



**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR
FACULTAD DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA
INSTITUTO DE BIOMEDICINA DE SEVILLA**

**Las placas de A β inducen una pérdida
progresiva de vasos mediante
angiogénesis no productiva. Nuevo
mecanismo fisiopatológico en la
Enfermedad de Alzheimer**

**Trabajo presentado para optar al Grado de Doctora por la
Universidad de Sevilla**

María Isabel Álvarez Vergara

Sevilla, 2021

D. Alberto Pascual Bravo, científico titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

CERTIFICA:

Que la memoria de trabajo titulada “Las placas de A β inducen una pérdida progresiva de vasos mediante angiogénesis no productiva. Nuevo mecanismo fisiopatológico en la Enfermedad de Alzheimer” elaborada por María Isabel Álvarez Vergara, graduada en Biomedicina Básica y Experimental y beneficiaria del programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU) por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte del Gobierno de España (FPU15/02898), ha sido realizada bajo su dirección y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctora por la Universidad de Sevilla.

Para que conste firma la presente en Sevilla, a 13 de mayo de 2021

Fdo: Alberto Pascual Bravo

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

Alvarez-Vergara, M.I. *, Rosales-Nieves*, A. E., March-Diaz, R., Rodriguez-Perinan G., Lara-Urena, N., Ortega-de San Luis, C., Sanchez-Garcia, M.A., Martin-Bornez, M., Gómez-Gálvez, P., Vicente-Munuera, P., Fernandez-Gomez, B., Marchena, M.A., Bullones-Bolanos A.S., Davila, J.C., Gonzalez-Martinez, R., Trillo-Contreras, J.L., Sanchez-Hidalgo, A.C., del Toro, R., G. Scholl, F., Herrera, E., Trepel, M., Körbelin, J., Escudero, L.M., Villadiego, J., Echevarria, M., de Castro, F., Gutierrez, A., Rabano, A., Vitorica, J.,& Pascual. A. Non-productive angiogenesis disassembles A β plaque-associated blood vessels. Nature Communications. (aceptado).

March-Diaz, R.* , Lara-Ureña, N.* , Romero-Molina, C.* , Heras-Garvin, A.* , Ortega-de San Luis, C.* , **Alvarez-Vergara, M.I.**, Sanchez-Garcia, M.A., Sanchez-Mejias, E., Davila, J.C., Rosales-Nieves, A.E., Forja, C., Navarro, V., Gomez-Arboledas, A., Sanchez-Mico, M.V., Viehweger, A., Gerpe, A., Hodson, E.J., Vizquete, M., Ratcliffe, P.J., Bishop, T., Serrano-Pozo, A., Lopez-Barneo, J., Berra, E., Gutierrez, A., Vitorica, J.#, Pascual A.#. Hypoxia compromises the mitochondrial metabolism of Alzheimer's disease microglia via HIF1. Nature Aging (aceptado).

ÍNDICE

A. INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	3
1.1. Antecedentes históricos.....	3
1.2. Manifestaciones clínicas y tratamiento actual de EA.....	3
1.3. Marcadores patológicos.....	5
1.3.1. Patología macroscópica	5
1.3.2. Patología microscópica	5
1.4. Tipos de enfermedad de Alzheimer	6
1.4.1. Alzheimer familiar (FAD).	6
1.4.2. Alzheimer esporádico (LOAD).	7
2. Aβ Y PATOLOGÍA AMILOIDE	9
2.1. Proteína Precursora Amiloide (A β PP)	9
2.2. Procesamiento de A β PP	10
2.2.1. Ruta no amiloidogénica.....	10
2.2.2. Ruta amiloidogénica.....	10
2.3. Aclaramiento del péptido amiloide.....	11
3. PRESENLINAS: PS1 Y PS2	12
3.1. Mecanismo de acción del complejo γ -secretasa.....	13
3.2. Mutaciones en PS en la EA	14
3.3. Funciones biológicas de PS.....	16
3.3.1. Funciones independientes del complejo γ -secretasa	16
3.3.2. Funciones dependientes del complejo γ -secretasa	17
3.4. Diferentes sustratos de Presenilinas	18
4. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE NOTCH	20
4.1. Receptores NOTCH.....	20
4.2. Regulación canónica de Notch	21
4.2.1. Ligandos de la vía canónica	21
4.2.2. Activación de la vía canónica	22
4.2.3. Interacción ligando y receptor en la vía canónica.....	23
4.3. Regulación no canónica de Notch.....	24
5. LA VÍA DE NOTCH EN LA REGULACIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS	24
5.1. Inhibición lateral mediada por Notch: eje VEGF/DII4/NOTCH	25
5.1.1. Fenotipos de las células endoteliales: tip, stalk y phalanx.....	26

5.1.2. Etapas del sprouting angiogénico	27
6. HIPOXIA	30
6.1. Regulación de la concentración de oxígeno.....	30
6.2. Hipoxia en la EA.....	31
6.3. Hipoxia e inflamación.....	33
6.3.1. Hipoxia e inflamación en la EA	33
7. SISTEMA VASCULAR Y EA	35
7.1. Angiogénesis y EA.....	36
8. TRABAJO PREVIO DEL LABORATORIO	36

B. OBJETIVOS

43

C. MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	47
1.1. Mantenimiento y cuidados generales.....	47
1.2. Líneas utilizadas.....	47
1.2.1. Modelos genéticos de EA	48
1.2.2. Modelos genéticos portadores del sistema CRE/LoxP.....	48
1.2.3. Otros modelos genéticos de neurodegeneración	50
1.3. Intervenciones quirúrgicas generales	50
1.4. Genotipado de los animales.....	51
1.4.1. Extracción de ADN.....	51
2. APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS EN MODELOS DE EA	54
2.1. Tratamiento con sorafenib.....	54
2.2. Tratamiento con hiperoxia	54
2.3. Tratamiento con virus adenoasociados AAV-BR1	55
2.3.1. Síntesis de vectores basados en virus adenoasociados (AAV-BR1)	56
2.3.2. Inyección de AAV-BR1	57
2.3.3. Detección de la construcción inyectada mediante AAV-BR1.....	58
3. MUESTRAS HUMANAS POSTMORTEN	59
3.1. Descripción de las muestras incluidas en el estudio	59
3.2. Procesamiento de las muestras humanas posmortem	60
3.3. Inmunohistoquímica (IHC) en muestras humanas.....	61

3.4. Adquisición de imágenes y análisis	62
4. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS EN MODELOS ANIMALES	63
4.1. Inmunodetección de la perfusión vascular	64
4.1.1. Fundamento de la técnica	64
4.1.2. Procedimiento	64
4.1.3. Cuantificación	65
4.2. Inmunodetección de marcadores asociados con la vasculatura	66
4.2.1. Fundamento de la técnica	66
4.2.2. Procedimiento	66
4.2.3. Cuantificaciones	68
4.3. Hibridación in situ combinada con inmunofluorescencia	70
4.3.1. Fundamento de la técnica	70
4.3.2. Procedimiento	71
4.3.3. Cuantificaciones	73
4.4. Microscopía electrónica	74
5. CLARIFICACIÓN DEL CEREBRO MEDIANTE LA TÉCNICA DE IDISCO	74
5.1. Fundamento de la técnica	74
5.2. Procedimiento	75
5.3. Adquisición de imágenes	76
6. AISLAMIENTO DE CÉLULAS ENDOTELIALES CEREBRALES MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO	76
7. EXTRACCIÓN DE ARN Y qRT-PCR	78
7.1. Extracción de ARN	78
7.1.1. Muestras de corteza	78
7.1.2. Células endoteliales aisladas por FACS	79
7.2. qRT-PCR	79
7.2.1. Tratamiento con DNasa y retrotranscripción	79
7.2.2. RT-PCR	79
8. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y ELISA	81
8.1. Extracción de proteínas	81
8.2. Cuantificación de proteínas	81
8.3. ELISA A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂	82
9. ESTUDIO TRANSCRIPTÓMICO	82
9.1. Arrays de expresión	82
9.2. Ontología de genes con GSEA	83
9.2.1. Fundamento de la técnica	83

