AAV no muestran diferencias significativas en ninguno de los 4 parámetros analizados cuantitativamente con respecto al grupo control (Fig. 3.3.22).

Por lo tanto, las poblaciones de células microgliales y astrogliales responden con un proceso de activación y/o degeneración en aquellos grupos en los que se suprimió la expresión de Tom o de Tollip. Además, este efecto es más acusado en la microglía que los astrocitos.

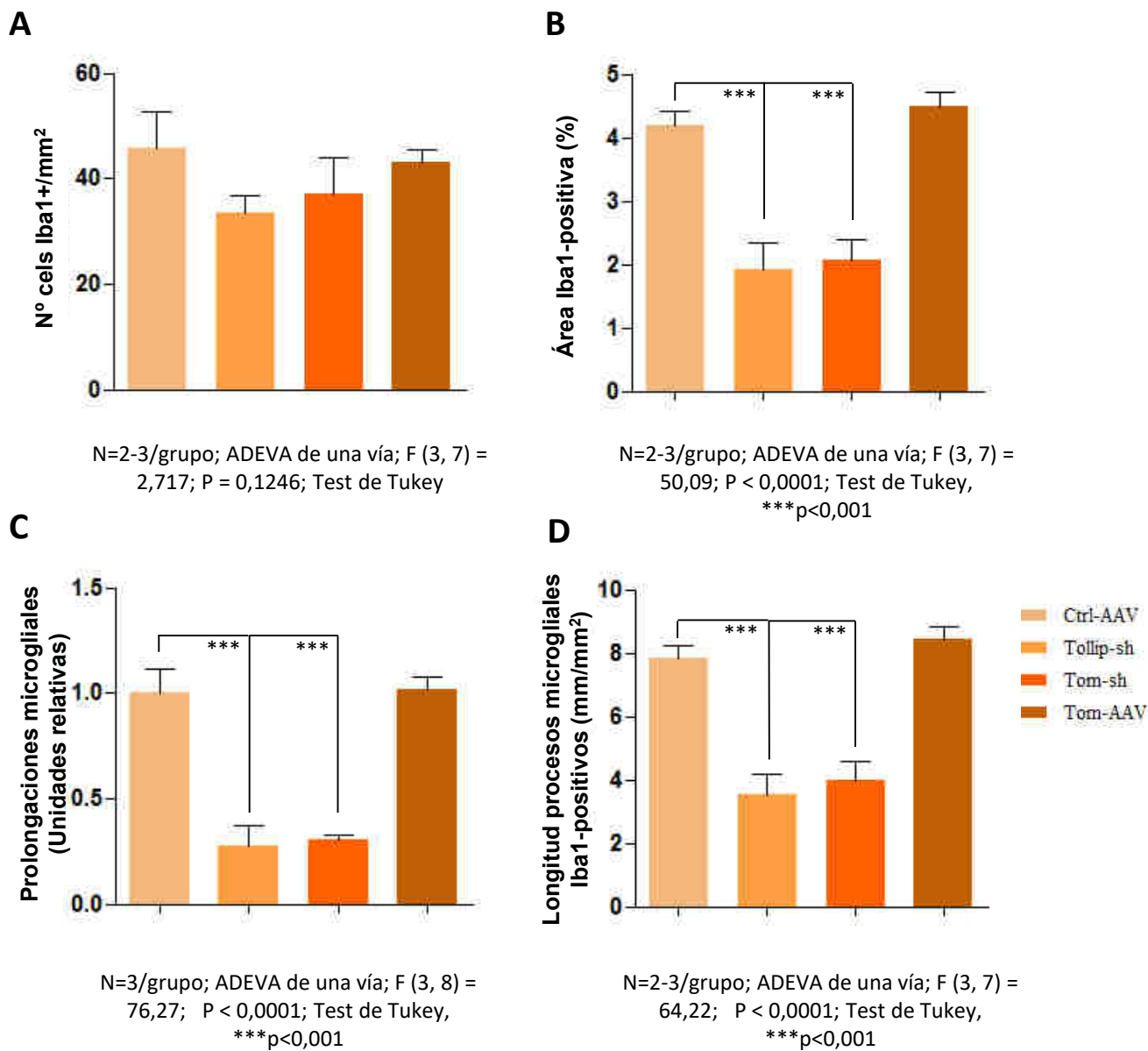
Por último, se decidió evaluar los niveles de determinadas citoquinas, proinflamatorias y antiinflamatorias, en los diferentes grupos experimentales con objeto de esclarecer el efecto de Tom1 y Tollip sobre la respuesta inmune mediada por la glía. Para ello, se llevó a cabo una reacción múltiple de análisis de proteínas (ELISA) en la que se midieron los niveles de IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-4 e IL-10. Tal y como cabía esperar, se observó un aumento significativo de IL-1 $\beta$  (Fig. Suplementaria 3.7A) en los grupos 3xTgAD-Tom-sh y 3xTgAD-Tollip-sh, demostrando la importancia del sistema de endocitosis Tom1/Tollip en la ruta bioquímica de la IL-1 $\beta$ . Además, los niveles del factor de necrosis tumoral TNF $\alpha$  (Fig. Suplementaria 3.7B) fueron también mayores en estos dos grupos, sin embargo y debido a la variabilidad entre animales, este incremento únicamente resultó estadísticamente significativo en el grupo 3xTgAD-Tom-sh.

Cabe destacar, los bajos niveles de estas dos citoquinas proinflamatorias en los animales inyectados con Tom-AAV, con valores muy similares a los del grupo nTg-Ctrl-AAV. Esto resultó especialmente llamativo para la IL-1 $\beta$ , ya que los valores de esta citoquina en los animales 3xTgAD suelen ser bastante superiores a los de animales nTg, sin embargo, tras la sobreexpresión de Tom1 los animales triple transgénicos mostraron un nivel casi idéntico al de animales nTg-Tom-AAV y nTg-Ctrl-AAV. Respecto a las citoquinas antiinflamatorias estudiadas, el análisis de IL-10 no mostró diferencias significativas entre ninguno de los grupos, aunque hay que destacar que los niveles más altos de IL-10 fueron encontrados en animales 3xTgAD-Tom-AAV, siendo superiores incluso a los de animales no transgénicos (Fig. Suplementaria 3.8A). En este sentido, se encontraron diferencias significativas entre los animales 3xTgAD-Tom-AAV y 3xTgAD-Tollip-sh (Fig. Suplementaria 3.8B) en los niveles de IL-4, siendo de nuevo el primero de estos grupos el que tuvo niveles más altos de esta citoquina anti-inflamatoria.

En su conjunto, estos resultados sugieren un efecto modulador de Tom1 y Tollip sobre la respuesta inflamatoria. De esta manera, podemos establecer una relación directa entre la sobreexpresión de Tom1 y la liberación de citoquinas antiinflamatorias (IL-10 e IL-4), al mismo tiempo que se ve reducida la expresión de citoquinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$  y TFN- $\alpha$ ). Por el contrario, el silenciamiento génico de Tom1 o Tollip parece estar asociado a una respuesta fundamentalmente proinflamatoria con niveles reducidos de IL-4.

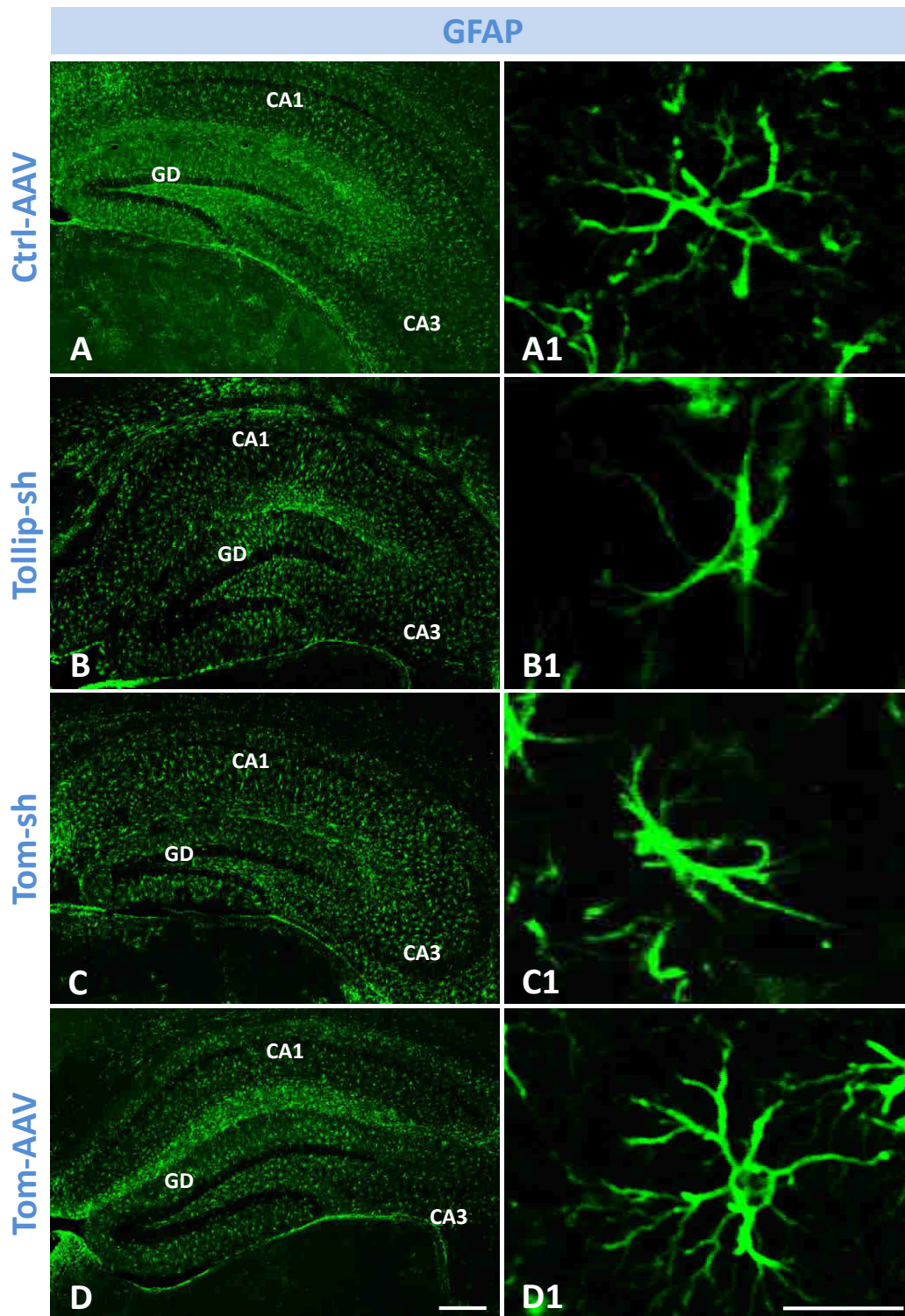


**Figura 3.3.19. Las células microgliales de los grupos Tollip-sh y Tom-sh manifiestan cambios morfológicos.** Inmunofluorescencia para el marcador microglial Iba1 en el hipocampo de animales 3xTgAD control (A y A1), Tollip-sh (B y B1), Tom-sh (C y C1) y Tom-AAV (D y D1). El hipocampo de los animales Tollip-sh y Tom-sh (B-C) presenta menor inmunorreactividad que el grupo control (A) o el grupo Tom-AAV (D). En las imágenes A1-D1 se muestran células microgliales representativas de cada grupo experimental, siendo visible alteraciones morfológicas en la microglia de lo grupos Tollip-sh (B1) y Tom-sh (C1) como son deramificación, acortamiento de las prolongaciones y engrosamiento del cuerpo celular. GD, giro dentado; CA1, CA3, regiones del asta de Ammon. Barras de escala: A-D: 200  $\mu\text{m}$ ; A1-D1: 25  $\mu\text{m}$ .

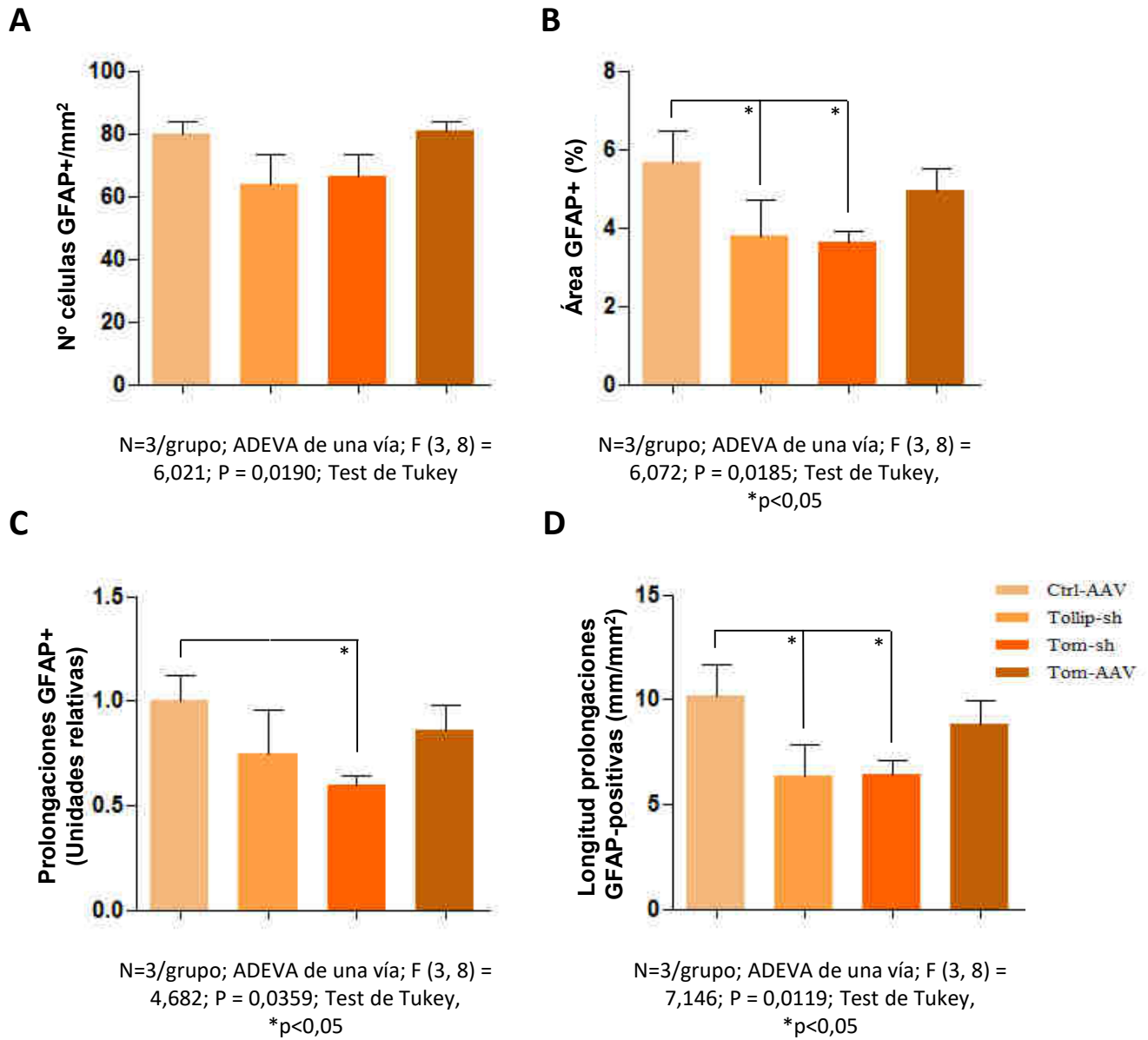


**Figura 3.3.20. Análisis de la población microglial en el hipocampo del modelo 3xTgAD en los grupos control (Ctrl-AAV), de silenciamiento génico de Tollip (Tollip-sh) o de Tom1 (Tom-Sh) y de sobreexpresión de Tom (Tom-AAV).** No existen cambios significativos en el número de células microgliales (A) entre los diversos grupos; sin embargo el área total ocupada por la microglía Iba1-positiva (B) muestra un descenso significativo en los grupos Tollip-sh y Tom-sh respecto al grupo control. Estos dos grupos muestran además una pérdida significativa (casi el 70%) de las prolongaciones microgliales (C) respecto al grupo control, así como un descenso significativo en la longitud total de los procesos microgliales (D). Los estudios cuantitativos se han realizado utilizando secciones inmunoteñidas para el marcador migroglial Iba1. La estadística y significancia se indican en cada gráfica.

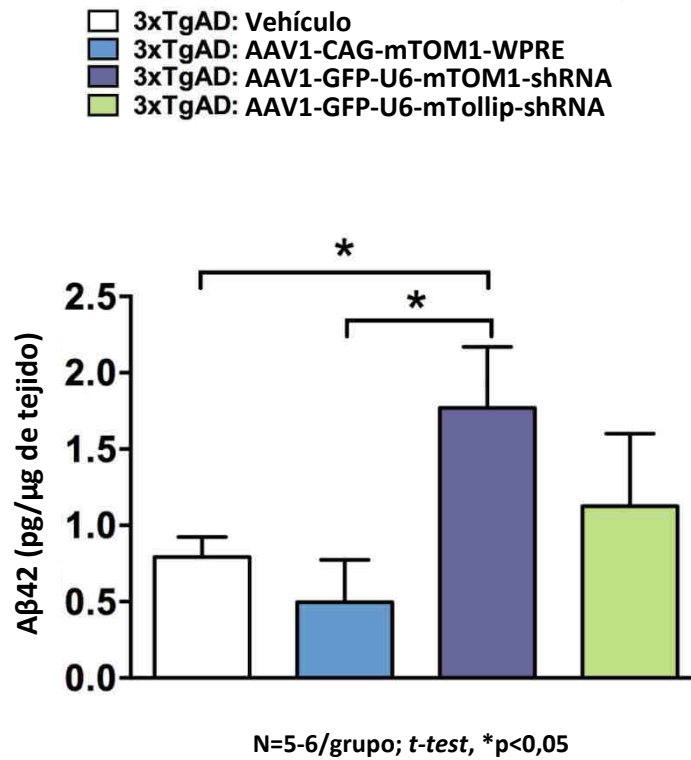




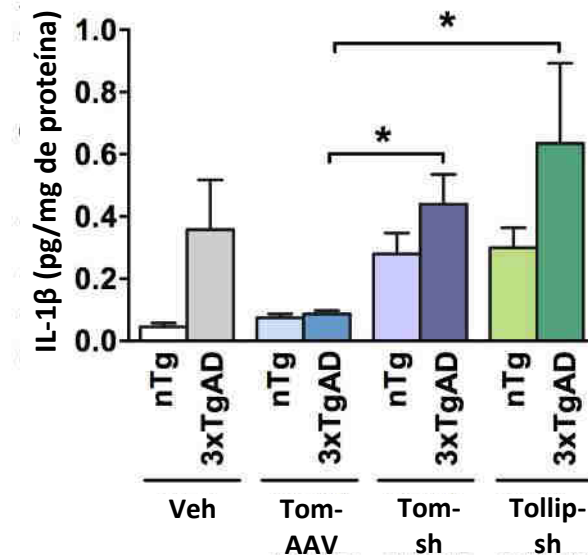
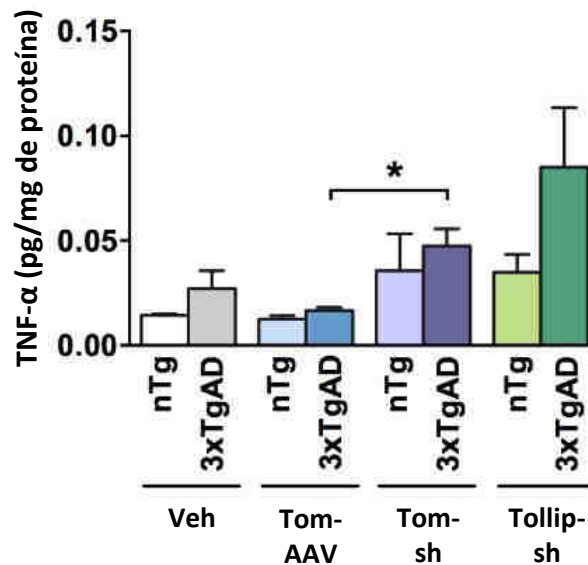
**Figura 3.3.21. Las células astrogliales de los grupos Tollip-sh y Tom-sh manifiestan cambios morfológicos.** Inmunofluorescencia para el marcador astrogial GFAP en animales 3xTgAD control (A y A1), Tollip-sh (B y B1), Tom-sh (C y C1) y Tom-AAV (D y D1). Aunque la inmunorreactividad general para GFAP en el hipocampo no muestra diferencias apreciables en los distintos grupos (A-D), el análisis a mayores aumentos revela cambios morfológicos en los astrocitos de los grupos Tollip-sh y Tom-sh (B1 y C1, respectivamente). En estos grupos, los astrocitos están engrosados, y presentan menor número de prolongaciones y más cortas en comparación con los otros grupos. GD, giro dentado; CA1, CA3, regiones del asta de Ammon. Barras de escala: A-D: 200  $\mu\text{m}$ ; A1-D1: 20  $\mu\text{m}$ .



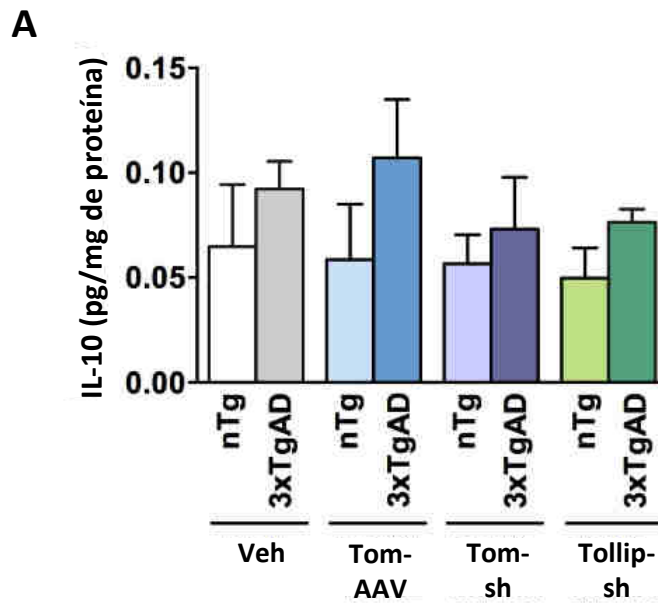
**Figura 3.3.22. Análisis de la población astrogliar en el hipocampo de animales 3xTgAD control, Tollip-sh, Tom-sh y Tom-AAV.** No existen cambios significativos en el número de células astrogliar (A) entre los diversos grupos experimentales; sin embargo el área total ocupada por la astrogliar GFAP-positiva (B) muestra un descenso significativo en los grupos Tollip-sh y Tom-sh respecto al grupo control. El grupo Tom-sh muestra además una pérdida significativa (42%) del número de prolongaciones astrogliar (C) respecto al grupo control. A pesar de que Tollip-sh no presenta un descenso significativo en el número de prolongaciones astrogliar, si que muestra una disminución significativa en la longitud total de las mismas, al igual que Tom-sh. El análisis cuantitativo se ha realizado en secciones inmunoteñidas para el marcador astrogliar GFAP. La estadística y significancia se indican en cada gráfica.



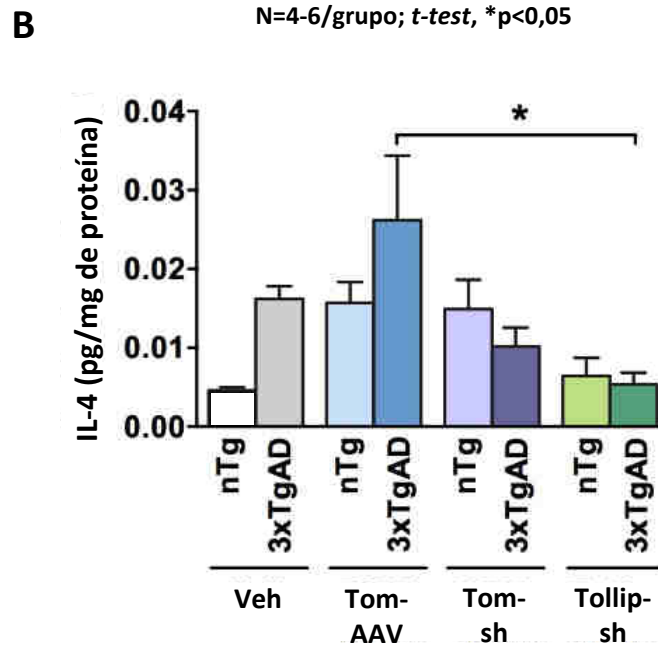
**Figura Suplementaria 3.6. Niveles de Aβ42 soluble en el hipocampo en animales 3xTgAD de los grupos control, Tollip-sh, Tom-sh y Tom-AAV.** La cuantificación mediante ELISA de los niveles de Aβ42 en la fracción soluble del hipocampo de los animales 3xTgAD de los diferentes grupos experimentales (Ctrl-AAV, Tom-AAV, Tom-sh o Tollip-sh) reveló un incremento significativo en los 3xTgAD-Tom-sh con respecto al grupo 3xTgAD-Tom-AAV y al grupo control. Resultados en colaboración con el laboratorio del Dr. Frank LaFerla (Universidad de California, Irvine, USA). La estadística y significancia está indicada en la gráfica.

**A****B**N=4-6/grupo; *t-test*, \**p*<0,05N=4-6/grupo; *t-test*, \**p*<0,05

**Figura Suplementaria 3.7. Aumento en los niveles de citoquinas proinflamatorias en el hipocampo de animales 3xTgAD-Tom-sh y 3xTgAD-Tollip-sh.** Los niveles de IL-1 $\beta$  aumentan de forma significativa en los animales 3xTgAD inyectados con Tom-sh o Tollip-sh. Además, el nivel de esta citoquina en los animales 3xTgAD-Tom-AAV se restablece a valores similares al de los animales no transgénicos. Del mismo modo, existe un incremento significativo de TNF- $\alpha$  en los animales 3xTgAD-Tom-sh al compararlos con los 3xTgAD-Tom-AAV. Los valores de esta citoquina proinflamatoria se incrementan también notablemente en los animales inyectados con Tollip-sh. La estadística y significancia se indican en las gráficas. Resultados en colaboración con el laboratorio del Dr. Frank LaFerla (Universidad de California, Irvine, USA).



N=4-6/grupo; *t*-test, \**p*<0,05



N=4-6/grupo; *t*-test, \**p*<0,05

**Figura Suplementaria 3.8. Niveles de las citoquinas antiinflamatorias IL-10 e IL-4 en la fracción soluble hipocampal de los animales 3xTgAD control, Tollip-sh, Tom-sh y Tom-AAV.** La cuantificación de los niveles de IL-10 no revela diferencias significativas entre ninguno de los grupos experimentales analizados. Los niveles de IL-4 se reducen significativamente en los animales 3xTgAD inyectados con Tollip-sh frente a los que han recibido Tom-AAV. De todos los grupos analizados, los animales 3xTgAD-Tom-AAV muestran los niveles más altos de la citoquina antiinflamatoria IL-4. La estadística y significancia se indican en las gráficas. Resultados en colaboración con el laboratorio del Dr. Frank LaFerla (Universidad de California, Irvine, USA).



## DISCUSIÓN

En este trabajo hemos demostrado la implicación directa de la vía de degradación endosomal regulada por Tom1/Tollip en la respuesta inflamatoria mediada por la IL-1 $\beta$  en un modelo triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer.

El papel de las citoquinas, tanto antiinflamatorias como proinflamatorias, en la progresión de la enfermedad de Alzheimer ha sido objeto de numerosos estudios en las últimas décadas. Está bien establecida la participación de citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 o TNF- $\alpha$  durante la patogénesis de la EA (revisado en Bagyinszky et al. 2017), aunque sus mecanismos de acción en dicha enfermedad siguen sin estar del todo claros a día de hoy. En este sentido la IL-1 fue la primera citoquina identificada con acción directa en el cerebro (Besedovsky et al. 1986; Berkenbosch et al. 1987), cuya capacidad para provocar fiebre tras ser administrada de manera periférica le valió su denominación como el “pirógeno endógeno” (Shaftel et al. 2008). En humanos, esta citoquina se encuentra elevada tanto en el cerebro como en el líquido cefalorraquídeo (CSF) de pacientes con daño cerebral e infarto. En el CSF se encuentra también elevada en pacientes con esclerosis múltiple, enfermedad de Párkinson y enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (Heneka et al. 2014; Labzin et al. 2017). Además, a nivel cerebral se observan altas cantidades de esta citoquina en pacientes con enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple, el síndrome de Down o la enfermedad de Alzheimer (Shaftel et al. 2008; Forlenza et al. 2009; Bagyinszky et al. 2017; Labzin et al. 2017). Aunque el papel de esta interleuquina proinflamatoria en la patología del Alzheimer no se conoce aún con exactitud, se ha relacionado con el incremento de la expresión de la proteína precursora amiloide en cultivos neuronales (Forloni et al. 1992; Yang et al. 1998). Además, la exposición de cultivos primarios de neuronas a la IL-1 $\beta$  exacerba la fosforilación de tau mediante la activación aberrante de p38-MAPK (Li et al. 2003).

El mecanismo de acción de la IL-1 $\beta$  es dependiente de la unión a su receptor, IL-1R1, lo cual permite el reclutamiento de otra subunidad del receptor, IL-1RAcP, y la formación del heterodímero (O’Neill 2008; Shaftel et al. 2008; Kitazawa et al. 2011; Dinarello 2011; Prieto et al. 2015). Todo ello conduce a la generación de una cascada de señales que implica el reclutamiento de intermediarios como MyD88, IRAK4 y TRAF6, y que conlleva finalmente la regulación transcripcional mediada por NF- $\kappa$ B de genes inflamatorios como la pre-IL-1 $\beta$  (O’Neill 2008). Además, es bien conocida la interacción entre el IL-1R1 y Tollip (del inglés “*Toll-interacting protein*”) (Burns et al. 2000), cuya localización se encuentra en los endosomas tempranos (Katoh et al. 2004). Tollip es la encargada ahora de reclutar a Tom1 (del inglés “*target of Myb1*”) y formar un complejo Tom1/Tollip encargado de regular el tráfico endosomal (mediado por clatrina) de proteínas ubiquitinadas que finaliza con la degradación lisosomal del receptor IL-1R1 (Katoh et al. 2004; Seet et al. 2004; Seet 2005; Katoh et al. 2006). En este sentido parece que es la propia IL-1 $\beta$  la que induce la ubiquitinación de IL-1R1,

marcando así el receptor para su eliminación (Brissoni et al. 2006). De esta manera, parece crucial el adecuado equilibrio entre la expresión en membrana del receptor de interleuquina 1 y su degradación lisosomal para el correcto funcionamiento de las vías de señalización en las que se encuentra implicada la interleuquina 1 $\beta$ . En relación a esta interleuquina, resultados previos del grupo del Dr. LaFerla mostraron niveles elevados de IL-1 $\beta$  en el cerebro de los ratones triple transgénicos (3xTgAD) con respecto a sus respectivos controles (Kitazawa et al. 2011). Además, los mismos autores demostraron también la relación entre la acumulación de esta interleuquina pro-inflamatoria (mediante el bloqueo de IL-1R1) y la presencia de déficits cognitivos, hiperfosforilación de tau y aumento de especies fibrilares y oligoméricas de A $\beta$  (Kitazawa et al. 2011). Por todo ello, resulta de gran interés el estudio de la implicación de la endocitosis de IL-1R1 mediada por Tom1/Tollip en la respuesta glial y su implicación en la evolución de las lesiones histopatológicas características de la enfermedad de Alzheimer. Así, nuestros resultados han demostrado que el silenciamiento de Tom y de Tollip resulta en un aumento de IL-1R1. Además, la sobreexpresión de Tom1 disminuye los niveles de este receptor. Podemos decir entonces que en el modelo triple transgénico 3xTgAD, las proteínas Tom1 y Tollip participan de manera directa en la internalización y eliminación de IL-1R1. En apoyo a estos resultados, estudios en los que se redujo la expresión de los niveles de Tom1 dieron como resultado la acumulación del receptor IL-1R1 en los endosomas tardíos (Brissoni et al. 2006). Además, en este trabajo hemos mostrado la expresión del IL-1R1 en las neuronas piramidales del hipocampo de animales 3xTgAD, cuya localización se encuentra de forma mayoritaria en la región postsináptica. En este mismo modelo, hemos mostrado también la abundante expresión del receptor en numerosas células de la microglía; a diferencia de los astrocitos, siendo muy pocos los que expresaban IL-1R1. Es importante destacar la escasez de trabajos que muestren la expresión celular de este receptor en el hipocampo murino. La mayoría de trabajos dirigidos a dilucidar su localización han sido llevados a cabo en modelos animales de rata (Ericsson et al. 1995; Friedman 2001), en donde se muestra la expresión del receptor IL-1R1 en las neuronas piramidales del hipocampo en condiciones basales y en las células gliales en condiciones patológicas (Friedman 2001).

En línea con resultados previos de otros autores en los que el bloqueo de IL-1R1 se ha relacionado con la recuperación de las alteraciones cognitivas hipocampales en el modelo 3xTgAD (Kitazawa et al. 2011), el silenciamiento de Tom1 o Tollip en animales triple transgénicos agrava los déficits cognitivos del modelo.

A nivel clínico la EA se caracteriza por un deterioro progresivo de las funciones cognitivas que comienza normalmente con pérdidas de memoria y finaliza con un estado generalizado de demencia. Por ello, resulta necesario emplear modelos animales que desarrollen declive cognitivo similar al manifestado por los pacientes de Alzheimer (Torres-Aleman 2008; LaFerla and Green 2012; Webster et al. 2014; Onos et al. 2016; Sasaguri et al. 2017). Actualmente existen numerosos modelos animales en los que se han descrito pérdidas cognitivas, entre ellos el modelo Tg2576 (modelo monogénico para APP) que presenta

pérdidas de memoria espacial y de reconocimiento a los 5 y 12 meses de edad respectivamente (Webster et al. 2014). El modelo APP<sup>swe</sup>/PS1 $\Delta$ 9 tiene déficits de memoria espacial desde los 6 meses de edad (Jankowsky et al. 2001) y el APP/PS1 (empleado en los capítulos previos de este trabajo) presenta alteraciones tanto de la memoria espacial como episódica desde los 6-9 meses de edad (Sanchez-Varo 2011; Trujillo-Estrada et al. 2013; Trujillo-Estrada 2015). En el modelo trigénico 3xTgAD empleado durante este trabajo también se han descrito déficits cognitivos entre 6 y 12 meses de edad (Oddo et al. 2003; Filali et al. 2012). Concretamente, los animales 3xTgAD presentan déficits en la memoria espacial analizada mediante el laberinto acuático de Morris y en la memoria asociativa analizada mediante el test de miedo condicionado; así como en la memoria a largo plazo analizada mediante el reconocimiento de objetos (Sterniczuk et al. 2010; Filali et al. 2012). En concordancia con estos autores, nuestro estudio muestra peores resultados en el laberinto acuático de Morris, pero no en el test de miedo condicionado, en los animales 3xTgAD con respecto a animales no transgénicos. Además, los resultados obtenidos en este trabajo han demostrado que el silenciamiento selectivo de Tom1 (3xTgAD-Tom-sh) o Tollip (3xTgAD-Tollip-sh) en animales 3xTgAD empeora significativamente los déficits cognitivos asociados a la memoria espacial y la memoria asociativa en este modelo de Alzheimer. Por el contrario, la sobreexpresión de Tom1 (3xTgAD-Tom-AAV) muestra resultados similares a los de animales no transgénicos en todos los test conductuales empleados. Por lo tanto, hemos establecido una relación directa de Tom1/Tollip con los déficits cognitivos que caracterizan a la EA. Dados los elevados niveles de IL-1 $\beta$  tanto en modelos animales como en pacientes de Alzheimer (Blum-Degen et al. 1995; Licastro et al. 2000; Mrak and Griffin 2001; Forlenza et al. 2009), así como los déficits cognitivos asociados a esta interleuquina (Kitazawa et al. 2011), parece lógico pensar que el silenciamiento de Tom1 o Tollip en el hipocampo esté causando la acumulación de esta interleuquina y en última instancia dé lugar al agravamiento de los déficits cognitivos observados en el modelo 3xTgAD. En este sentido, se ha relacionado la expresión local de IL-1 $\beta$  con alteraciones en la consolidación de la memoria en la formación hipocampal (Rachal Pugh et al. 2001). La acción directa de la IL-1 $\beta$  en los procesos de consolidación de la memoria se fundamenta en la demostración tanto *in vitro* como *in vivo* del aumento de esta interleuquina durante los procesos de potenciación a largo plazo (LTP) (Schneider et al. 1998). Además, de manera más reciente, la inyección de LPS (lipopolisacárido), inductor de la producción de IL-1 $\beta$  por la microglía, en el hipocampo de ratas dio como resultado déficits severos de aprendizaje y memoria (Tanaka et al. 2006) (revisado en Shaftel et al. 2008). A pesar de las numerosas evidencias que implican a la IL-1 $\beta$  de manera directa con los déficits cognitivos, no podemos descartar que éstos sean también producto del efecto perjudicial de la patología amiloide en estos animales (Billings et al. 2005).

Como sabemos, una de las primeras lesiones histopatológicas, de la EA es la acumulación de A $\beta$  en forma de depósitos extracelulares. Es por ello, que uno de los principales objetivos de este capítulo consistió en analizar el impacto de la

sobreexpresión/silenciamiento de Tom1 o Tollip sobre la carga amiloide en el modelo 3xTgAD. Este modelo se caracteriza por desarrollar placas amiloides desde los 6 meses de edad en la corteza frontal, aumentando de manera progresiva con el envejecimiento y apareciendo los primeros depósitos extracelulares en el hipocampo a los 12 meses aproximadamente (Oddo et al. 2003). En este trabajo, hemos demostrado un incremento significativo en la carga amiloide, mediante técnicas histológicas, en los animales 3xTgAD-Tollip-sh con respecto a los 3xTgAD-Ctrl-AAV. Este aumento en la carga amiloide se debe tanto a un mayor tamaño como a un mayor número de depósitos de A $\beta$ . Por tanto, la supresión de Tollip regularía negativamente la internalización de IL-1R1, que se acumula en la membrana plasmática, dando como resultado un incremento en los niveles de IL-1 $\beta$ . El aumento de los niveles hipocampales de IL-1 $\beta$  podría ser uno de los agentes causantes del incremento de la patología amiloide en estos animales. En este sentido, el papel de la interleuquina 1 ha generado una gran controversia al haber numerosos estudios que la relacionan tanto con el incremento como con el descenso de la patología amiloide en modelos animales para la enfermedad de Alzheimer. En apoyo a nuestros resultados, ha sido ampliamente descrita la capacidad de la IL-1 de aumentar la expresión de APP y en último término de A $\beta$ , dando lugar a una mayor deposición amiloide (Goldgaber et al. 1989; Brugg et al. 1995; Rogers et al. 1999; Liaoi et al. 2004; Shaftel et al. 2008). Además, ratones *knockout* para IL-1ra (antagonista de IL-1R1) mostraron también un aumento de la patología amiloide como consecuencia de la sobreexpresión de IL-1 (Craft et al. 2005). El tratamiento con drogas antiinflamatorias no esteroideas (NSAIDs), como el ibuprofeno, en varios modelos animales para la EA resultó en una reducción de IL-1 $\beta$  y su cascada de señalización, al mismo tiempo que la deposición amiloide se redujo notablemente (Lim et al. 2000; Morihara et al. 2005). Además, el bloqueo del receptor IL-1R1 mediante anticuerpos específicos en el modelo 3xTgAD dio como resultado la inhibición de la cascada de señalización mediada por la interleuquina 1 $\beta$  y resultó en una disminución de especies de A $\beta$  fibrilar y oligomérico, de manera similar a los resultados obtenidos en este trabajo (Kitazawa et al. 2011). Por otro lado, otros estudios muestran un efecto beneficioso de esta interleuquina 1 en el desarrollo y progresión de la patología amiloide (Lemere 2007). Así, la sobreexpresión de IL-1 $\beta$  tanto en el modelo APP<sup>swe</sup>/PS-1<sup>E9</sup> como en el 3xTgAD conllevó la reducción del número y tamaño de los depósitos de A $\beta$  (Matousek et al. 2012; Ghosh et al. 2013). Según estos autores, la sobreexpresión de IL-1 $\beta$  genera una fuerte respuesta neuroinflamatoria en la que la microglía reactiva fagocita de forma más activa el A $\beta$ , reduciendo así la carga amiloide en estos modelos animales. En estos estudios, los déficits cognitivos observados al sobreexpresar IL-1 $\beta$  fueron relacionados con el incremento de la patología de tau y no con la de A $\beta$ . No está claro por qué los resultados de estos autores son diferentes de los nuestros. Una posibilidad es que la sobreexpresión de IL-1 $\beta$  tenga efectos diferentes en función de la etapa de la patología en la que se analice y por lo tanto se puedan obtener resultados muy variados. Así, los animales 3xTgAD empleados por Ghosh y colaboradores (Ghosh et al. 2013) eran de edad muy avanzada (18 meses) mientras los empleados en nuestro estudio eran más jóvenes (12 meses) justo cuando la deposición amiloide está prácticamente comenzando.

Además, la región de estudio es un factor a tener en cuenta ya que la progresión de la patología de A $\beta$  es muy dependiente de esta variable; Ghosh y colaboradores centraron su estudio en el subículo mientras que nuestros resultados han sido obtenidos fundamentalmente en hipocampo propio. A pesar de todo, la falta de concordancia entre nuestros resultados y los trabajos de estos grupos de investigación pone de manifiesto la necesidad de profundizar en el conocimiento sobre la modulación de la respuesta inmune con el fin de obtener resultados favorables y que nos permitan desarrollar estrategias terapéuticas dirigidas a frenar el avance de la patología (Heppner et al. 2015).

Continuando con la patología amiloide y de manera opuesta a lo que esperábamos, los análisis bioquímicos mediante ELISA (*Meso Scale Discovery*) de los niveles de A $\beta$ 42 oligomérico en las fracciones solubles de muestras hipocampales de los 4 diferentes grupos de animales 3xTgAD, muestran un incremento significativo en el grupo 3xTgAD-Tom-sh en relación al grupo control (3xTgAD-Ctrl-AAV). Aunque los niveles de oligómeros solubles en el grupo 3xTgAD-Tollip-sh son notablemente mayores que en el grupo control, esta diferencia no resultó estadísticamente significativa. Se cree que las formas oligoméricas del péptido amiloide son las más tóxicas (Walsh et al. 2002; Walsh and Selkoe 2007), y aunque el origen de estos oligómeros solubles todavía no se conoce con exactitud, una posibilidad es que sean las propias placas amiloides las que liberen estas especies tóxicas hacia el neuropilo (Nuñez-Díaz 2014). En línea con esta hipótesis, nuestros resultados en los animales 3xTgAD-Tom-sh en los que aumenta el A $\beta$ 42 soluble y el número de depósitos extracelulares, pero no así la carga amiloide podrían indicar un aumento de la liberación de oligómeros solubles desde las placas de A $\beta$ . El elevado contenido de oligómeros tóxicos puede causar también una mayor activación microglial e incluso afectar negativamente a las neuronas hipocampales, comprometiendo así su viabilidad.

Además, la microglía reactiva participa de manera activa en la internalización del A $\beta$  a través de diversos receptores de membrana como el CD14, CD36, CD47, Scaral, Scarab1, RAGE y receptores de tipo Toll (El Khoury et al. 1996; Paresce et al. 1996; Du Yan et al. 1997; Fassbender et al. 2004; Koenigsnecht and Landreth 2004; Stewart et al. 2010; Thanopoulou et al. 2010; Frenkel et al. 2013; Sheedy et al. 2013; Yu and Ye 2015; Heppner et al. 2015; Colonna and Butovsky 2017; Wolf et al. 2017). Con el envejecimiento tiene lugar una pérdida de proteostasis microglial (Mosher and Wyss-Coray 2014) que junto con la amiloidosis cerebral puede originar una disminución en la capacidad fagocítica del péptido amiloide (Hickman et al. 2008; Krabbe et al. 2013). Por ello, es posible que en los animales 3xTgAD-Tom-sh y 3xTgAD-Tollip-sh, las células de la microglía se vean afectadas por la edad de los animales y/o por la patología amiloide, de modo que su capacidad funcional fagocítica resulte alterada y pueda también influir negativamente en la acumulación extracelular de A $\beta$ .

Respecto a los niveles de amiloide, resulta importante destacar que los resultados obtenidos mediante la sobreexpresión de Tom1 (3xTgAD-Tom-AAV) muestran una reducción



tanto en la carga amiloide como en el nivel de oligómeros solubles de A $\beta$ 42 con respecto al grupo control (3xTgAD-Ctrl-AAV). Si bien es cierto que la reducción no es significativa, estos resultados preliminares podrían estar indicando una función beneficiosa de Tom1 en la patología del Alzheimer. Resultaría interesante estudiar el efecto de la sobreexpresión de Tollip en el mismo modelo murino, así como el efecto de la sobreexpresión conjunta de Tom1 y Tollip con el objetivo de profundizar en sus posibles efectos protectores durante el inicio y desarrollo de la EA.

En relación a la microglía, en este trabajo de Tesis Doctoral hemos descrito la existencia de un marcado proceso de activación/degeneración microglial asociado a la acumulación de IL-1 $\beta$  que tiene lugar mediante la supresión de la expresión de las proteínas de endocitosis Tom1 y Tollip en un modelo murino triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer. Por el contrario, la sobreexpresión de Tom1 parece incrementar levemente parámetros como el área ocupada por las células microgliales o la longitud total de las prolongaciones microgliales respecto al grupo control. En este sentido, numerosos trabajos llevados a cabo en la última década han caracterizado un fenotipo microglial disfuncional correspondiente a lo que conocemos como microglía senescente o distrófica (Streit 2006; Kettenmann et al. 2013; Mosher and Wyss-Coray 2014; Streit et al. 2014). En línea con esta idea, nuestro grupo (Sanchez-Mejias et al. 2016) ha descrito un proceso degenerativo de la microglía en el hipocampo de los pacientes de Alzheimer, siendo más acusado en el giro dentado que en otras regiones. La microglía senescente se caracteriza morfológicamente por la atrofia del cuerpo celular, el acortamiento de las prolongaciones y la pérdida o fragmentación de las mismas (citorrexis). Esta disfunción glial se ha relacionado ampliamente con el envejecimiento normal así como con enfermedades neurodegenerativas como el síndrome de Down o la enfermedad de Alzheimer (Xue and Streit 2011; Streit 2004). Además, la identificación de TREM2 (implicado en procesos de fagocitosis en la microglía) como factor de riesgo para la EA, cuyas mutaciones han sido relacionadas con pérdidas de función no hace sino añadir más importancia a los procesos de senescencia microglial asociados al Alzheimer.

Los procesos de degeneración microglial en pacientes contrastan con la activación de la microglía descrita en modelos murinos para la EA como el modelo bigénico APP/PS1 empleado en los capítulos previos de este trabajo (ver Apartado 3.2). En el modelo APP/PS1 nuestro grupo de investigación describió procesos tempranos de activación microglial que se encontraban asociados espacial y temporalmente a las placas neuríticas tanto en el hipocampo (Jimenez et al. 2008) como en la corteza entorrinal (Moreno-Gonzalez et al. 2009). Se estableció además un cambio fenotípico de activación microglial, pasando de un estado de activación de tipo M2 con funciones neuroprotectoras en animales jóvenes a un estado M1 fundamentalmente citotóxico caracterizado por la producción de TNF $\alpha$  en edades avanzadas (Jimenez et al. 2008). En este sentido, los resultados obtenidos mediante ELISA en este trabajo, muestran una marcada respuesta neuroinflamatoria de tipo M1 caracterizada por un fuerte incremento de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en los animales 3xTgAD-Tom-sh y 3xTgAD-Tollip-sh con respecto

al grupo control. Al contrario que los resultados para estas dos citoquinas proinflamatorias, los análisis para las citoquinas antiinflamatorias IL-10 e IL-4 muestran un incremento asociado a la sobreexpresión de Tom1 (3xTgAD-Tom-AAV), mientras que sus niveles experimentan una ligera reducción asociada a la supresión de Tom1 o Tollip. Así, estudios más recientes de nuestro grupo en los que se deleccionó la IL-4 (citoquina anti-inflamatoria) en un modelo APP mostraron un cambio fenotípico microglial a un estado de activación M1 junto con un aumento de la patología amiloide y axonal (Trujillo-Estrada 2015). Estos modelos animales se caracterizan por presentar patología amiloide (además de pérdida sináptica y neuronal, entre otras lesiones histopatológicas), lo cual ha sido relacionado con los procesos de activación microglial. Sin embargo, la ausencia de patología Tau en los modelos APP puede ser una de las causas por las que no se han descrito procesos de senescencia microglial previamente en estos animales. En este sentido, de manera muy reciente nuestro grupo de investigación ha descrito procesos de degeneración de la microglía, asociados a la acumulación de especies fosforiladas de tau en estado soluble, en muestras humanas *post mortem* de pacientes para la enfermedad de Alzheimer y en modelos tau (Thy-tau-22) (Sanchez-Mejias et al. 2016).

El modelo 3xTgAD empleado en este capítulo se caracteriza por ser el primer modelo murino que recapitula no solo la patología amiloide y sináptica sino también la patología de tau (Oddo et al. 2003). Nuestros resultados en los grupos animales en los que se ha eliminado Tom1 o Tollip (3xTgAD-Tom-sh o 3xTgAD-Tollip-sh) muestran una reducción muy significativa del área del parénquima nervioso cubierta por microglía al mismo tiempo que se mantiene el número de células microgliales, lo cual puede ser indicativo de un proceso degenerativo (atrofia celular) de estas células. Además, y en apoyo a esta idea, estas células gliales pierden casi el 70% de sus prolongaciones, de manera paralela a la reducción de la longitud total de sus procesos microgliales. Sin embargo, todas estas características morfológicas pueden ser indicativos tanto de procesos de activación como de degeneración microglial. Serían necesarios estudios adicionales para caracterizar en profundidad el fenotipo microglial, incluyendo por ejemplo el marcador CD45 específico de activación microglial o ferritina como indicador de un proceso degenerativo, en los animales 3xTgAD inyectados con cada uno de los virus adeno-asociados mencionados previamente. Es conocido que las células de la microglía producen IL-1 (Li et al. 2003) y además expresan el receptor IL-1R1 tal y como hemos mostrado previamente en este trabajo, por ello es posible que la supresión de la endocitosis mediada por Tom1/Tollip y la consecuente acumulación de IL-1R1 afecte a las células de la microglía en gran medida, ya sea para activarlas o bien para inducir procesos de degeneración celular. Aunque la limitación temporal nos ha impedido analizar la evolución de fosfo-tau en este trabajo, resultados previos del grupo del Dr. LaFerla mostraron un incremento de la patología tau asociado a la inflamación mediada por IL-1 $\beta$  en animales 3xTgAD (Kitazawa et al. 2005). Posteriormente, los mismos autores demostraron que el bloqueo de IL-1R1 incidía de manera positiva en una reducción de la fosforilación de tau al mismo tiempo que se reducía la activación microglial en el modelo triple transgénico (Kitazawa et al. 2011). Aunque no

podemos descartar un posible papel tóxico de la patología amiloide, y especialmente de algunas formas oligoméricas solubles, sobre las células de la microglía (Korotzer et al. 1993; Flanary et al. 2007), nuestro grupo ha demostrado que *in vitro* el A $\beta$  soluble procedente de cerebro de pacientes, y de modelos APP/PS1, no producen toxicidad microglial (Sanchez-Mejias et al. 2016). En cualquier caso, se ha demostrado una disfunción fagocítica de las células microgliales asociadas a las placas amiloides en dos modelos animales para la EA (Krabbe et al. 2013).

Por todo ello, y aunque no podemos descartar completamente procesos de activación microglial, nuestros resultados sugieren que las células de la microglía se encuentran en estado degenerativo. Este proceso de degeneración microglial puede deberse a un cúmulo de factores entre los que encontramos el aumento de la IL-1 $\beta$ , el incremento de la patología amiloide (que cursa con un incremento de oligómeros tóxicos) y el efecto de la hiperfosforilación de tau. No obstante, todos estos factores tienen como origen la sobreexpresión del receptor IL-1R1 debido fundamentalmente a la supresión de las proteínas mediadoras de endocitosis Tom1 y Tollip.

En cuanto a la astrogliá, en este trabajo hemos mostrado un marcado proceso de activación astrogliá, caracterizado morfológicamente por el engrosamiento del cuerpo celular y de las prolongaciones astrogliales, asociado a la acumulación de IL-1 $\beta$  mediante la supresión de la endocitosis de IL-1R1 mediada por Tom1 y Tollip en el modelo murino triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer. De acuerdo con nuestros resultados, numerosos autores han descrito procesos de reactividad astrogliá asociada a la sobreproducción de IL-1 $\beta$  (Mrak and Griffin 2001; Moynagh 2005; Shaftel et al. 2008; Kitazawa et al. 2011; Medeiros and LaFerla 2013). En este sentido, se ha demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* la capacidad de la IL-1 $\beta$  para estimular la sobreproducción de S100B por los astrocitos; la cual ha sido ampliamente relacionada con un efecto patológico en la enfermedad de Alzheimer (Griffin et al. 1989; Sheng et al. 1996; Peskind et al. 2001; de Souza et al. 2009; Kitazawa et al. 2011). En un modelo murino para la EA (Tg2576) se demostró la relación entre la sobreproducción de S100B y el incremento de la deposición amiloide (Mori et al. 2010). El exceso de producción de esta proteína ha sido también relacionado con la activación de GSK-3 $\beta$  y la degradación de  $\beta$ -catenina en pacientes de Alzheimer (Esposito et al. 2008). Además la sobreexpresión de GSK-3 $\beta$  se ha relacionado con el incremento de la hiperfosforilación de tau en el hipocampo de modelos transgénicos para la EA por lo que la reactividad astrogliá mediada por IL-1 $\beta$  puede ser uno de los agentes causantes de la patología de tau característica de los pacientes de Alzheimer (Lucas et al. 2001). Así, el bloqueo del receptor IL-1R1 y con ello el bloqueo de la cascada de señalización mediada por la IL-1 dio como resultado la disminución de la producción de S100B, la reducción de la patología neuronal de tau y la reducción de la activación de GSK-3 $\beta$ , demostrando así la implicación directa de la interleuquina 1 en todos estos procesos característicos de la enfermedad de Alzheimer (Kitazawa et al. 2011).

Aunque nuestros resultados muestran una morfología típica de los astrocitos reactivos, el estudio morfométrico muestra algunos resultados contradictorios como la reducción significativa del área cubierta por astrocitos GFAP-positivos. Además, nuestros datos muestran una reducción del número y longitud de las prolongaciones astrogiales. Tal y como mencionamos en capítulos previos de esta Tesis Doctoral, aunque el GFAP ha sido ampliamente usado como marcador de activación astrogial realmente es un marcador constitutivo de los astrocitos, expresado por la astrogía reactiva y no reactiva (ver Apartado 3.1). Si bien es cierto que el aumento de GFAP suele ser indicativo de los procesos de reactividad astrogial, la disminución del área GFAP-positiva podría estar relacionada con el fenotipo astrogial observado en los animales 3xTgAD-Tom-sh y 3xTgAD-Tollip-sh en los que se observa una hipertrofia del cuerpo celular pero los astrocitos muestran un número muy reducido de procesos astrogiales. Sería interesante analizar en estos animales la expresión del marcador de reactividad astrogial BLBP por parte de los astrocitos, tal y como realizamos en capítulos previos de este trabajo, con el fin de corroborar la activación astrogial que sugieren nuestros resultados.

En relación a los animales en los que se ha sobreexpresado Tom1 (3xTgAD-Tom-AAV), resulta llamativo que la astrogía sigue la misma tendencia observada en los animales 3xTgAD-Tom-sh y 3xTgAD-Tollip-sh en los que se reducen tanto el área ocupada por la población astrogial como el número y longitud de los procesos astrocíticos. Es cierto que estos cambios en el grupo inyectado con Tom-AAV resultan mínimos respecto al grupo control y no son estadísticamente significativos, sin embargo, contrastan con el resto de los resultados analizados durante este capítulo donde la tendencia en este grupo de animales era alcanzar los valores al nivel del grupo control y siempre en dirección opuesta a lo que ocurría al suprimir Tom1 o Tollip.

Aunque es necesario llevar a cabo nuevos experimentos para poder entender la naturaleza de esta respuesta inflamatoria asociada a la astrogía, podemos decir que la supresión de Tom1 o Tollip mediante la sobreexpresión de IL-1 $\beta$  parece producir una sobreactivación astrogial en el hipocampo del modelo 3xTgAD. Esta reactividad astrogial se caracteriza morfológicamente por la hipertrofia del cuerpo celular y de las prolongaciones de los astrocitos. También sería necesario estudiar el efecto que la degeneración microglial pudiera tener sobre la astrogía. En este sentido en el hipocampo de pacientes donde tiene lugar un proceso degenerativo microglial en paralelo ocurre una fuerte reactividad astrogial (Sanchez-Mejias 2015).

El silenciamiento génico de Tom1 y Tollip, implicados en procesos de endocitosis del receptor IL-1R1, aceleran la progresión de la patología del Alzheimer en el modelo triple transgénico 3xTgAD. Este silenciamiento produce un aumento de la acumulación de depósitos extracelulares y especies solubles tóxicas de A $\beta$ . El incremento en la carga amiloide puede deberse en parte a disfuncionalidad microglial asociada al aumento de IL-1 $\beta$  al bloquear la endocitosis de IL-1R1. Por el contrario, la sobreexpresión de Tom1 induce una respuesta anti-inflamatoria protectora caracterizada por la sobreexpresión de IL-4 y la disminución de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$ .