9.2.2. Procedimiento	83
10. PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO	84
10.1. Prueba de campo abierto.....	84
10.2. Prueba de reconocimiento de un nuevo objeto	84
11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	85

D. RESULTADOS

1. OBJETIVO 1: ESTUDIAR EL MICROAMBIENTE HIPÓXICO Y LA ANGIOGÉNESIS EN LA PLACA AMILOIDE DE MODELOS Y PACIENTES DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	87
1.1. Las placas de A β constituyen un microambiente hipóxico e inducen una elevada expresión de HIF1 en las células que la rodean	87
1.2. Marcadores pro-angiogénicos enriquecidos en torno a las placas de A β	88
1.3. Las placas de A β se encuentran hipoperfundidas.....	95
2. OBJETIVO 2: ESTUDIAR LA VASCULATURA CEREBRAL EN MODELOS DE EA QUE ACUMULAN Aβ	97
2.1. OBJETIVO 2.1: Estudiar los mecanismos moleculares implicados en el daño vascular cerebral observado en modelos de EA	97
2.1.1. Alrededor de las placas de A β se inicia un proceso patológico de angiogénesis no productiva (NPA)	97
2.1.2. Anomalías vasculares IB4+ compatibles con NPA alrededor de las placas de A β ..	101
2.1.3. Las anomalías IB4+ son cicatrices vasculares (VaS) que sustituyen a los vasos sanguíneos.....	110
2.1.4. La NPA induce la fagocitosis de los vasos sanguíneos asociados a las placas de A β por parte de la A β AM.....	114
2.1.5. La pérdida de función de la inhibición lateral mediada por Notch es responsable de la formación de las VaS	118
2.1.6. La pérdida de función de la actividad γ -secretasa en células endoteliales reproduce las VaS en ausencia de patología amiloide	119
2.2. OBJETIVO 2.2. Diseñar abordajes terapéuticos que puedan revertir el daño vascular observado en torno a las placas de A β	126
2.2.1. El tratamiento con sorafenib valida la inducción de NPA entorno a las placas amiloides	126
2.2.2. El tratamiento con oxígeno para mejorar la estabilidad vascular presenta variabilidad ligada al género	128

E. DISCUSIÓN

1. OBJETIVO 1: ESTUDIAR EL MICROAMBIENTE HIPÓXICO Y LA ANGIOGÉNESIS EN LA PLACA AMILOIDE DE MODELOS Y PACIENTES DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	134
1.1. Las placas de A β constituyen un microambiente hipóxico e inducen una elevada expresión de HIF1 y de marcadores pro-angiogénicos.	134
1.2. Las placas de A β se encuentran hipoperfundidas.....	135
2. OBJETIVO 2: ESTUDIAR LA VASCULATURA CEREBRAL EN MODELOS DE EA QUE ACUMULAN Aβ	137
2.1. OBJETIVO 2.1. Estudiar los mecanismos moleculares implicados en el daño vascular cerebral observado en modelos de EA.....	137
2.1.1. Alrededor de las placas de A β se inicia un proceso patológico de angiogénesis no productiva (NPA)	137
2.1.2. Anomalías vasculares IB4 ⁺ compatibles con NPA alrededor de las placas de A β	137
2.1.3. La NPA induce la fagocitosis de los vasos sanguíneos asociados a las placas de A β por parte de la A β AM.....	139
2.1.4. La pérdida de función de la inhibición lateral mediada por Notch es responsable de la formación de las VaS	140
2.1.5. La pérdida de función de la actividad γ -secretasa en células endoteliales reproduce las VaS en ausencia de patología amiloide.	141
2.2. OBJETIVO 2.2. Diseñar abordajes terapéuticos que puedan revertir el daño vascular observado en torno a las placas amiloides.	145
2.2.1. El tratamiento con sorafenib valida la inducción de NPA entorno a las placas amiloides	145
2.2.2. El tratamiento de hiperoxia para mejorar la estabilidad vascular presenta variabilidad ligada al género	148
3. CONSIDERACIONES FINALES.....	150

F. CONCLUSIONES 154

G. BIBLIOGRAFÍA 157

H. ANEXOS 187

**ÍNDICE DE
FIGURAS Y TABLAS**

ÍNDICE DE FIGURAS

A. INTRODUCCIÓN

Figura A1. Procesamiento de la A β PP: vía no amiloidogénica y amiloidogénica.....	11
Figura A2. Transporte de A β a través del cerebro	12
Figura A3. Esquema representativo de las proteínas que componen el complejo γ - secretasa	13
Figura A4. Mutaciones descritas en PS1	15
Figura A5. Esquema representativo de los dominios proteicos del receptor NOTCH.....	21
Figura A6. Activación de la vía canónica de Notch.....	23
Figura A7. Microscopía de fluorescencia de un <i>sprout</i> angiogénico.....	26
Figura A8. Esquema representativo del <i>sprout</i> angiogénico	27
Figura A9. Esquema de la señalización bidireccional entre la célula <i>tip/stalk</i>	29
Figura A10. Angiogénesis no productiva en una retina de un ratón heterocigoto para Dll4	30
Figura A11. Esquema representativo de los componentes de la UNV	32
Figura A12. Medida de expresión de HIF1 α a nivel de ARNm y de proteína en muestras de hipocampo de controles y pacientes de EA.	37
Figura A13. Estudios de enriquecimiento funcional de la firma hipóxica (HMM) en microglía aislada en diferentes modelos animales de EA mediante GSEA.....	38
Figura A14. Las placas de A β son áreas hipóxicas.....	39

C. MATERIAL Y MÉTODOS

Figura C1. Expresión en cerebro del gen luciferasa mediada por el vector AAV-BR1.	56
Figura C2. Método de triple transfección en células HEK293T para la obtención de virus adenoasociados AAV-BR1	57
Figura C3. Diseño de oligos para detectar por PCR la delección del gen <i>Psen1</i> en los animales tratados con la enzima CRE recombinasa.	58
Figura C4. Flujo de trabajo en el procesamiento de las muestras humanas de pacientes y controles de EA.	61
Figura C5. Flujo de trabajo durante el proceso de inmunodetección de I α V β 3 y Tio-S en hipocampo de muestras humanas.....	62
Figura C6. Obtención de las coordenadas y del número total de células I α V β 3 ⁺ y de placas de A β sobre cada una de las muestras humanas.....	63
Figura C7. Imágenes obtenidas en Fiji usadas para la cuantificación de la perfusión con EB en regiones proximales y distales a placas en un ratón <i>APP_{751SL}/+</i>	66
Figura C8. Esquema representativo del protocolo de ISH.	71
Figura C9. Esquema representativo del flujo de trabajo durante el proceso de clarificación de cerebro mediante la técnica de iDISCO.....	75

Figura C10. Esquema representativo de la prueba de reconocimiento de un nuevo objeto. 84