## BIBLIOGRAFÍA

- Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, et al. 2000. *Inflammation and Alzheimer's disease*.
- Bagyinszky E, Giau V Van, Shim K, Suk K, An SSA, Kim S. 2017. Role of inflammatory molecules in the Alzheimer's disease progression and diagnosis. *J Neurol Sci* **376**: 242–254.
- Berkenbosch F, van Oers J, del Rey A, Tilders F, Besedovsky H. 1987. Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1. *Science (80- )* **238**: 524–526.
- Besedovsky H, del Rey A, Sorkin E, Dinarello CA. 1986. Interleukin1 and Glucocorticoid Hormones Integrate an Immunoregulatory Feedback Circuit. *Ann N Y Acad Sci* **496**: 85–90.
- Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM. 2005. Intraneuronal A $\beta$  causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* **45**: 675–688.
- Blum-Degen D, Müller T, Kuhn W, Gerlach M, Przuntek H, Riederer P. 1995. Interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett* **202**: 17–20.
- Brissoni B, Agostini L, Kropf M, Martinon F, Swoboda V, Lippens S, Everett H, Aebi N, Janssens S, Meylan E, et al. 2006. Intracellular Trafficking of Interleukin-1 Receptor I Requires Tollip. *Curr Biol* **16**: 2265–2270.
- Brugg B, Dubreuil YL, Huber G, Wollman EE, Delhayebouchaud N, Mariani J. 1995. Inflammatory Processes Induce  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein Changes In Mouse Brain. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 3032–3035.
- Burns K, Clatworthy J, Martin L, Martinon F, Plumpton C, Maschera B, Lewis A, Ray K, Tschopp J, Volpe F. 2000. Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nat Cell Biol* **2**: 346–351.
- Colonna M, Butovsky O. 2017. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. 441–468.
- Craft JM, Watterson DM, Hirsch E, Van Eldik LJ. 2005. Interleukin 1 receptor antagonist knockout mice show enhanced microglial activation and neuronal damage induced by intracerebroventricular infusion of human beta-amyloid. *J Neuroinflammation* **2**: 15.
- de Souza DF, Leite MC, Quincozes-Santos A, Nardin P, Tortorelli LS, Rigo MM, Gottfried C, Leal RB, Gonçalves CA. 2009. S100B secretion is stimulated by IL-1 $\beta$  in glial cultures and hippocampal slices of rats: Likely involvement of MAPK pathway. *J Neuroimmunol* **206**: 52–57.
- Dinarello CA. 2011. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* **117**: 3720–3732.
- Du Yan S, Zhu H, Fu J, Yan SF, Roher A, Tourtellotte WW, Rajavashisth T, Chen X, Godman GC, Stern D, et al. 1997. Amyloid-beta peptide-receptor for advanced glycation endproduct interaction elicits neuronal expression of macrophage-colony stimulating factor: a proinflammatory pathway in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 5296–301.
- El Khoury J, Hickman SE, Thomas CA, Cao L, Silverstein SC, Loike JD. 1996. Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils. *Nature* **382**: 716–719.
- Ericsson A, Liu C, Hart RP, Sawchenko PE. 1995. Type 1 interleukin-1 receptor in the rat brain: Distribution, regulation, and relationship to sites of IL-1-induced cellular activation. *J Comp Neurol* **361**: 681–698.
- Esposito G, Scuderi C, Lu J, Savani C, De Filippis D, Iuvone T, Steardo Jr L, Sheen V, Steardo L. 2008. S100B induces tau protein hyperphosphorylation via Dickkopf-1 up-regulation and disrupts the Wnt pathway in human neural stem cells. *J Cell Mol Med* **12**: 914–927.
- Fassbender K, Walter S, Kühl S, Landmann R, Ishii K, Bertsch T, Stalder AK, Muehlhauser F, Liu Y, Ulmer AJ, et al. 2004. The LPS receptor (CD14) links innate immunity with Alzheimer's disease. *FASEB J* **18**: 203–205.
- Filali M, Lalonde R, Theriault P, Julien C, Calon F, Planel E. 2012. Cognitive and non-cognitive behaviors in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease expressing mutated APP, PS1, and Mapt (3xTg-AD). *Behav Brain Res* **234**: 334–342.
- Flanary BE, Sammons NW, Nguyen C, Walker D, Streit WJ. 2007. Evidence That Aging And Amyloid Promote Microglial Cell Senescence.

- Rejuvenation Res* **10**: 61–74.
- Forlenza OV, Diniz BS, Talib LL, Mendonça VA, Ojopi EB, Gattaz WF, Teixeira AL.** 2009. Increased serum IL-1beta level in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Dement Geriatr Cogn Disord* **28**: 507–512.
- Forloni G, Demicheli F, Giorgi S, Bendotti C, Angeretti N.** 1992. Expression of amyloid precursor protein mRNAs in endothelial, neuronal and glial cells: modulation by interleukin-1. *Mol Brain Res* **16**: 128–134.
- Frenkel D, Wilkinson K, Zhao L, Hickman SE, Means TK, Puckett L, Farfara D, Kingery ND, Weiner HL, El Khoury J.** 2013. Scara1 deficiency impairs clearance of soluble amyloid- $\beta$  by mononuclear phagocytes and accelerates Alzheimer's-like disease progression. *Nat Commun* **4**: 2030.
- Friedman WJ.** 2001. Cytokines regulate expression of the type 1 interleukin-1 receptor in rat hippocampal neurons and glia. *Exp Neurol* **168**: 23–31.
- Ghosh S, Wu MD, Shaftel SS, Kyrkanides S, LaFerla FM, Olschowka JA, O'Banion MK.** 2013. Sustained Interleukin-1 Overexpression Exacerbates Tau Pathology Despite Reduced Amyloid Burden in an Alzheimer's Mouse Model. *J Neurosci* **33**: 5053–5064.
- Goldgaber D, Harris HW, Hla T, Maciag T, Donnelly RJ, Jacobsen JS, Vitek MP, Gajdusek DC.** 1989. Interleukin 1 regulates synthesis of amyloid beta-protein precursor mRNA in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 7606–10.
- Griffin WS, Stanley LC, Ling C, White L, MacLeod V, Perrot LJ, White CL, Araoz C.** 1989. Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci* **86**: 7611–7615.
- 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**: 117–27.
- Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Hamshere M, Pahwa JS, Moskvina V, Williams A, Jones N, Thomas C, et al.** 2009. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease, and shows evidence for additional susceptibility genes. *Nat Genet* **41**: 1088–1093.
- Heneka MT, Kummer MP, Latz E.** 2014. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat Rev Immunol* **14**: 463–77.
- Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B.** 2015. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci* **16**: 358–372.
- Hickman SE, Allison EK, El Khoury J.** 2008. Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J Neurosci* **28**: 8354–60.
- Jankowsky JL, Slunt HH, Ratovitski T, Jenkins NA, Copeland NG, Borchelt DR.** 2001. Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: A comparison of strategies. *Biomol Eng* **17**: 157–165.
- 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.
- Katoh Y, Imakagura H, Futatsumori M, Nakayama K.** 2006. Recruitment of clathrin onto endosomes by the Tom1-Tollip complex. *Biochem Biophys Res Commun* **341**: 143–149.
- Katoh Y, Shiba Y, Mitsuhashi H, Yanagida Y, Takatsu H, Nakayama K.** 2004. Tollip and Tom1 form a complex and recruit ubiquitin-conjugated proteins onto early endosomes. *J Biol Chem* **279**: 24435–24443.
- Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A.** 2013. Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. *Neuron* **77**: 10–18.
- Kitazawa M, Cheng D, Tsukamoto MR, Koike MA, Wes PD, Vasilevko V, Cribbs DH, LaFerla FM.** 2011. Blocking IL-1 signaling rescues cognition, attenuates tau pathology, and restores neuronal  $\beta$ -catenin pathway function in an Alzheimer's disease model. *J Immunol* **187**: 6539–49.
- Kitazawa M, Oddo S, Yamasaki TR, Green KN, LaFerla FM.** 2005. Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* **25**: 8843–53.
- Koenigsnecht J, Landreth G.** 2004. Microglial Phagocytosis of Fibrillar  $\beta$ -Amyloid through a 1 Integrin-Dependent Mechanism. *J Neurosci* **24**: 9838–9846.
- Korotzer AR, Pike CJ, Cotman CW.** 1993.  $\beta$ -Amyloid

- peptides induce degeneration of cultured rat microglia. *Brain Res* **624**: 121–125.
- Krabbe G, Halle A, Matyash V, Rinnenthal JL, Eom GD, Bernhardt U, Miller KR, Prokop S, Kettenmann H, Heppner FL.** 2013. Functional Impairment of Microglia Coincides with Beta-Amyloid Deposition in Mice with Alzheimer-Like Pathology. *PLoS One* **8**.
- Labzin LI, Heneka MT, Latz E.** 2017. Innate Immunity and Neurodegeneration. 1–13.
- LaFerla FM, Green KN.** 2012. Animal models of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**: 1–13.
- Lambert J-C, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K, Hiltunen M, Combarros O, Zelenika D, Bullido MJ, Tavernier B, et al.** 2009. Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *CR1* associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* **41**: 1094–1099.
- Lemere CA.** 2007. A beneficial role for IL-1 beta in Alzheimer disease? *J Clin Invest* **117**: 1483–5.
- Li Y, Liu L, Barger SW, Griffin WS.** 2003. Interleukin-1 mediates pathological effects of microglia on tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38-MAPK pathway. *J Neurosci* **23**: 1605–1611.
- Liao YF, Wang BJ, Cheng HT, Kuo LH, Wolfe MS.** 2004. Tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , and interferon- $\gamma$  stimulate  $\gamma$ -secretase-mediated cleavage of amyloid precursor protein through a JNK-dependent MAPK pathway. *J Biol Chem* **279**: 49523–49532.
- Licastro F, Pedrini S, Caputo L, Annoni G, Davis LJ, Ferri C, Casadei V, Grimaldi LME.** 2000. Increased plasma levels of interleukin-1, interleukin-6 and antichymotrypsin in patients with Alzheimer's disease: Peripheral inflammation or signals from the brain? *J Neuroimmunol* **103**: 97–102.
- Lim GP, Yang F, Chu T, Chen P, Beech W, Teter B, Tran T, Ubeda O, Ashe KH, Frautschy SA, et al.** 2000. Ibuprofen suppresses plaque pathology and inflammation in a mouse model for Alzheimer's disease. *J Neurosci* **20**: 5709–5714.
- Lucas JJ, Hernández F, Gómez-Ramos P, Morán MA, Hen R, Avila J.** 2001. Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *EMBO J* **20**: 27–39.
- Matousek SB, Ghosh S, Shaftel SS, Kyrkanides S, Olschowka JA, O'Banion MK.** 2012. Chronic IL-1 $\beta$ -mediated neuroinflammation mitigates amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease without inducing overt neurodegeneration. *J Neuroimmune Pharmacol* **7**: 156–164.
- Medeiros R, LaFerla FM.** 2013. Astrocytes: Conductors of the Alzheimer disease neuroinflammatory symphony. *Exp Neurol* **239**: 133–138.
- Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Del Rio JC, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, et al.** 2009. Extracellular amyloid- $\beta$  and cytotoxic glial activation induce significant entorhinal neuron loss in young PS1M146L/APP751SL mice. *J Alzheimer's Dis* **18**: 755–776.
- Mori T, Koyama N, Arendash GW, Horikoshi-Sakuraba Y, Tan J, Town T.** 2010. Overexpression of human S100B exacerbates cerebral amyloidosis and gliosis in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Glia* **58**: 300–314.
- Morihara T, Teter B, Yang F, Lim GP, Boudinot S, Boudinot FD, Frautschy SA, Cole GM.** 2005. Ibuprofen suppresses interleukin-1beta induction of pro-amyloidogenic alpha1-antichymotrypsin to ameliorate beta-amyloid (A $\beta$ ) pathology in Alzheimer's models. *Neuropsychopharmacology* **30**: 1111–1120.
- Morris R.** 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* **11**: 47–60.
- Mosher KI, Wyss-Coray T.** 2014. Microglial dysfunction in brain aging and Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol* **88**: 594–604.
- Moynagh PN.** 2005. The interleukin-1 signalling pathway in astrocytes: A key contributor to inflammation in the brain. *J Anat* **207**: 265–269.
- Mrak RE, Griffin WST.** 2001. Interleukin-1, neuroinflammation, and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **22**: 903–908.
- Navarrete F, Pérez-Ortiz J., Femenía T, García-Gutiérrez M., García-Payá ME, Leiva-santana C, Manzanares J.** 2008. Methods to evaluate cognitive disorders in animal models Métodos de evaluación de trastornos cognitivos en modelos animales. *Rev Neurol*.
- Núñez-Díaz C.** 2014. Estudio de la toxicidad de las placas amiloides durante la progresión de la patología en modelos transgénicos de la enfermedad de Alzheimer. *Tesina de Máster*.

- O'Neill LAJ.** 2008. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 Years of progress. *Immunol Rev* **226**: 10–18.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM.** 2003. Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles Intra-cellular A $\beta$  and Synaptic Dysfunction. *Neuron* **39**: 409–421.
- 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.
- Paresce DM, Ghosh RN, Maxfield FR.** 1996. Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid  $\beta$ -protein via a scavenger receptor. *Neuron* **17**: 553–565.
- Peskind ER, Griffin WST, Akama KT, Raskind MA, Van Eldik LJ.** 2001. Cerebrospinal fluid S100B is elevated in the earlier stages of Alzheimer's disease. *Neurochem Int* **39**: 409–413.
- Prieto GA, Snigdha S, Baglietto-Vargas D, Smith ED, Berchtold NC, Tong L, Ajami D, LaFerla FM, Rebek J, Cotman CW.** 2015. Synapse-specific IL-1 receptor subunit reconfiguration augments vulnerability to IL-1 $\beta$  in the aged hippocampus. *Proc Natl Acad Sci* **112**: E5078–E5087.
- Rachal Pugh C, Fleshner M, Watkins LR, Maier SF, Rudy JW.** 2001. The immune system and memory consolidation: A role for the cytokine IL-1 $\beta$ . *Neurosci Biobehav Rev* **25**: 29–41.
- Risbud M V, Shapiro IM.** 2014. Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: pain and disc content. *Nat Rev Rheumatol* **10**: 44–56.
- Rogers JT, Leiter LM, McPhee J, Cahill CM, Zhan S-S, Potter H, Nilsson LNG.** 1999. Translation of the Alzheimer Amyloid Precursor Protein mRNA Is Up-regulated by Interleukin-1 through 5'-Untranslated Region Sequences. *J Biol Chem* **274**: 6421–6431.
- Sanchez-Mejias E.** 2015. Estudio neuropatológico del hipocampo y giro parahipocámpal 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-Díaz 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-Varo R.** 2011. Estudio de la patología neurítica y sináptica en el hipocampo del modelo transgénico murino PS1M146L/APP751SL de la Enfermedad de Alzheimer. Tesis Doctoral.
- 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* **4621111**: e201797397.
- Schneider H, Pitossi F, Balschun D, Wagner A, del Rey A, Besedovsky HO.** 1998. A neuromodulatory role of interleukin-1beta in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7778–83.
- Seet L-F.** 2005. Endofin recruits clathrin to early endosomes via TOM1. *J Cell Sci* **118**: 575–587.
- Seet LF, Liu N, Hanson BJ, Hong W.** 2004. Endofin Recruits TOM1 to Endosomes. *J Biol Chem* **279**: 4670–4679.
- Shaftel SS, Griffin WST, O'Banion MK.** 2008. The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective. *J Neuroinflammation* **5**: 7.
- Sheedy FJ, Grebe A, Rayner KJ, Kalantari P, Ramkhalawon B, Carpenter SB, Becker CE, Ediriweera HN, Mullick AE, Golenbock DT, et al.** 2013. CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. *Nat Immunol* **14**: 812–20.
- Sheng JG, Ito K, Skinner RD, Mrak RE, Rovnaghi CR, Van Eldik LJ, Griffin WST.** 1996. In vivo and in vitro evidence supporting a role for the inflammatory cytokine interleukin-1 as a driving force in Alzheimer pathogenesis. *Neurobiol Aging* **17**: 761–766.
- Sterniczuk R, Antle MC, Laferla FM, Dyck RH.** 2010. Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: Part 2. Behavioral and cognitive changes. *Brain Res* **1348**: 149–155.
- Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, van Gils JM, Deng J, Halle A, Rayner KJ, Boyer L, Zhong R, Frazier WA, et al.** 2010. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol* **11**: 155–61.
- Streit WJ.** 2004. Microglia and Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurosci Res* **77**: 1–8.
- Streit WJ.** 2006. Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration

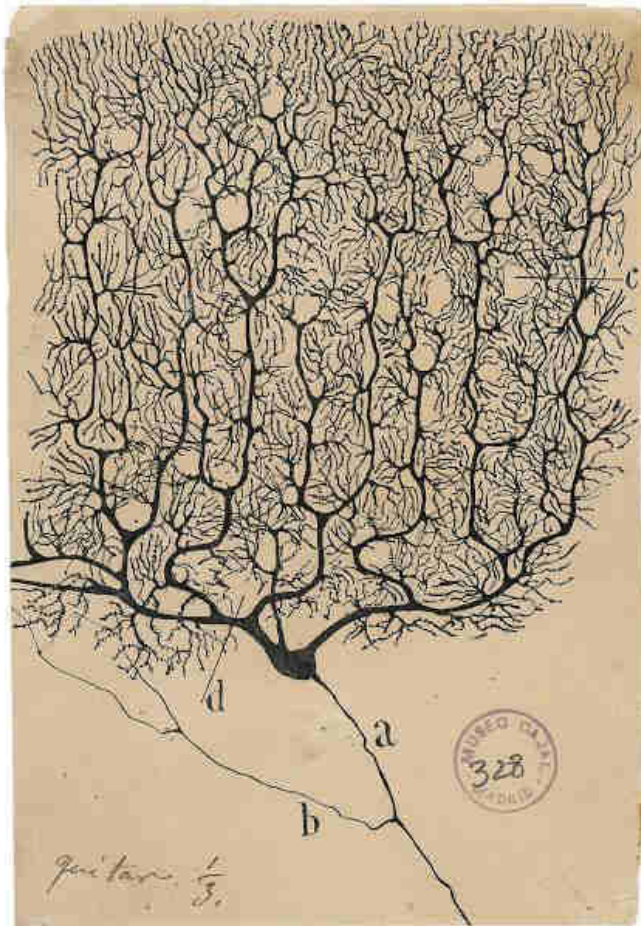
- date? *Trends Neurosci* **29**: 506–510.
- Streit WJ, Xue QS, Braak H, del Tredici K.** 2014. Presence of severe neuroinflammation does not intensify neurofibrillary degeneration in human brain. *Glia* **62**: 96–105.
- Sy M, Kitazawa M, Medeiros R, Whitman L, Cheng D, Lane TE, LaFerla FM.** 2011. Inflammation induced by infection potentiates tau pathological features in transgenic mice. *Am J Pathol* **178**: 2811–2822.
- Tanaka S, Ide M, Shibutani T, Ohtaki H, Numazawa S, Shioda S, Yoshida T.** 2006. Lipopolysaccharide-induced microglial activation induces learning and memory deficits without neuronal cell death in rats. *J Neurosci Res* **83**: 557–566.
- Thanopoulou K, Fragkouli A, Stylianopoulou F, Georgopoulos S.** 2010. Scavenger receptor class B type I (SR-BI) regulates perivascular macrophages and modifies amyloid pathology in an Alzheimer mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 20816–20821.
- Torres-Aleman I.** 2008. Minireview: Mouse models of Alzheimer's dementia: Current concepts and new trends. *Endocrinology* **149**: 5952–5957.
- Trujillo-Estrada L.** 2015. Caracterización neuropatológica y evaluación preclínica de potentes estrategias terapéuticas en modelos animales transgénicos de la enfermedad de Alzheimer. Tesis Doctoral.
- Trujillo-Estrada L, Jimenez S, De Castro V, Torres M, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Navarro V, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mejias E, Davila JC, et al.** 2013. In vivo modification of Abeta plaque toxicity as a novel neuroprotective lithium-mediated therapy for Alzheimer's disease pathology. *Acta Neuropathol Commun* **1**: 73.
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva J V., Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ.** 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid  $\beta$  protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* **416**: 535–539.
- Walsh DM, Selkoe DJ.** 2007. A $\beta$  oligomers - A decade of discovery. *J Neurochem* **101**: 1172–1184.
- 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**.
- Wolf SA, Boddeke HWGM, Kettenmann H.** 2017. Microglia in Physiology and Disease. *Annu Rev Physiol* **79**: 619–643.
- Xue QS, Streit WJ.** 2011. Microglial pathology in Down syndrome. *Acta Neuropathol* **122**: 455–466.
- Yang Y, Quitschke WW, Brewer GJ.** 1998. Upregulation of amyloid precursor protein gene promoter in rat primary hippocampal neurons by phorbol ester, IL-1 and retinoic acid, but not by reactive oxygen species. *Brain Res Mol Brain Res* **60**: 40–49.
- Yu Y, Ye RD.** 2015. Microglial A $\beta$  Receptors in Alzheimer's Disease. *Cell Mol Neurobiol* **35**: 71–83.





# 4. REFLEXIÓN FINAL Y CONCLUSIONES

---



Santiago Ramón y Cajal



## REFLEXIÓN FINAL

El desarrollo de terapias que frenen o retrasen el avance de la patología asociada al Alzheimer es uno de los principales retos biomédicos a los que se enfrenta nuestra sociedad. La hipótesis de la cascada amiloide ha dominado durante los últimos 25 años los programas de desarrollo de fármacos contra el Alzheimer, sin embargo, los continuos fracasos terapéuticos basados en dicha hipótesis han promovido que otras alternativas patogénicas, como la neuroinflamatoria, cobren mayor protagonismo.

A pesar de los numerosos estudios existentes en los últimos años sobre la respuesta neuroinflamatoria, mediada por la activación de las células microgliales y astrogiales, en modelos animales de Alzheimer, el papel beneficioso o perjudicial de la misma es aún materia de debate. Dicha activación es, al inicio, fundamentalmente una respuesta protectora dirigida a eliminar los estímulos perjudiciales, por ejemplo, la microglía activada reduce la acumulación de A $\beta$  al aumentar su fagocitosis, aclaramiento y degradación, y además secreta factores neurotróficos. Sin embargo, la activación incontrolada y prolongada va más allá del control fisiológico, y los efectos perjudiciales anulan los beneficiosos. La visión dominante en la actualidad otorga un papel neurotóxico a la activación de la microglía, a través de la liberación de citocinas y mediadores proinflamatorios. Esta visión está basada principalmente en los estudios realizados en modelos transgénicos de Alzheimer basados en sobreproducción de A $\beta$ , donde se observa una respuesta microglial muy marcada con carácter neurotóxico. Sin embargo, recientemente nuestro grupo ha descrito que en el hipocampo de pacientes no ocurre esta activación microglial, sino que por el contrario tiene lugar un marcado proceso de degeneración de estas células, mediado por las formas solubles de fosfo-Tau. Esta patología microglial conduciría a una menor protección del parénquima cerebral y a una reducida capacidad de eliminación de las formas tóxicas de A $\beta$  potenciándose así la progresión de la enfermedad. Por tanto, la patología cerebral en los pacientes se vería disparada por un estado de inmunosupresión. Esta hipótesis explicaría el continuo fracaso de las terapias antiinflamatorias en los ensayos clínicos. Por tanto, sería necesario reevaluar el papel de la respuesta neuroinflamatoria en la enfermedad y enfocar las terapias hacia la protección de la microglía y su polarización hacia un fenotipo neuroprotector.

Por otro lado, se cree que los astrocitos también tienen un papel importante en el proceso neuroinflamatorio, observándose una fuerte reactividad astrogial en el cerebro de pacientes de Alzheimer, aunque los posibles fenotipos funcionales de los astrocitos aún no se conocen. Los astrocitos participan en la homeostasis, defensa y mantenimiento del cerebro y por tanto una disfunción de esta población glial tendría graves repercusiones en la integridad de los circuitos neurales. Por tanto, en los próximos años es de esperar importantes avances en la comprensión de la extraordinaria plasticidad de las células microgliales y astrogiales y su contribución al desarrollo o progresión de la enfermedad, lo que abrirá nuevas perspectivas

terapéuticas. Una de las prioridades en la investigación básica es sin duda desarrollar nuevos modelos animales de la enfermedad que conjuntamente a la patología de A $\beta$  y de fosfo-Tau también mimeticen la respuesta glial observada en pacientes. Por último, hay que tener en cuenta que la respuesta inmune cerebral se ve influenciada por los eventos sistémicos, por tanto, hay que potenciar el estudio de los efectos que las enfermedades sistémicas (inflamación sistémica, diabetes, hipertensión, etc.) tienen sobre la patología del Alzheimer con objeto de abrir nuevas rutas potenciales que permitan retrasar su aparición o progresión.

En esta línea, en este trabajo de Tesis Doctoral hemos profundizado en la respuesta neuroinflamatoria asociada a la enfermedad de Alzheimer, utilizando modelos transgénicos, y, además, algunos de los resultados se han validado también en muestras humanas. Los resultados de este trabajo han permitido avanzar en el conocimiento de los perfiles funcionales de la glía reactiva y conocer su implicación en la progresión de la patología.

En primer lugar, hemos analizado a nivel celular y subcelular la respuesta inflamatoria mediada por la astrogliá reactiva en la formación hipocampal del modelo APP/PS1. Nuestros resultados muestran la existencia de un fuerte proceso de reactividad astrogliá asociado no sólo al envejecimiento normal sino a la progresión de la patología amiloide en la región CA1 del hipocampo. Estas células gliales participan activamente en el aislamiento e incluso en la eliminación del A $\beta$  en un intento por aliviar la carga amiloide y así reducir el efecto tóxico que tienen estos depósitos extracelulares sobre las neuronas adyacentes. Además, y de manera novedosa, nuestro trabajo ha identificado que los astrocitos reactivos recubren, internalizan y degradan neuritas distróficas que se localizan en la periferia de las placas amiloides para así intentar contener el daño asociado a la patología neurítica. Esta actividad fagocítica de los astrocitos es la primera vez que se describe, siendo destacable que no hemos observado células microgliales (las células fagocíticas por excelencia del cerebro) implicadas en la fagocitosis de distrofias. Las neuritas distróficas son estructuras de naturaleza axonal/presináptica en un estado patológico, en las que existe una acumulación anormal de vesículas autofágicas debido a fallos en el transporte axonal. Por tanto, la eliminación fagocítica por parte de los astrocitos de estas porciones axonales disfuncionales puede ser un intento de reparación y restauración de la función neuronal. En estas distrofias además tiene lugar la formación/liberación de A $\beta$ , por lo que su eliminación contribuiría a restringir la patología amiloide y la consecuente respuesta inflamatoria. Aunque la mayoría de los depósitos amiloides mostraron astrocitos reactivos llevando a cabo la internalización de las neuritas (68%), el número total de distrofias fagocitadas es muy pequeño (7%). Además, el proceso de fagocitosis de estructuras neuronales aberrantes ha sido identificado también en muestras humanas *post mortem*. Los datos descritos aquí muestran similitudes entre un modelo animal para la EA y pacientes de Alzheimer, en cuanto a la función astrogliá. Teniendo en cuenta los perfiles genéticos recientes de los astrocitos, es posible que estos astrocitos fagocíticos sean un subtipo de población de astrocitos en el cerebro. Nuestros datos también



indican que la capacidad fagocítica de los astrocitos reactivos podría de hecho estar limitada, e incluso alterarse durante el curso de la enfermedad. El deterioro funcional de las células astrogiales en la EA como un potencial impulsor de la progresión de la patología merece una consideración especial. Por lo tanto, proponemos un escenario de disfunción astrogial asociado a la enfermedad de Alzheimer y por tanto explorar cómo aumentar/restaurar las propiedades fagocíticas de los astrocitos podría ser una nueva vía terapéutica para frenar el avance de la enfermedad

En segundo lugar, hemos analizado las células microgliales activadas que rodean las placas amiloides en el hipocampo de nuestro modelo transgénico APP/PS1 mediante técnicas inmunohistoquímicas y de manera más específica mediante microscopía electrónica de transmisión para así poder analizar ultraestructuralmente esta población glial. Los resultados muestran una estrecha relación entre la microglía activada (CD45+) y los depósitos extracelulares de péptido amiloide. El estudio ultraestructural ha revelado la existencia de dos fenotipos funcionales, uno de características fagocíticas y otro con abundante retículo endoplásmico rugoso y por tanto de apariencia biosintética. Estas células parecen tener una participación activa en los procesos de formación/compactación de las placas amiloides tratando de reducir así el halo de oligómeros tóxicos que hay a su alrededor. Aunque en los últimos años se han publicado numerosos artículos acerca de la fagocitosis de A $\beta$  por parte de la microglía, nuestras observaciones ultraestructurales parecen indicar que principalmente parece estar promoviendo la formación de fibras o conformaciones más compactas de reducida toxicidad. Aunque la activación microglial puede ayudar a restringir la patología amiloide (por fagocitosis y/o compactación de las placas) en etapas tempranas de la enfermedad, la función microglial puede perder eficacia o incluso volverse perjudicial contribuyendo a la neurotoxicidad más adelante. La reciente identificación de varios factores de riesgo genético que involucran proteínas asociadas con la función microglial ha consolidado el papel de estas células en la patogénesis del Alzheimer. En particular, una variante genética rara (R47H) en el gen que codifica TREM2 aumenta significativamente el riesgo de sufrir Alzheimer esporádico. En ausencia de TREM2, la activación microglial se ve afectada. En el modelo 5xFAD, la deficiencia de TREM2 induce acumulación de A $\beta$  debido a una respuesta microglial disfuncional, incluso induce apoptosis microglial en lugar de activación. Este defecto en la función microglial resultó en placas menos compactas y en un daño axonal prominente. Por lo tanto, una respuesta microglial neuroprotectora deficiente en lugar de un fenotipo citotóxico hiperactivo, podría, de hecho, estar asociada con el desarrollo del Alzheimer. En apoyo a esta idea se encuentran datos de nuestro grupo sobre degeneración microglial en el hipocampo de pacientes Braak V-VI. Por tanto, proponemos que la progresión de la patología de la AD está asociada a la degeneración/disfunción microglial, que probablemente a su vez induce la hiperactivación de los astrocitos. Este nuevo escenario patogénico de degeneración/disfunción glial asociado con la patogénesis de la EA es completamente opuesto a lo descrito en modelos amiloidogénicos. Por lo tanto, esta desregulación del sistema inmune

innato cerebral debe ser reproducida en estos modelos animales para mejorar su valor predictivo y garantizar un mayor éxito terapéutico en humanos.

En tercer lugar, hemos estudiado el efecto de la modulación de la cascada de señalización mediada por la IL-1 $\beta$  en la progresión de la patología asociada a la enfermedad de Alzheimer en el modelo murino 3xTgAD. Este modelo transgénico es el primer modelo murino en recapitular de manera conjunta la patología de A $\beta$  y de Tau, de manera similar a lo que ocurre en humanos. Respecto a la interleuquina 1 $\beta$ , era conocido que se encuentra en niveles elevados en el cerebro y fluido cefalorraquídeo de pacientes de Alzheimer. Nuestros resultados demuestran que mediante la supresión de las proteínas Tom1 o Tollip implicadas en procesos de endocitosis del IL-1R1 se puede producir una acumulación excesiva de IL-1 $\beta$ , resultando en la sobreactivación patológica de la cascada de señales que se inician con esta interleuquina. La eliminación de Tom1 o Tollip ha demostrado tener un efecto directo sobre el aumento de la patología amiloide, produciendo un aumento de la carga amiloide y de las especies solubles tóxicas. Esto puede deberse en parte a los procesos de activación/degeneración microglial que hemos observado en la región hipocampal tras la supresión de Tom1/Tollip. Por tanto, es bastante probable que la microglía en el modelo 3xTgAD sufra procesos de degeneración microglial en respuesta al incremento de la patología de Tau que aparece como consecuencia del aumento de IL-1 $\beta$ . A diferencia de lo que ocurre con la microglía, las células astrogliales adquieren un fenotipo activado tras la supresión de Tom1/Tollip. Es posible que una disfunción microglial, y/o una reducida expresión basal de IL-1 $\beta$  y Tollip por parte de los astrocitos, así como la ausencia del receptor IL-1R1 en la mayoría de estas células sean los agentes causantes de este efecto de hiperactivación astrogliar. Esta modulación de la respuesta inflamatoria condujo además a la aparición de déficits cognitivos severos en los animales en los que se suprimió la expresión de Tom1/Tollip. Por último, parece que la sobreexpresión de Tom1 evita efectos perjudiciales sobre la patología de la EA.

Por ello, parece claro que el estudio de las diferentes rutas bioquímicas implicadas en la respuesta inmune asociadas a la EA puede conducir no sólo a un mejor conocimiento de la enfermedad así abrir nuevas vías para el desarrollo de novedosas estrategias terapéuticas contra el Alzheimer.

En conjunto nuestros datos apoyan la idea del restablecimiento de las funciones astrogliales y microgliales para retrasar la progresión de la patología, en lugar de suprimir la respuesta inflamatoria como se ha estado realizando en los últimos años mediante los tratamientos con diferentes fármacos antiinflamatorios.

## CONCLUSIONES

1. En el hipocampo del modelo APP/PS1, al igual que en los pacientes de Alzheimer, tiene lugar una fuerte reactividad astrogliar asociada a la patología amiloide, posiblemente dirigida a aislar y/o eliminar el A $\beta$  en un intento de reducir el daño neurotóxico. En este contexto, la aportación más significativa de nuestro estudio es la identificación de astrocitos reactivos capaces de fagocitar distrofias axonales y/o presinápticas lo que apoya el perfil neuroprotector de la respuesta astrogliar. Sin embargo, esta actividad fagocítica de los astrocitos parece poco eficiente pudiendo contribuir a la progresión de la patología. La idea de astrogliá disfuncional en la enfermedad de Alzheimer abre un nuevo escenario patogénico de potencial interés terapéutico.
2. La acumulación extracelular de A $\beta$  induce una fuerte activación microglial en el hipocampo del modelo APP/PS1. La íntima asociación de la microglía activada con el núcleo fibrilar de las placas y la presencia de A $\beta$  fibrilar intracelular, junto con la identificación de un subtipo microglial de características ultraestructurales biosintéticas, sugiere una participación de la microglía en la formación/compactación de las placas. Un aumento de la toxicidad de las placas con la progresión de la enfermedad podría ser consecuencia de una disfunción/degeneración microglial, lo que estaría en línea con los recientes avances científicos que relacionan genes microgliales con el riesgo de padecer Alzheimer.
3. La modulación de la ruta de endocitosis del receptor tipo I de IL-1 (IL-1R1), mediante silenciamiento génico de Tom1/Tollip en el hipocampo del modelo triple transgénico, produce un aumento de la interleuquina proinflamatoria IL-1 $\beta$  y agrava significativamente los déficits cognitivos y la patología amiloide. Este aumento de señalización de IL-1 $\beta$  induce también cambios morfológicos en las células microgliales y astrogliales indicativos de procesos de activación y/o degeneración. Estos datos apoyan la implicación de mecanismos inflamatorios, mediados por IL-1 $\beta$ , en la patología glial y la progresión de la enfermedad de Alzheimer. Por tanto, el desarrollo de terapias dirigidas al bloqueo del receptor IL-1R1 podrían ser de potencial interés clínico.
4. Teniendo en cuenta todo lo anterior, proponemos la disfunción microglial y astrogliar como mecanismo patogénico fundamental en el proceso neurodegenerativo asociado al Alzheimer. Sin embargo, los modelos animales basados en la sobreexpresión de APP y acumulación extracelular de A $\beta$ , no contextualizan esta patología glial, en especial la degeneración microglial que tiene lugar en el hipocampo de los pacientes. Por lo tanto, es necesario reformular los actuales modelos murinos para reproducir la respuesta glial de los pacientes y así aumentar su valor predictivo y garantizar soluciones terapéuticas realmente efectivas en humanos.

## CONCLUSIONS

1. In the hippocampus of the APP/PS1 model and Alzheimer's patients there is a strong astroglial reactivity associated with amyloid pathology, possibly aimed at isolating and / or eliminating A $\beta$  in an attempt to reduce neurotoxic damage. In this context, the most significant contribution of our study is the identification of reactive astrocytes able to phagocytose axonal and/or presynaptic dystrophies, which supports the neuroprotective role of astroglial response. However, this phagocytic activity of the astrocytes seems to be impaired and this may contribute to the progression of the pathology. The idea of dysfunctional astroglia in Alzheimer's disease opens a new pathogenic scenario of potential therapeutic interest.
2. The extracellular accumulation of A $\beta$  induces a strong microglial activation in the hippocampus of the APP / PS1 model. The intimate association of the activated microglia with the core of the plaques and the presence of intracellular fibrillar A $\beta$ , together with the identification of a microglial subtype of biosynthetic ultrastructural characteristics, suggests a participation of the microglia in the formation/compaction of the plaques. An increase in the toxicity of the plaques with the progression of the disease could be a consequence of microglial dysfunction/degeneration, which would be in line with the recent scientific advances that relate microglial genes with the risk of suffering Alzheimer's disease.
3. Modulation of the IL-1 receptor type I (IL-1R1) endocytosis, by gene silencing of Tom1 / Tollip in the hippocampus of the transgenic triple model, produces an increase in the levels of proinflammatory interleukin IL-1 $\beta$  and significantly aggravates the cognitive deficits and amyloid pathology. This increase in IL-1 $\beta$  signaling also induces morphological changes in microglial and astroglial cells indicative of activation and / or degeneration processes. These data support the involvement of inflammatory mechanisms, mediated by IL-1 $\beta$ , in glial pathology and the progression of Alzheimer's disease. Therefore, the development of therapies aimed at blockade of the IL-1R1 receptor could be of potential clinical interest.
4. Taking into account all the above, we propose microglial and astroglial dysfunction as a fundamental pathogenic mechanism in the neurodegenerative process associated with Alzheimer's disease. However, the animal models based on the over-expression of APP and extracellular accumulation of A $\beta$ , do not contextualize the glial pathology, and especially the microglial degeneration, which takes place in the hippocampus of the patients. Therefore, it is necessary to reformulate the current murine models to reproduce the glial response of patients and thus increase their predictive value and ensure effective therapeutic solutions in humans.

## BIBLIOGRAFÍA

- Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, Vizuete M, et al.** 2010. Calretinin interneurons are early targets of extracellular amyloid- $\beta$  pathology in PS1/A $\beta$ PP 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 A $\beta$  in proliferative processes in an amyloidogenic model of Alzheimer's disease. *Sci Rep* **7**: 10085.
- 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  $\beta$  (A $\beta$ ) oligomers reverses the neuroprotective effect of soluble amyloid precursor protein- $\alpha$  (sAPP $\alpha$ ) by modulating phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt-GSK-3 $\beta$  pathway in Alzheimer mouse model. *J Biol Chem* **286**: 18414–18425.
- Kitazawa M, Cheng D, Tsukamoto MR, Koike MA, Wes PD, Vasilevko V, Cribbs DH, LaFerla FM.** 2011. Blocking IL-1 signaling rescues cognition, attenuates tau pathology, and restores neuronal  $\beta$ -catenin pathway function in an Alzheimer's disease model. *J Immunol* **187**: 6539–49.
- Kitazawa M, Oddo S, Yamasaki TR, Green KN, LaFerla FM.** 2005. Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* **25**: 8843–53.
- Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Del Rio JC, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, et al.** 2009. Extracellular amyloid- $\beta$  and cytotoxic glial activation induce significant entorhinal neuron loss in young PS1M146L/APP751SL mice. *J Alzheimer's Dis* **18**: 755–776.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM.** 2003. Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles Intracellular A $\beta$  and Synaptic Dysfunction. *Neuron* **39**: 409–421.
- 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.
- Sanchez-Mejias E, Navarro V, Jimenez S, Mico MS, Varo RS, Diaz CN, Estrada LT, Davila JC, Vizuete M, Gutierrez A.** 2016. Soluble phospho-tau from Alzheimer's disease hippocampus drives microglial degeneration. *Acta Neuropathol* **1**–20.
- 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.
- 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, Vizuite M, Vitorica J, Gutiérrez A.** 2014. Early Neuronal Loss and Axonal/Presynaptic Damage is Associated with Accelerated Amyloid- $\beta$  Accumulation in A $\beta$ PP/PS1 Alzheimer's Disease Mice Subiculum. *J Alzheimers Dis* **42**.

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

# 5. SUMMARY



Santiago Ramón y Cajal



---

## PhD Thesis - 2017

---

**Thesis Title:** *GLIAL PATHOLOGY IN THE HIPPOCAMPUS OF TRANSGENIC MODELS OF ALZHEIMER'S DISEASE: AN ULTRASTRUCTURAL APPROACH.*

**Author** (PhD Student)

ÁNGELA GÓMEZ ARBOLEDAS – Bachelor in Biotechnology

**Laboratory Address:** Dept. Cell Biology, Genetics and Physiology (Cell Biology Area). Faculty of Sciences. University of Malaga. Teatinos 29010. Malaga. Spain

**PhD Supervisors:**

Dr. Antonia Gutiérrez Pérez (Professor of Cell Biology at Malaga University, Spain)

Dr. José Carlos Dávila Cansino (Professor of Cell Biology at Malaga University, Spain)

**Contact Information:**

Ángela Gómez Arboledas

Email: [angela\\_gomez@uma.es](mailto:angela_gomez@uma.es)

Phone: +34 952131935

Dr. Antonia Gutiérrez

Email: [agutierrez@uma.es](mailto:agutierrez@uma.es)

Phone: +34 952133344

Dr. José Carlos Dávila

Email: [davila@uma.es](mailto:davila@uma.es)

Phone: +34 952131964

**Grants Support:**

This work was supported by grants PI12/01431 (2013-2015) and PI15/00796 (2016-2018) from Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS/Carlos III Health Institute), by grant 20141432 (2015-2017) from Fundación La Marató de TV3 and by CIBERNED (2007-2017) from Carlos III Health Institute, Spain. Angela Gómez Arboledas was sponsored by a contract from Fundación La Marató de TV3.

**Publications in peer-reviewed journals:**

1. 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, Vizuite M, Comella JX, Galea E, Vitorica J and Gutierrez A. (2017). Phagocytic clearance of presynaptic dystrophies by reactive Astrocytes in Alzheimer's disease. *Glia* (2017) *In Press*. DOI: 10.1002/glia.23270
2. Baglietto-Vargas D, Sanchez-Mejias E, Navarro V, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Gomez-Arboledas A, Sanchez-Mico MV, Sanchez-Varo R, Vizuite M, Davila JC, Garcia-Verdugo JM, Vitorica J and Gutierrez A. (2017). Dual roles of A $\beta$  in proliferative processes in an amyloidogenic model of Alzheimer's disease. *Scientific Reports* 7 (2017) 10085. DOI: 10.1038/s41598-017-10353-7
3. Trujillo-Estrada L, Davila JC, Sanchez-Mejias E, Sanchez-Varo R, Gomez-Arboledas A, Vizuite M, Vitorica J and Gutierrez A. Early neuronal loss and axonal/presynaptic damage is associated with accelerated amyloid- $\beta$  accumulation in A $\beta$ PP/PS1 Alzheimer's disease mice subiculul. (2014). *Journal of Alzheimer's Disease* 42 (2014) 521-541. DOI: 10.3233/JAD-140495

In addition, this thesis contains unpublished data.



## 5.1 ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is starting to be considered an epidemic due to the staggering figures. More than 40 million people throughout the world including 7 million in Europe and more than 800 000 in Spain suffer from AD. At present there is no cure, in part because the very complex pathogenic mechanisms are not fully understood. The continuing failure to develop an effective treatment for AD urges a better understanding of the pathogenic mechanisms and the improvement of current animal models to facilitate success for clinical interventions. The transgenic models have been so far designed to recapitulate one, or both, protein lesions found in the brain of patients, the extracellular amyloid plaques and the intraneuronal neurofibrillary tangles. However, in recent years, a third pathogenic component is gaining strength in the onset and progression of this disease, the neuroinflammatory response mediated primarily by the brain's resident immune cells, microglia. This has been highlighted by the identification of genes involved in innate immunity as risk factors to develop this neurodegenerative disease. Our current concept, mostly derived from A $\beta$  producing models which show a robust microglial activation, supports an initial beneficial role of these glial cells followed by a pro-inflammatory cytotoxic function later on. This view is now being challenged by emerging data in human postmortem samples. We have recently demonstrated that in the hippocampus of Braak V-VI individuals there is a prominent degenerative process of the microglial population, driven by phospho-tau, that might compromise neuronal homeostasis. Thus, understanding and control the cerebral innate immune pathways and microglial phenotypes may lead to new therapeutic opportunities for the prevention or delay of AD.

On the other hand, astroglia is considered a neuroprotective cell, based on its normal (non-pathological) function in trophic support, redox homeostasis, elimination of toxic molecules, vascularization and control of synaptic activity. Reactive astrocytes are a hallmark of AD, both in the familiar and late-onset variants. More precisely, astrocytes cluster around Abeta plaques while they undergo a dramatic morphological change molecularly characterized by glial fibrillary protein (GFAP) over-expression. The term "reactive" is, however, insufficient to define whether astrocytes contribute to AD by toxic gain-of-function, loss-of-function or if, by contrast, they are protective, or a mix of everything depending on the disease stage and anatomic localization with respect to Abeta plaques. This lack of knowledge comes from insufficient evidence obtained in mouse models and human post-mortem samples.

In the present PhD thesis, we have analysed, mainly by cellular and ultrastructural approaches, the microglial and astroglial activated populations in the hippocampus of the APP/PS1 and 3xTgAD mouse models. Most relevant outcomes from this work are:

1) Reactive astrocytes surrounding A $\beta$  plaques in the hippocampus of APP/PS1 mice enwrap and engulf axonal/presynaptic dystrophies, probably aiming at eliminating aberrant presynaptic elements. Moreover, we also detected phagocytic astrocytes in human AD hippocampus. However, this phagocytic activity of the astrocytes seems to be impaired and this may contribute to the progression of the pathology. The idea of dysfunctional astroglia in Alzheimer's disease opens a new pathogenic scenario of potential therapeutic interest.

2) There is an increase in the microglial activation along with the amyloid pathology in the hippocampus of the APP/PS1 mice. The ultrastructural analysis revealed that the microglial was in intimate contact with the A $\beta$  fibrils, and that their processes showed frequently numerous cisternae of endoplasmic reticulum in the contact area, suggesting a possible role of microglia in the formation/compaction of amyloid plaques. An increase in the toxicity of the plaques with the progression of the disease could be a consequence of microglial dysfunction/degeneration, which would be in line with the recent scientific advances that relate microglial genes with the risk of suffering Alzheimer's disease.

3) Tom1 and Tollip exhibited a negative regulatory role by enhancing lysosomal sorting and degradation of the receptors for IL-1 $\beta$ . The suppression of the expression of Tom1/Tollip has a huge impact in the levels of IL-1 $\beta$  and accelerated the amyloid pathology and the cognitive decline in a triple transgenic mouse model of AD (3xTgAD). Moreover, this neuroinflammatory modulation shows a degenerative effect in the microglial cells but not in the astrocytes. These data support the involvement of inflammatory mechanisms, mediated by IL-1 $\beta$ , in glial pathology and the progression of Alzheimer's disease. Therefore, the development of therapies aimed at blockade of the IL-1R1 receptor could be of potential clinical interest.

Taking into account all the above, we propose microglial and astroglial dysfunction as a fundamental pathogenic mechanism in the neurodegenerative process associated with Alzheimer's disease. This scenario of glial dysfunction/degeneration should be taken into account for developing more reliable animal models of this disease and improve their predictive value for human drug efficacy testing. Finally, correcting dysregulated brain inflammatory responses might be a promising avenue to restore cognitive function.

## 5.2 LITERATURE OUTLINE

### 5.2.1. Alzheimer's disease

Alzheimer's disease is the most common cause of cognitive decline in the elderly, being characterized by progressive loss of memory and other cognitive functions and changes in personality (for review see Winbland et al. 2016). The proportion of the elderly people is growing, and the prevalence and incidence of AD have been shown to increase exponentially with age (Prince et al. 2013). It has been estimated that 5% of the population older than 65

years is affected by Alzheimer's disease. The prevalence doubles approximately every 5 years beyond age 65 and nearly half of the people aged 85 years and older suffer from this devastating disorder (The Alzheimer's Association 2016). Due to the demographic development, undoubtedly the number of patients and the economic impact of AD will grow extraordinarily in the future without advances in therapy or prevention. AD is etiologically heterogeneous, a multifactor disease. A small proportion of AD cases show an autosomic dominant transmission of the disease, and currently mutations in the genes encoding amyloid precursor protein (APP), presenilin 1 (PS1) and presenilin 2 (PS2) have been characterized in early onset familial AD cases ([www.alzforum.org](http://www.alzforum.org)). Mutations in each of these genes also result in elevated levels of A $\beta$ , a proteolytic processing fragment of the APP, which aggregates and accumulates in the brains of AD patients (Winblad et al. 2016; Scheltens et al. 2016; Rosenberg et al. 2016). Macroscopic changes found in AD brain include shrinkage of the gyrus and widening of the sulcus especially in frontotemporal areas, thickening of meninges and enlargement of the ventricles (Perl 2010; Nasrallah and Wolk 2014; Eskildsen et al. 2015). The memory centers, hippocampal formation and the entorhinal cortex, are the first regions to be affected. As the disease progresses, more regions are affected including temporal and parietal lobes. The two major microscopy lesions are amyloid plaques and neurofibrillary tangles (NFTs) (for review, see Duyckaerts et al. 2009; Serrano-Pozo et al. 2011; Karch et al. 2014), which are found significantly more often in AD compared to normal aging. The senile plaques are extracellular deposits of amyloid beta (A $\beta$ ) peptides with a dense central core, surrounded by dystrophic neurites, indicating that a neurodegenerative process is taking place. Amyloid plaques deposition begins 15–20 years prior to symptoms onset. NFTs are abnormal, filamentous inclusions found in the cell bodies of neurons primarily composed of abnormally phosphorylated tau. Tau, a microtubule-associated protein, forms paired helical filaments upon hyperphosphorylation, which leads to impaired axonal transport and eventually cell death (Brandt et al. 2005). Other AD lesions include neuronal loss, amyloid angiopathy, inflammation and synaptic alterations. Inflammation in AD brain is characterized by activated microglia and astroglia associated with A $\beta$  deposits and up-regulation of many mediators of inflammatory responses (Heneka et al. 2015; McManus and Heneka 2017).

### 5.2.2. The amyloid cascade hypothesis

The amyloid cascade hypothesis was proposed shortly after the initial genetic discoveries of APP mutations leading to familial AD. The model states that abnormal aggregation of A $\beta$  is initiating AD pathology and that neurofibrillary tangles, cell loss, inflammation, neurotransmitter deficiencies, and dementia follow as a direct result of this process. For several years it was debated whether tangles or plaques initiated the pathological process. Actually, several findings have strengthened the amyloid cascade hypothesis immensely and it is today the most favored model to explain the pathogenic events leading to AD. Although plaque burden has been shown to correlate with degree of dementia in some

studies, there are studies that have been unable to find such a correlation. Therefore, it has been debated whether AD pathology is the result of the insoluble A $\beta$  in the plaques, since it has been shown that soluble A $\beta$  correlates better than amyloid deposits to the degree of dementia (for review, see Haass y Selkoe 2007; Selkoe y Hardy 2016; Karran y De Strooper 2016). However, so far targeting the amyloid cascade have failed to show efficacy in clinical trials (Herrup 2015; Wisniewski and Goñi 2015; Gold 2017; Behl 2017) revealing a higher and still unsolved complexity for AD pathology.

### 5.2.3. Inflammation in Alzheimer's disease

In the last years, increasing evidence indicates that neuroinflammation involving particularly microglia and astrocytes contributes to AD pathogenesis and disease progression (Heneka et al. 2015; Heppner et al. 2015; Calsolaro and Edison 2016; De Strooper and Karran 2016; Ransohoff 2016). Thus, understanding and control the cerebral innate immune pathways may lead to new therapeutic opportunities for the prevention or delay of AD. Microglia, the primary cellular component of the brain's innate immune response, are complex and dynamic phagocytic cells that can have supportive or detrimental effects on neurons depending on their activation phenotype and secreted factors (Shemer et al. 2015; Masuda and Prinz 2016; Wolf et al. 2017). Upon activation, microglia also suffer morphological changes displaying larger cell body along with shorter, thicker, and less branched processes. In AD, activated microglia accumulate around A $\beta$  plaques in both amyloidogenic transgenic models (Jimenez et al. 2008; Moreno-Gonzalez et al. 2009) and AD patients (Serrano-Pozo et al. 2016). Although microglial activation may help to restrict amyloid pathology (by A $\beta$  phagocytosis and/or plaque compaction) at early disease stages, microglial function might lose efficacy or even become detrimental contributing to neurotoxicity later on (Mhatre et al. 2015). The recent identification of several genetic risk factors involving proteins associated with microglial function highlights the role of these cells in AD pathogenesis (for review see Kleinberger et al. 2014; Cuyvers and Sleegers 2016; Villegas-Llerena et al. 2016; Wes et al. 2016; Sims et al. 2017). In particular, a rare missense genetic variant (R47H) in the gene encoding the triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) significantly increases the risk of late-onset AD (Ulrich et al. 2017; Yeh et al. 2017). *TREM2* which is expressed by microglia in the brain is a lipid sensor implicated in regulation of phagocytosis, inhibition of inflammatory signalling and promotion of cell survival (Colonna, 2003; Ulland et al. 2017). In AD, *TREM2* supports A $\beta$ -reactive microgliosis and A $\beta$  clearance (Wang et al. 2015). In the absence of *TREM2*, microglial activation is impaired. In the 5xFAD model, *TREM2* deficiency increased A $\beta$  accumulation due to a dysfunctional microglial response, even more, microglia were apoptotic instead of activated (Wang et al. 2015). This defect in the microglial barrier function around plaques led to less compact A $\beta$  fibrils and a prominent axonal damage (Condello et al. 2015; Wang et al. 2016; Yuan et al. 2016). Decreased plaque-associated microgliosis was also observed in human R47H variant carriers as a result of *TREM2* impairment (Yuan et al. 2016). Thus, a deficient

neuroprotective microglial response rather than an overactive cytotoxic phenotype, could, indeed, be associated with AD development. In agreement with these data we have recently reported microglial degeneration in human *post mortem* samples (Sanchez-Mejias et al. 2016).

Microglia, as well as astrocytes, acquire an activated phenotype and cluster around fibrillary amyloid deposits. The current concept is that such an activation is primarily a protective response aimed at removing/isolating injurious stimuli by removing/compacting A $\beta$  and creating a protective barrier. However, during the course of the disease and due to chronic activation microglia may lose this beneficial phenotype as they acquire a ‘toxic’ phenotype characterized by the production of pro-inflammatory mediators. However, most knowledge concerning to microglial response in AD has been obtained using A $\beta$  producing models, such as APP-transgenic mice. Our APP/PS1 model displayed a strong response to extracellular A $\beta$  accumulation (Jimenez et al., 2008). These activated microglial cells that cluster around amyloid plaques adopted an alternative “M2” phenotype identified by the expression of YM1 and the neurotrophic factor IGF1. In support of a protective microglia associated to plaques, recently, using single-cell RNA sequencing a novel microglial subtype (named DAM from disease-associated microglia) with the potential to restrict disease has been identified in an APP-based model (5xFAD) (Keren-Shaul et al. 2017). As the disease progresses with age, microglial activation also increases in response to a continuous A $\beta$  plaques build-up in the brain. Interestingly, in our aged APP/PS1 mice activated microglial cells were also seen in the interplaque areas besides those around plaques (Jimenez et al., 2008). This interplaque activation was coincident with the accumulation of relatively large amounts of soluble oligomeric A $\beta$  peptides (Jimenez et al. 2011). In contrast with the large and significant microglial activation usually observed in the hippocampus of APP-based models, hippocampal human AD samples displayed a weak and limited microglial activation, restricted to amyloid plaques. This discrepancy between mice models and humans is further supported by the failure of numerous immuno-modulatory compounds to display efficacy in treating the human disease despite success in preclinical animal models of AD.

In addition, activation of astrocytes is also characteristic of AD (Medeiros and LaFerla 2013; Verkhratsky et al. 2014; Pekny et al. 2016; Acosta et al. 2017). It is manifested from the earliest stages of the disease (Carter et al. 2012) and progresses significantly as does the amyloid and tau pathology. However, the role of reactive astrocytes it is today largely unknown. The term “reactive” is insufficient to determine whether astrocytes contribute to the pathology of AD by toxic gain of function or loss, or, on the contrary are protective, or even have different functions depending on the state of the pathology and/or their regional location. Moreover, it has been suggested that astrocytes may play a role in the so-called “glymphatic system” (Iliff and Nedergaard 2013; Jessen et al. 2015) to generate interstitial fluid flows from perivascular space, from the arterial branches to the venous branches. This glymphatic flow could be responsible for drain excess of extracellular toxic proteins, such as A $\beta$



preventing its accumulation. Activation of astrocytes in the pathology of AD could alter or disrupt this flow and therefore results in increased toxicity.

Since the microglia and the astrocytes can have both neuroprotective functions, by degrading extracellular A $\beta$  and secret neurotrophic factors, and neurodegenerative functions, by secreting pro-inflammatory cytokines and cytotoxic agents, it is difficult to determine their role in the AD process.

#### 5.2.4. Animals models of Alzheimer's disease

In the last decade, multiple lines of transgenic (tg) mice over-expressing one or more of the familial AD-linked mutated genes have been created (for review, see LaFerla and Green, 2012; Neha et al. 2014; Webster et al. 2014; Drummond and Wisniewski, 2017; Sasaguri et al. 2017 ). Although none of the mouse models recapitulates all aspects of AD, several lines do develop robust AD-like pathology, including Abeta plaques surrounded by phospho-tau containing dystrophic neurites, synaptic damage, and age-related learning and memory deficits. These transgenic mouse models have provided new opportunities to investigate the biochemical and cellular mechanism underlying this devastating neurodegenerative disorder, and have helped to identify the link between elevated soluble A $\beta$  content, neuronal dysfunction and memory impairment.

The lack of effective therapies for Alzheimer's disease is mainly due to the lack of selective/functional pharmacological targets and animal models that recapitulate the neurodegenerative process described in patients. Animal models are important tools in the discovery and development of treatments. Challenges in translating preclinical studies to clinical trials include the inability of animal models to recapitulate the human disease. In recent years, it has become evident that AD starts decades prior to its clinical presentation, based on biomarker studies in familial and sporadic forms of the disease. Exploring the neuropathology of AD in such early stages is not an easy task. Transgenic animal models can shed much light on the many factors impacting or accelerating disease progression.

Our research group has previously characterized the APP<sub>751SL</sub>/PS1<sub>M146L</sub> model that has been used in the present work. This model displayed early and selective vulnerability of SOM/NPY interneurons in the hippocampus (Ramos et al. 2006), entorhinal cortex (Moreno-Gonzalez et al. 2009) and subiculum (Trujillo-Estrada et al. 2014). Hippocampal calretinin interneurons are also early affected (Baglietto-Vargas et al. 2010). These mice developed A $\beta$  plaques since early ages (Blanchard et al. 2003; Caballero et al. 2007; Sanchez-Varo et al. 2012; Trujillo-Estrada et al. 2014), however no significant hippocampal principal cell neurodegeneration was detected until 17-18 months of age (Schmitz et al. 2004; Ramos et al. 2006; Caballero et al. 2007). However, entorhinal pyramidal neurons exhibited high vulnerability at early ages (Moreno-Gonzalez et al. 2009). Most AD models exhibit scarce or delayed neuronal loss in despite of the accumulation of extracellular/intracellular A $\beta$ . To

address this question we have reported the dual role (neuroprotective/neurotoxic) of microglial activation during the time course of the A $\beta$  associated neuroinflammatory response in the hippocampus of APP/PS1 mice (Jimenez et al. 2008). In this sense, at early ages the activated microglial cells displayed an alternative phenotype that could explain the limited neuronal loss, however at advanced ages activated microglia exhibited a classical cytotoxic phenotype that probably could be responsible of the principal cell death in this model. The switch from alternative to classical phenotype was associated to an increase in the soluble oligomeric A $\beta$  content. In fact, in vitro studies demonstrated that A $\beta$  oligomers from S1 fractions of old APP/PS1 mice hippocampus induced microglial activation and TNF- $\alpha$  expression (Jimenez et al. 2008). Furthermore, increased A $\beta$ -oligomer levels are able to counteract the prosurvival pathways that are stimulated by soluble APP- $\alpha$  at early ages, leading to neurodegeneration (Jimenez et al. 2011). Recently, we have reported that neurogenesis is affected early in the APP/PS1 hippocampus and that A $\beta$  has a differential effect on hippocampal proliferative cells by inhibiting neuronal proliferation and triggering the formation of microglial cells (Baglietto-Vargas et al. 2017).

#### 5.2.5. Aims of the study

Although the neuroinflammatory hypothesis of Alzheimer's has been the focus of intense research in the last decade, the results have not translated into therapeutic success. Among the reasons for this failure is undoubtedly the complexity of this response and the multitude of functional microglial and astroglial phenotypes, still to be identified. Therefore, deepest knowledge about the pathological changes that both microglia and astroglia undergo is needed to explaining the pathological processes underlying disease, and absolutely necessary before any new therapeutic strategy can be addressed.

Taking into account the above, our **working hypothesis** proposes that *the progression of the pathology in Alzheimer's disease is associated with a dysfunction of the glial cells*. In this sense, the pharmacological modulation of glial cells is postulated as a potential therapeutic strategy to modify the course of the disease and reduce neuronal damage

The general objective of this Doctoral Thesis is to characterize, mainly at the ultrastructural level, the morphological and functional heterogeneity of reactive microglial and astroglial cells, as well as to determine its relationship with the progression of the pathology, in the hippocampus of the transgenic APP/PS1 model. The data obtained in models will be validated in human post-mortem samples of patients. The specific objectives are the following:

**Objective #1.** To study at the cellular and subcellular level the astroglial reactivity associated with the amyloid plaques in the hippocampus of the APP/PS1 model.

We will study the inflammatory response mediated by astroglial cells (astrogliosis) in the hippocampus of animals APP751SL/PS1M146L, as well as its relationship with amyloid and neuritic pathology. To this end, immunohistochemical techniques at light and electron microscopy will be used, along with image analysis and 3D ultrastructural studies (using double-beam electron microscopy, FIB/SEM). Additionally, post-mortem human samples of Alzheimer's patients will be used to validate the results obtained in the animal model.

**Objective #2.** To study at cellular and subcellular level the microglial activation and its relationship with amyloid pathology in the hippocampus of the transgenic APP/PS1 model.

The activated microglial cells that surround the amyloid plaques in the APP/PS1 model will be analyzed, mainly using immunohistochemical techniques under light and electron microscopy. As in the previous specific objective, post-mortem human samples from Alzheimer's patients will be used to validate the animal model results.

**Objective #3.** To determine the effect of the modulation of the signaling pathway of the pro-inflammatory interleukin IL1 $\beta$  on cognitive function and pathology using a triple transgenic model (3xTgAD).

In order to evaluate the role of the innate immune system in the progression of Alzheimer's disease, the signaling pathway of the interleukin-1 type I receptor (IL-1R1) will be studied by modulation of the Tom1/Tollip-mediated endocytosis system. For this purpose, 3xTgAD animals and adeno-associated virus controls will be injected in order to silence or overexpress these two proteins. The cognitive capacity of the animals will be evaluated and later, the effect on the glial population and Alzheimer's pathology will be analyzed by optical and electronic microscopy. This specific objective has been carried out in collaboration with the laboratory of Dr. LaFerla (California, USA) during a research pre-doctoral training period.

## 5.3 MATERIALS AND METHODS

### 5.3.1. Transgenic mice

Male transgenic APP/PS1 (APP751Swe-London/PS1M146L) mice (C57BL:6 background) of 4, 6 and 12 months of age were used (Blanchard et al. 2003). We have previously characterized this transgenic model (Ramos et al. 2006; Jimenez et al. 2008; Moreno-Gonzalez et al. 2009; Sanchez-Varo et al. 2012; Torres et al. 2012; Trujillo-Estrada et al. 2014). Age-matched non-transgenic mice (WT) of the same genetic 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).

Male transgenic 3xTgAD (PS1M146V/APPSwe/TauP301L) mice (C57BL:6 background) of 9 months of age were used (Oddo et al. 2003). Age-matched non-transgenic mice (WT) of the same genetic background were used as controls. Stereotaxic injections with adeno-associated virus (AAVs) were carried out in order to suppress or overexpress Tom1 or Tollip genes. Animals were cognitively tested and then sacrificed 3 months after intrahippocampal injections. All experiments were carried out in accordance with the Institutional Animal Care and Use Committee at the University of California, Irvine (Irvine, CA) and were consistent with federal guidelines.

### 5.3.2. Human samples

Human autopsy specimens (classified as Braak O, II, II-IV and V-VI) from the medial temporal lobe (hippocampal region) were obtained from the tissue bank Fundación CIEN (BT-CIEN; Madrid, Spain) and the Neurological Tissue Bank of IDIBELL-Hospital of Bellvitge (Barcelona, Spain). The utilization of post mortem human samples was approved by the corresponding biobank ethics committees and the “Comite de Etica de la Investigacion (CEI), Hospital Virgen del Rocio”, Seville, Spain. All cases were scored for Braak tau pathology as we previously summarized (see Sanchez-Mejias et al. 2016). Only Braak V-VI cases were clinically classified as demented (AD) patients.

### 5.3.3. 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 accumulates amyloid plaques since early stages of AD (Braak and Braak 1991; Andersen 2007) as also occurs in temporal neocortex and the entorhinal cortex.

The hippocampal formation involves the subiculum, the hippocampus proper (HP) and the dentate gyrus (DG). The subiculum continues laterally with the parahippocampal cortex. The mice hippocampus can be found from Bregma -0.94 mm to Bregma -4.04 mm in the histology atlas (Franklin and Paxinos 2008). The hippocampus is medially bordered by the fimbria-fornix. At rostral levels, it appears dorsally, after septum, inferior to the corpus callosum, superior to the dorsal thalamus and dorso-laterally bordered by the parietal cortex. 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. Moreover, 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 while CA2 and CA3 are inside the hippocampus. CA4 is practically indistinguishable in mice hippocampal formation (Andersen 2007).

#### 5.3.4. Tissue preparation

APP/PS1, 3xTgAD and WT animals were anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg) and transcardially perfused with 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), followed by 4% paraformaldehyde, 75mM lysine, 10mM sodium metaperiodate in 0.1 M phosphate buffer (PB). Fixed and cryoprotected brains were serially sectioned and hippocampal sections at 40  $\mu$ m thickness in the coronal plane on a freezing microtome were obtained. For light microscopy studies, human samples were fixed in 4% paraformaldehyde and sectioned at 30  $\mu$ m thickness on a freezing microtome.

#### 5.3.5. Histological staining with Thioflavin S

Free-floating sections were incubated for 5 minutes with 0.015% Thioflavin S (Sigma) in 50% ethanol, and then washed in 50% ethanol, mounted onto gelatin-coated slides and coverslipped with 0.01 M PBS containing 50% glycerine and 2.5% triethylenediamine.

#### 5.3.6. Light microscopy immunohistochemistry

Serial sections from control and transgenic mice were assayed simultaneously for light and confocal microscopy immunohistochemistry using same batches of solutions to minimize variability in immunolabeling conditions as previously reported (Ramos et al. 2006; Jimenez et al. 2008).

Free-floating sections were first treated with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/10% methanol in PBS, pH 7.4 for 20 min to inhibit endogenous peroxidase followed by avidin-biotin Blocking Kit (Vector Lab, Burlingame, CA, USA) for 30 min to block endogenous avidin, biotin and biotin-binding proteins. For single immunolabeling, sections were incubated overnight at room temperature with one of the following primary antibodies: anti-A $\beta$ 1-42 rabbit polyclonal (1:5000, Abcam); anti-oligomeric amyloid-beta OC rabbit polyclonal (1:5000, Millipore); anti-6E10 mouse monoclonal (1:5000, Covance); anti-A $\beta$ 17-24 (4G8 clone) mouse monoclonal (1:2000, Biologend); anti-ALDH1L1 mouse monoclonal (1:2000, Millipore); anti-APP rabbit polyclonal (1:20000, Sigma); anti-APP goat polyclonal (1:200000, Meridian Life Sciences); anti-AQP4 rabbit-polyclonal (1:10000 Sigma); anti-BLBP rabbit polyclonal (1:2000, Abcam); anti-EAAT2 rabbit polyclonal (1:10000 Abcam); anti-GFAP rabbit polyclonal (1:10000, Dako); anti-GFAP chicken polyclonal (1:20000, Millipore); anti-GS rabbit polyclonal (1:20000, Abcam); anti-Iba1 goat polyclonal (1:2000, Abcam); anti-Iba1 rabbit polyclonal (1:1000, Wako); anti-IL1R1 rabbit polyclonal (1:500, Abcam); anti-Megf10 rabbit polyclonal (1:1000, Millipore); anti-NeuN mouse monoclonal (1:1000, Chemicon); anti-synaptophysin rabbit polyclonal (1:1000 Abcam); anti-Tom1 rabbit polyclonal (1:500, Abcam); anti-Tollip rabbit polyclonal (1:500, Abcam); anti-VGlut1 guinea-pig polyclonal (1:10000 Millipore). For general antigen retrieval method, sections were previously heated at 80°C for 20 minutes in 50 mM citrate buffer pH 6.0.



The tissue-bound primary antibody was detected by the incubation for 1 h with the corresponding biotinylated secondary antibody (1:500, Vector Laboratories), followed by incubation with streptavidin-conjugated horseradish peroxidase (1:2000 Sigma Aldrich) for 90 min, and finally visualized with 0.05% 3-3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma Aldrich), 0.01% hydrogen peroxide in PBS and 0.03% nickel ammonium sulphate. Specificity of the immune reactions was controlled by omitting the primary antisera.

For double DAB/nickel-DAB immunohistochemical labeling sections were first incubated with the first primary antibody as described above. After the DAB-nickel reaction (dark blue end product), sections were then incubated with the second primary antibody. The second immunoperoxidase reaction was developed with DAB only (brown reaction end product).

For double or triple immunofluorescence labeling, sections were first sequentially incubated with the indicated primaries antibodies followed by the corresponding Alexa488/568/405 secondary antibodies (1:1000, Invitrogen). Sections were examined under a confocal laser microscope (Leica SP5 II). For 3D reconstructions, serial confocal images of double labeled sections (acquired in steps of 0.2  $\mu\text{m}$  using a 63x objective) were analyzed with IMARIS software (Bitplane), and 3D reconstructions were obtained with the surface plugin.

### 5.3.7. Electron microscopy

For transmission electron microscopy (TEM), fixed brains were sectioned at 50  $\mu\text{m}$  or 250  $\mu\text{m}$  thicknesses in the coronal plane on a vibratome (Leica VT1000S) and serially collected in wells containing cold PB and 0.02% sodium azide. For standard electron microscopy, the 250  $\mu\text{m}$ -thick sections were postfixed in 1% osmium tetroxide in 0.1 M PB, block stained with uranyl acetate, dehydrated in acetone, and flat embedded in Araldite (EMS, USA). Selected areas were cut in ultrathin sections and examined with an electron microscope (JEOL JEM1400).

For the immunogold labeling, 50- $\mu\text{m}$  thick sections were cryoprotected in a 25% sucrose and 10% glycerol solution, followed by freezing at  $-80^{\circ}\text{C}$  in order to increase the antibody binding efficiency. Sections were then incubated 48h in primary antibody in a PBS 0.1M/0.1% sodium azide/2% BSA-solution at  $22^{\circ}\text{C}$ . 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  $22^{\circ}\text{C}$ . After postfixation with 2% glutaraldehyde and washing with 50 mM sodium citrate, the labelling was enhanced with the HQ Silver<sup>TM</sup> 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.

### 5.3.8. Focused Ion Beam Scanning Electron Microscopy (FIB/SEM)

Araldite embedded tissue from 12-month-old APP/PS1 mice were glued onto a sample stub with carbon adhesive tape in order to facilitate conductivity. Then the sample stub was coated first with Iridium and later with platinum for 10 minutes to allow charge dissipation. With a combined FIB/SEM microscope (Helios Nanolab 650, FEI Company) we obtained serial EM images in steps of 30 nm, which allows representing three-dimensional images from a region of interest.

### 5.3.9. Quantitative image analysis

Astroglial loading was defined as the percentage of area stained with anti-GFAP (total astrocytes) or anti-BLBP (reactive astrocytes) related to the hippocampal area analyzed. 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 (4 sections/mouse/age) from APP/PS1 (n=4) and WT mice (n=4) were analyzed using Visilog 6.3 analysis program (Noesis, France). The GFAP- or BLBP-immunopositive signal within the selected brain region (CA1) was converted into 8-bit gray scale, and immunostained cells were identified by a threshold level mask. The threshold level 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. Plaque loading was defined as the percentage of total CA1 area immunostained with the anti-A $\beta$  antibody (OC), and the image analysis was carried out as described above. Plaque size and astroglial covered area were measured in EM images of amyloid plaques (19 plaques/age) from 6 (n=2) and 12-month-old (n=2) APP/PS1 mice with a JEOL JEM-1400 electron microscope, analysed by Visilog 6.3 analysis program (Noesis, France). This measurement was carried out in the CA1 hippocampal area. The number of total dystrophic neurites and engulfed dystrophic neurites was measured in the same electron microscopy images in which we previously analysed plaque size and astroglial covered area. Dystrophic-neurite size was estimated in randomly acquired digital images (10 images/mouse or human individual) from 12-month-old APP/PS1 (n=3) and Braak V-VI (n=3) sections immunostained with anti-APP antibody with a Nikon DS-5M digital camera, analysed by Visilog 6.3 program (Noesis, France). A total amount of 71-80 APP-immunopositive dystrophic neurites were measured in each mouse/individual in the CA1 hippocampal area. For astrocyte morphometric studies, astroglial GFAP-positive cells were randomly selected using stereology-based sampling (New-CAST software from Olympus) and examined under a 100x objective. Only astroglial cells with a visible cell body were used for this study. In order to determine astrocytes size, high-resolution images were processed (5 cells/mouse or individual; n=3) using the Visilog 6.3 program, and the GFAP-positive cell area was measured. Finally, we measured the thickness of GFAP-positive astroglial processes (3 processes/cell; 20 cells/mouse or individual; n=3) at a

fixed 5  $\mu\text{m}$  distance from the cell body. These analyses were carried out in the CA1 hippocampal area.

### 5.3.10. Behavioral analysis

Experiments were conducted on age-matched male WT-Ctrl-AAV (n=10), WT-Tom-sh (n=10), WT-Tollip-sh (n=10), WT-Tom-AAV (n=10), 3xTgAD-Ctrl-AAV (n=10), 3xTgAD-Tom-sh (n=10), 3xTgAD-Tollip-sh (n=10) and 3xTgAD-Tom-AAV (n=10). Mice were tested at 12 months of age, 3 months later to the treatment injections. All testing were performed in the light period of the light/dark cycle and the experiment was blind to the genotypes and treatment of mice.

Morris Water Maze (MWM): this test primarily measures hippocampal dependent cognition. The apparatus used for the MWM was a circular aluminium tank (1.2m diameter) painted white and filled with water maintained at 22-24°C. The maze was located in a room containing several simple visual extramaze cues. Mice were trained to swim and find a 14-cm-diameter circular clear Plexiglas platform submerged 1.5 cm beneath the surface of the water and invisible to the mice while swimming. On each training trial, mice were placed into the tank at one of four designated start points in a pseudorandom order. Mice were allowed to find and escape onto the platform. If mice failed to find the platform within 60s, they were manually guided to the platform and allowed to remain there for 10s. Each day, mice received four training sessions separated by intervals of 25s under a warming lamp. The training period ended after de 5<sup>th</sup> day of training. The probe trial to examine retention memory was assessed 24h after the last training trial. In the probe trials, the platform was removed from the pool, and mice were monitored by a ceiling-mounted camera directly above the pool during the 60s period. All trials were recorded for subsequent analysis. The parameters measured during the probe trial included: latency to cross the platform location and number of platform location crosses (Kitazawa et al. 2011).

Contextual fear conditioning (CFC): this test assesses both amygdala and hippocampal function, including the trisynaptic pathway (entorhinal cortex, dentate gyrus, CA3 and CA1). The training trial consisted of placing a mouse in an illuminated compartment and received three electric shocks. 24h later, the animals return to the same illuminated compartment but this time they don't receive any shocks. During 5 minutes, we recorded all the times the mice were freezing because of the fear and express this measurement as the % of time freezing.

### 5.3.11. Statistical analysis

Normally distributed data were expressed as the mean  $\pm$  SD. Mean values were compared using ANOVA followed by Tukey's test (more than two groups) or two-tailed-t-test for two group comparisons. Non-normally distributed data were represented using box-plots (Sigmaplot) or scatter-plots with the median and interquartile range (GraphPad), and

compared with the Mann-Whitney U test (for two groups comparisons) or Kruskal-Wallis tests (more than two groups) followed by Dunn's post-hoc test. The significance was set at 95 % of confidence. Linear correlations were analyzed using the Spearman test.

## 5.4 RESULTS AND DISCUSSION

### 5.4.1. Characterization of the reactive astroglial cells in the hippocampus of an APP/PS1 mouse model.

Glia-mediated neuroinflammation has been proposed as a potential mechanism underlying AD pathogenesis and over the past decade activated microglia have been the focus of increasing research (Heppner et al. 2015; Heneka et al. 2015); however, the precise contribution of reactive astrocytes is still undetermined. Astrocyte reactivity is specifically identified in the vicinity of amyloid plaques and can be monitored by the increased expression of the intermediate filament protein, GFAP, and, morphologically by the hypertrophy of their main processes (Osborn et al. 2016; Verkhratsky and Parpura 2016). Though emerging data support the molecular and functional diversity of astrocytes in adult brain (Haim and Rowitch 2017; John Lin et al. 2017), little is known about disease-activated astrocyte diversity. The activation of astrocytes has been often viewed as a neuroinflammatory neurotoxic response in AD; however this concept is currently changing to the notion of loss-of-function (Masgrau et al. 2017) or protection. As far as we know, there is no study showing that astrocytes phagocytose dystrophic neurites or neuronal debris in the context of neurodegenerative pathologies such as AD. So, the aim of this study is to analyze the phagocytic activity of reactive astrocytes in the hippocampus of a double transgenic APP/PS1 mouse model and compare the results with the astrocytes activity in *postmortem* human samples.

As expected, our results show that the hippocampus of both the transgenic APP/PS1 model and AD patients (Braak V-VI) displays significant astrogliosis (measured by GFAP expression and by the area covered by the reactive astrocytes), which progresses in parallel to the extracellular amyloid pathology. In addition, we found that plaque-associated reactive astrocytes selectively express BLBP, a typical marker for astrocyte-like neuronal stem cells. This marker has been widely used for studying neuronal progenitors in embryonic and adult brains, however the expression of BLBP is also a molecular signature for the reactive astrocytes in many injury conditions (for review, see Robel et al. 2011). Whether amyloid plaque-associated reactive astrocytes gain stem cell potential need to be determined; however in APP/PS1 model the proliferation capacity of this reactive population appears very limited (Serrano-Pozo et al. 2013a; Galea et al. 2015; Baglietto-Vargas et al. 2017). We have found that the amount of reactive astrocytic processes correlates with the number of dystrophic neurites around plaques rather than plaque size. Besides the tight association between reactive astrocytes and

neuronal dystrophies around plaques, the functional significance of this morphological evidence is not known.

We found that reactive astrocytes actively enwrap, internalize and degrade presynaptic dystrophies in the APP/PS1 mouse brain. This finding could be an extension of the capacity of astrocytes to phagocytose synapses as a normal process that mediates the refinement of neural circuits in the developing (Chung et al. 2015) and in the adult CNS (Chung et al. 2013), thus suggesting a major role of astrocytes in synaptic pruning in health and disease. Supporting a phagocytic role for reactive astrocytes in AD, it has been suggested that they could mediate Abeta clearance (Osborn et al. 2016) and limit amyloid deposits (Xiao et al. 2014) since these glial cells express many potential phagocytic receptors that bind Abeta (Sokolowski et al. 2011; Jones et al. 2013). Transcellular degradation of neuronal dystrophies by astrocytes might directly support neuron survival or, alternatively, it might reduce the Abeta release from dystrophic presynaptic elements. Alternatively, insulating dystrophies from the normal tissue might also decrease the probability of possible adverse inflammatory effects. Therefore, the phagocytosis of axonal dystrophies may be a protective function of astrocytes controlling the A $\beta$  production and/or preventing inflammatory response.

Considering recent gene profiling of astrocytes, is it plausible that phagocytic astrocytes are a subtype of the astrocyte population in the brain. The functional and molecular diversity of astrocytes in normal, and especially in diseased brains, remains challenging (Haim and Rowitch 2017). Recently, five distinct subpopulations of astrocytes based on molecular profiles have been identified in the adult mouse brain (John Lin et al. 2017). Noteworthy, two of these subpopulations are enriched for genes associated with phagocytic capacity. The contribution of the different astrocyte subsets to pathological conditions, and especially to AD, is not known. In fact, that loss-of-function of astrocytes may contribute to diseases in a disease-specific manner and, that therapies should promote their functional recovery are emerging ideas (for review, see Masgrau et al. 2017).

In summary, our results demonstrate the existence of phagocytic reactive astrocytes which eliminate/isolate presynaptic dystrophies in AD. This phagocytic capacity of astrocytes might result impaired during disease progression. Therefore, exploring how to increase/restore the phagocytic properties of astrocytes could be a novel therapeutic avenue to treat AD.

#### **5.4.2. Microglial activation in the hippocampus of a double transgenic APP/PS1 mouse model.**

Microglia are brain-resident myeloid cells that mediate key functions to support the CNS. Microglia act as guardians of the brain by promoting phagocytic clearance and providing trophic support to ensure tissue repair and maintain cerebral homeostasis. Recent large-scale genetic studies have found that genes that are associated with risk for Alzheimer's disease are highly expressed in microglia (Korvatska et al. 2015; Colonna and Wang 2016; Villegas-Llerena



et al. 2016; Huang et al. 2017; Sims et al. 2017). These results imply a potential role for microglia in Alzheimer's disease pathophysiology. It remains unclear whether microglial function is detrimental or protective, or both, but insufficient during neurodegenerative diseases. It's critical to decipher the diversity of activated microglial cells and the specific roles in disease progression.

In this work we have analyzed the activated microglial cells that surround the amyloid plaques in the hippocampus of our APP/PS1 transgenic model by immunohistochemical techniques and more specifically by transmission electron microscopy in order to ultrastructurally analyze this glial population. The results show a close relationship between activated microglia (CD45 +) and extracellular deposits of amyloid peptides. Morphologically, these activated glial cells displayed enlargement of the cell body and retraction and swelling of microglial processes. The ultrastructural study has revealed the existence of two functional phenotypes, one with phagocytic features and the other with abundant rough endoplasmic reticulum and therefore with a biosynthetic appearance. These cells seem to have an active participation in the processes of formation/compaction of amyloid plaques trying to reduce the toxic oligomeric halo around them. Although numerous articles have been published in recent years about phagocytosis of A $\beta$  by microglia (Bolmont et al. 2008; Serrano-Pozo et al. 2013b; Ries and Sastre 2016; Zuroff et al. 2017), our ultrastructural observations seem to indicate that activated microglia surrounding plaques mainly seems to be promoting the formation of more compact fibers or conformations of reduced toxicity. Although microglial activation can help to restrict amyloid pathology (due to phagocytosis and/or plate compaction) in early stages of the disease, microglial function can lose efficacy or even become harmful, contributing to neurotoxicity later on. The recent identification of several genetic risk factors that involve proteins associated with microglial function has consolidated the role of these cells in the pathogenesis of Alzheimer's. In particular, a rare genetic variant (R47H) in the gene encoding TREM2 significantly increases the risk of sporadic Alzheimer's. In the absence of TREM2, microglial activation is affected (Yuan et al. 2016; Wang et al. 2016). In the 5xFAD model, TREM2 deficiency induces accumulation of A $\beta$  due to a dysfunctional microglial response, even induces microglial apoptosis instead of activation (Baik et al. 2016). This defect in microglial function resulted in less compact plaques and prominent axonal damage. Therefore, a deficient neuroprotective microglial response instead of an overactive cytotoxic phenotype could, in fact, be associated with the development of Alzheimer's. In support of this idea our group has recently reported microglial degeneration in the hippocampus of Braak V-VI patients (Sanchez-Mejias et al. 2016).

Therefore, we propose that the progression of the pathology of AD is associated with microglial degeneration/dysfunction, which probably in turn induces the hyperactivation of astrocytes. This new pathogenic scenario of degeneration/glial dysfunction associated with the pathogenesis of AD is completely opposite to that described in amyloidogenic models.

Therefore, this dysregulation of the innate brain immune system must be reproduced in these animal models in order to improve its predictive value and ensure greater therapeutic success in humans

#### **5.4.3. Impact of Tom1/Tollip modulation on pathology progression in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease.**

Inflammation is a fundamental protective response, but if it becomes dysregulated, it can be a major cofactor in the pathogenesis of many chronic human diseases, including Alzheimer's disease. Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )-mediated chronic inflammation represents a key mechanism by which A $\beta$  drives the development of tau pathology and cognitive decline in AD. The potent pro-inflammatory activities of IL-1 $\beta$  are regulated at three levels and the disruption of these processes may cause excessive production of this interleukin and expression of IL-1R1, which in turn exacerbates inflammatory responses. Importantly, the potent pro-inflammatory activity of this receptor is counter-regulated by Tom1 via endocytosis and lysosomal degradation mechanism to ensure proper resolution of immune responses. Tom1 is predominantly present in the cytosol and it has been shown to interact with several proteins such as clathrin, endofin and Tollip (Kato et al. 2004; Seet et al. 2004; Seet 2005; Kato et al. 2006). The relevance of Tom1/Tollip-mediated protein trafficking and degradation for the regulation of pro-inflammatory receptors signaling suggests that dysfunction on these proteins may result in excessive production of inflammatory mediators, which in turn, exacerbate inflammatory responses. So, the modulation of the IL-1 $\beta$  pathways via Tom1/Tollip can lead to a reduction in AD-related pathology and it could be an effective therapeutic approach to slow the pathogenesis of Alzheimer's disease.

The work of this chapter was done in collaboration with Dr. LaFerla's laboratory (University of California at Irvine). This group have a huge experience in cellular and molecular techniques and have developed and characterized the novel triple transgenic mouse model for AD (3xTgAD) (Oddo et al. 2003).

First of all, we show that the suppression of Tom1 or Tollip enhanced the behavioral/memory deficits occurring during disease progression in the 3xTgAD mouse model. On the opposite, the overexpression of Tom1 in the 3xTgAD seems to rescue some of these deficits to non-transgenic mice levels. Some authors previously described high concentrations of IL-1 $\beta$  in the brain of mouse models and patients of Alzheimer's disease (Blum-Degen et al. 1995; Licastro et al. 2000; Mrazek and Griffin 2001; Forlenza et al. 2009) and this was related with cognitive deficits (Kitazawa et al. 2011). So our results suggest the active role of Tom1/Tollip in the endocytosis of IL-1R1, which in turn produce the accumulation of IL-1 $\beta$  and interferes in the consolidation of the memories in the hippocampal formation (Rachal Pugh et al. 2001). We also found a significant increase in the amyloid deposition in 3xTgAD-Tom-sh and 3xTgAD-Tollip-sh animals compared to age-matched control mice (3xTgAD-Ctrl-AAV). In the 3xTgAD-Tollip-sh, this change was due to an increase in the plaque number and in the plaque

size. Moreover, suppression of Tom1/Tollip showed increased A $\beta$ 42 soluble oligomers, which is known to be the most toxic form of Abeta peptide (Walsh et al. 2002; Walsh and Selkoe 2007). These toxic oligomers could be one of the reasons for the cognitive deficits seen in 3xTgAD-Tom-sh and 3xTgAD-Tollip-sh mice.

Microglia from 3xTgAD-Tom-sh and 3xTgAD-Tollip-sh suffers a serious activation/degenerative process characterized by a significant decrease in the area occupied, as well as a significant loose of processes. Morphologically, these cells were characterized by cell body atrophy and processes fragmentation. On contrary, the astroglial population of these animals exhibits a morphology characteristic of an activated phenotype.

Together these data revealed that the downregulation of Tom1/Tollip accelerates the pathology progression in the hippocampus of a 3xTgAD mouse model. This impairment in Tom1/Tollip showed a direct effect in increasing of amyloid pathology, cognitive deficits and microglial degeneration. This in vivo modulation of the IL-1 $\beta$  signaling pathway may represent an innovative therapeutic approach for AD.

Finally, we propose microglial and astroglial dysfunction as a fundamental pathogenic mechanism in the neurodegenerative process associated with Alzheimer's disease. However, the animal models based on the over-expression of APP and extracellular accumulation of A $\beta$ , do not contextualize the glial pathology, and especially the microglial degeneration, which takes place in the hippocampus of the patients. Therefore, it is necessary to reformulate the current murine models to reproduce the glial response of patients and thus increase their predictive value and ensure effective therapeutic solutions in humans.

## 5.5 REFERENCES

- Acosta C, Anderson HD, Anderson CM.** 2017. Astrocyte dysfunction in Alzheimer disease. *J Neurosci Res* **0**.
- Andersen P.** 2007. *The hippocampus book*. Oxford University Press.
- Ashe KH, Zahs KR.** 2010. Probing the Biology of Alzheimer's Disease in Mice. *Neuron* **66**: 631–645.
- Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Sanchez-Varo R, 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- $\beta$  pathology in PS1/A $\beta$ PP 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 A $\beta$  in proliferative processes in an amyloidogenic model of Alzheimer's disease. *Sci Rep* **7**: 10085.
- Baik SH, Kang S, Son SM, Mook-Jung I.** 2016. Microglia contributes to plaque growth by cell death due to uptake of amyloid  $\beta$  in the brain of Alzheimer's disease mouse model. *Glia* **64**: 2274–2290.
- Behl C.** 2017. Amyloid in Alzheimer's Disease: Guilty Beyond Reasonable Doubt? *Trends Pharmacol Sci* **38**: 849–851.
- Blanchard V, Moussaoui S, Czech C, Touchet N, Bonici B, Planche M, Canton T, Jedidi I, Gohin M, Wirths O, et al.** 2003. Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with A $\beta$  deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Exp Neurol* **184**: 247–263.
- Blum-Degen D, Müller T, Kuhn W, Gerlach M, Przuntek H, Riederer P.** 1995. Interleukin- $\beta$  and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett* **202**: 17–20.
- Bolmont T, Haiss F, Eicke D, Radde R, Mathis C a, Klunk WE, Kohsaka S, Jucker M, Calhoun ME.** 2008. Dynamics of the microglial/amyloid interaction indicate a role in plaque maintenance. *J Neurosci* **28**: 4283–4292.
- Braak H, Braak E.** 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* **82**: 239–259.
- Brandt R, Hundelt M, Shahani N.** 2005. Tau alteration and neuronal degeneration in tauopathies: Mechanisms and models. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* **1739**: 331–354.
- Caballero C, Jimenez S, Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Gavilan MP, Ramos B, del Rio JC, Vizuete M, Gutierrez A, et al.** 2007. Inter-individual variability in the expression of the mutated form of hPS1M146L determined the production of A $\beta$  peptides in the PS1xAPP transgenic mice. *J Neurosci Res* **85**: 787–797.
- Calzolaro V, Edison P.** 2016. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. *Alzheimer's Dement* **12**: 719–732.
- Carter SF, Scholl M, Almkvist O, Wall A, Engler H, Langstrom B, Nordberg A.** 2012. Evidence for Astrocytosis in Prodromal Alzheimer Disease Provided by 11C-Deuterium-L-Deprenyl: A Multitracer PET Paradigm Combining 11C-Pittsburgh Compound B and 18F-FDG. *J Nucl Med* **53**: 37–46.
- Chung W-S, Clarke LE, Wang GX, Stafford BK, Sher A, Chakraborty C, Joung J, Foo LC, Thompson A, Chen C, et al.** 2013. Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature* **504**: 394–400.
- Chung WS, Allen NJ, Eroglu C.** 2015. Astrocytes control synapse formation, function, and elimination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**.
- Colonna M.** 2003. TREMs in the immune system and beyond. *Nat Rev Immunol* **3**: 445–453.
- Condello C, Yuan P, Schain A, Grutzendler J.** 2015. Microglia constitute a barrier that prevents neurotoxic protofibrillar A $\beta$ 42 hotspots around plaques. *Nat Commun* **6**: 6176.
- Cuyvers E, Sleegers K.** 2016. Genetic variations underlying Alzheimer's disease: Evidence from genome-wide association studies and beyond. *Lancet Neurol* **15**: 857–868.
- De Strooper B, Karran E.** 2016. The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell* **164**: 603–615.
- Drummond E, Wisniewski T.** 2016. Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol* **133**: 155–175.

- Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC. 2009. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* **118**: 5–36.
- Eskildsen SF, Coupé P, Fonov VS, Pruessner JC, Collins DL. 2015. Structural imaging biomarkers of Alzheimer's disease: Predicting disease progression. *Neurobiol Aging* **36**.
- Forlenza OV, Diniz BS, Talib LL, Mendonça VA, Ojopi EB, Gattaz WF, Teixeira AL. 2009. Increased serum IL-1beta level in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Dement Geriatr Cogn Disord* **28**: 507–512.
- Franklin KBJ, Paxinos G. 2008. *Paxinos and Franklin's The mouse brain in stereotaxic coordinates*.
- Galea E, Morrison W, Hudry E, Arbel-Ornath M, Bacskai BJ, Gómez-Isla T, Stanley HE, Hyman BT. 2015. Topological analyses in APP/PS1 mice reveal that astrocytes do not migrate to amyloid- $\beta$  plaques. *Proc Natl Acad Sci* **201516779**.
- Gold M. 2017. Phase II clinical trials of anti-amyloid  $\beta$  antibodies: When is enough, enough? *Alzheimer's Dement Transl Res Clin Interv* **3**: 402–409.
- Haass C, Selkoe DJ. 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 101–112.
- Haim L Ben, Rowitch D. 2017. Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nat Rev Neurosci* **18**: 31–41.
- Heneka MT, Carson MJ, Houry 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**: 388–405.
- Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B. 2015. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci* **16**: 358–372.
- Herrup K. 2015. The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nat Neurosci* **18**: 794–799.
- Iliff JJ, Nedergaard M. 2013. Is There a Cerebral Lymphatic System? *Stroke* **44**: S93–S95.
- Jessen NA, Munk ASF, Lundgaard I, Nedergaard M. 2015. The Glymphatic System: A Beginner's Guide. *Neurochem Res* **40**: 2583–2599.
- 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  $\beta$  (A $\beta$ ) oligomers reverses the neuroprotective effect of soluble amyloid precursor protein- $\alpha$  (sAPP $\alpha$ ) by modulating phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt-GSK-3 $\beta$  pathway in Alzheimer mouse model. *J Biol Chem* **286**: 18414–18425.
- John Lin C-C, Yu K, Hatcher A, Huang T-W, Lee HK, Carlson J, Weston MC, Chen F, Zhang Y, Zhu W, et al. 2017. Identification of diverse astrocyte populations and their malignant analogs. *Nat Neurosci*.
- Jones RS, Minogue AM, Connor TJ, Lynch MA. 2013. Amyloid- $\beta$ -induced astrocytic phagocytosis is mediated by CD36, CD47 and RAGE. *J Neuroimmune Pharmacol* **8**: 301–311.
- Karch CM, Cruchaga C, Goate AM. 2014. Alzheimer's disease genetics: From the bench to the clinic. *Neuron* **83**: 11–26.
- Karran E, De Strooper B. 2016. The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? *J Neurochem* **139**: 237–252.
- Katoh Y, Imakagura H, Futatsumori M, Nakayama K. 2006. Recruitment of clathrin onto endosomes by the Tom1-Tollip complex. *Biochem Biophys Res Commun* **341**: 143–149.
- Katoh Y, Shiba Y, Mitsuhashi H, Yanagida Y, Takatsu H, Nakayama K. 2004. Tollip and Tom1 form a complex and recruit ubiquitin-conjugated proteins onto early endosomes. *J Biol Chem* **279**: 24435–24443.
- 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.
- Kitazawa M, Cheng D, Tsukamoto MR, Koike MA, Wes PD, Vasilevko V, Cribbs DH, LaFerla FM. 2011. Blocking IL-1 signaling rescues cognition, attenuates tau pathology, and restores neuronal  $\beta$ -catenin pathway function in an Alzheimer's disease model. *J Immunol* **187**: 6539–49.



- 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**: 243ra86.
- 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. *JAMA Neurol* **72**: 920.
- Latta CH, Brothers HM, Wilcock DM.** 2014. Neuroinflammation in Alzheimer's disease; A source of heterogeneity and target for personalized therapy. *Neuroscience* **302**: 103–111.
- Licastro F, Pedrini S, Caputo L, Annoni G, Davis LJ, Ferri C, Casadei V, Grimaldi LME.** 2000. Increased plasma levels of interleukin-1, interleukin-6 and antichymotrypsin in patients with Alzheimer's disease: Peripheral inflammation or signals from the brain? *J Neuroimmunol* **103**: 97–102.
- Masgrau R, Guaza C, Ransohoff RM, Galea E.** 2017. Should We Stop Saying "Glia" and "Neuroinflammation"? *Trends Mol Med* **xx**: 1–15.
- Masuda T, Prinz M.** 2016. Microglia: A Unique Versatile Cell in the Central Nervous System. *ACS Chem Neurosci* **acschemneuro.5b00317**.
- McGeer EG, McGeer PL.** 2003. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* **27**: 741–749.
- McGeer EG, McGeer PL.** 2010. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: A field in its infancy ed. M.A. Lovell. *J Alzheimer's Dis* **19**: 355–361.
- McManus RM, Heneka MT.** 2017. Role of neuroinflammation in neurodegeneration: new insights. *Alzheimers Res Ther* **9**: 14.
- Medeiros R, LaFerla FM.** 2013. Astrocytes: Conductors of the Alzheimer disease neuroinflammatory symphony. *Exp Neurol* **239**: 133–138.
- Mhatre SD, Tsai C a., Rubin AJ, James ML, Andreasson KI.** 2015. Microglial Malfunction: The Third Rail in the Development of Alzheimer's Disease. *Trends Neurosci* **38**: 621–636.
- Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Del Rio JC, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, et al.** 2009. Extracellular amyloid- $\beta$  and cytotoxic glial activation induce significant entorhinal neuron loss in young PS1M146L/APP751SL mice. *J Alzheimer's Dis* **18**: 755–776.
- Mrak RE, Griffin WST.** 2001. Interleukin-1, neuroinflammation, and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **22**: 903–908.
- Nasrallah IM, Wolk DA.** 2014. Multimodality Imaging of Alzheimer Disease and Other Neurodegenerative Dementias. *J Nucl Med* **55**: 2003–2011.
- Neha, Sodhi RK, Jaggi AS, Singh N.** 2014. Animal models of dementia and cognitive dysfunction. *Life Sci* **109**: 73–86.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM.** 2003. Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles Intracellular A $\beta$  and Synaptic Dysfunction. *Neuron* **39**: 409–421.
- Osborn LM, Kamphuis W, Wadman WJ, Hol EM.** 2016. Astroglia: An integral player in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* **144**: 121–141.
- Pekny M, Pekna M, Messing A, Steinhilber C, Lee JM, Parpura V, Hol EM, Sofroniew M V., Verkhratsky A.** 2016. Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathol* **131**: 323–345.
- Perl DP.** 2010. Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med* **77**: 32–42.
- Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP.** 2013. The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's Dement* **9**: 63–75.
- Rachal Pugh C, Fleshner M, Watkins LR, Maier SF, Rudy JW.** 2001. The immune system and memory consolidation: A role for the cytokine IL-1 $\beta$  *Neurosci Biobehav Rev* **25**: 29–41.
- Ramos B, Baglietto-Vargas D, Rio JC Del, Moreno-Gonzalez I, Santa-Maria C, Jimenez S, Caballero C, Lopez-Tellez JF, Khan ZU, Ruano D, et al.** 2006. Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1/APP transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **27**: 1658–1672.

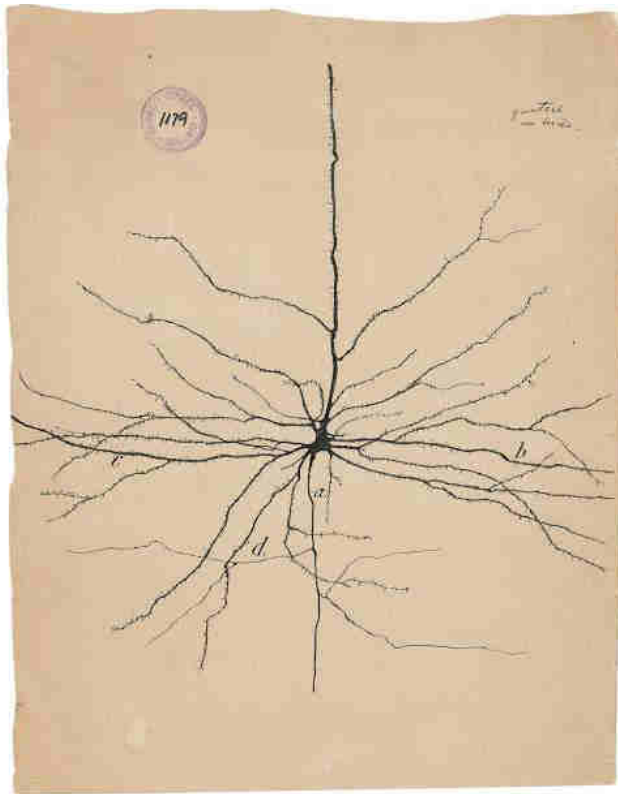
- Ransohoff RM.** 2016. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat Neurosci* **19**: 987–91.
- Reiman EM, Caselli RJ.** 1999. Alzheimer's disease. **31**: 185–200.
- Ries M, Sastre M.** 2016. Mechanisms of A $\beta$  clearance and degradation by glial cells. *Front Aging Neurosci* **8**: 160.
- Robel S, Berninger B, Gotz M.** 2011. The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis. *Nat Rev Neurosci* **12**: 88–104.
- Rosenberg RN, Lambracht-Washington D, Yu G, Xia W.** 2016. Genomics of Alzheimer Disease. *JAMA Neurol* **73**: 867.
- 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-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.
- 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.
- Schmitz C, Rutten BPF, Pielen A, Schäfer S, Wirths O, Tremp G, Czech C, Blanchard V, Multhaup G, Rezaie P, et al.** 2004. Hippocampal neuron loss exceeds amyloid plaque load in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* **164**: 1495–1502.
- Seet L-F.** 2005. Endofin recruits clathrin to early endosomes via TOM1. *J Cell Sci* **118**: 575–587.
- Seet LF, Liu N, Hanson BJ, Hong W.** 2004. Endofin Recruits TOM1 to Endosomes. *J Biol Chem* **279**: 4670–4679.
- Selkoe DJ, Hardy J.** 2016. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* **1–14**.
- Serrano-Pozo A, Betensky RA, Frosch MP, Hyman BT.** 2016. Plaque-associated local toxicity increases over the clinical course of Alzheimer disease. *Am J Pathol* **186**: 375–384.
- Serrano-Pozo A, Mielke ML, Gómez-Isla T, Betensky R a., 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 R a, Frosch MP, Hyman BT.** 2013a. Differential relationships of reactive astrocytes and microglia to fibrillar amyloid deposits in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **72**: 462–71.
- Serrano-Pozo A, Muzikansky A, Gómez-Isla T, Growdon JH, Betensky RA, Frosch MP, Hyman BT.** 2013b. Differential relationships of reactive astrocytes and microglia to fibrillar amyloid deposits in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **72**: 462–71.
- Shemer A, Erny D, Jung S, Prinz M.** 2015. Microglia Plasticity During Health and Disease: An Immunological Perspective. *Trends Immunol* **36**: 614–24.
- Sims R, van der Lee SJ, Naj AC, Bellenguez C, Badarinarayan N, Jakobsdottir J, Kunkle BW, Boland A, Raybould R, Bis JC, et al.** 2017. Rare coding variants in PLCG2, ABI3, and TREM2 implicate microglial-mediated innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat Genet* **49**: 1373–1384.
- Sokolowski JD, Nobles SL, Heffron DS, Park D, Ravichandran KS, Mandell JW.** 2011. Brain-specific angiogenesis inhibitor-1 expression in astrocytes and neurons: Implications for its dual function as an apoptotic engulfment receptor. *Brain Behav Immun* **25**: 915–921.
- The Alzheimer's Association.** 2016. 2016 ALZHEIMER'S DISEASE FACTS AND FIGURES. **12**: 1–84.
- 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- $\beta$  Accumulation in A $\beta$ PP/PS1 Alzheimer's Disease

- Mice Subiculum. *J Alzheimers Dis* **42**: 521–541.
- Ulland TK, Song WM, Huang SC-C, 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 JD, Ulland TK, Colonna M, Holtzman DM.** 2017. Elucidating the Role of TREM2 in Alzheimer's Disease. *Neuron* **94**: 237–248.
- van Strien NM, Cappaert NLM, Witter MP.** 2009. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat Rev Neurosci* **10**: 272–82.
- Verkhatsky A, Parpura V.** 2016. Astroglipathology in neurological, neurodevelopmental and psychiatric disorders. *Neurobiol Dis* **85**: 254–261.
- Verkhatsky A, Parpura V, Pekna M, Pekny M, Sofroniew M.** 2014. Glia in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Biochem Soc Trans* **42**: 1291–1301.
- Villegas-Llerena C, Phillips A, Reitboeck PG, Hardy J, Pocock JM.** 2016. Microglial genes regulating neuroinflammation in the progression of Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol* **36**: 74–81.
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva J V., Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ.** 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid  $\beta$  protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* **416**: 535–539.
- Walsh DM, Selkoe DJ.** 2007. A $\beta$  oligomers - A decade of discovery. *J Neurochem* **101**: 1172–1184.
- Wang Y, Cella M, Mallinson K, Ulrich JD, Young KL, Robinette ML, Gilfillan S, Krishnan GM, Sudhakar S, Zinselmeyer BH, et al.** 2015. TREM2 Lipid Sensing Sustains the Microglial Response in an Alzheimer's Disease Model. *Cell* **160**: 1061–1071.
- 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**: 667–75.
- 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**.
- Wes PD, Sayed FA, Bard F, Gan L.** 2016. Targeting microglia for the treatment of Alzheimer's Disease. *Glia* **64**: 1710–1732.
- Winblad B, Amouyel P, Andrieu S, Ballard C, Brayne C, Brodaty H, Cedazo-Minguez A, Dubois B, Edvardsson D, Feldman H, et al.** 2016. Defeating Alzheimer's disease and other dementias: A priority for European science and society. *Lancet Neurol* **15**: 455–532.
- Wisniewski T, Goñi F.** 2015. Immunotherapeutic Approaches for Alzheimer's Disease. *Neuron* **85**: 1162–1176.
- Wolf SA, Boddeke HWGM, Kettenmann H.** 2017. Microglia in Physiology and Disease. *Annu Rev Physiol* **79**: 619–643.
- 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  $\alpha\beta$  clearance and attenuates amyloid plaque pathogenesis. *J Neurosci* **34**: 9607–20.
- Yeh FL, Hansen D V., Sheng M.** 2017. TREM2, Microglia, and Neurodegenerative Diseases. *Trends Mol Med* **xx**: 1–22.
- 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* **90**: 724–739.
- Zuroff L, Daley D, Black KL, Koronyo-Hamaoui M.** 2017. Clearance of cerebral A $\beta$  in Alzheimer's disease: reassessing the role of microglia and monocytes. *Cell Mol Life Sci* **74**: 2167–2201.



# 6. ANEXOS

---



Santiago Ramón y Cajal






## **ANEXO 1**

**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, Vizuite M, Comella JX, Galea E, Vitorica J and Gutierrez A.** (2017). Phagocytic clearance of presynaptic dystrophies by reactive astrocytes in Alzheimer's disease. *Glia*. *In Press*. DOI: 10.1002/glia.23270



## RESEARCH ARTICLE

# Phagocytic clearance of presynaptic dystrophies by reactive astrocytes in Alzheimer's disease

Angela Gomez-Arboledas<sup>1,3</sup> | Jose C. Davila<sup>1,3</sup> | Elisabeth Sanchez-Mejias<sup>1,3</sup> |  
 Victoria Navarro<sup>2,3,4</sup> | Cristina Nuñez-Diaz<sup>1,3</sup> | Raquel Sanchez-Varo<sup>1,3</sup> |  
 Maria Virtudes Sanchez-Mico<sup>2,3,4</sup> | Laura Trujillo-Estrada<sup>1,3</sup> |  
 Juan Jose Fernandez-Valenzuela<sup>1,3</sup> | Marisa Vizuete<sup>2,3,4</sup> | Joan X. Comella<sup>3,5,7</sup> |  
 Elena Galea<sup>5,6</sup> | Javier Vitorica<sup>2,3,4\*</sup> | Antonia Gutierrez<sup>1,3\*</sup> 

<sup>1</sup>Dpto. Biología Celular, Genética y Fisiología. Facultad de Ciencias, Instituto de Biomedicina de Málaga (IBIMA), Universidad de Málaga, Spain

<sup>2</sup>Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Spain

<sup>3</sup>Centro de Investigación Biomedica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain

<sup>4</sup>Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS)-Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Spain

<sup>5</sup>Institut de Neurociències and Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Unitat de Bioquímica de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

<sup>6</sup>ICREA, Pg. Lluís Companys 23, Barcelona, 08010, Spain

<sup>7</sup>Institut de Recerca de l'Hospital Univesitary de la Vall d'Hebron (VHIR), Barcelona, Spain

## Correspondence

Antonia Gutierrez, Dpto. Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos s/n, Málaga 29071, Spain.  
 Email: agutierrez@uma.es

Javier Vitorica, Dpto. Bioquímica y Biología 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 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.



## KEYWORDS

Alzheimer's disease, neurodegeneration, neuropathology, reactive astrocyte, synaptopathy

## 1 | INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia in elderly individuals and, so far, an effective treatment that prevents onset and disease progression remains elusive. In addition to amyloid plaques and neurofibrillary tangles, the two signature pathological lesions, Alzheimer's brains manifest prominent astrocytic and microglial reactions (De Strooper & Karran, 2016; Heneka et al., 2015; Osborn, Kamphuis, Wadman, & Hol, 2016; Serrano-Pozo, Muzikansky, et al., 2013; Verkhratsky, Parpura, Pekna, Pekny, & Sofroniew, 2014). Glia-mediated neuroinflammation has been proposed as a potential mechanism underlying AD pathogenesis and over the past decade activated microglia have been the focus of increasing research (Heneka et al., 2015; Heppner, Ransohoff, & Becher, 2015); however, the precise contribution of reactive astrocytes is still undetermined. Astrocyte reactivity is specifically identified in the vicinity of amyloid plaques and can be monitored by the increased expression of the intermediate filament protein, GFAP, and, morphologically, by the hypertrophy of their main processes (Osborn et al., 2016; Verkhratsky, Zorec, Rodriguez, & Parpura, 2016). Though emerging data support the molecular and functional diversity of astrocytes in adult brain (Haim & Rowitch, 2017; John Lin et al., 2017), little is known about disease-activated astrocyte diversity. The activation of astrocytes has been often viewed as a neuroinflammatory toxic response in AD; however, this concept is currently changing to the notion of loss-of-function (Masgrau, Guaza, Ransohoff, & Galea, 2017) or protection. As an example of the latter, in amyloid precursor protein (APP) mice in which the GFAP and Vimentin genes have been deleted, plaques are more numerous and larger (Kraft et al., 2013), a result that suggests that reactive astrocytes limit the progression of plaques, however the mechanisms underlying these effects are still unclear. Reactive astrocytes could restrict amyloid pathology by phagocytosing and degrading amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) species (Xiao et al., 2014), since astrocytes have been shown to clear amyloid deposits *in vitro* (Wyss-Coray et al., 2003). The discovery that astrocytes express receptors and downstream signaling molecules involved in phagocytic pathways (Cahoy et al., 2008) supports new physiological roles for these cells, including the phagocytosis of synapses, both during development and in the adult brain (Chung et al., 2013). Further supporting a phagocytic profile, a recent study has described different astrocyte subpopulations by their specific gene signatures in adult mouse brain, and, interestingly, some subsets are enriched in genes linked to phagocytosis (John Lin et al., 2017). However, reactive astrocytes might display disease-specific dysfunctional phenotypes and thus contribute to circuit failure and disease progression.

As far as we know, there is no study showing that astrocytes phagocytose dystrophic neurites or neuronal debris in the context of neurodegenerative pathologies such as AD. In this study, we show that reactive astrocytes surrounding  $A\beta$  plaques in the hippocampus of

APP/PS1 mice enwrap and engulf axonal/presynaptic dystrophies, probably aiming at eliminating aberrant presynaptic elements. We also detected these phagocytic astrocytes in the hippocampus of AD patients. However, the persistence of dystrophies around plaques with disease progression might result from impaired phagocytic function of astrocytes. Therefore, a therapeutic approach to enhance the efficiency of astrocyte-mediated clearance activity may contribute to restore neuronal circuits, reduce the  $A\beta$  pathology and/or prevent the inflammatory response in AD.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Transgenic mice

Male transgenic mice expressing both amyloid precursor protein and presenilin-1 mutations (APP751Swe-London/PS1M146L) of 4 ( $n = 8$ ), 6 ( $n = 8$ ), and 12 ( $n = 8$ ) months of age were used. These bigenic mice were obtained (see Blanchard et al., 2003) by crossing homozygous PS1 mice (expressing human mutant PS1[M146L] under HMGC0A reductase promoter) to hemizygous APP751SL mice (expressing human mutant APP751 carrying the Swedish [KM670/671NL] and London [V717I] mutations under the control of the Thy1 promoter). We have previously characterized this APP/PS1 transgenic model (Baglietto-Vargas et al., 2010; Jimenez et al., 2008; Ramos et al., 2006; Sanchez-Varo et al., 2012; Torres et al., 2012; Trujillo-Estrada et al., 2014). Age-matched non-transgenic mice (WT) of the same genetic background (C57BL:6) 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).

### 2.2 | Human samples

Human autopsy specimens (Braak 0,  $n = 8$ ; Braak II,  $n = 13$ , Braak III-IV,  $n = 10$ , and Braak V-VI,  $n = 18$ ) from the medial temporal lobe (hippocampal region) were obtained from the tissue bank Fundacion CIEN (BT-CIEN; Madrid, Spain) and the Neurological Tissue Bank of IDIBELL-Hospital of Bellvitge (Barcelona, Spain). The utilization of *post mortem* human samples was approved by the corresponding biobank ethics committees and the "Comite de Etica de la Investigacion (CEI), Hospital Virgen del Rocio", Seville, Spain. All the subjects (Braak 0, II, III-IV and V-VI) in this study are identical to those reported by us previously (Sanchez-Mejias et al., 2016). All cases were scored for Braak tau pathology. Only Braak V-VI cases were clinically classified as demented patients. The number of cases for the different experiments is indicated in the corresponding results section or figure.