D. RESULTADOS

Figura D1. La expresión del ARNm de <i>Hif1a</i> en microglía se restringe a la zona cercana a depósitos amiloides.	88
Figura D2. La expresión de VEGF se asocia a las placas amiloides y es producido principalmente por los astrocitos.	89
Figura D3. Las células endoteliales emiten filopodios dirigidos a los focos VEGF ⁺	90
Figura D4. El marcador angiogénico $\lambda v\beta 3$ se acumula alrededor de las placas amiloides en el modelo <i>APP-PSEN1/+</i>	91
Figura D5. Expresión de $\lambda v\beta 3$ en el cerebro de pacientes de EA.	92
Figura D6. El marcador angiogénico $\lambda v\beta 3$ se acumula alrededor de las placas amiloides en muestras de pacientes con EA.	93
Figura D7. La $\lambda v\beta 3$ forma un depósito anómalo entorno a las placas amiloides en muestras humanas.	94
Figura D8. Las placas de A β en el modelo murino <i>APP-PSEN1/+</i> están hipoperfundidas.	95
Figura D9. Las placas de A β en el modelo <i>APP₇₅₁SL/+</i> están hipoperfundidas.	96
Figura D10. Aislamiento de células endoteliales de la corteza cerebral en ratones <i>APP-PSEN1/+</i> adultos.	98
Figura D11. La angiogénesis no es productiva (NPA) alrededor de las placas de A β	99
Figura D12. Validación de la represión de la vía Wnt/ β -catenina observada en el <i>microarray</i> de células endoteliales.	100
Figura D13. <i>Plaur</i> está sobreexpresado en regiones próximas a las placas amiloides.	101
Figura D14. El estudio de la NPA mediante IHC con el marcador IB4 muestra la presencia de anomalías IB4 ⁺ hipoperfundidas alrededor de las placas de A β	102
Figura D15. Las anomalías IB4 ⁺ no se originan a partir de los astrocitos ni de la microglía asociados a las placas de A β	103
Figura D16. El modelo murino de EAE no presenta anomalías IB4 ⁺	104
Figura D17. Las anomalías vasculares IB4 ⁺ se asocian a las placas de A β y se acumulan en el cerebro de ratones <i>APP-PSEN1/+</i> durante el curso de la patología.	106
Figura D18. Representación en 3D del cerebro de un ratón <i>APP-PSEN1/+</i> clarificado mediante la técnica iDISCO.	107
Figura D19. Las anomalías vasculares IB4 ⁺ del modelo <i>APP₇₅₁SL/+</i> son idénticas a las observadas en el modelo <i>APP-PSEN1/+</i>	108
Figura D20. Estudio de la vasculatura cerebral en el modelo murino <i>MAPT^{p.P301S}</i>	109
Figura D21. Estudio de la vasculatura cerebral en el modelo murino <i>APP-PSEN1; lepr db/db</i>	109
Figura D22. Reducción de la membrana basal endotelial en las proximidades de las placas de A β	111
Figura D23. Reducción de células endoteliales en las proximidades de las placas de A β	111

Figura D24. Reducción de pericitos (PDGFR β) en las proximidades de las placas de A β	112
Figura D25. Los vasos sanguíneos localizados en las regiones cercanas a las placas de A β pierden el pie astrocitario.	113
Figura D26. El estudio por microscopía electrónica revela que las anomalías IB4 ⁺ tienen naturaleza de cicatrices vasculares (VaS).....	114
Figura D27. La A β AM fagocita los vasos sanguíneos que sufren un proceso de NPA.	116
Figura D28. El marcador lisosomal CD68 confirma que las células microgliales fagocitan los vasos sanguíneos en las proximidades de las placas amiloides.	117
Figura D29. Modelo de trabajo del proceso de formación de VaS.	118
Figura D30. La vía Notch está inhibida en las proximidades de las placas amiloides	119
Figura D31. Modelo de inhibición de la actividad γ -secretasa en células endoteliales cerebrales.	121
Figura D32. Validación por ISH de la pérdida del gen <i>Psen1</i> en el cerebro de los ratones tratados con la Cre tras 19 días de la inyección viral.	122
Figura D33. La inhibición endotelial de la actividad γ -secretasa es suficiente para generar anomalías vasculares IB4 ⁺	123
Figura D34. Las VaS originadas en el modelo de pérdida de actividad del complejo γ -secretasa también sustituyen a los marcadores de la UNV.	124
Figura D35. En el modelo de pérdida de función del complejo γ -secretasa la microglía también fagocita los vasos sanguíneos asociados a las VaS.....	125
Figura D36. Inhibición de angiogénesis mediante el tratamiento con Sorafenib en ratones <i>APP_{751SL}/+</i>	127
Figura D37. Inhibición de angiogénesis mediante el tratamiento con hiperoxia en ratones <i>APP_{751SL}/+</i>	129
Figura D38. El estudio histológico del tratamiento con hiperoxia mostró diferencias ligadas al sexo. (A-B)	130

E. DISCUSIÓN

Figura E1. Reducción de la PIC en el cerebro de ratones <i>APP751SL/+</i>	136
--	-----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla C1. Condiciones de reacción de PCR para genotipado.	53
Tabla C2. Oligonucleótidos usados para el genotipado.	54
Tabla C3. Condiciones de reacción de PCR para la detección de virus AAV-BR1 en cerebro.	59
Tabla C4. Oligonucleótidos usados para la detección de virus AAV-BR1 en cerebro	59
Tabla C5. Colección de muestras humanas de pacientes y controles de EA.	60
Tabla C6. Relación de anticuerpos usados para la técnica de IHC	67

Tabla suplementaria 1. Genes expresados diferencialmente en las células endoteliales cerebrales de ratones <i>APP-PSEN1/+</i> versus a ratones controles.....	187
Tabla suplementaria 2. Genes incluidos en el GS “DII4+/-_UP”. Genes que incrementan su expresión en la retina de un ratón DII4 heterocigoto (Del Toro y col. 2010).	192
Tabla suplementaria 3. Los 20 GeneSet de la categoría “Biological Processes” que más incrementan su expresión en las células endoteliales cerebrales de ratones <i>APP-PSEN1/+</i> de 12 meses versus WT de 12 meses.....	194
.....	194
Tabla suplementaria 4.. Los 20 GeneSet de la categoría “Biological Processes” que más reducen su expresión en las células endoteliales cerebrales de ratones <i>APP-PSEN1/+</i> de 12 meses versus WT de 12 meses.....	195

ABREVIATURAS

AAV-BR1	Virus adenoasociados que infectan endotelio cerebral (<i>Adeno-Associated Viruses BR1</i>)	EB	<i>Evans Blue</i>
aLCR	Líquido cefalorraquídeo artificial	EAE	Encefalopatía autoinmune experimental (<i>Experimental Autoimmune Encephalomyelitis</i>)
ADAM	Metaloproteasa (<i>A desintegrin metalloprotease</i>)	ERG	Factor de transcripción endotelial (<i>ETS Related Gene</i>)
APH-1	Subunidad del complejo γ -secretasa (<i>Anterior Pharynx-Defective 1</i>)	ES	Parámetro de enriquecimiento funcional (<i>Enrichment Score</i>)
AQP4	Pie astrocitario (Acuaporina 4)	FACS	Clasificación de células activadas por fluorescencia (<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>)
Aβ	β -amiloide (<i>Amyloid-β</i>)	FAD	Alzheimer familiar (<i>Familial Alzheimer Disease</i>)
AβAM	Microlgía asociada a A β (<i>Aβ associated microglia</i>)	FC	<i>Fold change</i>
AβPP	Proteína precursora amiloide (<i>Amyloid-β Precursor Protein</i>)	FDR	<i>False Discovery Rate</i>
BACE-1	β -secretasa (<i>β-site Amyloid precursor protein-Cleaving Enzyme 1</i>)	FSC	Dispersión frontal (<i>Forward Scatter</i>)
BHE	Barrera hematoencefálica	FSC-A	Área dispersión frontal (<i>Forward Scatter Area</i>)
BP	Proceso biológico (<i>Biological Process</i>)	FSC-H	Altura dispersión frontal (<i>Forward Scatter Height</i>)
CAA	Angiopatía amiloide (<i>Cerebral Amyloid Angiopathy</i>)	FZD4	<i>Frizzled 4</i>
C83 o αCTF	Fragmento C-terminal α (<i>α C-Terminal Fragment</i>)	GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
C99 o βCTF	Fragmento C-terminal β (<i>β C-Terminal Fragment</i>)	GFAP	Marcador de astrocitos (<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>)
CBF	Flujo sanguíneo cerebral (<i>Cerebral Brain Flow</i>)	GSEA	Análisis de enriquecimiento funcional (<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>)
EA	Enfermedad de Alzheimer	GWAS	Estudios de asociación del genoma completo (<i>Genome Wide Association Studies</i>)

GSK3β	<i>Gene Expression Omnibus</i>	PDGFRβ	Marcador de pericitos (<i>Platelet Derived Growth Factor</i>)
HIF	Factor inducible por hipoxia (<i>Hypoxia Inducible Factor</i>)	PIC	Presión Intracraneal
HMM	<i>Firma hipóxica de la microglía (HIF1/Hypoxia-induced Microglial Module)</i>	Plaur	Marcador de angiogénesis (<i>Plasminogen Activator Urokinase Receptor</i>)
IBA1	Marcador microglial (<i>Ionized calcium-Binding Adapter molecule 1</i>)	PS1	Presenilina 1
IBA4	Isolectina B4	PS2	Presenilina 2
IαVβ3	Marcador angiogénesis (Integrina α V β 3)	PEN2	Subunidad del complejo γ -secretasa (<i>Presenilin Enhancer 2</i>)
ISF	Líquido intersticial (<i>Interstitial Fluid</i>)	SNC	Sistema nervioso central
ISH	Técnica de hibridación <i>in situ</i> (<i>In Situ Hybridization</i>)	SSC	Dispersión lateral (<i>Side Scatter</i>)
LCR	Líquido cefalorraquídeo	Tio-S	Marcador de placa amiloide (Tioflavina-S)
LOAD	Alzheimer esporádico (<i>Late Onset Alzheimer Disease</i>)	TJ	Uniones estrechas (<i>Tight Junctions</i>)
Log FC	Logaritmo del <i>Fold change</i>	TMX	Tamoxifeno
MAPT	Proteína TAU asociada a microtúbulos (<i>Microtubule Associated Protein TAU</i>)	UNV	Unidad neurovascular
NES	Normalización del ES (<i>Normalized Enrichment Score</i>)	VEGF	Factor de crecimiento del epitelio vascular (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
NFT	Ovillos neurofibrilares (<i>Neurofibrillary Tangles</i>)	VEGFR2	Receptor 2 de VEGF
NICD	Forma procesada del receptor NOTCH (<i>NOTCH Intracellular Domain</i>)	WB	<i>Western blot</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud	WT	Ratón silvestre (<i>Wild Type</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)		

A. INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

1.1. Antecedentes históricos

La Enfermedad de Alzheimer (EA) fue descrita por primera en 1907 por el psiquiatra y neurólogo Aloïs Alzheimer. La descripción del primer caso fue el de la paciente Auguste Deter, de 51 años, quien presentaba síntomas cognitivos y conductuales bastante llamativos y muy diferentes a los que se asociaban con una demencia senil. La paciente sufría afasia, paranoia, agresividad, problemas de memoria a corto plazo e incapacidad para identificar objetos y personas cotidianas en su vida. Auguste Deter murió 5 años después de la aparición de los primeros síntomas de esta enfermedad. El análisis anatómico patológico del cerebro reveló la presencia de depósitos proteicos tanto a nivel extracelular (placas seniles), como a nivel intracelular (ovillos neurofibrilares), localizados principalmente en la corteza cerebral e hipocampo. Ambas lesiones continúan siendo actualmente los principales marcadores *postmortem* de esta enfermedad. Dicho estudio fue recogido por Alzheimer en el artículo titulado “Una enfermedad peculiar de la corteza cerebral” (Alzheimer, 1907). En 1910, otro psiquiatra alemán, Emil Kraepelin, dio el nombre de Enfermedad de Alzheimer (EA) a esta nueva manifestación clínica y patológica, en reconocimiento al esfuerzo y los hallazgos del doctor Alzheimer (Hunting, 2015; Kay y col. 1964; Scheltens y col. 2016; Strassnig, M. & Ganguli, 2005).

1.2. Manifestaciones clínicas y tratamiento actual de EA

La demencia es un síndrome que implica un deterioro de las capacidades cognitivas, siendo lo suficientemente severo como para que las actividades cotidianas de la persona afectada se vean comprometidas. La demencia puede ser causada por diversas enfermedades y lesiones que afectan al cerebro de forma primaria o secundaria, como la EA o los accidentes cerebrovasculares, respectivamente. La EA es la causa más común de demencia, pues en edades superiores a 65 años, 2 de cada 3 casos de personas que sufren demencia padecen EA (OMS 2017). En la actualidad, se estima que el número de pacientes con EA es de 24 millones a nivel mundial (OMS 2017; Prince y col. 2016). Al ser esta patología característica de la población envejecida, y dado el aumento en la esperanza de vida registrado en los últimos años, se estima que la prevalencia de la enfermedad sea 4 veces mayor en 2050 (OMS 2017; Kumar & Tsao, 2018; Prince y col. 2016).

La EA es una enfermedad neurodegenerativa de carácter progresivo e irreversible que se manifiesta con deterioro de las funciones cognitivas y conductuales. Desde el punto de vista clínico, la EA se clasifica en 3 fases atendiendo el grado de alteración cognitiva (Kumar y Tsao, 2018). La primera fase “preclínica” es asintomática, cursa con amiloidosis cerebral

y afecta a la corteza entorrinal y al hipocampo; a continuación, hay una fase "prodrómica" o de "deterioro cognitivo leve" (MCI; del inglés, *Mild Cognitive Impairment*), en la que la patología progresa hacia distintas áreas de la corteza cerebral. En este estadio debutan los primeros síntomas, siendo la pérdida de memoria a corto plazo o amnesia, el rasgo más característico. Finalmente, la fase de "demencia" es consecuencia de la pérdida de sinapsis y neuronas en las regiones cerebrales responsables de los procesos cognitivos, como son la corteza entorrinal, el hipocampo, la amígdala y las áreas neocorticales. En este estadio más avanzado, la amnesia inicial suele ir acompañada de la incapacidad para llevar a cabo tareas cotidianas (apraxia), así como de alteraciones en el lenguaje (afasia), y pérdida de la capacidad de reconocimiento a pesar de una correcta percepción a través de los sentidos (agnosia) (Helmes & Østbye, 2002). El pensamiento abstracto y el razonamiento también se ven seriamente afectados. Por último, los síntomas neuropsiquiátricos tales como apatía, desinhibición, psicosis o aislamiento social son igualmente típicos de la fase más avanzada en la EA (Hane y col. 2017; Karch y col. 2014; Kumar & Tsao, 2018; Scheltens y col. 2016; Serrano-Pozo y col. 2011; Winblad y col. 2016). El curso clínico de la enfermedad suele durar de 4 a 8 años tras la aparición de los primeros síntomas, aunque se puede alargar hasta los 20 (Kumar & Tsao, 2018).

A pesar de los avances conseguidos entorno a la caracterización molecular de la EA, a día de hoy, se desconocen las causas exactas que la originan. Además, la ausencia de buenos marcadores biológicos hace que aún no dispongamos de un test *premortem* para un diagnóstico concluyente y que sólo el análisis neuropatológico *postmortem* permita su diagnóstico definitivo (Hane y col. 2017; Kumar & Tsao, 2018). Hasta la fecha, los fármacos disponibles para el tratamiento de esta enfermedad actúan a nivel sintomático, mejorando las funciones cognitivas, aunque su potencial terapéutico va disminuyendo con la progresión de la enfermedad y en ningún caso modifican el curso temporal de la patología. Este efecto se obtiene modulando dos mecanismos de neurotransmisión implicados en la patología de Alzheimer: neurotransmisión mediada por acetilcolina y glutamato (Farlow y col. 2008; Kumar & Tsao, 2018). En el primer caso, haciendo uso de inhibidores de la enzima acetil colinesterasa, se consigue aumentar los niveles de acetilcolina, con el objetivo de combatir la neurodegeneración de neuronas colinérgicas característica de estos pacientes (Mufson y col. 2008). En cuanto a la señalización mediada por glutamato, con un antagonista parcial de los receptores NMDA se hace frente a la excitotoxicidad asociada a este neurotransmisor en la EA (Tanovic & Alfaro, 2006). Existen nuevas líneas de tratamiento que tienen como dianas la inflamación, el estrés oxidativo, el metabolismo del colesterol, o incluso, la modulación de procesos hormonales, siendo todos ellos factores implicados en la EA (Farlow y col. 2008). No obstante, hasta la fecha no existe ningún tratamiento

farmacológico efectivo que cure la enfermedad, ni siquiera que modifique el curso de la misma. Es por ello que se requiere una búsqueda intensa sobre los mecanismos moleculares que subyacen a dicha patología con el objetivo de obtener dianas terapéuticas específicas (Kumar & Tsao, 2018; Reitz & Mayeux, 2014).