### 2.3 | Tissue preparation

For light microscopy studies APP/PS1 and age-matched WT animals were anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg) and transcardially perfused with 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), followed by 4% paraformaldehyde, 75 mM lysine, 10 mM sodium metaperiodate in 0.1 M phosphate buffer (PB). Fixed and cryoprotected brains were serially sectioned at 40  $\mu\text{m}$  thickness in the coronal plane on a freezing microtome. Human samples were fixed in 4% paraformaldehyde and sectioned at 30  $\mu\text{m}$  thickness on a freezing microtome. For Westerns and quantitative real-time PCR (qPCR), unfixed and frozen hippocampi from *post mortem* human samples were used. For transmission electron microscopy (TEM), mice and human sections were postfixed in 1% osmium tetroxide in 0.1 M PB, block stained with uranyl acetate, dehydrated in graded acetone and embedded in Araldite (EMS, USA). Selected areas were cut in ultrathin sections and examined with an electron microscope (JEOL JEM 1400).

### 2.4 | Antibodies

The following primary antibodies were used for this study: anti-oligomeric A $\beta$  OC rabbit polyclonal (1:5000, Millipore, Burlington, MA); anti-GFAP (glial fibrillary acidic protein) rabbit polyclonal (1:10000, Dako, Troy, MI); anti-GFAP chicken polyclonal (1:20000, Millipore); anti-BLBP (brain lipid-binding protein) rabbit polyclonal (1:2000, Abcam, Cambridge, MA); anti-AQP4 (aquaporin 4) rabbit polyclonal (1:10000, Sigma, St. Louis, MO); anti-ALDH1L1 (aldehyde dehydrogenase 1 family member L1; N103/39 clone) mouse monoclonal (1:2000, Millipore); anti-EAAT2 (excitatory amino acid transporter 2) rabbit polyclonal (1:10000, Abcam); anti-human APP rabbit polyclonal (1:10000, Sigma); anti-Iba1 (ionized calcium binding adaptor molecule 1) rabbit polyclonal (1:1000, Wako, Mountain View, CA); anti-VGluT1 (vesicular glutamate transporter 1) guinea-pig polyclonal (1:10000, Millipore); anti-synaptophysin rabbit polyclonal (1:1000, Abcam).

### 2.5 | Light microscopy immunohistochemistry

Free-floating sections were first treated with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/10% methanol in PBS, pH 7.4 for 20 min to inhibit endogenous peroxidase followed by avidin-biotin Blocking Kit (Vector Lab, Burlingame, CA) for 30 min to block endogenous avidin, biotin and biotin-binding proteins. For general antigen retrieval method sections were previously heated at 80°C for 30 min in 50 mM citrate buffer pH 6.0. Sections were immunoreacted with the primary antibody over 24 hr at room temperature. The tissue-bound primary antibody was detected by the incubation for 1 hr with the corresponding biotinylated secondary antibody (1:500, Vector Laboratories), followed by incubation with streptavidin-conjugated horseradish peroxidase (1:2000, Sigma-Aldrich) for 90 min, and finally visualized with 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma-Aldrich), 0.01% hydrogen peroxide in PBS and 0.03% nickel ammonium sulfate. The specificity of the immune reactions was controlled by omitting the primary antisera. For double immunofluorescence labeling, sections were first

sequentially incubated with the indicated primary antibodies followed by the corresponding Alexa 488/548 secondary antibodies (1:1000, Invitrogen, Carlsbad, CA). GFAP-, AQP4-, and EAAT2-immunolabeled sections were stained with 0.02% thioflavin-S in 50% ethanol. Double immunofluorescent sections were examined under a confocal laser microscope (Leica SP5 II). For three-dimensional (3D) reconstructions, serial confocal images of GFAP/APP double labeled sections (acquired in steps of 0.2  $\mu\text{m}$  using a 63 $\times$  objective) were analyzed with Imaris software (Bitplane), and 3D reconstructions were obtained with the surface plugin.

### 2.6 | Electron microscopy immunogold labeling

50- $\mu\text{m}$  thick sections from 6 and 12-month-old APP/PS1 mice were cryoprotected in a 25% sucrose and 10% glycerol solution, followed by freezing at  $-80^{\circ}\text{C}$  in order to increase the antibody binding efficiency. Sections were then incubated 48 hr in primary antibody in a PBS 0.1 M/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, Yaphank, NY) overnight at 22°C. After postfixation with 2% glutaraldehyde and washing with 50 mM sodium citrate, the labeling 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.

### 2.7 | Focused ion beam scanning electron microscopy (FIB/SEM)

Araldite embedded tissue from 12-month-old APP/PS1 mice were glued onto a sample stub with carbon adhesive tape in order to facilitate conductivity. Then the sample stub was coated first with iridium and later with platinum for 10 min to allow charge dissipation. With a combined FIB/SEM microscope (Helios Nanolab 650, FEI Company, Hillsboro, OR) we obtained serial TEM images in steps of 30 nm, which allows to represent 3D images from a region of interest.

### 2.8 | Quantitative image analysis

Astroglial loading was defined as the percentage of area stained with anti-GFAP (total astrocytes) or anti-BLBP (reactive astrocytes) related to the hippocampal area analyzed. 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, Minato, Tokyo, Japan). The camera settings were adjusted at the start of the experiment and maintained for uniformity. Digital images (4 sections/mouse/age) from APP/PS1 ( $n = 4$ /age) and WT mice ( $n = 4$ /age) were analyzed using Visilog 6.3 analysis program (Noesis, France). The GFAP- or BLBP-immunopositive signal within the selected brain region (CA1) was converted into 8-bit gray scale, and immunostained cells were identified by a threshold level mask. The threshold level 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. Plaque loading was defined as the percentage of total CA1 area immunostained with the anti-A $\beta$  antibody (OC), and the image analysis was carried out as described above. Plaque size and astroglial covered area were measured in TEM images of amyloid plaques (19 plaques/age) from 6 ( $n = 3$ ) to 12-month-old ( $n = 3$ ) APP/PS1 mice with a JEOL JEM-1400 electron microscope, analyzed by Visilog 6.3 analysis program (Noesis). This measurement was carried out in the CA1 hippocampal area. The number of total dystrophic neurites around plaque and the number of engulfed dystrophic neurites was measured in the same electron microscopy images in which we previously analyzed plaque size and astroglial covered area.

## 2.9 | Total RNA and protein extraction

Total RNA and proteins were sequentially extracted from cells and human or mouse hippocampal tissue using Tripure Isolation Reagent (Roche, Basel, Switzerland; 100 mg tissue/1 ml Tripure Isolation Reagent) following the manufacturer's recommendations. RNA integrity (RIN) was determined by RNA Nano 6000 (Agilent, Santa Clara, CA). Although no differences between Braak groups were observed, the RIN was lower in human samples compared with transgenic models (RIN:  $4.95 \pm 1.4$  or  $8.5 \pm 0.5$  for human and mouse samples, respectively). RNA was quantified using NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher, Waltham, MA). Proteins were quantified using Lowry's method.

## 2.10 | Retrotranscription and qPCR

Retrotranscription and qPCR were performed as described previously (Sanchez-Mejias et al., 2016). Briefly, retrotranscription (4 g of total RNA as template) was performed with the High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). For real time qPCR, 40 ng of cDNA were mixed with 2 $\times$  Taqman Universal Master Mix (Applied Biosystems) and 20 $\times$  Taqman Gene Expression assay probes. Quantitative PCR reactions (qPCR) were carried out in 96-well plates using an ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems). The cDNA levels of the different samples were determined using GAPDH and  $\beta$ -actin. Routinely, we used the housekeeper gene, GAPDH, to normalize loading. The amplification of GAPDH was performed in parallel with the gene to be analyzed. Results were expressed using the comparative double-delta Ct method (2- $\Delta\Delta$ Ct; Bulletin number 2, Applied Biosystems) using Braak 0 as the reference condition.

## 2.11 | Western blots

Western blots were performed as previously described (Sanchez-Mejias et al., 2016). Proteins (15  $\mu$ g) were loaded on 4–20% sodium dodecyl sulfate-Tris-Glycine-polyacrylamide gel electrophoresis (Bio-Rad, Hercules, CA), transferred to nitrocellulose (Optitran, GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, MA) and incubated with anti-GFAP antibody.

## 2.12 | Statistical analysis

Normally distributed data were expressed as the mean  $\pm$  SD. Mean values were compared using ANOVA followed by Tukey's test (more than two groups) or two-tailed  $t$  test for two group comparisons. Non-normally distributed data were represented using box-plots (Sigmaplot) or scatter-plots with the median and interquartile range (GraphPad), and compared with the Mann-Whitney  $U$  test (for two groups comparisons) or Kruskal-Wallis tests (more than two groups) followed by Dunn's post-hoc test. The significance was set at 95% of confidence. Linear correlations were analyzed using the Spearman test. In all cases, IBM SPSS (v23) Statistics software was used.

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Reactive astrocytes are specifically and intimately associated with amyloid plaques in APP/PS1 mouse hippocampus

As revealed by GFAP immunostaining, astrocytes were widely and homogeneously distributed throughout all hippocampal regions in young APP/PS1 mice with none or very low extracellular amyloid deposition (Figure 1a1). However, astroglial reactivity gradually increased with age and amyloid pathology; in fact, astrogliosis was especially patent in areas with abundant amyloid deposits such as the *stratum oriens* of CA subfields and the hilar region of the dentate gyrus (Figure 1a2, a3). This increase was confirmed by quantification of the GFAP-positive loading in the CA1 subfield (Figure 1b1). Though WT-mouse hippocampus displayed also an age-dependent increase in the GFAP-positive covered area, the increase was much more pronounced in APP/PS1 mice ( $2.4 \pm 0.6$ ,  $2.01 \pm 0.23$ , and  $1.68 \pm 0.17$  fold in 4, 6, and 12 month-old APP/PS1 compared with age-matched WT mice;  $n = 4$ /age, see Figure 1b1).

Although most hippocampal astrocytes expressed GFAP-immunoreactivity, only those located near the A $\beta$  plaques showed enhanced expression of GFAP and displayed a reactive phenotype with hypertrophic morphology and extended processes in and around the plaques. To selectively discriminate reactive from non-reactive astrocytes, we have used BLBP, a specific marker for reactive astroglia (Gotz, Sirko, Beckers, & Irmeler, 2015). Astrocyte-like neural stem cells in the subgranular zone of dentate gyrus are also positive for this marker. Immunostaining for BLBP (Figure 1a4–a6), and quantification of BLBP-covered area in the CA1 subfield (Figure 1b2), clearly demonstrated a significant increase in astroglial reactivity with age in APP/PS1 mice ( $2.6 \pm 1.41$ ,  $4.06 \pm 0.74$ , and  $6.39 \pm 0.06$  fold at 4, 6, and 12 months compared to age-matched WT mice;  $n = 4$ /genotype/age, see Figure 1b2). As expected, only astrocytes surrounding plaques were double labeled for GFAP and BLBP (Figure 1a10–a12). The regional and temporal pattern for BLBP-immunoreactivity was coincident with that for amyloid deposition revealed with OC-immunostaining (see Figure 1a7–a9). Moreover, a good linear correlation (Spearman's correlation coefficient  $r = 0.87$ ,  $P < .0001$ ) was found

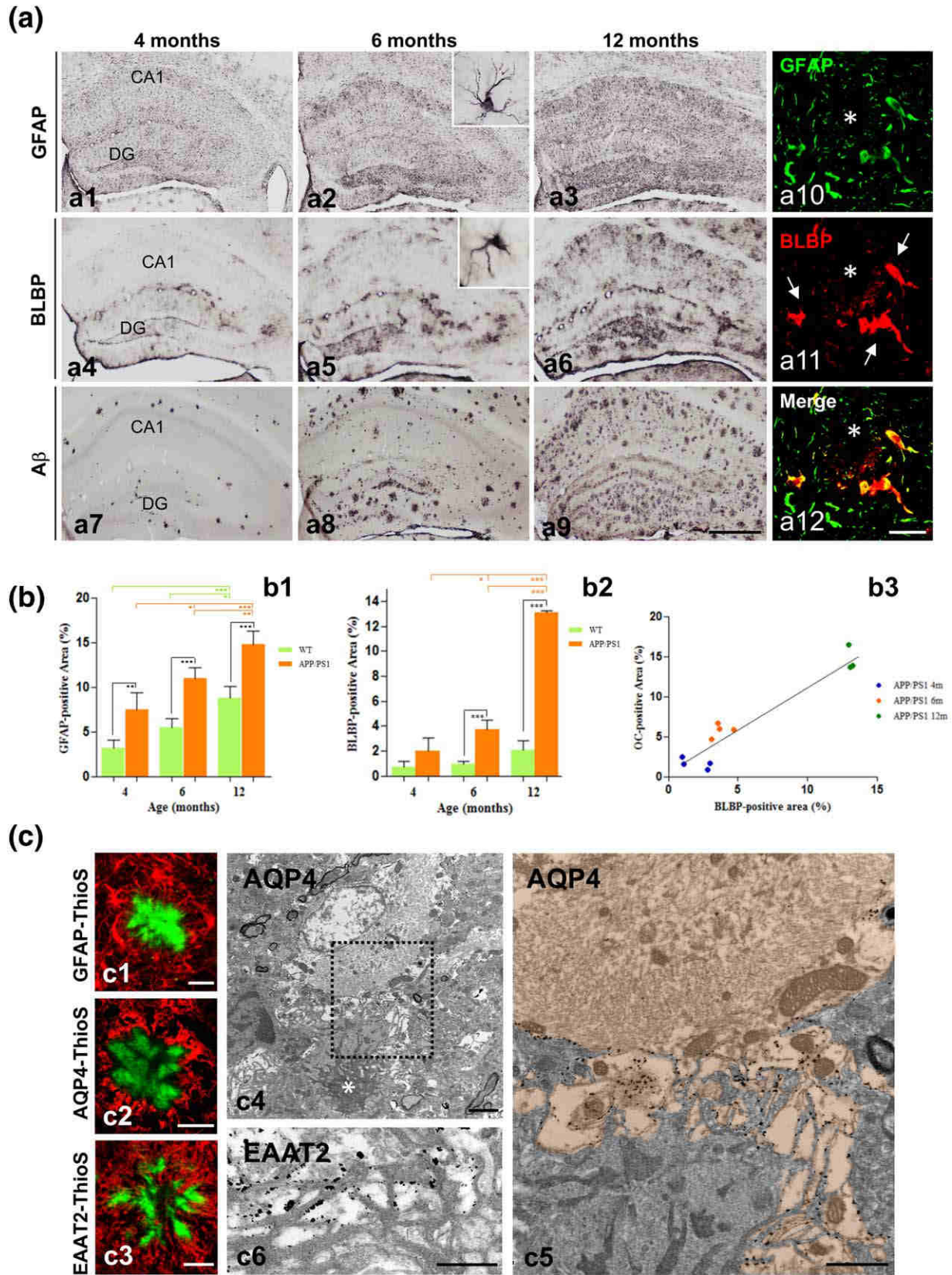


FIGURE 1.



between the astroglial reactivity (BLBP-positive) and the amyloid load (OC-immunoreactivity; Figure 1b3).

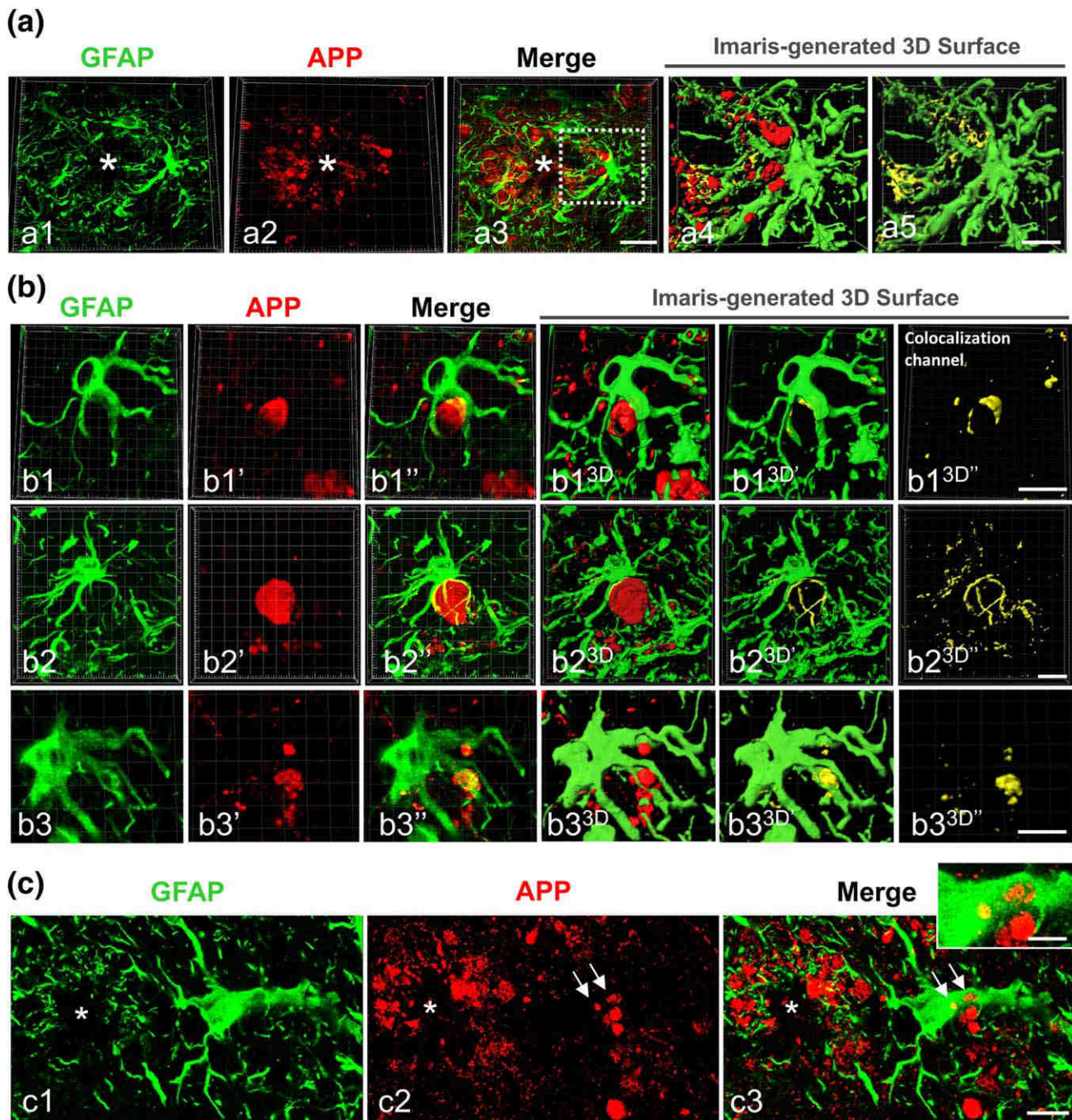
Thus, amyloid plaques were always surrounded by reactive astrocytes. Double-staining with thioflavin-S (for fibrillar A $\beta$ ) and anti-GFAP revealed the intricate relationship between the reactive-astrocyte processes and the fibrillar plaques (Figure 1c1), which was seen also with other astrocyte markers, such as AQP4 (Figure 1c2) and EAAT2 (Figure 1c3). Immunogold electron microscopy for AQP4 (Figure 1c4,c5) and EAAT2 (Figure 1c6) revealed immunopositive astrocytic processes closely intermixed with A $\beta$  fibres and microglial processes in the periphery of the amyloid plaques, leading to plaques completely wrapped by glial processes. In fact, the percentage of astroglial area surrounding plaques increased with plaque size, showing a highly significant linear correlation (Spearman's correlation coefficient  $r = 0.745$ ,  $P = .0001$ ).

### 3.2 | Reactive astrocytes envelop and internalize plaque-associated axonal dystrophic neurites

We have previously showed that almost all amyloid plaques in the APP/PS1 hippocampus are surrounded by dystrophic neurites, and that the number of dystrophies correlates with the plaque size (Sanchez-Varo et al., 2012). Also, we have reported that dystrophic neurites are APP-positive and of axonal/synaptic nature (Sanchez-Varo et al., 2012). However, besides the close spatial relationship between reactive astrocytes and amyloid plaques, there are no studies focusing on astroglia and the dystrophic neurites surrounding neuritic plaques. Since reactive astrocyte processes were better visualized with GFAP marker compared with ALDH1L1 (see Supporting Information, Figure S1), here we analyzed the morphological relationship between GFAP-reactive astrocytes and APP-positive aberrant neuronal structures. For that, we have used confocal microscopy and 3D image reconstructions with Imaris software of double GFAP/APP immunolabeling (Figure 2). As shown in Figure 2a, plaque-associated astrocytic processes were in close proximity to dystrophic neurites (Figure 2a1–a3). The Imaris-generated 3D reconstructions confirmed the tight interaction between dystrophies and astrocyte processes (Figure 2a4). Moreover, both markers co-

localized in some areas, as shown by the yellow color (Figure 2a5), suggesting close physical contact. Higher magnification images of individual reactive astrocytes (Figure 2b1–b3 are representative images) demonstrated that the astroglial processes envelop one or several APP-positive dystrophic neurites. Solid surfaces, best matching the anatomy of astrocytes and dystrophic neurites, were created by 3D reconstructions with Imaris of z-stacks obtained in the three-color channels (Fig. 2b1–b3<sup>3D</sup> series). They showed that neuronal dystrophies directly oppose the astrocyte cell surface. The abundance of astrocyte-dystrophy association per plaque was quantified by confocal imaging. In contrast, most (if not all) plaques presented astrocyte-dystrophy contacts in 6 and 12-month-old APP/PS1 mice ( $84.74\% \pm 36.26\%$  and  $89.83\% \pm 30.48\%$ , respectively). In contrast, the confocal analysis showed the presence of APP-positive dystrophies within reactive astrocytes near amyloid plaques (Figure 2c1–c3), suggesting phagocytosis of dystrophies by astrocytes. To investigate this further we performed ultrastructural analysis (Figure 3). Transmission electron microscopy images revealed the presence of dystrophic neurites (identified by their typical heterogeneous content with autophagic vacuoles) within the cytoplasm of plaque-associated reactive astrocytes (Figure 3a1–a3,b1,b2). The astrocytic processes containing dystrophies were large and completely filled with intermediate filaments, many of which appeared surrounding and even attached to the outer membrane of the inside-located dystrophies (Figure 3a3,b2). In contrast, the astrocytic cytoplasm adjacent to the fibrillar A $\beta$  in the periphery of the plaques appeared devoid of filaments and other organelles. To better visualize the spatial relationship of astrocyte-dystrophies we used FIB/SEM for high-resolution 3D reconstructions of serially collected transmission electron microscopy images (Figure 3c1–c8 are representative serial images). These serial images confirmed the intracellular location of the dystrophic neurites within reactive astrocyte processes. Quantitative studies using TEM sections revealed, as expected, the existence of an age-dependent (between 6 and 12 months of age) increase in the plaque area (average  $51.42 \mu\text{m}^2$  (range 5.02–82.67) and  $137.68 \mu\text{m}^2$  (range 6.7–571.30) for 6 and 12 months of age, respectively,  $n = 20$  plaques per age; Mann-Whitney  $P = .03$ ) and in the number of dystrophic neurites (Mann-Whitney  $P = .02$ , Figure 3d1) associated to the

**FIGURE 1** Astrocyte reactivity progresses in parallel to amyloid pathology in the of APP/PS1 hippocampus. (a) Immunostaining for GFAP (a1–a3), BLBP (a4–a6), and OC (a7–a9) in the hippocampus of APP/PS1 at 4, 6, and 12 months of age, immunostained with anti-GFAP (a1–a3), anti-BLBP (a4–a6) or anti-OC (a7–a9) antibodies. Insets in a2 and a5 show details of GFAP- and BLBP-positive astrocytes, respectively, at a higher magnification. Reactive astrocytes are located around amyloid plaques (asterisk) and co-expressed GFAP and BLBP (arrows; a10–a12) as shown by double immunofluorescence. (b) Image analysis quantification of the GFAP-positive (b1) and BLBP-positive (b2) covering areas in the CA1 subfield demonstrates an age-related increase in the astroglial reactivity, which was significantly higher in the transgenic mice compared to WT mice. BLBP was a more selective marker for reactive astrocytes than GFAP, and the BLBP-positive area displayed a good correlation with the OC-positive amyloid load (b3). Data (mean  $\pm$  SD) from GFAP and BLBP quantification was analyzed by one-way ANOVA ( $F(5,18) = 38.18$ ,  $P = .0001$  for GFAP; and  $F(5,16) = 149.3$ ,  $P = .0001$  for BLBP) followed by Tukey post hoc multiple comparison test. Significance (\* $P < .05$ ; \*\* $P < .01$ ; \*\*\* $P < .0001$ ) was indicated in the figure. Correlation data between BLBP and OC loading was analyzed by Spearman's Correlation test ( $r = 0.87$ ;  $P = .0001$ ). (c) The close relationship between the astrocytic processes and the amyloid fibrils can be observed by confocal microscopy double-staining for GFAP–Thioflavin S (c1), AQP4–Thioflavin S (c2), or EAAT2–Thioflavin S (c3), as well as by electron microscopy immunogold staining for AQP4 (c4–c5) or EAAT2 (c6); amyloid plaque in c4 is indicated by a white asterisk; A $\beta$  fibrils in c5 and c6 are visualized by their higher electrodensity compared with astroglial (very low electrodense cytoplasm) and microglia (intermediate electrodense cytoplasm). Note the specific gold-labeling in the astrocytic plasma membrane facing the amyloid fibrils in c5 (the astrocyte cytoplasm is orange colored) and c6. DG, dentate gyrus; CA1, hippocampal CA1 subfield. Scale bars: a1–a9, 500  $\mu\text{m}$ ; a10–a12, 25  $\mu\text{m}$ ; c1–c3, 20  $\mu\text{m}$ ; c4, 2  $\mu\text{m}$ ; c5–c6, 1  $\mu\text{m}$  [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

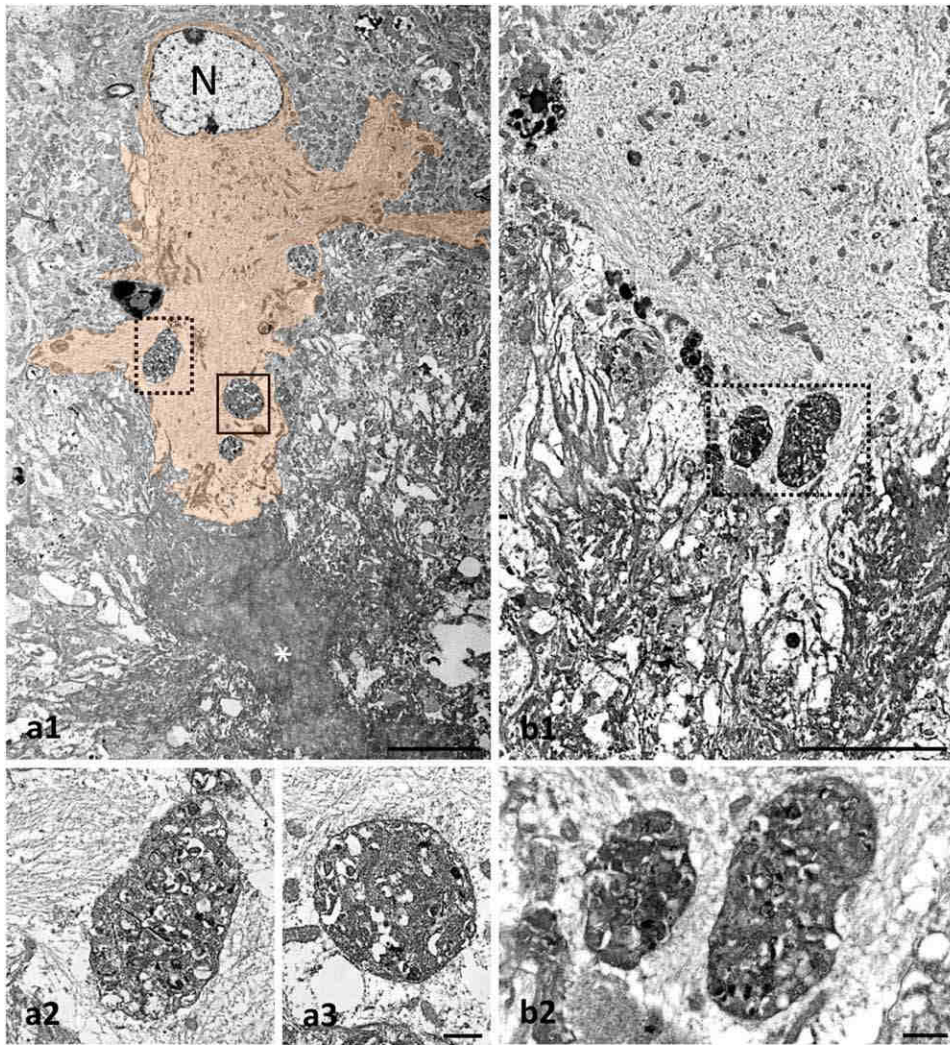


**FIGURE 2** Plaque-associated reactive astrocytes enwrap axonal dystrophic neurites in APP/PS1 hippocampus. (a) Confocal microscopy of double GFAP/APP immunofluorescence showing plaque (asterisk)-associated reactive astrocytes making very close contacts with APP-containing axonal dystrophies (a1–a3). Imaris-generated 3D surface images (a4 and a5) reveal the tight apposition between the reactive astrocytes and dystrophic neurite membranes in the co-localization channel in a5). (b) Confocal images of double GFAP/APP immunofluorescence showing representative examples of reactive astrocytes with their processes clearly wrapping APP-positive axonal dystrophies (b1–b3). The corresponding Imaris-generated 3D reconstructions (b1<sup>3D</sup>–b3<sup>3D</sup>) reveal the extensive apposition surface between the astrocytic processes and the neuronal dystrophies. (c) Confocal images of double GFAP/APP immunofluorescence showing APP-positive dystrophies (arrows) within a reactive astrocyte in the nearness of an A $\beta$  plaque (star). Scale bars: a1–a3, 20  $\mu$ m; a4 and a5, b1–b3, and c1–c3, 10  $\mu$ m; inset, 5  $\mu$ m [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

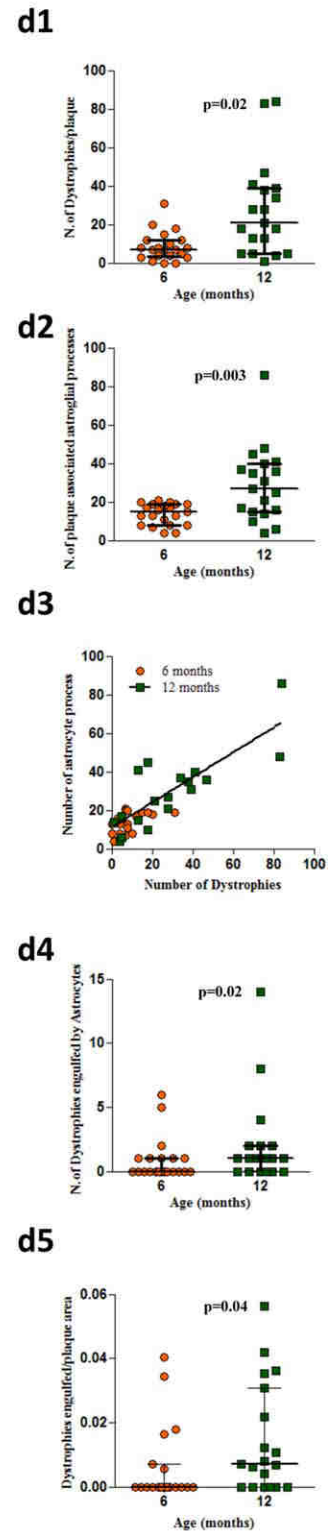
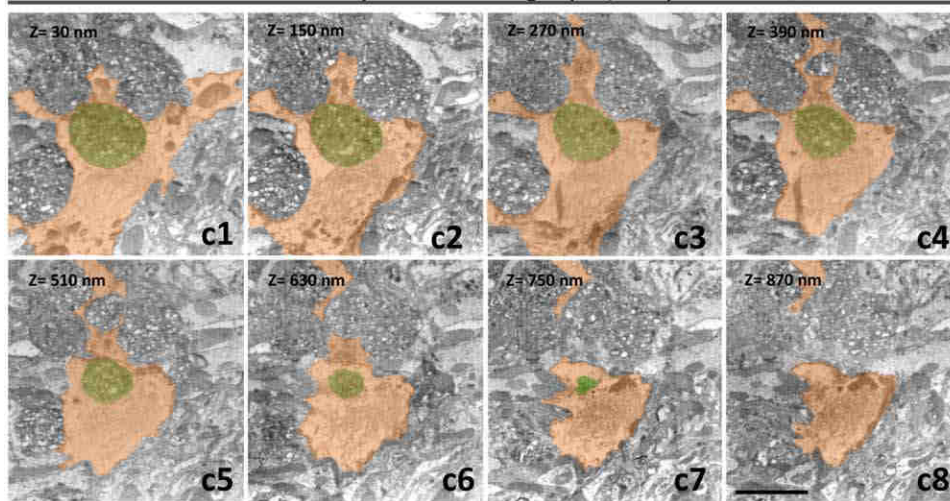
A $\beta$  plaques (3.3-fold between 6 and 12 months of age). This increase was paralleled by a significant increment in the number of astrocytic processes associated to the plaques ( $13.80 \pm 5.49$  vs.  $29.15 \pm 19.17$  processes at 6 and 12 months of age respectively,  $n = 20$  per age,

Mann–Whitney  $P = .003$ , Figure 3d2). In fact, the number of plaque-associated astrocyte processes significantly correlated with the number of dystrophies (Figure 3d3, Spearman  $r = 0.785$ ,  $P = .0001$ ,  $n = 40$ ) but not with the plaque size (Spearman  $r = 0.04$ ,  $P = .39$ ). In





Serially sectioned images (FIB/SEM)



**FIGURE 3** Ultrastructural identification of engulfed dystrophic neurites within the cytoplasm of APP/PS1 reactive astrocytes. TEM images (a1 and b1) showing dystrophic neurites inside plaque-associated reactive astrocytes (cytoplasm colored in orange in a1; N, astrocyte nucleus). As can be seen in the enlarged images (a2, a3; b2), the engulfed dystrophies are surrounded by the astrocytic cytoplasm completely filled with glial filaments. Representative serial FIB/SEM electron microscopy images (c1–c8) showing an astrocytic process (orange colored) wrapping and engulfing a dystrophic neurite (green colored). Quantitative analysis demonstrates a significant age-dependent increase in the number of dystrophies associated to plaques (d1), which was paralleled by a significant increment in the number of reactive astrocytic processes contacting the plaque (d2). In consequence, a highly significant linear correlation (d3) between reactive astrocytic processes and the number of dystrophies was also observed (Spearman  $r = 0.785$ ,  $P = .0001$ ,  $n = 40$ ). A significant increase in the number of dystrophic neurites engulfed by astrocytic processes (d4), and in the number of engulfed dystrophies per plaque (d5), is observed at 12 months of age as compared with 6 months. The data ( $n = 19$ – $21$  plaques from three APP/PS1 mice/age) are shown individually (dots) with the median and the interquartile range. Significance was analyzed by Mann–Whitney  $U$  comparison test and indicated in the figure. Scale bars: a1 and b1, 5  $\mu\text{m}$ ; a2, a3, and b2, 0.5  $\mu\text{m}$ ; c1–c8, 3  $\mu\text{m}$  [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]



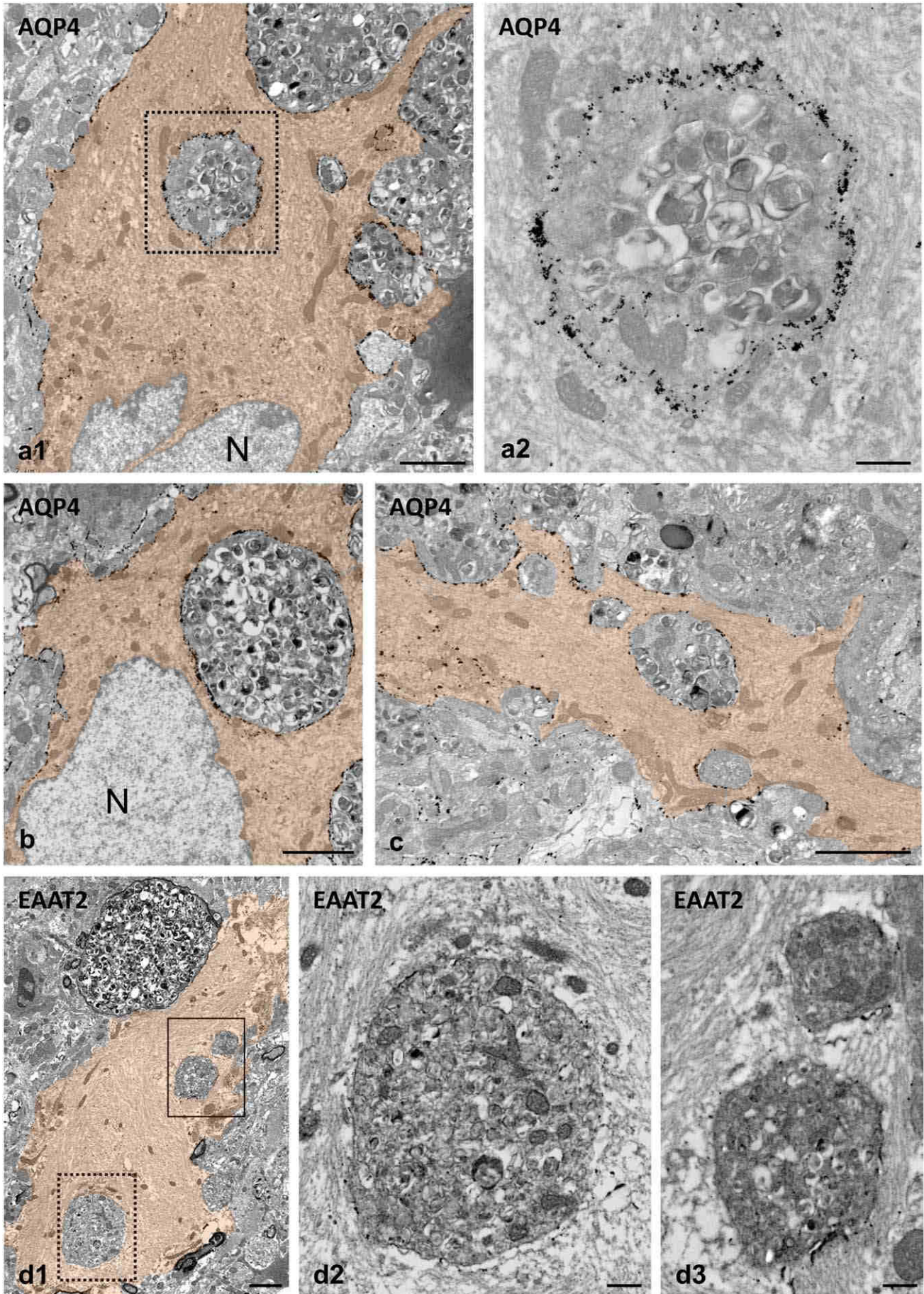


FIGURE 4.

consequence, we also observed a significant increase ( $n = 20$  per age, Mann–Whitney  $P = .02$ ) in the number of dystrophies engulfed by astrocytic processes (Figure 3d4), and in the engulfed dystrophies per plaque (Mann–Whitney  $P = .04$ ,  $n = 20$  per age, Figure 3d5). It is relevant that the proportion of plaques with associated astrocytic processes containing one or more dystrophies was much higher at 12 months (68.40%) than at 6 months (35%). In spite of this increase, the proportion of dystrophic neurites engulfed by astrocytes with respect to the total number of dystrophies around the plaques was low at both ages (i.e.,  $6.25\% \pm 10.14\%$  or  $7.72\% \pm 10.95\%$  of total neurites for 6 or 12-month-old APP/PS1 mice).

Though microglia, the main phagocytic population within the brain, surrounded amyloid plaques and were also in close contact with dystrophic neurites (see Supporting Information, Figure 2), we could not identify by EM the presence of these abnormal structures within the cytoplasm of these cells. In addition, and in support of the selective clearance of dystrophic neurites by engulfing reactive astrocytes, we never saw other neuronal structures (such as myelinated axons or even myelinated dystrophies) within the cytoplasm of reactive astrocytes.

### 3.3 | Reactive astrocytes engulf and degrade axonal/synaptic dystrophies

Next, we aimed to better visualize the internalization of dystrophies by astrocytes examining by TEM the localization of plasma membrane proteins, AQP4 channel and EAAT2. These proteins are extensively located throughout the plasma membrane of reactive astrocytes in the APP/PS1 mouse hippocampus, and thus allow to dissect the anatomical boundaries of astrocytes (Figures 1 and 3). While AQP4 was mainly located at the astrocyte end-feet membrane in WT mice hippocampus (Supporting Information, Figure S3), the engulfed dystrophies appeared morphologically intact and surrounded by AQP4-positive plasma membrane in APP/PS1 mice, as revealed by electron microscopy immunogold labeling for AQP4 (Figure 4 a–c). As mentioned before, the cytoplasm adjacent to the endocytosed dystrophies showed many glial intermediate filaments, and mitochondria frequently appeared closely associated to the phagosome membrane. Similar results were obtained with the antibody for EAAT2 (Figure 4 d1–3), though the immunostaining intensity was substantially lower than that of AQP4. In most cases, the engulfed dystrophies appeared as double-membrane-bound inclusions (astrocyte membrane plus the neuronal dystrophy membrane), but occasionally the membrane of the engulfed material was discontinuous or seemed to be absent (Figure 5a1,a2,b). These TEM images support the existence of astrocyte phagocytosis of pathological neuronal structures. In fact, lysosomes were usually found near the engulfed

dystrophies (Figure 5a2,c2,d2). Some of the dystrophies seemed to be in the process of degradation (Figure 5c2,d2), indicating that reactive astrocytes actively engulf and degrade neuronal dystrophies.

To confirm the neuronal/synaptic origin of the engulfed material, we used confocal and TEM immunolabeling with antibodies for neuronal (APP) and synaptic (VGluT1 and synaptophysin) molecules (Figure 6). Double immunofluorescence labelling for GFAP and VGluT1 (Figure 6a1–a6) or synaptophysin (Figure 6b1–b3) confirmed the neuronal and probably synaptic nature of the dystrophies enwrapped by reactive astrocytes. Moreover, TEM analysis identified presynaptic dystrophies surrounded by astrocyte processes (Figure 6c1,c2). In addition, the ultrastructural immunolabeling of the engulfed dystrophies with antibodies for APP (Figure 6d1,d2) or VGluT1 (Figure 6d3) clearly demonstrated positive dystrophies, completely surrounded by the astrocyte cytoplasm, confirming their neuronal and potential presynaptic nature. Furthermore, engulfed dystrophies were significantly (Mann–Whitney,  $P = .0002$ ) smaller ( $4.23 \mu\text{m}^2$  in average; 2.0–9.4 range,  $n = 28$ ) than those non-phagocytosed ( $14.01 \mu\text{m}^2$  in average; 2.9–50.8 range,  $n = 28$ ). Altogether, these findings suggest that astrocytes engage in the elimination of presynaptic dystrophies in APP/PS1 mice.

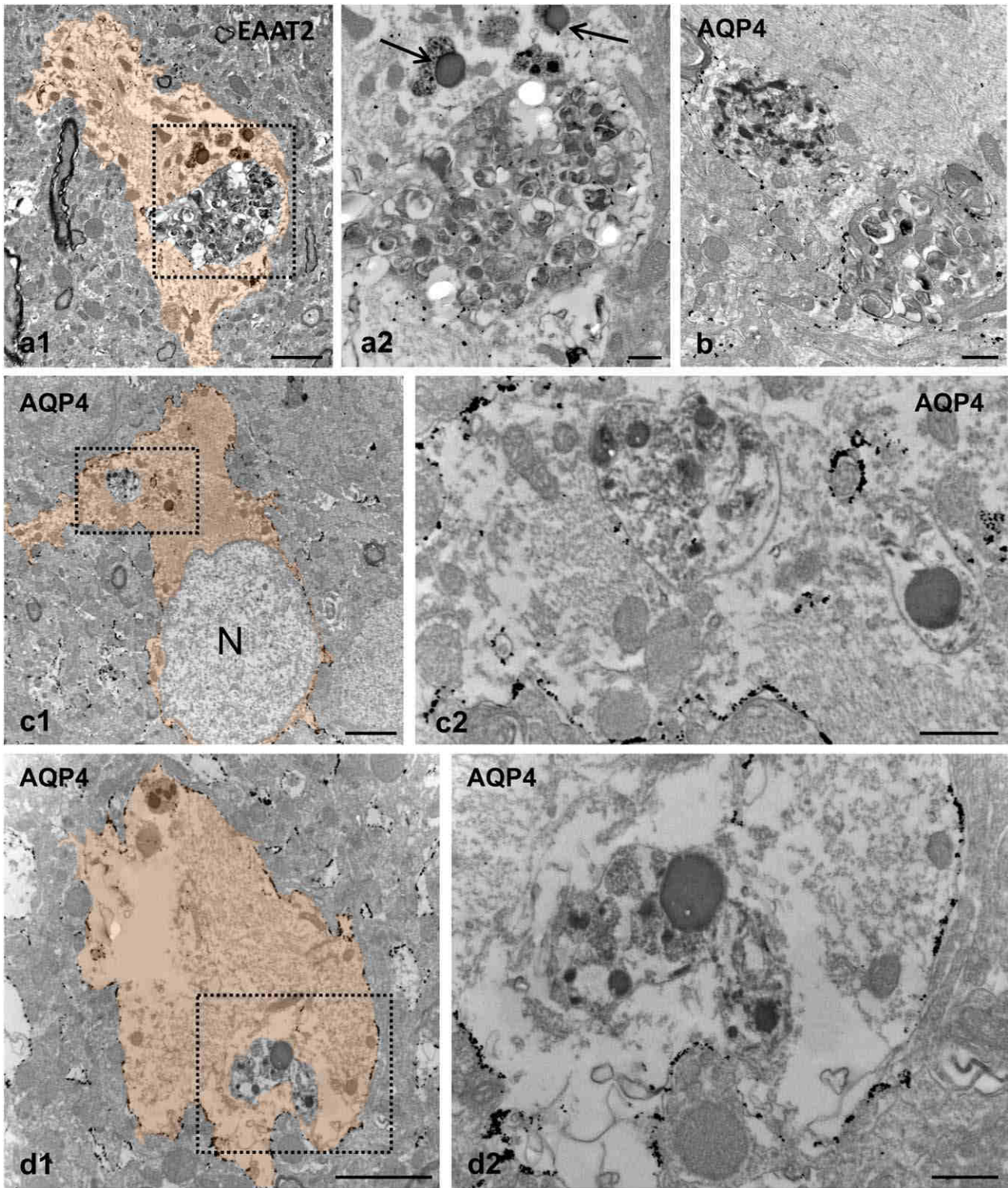
### 3.4 | Astrocyte phagocytosis of neuronal dystrophies is present in human Alzheimer's brains

Astroglia is a noticeable event in the hippocampus of Alzheimer's patients (Braak V–VI). The expression of the astrocyte marker GFAP was significantly upregulated in the Braak V–VI samples compared with earlier stages of tau pathology and controls, as measured by Western blot (Figure 7a1,a2) and qPCR (Figure 7a3). Similarly, the expression of vimentin, another astrocyte marker, was also higher in Braak V–VI samples as compared with controls (not shown). This upregulation of GFAP in the hippocampus of Braak V–VI individuals was corroborated by immunostaining and GFAP-positive astrocyte loading quantification. Reactive astrocytes clustered around amyloid plaques, and the hippocampal area occupied by these astrocytes showed a significant increase in Braak V–VI samples ( $5.33 \pm 2.47$  fold,  $n = 6$  for Braak V–VI as compared with Braak II,  $n = 4$ , or Braak III–IV,  $n = 5$ , samples; Kruskal–Wallis followed by Dunn test,  $P < .05$ ).

We next examined by confocal microscopy the relationship between dystrophic neurites and astrocytes using double APP–GFAP immunofluorescence. As seen in the APP/PS1 mice, human APP-positive dystrophic neurites were surrounded by GFAP-positive astrocyte processes (Figure 7). Similar results were observed using AT8 antibody as another marker for human dystrophic neurites (not shown). The tight astrocyte-dystrophy association could be seen since initial

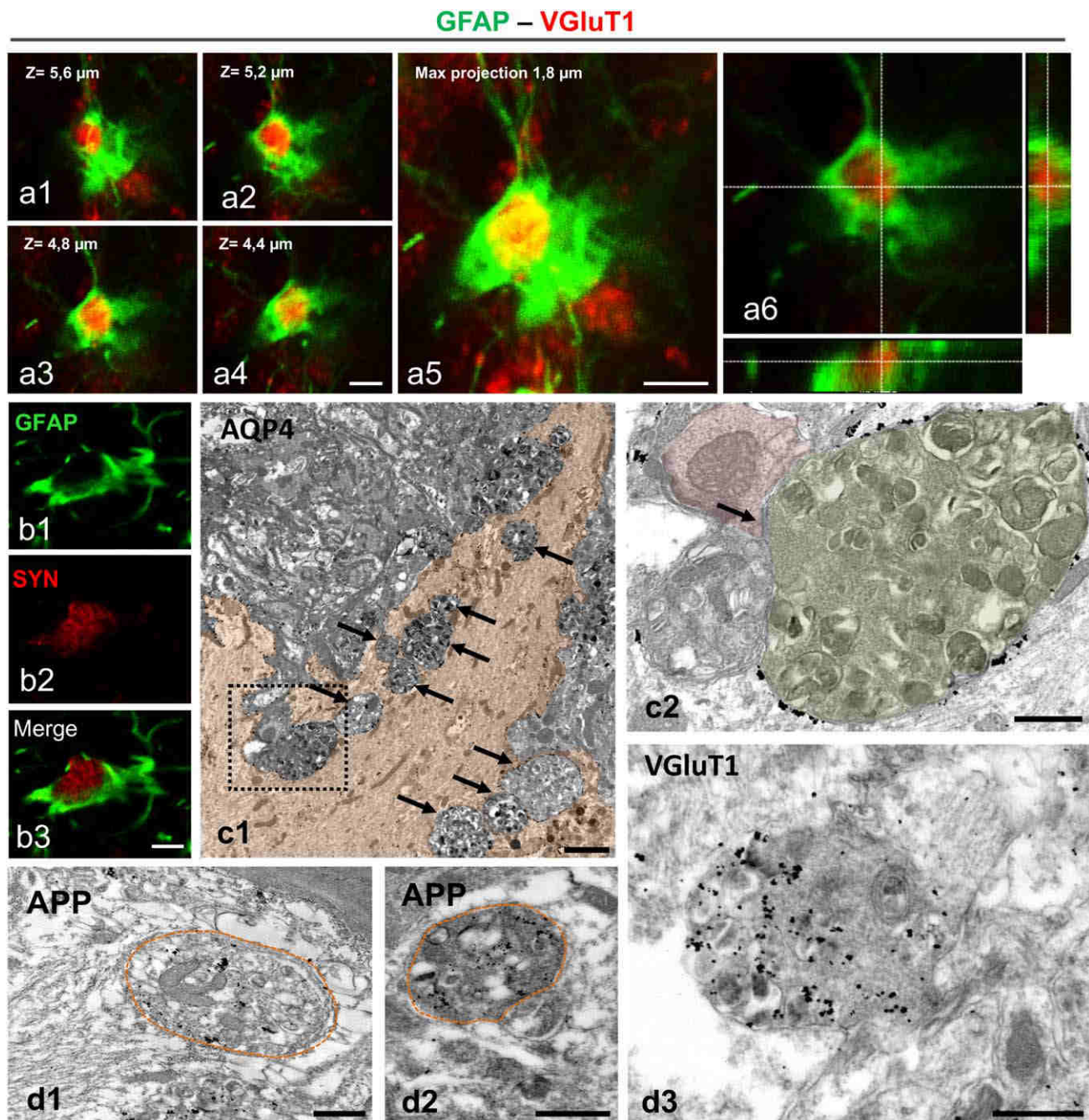
**FIGURE 4** Internalized neuronal dystrophies are enclosed by the plasma membrane of the phagocytic reactive astrocytes. TEM images from AQP4 immunogold-labeled APP/PS1 mouse hippocampus (a–c). The dystrophies located within the astrocyte cytoplasm (orange colored) are completely enclosed by the reactive astrocyte plasma membrane, which is easily recognized by its specific AQP4 labeling. As can be seen in the enlarged detail (a2), the cytoplasm of a phagocytic astrocyte displays many intermediate filaments and few mitochondria closely associated to the engulfed dystrophy. (d1) Likewise, EAAT2 immunogold-labeled membranes were detected around engulfed dystrophies within reactive astrocyte (colored in orange); the image shows an example of three engulfed dystrophies (see details in d2 and d3). Astrocyte-engulfed dystrophies typically contain numerous autophagic vacuoles. N, astrocyte nucleus. Scale bars: a1, b, c, and d1, 2  $\mu\text{m}$ ; a2, d2 and d3, 0.5  $\mu\text{m}$  [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]





**FIGURE 5** Phagocytic reactive astrocytes degrade engulfed neuronal dystrophies in APP/PS1 hippocampus. TEM images from EAAT2 (a) and AQP4 (b, c, and d) immunogold-labeled hippocampal APP/PS1 sections showing dystrophic neurites at different stages of digestion. In some cases, the astrocyte membrane around the engulfed dystrophy seemed interrupted or absent (a1, a2 and b), whereas other dystrophies appeared to be in a more advanced degradation process (c and d). a2, c2, and d2 are enlarged views of a1, c1, and d1, respectively. The reactive astrocyte cytoplasm is orange colored in figures a1, c1, and d1; lysosomes are indicated by black arrows. N, astrocyte nucleus. Scale bars: a1, c1, and d1, 2  $\mu\text{m}$ ; a2, b, c2, and d2, 0.5  $\mu\text{m}$  [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]



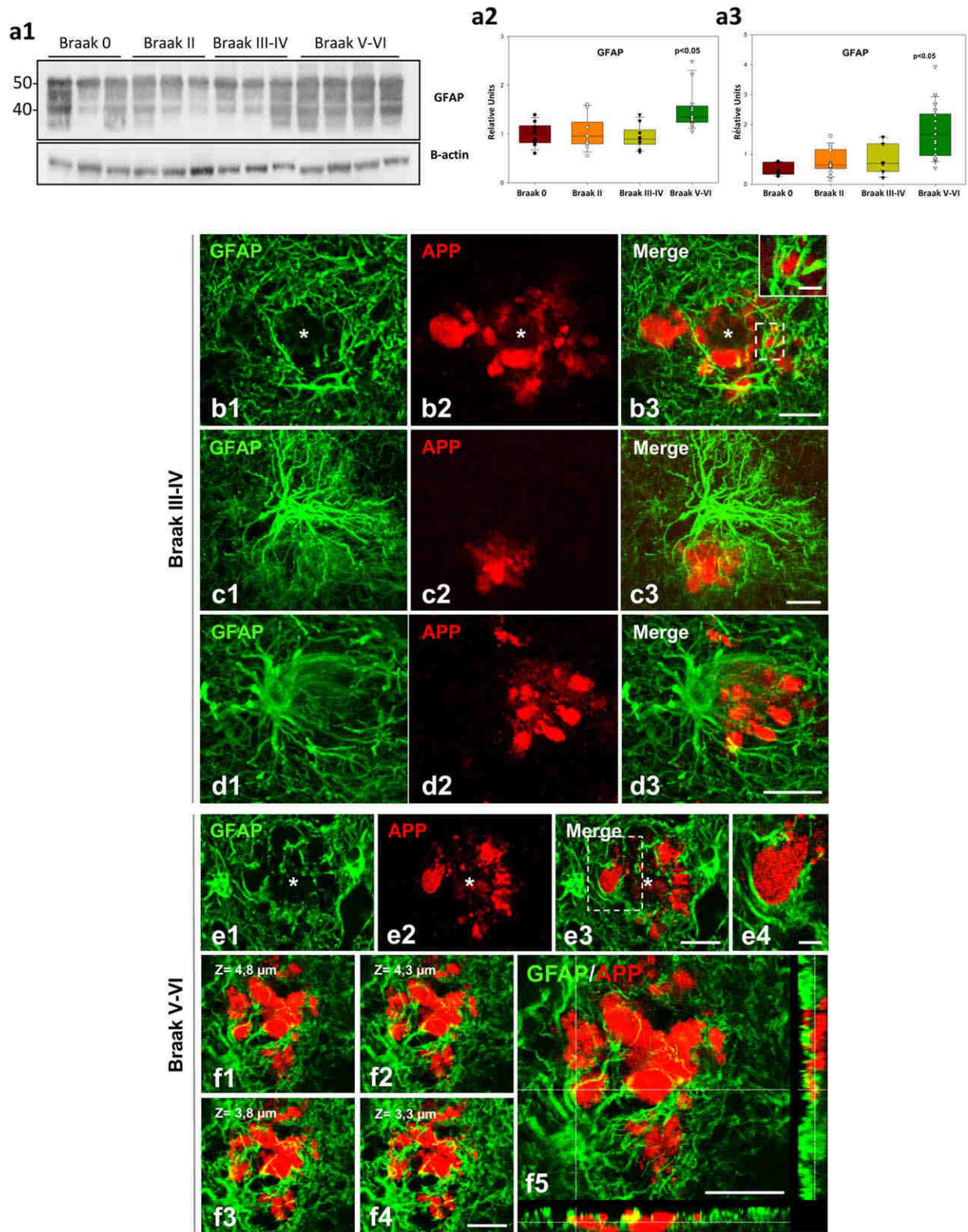


**FIGURE 6** Dystrophies phagocytosed by APP/PS1 reactive astrocytes are of presynaptic nature. Double immunofluorescence labeling for GFAP and VGluT1 (a1–a6) or synaptophysin (b1–b3) confirm that phagocytic reactive astrocytes enwrap presynaptic dystrophies. The orthogonal reconstruction of GFAP/VGluT1 confocal stack images shows that the VGluT1-positive presynaptic dystrophy is completely enclosed by the astrocyte (a6). TEM image showing an AQP4-positive reactive astrocyte (cytoplasm colored in orange, c1) containing several dystrophic neurites (arrows). As shown in c2 (enlarged image of the dashed square in c1), a presynaptic dystrophy (green colored) making a synaptic contact (arrow) on a postsynaptic structure (red colored) is surrounded and in close contact with the astrocyte processes (AQP4-positive). TEM image of immunogold labeled sections shows APP-positive (d1 and d2) or VGluT1-positive (d3) neuronal/synaptic structures inside the phagocytic astrocyte cytoplasm. Scale bars: a1–a5, 2  $\mu\text{m}$ ; b1–b3, 5  $\mu\text{m}$ ; c1, 2  $\mu\text{m}$ ; c2 and d1–d3, 0.5  $\mu\text{m}$  [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

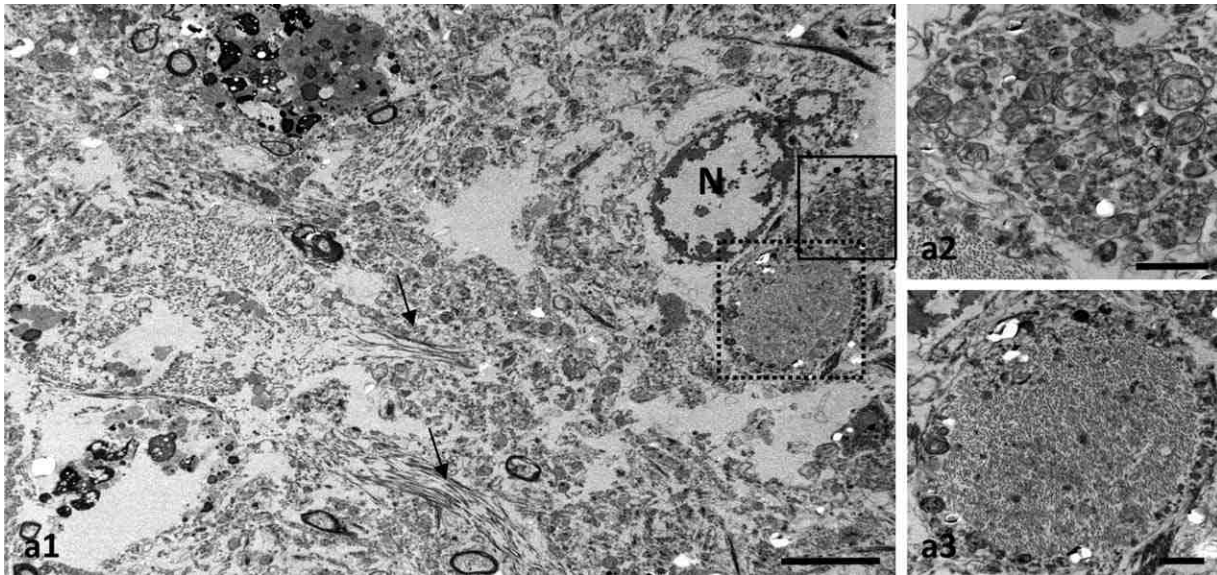
stages of the amyloid pathology in the hippocampus (Braak III–IV). Reactive astrocytes sent their processes toward the dystrophic neurites forming a net entrapping them (Figure 7b–d). Moreover, in Braak V–VI hippocampus the astrocyte processes were also found in contact with APP-positive dystrophies, in occasions covering them widely (Figure

7e1–e4, f1–f5); however, the identification of APP-positive dystrophies inside the astrocyte processes by confocal imaging was difficult. To confirm whether reactive astrocytes in AD Braak V–VI brains phagocytose dystrophic neurites we performed a TEM analysis in *post mortem* human samples. Similar to APP/PS1 mice, we found engulfed





**FIGURE 7** Human reactive astrocytes in Alzheimer's hippocampus envelop the dystrophic neurites that cluster around amyloid plaques. (a1–a3) Marked increase in GFAP protein (a1 and a2) and mRNA (a3) levels in Braak V–VI samples ( $n = 12–18$  for Western blots/qPCR respectively) as compared with controls (Braak 0,  $n = 6$ ) or earlier tau pathology stages (Braak II,  $n = 9–13$  for Western blots/qPCR respectively; Braak III–IV,  $n = 9$ ). The data are shown individually (dots) or as box-plots. Significance (indicated in the figure) was determined by Kruskal–Wallis test followed by Dunn post-hoc test. (b–f) Confocal microscopy images of double GFAP/APP immunofluorescence showing plaque (asterisk)-associated reactive astrocytes making very close contacts or encircling APP-containing dystrophies in the hippocampus of Braak III–IV (b–d) and Braak V–VI (e and f) patients. Single reactive astrocytes are able to cover a cluster of dystrophies (b1–b3 and c1–c3), and the astrocytic processes are directed toward the dystrophies (d3). In Braak V–VI samples, the dystrophic neurites could be seen partially or even broadly covered by astrocytic processes (e1–e4). Serial confocal images (f1–f4) showing a cluster of APP-positive dystrophies intermingled with astrocyte processes. In f5 is shown an orthogonal plane displaying APP-positive dystrophies enwrapped by reactive astrocytes. Scale bars: b1–b3, c1–c3, d1–d3, and f1–f5, 20  $\mu\text{m}$ ; insets in b3, and e4, 5  $\mu\text{m}$  [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]



**FIGURE 8** Human reactive astrocytes in Alzheimer's brains phagocytose dystrophic neurites. TEM of *post mortem* human Braak V–VI tissue showing a reactive astrocyte containing dystrophic neurites (a1). Small bundles of filaments are observed (arrows). Higher magnification views of the squared areas in c showing dystrophic neurites filled with autophagic vesicles (a2) or containing paired-helical filaments (a3). N, astrocyte nucleus. Scale bars: a1, 5  $\mu\text{m}$ ; a2 and a3, 1  $\mu\text{m}$

dystrophies within the reactive-astrocyte cytoplasm (Figure 8a1–a3). The engulfed dystrophic neurites were identified by their high content in autophagy vacuoles, and some even were filled with paired-helical filaments corroborating the neuronal origin of these structures. However, the limitations of human autopsy brain samples for TEM studies precluded us to further perform subcellular quantitative analysis.