1.3. Marcadores patológicos

En el cerebro de un paciente enfermo de Alzheimer existen cambios tanto a nivel macroscópico como microscópico.

1.3.1. Patología macroscópica

En la EA se observa una atrofia cortical generalmente simétrica y de carácter difuso, aunque se asocia con una mayor frecuencia a las regiones frontotemporales del cerebro. Como resultado de dicho adelgazamiento cortical, el sistema ventricular puede aparecer fuertemente dilatado (lo que recibe el nombre de hidrocefalia *ex vacuo*). La atrofia del hipocampo, junto con una dilatación prominente del asta temporal del ventrículo lateral son los rasgos macroscópicos más específicos en la EA (Guimerà y col. 2002).

La presencia de microinfartos y microhemorragias, así como la desmielinización de la sustancia blanca periventricular, que refleja un daño vascular, son rasgos macroscópicos frecuentes de la EA. Este dato deja en evidencia la relación entre las enfermedades cerebrovasculares y la patología de Alzheimer (Serrano-Pozo et al., 2011; Wardlaw et al., 2015).

1.3.2. Patología microscópica

Los marcadores microscópicos de la enfermedad se pueden clasificar en marcadores positivos y negativos. Dentro de los marcadores positivos se encuentran: las placas amiloides, los ovillos neurofibrilares, la activación microglial y la angiopatía cerebral amiloide (CAA; del inglés, *cerebral amyloid angiopathy*). Además de las lesiones positivas, la pérdida de neuronas y de sinapsis se engloban dentro de los marcadores negativos de la EA. En concreto, la CAA y la pérdida de sinapsis son considerados los marcadores con mayor carácter predictivo del deterioro cognitivo en dicha patología.

Las **placas amiloides** son depósitos extracelulares insolubles que contienen principalmente fragmentos del péptido A β . El péptido A β tiene una longitud variable de entre 39 y 43 aminoácidos y es un producto natural del metabolismo de la proteína precursora amiloide o de A β (A β PP) (De Strooper, 2010). Las especies más abundantes de A β son A β ₄₀ y A β ₄₂. Debido a su mayor agregación e insolubilidad, A β es más abundante en las placas amiloides (Goedert & Spillantini, 2006; Imbimbo y col., 2005; Mott & Hulette, 2005).

Los **ovillos neurofibrilares** (NFT; del inglés, *Neurofibrillary Tangles*) son agregados intracelulares que están principalmente compuestos por proteína Tau fosforilada. La proteína Tau, en condiciones fisiológicas, se asocia a los microtúbulos regulando su ensamblaje. Gracias a ello, se mantiene la arquitectura y el transporte de proteínas y vesículas en la neurona (Delacourte, 2005). Cuando la proteína Tau está hiperfosforilada (P-Tau), se disocia de los microtúbulos y debido a esta modificación, se agrega formando filamentos helicoidales que darán lugar a los ovillos neurofibrilares. Los NFTs extracelulares proceden de la muerte de neuronas portadoras y, tanto su concentración como distribución están estrechamente relacionadas con la neurodegeneración, aunque no está claro si la formación de NFTs causa la muerte neuronal o si, por el contrario, es un mecanismo de protección de la propia célula (Bierer y col. 1995; Serrano-Pozo y col. 2011).

Durante la EA existe un **proceso neuroinflamatorio** importante, con activación glial de astrocitos y microglía (Heneka y col. 2015) que se asocia fundamentalmente con el depósito de placas amiloides con núcleo denso y también con la aparición de NFTs (Serrano-Pozo y col. 2011).

El péptido A β amiloide no sólo se deposita en el parénquima cerebral en forma de placas amiloides, sino que también aparece en la pared de los vasos sanguíneos dando lugar a la **CAA**. Esta acumulación se da en vasos corticales y leptomenínges de pequeño tamaño y, más concretamente, en la capa media de la pared del vaso (túnica media), donde se localiza el músculo liso, siendo más frecuente el depósito de A β_{40} (Serrano-Pozo y col. 2011).

La **pérdida sináptica** y **degeneración neuronal** son otros rasgos significativos de la enfermedad. Ambos procesos se dan en áreas cerebrales especialmente vulnerables que, en la mayoría de los casos, están implicadas en el procesamiento de la información y la adquisición de la memoria (Gómez-Isla y col. 1996).

1.4. Tipos de enfermedad de Alzheimer

Existen dos tipos de EA en función de la edad de aparición de los primeros síntomas y de los factores genéticos causantes, pero ambos comparten la misma sintomatología y lesiones histopatológicas (Bagyinszky y col. 2014; Ballard y col., 2011; Gomez-Isla y col. 2008; Perl, 2010; Gassen & Annaert, 2003).

1.4.1. Alzheimer familiar (FAD).

Representa entre el 1-3% de los casos de Alzheimer y se manifiesta a edades tempranas, generalmente entre los 35 y 40 años de edad (Ringman y col. 2015), por lo que también se conoce como “Alzheimer de inicio temprano” o FAD (del inglés, *Familial Alzheimer Disease*).

La gran mayoría de casos con FAD presentan un patrón de herencia autosómica dominante. Con el objetivo de identificar los factores genéticos asociados a la manifestación temprana de EA, se llevaron a cabo estudios masivos mediante la reconstrucción de pedigrís y análisis de ligamiento genético. Este abordaje, permitió identificar mutaciones con un 100% de penetrancia en 3 loci genéticos que codifican para la *proteína precursora amiloide* (A β PP) y las *presenilinas 1 y 2* (PS1 y PS2) localizados en los cromosomas 21, 14 y 1, respectivamente (Hane y col. 2017; Kumar & Tsao, 2018; Robinson y col. 2018). Estas proteínas están implicadas en la producción y agregación del péptido β -amiloide (componente principal de las placas seniles). La primera (A β PP) es su precursora y las otras dos (PS1 y PS2) forman parte del complejo γ -secretasa que interviene en el procesamiento de A β PP. Actualmente, se han descrito 52 mutaciones en A β PP, 241 en PS1 y sólo 45 en PS2, relacionadas con la enfermedad (<http://www.alzforum.org/mutations>).

Aunque las primeras mutaciones relacionadas con la EA se describieron en la proteína precursora amiloide (A β PP), sólo son responsables del 10% de los casos de FAD. No obstante, la implicación de este gen en la EA es tan evidente que, con el aumento de sólo una copia en los casos de trisomía del cromosoma 21, es suficiente para causar los síntomas de demencia que pueden experimentar los individuos con Síndrome de Down a edades tempranas (Czech y col. 2000; Thinakaran & Koo, 2008; Wiseman y col. 2015). Sin embargo, las mutaciones en el gen de la presenilina 1 (PS1) son la causa más frecuente de Alzheimer familiar, con un 30-50% de los casos antes de los 55 años y un 70% del total de casos de FAD (Czech y col. 2000; Sherrington y col. 1995).