#### 4 | DISCUSSION

In this study, we provide evidence with light and electron microscopy that amyloid plaque-associated reactive astrocytes have phagocytic capacity for dystrophic axonal/presynaptic elements in the hippocampus of APP/PS1 mice and in AD brains. Astroglial reactive processes enwrap and internalize axonal/presynaptic dystrophies terminals, which are filled with autophagic vacuoles and surround amyloid plaques. The engulfed neuronal dystrophies are bound for degradation since they were found associated with lysosomal compartments, and partially degraded. To the best of our knowledge, this is the first report of astrocyte-mediated phagocytic clearance of dystrophic neurites from injured neurons in AD. Below we discuss the relevance of this finding in AD pathogenesis.

As expected (Jimenez et al., 2008; Serrano-Pozo, Muzikansky, et al., 2013; Serrano-Pozo, Betensky, Frosch, & Hyman, 2016; Trujillo-Estrada et al., 2013), the hippocampus of both the transgenic APP/PS1 model and Alzheimer's patients (Braak V–VI) displays significant astrogliosis (measured by GFAP expression and by the area covered by the reactive astrocytes; see also Jimenez et al., 2008), which progresses in parallel to the extracellular amyloid pathology. The increase in astrocytic reactivity involves both morphological (enlarged cell body and processes) and molecular changes (Osborn et al., 2016). In this sense, and in addition to the well-established increase in GFAP expression, we found that plaque-associated reactive astrocytes selectively express

BLBP, a typical marker for astrocyte-like neuronal stem cells (Götz & Barde, 2005). This marker has been widely used for studying neuronal progenitors in embryonic and adult brains; however, the expression of BLBP is also a molecular signature for reactive astrocytes in many injury conditions (Robel, Berninger, & Gotz, 2011). We report here for the first time that the extracellular amyloid-triggered astrogliosis in the brain of a transgenic Alzheimer's model can be monitored by the expression of BLBP. Whether amyloid plaque-associated reactive astrocytes gain stem cell potential needs to be determined; however, in the APP/PS1 model the proliferation capacity of this reactive population appears very limited if any (Baglietto-Vargas et al., 2017; Galea et al., 2015; Serrano-Pozo, Gómez-Isla, Growdon, Frosch, & Hyman, 2013).

Microglial cells, the professional phagocytes of the brain, were presumably not involved in the clearance of dystrophic neurites in our transgenic model. However, it has been recently reported in another APP/PS1 model, by EM analysis, that activated (dark) microglia is able to encircle synaptic dystrophic elements (Bisht et al., 2016) which might be indicative of their potential phagocytic capacity to eliminate these structures. Therefore, we cannot completely discard a microglial role in the dystrophic clearance but if exists, it must be very infrequent or, on the contrary, a very rapid and highly dynamic process difficult to detect.

We have found that the amount of reactive astrocytic processes correlates with the number of dystrophic neurites around plaques rather than with plaque size, confirming previously reported findings in Alzheimer's brains (Serrano-Pozo, Muzikansky, et al., 2013). What these morphological analyses indicate is that astrocytes react to damaged neurons, although the functional significance of this response is not known. Our data support the possibility that reactive astrocytes eliminate damaged synapses. The presence of several presynaptic markers at the plaque-associated dystrophies (this work, Sanchez-Varo et al.,





2012, Trujillo-Estrada et al., 2014) strongly suggests the presynaptic nature of these pathological structures. Similar findings have been also reported in another APP/PS1 model (Sadleir et al., 2016). However, we cannot rule out the possibility that some of these dystrophies are in fact axonal portions.

Furthermore, our finding of reactive astrocytes actively enveloping, internalizing and further degrading presynaptic dystrophies in the APP/PS1 mouse brain is an extension of the capacity of astrocytes to phagocytose synapses as a normal process that mediates the refinement of neural circuits in the developing (Chung, Allen, & Eroglu, 2015) and in the adult CNS (Chung et al., 2013), thus suggesting a major role of astrocytes in synaptic pruning in health and disease. Supporting a phagocytic role for reactive astrocytes in AD, it has been suggested that they could mediate A $\beta$  clearance (Osborn et al., 2016) and limit amyloid deposits (Xiao et al., 2014) since these glial cells express many potential phagocytic receptors that bind A $\beta$  (Jones, Minogue, Connor, & Lynch, 2013; Sokolowski & Mandell, 2011). Moreover, astrocytes in culture are highly phagocytic cells (Roldán, Gogg, Ferrini, Schillaci, & De Nicola, 1997; Tansey & Cammer, 1998), and can phagocytose A $\beta$  (Wyss-Coray et al., 2003) and apoptotic cells (Chang, Barbaro, & Pieper, 2000) and effectively engulf whole dead cells following neural scratch injury *in vitro* (Lööv, Hillered, Ebendal, & Erlandsson, 2012). Recently, astrocyte phagocytosis of myelin debris has been observed in response to tissue damage (Ponath et al., 2017). Additionally, it has been shown that reactive astrocytes become phagocytic and engulf neuronal cell debris after transient brain ischemia (Morizawa et al., 2017). Moreover, astrocytes degrade mitochondria (transmitophagy) from healthy retinal ganglion cell axons (Davis et al., 2014). Therefore, transcellular degradation of neuronal dystrophies by astrocytes might directly support neuron survival or, alternatively, it might reduce the A $\beta$  release from dystrophic presynaptic elements. In this sense, presynaptic dystrophies are sites of APP accumulation and putative A $\beta$  release (Sanchez-Varo et al., 2012; Torres et al., 2012) and, as recent studies indicate, the accumulation of BACE1 in presynaptic dystrophies surrounding plaques causes increased cleavage of APP and A $\beta$  generation, which could lead to an exacerbation of amyloid pathology in AD (Sadleir et al., 2016; Torres et al., 2012). Alternatively, insulating dystrophies from the normal tissue might also decrease the probability of possible adverse inflammatory effects. Therefore, the phagocytosis of presynaptic/axonal dystrophies may be a protective function of astrocytes controlling the A $\beta$  production and/or preventing the inflammatory response. However, we cannot discard that healthy synapses, not observed by our EM analysis, were also eliminated by reactive astrocytes contributing then to synaptic loss and cognitive decline. Anyway, further studies are needed for better understanding of the physiological consequences (beneficial or detrimental) of the reactive astrocyte phagocytosis.

Considering recent gene profiling of astrocytes, is it plausible that phagocytic astrocytes are a subtype of the astrocyte population in the brain. The functional and molecular diversity of astrocytes in normal, and especially in diseased brains, remains challenging (Haim & Rowitch, 2017). The extensive array of astrocyte functions supports the existence of different astroglial populations, and, recently, five distinct subpopulations based on molecular profiles have been identified in the adult

mouse brain (John Lin et al., 2017). Noteworthy, one of the populations (type C) is highly enriched for genes associated with synaptic activity, and two subpopulations (types B and C) for genes associated with phagocytic capacity. The contribution of the different astrocyte subsets to pathological conditions, and especially to AD, is not known. In fact, that loss-of-function of astrocytes may contribute to diseases in a disease-specific manner and, that therapies should promote their functional recovery are emerging ideas (Khakh et al., 2017; Masgrau et al., 2017).

In line with this idea, we found that the phagocytic activity of reactive astrocytes in APP/PS1 mice did not significantly increase with disease progression. Although the proportion of plaques displaying astrocytic processes containing engulfed dystrophies was greater at 12 months of age (68%) than at 6 months (35%), the number of engulfed dystrophies was relatively low at both ages (around 7% of the total dystrophies that surround plaques). Considering that the amount of plaques and dystrophies significantly increases with age, in parallel with the astrocytic activation, it would be expected that astrocyte-mediated dystrophy engulfment will increase consequently. Phagocytic activity is a dynamic process, then the proportion of engulfed dystrophies could in fact be low at one time, however the persistence of abundant dystrophic neurites around plaques in older animals highlights the poor efficiency of the astrocyte phagocytosis. Therefore, our data indicate that the phagocytic capacity of reactive astrocytes could be in fact limited, and even impaired, during disease-course. In contrast, we do not know how efficiently the astrocyte degradation process of these engulfed dystrophies is. In this regard, our TEM studies revealed that the presence of partially degraded material within astrocytes is a less frequent event than the presence of intact dystrophic neurites (surrounded by the astrocyte plasma membrane). It is possible that astrocytes have a low rate of digestion as compared to other typical phagocytes such as microglial cells. In this sense, poor degradation of engulfed dead cells in astrocytes has been reported previously (Lööv et al., 2012). These authors indicate that the slow digestion of the engulfed material in astrocytes is due, at least in part, to the actin-rings that surround the phagosomes for long periods of time, which physically inhibit the phagolysosome fusion (Lööv, Mitchell, Simonsson, & Erlandsson, 2015). We observed in the APP/PS1 hippocampus numerous instances in which the ingested dystrophies within astrocytes appeared surrounded by intermediate filaments that could cause impairment of lysosome fusion.

Our ultrastructural data in human Braak V–VI samples clearly show that the hippocampal reactive astrocytes exhibit cytoplasmic neurite-like inclusions containing autophagic vesicles and even paired helical filaments. Therefore, the phagocytosis of dystrophies appears to occur in AD patients as seen in APP/PS1 mice. Supporting a reduced phagocytic capacity of astrocytes in AD brains, a recent study suggests that the susceptibility of APOE4, the strongest genetic risk factor for AD, may arise in part from the defective phagocytic ability of astrocytes (Chung et al., 2016). Therefore, altogether our data support the idea of dysfunctional astroglial cells in the context of AD. In this sense, we have recently reported that microglial cells in the hippocampus of AD brains display a degenerative phenotype (Sanchez-Mejias et al., 2016).





Therefore, the functional impairment of glial cells in AD as a potential driver of disease progression deserves particular consideration.

In summary, our study demonstrates the existence of phagocytic reactive astrocytes which eliminate/isolate presynaptic dystrophies in AD. This phagocytic capacity of astrocytes might result impaired during disease progression. Therefore, exploring how to increase/restore the phagocytic properties of astrocytes could be a novel therapeutic avenue to treat AD.

## ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by La Marató-TV3 Foundation grants 20141432 (to A. G.), 20141431 (to J. V.), 20141433 (to J. X. C.) and 20141430 (to E. G.); by Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) of Spain-co-financed by FEDER funds from European Union, through grants PI15/00796 (to A. G.) and PI15/00957 (to J. V.); by CIBERNED PI2015-2/02 (to A. G., J. V., and J. X. C.); and by Junta de Andalucía, Proyecto de Excelencia (CTS-2035) (to J. V. and A. G.). We thank to Rocio Romero Pareja from FESEM-FIB Unit (Bioinnovation Building, University of Malaga, Spain) and Mercedes Aneiros Ferrer for their expert technical assistance.

## REFERENCES

- Baglietto-Vargas, D., Moreno-Gonzalez, I., Sanchez-Varo, R., Jimenez, S., Trujillo-Estrada, L., Sanchez-Mejias, E., ... Gutierrez, A. (2010). Calretinin interneurons are early targets of extracellular amyloid- $\beta$  pathology in PS1/A $\beta$ PP Alzheimer mice hippocampus. *Journal of Alzheimer's Disease*, 21(1), 119–132.
- Baglietto-Vargas, D., Sánchez-Mejias, E., Navarro, V., Jimenez, S., Trujillo-Estrada, L., Gómez-Arboledas, A., ... Gutierrez, A. (2017). Dual roles of A $\beta$  in proliferative processes in an amyloidogenic model of Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, 7(1), 10085. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10353-7>
- Bisht, K., Sharma, K. P., Lecours, C., Sanchez, M. G., El Hajj, H., Milior, G., ... Tremblay, M.-E. (2016). Dark microglia: a new phenotype predominantly associated with pathological states. *GLIA*, 64, 826–839.
- Blanchard, V., Moussaoui, S., Czech, C., Touchet, N., Bonici, B., Planche, M., ... Pradier, L. (2003). Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with A $\beta$  deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Experimental Neurology*, 184(1), 247–263.
- Cahoy, J. D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L. C., Zamanian, J. L., Christopherson, K. S., ... Barres, B. A. (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: A new resource for understanding brain development and function. *Journal of Neuroscience*, 28(1), 264–278.
- Chang, G. H., Barbaro, N. M., & Pieper, R. O. (2000). Phosphatidylserine-dependent phagocytosis of apoptotic glioma cells by normal human microglia, astrocytes, and glioma cells. *Neuro-Oncology*, 2(3), 174–183.
- Chung, W.-S., Clarke, L. E., Wang, G. X., Stafford, B. K., Sher, A., Chakraborty, C., ... Barres, B. A. (2013). Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature*, 504(7480), 394–400.
- Chung, W.-S., Verghese, P. B., Chakraborty, C., Jung, J., Hyman, B. T., Ulrich, J. D., ... Barres, B. A. (2016). Novel allele-dependent role for APOE in controlling the rate of synapse pruning by astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(36), 10186–10191.
- Chung, W. S., Allen, N. J., & Eroglu, C. (2015). Astrocytes control synapse formation, function, and elimination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(9), a020370. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020370>
- Davis, C.-H. O., Kim, K.-Y., Bushong, E. A., Mills, E. A., Boassa, D., Shih, T., ... Marsh-Armstrong, N. (2014). Transcellular degradation of axonal mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(26), 9633–9638.
- De Strooper, B., & Karran, E. (2016). The cellular phase of Alzheimer's disease. *Cell*, 164(4), 603–615.
- Galea, E., Morrison, W., Hudry, E., Arbel-Ornath, M., Bacskai, B. J., Gómez-Isla, T., ... Hyman, B. T. (2015). Topological analyses in APP/PS1 mice reveal that astrocytes do not migrate to amyloid- $\beta$  plaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, 15556–15561.
- Götz, M., & Barde, Y.-A. (2005). Radial glial cells. *Neuron*, 46(3), 369–372.
- Gotz, M., Sirko, S., Beckers, J., & Imler, M. (2015). Reactive astrocytes as neural stem or progenitor cells: In vivo lineage, in vitro potential, and Genome-wide expression analysis. *GLIA*, 63(8), 1452–1468.
- Haim, L. B., & Rowitch, D. (2017). Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(1), 31–41.
- Heneka, M. T., Carson, M. J., Khoury, J. E., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., ... Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, 14(4), 388–405.
- Heppner, F. L., Ransohoff, R. M., & Becher, B. (2015). Immune attack: The role of inflammation in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(6), 358–372.
- Jimenez, S., Baglietto-Vargas, D., Caballero, C., Moreno-Gonzalez, I., Torres, M., Sanchez-Varo, R., ... 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. *Journal of Neuroscience*, 28(45), 11650–11661.
- John Lin, C.-C., Yu, K., Hatcher, A., Huang, T.-W., Lee, H. K., Carlson, J., ... Deneen, B. (2017). Identification of diverse astrocyte populations and their malignant analogs. *Nature Neuroscience*, 20, 396–405.
- Jones, R. S., Minogue, A. M., Connor, T. J., & Lynch, M. A. (2013). Amyloid- $\beta$ -induced astrocytic phagocytosis is mediated by CD36, CD47 and RAGE. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 8(1), 301–311.
- Khakh, B. S., Beaumont, V., Cachope, R., Munoz-Sanjuan, I., Goldman, S. A., & Grantyn, R. (2017). Unravelling and exploiting astrocyte dysfunction in Huntington's disease. *Trends in Neurosciences*, 40(7), 1–16.
- Kraft, A. W., Hu, X., Yoon, H., Yan, P., Xiao, Q., Wang, Y., ... Lee, J. M. (2013). Attenuating astrocyte activation accelerates plaque pathogenesis in APP/PS1 mice. *FASEB Journal*, 27(1), 187–198.
- Lööv, C., Hillered, L., Ebendal, T., & Erlandsson, A. (2012). Engulfing astrocytes protect neurons from contact-induced apoptosis following injury. *PLoS ONE*, 7(3), e33090. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033090>
- Lööv, C., Mitchell, C. H., Simonsson, M., & Erlandsson, A. (2015). Slow degradation in phagocytic astrocytes can be enhanced by lysosomal acidification. *GLIA*, 63(11), 1997–2009.
- Masgrau, R., Guaza, C., Ransohoff, R. M., & Galea, E. (2017). Should we stop saying “glia” and “neuroinflammation”? *Trends in Molecular Medicine*, 23(6), 486–500.
- Morizawa, Y. M., Hirayama, Y., Ohno, N., Shibata, S., Shigetomi, E., Sui, Y., ... Koizumi, S. (2017). Reactive astrocytes function as phagocytes after brain ischemia via ABCA1-mediated pathway. *Nature Communications*, 8(1), 28. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00037-1>





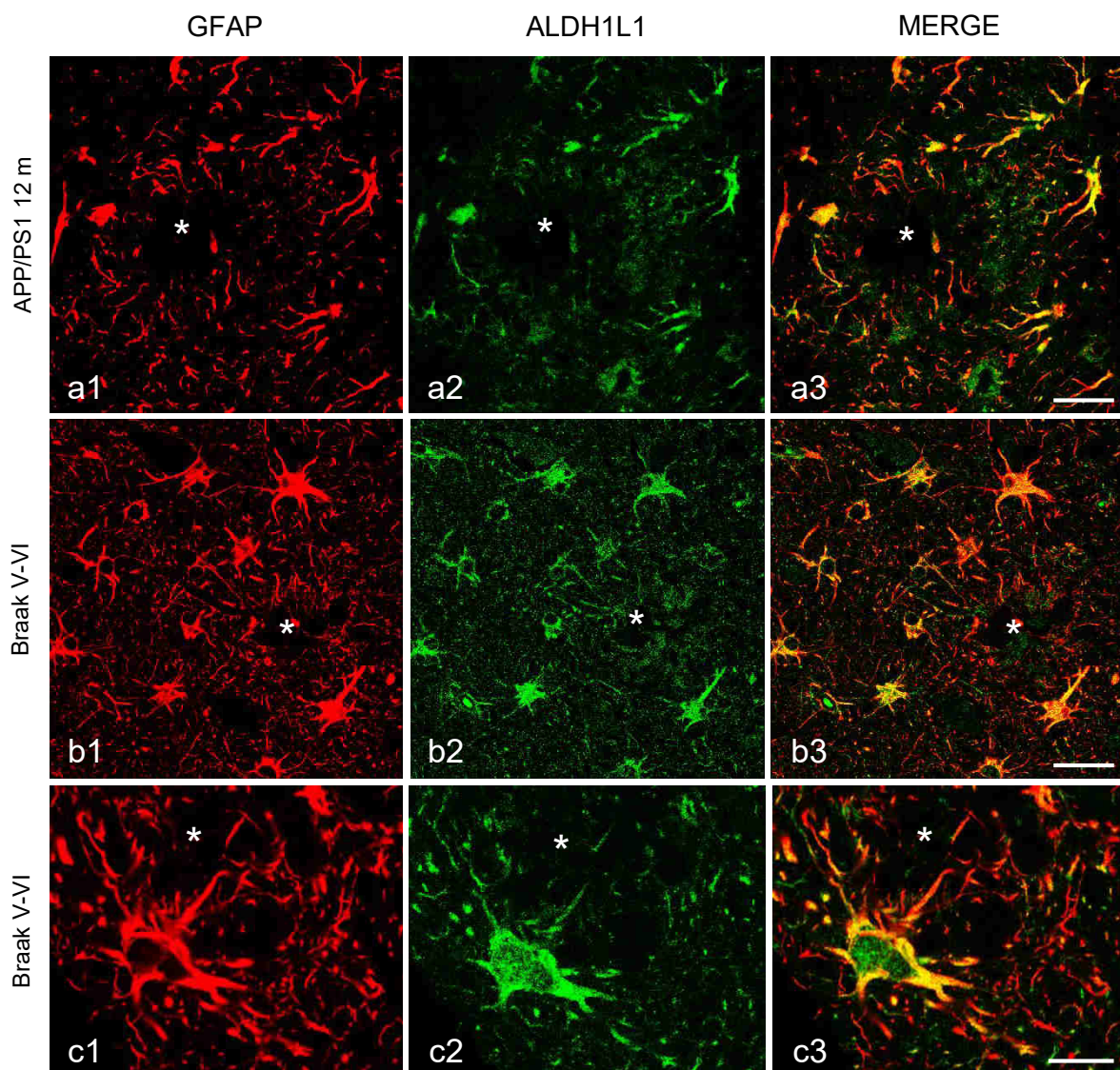
- Osborn, L. M., Kamphuis, W., Wadman, W. J., & Hol, E. M. (2016). Astroglia: An integral player in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*, 144, 121–141.
- Ponath, G., Ramanan, S., Mubarak, M., Housley, W., Lee, S., Sahinkaya, F. R., ... Pitt, D. (2017). Myelin phagocytosis by astrocytes after myelin damage promotes lesion pathology. *Brain*, 140(2), 399–413.
- Ramos, B., Baglietto-Vargas, D., Rio, J. C. D., Moreno-Gonzalez, I., Santa-Maria, C., Jimenez, S., ... Vitorica, J. (2006). Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1/APP transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 27(11), 1658–1672.
- Robel, S., Berninger, B., & Gotz, M. (2011). The stem cell potential of glia: Lessons from reactive gliosis. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(2), 88–104.
- Roldán, A., Gogg, S., Ferrini, M., Schillaci, R., & De Nicola, A. F. (1997). Glucocorticoid regulation of in vitro astrocyte phagocytosis. *Biocell*, 21(1), 83–89.
- Sadleir, K. R., Kandalepas, P. C., Buggia-Prévot, V., Nicholson, D. A., Thirakaran, G., & Vassar, R. (2016). Presynaptic dystrophic neurites surrounding amyloid plaques are sites of microtubule disruption, BACE1 elevation, and increased A $\beta$  generation in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 132(2), 1–22.
- Sanchez-Mejias, E., Navarro, V., Jimenez, S., Sanchez-Mico, M., Sanchez-Varo, R., Nuñez-Díaz, C., ... Vitorica, J. (2016). Soluble phospho-tau from Alzheimer's disease hippocampus drives microglial degeneration. *Acta Neuropathologica*, 132(6), 897–916.
- Sanchez-Varo, R., Trujillo-Estrada, L., Sanchez-Mejias, E., Torres, M., Baglietto-Vargas, D., Moreno-Gonzalez, I., ... Gutierrez, A. (2012). Abnormal accumulation of autophagic vesicles correlates with axonal and synaptic pathology in young Alzheimer's mice hippocampus. *Acta Neuropathologica*, 123(1), 53–70.
- Serrano-Pozo, A., Betensky, R. A., Frosch, M. P., & Hyman, B. T. (2016). Plaque-associated local toxicity increases over the clinical course of Alzheimer disease. *American Journal of Pathology*, 186(2), 375–384.
- Serrano-Pozo, A., Gómez-Isla, T., Growdon, J. H., Frosch, M. P., & Hyman, B. T. (2013). A phenotypic change but not proliferation underlies glial responses in Alzheimer disease. *American Journal of Pathology*, 182(6), 2332–2344.
- Serrano-Pozo, A., Muzikansky, A., Gómez-Isla, T., Growdon, J. H., Betensky, R. A., Frosch, M. P., & Hyman, B. T. (2013). Differential relationships of reactive astrocytes and microglia to fibrillar amyloid deposits in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 72(6), 462–471.
- Sokolowski, J. D., & Mandell, J. W. (2011). Phagocytic clearance in neurodegeneration. *American Journal of Pathology*, 178(4), 1416–1428.
- Tansey, F. A., & Cammer, W. (1998). Differential uptake of dextran beads by astrocytes, macrophages and oligodendrocytes in mixed glial-cell cultures from brains of neonatal rats. *Neuroscience Letters*, 248(3), 159–162.
- Torres, M., Jimenez, S., Sanchez-Varo, R., Navarro, V., Trujillo-Estrada, L., Sanchez-Mejias, E., ... Vitorica, J. (2012). Defective lysosomal proteolysis and axonal transport are early pathogenic events that worsen with age leading to increased APP metabolism and synaptic Abeta in transgenic APP/PS1 hippocampus. *Molecular Neurodegeneration*, 7(1), 59. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-7-59>
- Trujillo-Estrada, L., Dávila, J. C., Sánchez-Mejias, E., Sánchez-Varo, R., Gomez-Arboledas, A., Vizúete, M., ... Gutiérrez, A. (2014). Early neuronal loss and axonal/presynaptic damage is associated with accelerated amyloid- $\beta$  accumulation in A $\beta$ PP/PS1 Alzheimer's disease mice subiculum. *Journal of Alzheimer's Disease*, 42(2), 521–541.
- Trujillo-Estrada, L., Jimenez, S., De Castro, V., Torres, M., Baglietto-Vargas, D., Moreno-Gonzalez, I., ... Vitorica, J. (2013). In vivo modification of Abeta plaque toxicity as a novel neuroprotective lithium-mediated therapy for Alzheimer's disease pathology. *Acta Neuropathologica Communications*, 1(1), 73. <https://doi.org/10.1186/2051-5960-1-73>
- Verkhatsky, A., Parpura, V., Pekna, M., Pekny, M., & Sofroniew, M. (2014). Glia in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Biochemical Society Transactions*, 42(5), 1291–1301.
- Verkhatsky, A., Zorec, R., Rodriguez, J. J., & Parpura, V. (2016). Astroglia dynamics in ageing and Alzheimer's disease. *Current Opinion in Pharmacology*, 26, 74–79.
- Wyss-Coray, T., Loike, J. D., Brionne, T. C., Lu, E., Anankov, R., Yan, F., ... Husemann, J. (2003). Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nature Medicine*, 9(4), 453–457.
- Xiao, Q., Yan, P., Ma, X., Liu, H., Perez, R., Zhu, A., ... Lee, J.-M. (2014). Enhancing astrocytic lysosome biogenesis facilitates A $\beta$  clearance and attenuates amyloid plaque pathogenesis. *Journal of Neuroscience*, 34(29), 9607–9620.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

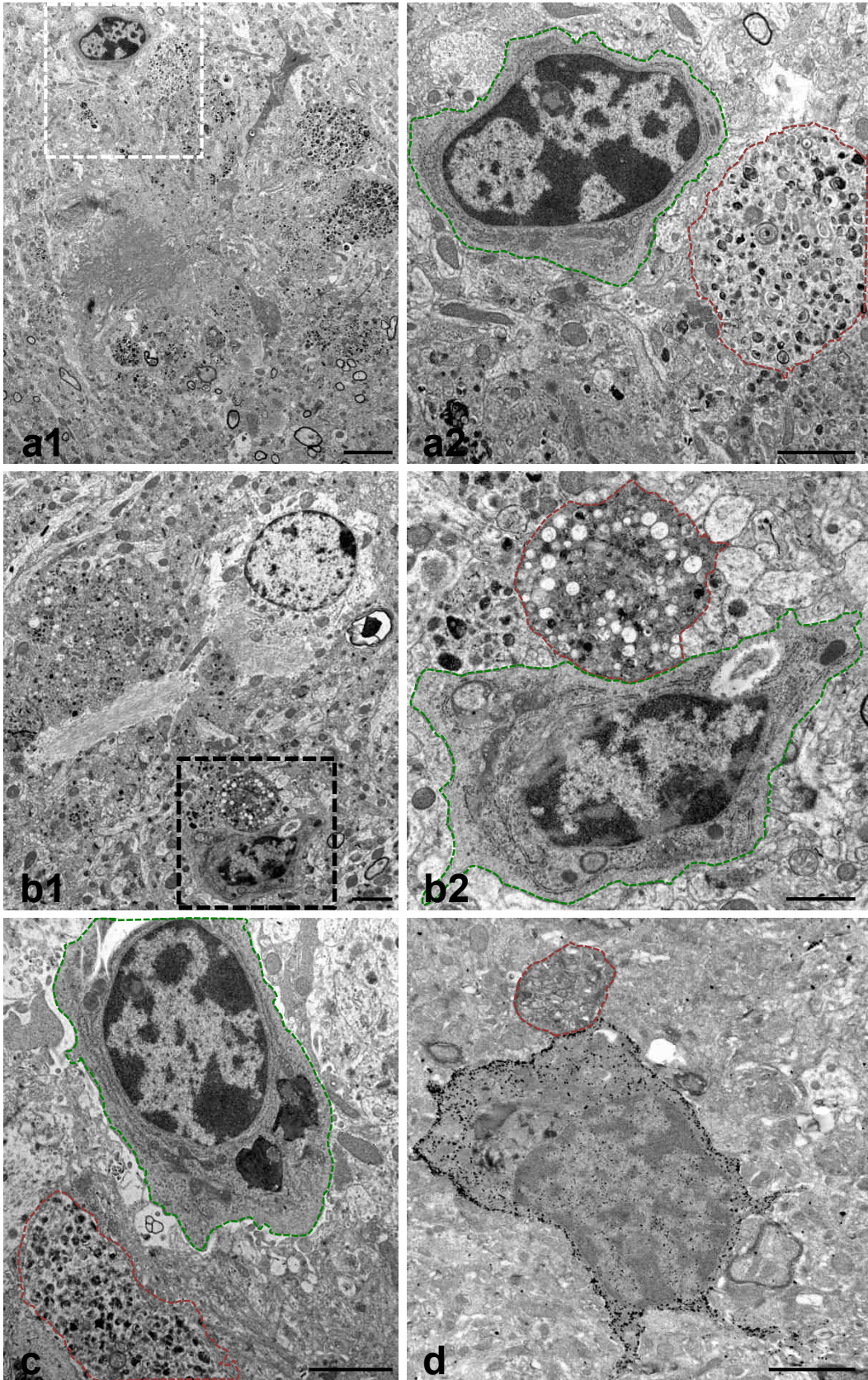
**How to cite this article:** Gomez-Arboledas A, Davila C, Sanchez-Mejias E, et al. Phagocytic clearance of presynaptic dystrophies by reactive astrocytes in Alzheimer's disease. *Glia*. 2017;00:1–17. <https://doi.org/10.1002/glia.23270>





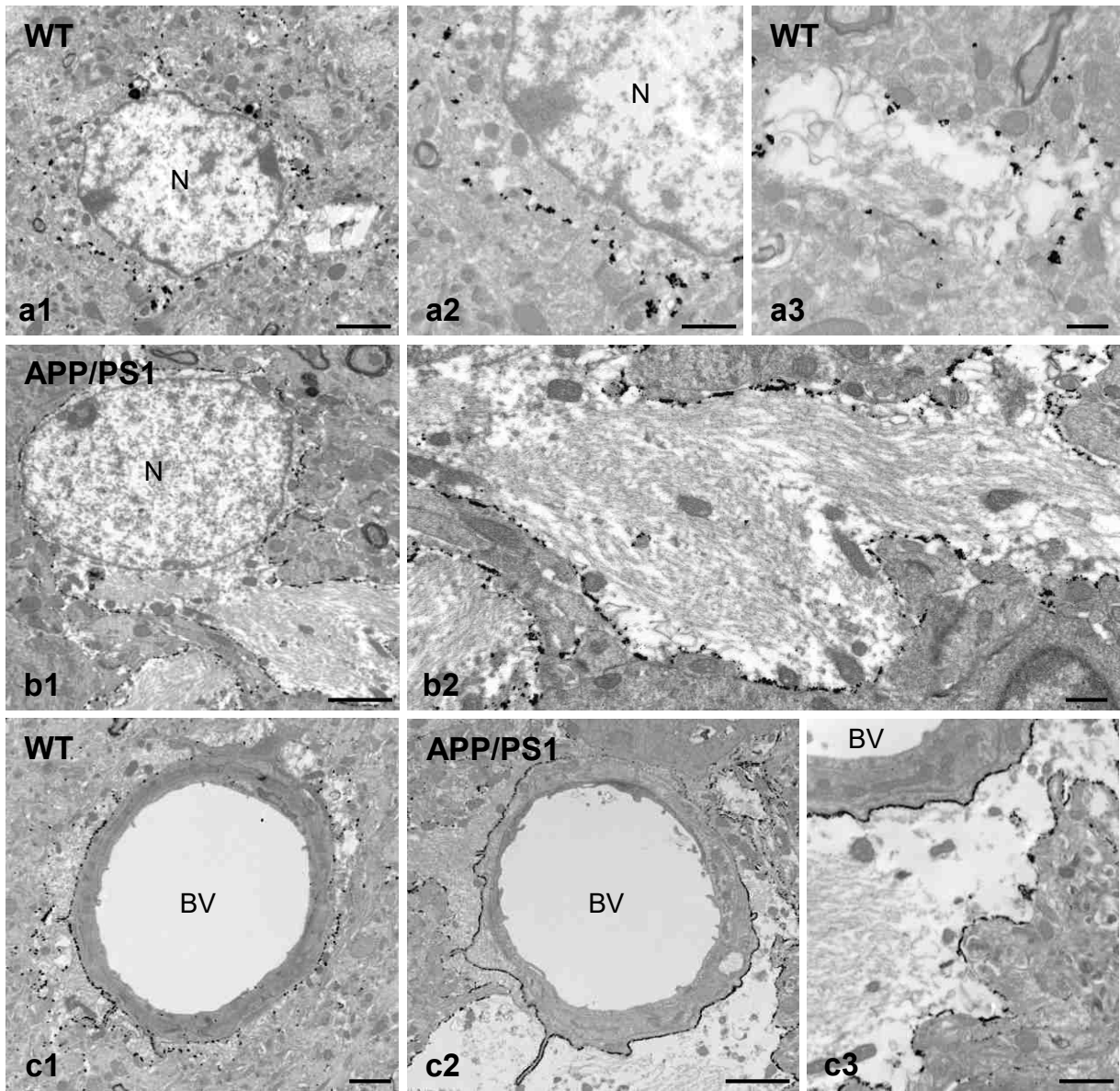
SUPPLEMENTAL FIGURE 1





SUPPLEMENTAL FIGURE 2





SUPPLEMENTAL FIGURE 3

**Supplemental Figure 1. Reactive astrocyte express GFAP and ALDH1L1.** Double confocal GFAP/ALDH1L1 immunofluorescence labeling in APP/PS1 (a1-a3) and post mortem human Braak V-VI (b1-b3 and c1-c3) hippocampus showing reactive astrocytes around amyloid plaques (asterisks). All reactive astrocytes are double labeled (see merge images), however GFAP strongly labels most astrocyte processes including the primary thicker portions. Scale bars, a1-a3 and b1-b3, 30  $\mu\text{m}$ ; c1-c3, 15  $\mu\text{m}$ .

**Supplemental Figure 2. Lack of ultrastructural evidence of dystrophic neurites engulfment by microglial cells.** Representative electron photomicrographs of APP/PS1 hippocampus showing microglial cells near dystrophic neurites without evidence of engulfment of these pathological structures. a1, Amyloid plaque (core indicated by an asterisk) surrounded by dystrophic neurites (some of them are encircled) and microglial cells (arrows). a2, Higher magnification of the squared area in image a1 showing a microglial cell (orange coloured) without a phagocytic appearance and close to a dystrophic neurite (green coloured). b1 and the enlarged image in b2, is another example of a microglial cell in close contact with dystrophic neurites clearly no internalized; see in b1 a reactive astrocyte (nucleus indicated with N) and a dystrophic neurite (indicated with blue arrow) inside the cytoplasm. c, microglial cell (orange coloured) containing phagocytic bodies that do not resemble dystrophies as the one shown in green colour. d, Iba1-immunogold labelled microglia contacting a dystrophic neurite (green coloured). Please note that though microglial cells are in close contact with dystrophic neurites they do not enwrap them. Scale bars, a1, 5  $\mu\text{m}$ ; a2, b1, c1 and d, 2  $\mu\text{m}$ ; b2, 1  $\mu\text{m}$ .

**Supplemental Figure 3. AQP4 expression is upregulated in reactive astrocytes in APP/PS1 hippocampus.** Electron photomicrographs from AQP4 immunogold-labeled

sections showing the subcellular distribution of aquaporin channels in WT and APP/PS1 astrocytes. The cell bodies (a1 and a2) and processes (a3) of WT astrocytes display few membrane-associated AQP4 channels, being most the AQP4 labelling at the astrocyte end-feet membrane facing blood vessels (c1). In contrast, APP/PS1 reactive astrocytes display a high density of AQP4 channels which are widespread distributed throughout the cell membrane of both cell body and processes (b1 and b2). Also, AQP4 channels are densely clustered at the end-foot membrane of APP/PS1 reactive astrocytes (c2-3). BV, blood vessels; N, astrocyte nucleus. Scale bars: a1, b1 and c1-2, 2  $\mu\text{m}$ ; a2 and c3, 1  $\mu\text{m}$ ; a3 and b2, 0.5  $\mu\text{m}$ .



## **ANEXO 2**

**Baglietto-Vargas D, Sanchez-Mejias E, Navarro V, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Gomez-Arboledas A, Sanchez-Mico MV, Sanchez-Varo R, Vizuite M, Davila JC, Garcia-Verdugo JM, Vitorica J and Gutierrez A. (2017). Dual roles of A $\beta$  in proliferative processes in an amyloidogenic model of Alzheimer's disease. *Scientific Reports.*, 7(1): 10085. DOI: 10.1038/s41598-017-10353-7**



# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## Dual roles of A $\beta$ in proliferative processes in an amyloidogenic model of Alzheimer's disease

David Baglietto-Vargas<sup>1,4,6</sup>, Elisabeth Sánchez-Mejías<sup>1,4</sup>, Victoria Navarro<sup>2,4,5</sup>, Sebastián Jimenez<sup>2,4,5</sup>, Laura Trujillo-Estrada<sup>1,4,6</sup>, Angela Gómez-Arboledas<sup>1,4</sup>, Maria Sánchez-Mico<sup>2,4,5</sup>, Raquel Sánchez-Varo<sup>1,4</sup>, Marisa Vizuete<sup>2,4,5</sup>, José Carlos Dávila<sup>1,4</sup>, José Manuel García-Verdugo<sup>3,4</sup>, Javier Vitorica<sup>2,4,5</sup> & Antonia Gutierrez<sup>1,4</sup>

Alzheimer's disease is a major neurodegenerative disorder that leads to severe cognitive deficits in the elderly population. Over the past two decades, multiple studies have focused on elucidating the causative factors underlying memory defects in Alzheimer's patients. In this regard, new evidence linking Alzheimer's disease-related pathology and neuronal stem cells suggests that hippocampal neurogenesis impairment is an important factor underlying these cognitive deficits. However, because of conflicting results, the impact of A $\beta$  pathology on neurogenesis/gliogenesis remains unclear. Here, we investigated the effect of A $\beta$  on neuronal and glial proliferation by using an APP/PS1 transgenic model and *in vitro* assays. Specifically, we showed that neurogenesis is affected early in the APP/PS1 hippocampus, as evidenced by a significant decrease in the proliferative activity due to a reduced number of both radial glia-like neural stem cells (type-1 cells) and intermediate progenitor cells (type-2 cells). Moreover, we demonstrated that soluble A $\beta$  from APP/PS1 mice impairs neuronal cell proliferation using neurosphere cultures. On the other hand, we showed that oligomeric A $\beta$  stimulates microglial proliferation, whereas no effect was observed on astrocytes. These findings indicate that A $\beta$  has a differential effect on hippocampal proliferative cells by inhibiting neuronal proliferation and triggering the formation of microglial cells.

Alzheimer's disease (AD) currently represents one of the most prevalent neurodegenerative disorders affecting the elderly population<sup>1</sup>. AD is an irreversible and progressive disease that leads to a gradual loss of memory and other cognitive functions<sup>1,2</sup>. Despite the intensive research over the past three decades, the mechanisms underlying cognitive and memory deficits in AD are elusive. Recent evidence indicated that hippocampal neurogenesis plays a key role in learning and memory processes, and numerous findings support the concept that neurogenesis impairment may be associated with the cognitive decline observed in AD patients<sup>3–11</sup>. In addition, several studies have shown that neurogenesis in the subgranular zone (SGZ) plays an important role with respect to hippocampal spatial and contextual memories, demonstrating an important link between adult neurogenesis and cognitive processes<sup>9,11</sup>. Furthermore, supporting this idea, several compelling studies have shown that the inhibition of adult hippocampal neurogenesis impairs memory processing, while its enhancement improves memory performance<sup>12–15</sup>.

Studies involving human *post mortem* AD cases have shown contradictory results. While some reports indicated that AD is associated with a marked increase in the proliferation and survival of new neurons<sup>16,17</sup>, others have shown a significant reduction in the immature neuron population at severe stages of the disease<sup>18–20</sup>. Interestingly, it has been reported that proliferative cells in AD brains were mainly derived from glia- and

<sup>1</sup>Dpto. Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Instituto de Biomedicina de Málaga (IBIMA), Universidad de Málaga, Málaga, Spain. <sup>2</sup>Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain. <sup>3</sup>Laboratorio de Neurobiología Comparada, Dpto. Biología Celular. Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Universidad de Valencia, Valencia, Spain. <sup>4</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain. <sup>5</sup>Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS)-Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Seville, Spain. <sup>6</sup>Institute for Memory Impairments and Neurological Disorders (UCIMIND), University of California, Irvine, USA. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.V. (email: [vitorica@us.es](mailto:vitorica@us.es)) or A.G. (email: [agutierrez@uma.es](mailto:agutierrez@uma.es))

vasculature-associated changes, suggesting that the proliferating cells do not become mature neurons<sup>18,19,21,22</sup>. Overall, these data suggest that adult hippocampal neurogenesis is differentially affected during the progression of the disease and that different cellular proliferative phases may occur.

To understand the impact of AD on neurogenesis/gliogenesis, multiple studies have been performed using several AD animal models. Overall, there is a consensus indicating that hippocampal neurogenesis is altered in amyloidogenic mouse models of AD<sup>23–26</sup>; however, the contradictory results observed in human cases have also been reported in these models. These conflicting results observed in AD models have been proposed to depend on mouse genetic background, gender, mutation and disease progression features<sup>17,26–30</sup>. Here, we provide critical evidence for the impact of A $\beta$  on hippocampal neuron/glia proliferation in different cell types using an APP/PS1 mouse model of AD. Our study showed that neurogenesis is impaired early on due to the remarkable diminution of SGZ progenitor cells (including type-1 and type-2 progenitors), which could be due to the accumulation of extracellular A $\beta$ . Additionally, we showed that soluble A $\beta$  inhibits the proliferation and growth of hippocampal neurospheres, therefore affecting the formation of new neurons. On the other hand, our study showed that A $\beta$  stimulates microglial proliferation *in vivo* and *in vitro*. Moreover, no differences were observed in astroglial cells. Therefore, our study suggests a differential effect of A $\beta$  on neurons and glial cells.

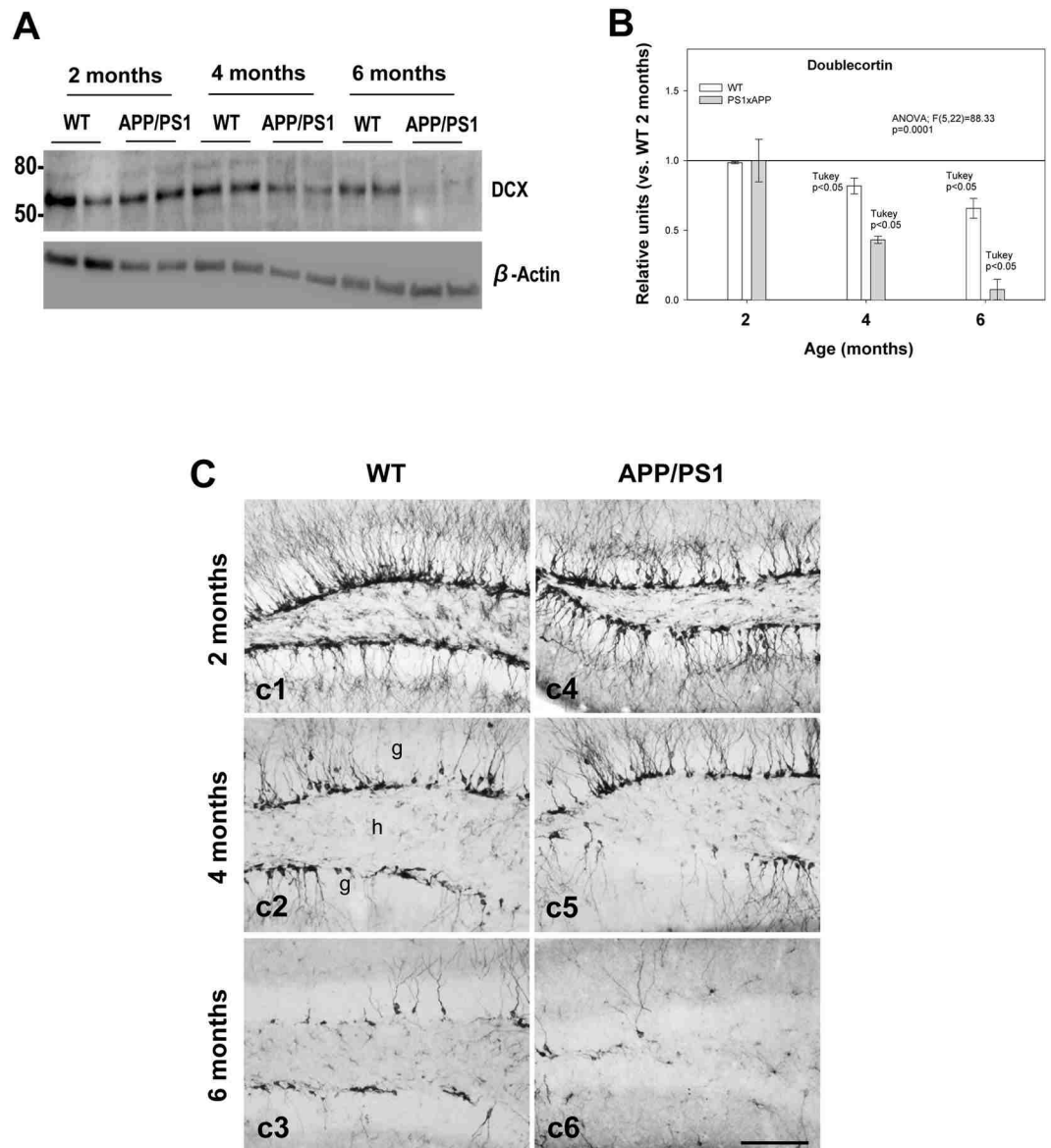
## Results

**Neurogenesis is impaired in the SGZ of APP/PS1 mice.** To assess whether neurogenesis was affected in the subgranular zone of the dentate gyrus (DG) in APP/PS1 mice, we analyzed the expression of doublecortin (DCX), a microtubule-stabilizing factor that is expressed specifically in immature neurons<sup>31</sup>, at 2, 4 and 6 months of age in comparison to age-matched WT mice. Western blot analysis (Fig. 1A and B) showed a significant decrease in the steady-state levels of DCX in APP/PS1 mice at 4 months and an even more severe decrease at 6 months ( $-56.80 \pm 2.5\%$  and  $-92.5 \pm 7.3\%$ , respectively; Tukey's post hoc test,  $p < 0.05$ ). A significant age-dependent progressive reduction of DCX was also detected in WT mice (Fig. 1A and B). These data were consistent with a prominent decrease in the number of DCX-immunopositive cells in the SGZ that was observed with age in both WT and APP/PS1 mice (Fig. 1C). The reduction of DCX-positive cells in APP/PS1 compared to age-matched WT mice was noticeable at 6 months of age (Fig. 1C, c6 compared to c3). Overall, these results indicate that neurogenesis in the SGZ is impaired in APP/PS1 mice at early stages of the disease (4- to 6-month-old mice) (see Fig. 1 and Supplemental Fig. 1).

**Proliferative cells are significantly reduced in the SGZ of APP/PS1 mice.** To understand the mechanism underlying the severe reduction of DCX cells in the SGZ of APP/PS1 mice compared to WT mice at 6 months of age, we examined whether cell proliferation was affected in these mice. To evaluate the cell proliferation, mice were administered bromodeoxyuridine (BrdU) injections and sacrificed 3 days after the first injection (proliferation). After that, brain sections were double immunostained with anti-BrdU and anti-DCX antibodies (Fig. 2A). Stereological quantification in the SGZ showed a significant decrease in the number of double BrdU/DCX-positive cells in APP/PS1 mice at 6 months of age compared to age-matched control mice ( $-46.99 \pm 13.45\%$ ; Tukey's post hoc test,  $p < 0.05$ ), whereas no differences between the genotypes were detected at 2 months of age (Fig. 2B). In addition, a significant reduction in the number of double-positive cells was detected in the APP/PS1 mice between 2 to 6 months of age ( $-63.37\% \pm 9.30\%$ ; Tukey's post hoc test,  $p < 0.001$ ) indicating the existence of an age-related decrease in cell proliferation (Fig. 2B). Together, these data suggest that cell proliferation is significantly diminished in the SGZ of 6-month-old APP/PS1 mice compared to age-matched controls, and the reduced cell proliferation might be responsible for the decrease in neurogenesis observed in these mice.

**Progenitor cells are extensively reduced in the SGZ of APP/PS1 mice.** Next, we seek to determine whether the reduction of cell proliferation was related to changes in progenitor cells in the SGZ of APP/PS1 mice at 6 months of age. Radial glia-like stem/precursor cells, or type-1 cells, are quiescent and pluripotent cells that can differentiate into immature neurons in the SGZ. These cells express the astrocytic markers glial fibrillary acidic protein (GFAP), nestin and brain lipid binding protein (BLBP), and can divide asymmetrically to generate intermediate progenitors (type-2 cells), which express stem cell markers such as Sox2 and neuronal lineage markers such as Prox1, NeuroD1 and DCX<sup>32,33</sup>. Here, we investigated whether changes in type-1 and type-2 progenitor cells are associated with the reduction of neurogenesis in APP/PS1 mice. First, we analyzed the number of BLBP-positive cells to investigate radial glia-like stem cell type-1 progenitor cells in the SGZ<sup>34</sup>. Immunohistochemical analysis demonstrated the localization of multiple BLBP-positive stem cells in the SGZ of both WT and APP/PS1 mice at 4-, 6- and 12-months of age (Figs 3A and 4A). In WT and APP/PS1 mice, these stem cells showed a cell soma located at the SGZ, had an elongated main process that crossed the granular layer and displayed a terminal arborization (see Fig. 3). However, in APP/PS1 mice, BLBP-positive stem cells with thick primary processes and BLBP-positive reactive astrocytes were also observed (see Fig. 3A a4–6 and Fig. 4A a4–6). The radial glia-like type 1 cells co-expressed BLBP and GFAP as shown by confocal microscopy in the SGZ of both WT and APP/PS1 mice (Fig. 3B). Moreover, stereological quantification demonstrated an age-dependent decrease in BLBP-positive stem cells of the SGZ. In WT mice, a significant reduction of BLBP-positive stem cells at 6 months ( $-51.39\% \pm 4.23\%$ ; Tukey's post hoc test,  $p < 0.001$ ) and 12 months ( $-57.64\% \pm 6.11\%$ ; Tukey's post hoc test,  $p < 0.001$ ) compared to 4-month-old WT mice (Fig. 4A and B) was detected. Moreover, a further reduction of BLBP stem cells was observed in APP/PS1 mice at 6 months of age compared to age-matched WT mice ( $-30.86\% \pm 10.77\%$ , t-test  $p < 0.01$ ) (Fig. 4A a2 and a5, and Fig. 4C). No differences were observed at 4 months between WT and APP/PS1 mice.