Por último, la convergencia entre los hallazgos histopatológicos y los estudios genéticos, destacó el papel del péptido amiloide en la fisiopatología de la EA, y supuso el lanzamiento de la *hipótesis amiloide* para justificar el curso clínico y molecular de dicha enfermedad (Bertram y col. 2010; Goate & Hardy, 2012).

1.4.2. Alzheimer esporádico (LOAD).

Esta variante representa la mayoría de los casos de EA (97-99%) y se le conoce también como Alzheimer “de inicio tardío” o LOAD (del inglés, *Late Onset Alzheimer Disease*). Afecta al 3-4% de los adultos entre los 60 y 65 años, y su incidencia se duplica cada 5 años, aumentando exponencialmente con la edad (Jahn, 2013; Prince y col. 2013). Sus causas son desconocidas hasta el momento y se le otorga un origen multifactorial. Los principales factores que influyen en la aparición de LOAD son los factores genéticos y los factores ambientales, y dentro de esta última categoría podemos diferenciar entre aquellos que son no modificables y los modificables (Ballard y col. 2011; Kumar & Tsao, 2018; Livingston y col. 2017; Scheltens y col. 2016; Van Cauwenberghe y col. 2016).

- **Factores Genéticos**

En la LOAD no existe un patrón de herencia autosómico tan definido como en la FAD. En este caso se habla de variantes o alelos de riesgo que, por sí solos o en combinación con varios de ellos y con factores ambientales, modifican la probabilidad de padecer dicha enfermedad. De este modo, la implicación genética en LOAD podría alcanzar el 60-80% (Van Cauwenberghe y col. 2016). Estudios genéticos masivos como son los GWAS (del inglés, *Genome Wide Association Studies*), han permitido identificar alelos asociados a la EA (Robinson y col. 2017; Sancesario & Bernardini, 2018). Dentro de esta categoría, el alelo $\epsilon 4$ del gen apolipoproteína E (*APOE*) se ha identificado como el principal factor de riesgo que contribuye a la patología de Alzheimer de inicio tardío. Apo $\epsilon 4$ también se relaciona con el metabolismo y el aclaramiento del péptido A β , al igual que las mutaciones descritas en la FAD, lo que refuerza aún más el papel del péptido amiloide en la fisiopatología de la enfermedad. Para el gen *APOE* existen tres alelos polimórficos ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$) que codifican 3 isoformas distintas: Apo $\epsilon 2$, Apo $\epsilon 3$ (las isoformas más frecuentes) y Apo $\epsilon 4$. La presencia del alelo Apo $\epsilon 4$ aumenta el riesgo de padecer FAD o LOAD en heterocigosis hasta 3 veces, y hasta 15 veces en homocigosis.

Por otro lado, estos estudios genéticos masivos han identificado otros alelos asociados a la patología de Alzheimer y, curiosamente, la mayoría de ellos se expresan principalmente en células implicadas en la respuesta inflamatoria del sistema nervioso central (SNC), como la microglía y los astrocitos (CR1, CD33, MS4A, ABCA7, EPHA1, CLU, HLA-DRB5/HLA-DRB1, INPP5D, TREM2 y MEF2C) (Lambert y col. 2013b), así como en el aclaramiento y procesamiento del péptido amiloide (TREM2, CLU) y en el metabolismo del colesterol (APOE, SORL1, ABCA7 y CLU) (Robinson y col. 2017; Sancesario & Bernardini, 2018).

- **Factores Ambientales.**

- a) **Factores no modificables**

El principal factor de riesgo no modificable que predispone a padecer LOAD es la edad. Sin embargo, la EA no es un rasgo natural dentro del proceso de envejecimiento, lo que indica que la edad no es causa necesaria de dicha enfermedad y, por tanto, deben existir otros factores adicionales (Alzheimer's Association, 2016; Ballard y col. 2011; Mattson & Arumugam, 2018).

Por otro lado, un rasgo muy característico del cerebro de pacientes con EA es la caída en el flujo sanguíneo cerebral (CBF; del inglés, *Cerebral Blood Flow*). Existe una correlación directa entre la reducción del CBF y el daño cognitivo (Leijenaar y col. 2017). Por este motivo, todas aquellas enfermedades que suponen un daño cardiovascular (infarto de

miocardio, hipertrofia ventricular, insuficiencia cardiaca, daño valvular, etc.) con la consecuente limitación en el aporte de oxígeno y nutrientes al cerebro, constituyen un factor de riesgo para la EA.

b) Factores modificables

Dentro de la categoría de factores ambientales modificables se encuentran: factores de riesgo vasculares como la hipertensión, dislipemias, aterosclerosis, diabetes tipo 2, obesidad, tabaquismo o la adquisición de hábitos saludables como la práctica de ejercicio físico o el cumplimiento de una dieta saludable. En definitiva, todos aquellos factores que podrían comprometer el aporte de oxígeno al cerebro. La relación existente entre los factores cardiovasculares y la aparición de EA ha llevado a establecer la *hipótesis vascular de la EA* y deja de manifiesto el papel tan importante que desempeña el sistema vascular y la hipoxia cerebral en esta patología (Armstrong, 2019; de la Torre, 2018; De La Torre, 2010; Serrano-Pozo & Growdon, 2019).

Además, un nivel socio-cultural bajo, así como el aislamiento social relacionado con enfermedades como la sordera o determinadas enfermedades psiquiátricas como la depresión, aumenta el riesgo de padecer LOAD (Livingston y col. 2017).

2. A β Y PATOLOGÍA AMILOIDE

Una de las lesiones microscópicas más características del cerebro de pacientes de Alzheimer son las placas seniles: agregados proteicos localizados en el parénquima cerebral cuyo componente principal es el péptido A β que también podrían depositarse en la pared de los vasos sanguíneos dando lugar a la CAA. El A β se obtiene como resultado del procesamiento proteolítico de la proteína precursora del péptido beta-amiloide (A β PP).

2.1. Proteína Precursora Amiloide (A β PP)

A β PP se localiza en el cromosoma 21 (21q21) y codifica para una proteína transmembrana tipo 1 con un dominio extracelular largo y una cola citoplasmática pequeña. A β PP se expresa de forma ubicua y presenta *splicing* alternativo dando lugar a tres transcritos: A β PP695, A β PP751 y A β PP770. La isoforma A β PP695 se expresa fundamentalmente en neuronas, mientras que la A β PP751 se expresa en astrocitos. Aunque parece que A β PP actúa como un receptor de membrana, no se conoce su función fisiológica. No obstante, se asume que pueda ser una proteína multifuncional dada la gran cantidad de dominios de interacción proteína-proteína que existen en la región citoplasmática. A β PP sufre muchas modificaciones postraduccionales como glicosilación o fosforilación, sin

embargo, la modificación postraducciona l más frecuente es el procesamiento proteolítico mediado por secretasas (Sassi y col. 2014; Van Gassen & Annaert, 2003).

2.2. Procesamiento de A β PP

A continuación, se describen las 2 rutas clásicas para el procesamiento post-traducciona l de A β PP: la vía no amiloidogénica (no patogénica) o amiloidogénica (responsable de la formación del péptido amiloide) (**Figura A1**).

2.2.1. Ruta no amiloidogénica

La mayor parte de A β PP se procesa mediante la ruta no amiloidogénica, en la que intervienen las enzimas α y γ -secretasa. En la ruta no amiloidogénica, no se genera el péptido A β (de ahí su nombre), ya que la proteólisis inicial tiene lugar en la región de A β PP que da lugar a dicho péptido. Este procesamiento ocurre mayoritariamente en la membrana plasmática.