Herein, we also distinguished between BLBP-positive stem cells with thin or thick elongated main processes (see Fig. 5A for morphological details). Our stereological quantification (Fig. 5B and C) demonstrated a significant decrease in the thin BLBP-positive stem cells in APP/PS1 mice compared to WT mice ( $-55.57\% \pm 14.02$ ,

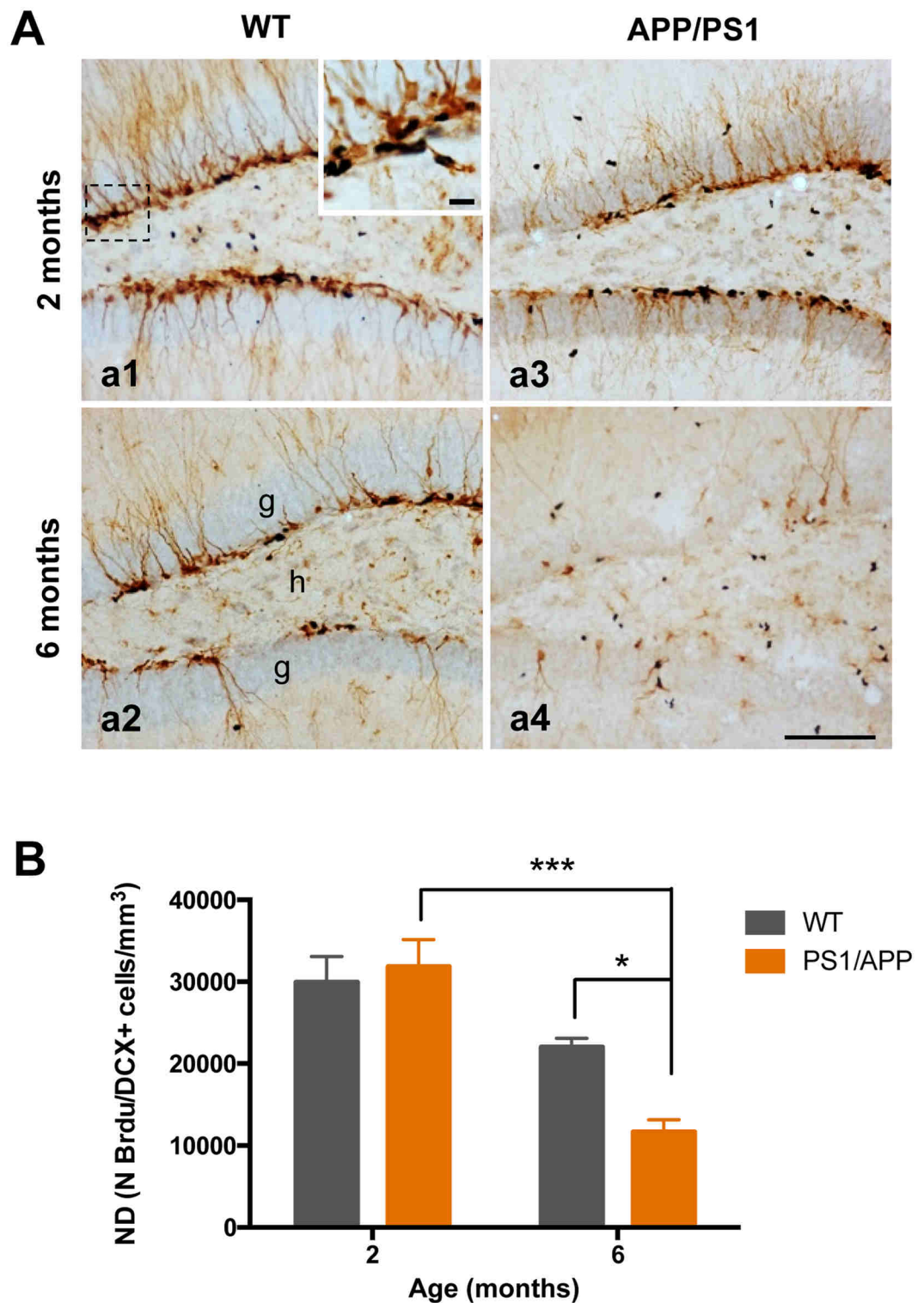


**Figure 1.** Neurogenesis is severely affected in the SGZ of APP/PS1 mice. (A and B) Western-blot analysis shows a significant decrease ( $n = 5/\text{genotype}/\text{age}$ ; ANOVA  $F(5,22) = 88.33$ ; Tukey's post hoc  $p < 0.05$ ) in the level of DCX at 4 and 6 months of age in APP/PS1 mice compared with age-matched WT mice. (C) Light microscopic images of DCX immunolabeling in the dentate gyrus of WT (c1–c3), and APP/PS1 (c4–c6) mice from 2 to 6 months of age. Significant reduction in DCX-positive cells was observed in APP/PS1 mice compared to WT mice during aging; g: granular cell layer; h: hilus. Scale bars: 100  $\mu\text{m}$  (c1–c6).

Tukey's post hoc test,  $p < 0.001$ ) at 6 months of age. However, a 4.5-fold increase in the thick BLBP-positive stem cells was observed in APP/PS1 mice compared to WT mice at 6 months of age (Tukey's post hoc test  $p < 0.05$ ). The proportion of thick BLBP-positive stem cells was higher in APP/PS1 mice and this number increased with age as show in Fig. 5C.

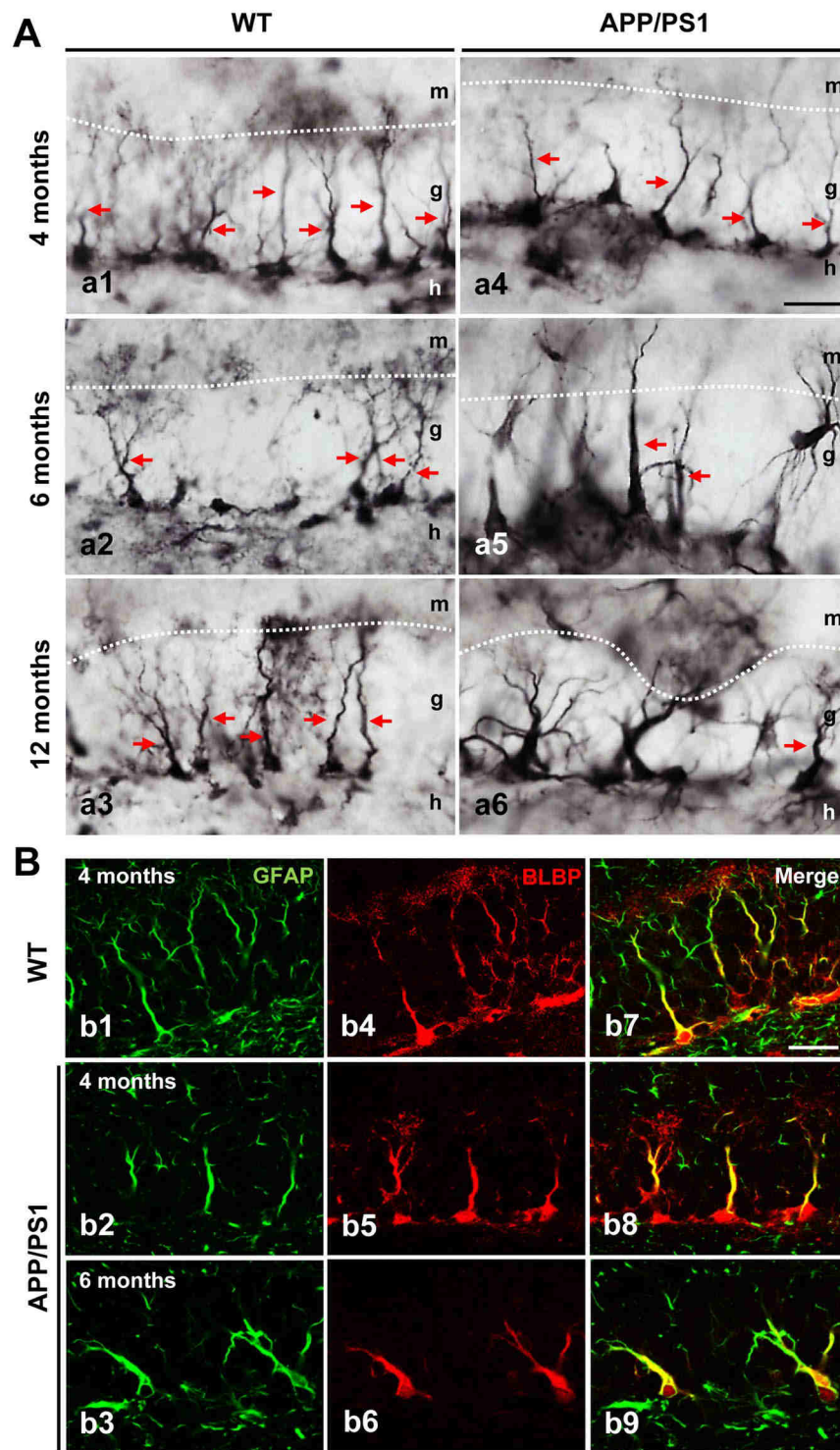
In addition, qualitative observations in semithin sections (1–1.5  $\mu\text{m}$ -thick) showed a severe loss of neurogenic niches in the SGZ of the dentate gyrus in 6-month-old APP/PS1 mice compared to WT mice. In semithin sections, type-1 cells are recognized as having a triangular soma with long, single or double apical processes that radially cross the granular cell layer (GCL); however, type-2 cells displayed an irregular heterochromatic nucleus and short cytoplasmic processes extending parallel to the SGZ<sup>35</sup>. The quantification of morphologically identified neural precursors showed a significant reduction in the number of both type-1 ( $-47.31 \pm 15.18\%$ ,  $p < 0.05$  t-test) and type-2 ( $-69.87 \pm 30.12\%$ ,  $p < 0.05$ , t-test) cells in APP/PS1 mice compared to WT (Supplemental Fig. 2A–C). Overall, these data indicate that neurogenic niches are significantly affected in 6-month-old APP/PS1 mice, and these profound alterations in stem cell type-1 progenitor cells may be responsible for the substantial decline in proliferation rate observed in APP/PS1 mice.





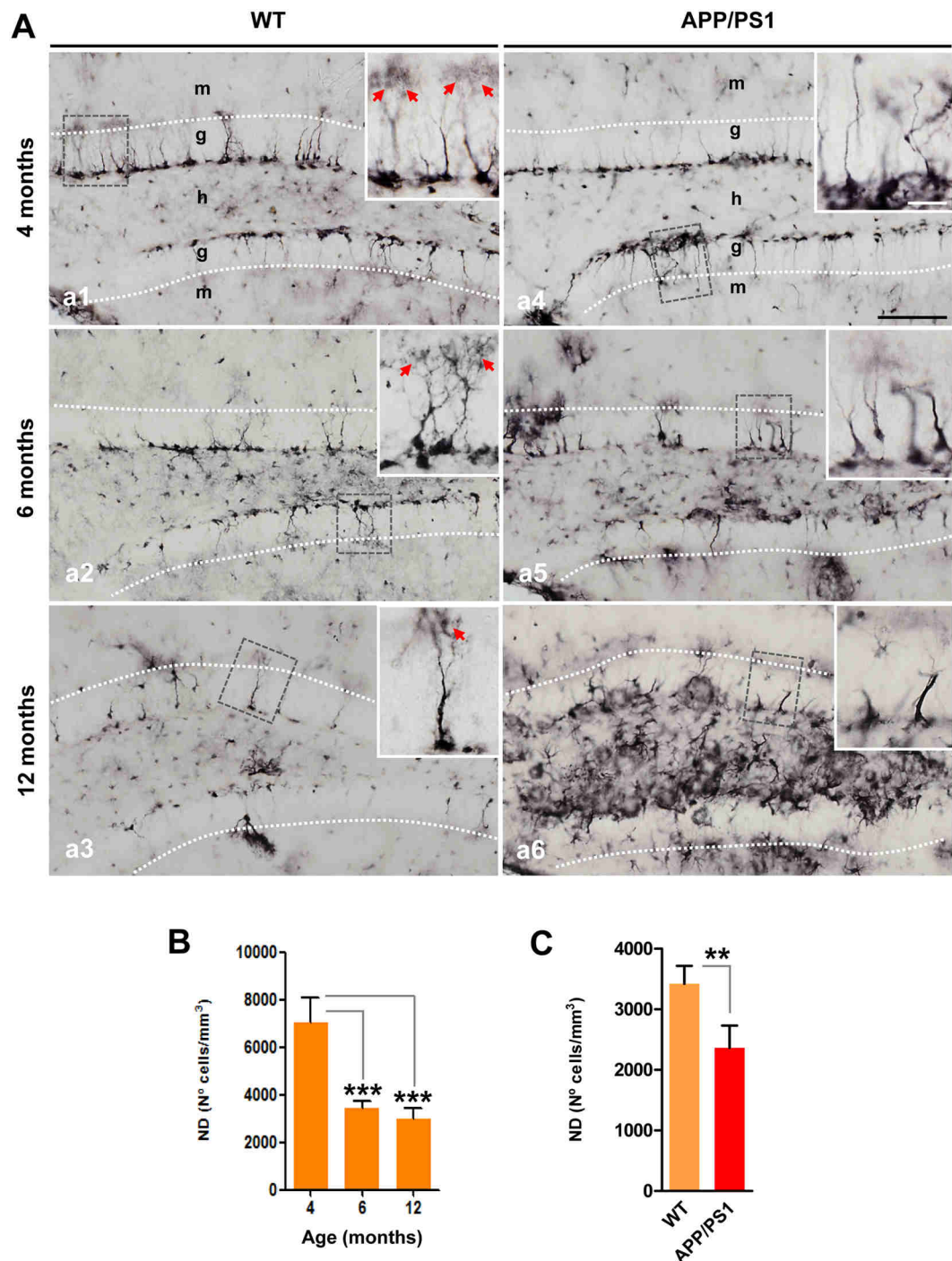
**Figure 2.** Cell proliferation is significantly reduced in the hippocampus of APP/PS1 mice at 6 months of age. (A) Light microscopic images of double immunolabeled cells, BrdU (blue)-DCX (brown), in the DG of 2- and 6-months-old WT (a1 and a2), and APP/PS1 (a3 and a4) mice. (B) The total number of BrdU/DCX-positive cells was significantly reduced in APP/PS1 mice compared to WT mice at 6 months of age ( $n = 4/\text{age/genotype}$ ); ANOVA  $F(3,11) = 15.57$ ; Tukey's post hoc test  $*p < 0.05$ ,  $***p < 0.001$ . Scale bars: 100  $\mu\text{m}$  (a1–a4).

**Soluble A $\beta$  affects neuronal proliferation in the APP/PS1 hippocampus.** As expected from previous studies from our lab, the immunohistological analysis and plaque-load quantification demonstrated an age-dependent increase (2.1 and 4.3-fold at 6 and 12 months of age, respectively, compared to 4-month-old mice)



**Figure 3.** BLBP-positive stem cells in the SGZ in WT and APP/PS1 mice. **(A)** Light microscopic images of the dentate gyrus of WT (a1–a3) and APP/PS1 (a4–a6) mice immunostained for BLBP. **(B)** Double confocal images of GFAP (b1–3) and BLBP (b4–6) markers demonstrate the presence of radial glial-like stem cell type-1 progenitors in both WT and APP/PS1 mice as shown in the co-localization images (b7–9). g: granular cell layer; h: hilus; m: molecular cell layer. Scale bars: 25  $\mu$ m (a1–a6 and b1–b9).

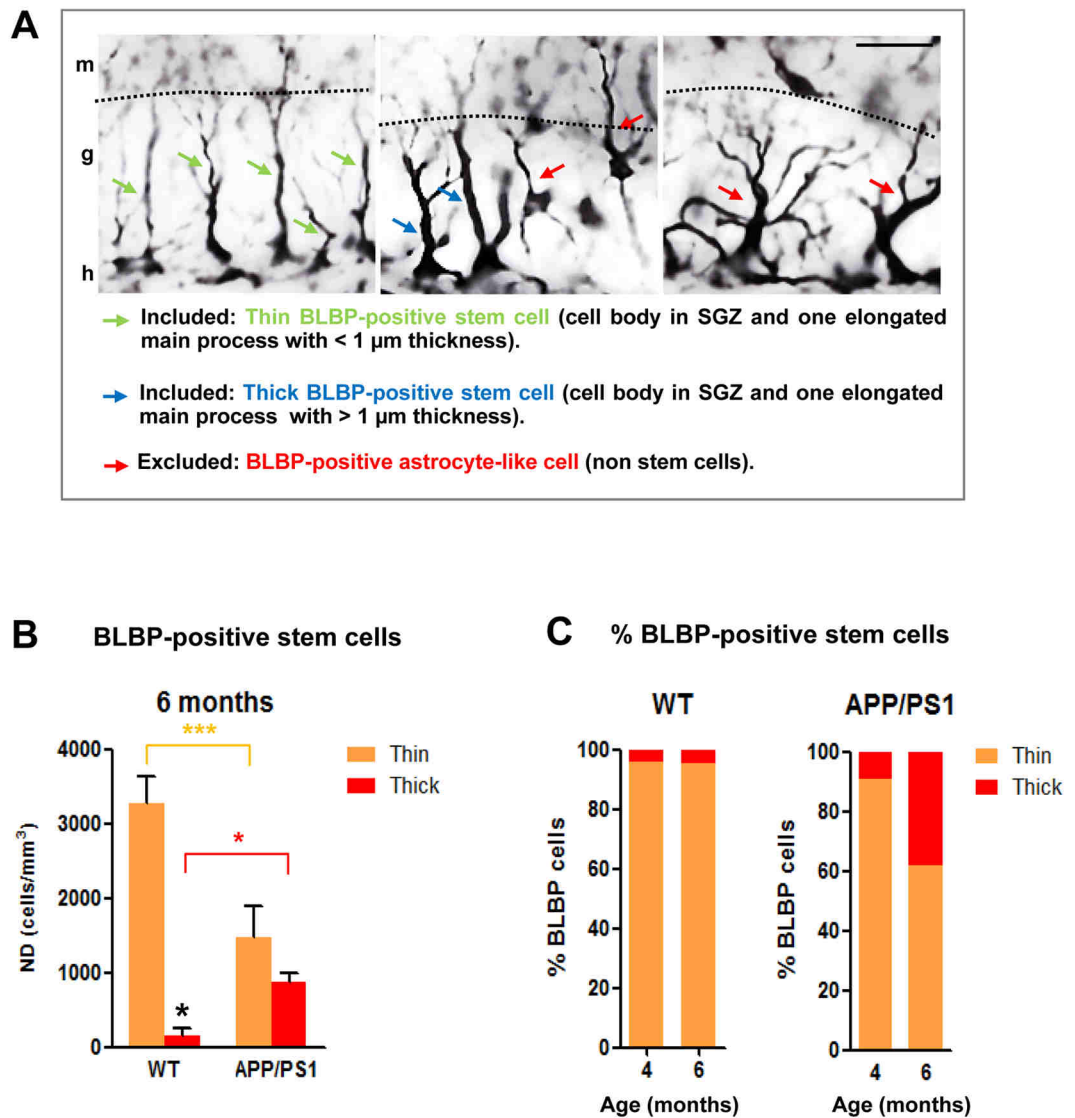
in the extracellular A $\beta$  deposits in the hilus of the dentate gyrus in APP/PS1 mice (Fig. 6A). In addition, Western blot analysis of hippocampal samples showed a significant age-dependent increase (12.9 and 20.3-fold at 6 and 12 months of age, respectively, compared to 4-month-old mice) in A $\beta$  levels (Fig. 6B). Together, these data suggest that A $\beta$  could affect neuronal proliferation in the hippocampus. To investigate whether soluble A $\beta$  from an



**Figure 4.** BLBP-positive stem cells are reduced in aging and in APP/PS1 mice. **(A)** Light microscopic images of the dentate gyrus of WT (a1–a3) and APP/PS1 (a4–a6) mice immunostained for BLBP. **(B)** Stereological quantification demonstrates an age-dependent decrease in BLBP-positive cells ( $n = 4/\text{genotype}/\text{age}$ ; ANOVA  $F(2,8) = 38.93$ , Tukey's post hoc test,  $***p < 0.001$ ). **(C)** Stereological quantification shows a significant decrease in the number of BLBP-cells in APP/PS1 mice compared to age-matched WT mice ( $n = 4/\text{age}/\text{genotype}$ ; t-test  $**p < 0.01$ ). Red arrows: BLBP-positive stem cells with broccoli-like cell endings. g: granular cell layer; h: hilus; m: molecular cell layer. Scale bars: 100  $\mu\text{m}$  (a1–a6), 25  $\mu\text{m}$  for inserts.

APP/PS1 hippocampus might affect neurogenesis in these mice, we conducted an *in vitro* neurosphere assay. The diameter of the neurosphere reflects cellular proliferative capacity. As shown in Fig. 6, the soluble A $\beta$  present in S1 fractions derived from 6-month-old APP/PS1 hippocampal samples inhibited and/or blocked the proliferation and growth of the neurospheres (from  $109.9 \pm 46.38$  to  $83.51 \pm 43.60$   $\mu\text{m}$ , at the maximal dose tested; Fig. 6D). To address whether soluble A $\beta$  was the toxic agent, the neurospheres were incubated with A $\beta$ -immunodepleted S1 samples using the antibody 6E10. Our experiment demonstrated that A $\beta$ -immunodepleted samples did not

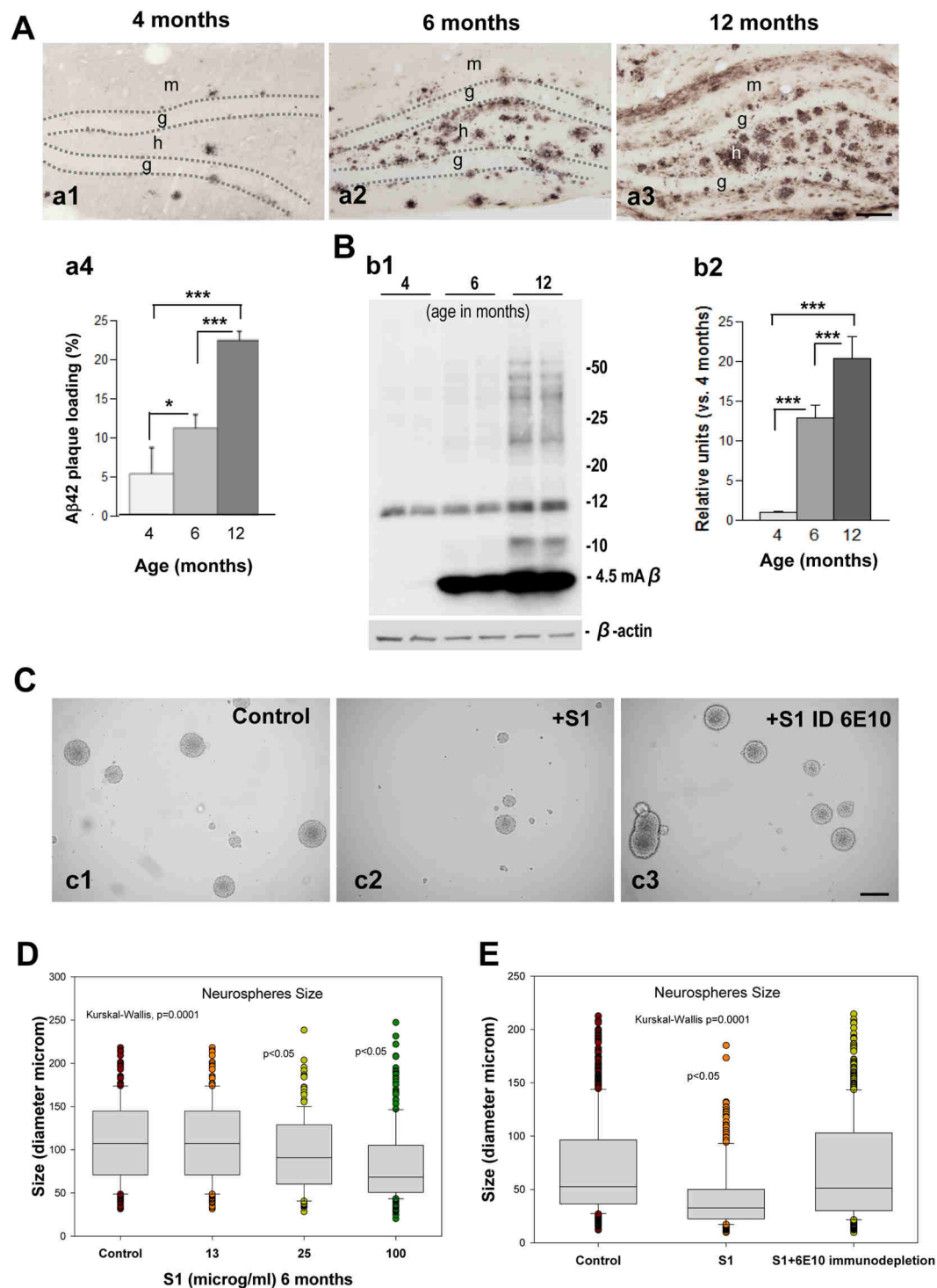




**Figure 5.** Thin and thick BLBP-positive stem cells are differentially affected in APP/PS1 mice. (A) Representative images of BLBP-positive cells in the dentate gyrus of 6-month-old APP/PS1 mice; radial glia-like stem cells (type-1 cells) display a thin (green arrows) or thick (blue arrows) long radial process that extends from the cell body in the SGZ and traverses the granule cell layer; BLBP-positive non-stem cells exhibit a cell body located out of SGZ and many branched processes (red arrows) resembling mature astrocytes. (B) Stereological quantifications show a significant decrease in the number of BLBP-stem cells extending thin apical process in the APP/PS1 mice compared to WT mice at 6 months of age. However, a significant increase in the number of BLB-stem cells with a thick process is observed in these APP/PS1 mice compared to WT mice ( $n = 4/\text{genotype/age}$ ; ANOVA  $F(3,12) = 85.545$ ; Tukey's post hoc test,  $*p < 0.05$ ,  $***p < 0.001$ ). (C) Percentage of thin and thick BLBP-positive stem cells in WT and APP/PS1 at 4- and 6-month-old. g: granular cell layer; h: hilus; m: molecular cell layer. Scale bars:  $25 \mu\text{m}$ .

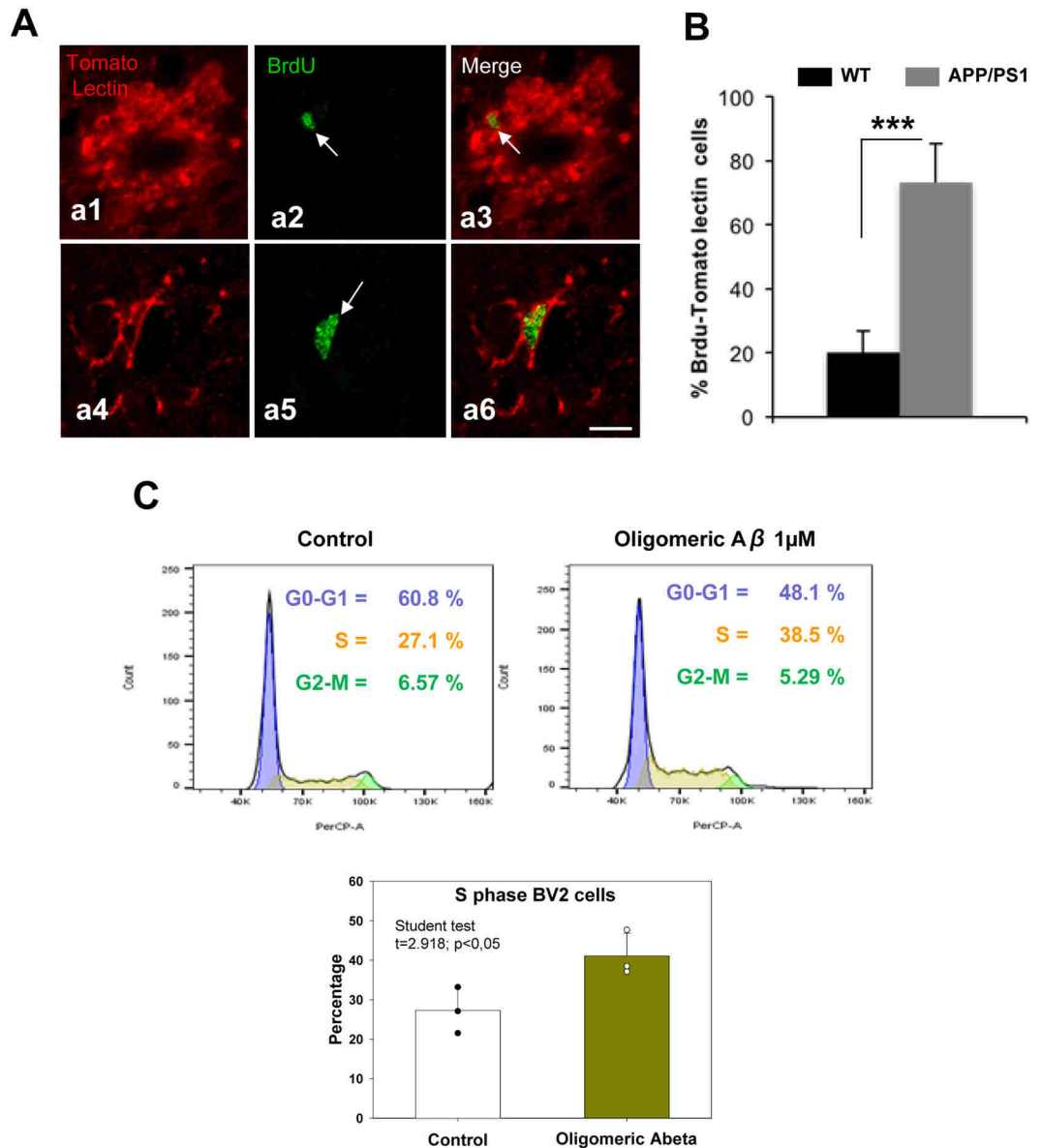
affect neurosphere proliferation and growth (Fig. 6C and E). Therefore, our study suggests that soluble  $A\beta$  might significantly affect cell proliferation in the SGZ of APP/PS1 mice and, consequently, the formation of new neuronal cells in these mice.

**$A\beta$  stimulates microglial proliferation in APP/PS1 mice.** In the cell proliferation studies, we observed numerous BrdU-positive/DCX-negative cells in the hilus of the dentate gyrus of APP/PS1 mice (Fig. 2a4). To further determine the specific glial phenotype of these cells, double-immunostaining of BrdU and tomato lectin (a microglial marker) or GFAP (an astroglial marker) was performed. The confocal images and the quantitative study showed that most of the newly generated cells in the hilar region of the APP/PS1 hippocampus were microglial cells (Fig. 7A and B). The hilar microglial population increased over 3-fold ( $71.97 \pm 9.08\%$ ;  $p < 0.001$ , t-test) in transgenic mice compared to WT mice. These results were consistent with the pro-inflammatory response that



**Figure 6.** Soluble APP/PS1-derived A $\beta$  inhibits neurospheres growth and proliferation. (A) Light microscopic images of the dentate gyrus of APP/PS1 mice showing an age-dependent increase in the extracellular A $\beta$  accumulation (a1–a3); quantification of A $\beta$  plaque loading shows a significant increase from 4 months of age up to 12 months (n = 5/age; ANOVA; F(2,8) = 54.29; p = 0.0001; Tukey's post hoc test, \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001) (a4). (B) Western-blot analysis (b1) shows a significant age-dependent increase (b2) in the level of monomeric A $\beta$  in APP/PS1 mice (ANOVA; F(2,9) = 119.3; P = 0.0001; Tukey's post hoc test p < 0.001). (C) Soluble proteins (S1) from APP/PS1 mice inhibit neurospheres growth. (D) A $\beta$ -immunodepleted soluble proteins from APP/PS1 mice hippocampus demonstrate that A $\beta$  is a key molecular factor inhibiting neurospheres growth (Kruskal Wallis p = 0.0001, Dunn test p < 0.05). g: granular cell layer; h: hilus. Scale bars: 100  $\mu$ m (a1–a3); 200  $\mu$ m (c1–c3).





**Figure 7.** The microglial population increases in the dentate gyrus of APP/PS1 mice. **(A)** Double immunofluorescence confocal images for tomato lectin/BrdU (a1–a6) in 6-month-old APP/PS1 mice. The corresponding merged images showed that the BrdU-cells (arrows) observed in the hilus corresponded to microglial cells. **(B)** Quantitative analysis shows a significant increase of tomato lectin/BrdU double-labeled cells in APP/PS1 mice compared to WT mice ( $n = 6/\text{genotype}$ ;  $t\text{-test } ***p < 0.001$ ). **(C)** Bv2 proliferation assay shows an increase of proportion of microglia cells in S phase after  $A\beta$  treatment. **(D)** Proliferation index ratio shows a significant increase (showing in the graph) in Bv2 cells treatment with soluble oligomeric  $A\beta$  compared to control. Scale bars:  $10 \mu\text{m}$ .

occurred in the hippocampus of these transgenic animals at these ages and coincident with the  $A\beta$  deposition. Moreover, no differences were observed in BrdU-GFAP-positive cells (Supplemental Fig. 3).

On the other hand, *in vitro* experiments demonstrated that soluble oligomeric  $A\beta$  (OC-positive) promoted cell cycle re-entry of Bv2 cells (Fig. 7C). As shown, we observed a reduction in the number of G0-G1 cells and a consequent increase in the proportion of cells in S phase. As a result, we also observed a significant increase in the “proliferation index” of Bv2 cells due to soluble  $A\beta$  (Fig. 7D). Overall, these data suggest that  $A\beta$  induces microglial proliferation.

## Discussion

The study of neurogenesis in humans and AD animal models has been a major focus of research in the past decade<sup>3–11</sup>; however, the role of AD pathogenesis in adult neurogenesis remains elusive. In the present study, we investigated how  $A\beta$  impairs neurogenesis in an amylogenic transgenic mouse model of AD. Our data demonstrated that neurogenesis is impaired at early ages in double transgenic APP/PS1 mice compared to WT mice.

This reduction in the formation of new neuronal cells is associated with a significant decrease in the number of type-1 and type-2 progenitor cells in the SGZ of the dentate gyrus. Furthermore, we demonstrated that soluble A $\beta$  is the key factor underlying these effects. Interestingly, our study showed that soluble A $\beta$  forms derived from the hippocampus of APP/PS1 mice inhibited the proliferation and growth of hippocampal neurospheres, blocking the production of new neuronal cells. By contrast, we observed that the soluble A $\beta$  stimulated microglial proliferation with no effect on astrocytes. Therefore, our study suggests that A $\beta$  has a differential effect on proliferative cells in the CNS.

A significant decrease in SGZ proliferation, survival and differentiation has been previously shown in several AD models, such as hAPP, Tg2576 and PDAPP<sup>36–38</sup>. Furthermore, morphological alterations along with a dramatic reduction in dentate gyrus neural stem cells have been reported in APP/PS1 models and the 3xTg-AD model<sup>39–42</sup>. In the latter model, the reduction in cell proliferation was associated with the presence of A $\beta$  plaques and significant increases in the number of A $\beta$ -containing neurons in the hippocampus<sup>25</sup>. Overall, these studies are consistent with our findings in double transgenic APP/PS1 mice. In this AD model, there is a significant and early-stage (4–6 months of age) decrease in the number of DCX-positive cells in the dentate gyrus associated with a decrease in the hippocampal proliferative rate. We demonstrated that this cell-proliferation impairment is associated with a significant loss of the progenitor cells in the SGZ, as determined by stereological quantifications of radial glia-like stem cell type-1 progenitor cells (BLBP-positive) and by morphological quantification in semithin sections. The progenitor cells in the SGZ can be classified into type-1 and type-2 cells<sup>32, 33</sup>. Type-1 cells are astrocyte-like progenitor cells, which possess the potential capacity for self-renewal and to produce neuronal and glial cells. Type-1 progenitor cells can divide and generate intermediate precursors, defined as type-2 cells<sup>34, 43</sup>. These other intermediate precursor (type-2) cells remain in small clusters with a few cells in the neurogenic niches which continue to express stem/progenitor markers and progressively can differentiate into granule neurons<sup>34, 43</sup>. Our study demonstrates that the populations of both type-1 and -2 cells are diminished in APP/PS1 mice compared to WT mice at 6 months of age. Similar data have been reported in other transgenic animal models (i.e., APP, APPKI/PS1KI, APP23, and Tet/GSK3 $\beta$ ) where stereological quantification using confocal images and qualitative measurements in semithin sections have shown a robust decrease in the number of progenitor cells in the SGZ<sup>35, 38, 41, 42, 44</sup>.

Multiple factors could be responsible for the impairment of neurogenesis in our APP/PS1 model at these early ages (4–6 months). These mice displayed a robust extracellular accumulation of A $\beta$  in the dentate gyrus since early ages and therefore, it would be plausible that A $\beta$  may mediate this negative effect on neurogenesis. To address this question, hippocampal neurospheres from WT mice were incubated with soluble fractions from 6-month-old APP/PS1 hippocampi. Our study clearly showed that soluble proteins from APP/PS1 mice inhibited neurosphere growth and proliferation; moreover, when these soluble samples were immunodepleted with anti-A $\beta$  antibodies no effect on neurosphere size was detected. Thus, our data strongly supports soluble A $\beta$  forms as the toxic agent for the formation of new neuronal cells in the hippocampus of APP/PS1 mice. Similar results from other studies support our findings, suggesting that A $\beta$  reduces the cell viability of the neurosphere and promotes its senescence<sup>45–48</sup>.

Among the possible mechanisms by which A $\beta$  impairs neurosphere proliferation, differentiation and/or migration, multiple different processes could occur in the APP/PS1 mice: the activation of formylpeptide receptor 2 (FPR2) and its downstream reactive oxygen species p38 mitogen-activated protein kinase (ROS-p38 MAPK), the activation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), or a deficiency in the nuclear factor erythroid 2-related factor (Nrf2)<sup>45, 47, 48</sup>. However, it is also possible that other APP-derived fragments may have a significant role in modulating neurogenesis in APP/PS1 mice<sup>49</sup>. Previous studies have shown that sAPP $\alpha$  and the APP intracellular domain (AICD) regulate neurogenesis<sup>49</sup>. While sAPP $\alpha$  has been shown to be neuroprotective and important for neurogenesis, AICD negatively modulates neurogenesis<sup>49</sup>. Thus, we cannot discard the idea that APP-derived fragments may also modulate neurogenesis in our APP/PS1 mice.

Despite the widely accepted idea that the formation of new neurons is impaired in AD mouse models, such as our APP/PS1 model, conflictive observations have been reported in several other transgenic mice. For example, PDGF-APP<sup>Swe</sup>,Ind mice (J20) show an increased number of BrdU-positive cells and more immature neuronal markers in the dentate gyrus than their WT counterparts<sup>30</sup>. Similar results are observed in the APP23 and in the double APP<sub>K670N/M671N</sub>/PS1<sub>M146L</sub> transgenic mice<sup>17, 28, 41</sup>. These discrepancies could be attributed to multiple factors principally related to the transgene expression, mouse line and experimental conditions. Likewise, there are also conflicting data regarding how neurogenesis is affected in human AD cases. While some studies suggest that neurogenesis is impaired in AD<sup>18–20</sup>, other studies indicate that neurogenesis is stimulated by an increase in the proliferation rate and survival of new neurons<sup>16, 17</sup>. However, novel findings suggest that the observed increase in the cell proliferation mainly results from glial and vascular-associated changes<sup>18, 19, 21, 22</sup>. In this context, our results in APP/PS1 mice demonstrate that the significant increase in the number of BrdU-positive cells in the hilus of the dentate gyrus correspond to glial cells, specifically microglia. These data correlate with an important inflammatory response observed in these mice at early ages<sup>50–52</sup>. Using Bv2 cells, we also demonstrate that soluble A $\beta$  oligomers stimulate microglial proliferation, which suggests that the A $\beta$  pathology might be the causative factor inducing microglial proliferation in the dentate gyrus. In alignment with our data, several studies have shown that A $\beta$  stimulates microglial proliferation *in vitro*, and multiple molecular mechanisms have been proposed, such as increased microglial release of TNF- $\alpha$  and production of hydrogen peroxide from NADPH oxidase or increased expression of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) through the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase), protein kinase B (Akt) and nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) pathway<sup>53, 54</sup>. Moreover, oligomeric A $\beta$  could stimulate microglial proliferation by interacting directly and/or indirectly with TREM2 (Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells), which is overexpressed in plaque-associated microglia<sup>55</sup>. In support of this idea, significant microglial proliferation has been observed in aged mice with A $\beta$  pathology<sup>56</sup>, and more importantly, microglial proliferation is reduced in TREM2<sup>-/-</sup> mice, which likely contributes to the reduced

number of total microglia observed in older  $TREM2^{-/-}$  mice with  $A\beta$  pathology<sup>56,57</sup>. On the other hand, the lack of changes in astrocyte proliferation is consistent with other reports in transgenic mice<sup>58</sup> and, more relevant, in AD brains<sup>18,59</sup>.

Overall, the findings from this study demonstrate important compelling evidence related to the role of  $A\beta$  in different cell populations. On one hand,  $A\beta$  impairs neurogenesis via reducing the number of progenitor cells and affecting their proliferation and differentiation into new neuronal cells. On the other hand,  $A\beta$  stimulates microglial proliferation, indicating that  $A\beta$  differentially affects the proliferative process of distinct cell types in CNS. These results provide important significant value to understanding the impact of AD in distinctive proliferative cells in CNS. Adult neurogenesis plays an important role in many aspects of hippocampus-dependent memory<sup>60,61</sup>. Neurogenesis impairment, along with the synaptotoxic effect of oligomeric  $A\beta$ <sup>62</sup>, might be responsible for the early cognitive deficits in AD patients. The regulation of endogenous neurogenesis is an important therapeutic target for mitigating the hippocampal dysfunction associated with multiple neurodegenerative disorders, including Alzheimer's disease.

## Methods

**Transgenic mice.** The generation and characterization of APP/PS1 transgenic mice has been previously described<sup>50–52,63–65</sup>. Transgenic mice (C57BL/6 background) were obtained by crossing heterozygotic Thy1-APP751SL (Swedish-K670N, M671L- and London-V717I-FAD mutations) transgenic mice with homozygotic PS1M146L transgenic mice (Charles River, France). Transgenic mice at 2, 4, 6, 9, 12 and 18 months of age were used. Age-matched non-transgenic (WT) mice of the same genetic background were analyzed as controls. Only male mice were used in this work. All animal experiments were conducted in accordance with the European Union regulations and approved by the Committee of Animal Use for Research at Malaga University.

**BrdU labelling.** BrdU (Sigma-Aldrich) was dissolved in phosphate buffered saline (PBS) and administered intraperitoneally (50 mg/kg) twice a day (at 8 h intervals) for 3 consecutive days to 2- and 6-month-old APP/PS1 ( $n = 5/\text{age}$ ) and WT ( $n = 5/\text{age}$ ) mice.

**Tissue preparation.** After deep anesthesia with sodium pentobarbital (60 mg/kg), mice were transcardially perfused with 0.1 M PBS, pH 7.4, followed by a solution of 4% paraformaldehyde (PFA), 75 mM lysine, and 10 mM sodium metaperiodate in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4. Brains were then removed, post-fixed overnight in the same fixative at 4 °C and cryoprotected in 30% sucrose. Sections (40  $\mu\text{m}$  thickness) were obtained from the coronal plane using a freezing microtome and serially collected into wells containing cold PBS and 0.02% sodium azide.

To study neurogenic niches in the dentate gyrus and identify type-1 and -2 cells in semithin sections, 6-month-old APP/PS1 and WT mice (not injected with BrdU) were intracardially perfused with 0.9% saline followed by 2% PFA and 2.5% glutaraldehyde. Next, coronal sections (200  $\mu\text{m}$ ), corresponding to the same hippocampal region from APP/PS1 and WT mice, were post-fixed in 2% osmium tetroxide ( $\text{OsO}_4$ ) for 2 h, rinsed, dehydrated, and embedded in Durcupan (Fluka BioChemika, Ronkonkoma, NY, USA). Serial semithin sections (1.5  $\mu\text{m}$ ) were cut with a diamond knife and stained with 1% toluidine blue.

**Immunohistochemistry.** Serial sections from BrdU-injected control and transgenic mice were assayed simultaneously. For single immunolabeling, free-floating sections were first treated with 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ /10% methanol in PBS and with an avidin-biotin Blocking Kit (Vector Labs, Burlingame, CA, USA). The sections were incubated overnight with anti-BLBP (1:3000 dilution; Abcam, Cambridge, United Kingdom), anti-DCX polyclonal goat antibody (1:1000 dilution; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) or anti-6E10 (1:1500; Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). The tissue-bound primary antibody was detected by incubating with the corresponding biotinylated secondary antibody (1:500 dilution, Vector Labs, Burlingame, CA, USA) and then by incubating with streptavidin-conjugated horseradish peroxidase (Sigma-Aldrich) diluted 1:2000. The peroxidase reaction was visualized with 0.05% 3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma-Aldrich), 0.03% nickel ammonium sulfate and 0.01% hydrogen peroxide in PBS. Sections were then mounted on gelatin-coated slides, air dried, dehydrated in graded ethanol solutions, cleared in xylene and cover-slipped with DPX mounting medium (BDH Chemicals Ltd., England). The specificity of the immune reactions was controlled by omitting the primary antiserum.

For double immunoperoxidase BrdU/DCX labeling, free-floating sections were first treated in 2 N HCL for 30 min at 37 °C followed by 0.1 mol/L borate buffer (pH 8.5) for 15 min. Next, the free-floating sections were treated with 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ /3% methanol in PBS and with avidin-biotin Blocking Kit (Vector Labs, Burlingame, CA, USA). The sections were incubated 48 h at room temperature with rat monoclonal anti-BrdU (1:500 dilution; Serotec, Oxford, United Kingdom). The tissue-bound primary antibody was detected following peroxidase reaction with DAB including 0.03% nickel ammonium sulfate (black reaction end-product). Then, sections were incubated overnight with the second primary antibody, anti-DCX polyclonal goat antibody (1:1000 dilution; Santa Cruz Biotechnology). This second immunoperoxidase reaction was developed with DAB only (brown reaction end-product). Sections were finally mounted on gelatin-coated slides, air-dried, dehydrated in graded ethanol, cleared in xylene and cover-slipped with DPX.

For double BrdU/Tomato lectin fluorescence labeling, sections were incubated 48 h at room temperature with rat anti-BrdU (1:500 dilution; Serotec) and 60 min with tomato lectin solution (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). BrdU/Tomato lectin double labeling was visualized with Alexa 568 donkey anti-rat (1:1000 dilution, Molecular Probes), and streptavidin-conjugated Alexa 488 (1:2000 dilution; Molecular Probes). For double GFAP/BLBP immunofluorescence labeling, sections were sequentially incubated with BLBP (1:3000 dilution, Abcam) and GFAP (1:10000 dilution; Dako, Glostrup, Denmark) followed by the corresponding Alexa 488/568 secondary antibodies. Sections

were mounted onto gelatin-coated slides, cover-slipped with 0.01 M PBS containing 50% glycerin and 2.5% triethylenediamine and then examined under a confocal laser microscope (Leica SP5II).

**Cell counting.** The numerical density (ND; cells/mm<sup>3</sup>) of the BrdU/DCX-positive cells was estimated by stereological analysis according to the optical fractionator method as we have previously described<sup>50–52,64</sup>. Briefly, the immunopositive cells were visualized using an Olympus BX61 microscope (Olympus, Denmark) coupled to a DP71 digital camera (Olympus). The New CAST-Grid Vis: 6.1.1.0 software package (Visiopharm Integrator System) generated sampling frames with a known area and directed the motorized X-Y stage (Prior ProScan, Prior Scientific Instruments, Cambridge, UK). BrdU/DCX-positive cells from 2- and 6-month-old WT and APP/PS1 mice were quantified through the entire antero-posterior extent of the hippocampus between -0.94 mm anterior and 3.64 mm posterior to Bregma coordinates. An average of 10–12 serial sections (with 280 μm between sections) per animal was analyzed (n = 5/genotype/age). This selection criteria prevented counting cells from contiguous sections. The dentate gyrus was defined using a 4X objective and the number of cells was counted using a 100X/1.35 objective. We used a counting frame of 918.43 μm<sup>2</sup> with step lengths of 68.54 μm. The numerical density was estimated as follows:  $ND = Q/(\Sigma A \cdot h)$ , where 'Q' is the number of disector-counted cellular profiles, 'ΣA' is the area of the counting frame, and 'h' is the disector height of the optical disector (10 μm). For the numerical density of BLBP-immunopositive stem cells in the SGZ of the dentate gyrus, quantification was conducted according to the optical fractionator method as described above. For this study, APP/PS1 and WT mice from 4, 6 and 12 months of age were analyzed (n = 4/genotype/age; 7–9 sections per animal) using a counting frame of 22890 μm<sup>2</sup> with step lengths of 213.96 μm. Only BLBP-positive cells with a subgranular position and one elongated main process were included for quantification, distinguishing between thin and thick BLBP-stem cells (prolongation thickness with less or more than 1 μm, respectively). Other events as astrocyte-like cells, positive also for BLBP, were excluded (for detail see Fig. 5). The CE value for each individual animal ranged between 0.03 and 0.08.

To quantify tomato lectin/BrdU or GFAP/BrdU double labeled cells (cells/mm<sup>2</sup>) in 6-month-old APP/PS1 and WT mice confocal microscopy analysis was performed on serial sections (with 280 μm between sections) from -1.58 to -3.40 mm posterior of Bregma (n = 6 animals per group and genotype). The Z-stack images were taken at 40X magnification throughout the dentate gyrus, including the granular cell layer, subgranular zone, and hilus. All double-labeled cells were imaged using the lambda-strobing function to prevent non-specific cross-excitation of fluorophores. For comparative studies, identical laser and software settings were utilized for all analyzed sections. Z-stacks were stitched into one continuous 40X representation of the entire dentate gyrus for each slice.

Type-1 and type-2 cell quantification was carried out on nine of the forty-five serial toluidine blue-stained semithin sections (one out of each five sections, with a five-section interval between stained sections) per mouse and on three mice per group. Data are reported as the mean (± standard deviation, SD) of the number of type-1 cells and type-2 cells per millimeter square in the DG. The length measurements of DG sections were performed with the ImageTool program<sup>32</sup>.

**Western blot analysis.** Dissected hippocampi from 2-, 4-, 6- and 12-month-old APP/PS1 and WT mice were incubated in TriPure Isolation Reagent (Roche) to extract RNA. After that, protein pellets obtained from the TriPure Isolation Reagent- and isopropanol-mediated precipitation were resuspended in 4% SDS and 8 M urea (in 40 mM Tris-HCL, pH 7.4) and rotated overnight at room temperature to complete protein solubilization. Western blot analysis was performed as described<sup>50</sup>. Briefly, 5–20 μg of protein from the different samples were loaded onto a 12% Tris-Glycine-SDS-PAGE gel and transferred to nitrocellulose (Hybond-C Extra; Amersham). After blocking, membranes were incubated overnight at 4 °C in anti-DCX polyclonal goat antibody (1:1000 dilution; Santa Cruz Biotechnology) or the monoclonal 6E10 antibody (1:1500 dilution; Sigma-Aldrich) prepared in 5% non-fat milk. Membranes were then incubated in the corresponding horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibody (Dako, Denmark) at a dilution of 1:8000. Each blot was developed using the ECL-plus detection method (Amersham) and quantified using Image-Quant Las 4000 mini gold (GE Healthcare Bio-Sciences). For normalization purposes, proteins were first estimated by the Lowry protein assay and protein loading was corrected by beta-actin. Western blot images were analyzed using the PCBAS program. In each experiment, the intensity of DCX or Aβ was corrected by the corresponding beta-actin signal. For DCX quantification, data from 2-month-old WT mice were averaged and considered as 1 relative unit. All data from WT and APP/PS1 mice were then normalized to the specific signal observed in 2-month-old WT group. For Aβ quantification, averaged data from 4-month-old APP/PS1 mice was considered as 1 relative unit.

**Bv2 proliferation assay.** Bv2 microglial cells were grown (37 °C and 5% CO<sub>2</sub>) in RPMI 1640 supplemented with 2 mM glutamine, 10% (v/v) fetal bovine serum, plus penicillin/streptomycin (Biowest, France). For proliferation experiments, Bv2 cells were seeded onto a 24-well plate (45,000 cells/well, 12 h). The cells were serum-deprived for 8 h and then treated (12 h) with 1% (v/v) fetal bovine serum and PBS or 1 μM oligomeric Aβ(1–42) (AnaSpec; San Jose, CA, USA). Cell cycle analysis was assessed using the "PI/RNase Solution" detection kit (Immunostep; Salamanca, Spain) according to the manufacturer's recommendations. Briefly, cells were fixed in 70% ethanol and labeled with a propidium iodide solution (PI/RNase). Cells were analyzed using a FACSCanto II flow cytometer (BD Services, San Jose, CA, USA). The *S-phase cell ratio* was calculated as  $S/(G0-G1 + S + G2-M)$ ; and the *proliferation ratio index* was calculated as  $(S + G2-M)/(G0/G1 + S + G2-M)$ <sup>66</sup>.

**Plaque Loading.** Aβ42-immunostained dentate gyrus (DG) was observed under a Nikon Eclipse 80i microscope using a 4X objective, and images were acquired with a Nikon DS-5M high-resolution digital camera. The camera settings were adjusted at the start of the experiment and maintained for uniformity. Digital images (five sections/mouse from four different APP/PS1 mice per age group 4-, 6-, and 12-month-old) were analyzed using



Visilog 6.3 analysis program (Noesis, France). Immunopositive plaque area within the hilar region of the DG (where the amyloid plaques are mainly concentrated) was identified by bright-level threshold, the level of which was maintained throughout the experiment for uniformity. The grayscale image was converted to a binary image with plaque and DG areas identified. Plaque loading was defined as the percentage of total DG area immunostained for A $\beta$ 42. The hilus area in each 4x image was manually outlined. The plaque loading (%) for each mouse was estimated and defined as (sum plaque area measured/sum DG area analyzed)  $\times$  100. The sums were taken over all slides sampled, and a single plaque burden was computed for each mouse. The mean and standard deviation (SD) of the plaque loading were determined using all the available data. Quantitative comparisons were carried out on sections processed at the same time.

**Neurosphere cultures.** Briefly, neurospheres were obtained from the subventricular zone (SVZ) of WT mice (P7 post-natal). The SVZ tissue was digested in papain solution for 30 min in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. After that, neurosphere culture medium (NCM) was added to the plates with the SVZ tissue, and cells were dissociated using a glass pipette. Cells were then centrifuged for 5 min 300  $\times$  g at 4–8 °C, and the supernatant was removed. Next, cells were centrifuged for another 5 min and resuspended in 1 ml of NCM supplemented with growth factors, and then 100 cells/ $\mu$ l were plated in each well to perform the required experiments.

Immunodepletion experiments were conducted as previously described<sup>52</sup>. Briefly, 10  $\mu$ g of protein from soluble S1 fractions prepared from 6-month-old APP/PS1 mice hippocampal samples ( $n = 4$ ) were subjected to three sequential incubations (8–12 h at 4 °C) with 2  $\mu$ g of 6E10 bound to Protein G-Sepharose. After A $\beta$  immunodepletion, the S1 fractions were treated as above. As a control, the different S1 fractions were sequentially incubated with either Protein G-Sepharose or Protein A-Sepharose and tested in parallel experiments to the immunodepleted samples.

**Soluble protein extraction.** The soluble fractions (S1) were obtained by ultracentrifugation of the homogenates as previously described<sup>52, 63, 67, 68</sup>. Briefly, hippocampal tissue samples were homogenized (using a Dounce homogenizer) in cold isotonic buffer (0.32 M sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA; 20 mM Tris-HCl, pH 7.5; containing a cocktail of protease and phosphatase inhibitors, Sigma-Aldrich) and ultracentrifuged (Optima™ MAX Preparative Ultracentrifuge, Beckman Coulter) at 120,000  $\times$  g, 4 °C, for 60 min. Immediately after centrifugation, the samples were aliquoted and stored at –81 °C until use. The protein content in the soluble fractions was determined by the Lowry protein assay.

**Statistical analysis.** The data were subsequently analyzed by Student's t-test comparison or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's or Kruskal-Wallis test using GraphPad Prism software (GraphPad Prism Inc., San Diego, CA, USA). The significance was set at 95% of confidence. All values are presented as the mean  $\pm$  SD.