El primer corte es realizado por la enzima α secretasa. Parece ser que miembros de la familia de proteínas ADAM (del inglés, *A Disintegrin And Metalloproteases family*), localizados en la membrana plasmática de la célula, son los responsables del corte α -secretasa en A β PP. En concreto, la enzima ADAM10 cataliza esta reacción sobre A β PP con mayor afinidad que el resto (Gassen y Annaert, 2003). Tras la actuación de ADAM10, se libera el fragmento A β PP α soluble (sA β PP α) y un fragmento C-terminal de unión a membrana de 83 aminoácidos (C83 o α -CTF; inglés, *C-Terminal Fragment*). Este último fragmento (α CTF) actúa como sustrato de la γ -secretasa, quien, tras llevar a cabo su función enzimática, da lugar a la formación del péptido extracelular p3 y al fragmento intracelular derivado de A β PP (AICD; del inglés, *A β PP Intracelullar Domain*). A diferencia de p3, que se degrada fácilmente en el espacio extracelular, al fragmento AICD se le asignan funciones de traducción de señal (Park y col. 2009, Gassen y Annaert, 2003, Celeste y col. 2014) (De Strooper, 2010; O'Brien & Wong, 2011; Wilkins & Swerdlow, 2017; Zhang y col. 2011).

2.2.2. Ruta amiloidogénica

Alternativamente, A β PP puede ser procesado por la vía amiloidogénica en la que intervienen las enzimas β y γ -secretasa. La actividad llevada cabo por la enzima β secretasa constituye el paso limitante de la vía amiloidogénica. En ella, como su propio nombre indica, se forman péptidos amiloides: sA β PP β , β -CTF y el péptido A β .

La enzima responsable del corte β -secretasa recibe el nombre de BACE-1 (del inglés, *Beta-site A β PP Cleaving Enzyme 1*). Tras el corte de BACE-1 en A β PP, se obtiene el péptido A β PP β soluble (sA β PP β), que se libera al espacio extracelular, y β -CTF de 99 aminoácidos (C99), anclado a la membrana plasmática. β -CTF se convierte en sustrato directo de la γ -

secretasa, quien lleva a cabo la actividad proteolítica en su dominio transmembrana, obteniéndose como productos de dicha reacción el péptido A β , con diferentes longitudes (siendo A β_{40} y A β_{42} los más frecuentes), y el fragmento intracelular de A β PP (AICD; del inglés, *APP Intracelullar Domain*). Como se mencionó anteriormente, al fragmento AICD se le asignan funciones de traducción de señal, por lo que, en presencia de caspasas, AICD sufre una proteólisis adicional obteniéndose de esta reacción el péptido C31, quien puede desarrollar una actividad citotóxica (Haass et al., 2012; Saido & Leissring, 2012; Gassen & Annaert, 2003; Wang y col. 2012; Zhang y col. 2011b).

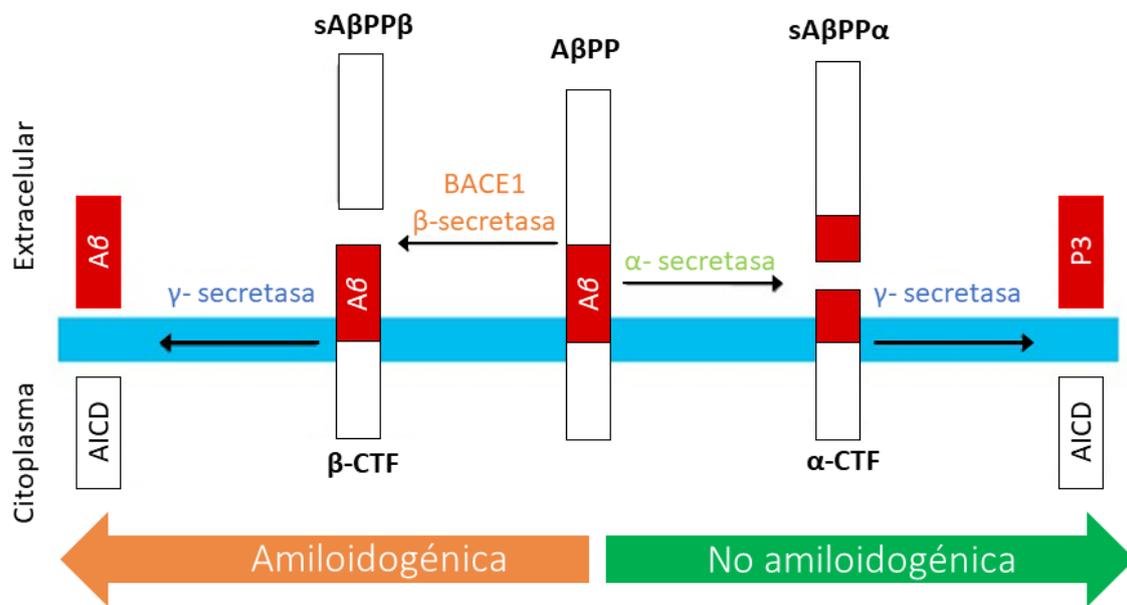


Figura A1. Procesamiento de la A β PP: vía no amiloidogénica y amiloidogénica. La proteína de membrana A β PP (membrana indicada en azul) puede ser procesada por dos vías, la no amiloidogénica (verde) y la amiloidogénica (naranja). En la vía no amiloidogénica la enzima α -secretasa corta en la región A β (roja) y se obtiene el fragmento soluble A β PP α (sA β PP α) y el fragmento α -CTF. Este último fragmento es cortado por la enzima γ -secretasa, obteniéndose el dominio APP intracelular (AICD) y el fragmento P3. En la vía amiloidogénica la enzima β -secretasa corta la APP para producir el fragmento soluble A β PP β (sA β PP β) y el fragmento β -CTF, el cual es cortado por la enzima γ -secretasa para producir A β_{40} , A β_{42} y AICD (modificado de Wang y col. 2012).

2.3. Aclaramiento del péptido amiloide

Los péptidos de A β se producen en condiciones fisiológicas y son retirados del cerebro a través de diferentes mecanismos. Dentro de estos mecanismos se incluye: la degradación enzimática del péptido amiloide (tanto a nivel extracelular como intracelular), la degradación dirigida por la microglía y los astrocitos, el transporte mediado por moléculas específicas tales como LRP1/2, ABCB1 y RAGE a través de la barrera hematoencefálica (BHE), el lavado a través del flujo entre el líquido cefalorraquídeo (LCR) y el líquido

intersticial (ISF; del inglés, *Interstitial Fluid*), y la absorción desde el LCR hacia el sistema circulatorio y linfático (Tarasoff-Conway y col. 2015) (**Figura A2**).

La aparición de placas amiloides (placas seniles) y de CAA, tendría lugar debido a un desbalance entre los mecanismos implicados en la síntesis de A β y los mecanismos de degradación o drenaje (Hardy & Selkoe, 2002; Selkoe, 2003; Tarasoff-Conway y col. 2015; Zlokovic y col. 2000).