**Data availability statement.** The datasets analysed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## References

- Holtzman, D. M., Morris, J. C. & Goate, A. M. Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Sci Transl Med* **3**, 77sr71, doi:10.1126/scitranslmed.3002369 (2011).
- Querfurth, H. W. & LaFerla, F. M. Alzheimer's disease. *N Engl J Med* **362**, 329–344, doi:10.1056/NEJMra0909142 (2010).
- Winner, B. & Winkler, J. Adult neurogenesis in neurodegenerative diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, a021287, doi:10.1101/cshperspect.a021287 (2015).
- Ruan, L. *et al.* Neurogenesis in neurological and psychiatric diseases and brain injury: from bench to bedside. *Prog Neurobiol* **115**, 116–137, doi:10.1016/j.pneurobio.2013.12.006 (2014).
- Pan, Y. W., Storm, D. R. & Xia, Z. Role of adult neurogenesis in hippocampus-dependent memory, contextual fear extinction and remote contextual memory: new insights from ERK5 MAP kinase. *Neurobiol Learn Mem* **105**, 81–92, doi:10.1016/j.nlm.2013.07.011 (2013).
- Mu, Y. & Gage, F. H. Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. *Molecular neurodegeneration* **6**, 85, doi:10.1186/1750-1326-6-85 (2011).
- Sahay, A. *et al.* Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature* **472**, 466–470, doi:10.1038/nature09817 (2011).
- Coras, R. *et al.* Low proliferation and differentiation capacities of adult hippocampal stem cells correlate with memory dysfunction in humans. *Brain* **133**, 3359–3372, doi:10.1093/brain/awq215 (2010).
- Deng, W., Aimone, J. B. & Gage, F. H. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature reviews Neuroscience* **11**, 339–350, doi:10.1038/nrn2822 (2010).
- Aimone, J. B., Wiles, J. & Gage, F. H. Computational influence of adult neurogenesis on memory encoding. *Neuron* **61**, 187–202, doi:10.1016/j.neuron.2008.11.026 (2009).
- van Praag, H. *et al.* Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* **415**, 1030–1034, doi:10.1038/4151030a (2002).
- Goodman, T. *et al.* Young hippocampal neurons are critical for recent and remote spatial memory in adult mice. *Neuroscience* **171**, 769–778, doi:10.1016/j.neuroscience.2010.09.047 (2010).
- Shors, T. J. *et al.* Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* **410**, 372–376, doi:10.1038/35066584 (2001).
- van Praag, H., Kempermann, G. & Gage, F. H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature neuroscience* **2**, 266–270, doi:10.1038/6368 (1999).
- Kempermann, G., Kuhn, H. G. & Gage, F. H. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **18**, 3206–3212 (1998).
- Perry, E. K. *et al.* Neurogenic abnormalities in Alzheimer's disease differ between stages of neurogenesis and are partly related to cholinergic pathology. *Neurobiology of disease* **47**, 155–162, doi:10.1016/j.nbd.2012.03.033 (2012).
- Jin, K. *et al.* Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 343–347, doi:10.1073/pnas.2634794100 (2004).
- Marlatt, M. W. *et al.* Proliferation in the Alzheimer hippocampus is due to microglia, not astroglia, and occurs at sites of amyloid deposition. *Neural Plast* **2014**, 693851, doi:10.1155/2014/693851 (2014).



19. Ekonomou, A. *et al.* Stage-specific changes in neurogenic and glial markers in Alzheimer's disease. *Biological psychiatry* **77**, 711–719, doi:10.1016/j.biopsych.2014.05.021 (2015).
20. Crews, L. *et al.* Increased BMP6 levels in the brains of Alzheimer's disease patients and APP transgenic mice are accompanied by impaired neurogenesis. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **30**, 12252–12262, doi:10.1523/JNEUROSCI.1305-10.2010 (2010).
21. Li, B. *et al.* Failure of neuronal maturation in Alzheimer disease dentate gyrus. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **67**, 78–84, doi:10.1097/nen.0b013e318160c5db (2008).
22. Boekhoorn, K., Joels, M. & Lucassen, P. J. Increased proliferation reflects glial and vascular-associated changes, but not neurogenesis in the presenile Alzheimer hippocampus. *Neurobiology of disease* **24**, 1–14, doi:10.1016/j.nbd.2006.04.017 (2006).
23. Krezymon, A. *et al.* Modifications of hippocampal circuits and early disruption of adult neurogenesis in the tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *PloS one* **8**, e76497, doi:10.1371/journal.pone.0076497 (2013).
24. Demars, M., Hu, Y. S., Gadadhar, A. & Lazarov, O. Impaired neurogenesis is an early event in the etiology of familial Alzheimer's disease in transgenic mice. *J Neurosci Res* **88**, 2103–2117, doi:10.1002/jnr.22387 (2010).
25. Rodriguez, J. J. *et al.* Impaired adult neurogenesis in the dentate gyrus of a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *PloS one* **3**, e2935, doi:10.1371/journal.pone.0002935 (2008).
26. Verret, L., Jankowsky, J. L., Xu, G. M., Borchelt, D. R. & Rampon, C. Alzheimer's-type amyloidosis in transgenic mice impairs survival of newborn neurons derived from adult hippocampal neurogenesis. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **27**, 6771–6780, doi:10.1523/JNEUROSCI.5564-06.2007 (2007).
27. Marlatt, M. W., Potter, M. C., Bayer, T. A., van Praag, H. & Lucassen, P. J. Prolonged running, not fluoxetine treatment, increases neurogenesis, but does not alter neuropathology, in the 3xTg mouse model of Alzheimer's disease. *Curr Top Behav Neurosci* **15**, 313–340, doi:10.1007/7854\_2012\_237 (2013).
28. Yu, Y. *et al.* Increased hippocampal neurogenesis in the progressive stage of Alzheimer's disease phenotype in an APP/PS1 double transgenic mouse model. *Hippocampus* **19**, 1247–1253, doi:10.1002/hipo.20587 (2009).
29. Kolecki, R. *et al.* The effect of amyloidosis-beta and ageing on proliferation of neuronal progenitor cells in APP-transgenic mouse hippocampus and in culture. *Acta neuropathologica* **116**, 419–424, doi:10.1007/s00401-008-0380-4 (2008).
30. Gan, L. *et al.* Neurogenic responses to amyloid-beta plaques in the brain of Alzheimer's disease-like transgenic (pPDGF-APPsW,Ind) mice. *Neurobiol Dis* **29**, 71–80, doi:10.1016/j.nbd.2007.08.002 (2008).
31. von Bohlen Und Halbach, O. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res* **329**, 409–420, doi:10.1007/s00441-007-0432-4 (2007).
32. Seri, B., Garcia-Verdugo, J. M., Collado-Morente, L., McEwen, B. S. & Alvarez-Buylla, A. Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *The Journal of comparative neurology* **478**, 359–378, doi:10.1002/cne.20288 (2004).
33. Zhang, J. & Jiao, J. Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis. *Biomed Res Int* **2015**, 727542, doi:10.1155/2015/727542 (2015).
34. Nicola, Z., Fabel, K. & Kempermann, G. Development of the adult neurogenic niche in the hippocampus of mice. *Front Neuroanat* **9**, 53, doi:10.3389/fnana.2015.00053 (2015).
35. Sirerol-Piquer, M. *et al.* GSK3beta overexpression induces neuronal death and a depletion of the neurogenic niches in the dentate gyrus. *Hippocampus* **21**, 910–922, doi:10.1002/hipo.20805 (2011).
36. Naumann, N., Alpar, A., Ueberham, U., Arendt, T. & Gartner, U. Transgenic expression of human wild-type amyloid precursor protein decreases neurogenesis in the adult hippocampus. *Hippocampus* **20**, 971–979, doi:10.1002/hipo.20693 (2010).
37. Donovan, M. H. *et al.* Decreased adult hippocampal neurogenesis in the PDAPP mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of comparative neurology* **495**, 70–83, doi:10.1002/cne.20840 (2006).
38. Haughey, N. J. *et al.* Disruption of neurogenesis by amyloid beta-peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* **83**, 1509–1524 (2002).
39. Hamilton, A. & Holscher, C. The effect of ageing on neurogenesis and oxidative stress in the APP(swe)/PS1(deltaE9) mouse model of Alzheimer's disease. *Brain research* **1449**, 83–93, doi:10.1016/j.brainres.2012.02.015 (2012).
40. Biscaro, B., Lindvall, O., Hock, C., Ekdahl, C. T. & Nitsch, R. M. Abeta immunotherapy protects morphology and survival of adult-born neurons in doubly transgenic APP/PS1 mice. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **29**, 14108–14119, doi:10.1523/JNEUROSCI.2055-09.2009 (2009).
41. Ermini, F. V. *et al.* Neurogenesis and alterations of neural stem cells in mouse models of cerebral amyloidosis. *Am J Pathol* **172**, 1520–1528, doi:10.2353/ajpath.2008.060520 (2008).
42. Zhang, C., McNeil, E., Dressler, L. & Siman, R. Long-lasting impairment in hippocampal neurogenesis associated with amyloid deposition in a knock-in mouse model of familial Alzheimer's disease. *Exp Neurol* **204**, 77–87, doi:10.1016/j.expneurol.2006.09.018 (2007).
43. Goncalves, J. T., Schafer, S. T. & Gage, F. H. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell* **167**, 897–914, doi:10.1016/j.cell.2016.10.021 (2016).
44. Fuster-Matanzo, A. *et al.* Dual effects of increased glycogen synthase kinase-3beta activity on adult neurogenesis. *Hum Mol Genet* **22**, 1300–1315, doi:10.1093/hmg/dd533 (2013).
45. Karkkainen, V. *et al.* Nrf2 regulates neurogenesis and protects neural progenitor cells against Abeta toxicity. *Stem Cells* **32**, 1904–1916, doi:10.1002/stem.1666 (2014).
46. Kanemoto, S. *et al.* Proliferation, differentiation and amyloid-beta production in neural progenitor cells isolated from TgCRND8 mice. *Neuroscience* **261**, 52–59, doi:10.1016/j.neuroscience.2013.12.021 (2014).
47. He, N. *et al.* Amyloid-beta(1–42) oligomer accelerates senescence in adult hippocampal neural stem/progenitor cells via formylpeptide receptor 2. *Cell Death Dis* **4**, e924, doi:10.1038/cddis.2013.437 (2013).
48. Lee, I. S., Jung, K., Kim, I. S. & Park, K. I. Amyloid-beta oligomers regulate the properties of human neural stem cells through GSK-3beta signaling. *Exp Mol Med* **45**, e60, doi:10.1038/emm.2013.125 (2013).
49. Zhou, Z. D. *et al.* The roles of amyloid precursor protein (APP) in neurogenesis: Implications to pathogenesis and therapy of Alzheimer disease. *Cell Adh Migr* **5**, 280–292 (2011).
50. Trujillo-Estrada, L. *et al.* In vivo modification of Abeta plaque toxicity as a novel neuroprotective lithium-mediated therapy for Alzheimer's disease pathology. *Acta Neuropathol Commun* **1**, 73, doi:10.1186/2051-5960-1-73 (2013).
51. Moreno-Gonzalez, I. *et al.* Extracellular amyloid-beta and cytotoxic glial activation induce significant entorhinal neuron loss in young PS1(M146L)/APP(751SL) mice. *Journal of Alzheimer's disease: JAD* **18**, 755–776, doi:10.3233/JAD-2009-1192 (2009).
52. Jimenez, S. *et al.* Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **28**, 11650–11661, doi:10.1523/JNEUROSCI.3024-08.2008 (2008).
53. Jekabsone, A., Mander, P. K., Tickler, A., Sharpe, M. & Brown, G. C. Fibrillar beta-amyloid peptide Abeta1-40 activates microglial proliferation via stimulating TNF-alpha release and H2O2 derived from NADPH oxidase: a cell culture study. *J Neuroinflammation* **3**, 24, doi:10.1186/1742-2094-3-24 (2006).
54. Ito, S. *et al.* Amyloid-beta peptides induce cell proliferation and macrophage colony-stimulating factor expression via the PI3-kinase/Akt pathway in cultured Ra2 microglial cells. *FEBS Lett* **579**, 1995–2000, doi:10.1016/j.febslet.2005.02.048 (2005).
55. Ulrich, J. D., Ulland, T. K., Colonna, M. & Holtzman, D. M. Elucidating the Role of TREM2 in Alzheimer's Disease. *Neuron* **94**, 237–248, doi:10.1016/j.neuron.2017.02.042 (2017).

56. Jay, T. R. *et al.* Disease Progression-Dependent Effects of TREM2 Deficiency in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Neurosci* **37**, 637–647, doi:10.1523/JNEUROSCI.2110-16.2016 (2017).
57. Wang, Y. *et al.* TREM2-mediated early microglial response limits diffusion and toxicity of amyloid plaques. *J Exp Med* **213**, 667–675, doi:10.1084/jem.20151948 (2016).
58. Kamphuis, W., Orre, M., Kooijman, L., Dahmen, M. & Hol, E. M. Differential cell proliferation in the cortex of the APPswePS1dE9 Alzheimer's disease mouse model. *Glia* **60**, 615–629, doi:10.1002/glia.22295 (2012).
59. Serrano-Pozo, A., Gomez-Isla, T., Growdon, J. H., Frosch, M. P. & Hyman, B. T. A phenotypic change but not proliferation underlies glial responses in Alzheimer disease. *Am J Pathol* **182**, 2332–2344, doi:10.1016/j.ajpath.2013.02.031 (2013).
60. Anacker, C. & Hen, R. Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility - linking memory and mood. *Nat Rev Neurosci* **18**, 335–346, doi:10.1038/nrn.2017.45 (2017).
61. Lazarov, O. & Hollands, C. Hippocampal neurogenesis: Learning to remember. *Prog Neurobiol* **138–140**, 1–18, doi:10.1016/j.pneurobio.2015.12.006 (2016).
62. Forner, S., Baglietto-Vargas, D., Martini, A. C., Trujillo-Estrada, L. & LaFerla, F. M. Synaptic Impairment in Alzheimer's Disease: A Dysregulated Symphony. *Trends Neurosci* **40**, 347–357, doi:10.1016/j.tins.2017.04.002 (2017).
63. Sanchez-Varo, R. *et al.* Abnormal accumulation of autophagic vesicles correlates with axonal and synaptic pathology in young Alzheimer's mice hippocampus. *Acta Neuropathol* **123**, 53–70, doi:10.1007/s00401-011-0896-x (2012).
64. Baglietto-Vargas, D. *et al.* Calretinin interneurons are early targets of extracellular amyloid-beta pathology in PS1/AbetaPP Alzheimer mice hippocampus. *J Alzheimers Dis* **21**, 119–132, doi:10.3233/JAD-2010-100066 (2010).
65. Ramos, B. *et al.* Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1xAPP transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* **27**, 1658–1672, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.022 (2006).
66. Wan, L., Sun, Y., Zhang, F. & Ren, Y. Low-Dose Homocysteine Enhances Proliferation and Migration of Bv2 Microglia Cells. *Cell Mol Neurobiol* **36**, 1279–1289, doi:10.1007/s10571-015-0325-0 (2016).
67. Sanchez-Mejias, E. *et al.* Soluble phospho-tau from Alzheimer's disease hippocampus drives microglial degeneration. *Acta Neuropathol* **132**, 897–916, doi:10.1007/s00401-016-1630-5 (2016).
68. Jimenez, S. *et al.* Disruption of amyloid plaques integrity affects the soluble oligomers content from Alzheimer disease brains. *PLoS One* **9**, e114041, doi:10.1371/journal.pone.0114041 (2014).

## Acknowledgements

This study was supported by Institute of Health Carlos III (ISCIII, Spain) through grants PI12/01431, PI15/00796 (to AG) and PI12/01439, PI15/00957 (to JV) that were co-financed by FEDER funds from European Union, by Junta de Andalucía Proyecto de Excelencia CTS-2035 (to JV and AG), Alzheimer's Association NIRG-15-363477 (to DBV) and The Larry Hillblom Foundation #2013-A-016-FEL (to DBV). We want to thank to Sanofi (France) for providing us the transgenic models used in this study. We also thank Mercedes Aneiros for her expert technical assistance.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: D.B.V., J.V. and A.G. Performed the experiments: D.B.V., E.S.M., S.J., V.N., L.T.E., R.S.V., M.S.V. and A.G.A. Analysis of the data: D.B.V., L.T.E., J.M.G.V., J.V., A.G. Contributed to the writing of the manuscript: D.B.V., M.V., J.C.D., J.M.G.V., J.V., A.G.

## Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at doi:10.1038/s41598-017-10353-7

**Competing Interests:** The authors declare that they have no competing interests.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017



## **ANEXO 3**

**Trujillo-Estrada L, Davila JC, Sanchez-Mejias E, Sanchez-Varo R, Gomez-Arboledas A, Vizuete M, Vitorica J and Gutierrez A.** (2014). Early neuronal loss and axonal/presynaptic damage is associated with accelerated amyloid- $\beta$  accumulation in A $\beta$ PP/PS1 Alzheimer's disease mice subiculum. *Journal of Alzheimer's Disease.*, 42(2):521-541. DOI: 10.3233/JAD-140495





# Early Neuronal Loss and Axonal/Presynaptic Damage is Associated with Accelerated Amyloid- $\beta$ Accumulation in A $\beta$ PP/PS1 Alzheimer's Disease Mice Subiculum

Laura Trujillo-Estrada<sup>a,c</sup>, José Carlos Dávila<sup>a,c</sup>, Elisabeth Sánchez-Mejías<sup>a,c</sup>, Raquel Sánchez-Varo<sup>a,c</sup>, Angela Gomez-Arboledas<sup>a,c</sup>, Marisa Vizúete<sup>b,c,d</sup>, Javier Vitorica<sup>b,c,d,\*</sup> and Antonia Gutiérrez<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup>*Department Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Universidad de Málaga, Spain*

<sup>b</sup>*Department Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Spain*

<sup>c</sup>*Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Spain*

<sup>d</sup>*Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS)-Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Spain*

Handling Associate Editor: Javier S. Burgos Muñoz

Accepted 10 April 2014

**Abstract.** The progressive cognitive decline leading to dementia in Alzheimer's disease (AD) patients is the consequence of a severe loss of synapses and neurons affecting particular cell subpopulations in selected brain areas, with the subiculum being one of the earliest regions displaying severe atrophy and pathology. The lack of significant neuronal loss in most AD models is, in fact, the major shortcoming for the preclinical evaluation of drugs that could have greater potential in patients to alleviate or prevent this disease. In this study, using immunohistochemical and stereological approaches, we have analyzed the histopathological events in the subiculum of A $\beta$ PP751SwedLondon/PS1M146L mice, a transgenic model that displays neuronal vulnerability at early ages in hippocampus and entorhinal cortex. Our results indicate that the subiculum is the earliest affected region in the hippocampus, showing a selective early loss of both principal neurons (28%) and SOM-positive interneurons (69%). In addition, our data demonstrate the existence of an early axonal and synaptic pathology, which may represent the beginning of the synaptic disruption and loss. These neurodegenerative processes occur in parallel, and closely related, with the onset and accelerated progression of the extracellular amyloid- $\beta$  deposition, thus suggesting plaques as major contributors of neuronal/axonal damage. Data reported here indicate that this AD model displays a selective AD-like neurodegenerative phenotype in highly vulnerable regions, including the subiculum, and therefore can be a very useful model for testing the therapeutic ability of potential compounds to protect neurons and ameliorate disease symptoms.

**Keywords:** Alzheimer's disease, amyloid- $\beta$  plaques, axonal damage, hippocampus, neuronal loss, subiculum, transgenic mice

\*Correspondence to: Javier Vitorica, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, 41012 Sevilla, Spain. Tel.: +34 955923053; Email: vitorica@us.es; Antonia Gutiérrez, Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29071 Málaga, Spain. Tel.: +34 952133344; E-mail: agutierrez@uma.es.

<sup>1</sup>These authors are co-senior authors.

ISSN 1387-2877/14/\$27.50 © 2014 – IOS Press and the authors. All rights reserved

This article is published online with Open Access and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License.

## INTRODUCTION

The progressive cognitive decline that ultimately leads to dementia in Alzheimer's disease (AD) is consequence of a severe loss of synapses and neurons that selectively affects particular cell subpopulations in brain areas critical for learning and memory [1–6]. Although transgenic mice, based on the overexpression of proteins harboring one or several mutations found in familial AD, progressively develop amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) deposits and tau hyperphosphorylation, along with dystrophic neurites and activated astrocytes and microglia, very limited or no neuronal death has been reported in vulnerable brain areas of these AD models [7–10]. This lack of significant neuronal loss is, in fact, the major shortcoming of AD models for the preclinical evaluation of drugs that could have greater potential in patients to alleviate or prevent this disease. Therefore, the characterization of the neurodegenerative phenotype of AD models is a critical step in ensuring success for translating therapeutic efficacy.

The hippocampal formation, a key structure of the medial temporal lobe memory system and one of the earliest regions to be affected in AD, consists of a number of subdivisions including the dentate gyrus, the hippocampus proper (areas CA1 and CA3), the entorhinal cortex, and the subiculum [11–13]. Marked neuronal reduction occurs in the hippocampal formation of AD patients [14–21]. Even in mild AD, a marked neuronal loss can be found in the entorhinal cortex and hippocampus [2, 4], and these changes result in decreased volume of these brain areas [22, 23]. Unlike most transgenic animal models, which do not exhibit the neurodegenerative spectrum of disease observed in the patient population, in the A $\beta$ PP751SweLondon/PS1M146L (A $\beta$ PP/PS1) mice we have previously reported a selective and significant neuronal loss in the hippocampus proper, dentate gyrus, and entorhinal cortex. Subpopulations of GABAergic interneurons were selectively affected at early ages in hippocampal CA fields and dentate gyrus [24, 25] as well as entorhinal cortex [26]. However, pyramidal neurons were first affected in entorhinal cortex [26] and then later in CA1 hippocampus [27], similarly to the pathological pattern described in patients [2, 28, 29]. The loss of these neurons was associated with the prominent extracellular amyloid pathology along with the age-dependent increase in the soluble oligomeric A $\beta$  content and/or the induced cytotoxic inflammatory response [27, 30].

In contrast to the rest of the hippocampal formation, the subiculum has received comparatively little

investigation in the AD field. The subiculum is the principal target of the CA1 pyramidal cells and serves as the major output structure of the hippocampal formation to widespread subcortical and cortical areas (for review, see [31]). In AD patients, the subiculum is among the earliest regions displaying severe atrophy and pathology [1, 16, 18, 32–37]. Loss of the subicular neurons has been reported to be associated with clinical AD [19, 21]. Thus, damaged hippocampal–cortical and hippocampal–subcortical communication might be significant for the memory impairment seen in patients. In AD models, tremendous attention has been focused on hippocampal (CA fields and dentate gyrus) pathology, however very few studies comment specifically on subiculum neurodegeneration so far [38, 39].

Here we have characterized the histopathological events in the subiculum of the A $\beta$ PP751SweLondon/PS1M146L model by immunohistochemistry and stereological approaches to detect changes in the number of neurons. Our data indicate that the subiculum is the earliest affected hippocampal region showing a selective loss of both principal cells and SOM-positive interneurons at an early age (4–6 months) in parallel with an early onset of extracellular amyloid deposits and prominent axonal damage. The most relevant feature of this model is the selective AD-like neurodegenerative phenotype in highly AD-vulnerable regions. Therefore, this model can be very useful for testing the therapeutic ability of potential compounds to protect neurons and ameliorate disease symptoms due to this neurodegenerative phenotype.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Male transgenic mice expressing familial AD-causing mutations in the A $\beta$ PP and PS1 genes were used in this study [40]. The bigenic mice were obtained by crossing homozygous mice expressing human mutant PS1M146L (under HMG-CoA reductase promoter) to hemizygous mice expressing human mutant A $\beta$ PP751 carrying the Swedish (KM670/671NL) and London (V717I) mutations (under the control of the Thy1 promoter). Mice represented F6–F10 offspring of heterozygous transgenic mice. Non-transgenic mice (WT) of the same genetic background (C57BL/6) and age were also used. All animal experiments were carried out in accordance with the European Union regulations (Council Directive 86/609/ECC of November 24th, 1986) and approved by the committee of

animal use for research at Malaga University, Spain (RD 1201/2005 of October 10th, 2005).

#### Tissue preparation

After deep anesthesia with sodium pentobarbital (60 mg/kg), 2, 4, 6, 12 and 18-month-old, A $\beta$ PP/PS1, PS1, and WT mice ( $n=6$ /age/genotype) were perfused transcardially with 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4 followed by 4% paraformaldehyde, 75 mM lysine, 10 mM sodium metaperiodate in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4. Brains were then removed, post-fixed overnight in the same fixative solution at 4°C, cryoprotected in 30% sucrose, sectioned at 40  $\mu$ m thickness in the coronal plane on a freezing microtome, and serially collected in wells containing cold PBS and 0.02% sodium azide (each series contained sections that represented 1/7th of the total brain).

#### Immunohistochemistry

Serial sections from A $\beta$ PP/PS1, PS1, and WT mice were assayed simultaneously for light and confocal microscopy immunohistochemistry using same batches of solutions to minimize variability in immunolabeling conditions as previously reported [24–26, 41]. Free-floating sections were first pre-treated with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/3% methanol in PBS pH 7.4 for 20 min to inhibit endogenous peroxidase, and then with avidin- biotin Blocking Kit (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) for 30 min to block endogenous avidin, biotin and biotin-binding proteins. For single immunolabeling, sections were incubated overnight at room temperature with one of the following primary antibodies: anti-somatostatin (SOM) goat polyclonal (1:1000 dilution; Santa Cruz Biotechnology); anti-parvalbumin (PV) rabbit polyclonal (1/5000 dilution, Swant); anti-human amyloid- $\beta$  protein precursor (hA $\beta$ PP) rabbit polyclonal (1/20000; Sigma) or goat polyclonal (1/20000; Meridian life sciences); anti-A $\beta$  mouse monoclonal 6E10 (1:1500 dilution; Sigma); anti-A $\beta$ <sub>42</sub> rabbit polyclonal (1/5000; Millipore); anti-oligomeric A $\beta$  (OC) rabbit polyclonal (1/5000; Millipore); anti-synaptophysin (Syn) rabbit polyclonal (1:1000 dilution; Abcam); anti-MAP-2 rabbit polyclonal (1/5000 dilution; Chemicon); anti-neurofilament rabbit polyclonal (1/5000 dilution; Chemicon), anti-VGluT1 guinea pig polyclonal (1/10000 dilution; Chemicon); anti-VGAT guinea pig polyclonal (1/5000 dilution; Calbiochem); anti-LC3 rabbit polyclonal (1/1000 dilution; Cell Signaling);

anti-ubiquitin rabbit polyclonal (1/5000 dilution; Dako); anti-phospho-tau (AT8) mouse monoclonal (1/250 dilution; Pierce); anti-cathepsin D (Cat-D) goat polyclonal (1/100 dilution; Santa Cruz Biotechnology); anti-choline acetyltransferase (ChAT) goat polyclonal (1/1000 dilution; Millipore) over 24, 48, or 72 h at room temperature. To retrieve intracellular A $\beta$ , sections were pre-treated for 7 min with 85% formic acid before incubation with the anti-A $\beta$  antibodies. For general antigen retrieval method sections were previously heated at 80°C for 20 min in 50 mM citrate buffer pH 6.0. The tissue-bound primary antibody was detected by incubating with the corresponding biotinylated secondary antibody (1:500 dilution, Vector Laboratories), and then followed by 1:2000 streptavidin-conjugated horseradish peroxidase (Sigma Aldrich). The peroxidase reaction was visualized with 0.05% 3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), 0.03% nickel ammonium sulphate, and 0.01% hydrogen peroxide in PBS. Specificity of the immune reactions was controlled by omitting the primary antisera. After DAB, some immunolabeled sections were incubated 3 min in a solution of 20% of Congo red. Sections were then mounted onto gelatin-coated slides, dehydrated in graded ethanol, cleared in xylene and coverslipped with DPX (BDH) mounting medium.

For double A $\beta$ <sub>42</sub>/Cat-D, A $\beta$ <sub>42</sub>/hA $\beta$ PP, A $\beta$ <sub>42</sub>/Syn, hA $\beta$ PP/SOM, or hA $\beta$ PP/VGluT1 immunofluorescence labeling, sections were first sequentially incubated with the indicated primaries antibodies followed by the corresponding Alexa488/568 secondary antibodies (1:1000 dilution; Invitrogen). Sections were examined under a confocal laser microscope (Leica SP5 II).

For pyramidal cell discrimination, we used a 5 $\times$  immunohistochemical approach previously reported [26]. Sections were first and sequentially incubated with the following interneuron markers: anti-SOM goat polyclonal (1:1000, Santa Cruz), anti-Calretinin (CR) rabbit polyclonal (1:5000 dilution; Swant), anti-VIP rabbit polyclonal (1:5000 dilution, Acris), anti-PV rabbit polyclonal (1/5000 dilution, Swant) as described above. After the DAB-nickel reaction (dark blue end product), sections were then incubated 3 days with the neuronal marker anti-NeuN monoclonal antibody (1:1000 dilution; Chemicon). The second immunoperoxidase reaction was developed with DAB only (brown reaction end product). The appropriate controls were performed to avoid any false positive immunostaining due to cross-reactivity between detection systems. To clearly discriminate the different streptavidin-

peroxidase reactions, the first one (for interneurons) was always developed with DAB-nickel (dark blue) solution whereas the second one (NeuN) only with DAB (light brown). Moreover, the different compartment localization of interneuron (cytoplasm) and NeuN (nuclei) epitopes completely guarantee the correct non-overlapped visualization of both reactions and the interpretation of the results.

#### *Thioflavin-S staining*

Free-floating sections were incubated for 5 min with 0.015% Thio-S (Sigma) in 50% ethanol, and then washed in 50% ethanol, in PBS, mounted onto gelatin coated slides and coverslipped with 0.1 M PBS containing 50% glycerin and 3% triethylenediamine.

#### *Plaque loading quantification*

Plaque loading was defined as percentage of total subicular area stained for A $\beta$ . Quantification of extracellular A $\beta$  content was performed as previously reported [26]. Thioflavin-S staining was examined under an Olympus BX-61 epifluorescent microscope using FITC filter and 4 $\times$  objective. Images were acquired with an Olympus DP71 high-resolution digital camera using the Cell-A program (Olympus). The camera settings were adjusted at the start of the experiment and maintained for uniformity. Digital images (4 sections/mouse) from 2, 4, 6, and 12-month old A $\beta$ PP/PS1 mice ( $n=4/\text{age}$ ) were analyzed using Visilog 6.3 analysis program (Noesis, France). The plaque area (Thioflavin-S positive) within the subiculum was identified by level threshold which was maintained throughout the experiment for uniformity. The color images were converted to binary images with plaques. The subicular area in each 4 $\times$  image was manually outlined. The plaque loading (%) for each transgenic mouse was estimated and defined as (sum plaque area measured/sum subicular area analyzed) $\times$  100. The sums were taken over all slides sampled and a single plaque burden was computed for each mouse. The mean and standard deviation (SD) of the plaque loading were determined using all the available data. Quantitative comparisons were carried out on sections processed at the same time with same batches of solutions.

#### *Plaque size morphometric analysis*

Four coronal sections stained with Thioflavin-S from 2 ( $n=5$ ), 4 ( $n=5$ ), 6 ( $n=5$ ), and 12-month-old

( $n=5$ ) A $\beta$ PP/PS1 mice were analyzed using the nucleator method with isotropic probes by the NewCAST software package from Olympus stereological system. Subiculum was analyzed using a counting frame of 6022.8  $\mu\text{m}^2$  and step length of 173.53  $\mu\text{m}$ . For individual plaque measurement, a 40 $\times$  objective was used. Number of plaques/ $\text{mm}^2$  falling into four surface categories (ranging from  $<200 \mu\text{m}^2$  to  $>2000 \mu\text{m}^2$ ) was calculated. Each analysis was done by a single examiner blinded to sample identities.

#### *Stereological analysis*

Immunopositive cells for SOM, PV, or NeuN belonging to the different animal groups (WT, PS1, and A $\beta$ PP/PS1) and ages (2, 4, 6, 12, or 18 months) were quantified ( $n=5-6/\text{age}/\text{group}$ ). Briefly, the quantitative analyses were performed using an Olympus BX61 microscope interfaced with a computer and a Olympus DP71 digital camera, and the NewCAST (Computer Assisted Stereological Toolbox) software package (Olympus, Denmark). The number of neurons was quantified in every 7th section (with a distance of 280  $\mu\text{m}$  between sections) through the rostrocaudal extent of the subiculum (between  $-2.46 \text{ mm}$  anterior and  $-4.60 \text{ mm}$  posterior to Bregman coordinates, according to the atlas of Franklin and Paxinos [42]). An average of 6-7 sections was measured in each animal. The subicular area was defined using a 4 $\times$  objective and the number of neurons was counted using a 100 $\times$ /1.35 objective. We used a counting frame of 902.52  $\mu\text{m}^2$  with step lengths of 46.98  $\mu\text{m}$  for SOM and 95  $\mu\text{m}$  for NeuN counting. The numerical density (ND; cells/ $\text{mm}^3$ ) was estimated using the following formula:  $\text{ND} = Q/(\Sigma A * h)$ , where 'Q' is the number of dissector-counted somatic profiles, ' $\Sigma A$ ' is the area of the counting frame, and 'h' is the height of the optical dissector (10  $\mu\text{m}$ ). The precision of the individual estimations is expressed by the coefficient of error (CE) [43] calculated using the following formula:  $\text{CE} = 1/Q \times (3A - 4B + C/12) / 2$ , where  $A = \Sigma Q_i$ ,  $B = \Sigma Q_i \times Q_{i+1}$ ,  $C = \Sigma Q_i \times Q_{i+2}$ . The CEs ranged between 0.07 and 0.1. An investigator who was blind to the experimental conditions (age, genotype, and marker) performed neuronal profile counting.

#### *Co-localization analysis*

Double immunopositive subicular cells for A $\beta_{42}$  and Cat-D or for A $\beta_{42}$  and hA $\beta$ PP were analyzed to determine the extent of colocalization between both couple of markers in 2 month-old A $\beta$ PP/PS1

animals. Confocal images of  $1,024 \times 1,024$  pixels were acquired by using a Leica SP5 II confocal microscope and a  $40\times$  objective. A total of 30 (A $\beta_{42}$ /Cat-D) to 50 (A $\beta_{42}$ /hA $\beta$ PP) cells were randomly photographed ( $n=3$ ). Laser settings were adjusted at the start of the experiment and maintained for uniformity. Images were analyzed using LAS AF Lite program (Leica). For A $\beta_{42}$ /Cathepsin-D quantification we considered the number of A $\beta_{42}$  points that were cathepsin-D positives. For A $\beta_{42}$ /hA $\beta$ PP quantification, we determined the area of A $\beta_{42}$  which co-localized with hA $\beta$ PP.

#### Electron microscopy

Fixed brains (see above) from 4–6 month-old mice were sectioned at  $50\ \mu\text{m}$  or  $250\ \mu\text{m}$  thickness in the coronal plane on a vibratome (Leica VT1000S) and serially collected in wells containing cold PB and 0.02% sodium azide. For standard electron microscopy, the  $250\ \mu\text{m}$ -thick sections were postfixed in 1% osmium tetroxide in 0.1 M PB, block stained with uranyl acetate, dehydrated in acetone, and flat embedded in Araldite (EMS, USA). Selected areas were cut in ultrathin sections and examined with an electron microscope (JEOL JEM1400).

For the immunogold labeling, the  $50\ \mu\text{m}$  sections were first washed with PBS and incubated in a 50 mM glycine solution 5 min in order to increase the antibody binding efficiency. Following the standard immunohistochemical protocol, the tissue was incubated 48 h in primary rabbit polyclonal antibody anti-A $\beta$  (1/5000; Millipore) in a PBS 0.1M/0.02%Tx-100/1% BSA solution at  $22^\circ\text{C}$ . Then, sections were washed in PBS, and incubated with 1.4 nm gold-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:100; Nanoprobes) overnight at  $22^\circ\text{C}$ . After postfixing with 2% glutaraldehyde and washing with 50 mM sodium citrate, the labelling was enhanced with the HQ Silver<sup>TM</sup> Kit (Nanoprobes), and gold toned. Finally, the immunolabeled sections were processed as above by the osmium fixation, dehydration and embedding steps. In negative control experiments, the primary antibody was omitted.

#### Statistical analysis

Data was expressed as mean  $\pm$  SD. The comparison between two mice groups (WT and A $\beta$ PP/PS1 mice or PS1 and A $\beta$ PP/PS1 transgenic mice) was done by two-tailed *t*-test, and for comparing several groups (WT, PS1, and A $\beta$ PP/PS1 mice) and ages, we used one-way ANOVA, followed by Tukey *post-hoc* multiple comparison test (SigmaStat<sup>®</sup> 2.03, SPSS Inc).

In both cases, the significance was set at 95% of confidence.

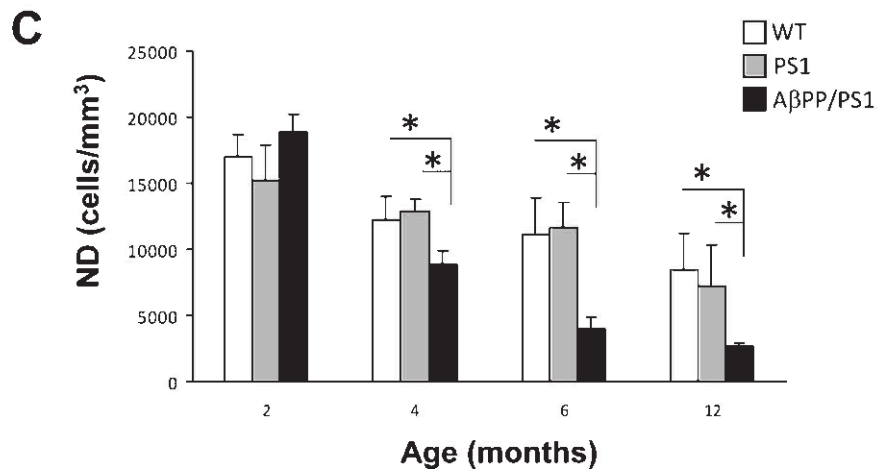
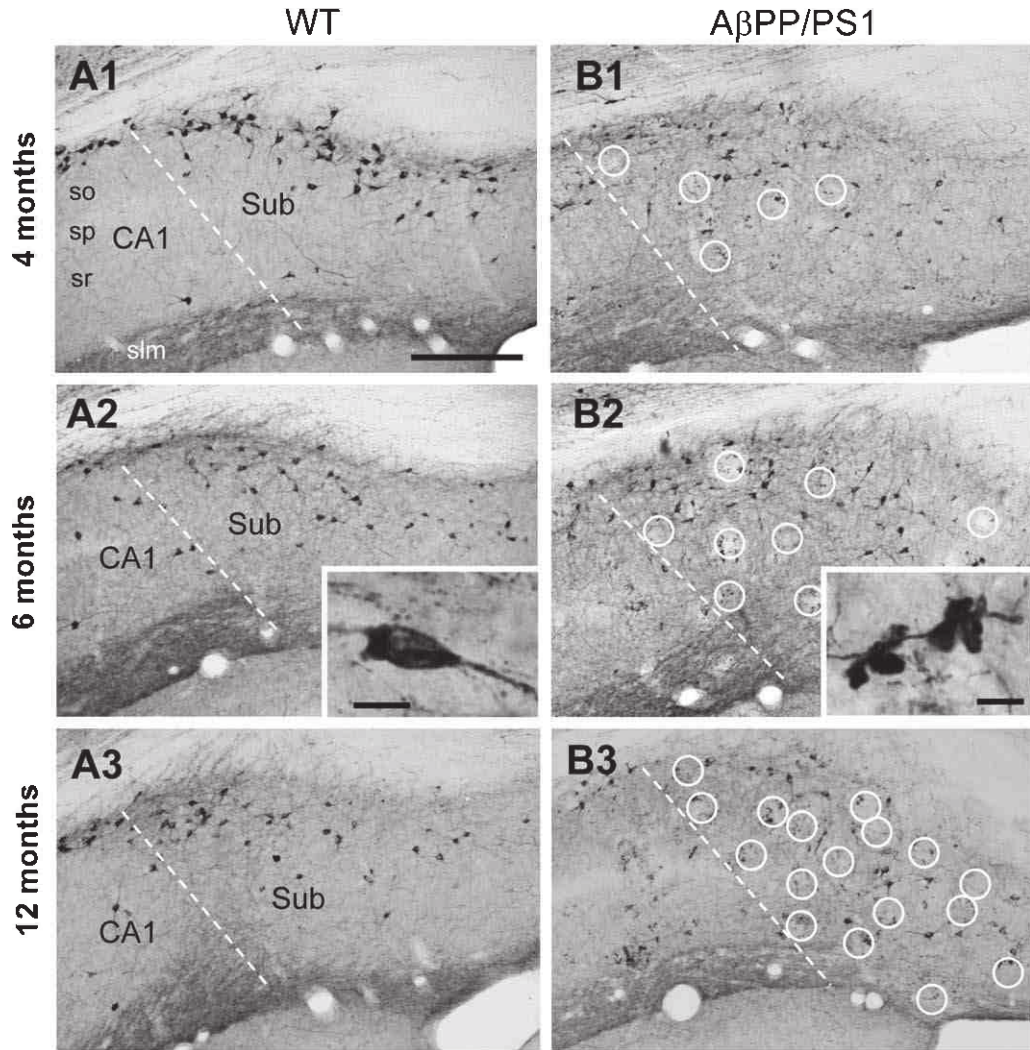
## RESULTS

### *Selective loss of subicular interneurons at early ages*

We have first determined the numerical density of SOM-immunostained neurons in the subiculum (including pro-subiculum) of A $\beta$ PP/PS1 at 2, 4, 6 and 12 months of age and compared to age-matched PS1 and WT mice. The initial immunohistochemical analysis showed that the majority of subicular SOM-containing cells were located in the deep pyramidal cell layer and in the polymorphic layer (Fig. 1A1–A3). These interneurons (see inset in Fig. 1A2), corresponding to O-LM cells of hippocampal sector CA1, innervate the distal apical dendrites of pyramidal neurons in the outer molecular layer which receives the main excitatory input from layer III of the medial entorhinal cortex. WT and PS1 animals displayed a similar pattern of SOM-immunolabeling. However, A $\beta$ PP/PS1 mice (Fig. 1B1–B3) showed a reduced number of labeled somata since early ages (4–6 months) and the presence of numerous SOM-positive dystrophic neurites (see inset in Fig. 1B2), mostly located around amyloid plaques. The stereological study (Fig. 1C) demonstrated a significant decrease ( $27.17 \pm 8.50\%$ , Tukey  $p < 0.05$ ) in the numerical density (neurons/ $\text{mm}^3$ ) of SOM-positive cells in A $\beta$ PP/PS1 mice at 4 months of age compared to age-matched WT group. This decrease was much more marked at 6 months of age ( $69.37 \pm 8.53\%$ , Tukey  $p < 0.05$ ). No further decrease was detected at 12 month-old ( $69.15 \pm 3.05\%$ , Tukey  $p < 0.05$ ). PS1 group did not show changes respect to WT group at any age tested. These data were in line with our previous reports showing a significant loss of SOM interneurons in the hippocampus proper (CA1–CA3 and dentate gyrus) and entorhinal cortex of our A $\beta$ PP/PS1 model at 6 months of age [25, 26].

We have also analyzed whether another major interneuron population, the cells expressing the calcium binding protein parvalbumin (PV) which include basket and axo-axonic GABAergic neurons, was also early affected in the subiculum of our AD model. PV-positive interneurons were present throughout the principal cell layer of the subiculum (Fig. 2A–B). We have not found significant differences in the numerical density (Fig. 2C) of this GABA population at 6 months of age between A $\beta$ PP/PS1 ( $8415.58 \pm 1429.79$ ) and





WT ( $10721.93 \pm 3057.86$ ) mice and neither at the advanced age of 18 month-old ( $7556.79 \pm 1033.90$  versus  $9136.28 \pm 1205.44$  for A $\beta$ PP/PS1 and WT mice, respectively). Moreover, and unlike SOM-cells, the neuronal population positive for PV did not develop dystrophic neurites with the progression of age. In fact, even the PV-immunopositive processes and somata that were located in the very near proximity of amyloid plaques displayed a normal morphology (see Fig. 2B2).

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

#### Loss of subicular principal neurons at early ages

Though in this AD model the loss of hippocampal principal neurons is a late event (17–18 months of age) [27, 44], in the entorhinal cortex pyramidal neurodegeneration begins at an early age (6 months) [26]. Therefore, we next examined whether subicular principal neurons were also affected early by determining their numerical density at 2 and 6 months of age in comparison with age-matched PS1 and WT animals. To specifically distinguish principal cells from interneurons, we have performed a multiple immunoperoxidase labeling approach as previously reported ( $5 \times$  immunolabeling) [26]. Principal cells were discriminated by a single NeuN-nuclei labeling in light brown color whereas interneurons (those expressing SOM/PV/CR/VIP alone or in combination) displayed also a dark-blue cytoplasmic labeling (see Fig. 3 and for details see insets).

As shown in Fig. 3, the microscopic observation of the  $5 \times$  immunolabeled sections at 2 and 6 months of age revealed no qualitative differences in the immunostaining pattern and cell distribution between A $\beta$ PP/PS1 and PS1 or WT animals. Small rounded areas devoid of cells and characterized by the presence

of dystrophic neurites (in this case only GABAergic dystrophies), which corresponded to areas occupied by amyloid plaques, were easily detected in A $\beta$ PP/PS1 animals, few plaques at 2 months (Fig. 3A3) and more numerous at 6 months of age (Fig. 3B3), as expected. The quantitative stereological study (Fig. 3C) revealed a significant ( $-28.04 \pm 11.76\%$ ;  $p < 0.05$ ) principal cell loss in A $\beta$ PP/PS1 mice (compared to PS1 and non-transgenic littermates) at 6 months of age. No differences were detected at 2 months of age. These data demonstrated that principal subicular neurons were vulnerable at early ages and the first hippocampal pyramidal neurons to be affected by the course of the disease.

#### Accelerated intra- and extracellular A $\beta$ accumulation in the subiculum

Considering the toxic effect of A $\beta$  accumulation on neuronal survival we next investigated the temporal intra/extracellular expression of A $\beta$  in the subiculum of the double transgenic model from 2 to 12 months of age by A $\beta_{42}$  immunohistochemistry (Fig. 4). Similar results were obtained with the OC antibody for the oligomeric forms of A $\beta$  (results not shown). As shown in the panoramic images (Fig. 4A–C), the subiculum is one of the earliest forebrain regions to express and accumulate A $\beta$ . At 2 months of age the presence of intracellular A $\beta$  was clearly seen in subicular neurons which presented a strong punctuate immunolabeling (Fig. 4A, D, and for a detail see inset in D). We did not check in younger animals, but most probably the intracellular A $\beta$  accumulation in subiculum started before 2 months of age. The formation of extracellular A $\beta$  deposits was also first observed in this area at 2 months of age; however the number of plaques was really low indicating that the onset of extracellular amyloid pathology was at the initial stage. At 4 months, numerous plaques were already formed in the subiculum (Fig. 4E) and further on the number and size of these deposits significantly increased, as shown here for 6 and 12 months of age (Fig. 4F and G, respectively). As

Fig. 1. Significant reduction of subicular SOM-interneurons in A $\beta$ PP/PS1 mice at early ages. Light microscopy images of SOM immunoreactivity in the subiculum of WT (A1–A3) and A $\beta$ PP/PS1 (B1–B3) mice at 4, 6 and 12 months of age. SOM-positive neurons were located in the deep pyramidal cell layer and in the polymorphic layer (an immunoreactive neuron is shown at higher magnification in A2 inset). A decrease in the number of immunoreactive somata was observed in A $\beta$ PP/PS1 mice. Abundant immunoreactive dystrophic neurites (higher magnification detail is shown in B2 inset) were seen associated to amyloid plaques (indicated with open white circles) in the double transgenic mice. The number of dystrophies clearly increased with age. Stereological quantification (C) of SOM-positive neurons in WT, PS1, and A $\beta$ PP/PS1 mice at 2, 4, 6 and 12 months of age ( $n = 4$  per genotype and age). Results showed a significant decrease in the density of SOM-immunoreactive somata (cells/mm<sup>3</sup>) in A $\beta$ PP/PS1 mice compared to WT-PS1 since 4 months of age. Data (mean  $\pm$  SD) was analyzed by one-way ANOVA  $p < 0.01$  ( $F(14,24) = 24,3$ ), followed by Tukey *post-hoc* multiple comparison test. Significance ( $*p < 0.05$ ) was indicated in the figure. No differences were detected between PS1 and WT animals. Scale bars, A1–A3 and B1–B3, 200  $\mu$ m; insets 14  $\mu$ m.

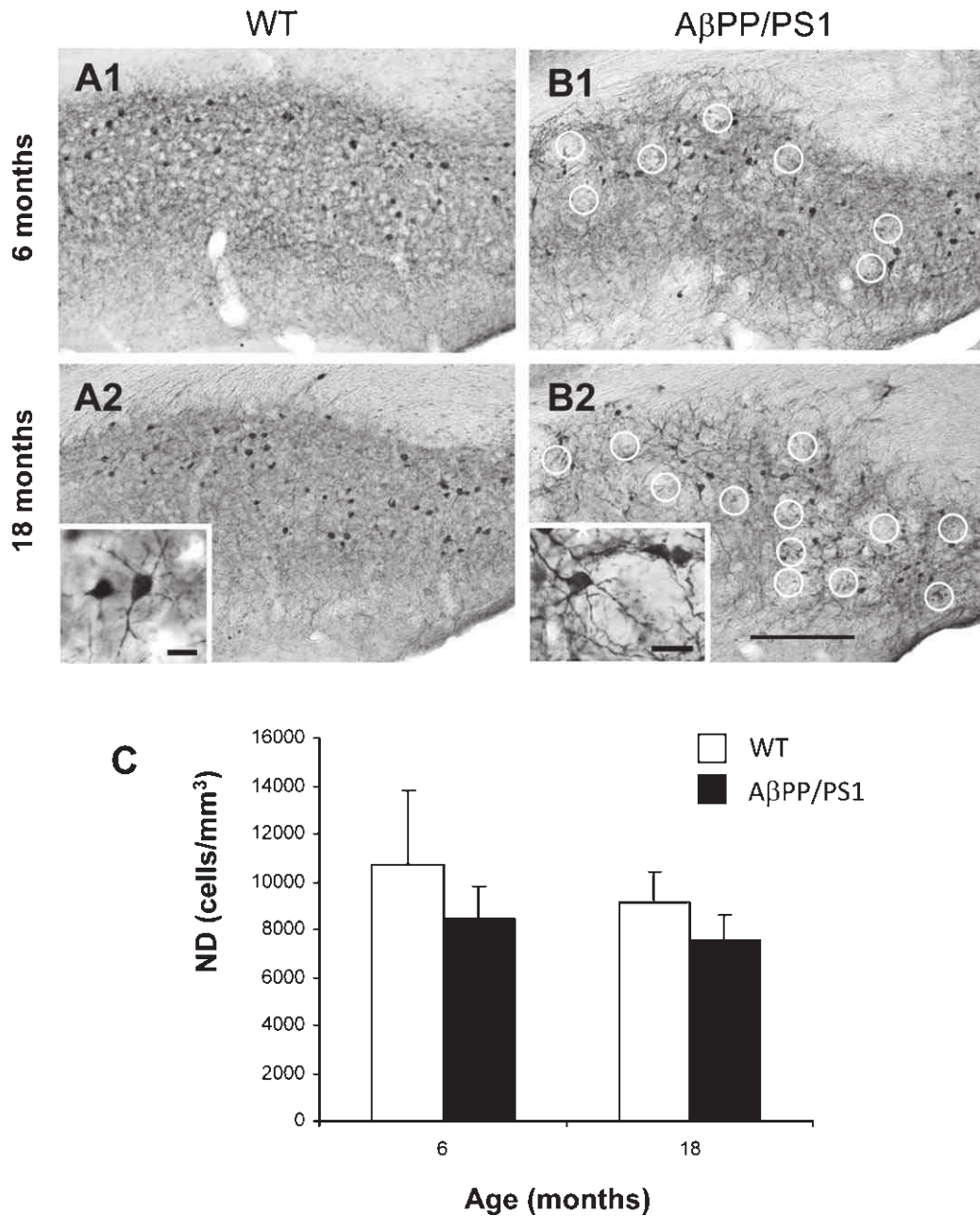


Fig. 2. PV-interneurons are resistant to neurodegeneration in A $\beta$ PP/PS1 subiculum. Light microscopy images of PV immunoreactivity in the subiculum of WT (A1 and A2) and A $\beta$ PP/PS1 (B1 and B2) at 6 and 18 months of age. No changes were detected between both genotypes in the number and morphology of these inhibitory neurons. Immunolabeled PV-neurons are shown at higher magnification in A2 inset. PV-neurons located near A $\beta$  plaques in A $\beta$ PP/PS1 mice displayed normal morphology as shown in B2 inset. Open white circles indicate areas occupied by A $\beta$  plaques (not stained) in A $\beta$ PP/PS1 subiculum. Stereological quantification (C) of PV-positive neurons (cells/mm<sup>3</sup>) at 6 and 18 months of age in WT and A $\beta$ PP/PS1 mice revealed no significant differences between the genotypes at the two ages examined. Scale bars, A1, A2, B1 and B2, 200  $\mu$ m; insets 14  $\mu$ m.

rapidly increased the extracellular accumulation of A $\beta$  the presence of intraneuronal A $\beta$  in the somata tended to decrease. In fact, it was really difficult to distinguish A $\beta$ -positive somata at light microscopy from 6 months

onward due to the high amount of extracellular amyloid deposits occupying the subiculum.

To quantitatively compare the extracellular amyloid progression with age in the subiculum with other



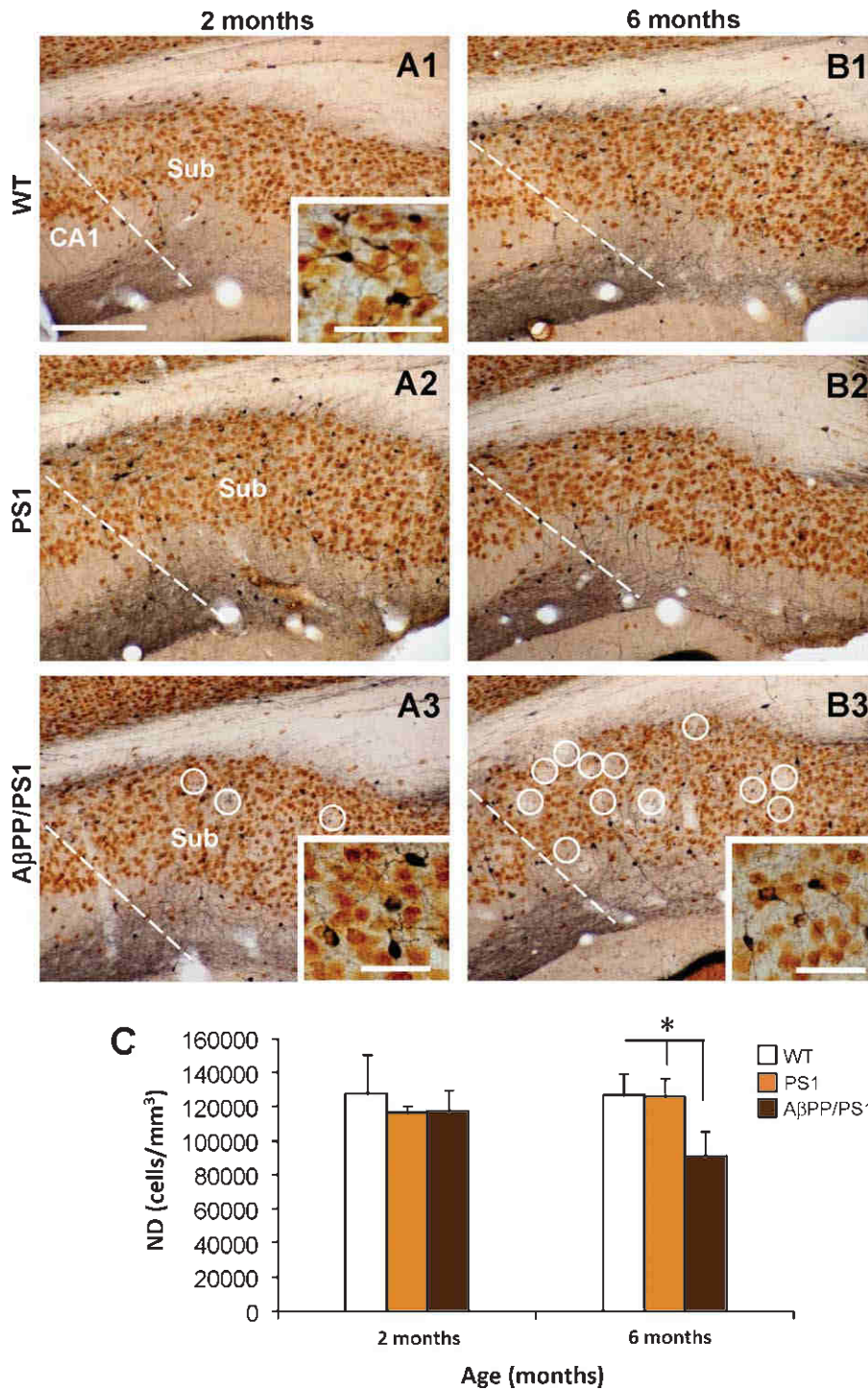


Fig. 3. Loss of principal neurons in the A $\beta$ PP/PS1 subiculum at early ages. Multiple 5 $\times$  (SOM, PV, CR, VIP and NeuN)-immunolabeling in the subiculum, of WT (A1 and B1), PS1 (A2 and B2), and A $\beta$ PP/PS1 (A3 and B3) mice at 2 and 6 months of age. Principal neurons (single NeuN-labeled cells in brown color) were immunohistochemically differentiated from interneurons (SOM/PV/CR/VIP-labeled cells in dark blue color) as seen in the higher magnification images of the insets. Stereological counts (C) of principal cells revealed a significant (two tailed *t*-test,  $p < 0.05$ ) decrease in the density (neurons/mm<sup>3</sup>) of this cell population in the A $\beta$ PP/PS1 subiculum compared to age-matched WT or PS1 mice at 6 months of age. No differences were found at 2 months of age. Data are given as mean + SD. Open white circles indicated amyloid plaques location in the A $\beta$ PP/PS1 subiculum. Scale bars, A1–A3 and B1–B3, 200  $\mu$ m; insets in A1 and A3, 100  $\mu$ m; inset in B3, 50  $\mu$ m.

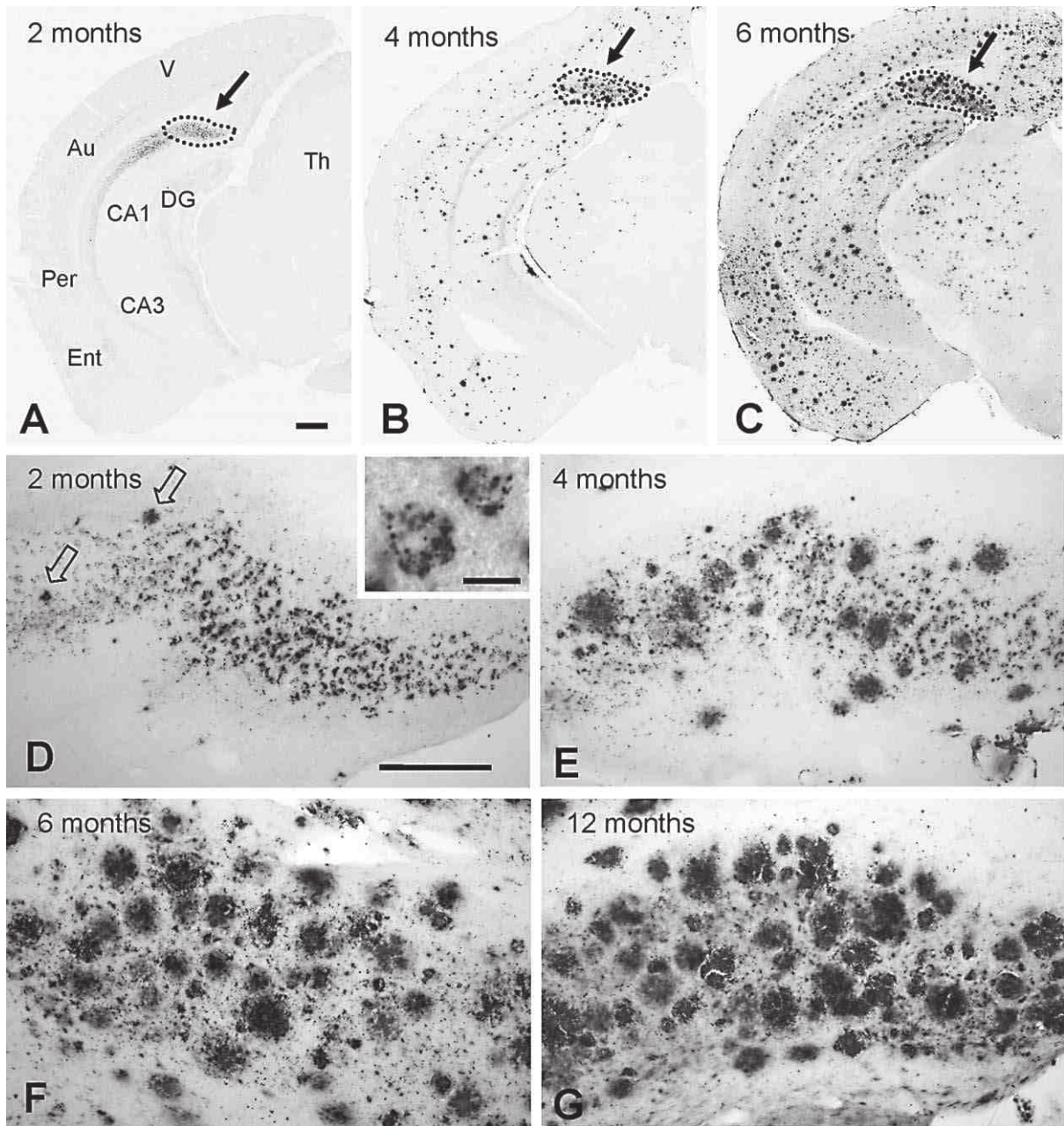


Fig. 4. Early accelerated intra- and extracellular A $\beta$  accumulation in the A $\beta$ PP/PS1 subiculum. A $\beta_{42}$  immunohistochemistry at 2 (A and D), 4 (B and E), 6 (C and F), and 12 (G) months of age. A–C, panoramic views of the caudal telencephalon showing the A $\beta_{42}$  immunoreactivity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

highly vulnerable brain areas, such as CA1 and entorhinal cortex, we have measured the area occupied by the A $\beta$  deposits (plaque loading) in these brain regions using Thioflavin-S stained sections (images not shown). Thioflavin-S labeled only extracellular A $\beta$  and allowed

better image analysis quantification of plaques since intracellular A $\beta$  pool was excluded. As shown, the subiculum (Fig. 5A) is the earliest and most severely affected area by the extracellular amyloid pathology. The subicular amyloid load was  $0.06 \pm 0.1\%$  and



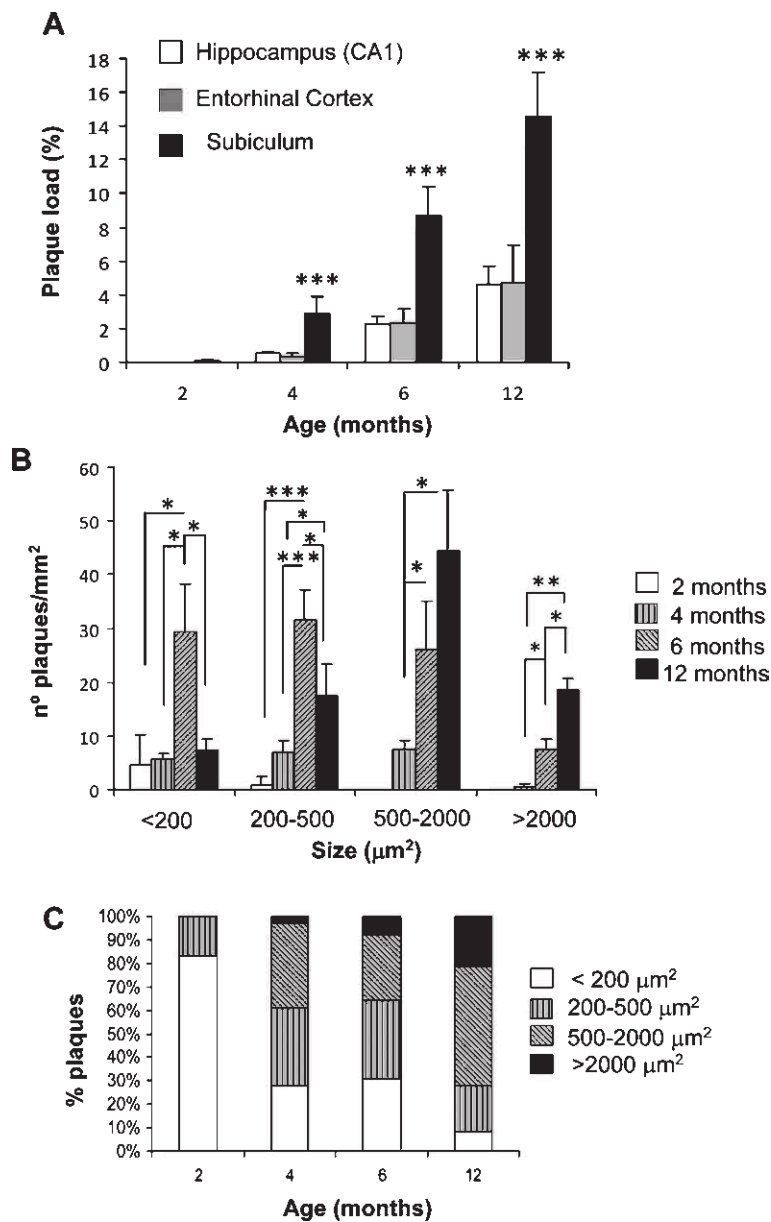


Fig. 5. A $\beta$  load and plaque progression with age in A $\beta$ PP/PS1 subiculum. A) A $\beta$  load in subiculum rapidly increased with age and it was significantly higher than in CA1 and entorhinal cortex at all ages analyzed. B, C) The number (plaques/mm<sup>2</sup>) and the size ( $\mu\text{m}^2$ ) of the A $\beta$  plaques in the subiculum exhibited a marked increase with age (two tailed *t*-test, \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001).

2.77  $\pm$  1.17% at 2 and 4 months of age, respectively. A $\beta$  deposition increased to 8.67  $\pm$  1.70% at 6 months of age and reached to 14.57  $\pm$  0.63% at 12 months (the maximum was at 18 months with 25.31  $\pm$  4.10%, not shown). A $\beta$  load was significantly greater in subiculum than in CA1 and entorhinal cortex at all ages analyzed. At 4 months of age, the subicular amyloid deposition was markedly accelerated and reached up to 5 times higher than in CA1 and 7 times than in entorhinal cor-

tex. Then after, at 6 and 12 months, the plaque load in subiculum, was between 3–4 times higher than in CA1 or entorhinal cortex. Therefore, the subiculum showed the greatest age-related A $\beta$  load and also exhibited the earliest neuronal loss.

The age-dependent increase in the total amyloid load in the subiculum appeared to be associated with both the number and size of the plaques. To support this observation, we next determined the plaque density

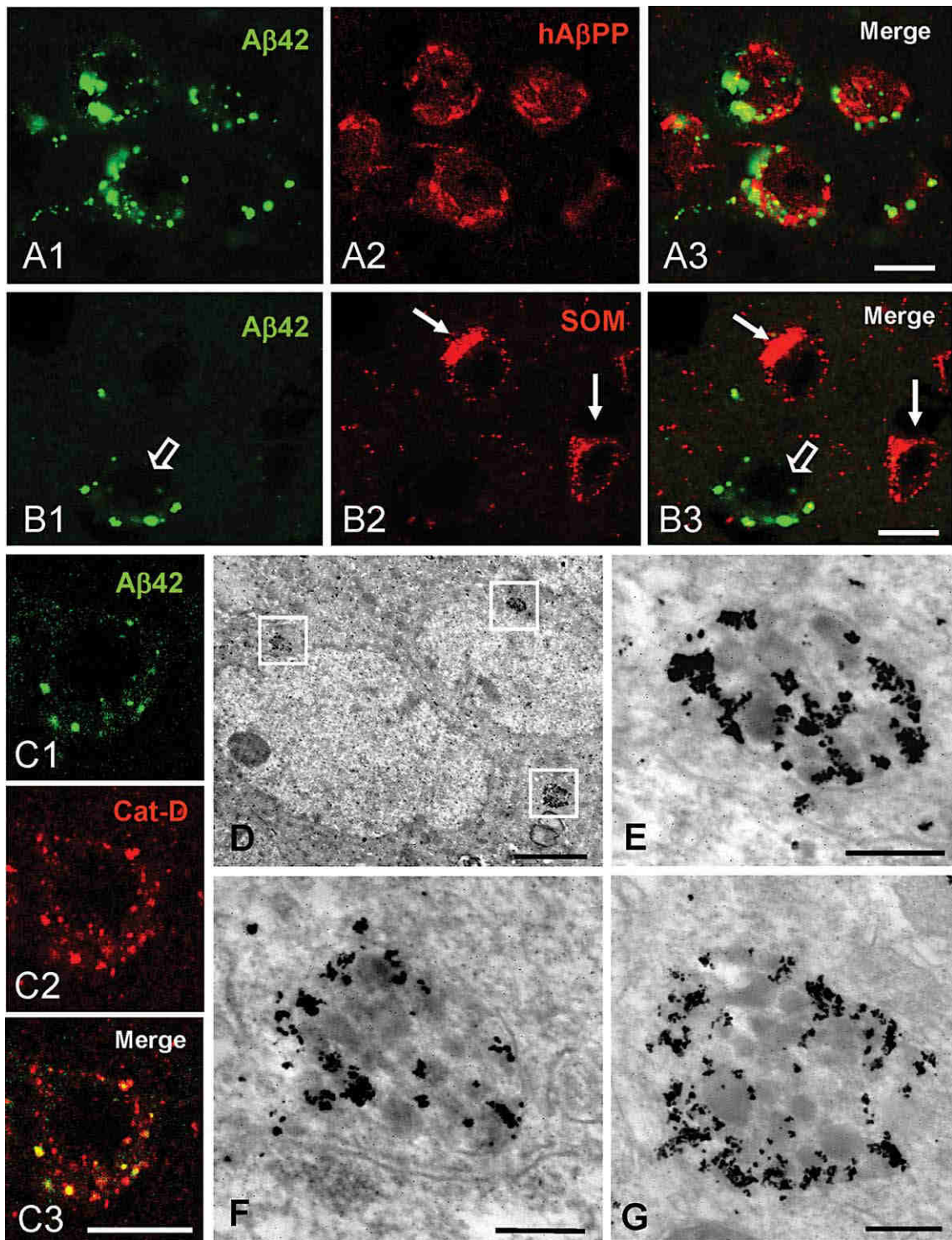


Fig. 6. Intracellular A $\beta$  is mostly localized in lysosomal vesicles of principal cells. Double confocal immunofluorescence labelings show the presence of A $\beta$  in A $\beta$ PP-positive (principal) neurons (A1–A3) but not in SOM-interneurons (B1–B3). Most A $\beta$ 42 was localized in lysosomal vesicles as shown by double A $\beta$ 42/Cathepsin-D labeling and confocal microscopy (C1–C3). A $\beta$  immunogold electron microscopy reveals the restricted subcellular location of A $\beta$  within endolysosomal organelles of principal neuronal cell bodies. Scale bars: A–C, 10  $\mu$ m; D, 2  $\mu$ m; E–G, 0.2  $\mu$ m.



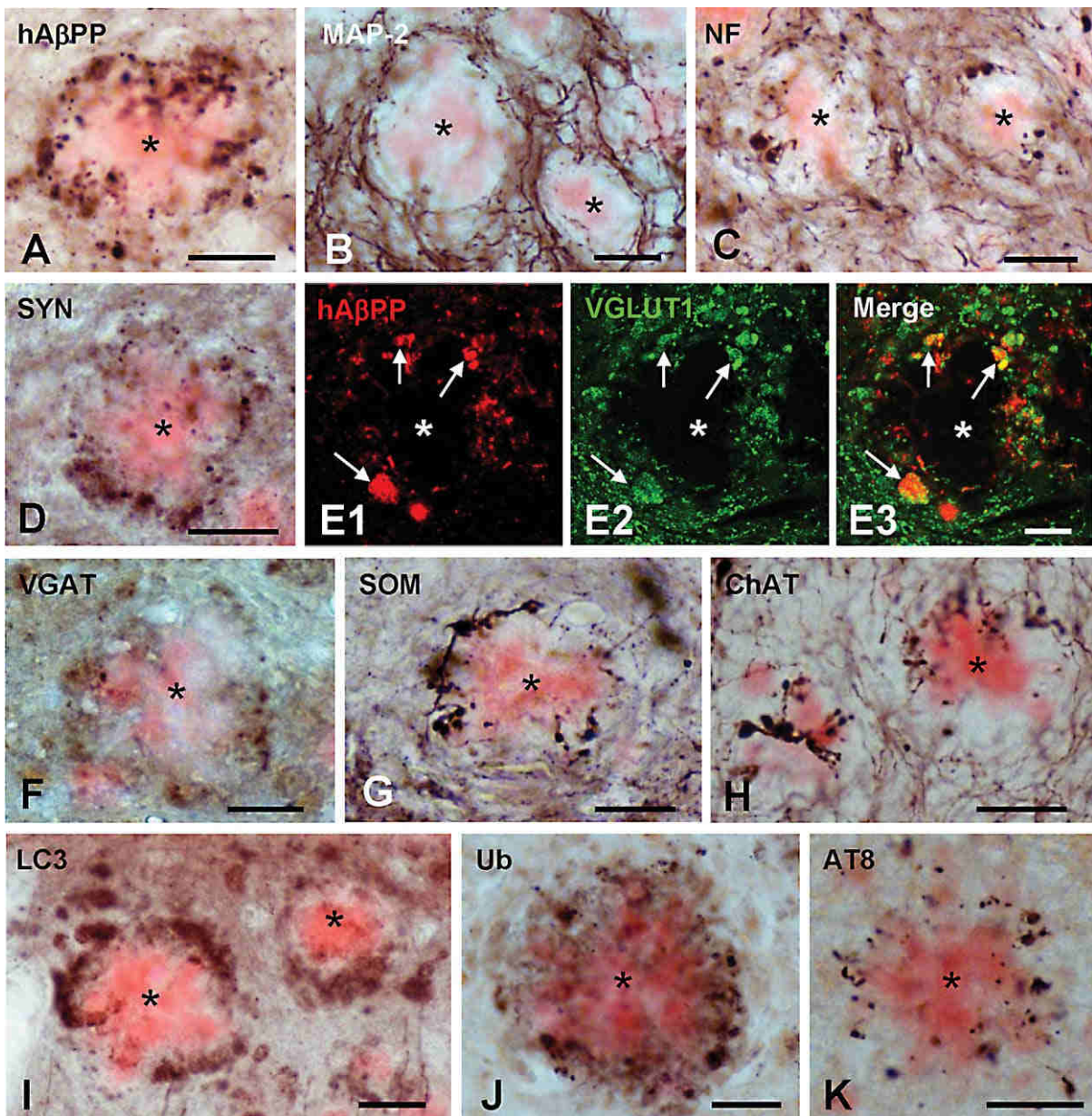


Fig. 7. A $\beta$  plaques are closely surrounded by axonal/synaptic dystrophies containing phospho-tau and autophagy vesicles. A) A $\beta$  plaque (Congo red-stained) surrounded by numerous dystrophic neurites immunopositive for hA $\beta$ PP antibody. B) Dystrophic neurites were not immunopositive for MAP-2 (dendritic marker). C) Immunoreactivity for neurofilament (axonal marker) was found in dystrophic neurites surrounding plaques. D) Plaque associated dystrophies were immunoreactive for synaptophysin (synaptic marker). E1–E3) Confocal double immunofluorescence labeling for hA $\beta$ PP (red) and VGLUT1 (green) shows extensive co-localization (arrows) of the two markers indicating the axonal/synaptic glutamatergic nature of hA $\beta$ PP-positive dystrophic neurites around plaques. F–H) Congo red-stained plaques were surrounded by axonal/synaptic dystrophies immunopositive for VGAT (marker for GABAergic terminals), somatostatin (marker for a GABAergic subpopulation) and ChAT (cholinergic marker). I–K) Dystrophies around plaques were immunolabeled for the autophagy marker LC3, ubiquitin and phospho-tau (AT8). Asterisks indicate A $\beta$  plaques. Scale bars: A–D and F–K, 25  $\mu$ m; E1–E3, 10  $\mu$ m.

(plaque/mm<sup>2</sup>) dissected into four size categories ranging from <200  $\mu$ m<sup>2</sup> to those >2000  $\mu$ m<sup>2</sup> (Fig. 5B), as well as the percent of each plaque category (Fig. 5C), at 2, 4, 6 and 12 months of age. The appearance of

plaques in this region began at 2 months of age and they were mostly under 200  $\mu$ m<sup>2</sup>, and then progressively increased in number at 4 months with the formation also of bigger plaques. However, the most significant



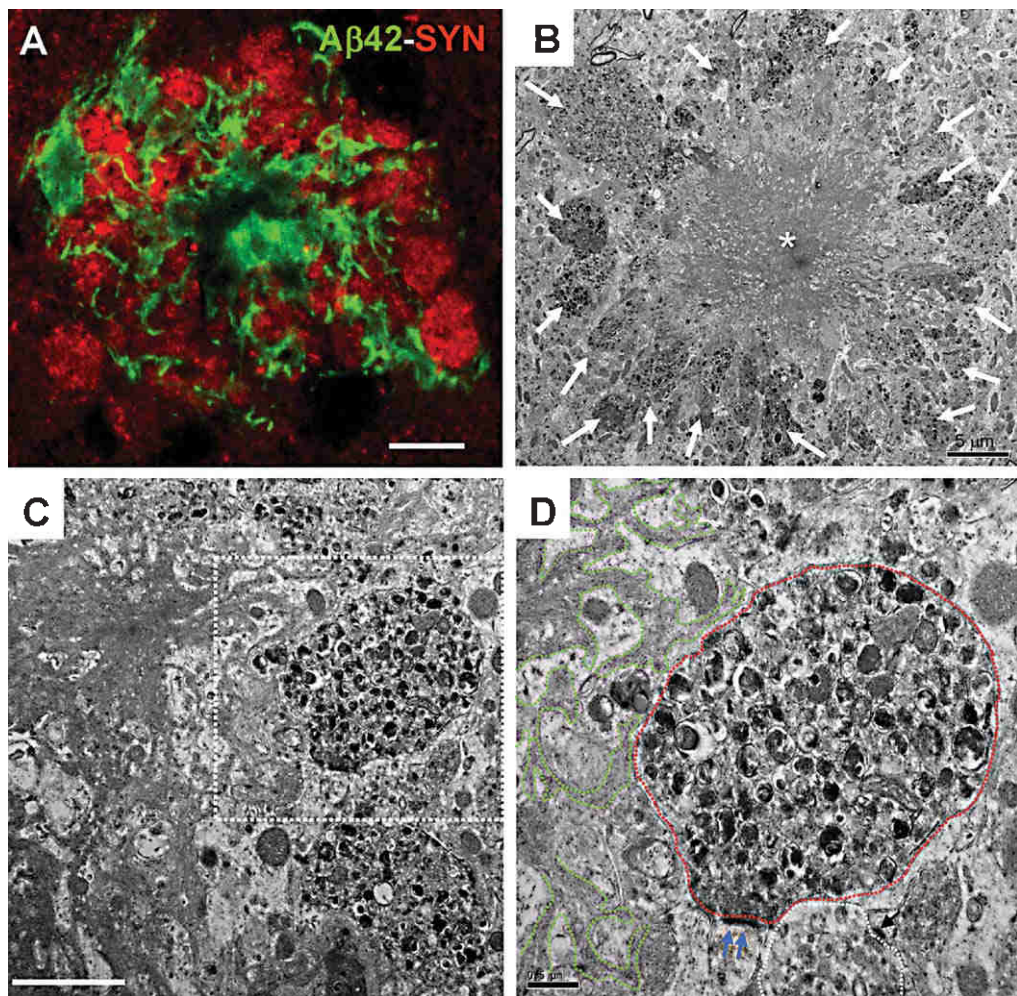


Fig. 8. Tight association between extracellular A $\beta$  and synaptic dystrophies. A) Double confocal A $\beta_{42}$  (green) and synaptophysin (SYN, red) labelling show how A $\beta$  threads from a plaque closely cover SYN-positive dystrophies. B) Electron microscopy micrograph of an A $\beta$  plaque (asterisk) surrounded by numerous dystrophic neurites (white arrows). C) An electron microscopy image of the plaque periphery showing dystrophic neurites in close contact with A $\beta$  threads. D) is a higher magnification image of the squared area in C; a dystrophic presynaptic terminal (outlined with red line), contacting with a normal postsynaptic element (postsynaptic density is pointed with blue arrows), is in the very close proximity of A $\beta$  threads (outlined in green color). Scale bar: A, 10  $\mu$ m; B, 5  $\mu$ m; C, 2  $\mu$ m; D, 0.5  $\mu$ m.

increase in the number of plaques/mm<sup>2</sup> was at the age of 6 months for each size category (5, 4.6, 3.4, and 14.5 times higher than at 4 months for those plaques <200, 200–500, 500–2000, and >2000  $\mu$ m<sup>2</sup>, respectively,  $n=5$ , two tailed  $t$ -test,  $p<0.05$ ), with the most abundant being those at <500  $\mu$ m<sup>2</sup>. Interestingly, at 12 months the plaque distribution switched and the predominant plaque size was >500  $\mu$ m<sup>2</sup>. Then our data demonstrated that the number of plaques significantly build-up with age, but most remarkable, plaque size also displayed a striking increment.

Since intraneuronal A $\beta$  accumulation precedes amyloid plaque formation in the subiculum, we further

investigated the A $\beta$  expression in subicular neurons as a potential toxic agent to induce the neurodegeneration. The early presence of intraneuronal A $\beta$  in A $\beta$ PP-positive cells was confirmed by double A $\beta_{42}$ /hA $\beta$ PP immunofluorescence labeling (Fig. 6A1–A3) in 2-month-old A $\beta$ PP/PS1 mice. These A $\beta$ PP-positive cells corresponded to principal neurons since the mutated human A $\beta$ PP transgene is expressed only by this population in the transgenic mice used. It can be argued then that this early accumulation of A $\beta$  within principal cells could be responsible of their vulnerability. However, SOM-positive interneurons were also highly affected at early ages, and these

cells did not accumulate intracellular A $\beta$  (Fig. 6B1–B3), since they do not express the mutated human A $\beta$ PP. Therefore, it is very unlikely that the neuronal loss in the subiculum, at least for interneurons, was induced by the intracellular A $\beta$ .

As shown here, the labeling of A $\beta_{42}$  and hA $\beta$ PP just marginally overlaps in the same subcellular compartments. In fact, only  $3.36 \pm 1.79\%$  ( $n=30$  cells) of A $\beta_{42}$  co-localized with hA $\beta$ PP. This demonstrated the specificity of the A $\beta$  antibody, since it does not cross-react with the A $\beta$ PP antibody and that hA $\beta$ PP processing and A $\beta$  accumulation should take place in different intracellular compartments. In this sense, the punctuate labeling of the A $\beta_{42}$  antibody was suggestive of vesicular location. Several studies have reported the preferential location of A $\beta$  in vesicles of the endosome-lysosome system [38] including autophagy vesicles [41, 45]. Confocal images of double A $\beta_{42}$ /cathepsin-D labeling (Fig. 6C1–C3) indicated that most of the A $\beta$  was in fact associated with lysosomal structures in the somata of the principal subicular neurons. Quantitative analysis demonstrated that  $88.9 \pm 18.2\%$  ( $n=50$  cells) of the intracellular A $\beta_{42}$  labeling co-localized with cathepsin-D. Thus, A $\beta$  is accumulated preferentially in lysosomal vesicles. Furthermore, immunogold electron microscopy experiments demonstrated a restricted location of A $\beta$  within endolysosomal subcellular compartments of the principal neuronal somata (Fig. 6D–G). Immunogold labeled organelles displayed an electron-dense granular content typical of endolysosomes (see higher magnification images in Fig. 6E–G).

#### *A $\beta$ plaques as inductors of early axonal/presynaptic pathology in the subiculum*

The pathogenic mechanisms leading to neuron loss in AD have not been completely elucidated yet, and the extracellular amyloid deposits could be major contributors for neuronal damage/loss. In our model, the hippocampal plaques are surrounded by numerous dystrophic neurites of axonal/presynaptic origin [41, 45]. Then, we next examined the dystrophy pathology in the subiculum and its association with amyloid plaques using light and electron microscopy approaches. The formation of plaques in the subiculum was paralleled with the appearance of dystrophic neurites in their very close periphery. The hA $\beta$ PP antibody is a well-established marker for dystrophies (Fig. 7A), and in our model labeled dystrophies belonging to glutamatergic cells as we show here with the double labeling A $\beta$ PP/VGLUT1 (see Fig. 7E1–E3). While

no dystrophic dendrites around plaques were detected with MAP2 immunostaining (Fig. 7B), numerous dystrophic neurites were labeled with different axonal/synaptic markers such as NF (Fig. 7C), synaptophysin (Fig. 7D), VLGUT1 (Fig. 7E2), and VGAT (Fig. 7F). In addition, we observed SOM-positive (7G) or ChAT-positive (7H) axonal dystrophies surrounding subicular plaques. Altogether, these data confirmed the axonal origin of the dystrophies that surround plaques in the subiculum.

We and others have reported the accumulation of autophagy vesicles within dystrophies [41, 45–47]. This abnormal collection of vesicles belonging to the autophagy-lysosome degradation system might result from a defective cytoskeleton-mediated transport. We have next checked whether subicular dystrophies displayed immunoreactivity for LC3 (autophagy marker), ubiquitin (marker for protein degradation), and AT8 (phosphorylated tau). As shown in Fig. 7 (I–K), these axonal dystrophies were strongly labeled with all these markers suggesting a focalized altered microtubule vesicular transport that compromise protein degradation with the subsequent accumulation of vesicles and un-degraded proteins that disrupts axonal structure.

A direct toxic effect of the A $\beta$  plaques on surrounding axons might be the cause of dystrophic formation. In fact, the confocal microscopy evaluation of double A $\beta_{42}$ /synaptophysin labeling (Fig. 8A) revealed a very close spatial association between both markers with the extracellular A $\beta$  encircling, almost wrapping, the synaptophysin-positive dystrophies. For a better resolution, we next evaluated this tight association between plaque and dystrophies at the transmission electron microscopy (Fig. 8B–D). Figure 8B shows a typical amyloid plaque in this model (neuritic plaque), completely surrounded by numerous dystrophic neurites. In their periphery, plaques gave off many long branches coming in close contact with the dystrophies (Fig. 8C, D). Dystrophies were morphologically characterized by the presence of multiple heterogeneous autophagy-like vesicles, as expected.

The early axonal defects in the subiculum of this AD model could directly affect presynaptic terminals. Though the plaque-associated dystrophies were labeled with the synaptic marker synaptophysin, this labeling could be due to the abnormal accumulation of this protein along the axon due to transport failure, and not to be present in synaptic boutons. However, electron microscopic examination revealed that presynaptic terminals were indeed dystrophic (Fig. 8D) and displayed abnormal morphology with huge collection of autophagy/lysosomal vesicles. Though these



dystrophic terminals made contact with normal post-synaptic elements their function and viability could be somehow compromised.

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

## DISCUSSION

Neuron loss is the best anatomopathological substrate that correlates with cortical atrophy and dementia during disease progression in AD. However, most transgenic animals do not display this fundamental degenerative feature of patients. To evaluate the effectiveness of potential neuroprotective therapies for AD, it is essential that animal models exhibit neuronal damage/dysfunction, and even most importantly neuronal death, relevant to the disease in vulnerable brain regions and cell populations. The present work provides new evidence and further support our previous studies [24–27, 30, 41, 45] on the selective AD-like neurodegenerative phenotype of the A $\beta$ PP751SweLondon/PS1M146L model (data summarized in Table 1). We show here that the subiculum of this model is the earliest affected hippocampal region exhibiting a wide repertoire of AD-like pathological manifestations including 1) accelerated A $\beta$  accumulation, both intra- and extracellularly; 2) prominent axonal neuritic pathology, that affects presynaptic terminals, with the accumulation of autophagy vesicles, and 3), and most valuable, significant neuronal loss from principal and local inhibitory populations.

As we have reported previously, this A $\beta$ PP/PS1 transgenic model has the advantage over other models of showing significant loss of neurons in highly vulnerable brain areas [24–26] similar to AD patients. Loss of interneurons was an early event (4–6 months of age) in the hippocampal CA subfields and dentate gyrus, as well as in the entorhinal cortex, however principal neurons were differentially affected by age in these areas. While the entorhinal principal neurons showed early vulnerability (6 months of age) the hippocampus (CA1 subfield) displayed significant pyramidal cell decline only at old ages (>17 months of age). Few others transgenic models have also been reported to have neuronal death [39, 48–51], however this was usually quantitatively minor and/or occurred at very late ages. Subicular neurodegeneration has been previously reported in the 5xFAD model at 9 months of age [38, 39]. Nevertheless, in these studies no quantita-

tive analysis was made to determine the extent of subicular cell loss and neither the vulnerable neuronal type was identified. Here we demonstrate by unbiased stereology a significant decline in SOM-containing interneurons (–27% and –69% at 4 and 6 months of age, respectively) and, most importantly, in principal subicular neurons (–28% at 6 months) of our A $\beta$ PP/PS1 model at early ages. Therefore, this is the first study showing a quantitative decline of subicular neurons, and noteworthy, occurring as early as 4–6 months of age. Together, and of relevance, subiculum is the first hippocampal brain region exhibiting principal neuronal loss in this model.

Among the potential causative agents for this neuronal loss, A $\beta$  is the leading candidate in amyloidogenic models bearing familial mutations, as the A $\beta$ PP/PS1 model used in this study. In fact, A $\beta$  pathology in the subiculum preceded the loss of neurons. Furthermore, we have also compared the severity of the amyloid pathology in the subiculum with other highly AD vulnerable brain areas, such as CA1 of hippocampus and entorhinal cortex. Interestingly, the subiculum displayed up to 5 and 7 fold increased A $\beta$  load than CA1 and entorhinal cortex, respectively, at the age of 4 months. Therefore, subiculum is the earliest and most severely affected region by the amyloid pathology. In consequence, we also observed an extensive neuronal (pyramidal and GABAergic) degeneration in this particular brain region.

Abundant intraneuronal accumulation of A $\beta$ <sub>42</sub> was seen at 2 months of age mostly located in the endolysosomes and immediately after a rapid onset of amyloid plaques was manifested. As the plaque load increased with age the intracellular A $\beta$  labeling was less evident. In fact, at 6 months of age it was really difficult to visualize A $\beta$ -immunolabeled neuronal somata at light microscopy suggesting a possible transient localization of A $\beta$  in the neuronal compartments (soma versus axonal/synaptic?). However, immunogold labeling demonstrated the presence of some intracellular A $\beta$  within the cell bodies at least in 6-month-old A $\beta$ PP/PS1 mice. We cannot rule out the possibility that plaques bind most A $\beta$  antibodies thus preventing the intracellular A $\beta$  labeling. Our results are in agreement with others since A $\beta$  pathology (intra preceding extra) was reported to be early present in the subiculum of other transgenic models [38, 39, 52].

As to which A $\beta$  (intra or extra) mainly contributes to the neuronal death in this region, our data point to the extracellular pool as the most likely toxic agent. Interneurons do not express the human mutant A $\beta$ PP transgene in our A $\beta$ PP/PS1 model (see Fig. 6),

Table 1  
Summary of the major neuropathological findings in the A $\beta$ PP751SweLondon/PS1M146L transgenic model

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

The age (months, mo) when intracellular A $\beta$  (immunoreactivity with the A $\beta$ <sub>42</sub> or oligomer-specific OC antibodies), extracellular deposits (immunopositive for 6E10, A $\beta$ <sub>42</sub>, or OC antibodies, or stained with thioflavin-s or congo red), dystrophic neurites around plaques (immunopositive for A $\beta$ PP, SYN, ubiquitin, LC3, or phospho-tau AT8 antibodies), neuronal loss (measured by stereological analysis of SOM+, CR+ or pyramidal neurons), and neuroinflammation (microglial and astroglial activation) are detected is indicated. NT, non detected. SOM+, immunopositive somatostatin interneurons; CR+, immunopositive calretinin interneurons. \*Data from references [24, 25, 27]. \*\*Data from reference [26].

therefore these cells do not produce and accumulate A $\beta$ , ruling out the possibility of the intraneuronal source as the causative agent for the death in the SOM-population. On the other hand, principal subicular neurons contain intracellular A $\beta$  at an early age (2 months or even before), and though the present results do not allow us to completely discard the toxic role of this intracellular stock, the loss of this population (approximately 30%) is delayed until the age of 6 months. Thus, it is most likely to be associated with the accelerated extracellular A $\beta$  accumulation. This asseveration was also based on: 1) early (2 months) intracellular A $\beta$  accumulation is seen in CA1 principal neurons of our model (see Fig. 4 A,D), however no neuronal loss in the CA1 pyramidal layer is detected until 17-18 months of age [27, 44]; 2) principal cell loss in the entorhinal cortex is also an early event (6 months) in this model, however it is associated with extracellular rather than intracellular A $\beta$  pathology [26]. In fact, the vulnerable principal neurons in the entorhinal cortex were those located in the highly A $\beta$  loaded deep layers (V-VI) and interestingly, these cells did not even expressed the human A $\beta$ PP transgene and therefore did not accumulate A $\beta$  intracellularly; 3) early intracellular A $\beta$  has been detected in many other animal models, however neuronal loss is usually absent or occurred at late ages [7-10]; 4) A $\beta$  plaques are a potent source of neurotoxic damage as many axonal dystrophies developed in their close periphery (neuritic plaques); 5) A $\beta$  plaques induce a strong glial activation in subiculum (data not shown) as seen in hippocampus and entorhinal cortex [26, 27]. A cytotoxic profile of this inflammatory response was temporally associated with the pyramidal neuronal death in these brain regions.

Therefore, cerebral amyloidosis (extracellular) seems to be the driving force for neuronal loss and the axonal/synaptic damage in the subiculum as well

as in other brain areas [24-26, 30, 41, 45]. Amyloid plaques are potentially major sources of soluble and toxic oligomeric A $\beta$  [53]. Then, the accelerated and severe formation of plaques in subiculum, compared to other brain regions, could locally increase the concentration of these oligomers since early ages affecting the most vulnerable neuronal populations.

Subicular A $\beta$  deposits were surrounded by hyperphosphorylated tau-positive axonal dystrophies and A $\beta$  oligomers have been shown to induce an increase in tau hyperphosphorylation [54, 55] as well as axonal transport failure with organelle accumulation through GSK3 $\beta$  signaling [45, 56]. In support of this idea, we have recently demonstrated the involvement of A $\beta$  oligomers in the activation of GSK3 $\beta$  and tau phosphorylation [30]. Together, A $\beta$  oligomers released from plaques might cause locally the interruption of axonal transport leading to a severe accumulation of vesicles mostly from autophagy pathway (LC3-positive) due to failed lysosome maturation [41, 45] (present work) and in consequence the formation of axonal dystrophies. These dystrophies are positive for synaptic proteins (synaptophysin or VGluT1) as shown by confocal microscopy which might reflect synaptic protein accumulation due to axonal transport deficiency. Alternatively, some (or most) dystrophies might be actually presynaptic boutons directly affected by the plaque-associated toxic A $\beta$  oligomers. In agreement with the last suggestion, we have demonstrated by electron microscopy the presence of dystrophic synaptic terminals making contact with normal postsynaptic elements near plaques in subiculum as we have previously shown also in CA1 [41]. These morphologically altered synaptic terminals might represent the initial step of axonal degeneration previous to the synapse loss, the major correlate for cognitive deficits in the initial stages of the disease [1, 3, 5, 6]. In addition,

axonal/synaptic damage could trigger a neurodegenerative process toward the cell bodies. In line with this, we and others have reported a relationship between extracellular A $\beta$  accumulation in axonal fields and the progressive degeneration of their away located projecting neurons in AD models [24, 57]. This suggestion is also supported by the apparent resistance of the PV positive GABAergic cells. As shown in this and previous work, the number of subicular, hippocampal, and entorhinal PV positive cells was not modified in the A $\beta$ PP/PS1 model. These data are in line with the relative resistance of these cells observed in AD patients [58, 59]. Furthermore, at the age tested, the PV positive cells developed few (if any) dystrophic neurites even in close proximity to the A $\beta$  plaques (see Fig. 2B2). At present, we do not know the mechanisms that determine the relative protection of this neuronal subpopulation to the A $\beta$  pathology. However, it is possible that the high expression of a Ca<sup>2+</sup>-chelating protein, such as PV, could protect the cell from the extracellular A $\beta$  damage.

Altogether, our data support A $\beta$  plaques as major contributors of neuronal/axonal damage in this AD model. The relevance of this conclusion for the disease in humans could be of controversial since no clear association has been made so far between the extent of amyloid burden and dementia severity in AD patients. Moreover, A $\beta$  deposition begins over a decade prior to the dementia and asymptomatic cortical A $\beta$  deposition in elderly individuals is also well documented [60–64]. However, a recent report [65] has shed light on this intriguing topic and discriminate demented and non-demented individuals with high amyloid burden on the basis of their neuropathological phenotype. Authors identified that plaques in demented cases had significant higher amount of oligomeric A $\beta$  and, importantly, a higher number of dystrophic neurites compared to non-demented individuals. In addition, accumulation of phospho-tau into synaptic compartments, and stronger glial activation response discriminated demented from non-demented cases. These findings highlight the existence of different plaques, in relation to their toxicity, that might account for the onset and severity of dementia during disease progression. Therefore, the characterization of plaques on the basis of their capacity to induce axonal and neuronal damage is crucial to validate animal models for research and drug testing. In this sense, our A $\beta$ PP/PS1 model is of great interest since these mice develop human-like neuritic plaques whose toxicity can be modulated *in vivo*, as we have recently shown, by lithium administration resulting in a marked reduc-

tion of neuronal and axonal damage and cognitive improvement [66].

The subiculum is the main hippocampal output, and therefore hippocampal–cortical and hippocampal–subcortical communication arises most predominantly from subicular neurons [12, 13]. In fact, this region is specifically involved in spatial memory and navigation, as well as in stress responses and limbic-mediated affective, cognitive, and behavioral processes [67, 68]. Subiculum may act as a possible interface between the hippocampus and the neocortex during the consolidation of memories [69]. Interestingly, a relationship between cortical thinning in the subicular and entorhinal regions with the decline in the ability to encode new memories over time has been reported in mild cognitive impairment patients [70]. Then, the early reduction in the subicular neurons along with the axonal/synaptic damage might contribute to the altered neuronal network in the hippocampus and entorhinal cortex seen in AD.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), from Instituto de Salud Carlos III of Spain, through grants PI12/01431 (to AG) and PI12/01439 (to JV), and by CIBERNED (PI2010/08 and PI2013/01) to JV and AG. LT-E and ES-M were recipients of PhD fellowships (FPU) from Ministerio de Educacion, Cultura y Deportes (Spain). We thank Sanofi for the A $\beta$ PP/PS1 model used in this study, and Mercedes Aneiros for her expert technical assistance. Antonia Gutierrez and Javier Vitorica are Co-Senior corresponding authors.

Authors' disclosures available online (<http://www.jalz.com/disclosures/view.php?id=2268>).

## REFERENCES

- [1] Davies CA, Mann DM, Sumpter PQ, Yates PO (1987) A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* **78**, 151-164.
- [2] Gomez-Isla T, Price JL, McKeel DW, Jr, Morris JC, Growdon JH, Hyman BT (1996) Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci* **16**, 4491-4500.
- [3] Masliah E, Mallory M, Alford M, DeTeresa R, Hansen LA, McKeel DW Jr, Morris JC (2001) Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology* **56**, 127-129.
- [4] Price JL, Ko AI, Wade MJ, Tsou SK, McKeel DW, Morris JC (2001) Neuron number in the entorhinal cortex and CA1 in preclinical Alzheimer disease. *Arch Neurol* **58**, 1395-1402.

- [5] Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, Mufson EJ (2006) Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* **27**, 1372-1384.
- [6] Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R (1991) Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* **30**, 572-580.
- [7] Kitazawa M, Medeiros R, Laferla FM (2012) Transgenic mouse models of Alzheimer disease: Developing a better model as a tool for therapeutic interventions. *Curr Pharm Des* **18**, 1131-1147.
- [8] Laferla FM, Green KN (2012) Animal models of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, pii: a006320.
- [9] Platt TL, Reeves VL, Murphy MP (2013) Transgenic models of Alzheimer's disease: Better utilization of existing models through viral transgenesis. *Biochim Biophys Acta* **1832**, 1437-1448.
- [10] Schaeffer EL, Figueiro M, Gattaz WF (2011) Insights into Alzheimer disease pathogenesis from studies in transgenic animal models. *Clinics (Sao Paulo)* **66**(Suppl 1), 45-54.
- [11] Amaral DG, Witter MP (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neuroscience* **31**, 571-591.
- [12] O'Mara S (2005) The subiculum: What it does, what it might do, and what neuroanatomy has yet to tell us. *J Anat* **207**, 271-282.
- [13] O'Mara SM, Commins S, Anderson M, Gigg J (2001) The subiculum: A review of form, physiology and function. *Prog Neurobiol* **64**, 129-155.
- [14] Ball MJ (1977) Neuronal loss, neurofibrillary tangles and granulovacuolar degeneration in the hippocampus with ageing and dementia. A quantitative study. *Acta Neuropathol* **37**, 111-118.
- [15] Bobinski M, Wegiel J, Tarnawski M, Bobinski M, Reisberg B, de Leon MJ, Miller DC, Wisniewski HM (1997) Relationships between regional neuronal loss and neurofibrillary changes in the hippocampal formation and duration and severity of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **56**, 414-420.
- [16] Davies DC, Horwood N, Isaacs SL, Mann DM (1992) The effect of age and Alzheimer's disease on pyramidal neuron density in the individual fields of the hippocampal formation. *Acta Neuropathol* **83**, 510-517.
- [17] Kril JJ, Patel S, Harding AJ, Halliday GM (2002) Neuron loss from the hippocampus of Alzheimer's disease exceeds extracellular neurofibrillary tangle formation. *Acta Neuropathol* **103**, 370-376.
- [18] Simic G, Kostovic I, Winblad B, Bogdanovic N (1997) Volume and number of neurons of the human hippocampal formation in normal aging and Alzheimer's disease. *J Comp Neurol* **379**, 482-494.
- [19] West MJ (1993) Regionally specific loss of neurons in the aging human hippocampus. *Neurobiol Aging* **14**, 287-293.
- [20] West MJ, Kawas CH, Martin LJ, Troncoso JC (2000) The CA1 region of the human hippocampus is a hot spot in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* **908**, 255-259.
- [21] West MJ, Kawas CH, Stewart WF, Rudow GL, Troncoso JC (2004) Hippocampal neurons in pre-clinical Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **25**, 1205-1212.
- [22] Bobinski M, Wegiel J, Wisniewski HM, Tarnawski M, Bobinski M, Reisberg B, de Leon MJ, Miller DC (1996) Neurofibrillary pathology—correlation with hippocampal formation atrophy in Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* **17**, 909-919.
- [23] Franko E, Joly O (2013) Evaluating Alzheimer's disease progression using rate of regional hippocampal atrophy. *PLoS One* **8**, e71354.
- [24] Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, Vizuete M, Vitorica J, Gutierrez A (2010) Calretinin interneurons are early targets of extracellular amyloid-beta pathology in PS1/AbetaPP Alzheimer mice hippocampus. *J Alzheimers Dis* **21**, 119-132.
- [25] Ramos B, Baglietto-Vargas D, Del Rio JC, Moreno-Gonzalez I, Santa-Maria C, Jimenez S, Caballero C, Lopez-Tellez JF, Khan ZU, Ruano D, Gutierrez A, Vitorica J (2006) Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1xAPP transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **27**, 1658-1672.
- [26] Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Del Rio JC, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, Vizuete M, Vitorica J, Gutierrez A (2009) Extracellular amyloid-beta and cytotoxic glial activation induce significant entorhinal neuron loss in young PS1(M146L)/APP(751SL) mice. *J Alzheimers Dis* **18**, 755-776.
- [27] Jimenez S, Baglietto-Vargas D, Caballero C, Moreno-Gonzalez I, Torres M, Sanchez-Varo R, Ruano D, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J (2008) Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: Age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic. *J Neurosci* **28**, 11650-11661.
- [28] Killiany RJ, Hyman BT, Gomez-Isla T, Moss MB, Kikinis R, Jolesz F, Tanzi R, Jones K, Albert MS (2002) MRI measures of entorhinal cortex vs hippocampus in preclinical AD. *Neurology* **58**, 1188-1196.
- [29] Pennanen C, Kivipelto M, Tuomainen S, Hartikainen P, Hanninen T, Laakso MP, Hallikainen M, Vanhanen M, Nissinen A, Helkala EL, Vainio P, Vanninen R, Partanen K, Soininen H (2004) Hippocampus and entorhinal cortex in mild cognitive impairment and early AD. *Neurobiol Aging* **25**, 303-310.
- [30] Jimenez S, Torres M, Vizuete M, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mejias E, Trujillo-Estrada L, Carmona-Cuenca I, Caballero C, Ruano D, Gutierrez A, Vitorica J (2011) Age-dependent accumulation of soluble amyloid beta (A $\beta$ ) oligomers reverses the neuroprotective effect of soluble amyloid precursor protein-alpha (sAPP(alpha)) by modulating phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt-GSK-3beta pathway in Alzheimer mouse model. *J Biol Chem* **286**, 18414-18425.
- [31] Ding SL (2013) Comparative anatomy of the prosubiculum, subiculum, presubiculum, postsubiculum, and parasubiculum in human, monkey, and rodent. *J Comp Neurol* **521**, 4145-4162.
- [32] Apostolova LG, Dutton RA, Dinov ID, Hayashi KM, Toga AW, Cummings JL, Thompson PM (2006) Conversion of mild cognitive impairment to Alzheimer disease predicted by hippocampal atrophy maps. *Arch Neurol* **63**, 693-699.
- [33] Falke E, Nissanov J, Mitchell TW, Bennett DA, Trojanowski JQ, Arnold SE (2003) Subicular dendritic arborization in Alzheimer's disease correlates with neurofibrillary tangle density. *Am J Pathol* **163**, 1615-1621.
- [34] Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR, Barnes CL (1984) Alzheimer's disease: Cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science* **225**, 1168-1170.
- [35] La JR, Perrotin A, de LS, V, Egret S, Doeuvre L, Belliard S, Eustache F, Desgranges B, Chetelat G (2013) Hippocampal subfield volumetry in mild cognitive impairment, Alzheimer's



- disease and semantic dementia. *Neuroimage Clin* **3**, 155-162.
- [36] Van Hoesen GW, Hyman BT (1990) Hippocampal formation: Anatomy and the patterns of pathology in Alzheimer's disease. *Prog Brain Res* **83**, 445-457.
- [37] Davies DC, Wilmott AC, Mann DM (1988) Senile plaques are concentrated in the subicular region of the hippocampal formation in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **94**, 228-233.
- [38] Eimer WA, Vassar R (2013) Neuron loss in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease correlates with intraneuronal Abeta42 accumulation and Caspase-3 activation. *Mol Neurodegener* **8**, 2.
- [39] Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Van EL, Berry R, Vassar R (2006) Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: Potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci* **26**, 10129-10140.
- [40] Blanchard V, Moussaoui S, Czech C, Touchet N, Bonici B, Planche M, Canton T, Jedidi I, Gohin M, Wirths O, Bayer TA, Langui D, Duyckaerts C, Tremp G, Pradier L (2003) Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with Abeta deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Exp Neurol* **184**, 247-263.
- [41] Sanchez-Varo R, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, De C, V, Jimenez S, Ruano D, Vizuete M, Davila JC, Garcia-Verdugo JM, Jimenez AJ, Vitorica J, Gutierrez A (2012) Abnormal accumulation of autophagic vesicles correlates with axonal and synaptic pathology in young Alzheimer's mice hippocampus. *Acta Neuropathol* **123**, 53-70.
- [42] Paxinos G, Franklin KBJ (2008) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, New York.
- [43] Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B (1988) The new stereological tools: Disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* **96**, 857-881.
- [44] Schmitz C, Rutten BP, Pielen A, Schafer S, Wirths O, Tremp G, Czech C, Blanchard V, Multhaup G, Rezaie P, Korr H, Steinbusch HW, Pradier L, Bayer TA (2004) Hippocampal neuron loss exceeds amyloid plaque load in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* **164**, 1495-1502.
- [45] Torres M, Jimenez S, Sanchez-Varo R, Navarro V, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Carmona I, Davila JC, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J (2012) Defective lysosomal proteolysis and axonal transport are early pathogenic events that worsen with age leading to increased APP metabolism and synaptic Abeta in transgenic APP/PS1 hippocampus. *Mol Neurodegener* **7**, 59.
- [46] Lee S, Sato Y, Nixon RA (2011) Primary lysosomal dysfunction causes cargo-specific deficits of axonal transport leading to Alzheimer-like neuritic dystrophy. *Autophagy* **7**, 1562-1563.
- [47] Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A, Cuervo AM (2005) Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: An immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol* **64**, 113-122.
- [48] Casas C, Sergeant N, Itier JM, Blanchard V, Wirths O, van der KN, Vingtdoux V, van de SE, Ret G, Canton T, Drobecq H, Clark A, Bonici B, Delacourte A, Benavides J, Schmitz C, Tremp G, Bayer TA, Benoit P, Pradier L (2004) Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated Abeta42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. *Am J Pathol* **165**, 1289-1300.
- [49] Cohen RM, Rezai-Zadeh K, Weitz TM, Rentsendorj A, Gate D, Spivak I, Bholat Y, Vasilevko V, Glabe CG, Breunig JJ, Rakic P, Davtyan H, Agadjanyan MG, Kepe V, Barrio JR, Bannykh S, Szekely CA, Pechnick RN, Town T (2013) A transgenic Alzheimer rat with plaques, tau pathology, behavioral impairment, oligomeric abeta, and frank neuronal loss. *J Neurosci* **33**, 6245-6256.
- [50] Saul A, Sprenger F, Bayer TA, Wirths O (2013) Accelerated tau pathology with synaptic and neuronal loss in a novel triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **34**, 2564-2573.
- [51] Wright AL, Zinn R, Hohensinn B, Konen LM, Beynon SB, Tan RP, Clark IA, Abdipranoto A, Vissel B (2013) Neuroinflammation and neuronal loss precede Abeta plaque deposition in the hAPP-J20 mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* **8**, e59586.
- [52] Ronnback A, Zhu S, Dillner K, Aoki M, Lilius L, Naslund J, Winblad B, Graff C (2011) Progressive neuropathology and cognitive decline in a single Arctic APP transgenic mouse model. *Neurobiol Aging* **32**, 280-292.
- [53] Martins IC, Kuperstein I, Wilkinson H, Maes E, Vanbrabant M, Jonckheere W, Van GP, Hartmann D, D'Hooge R, De SB, Schymkowitz J, Rousseau F (2008) Lipids revert inert Abeta amyloid fibrils to neurotoxic protofibrils that affect learning in mice. *EMBO J* **27**, 224-233.
- [54] De Felice FG, Wu D, Lambert MP, Fernandez SJ, Velasco PT, Lacor PN, Bigio EH, Jerecic J, Acton PJ, Shughrue PJ, Chen-Dodson E, Kinney GG, Klein WL (2008) Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A beta oligomers. *Neurobiol Aging* **29**, 1334-1347.
- [55] Jin M, Shepardson N, Yang T, Chen G, Walsh D, Selkoe DJ (2011) Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 5819-5824.
- [56] Decker H, Lo KY, Unger SM, Ferreira ST, Silverman MA (2010) Amyloid-beta peptide oligomers disrupt axonal transport through an NMDA receptor-dependent mechanism that is mediated by glycogen synthase kinase 3beta in primary cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* **30**, 9166-9171.
- [57] Liu Y, Yoo MJ, Savonenko A, Stirling W, Price DL, Borchelt DR, Mamounas L, Lyons WE, Blue ME, Lee MK (2008) Amyloid pathology is associated with progressive monoaminergic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* **28**, 13805-13814.
- [58] Iwamoto N, Emson PC (1991) Demonstration of neurofibrillary tangles in parvalbumin-immunoreactive interneurons in the cerebral cortex of Alzheimer-type dementia brain. *Neurosci Lett* **128**, 81-84.
- [59] Takahashi H, Brasnjevic I, Rutten BP, van der KN, Perl DP, Bouras C, Steinbusch HW, Schmitz C, Hof PR, Dickstein DL (2010) Hippocampal interneuron loss in an APP/PS1 double mutant mouse and in Alzheimer's disease. *Brain Struct Funct* **214**, 145-160.
- [60] Bennett DA (2006) Postmortem indices linking risk factors to cognition: Results from the Religious Order Study and the Memory and Aging Project. *Alzheimer Dis Assoc Disord* **20**, S63-S68.
- [61] Kantarci K (2014) Molecular imaging of Alzheimer disease pathology. *AJNR Am J Neuroradiol*. doi: 10.3174/ajnr.A3847
- [62] Negash S, Bennett DA, Wilson RS, Schneider JA, Arnold SE (2011) Cognition and neuropathology in aging: Multidimen-

- sional perspectives from the Rush Religious Orders Study and Rush Memory And Aging Project. *Curr Alzheimer Res* **8**, 336-340.
- [63] Perrin RJ, Fagan AM, Holtzman DM (2009) Multimodal techniques for diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease. *Nature* **461**, 916-922.
- [64] Price JL, Morris JC (1999) Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. *Ann Neurol* **45**, 358-368.
- [65] Perez-Nievas BG, Stein TD, Tai HC, Dols-Icardo O, Scotton TC, Barroeta-Espar I, Fernandez-Carballo L, de Munain EL, Perez J, Marquie M, Serrano-Pozo A, Frosch MP, Lowe V, Parisi JE, Petersen RC, Ikonomic MD, Lopez OL, Klunk W, Hyman BT, Gomez-Isla T (2013) Dissecting phenotypic traits linked to human resilience to Alzheimer's pathology. *Brain* **136**, 2510-2526.
- [66] Trujillo-Estrada L, Jimenez S, De C, Torres V, Baglietto-Vargas M, Moreno-Gonzalez D, Navarro I, Sanchez-Varo V, Sanchez-Mejias R, Davila E, Vizuete JC, Gutierrez M, Vitorica A, J (2013) *In vivo* modification of Abeta plaque toxicity as a novel neuroprotective lithium-mediated therapy for Alzheimer's disease pathology. *Acta Neuropathol Commun* **1**, 73.
- [67] O'Mara S (2006) Controlling hippocampal output: The central role of subiculum in hippocampal information processing. *Behav Brain Res* **174**, 304-312.
- [68] O'Mara SM, Sanchez-Vives MV, Brotons-Mas JR, O'Hare E (2009) Roles for the subiculum in spatial information processing, memory, motivation and the temporal control of behaviour. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **33**, 782-790.
- [69] Craig S, Commins S (2006) The subiculum to entorhinal cortex projection is capable of sustaining both short- and long-term plastic changes. *Behav Brain Res* **174**, 281-288.
- [70] Burggren AC, Renner B, Jones M, Donix M, Suthana NA, Martin-Harris L, Ercoli LM, Miller KJ, Siddarth P, Small GW, Bookheimer SY (2011) Thickness in entorhinal and subicular cortex predicts episodic memory decline in mild cognitive impairment. *Int J Alzheimers Dis* **2011**, 956053.