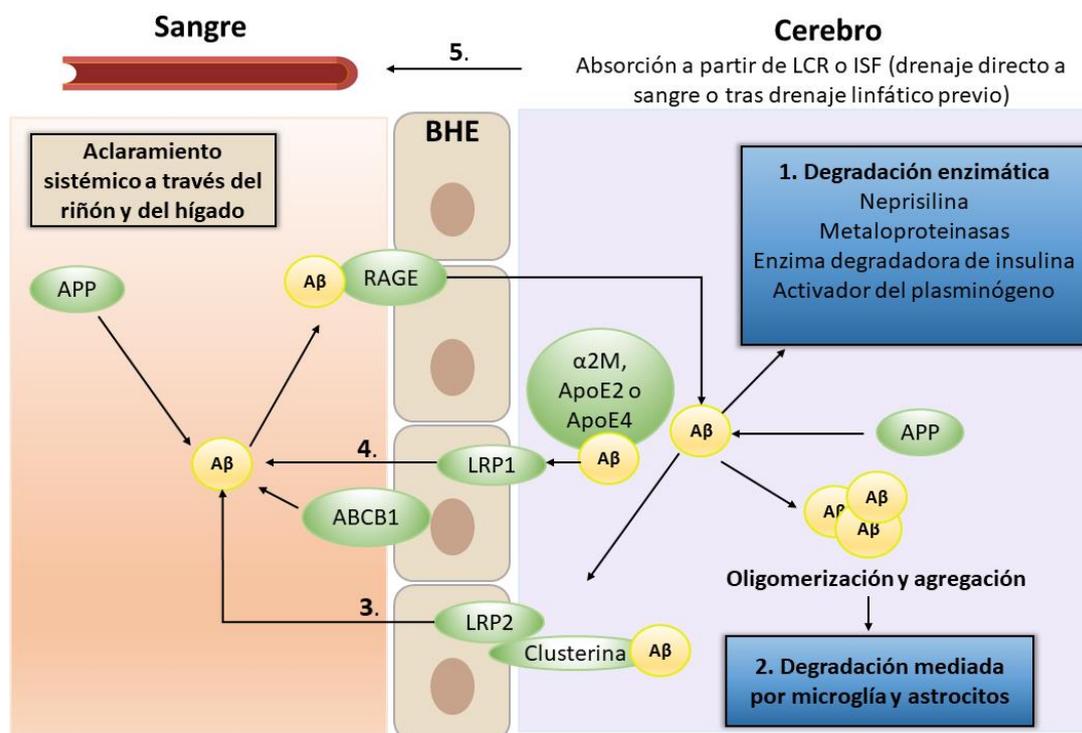


Figura A2. Transporte de A β a través del cerebro. El péptido A β entra al cerebro (violeta) a través del transportador RAGE localizado en la BHE (marrón). El A β se elimina del cerebro mediante: 1) degradación enzimática; 2) degradación mediada por microglía y astrocitos; 3) transporte a través de la BHE dirigido por clusterina y LRP2 o por; 4) el complejo LRP1 y ABCB1, que transporta A β unido a ApoE2, ApoE4 y α 2M; y por 5) absorción desde el LCR o ISF hacia el sistema circulatorio (figura de elaboración propia inspirada en Tarasoff-Conway y col. 2015).

3. PRESENILINAS: PS1 Y PS2

Una vez que la proteína transmembrana A β PP se corta en su dominio extracelular por las enzimas con actividad α o β - secretasa, los productos de esta reacción, C83 ó C99 respectivamente, constituirán los sustratos del complejo γ -secretasa (ver apartado 2.2) (Li y col. 2009).

El complejo γ -secretasa está compuesto de 4 proteínas de membrana: presenilina (PS), nicastrina, Aph 1 ó 2 (del inglés, *Pharynx-Defective-1 and 2*) y el potenciador de presenilina (PEN2; del inglés, *Presenilin Enhancer 2*), siendo la PS la subunidad catalítica del complejo

con actividad aspartil proteasa. Existen dos proteínas PS homólogas (PS1 y PS2). Ambas proteínas presentan 9 dominios transmembrana, un extremo N-terminal citosólico y el extremo C-terminal dirigido al espacio extracelular. La presencia de PS1 o PS2 en el complejo γ -secretasa determina su localización subcelular. Cuando el complejo γ -secretasa contiene PS1 se localiza principalmente en la membrana plasmática. Sin embargo, cuando el complejo γ -secretasa contiene PS2 se dirige al sistema retículo endoplásmico-Golgi y a un subconjunto de compartimentos endosómicos (Li y col. 2009; Meckler & Checler, 2016).

El ensamblaje del complejo γ -secretasa tiene lugar secuencialmente. Primero, Aph-1 y Nicastrina forman un heterodímero al que, posteriormente, se une PS. Por último, PEN2 se ensambla a PS y lleva a cabo la endoproteólisis de la subunidad catalítica PS entre sus residuos N292 y V293 para formar el complejo activo PS/ γ -secretasa. El proceso de endoproteólisis da lugar a dos fragmentos en PS: NTF con 30 kDa (del inglés, *N-terminal fragment*) y CTF con 20 kDa (del inglés, *C-terminal fragment*). La actividad proteolítica de PS está mediada por dos residuos de aspartato localizados en las posiciones aminoacídicas 257 y 385 en el sexto y séptimo dominio transmembrana, respectivamente. La mutación que conlleva el intercambio de cualquiera de estos dos residuos de aspartato por alanina, interfiere tanto con la endoproteólisis de la PS, como con la proteólisis de A β PP y Notch, el otro sustrato principal del complejo γ -secretasa (Kimberly y col. 2000; Wolfe y col. 1999) (Figura A3).

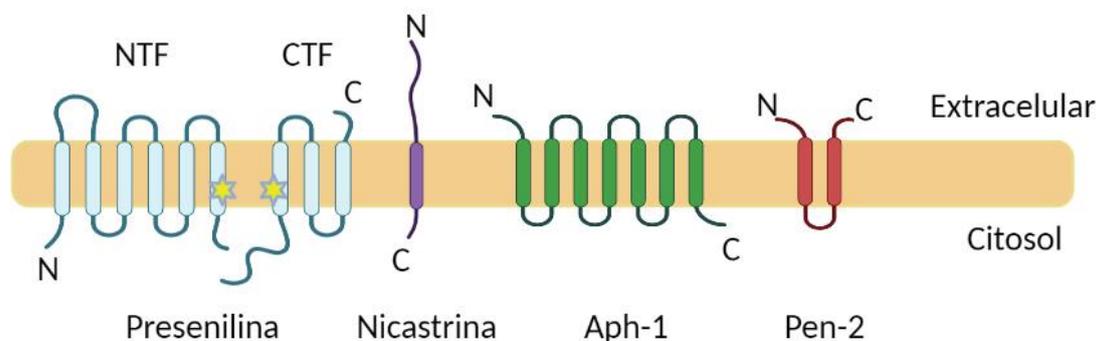


Figura A3. Esquema representativo de las proteínas que componen el complejo γ -secretasa (figura de elaboración propia inspirada en Strooper y col. 2012).

3.1. Mecanismo de acción del complejo γ -secretasa

El complejo γ -secretasa tiene actividad proteasa. Para romper un enlace peptídico se requiere de la lisis de una molécula de agua (hidrólisis), por tanto, toda proteasa es considerada también una hidrolasa. α/β -CTF, el sustrato de la γ -secretasa, es un fragmento anclado a la membrana plasmática, región altamente hidrofóbica, por esto motivo, el acceso de las moléculas de agua para intervenir en la ruptura del enlace peptídico y dar lugar al

péptido A β está más restringido. Este hecho requiere que el fragmento β -CTF se vaya procesando secuencialmente a través de diferentes cortes para favorecer dicha reacción: cortes ϵ , ζ y γ , respectivamente. El corte- ϵ , el primero en tener lugar tras la actuación de las enzimas α o β -secretasa, se da en la región del fragmento limitante con la membrana plasmática, por tanto, es una zona más accesible para las moléculas de agua. Este corte crea el recorrido por el que circulan las moléculas de agua para acceder a los siguientes sitios de corte.

Durante la actuación del complejo γ -secretasa, se han detectado varios productos intermediarios: A β_{49} , A β_{46} y A β_{43} . La naturaleza de dichos péptidos sugiere la posibilidad de que el procesamiento llevado a cabo por el complejo γ -secretasa consista en la realización de cortes secuenciales cada tres residuos sobre el fragmento β -CTF, hasta producir el péptido mayoritario A β_{40} . Se postula que la estructura α -hélice del fragmento transmembrana A β PP es la responsable de estos cortes secuenciales, pues únicamente los enlaces peptídicos entre los residuos A β_{46-47} , A β_{43-44} y A β_{40-41} estarían alineados en dicha estructura con el centro activo del enzima. No obstante, a medida que estos cortes van teniendo lugar, el fragmento transmembrana A β PP pierde su estructura α -hélice y este hecho podría justificar que, en algunos casos, el enlace peptídico entre los residuos A β_{42-43} quede mucho más expuesto al centro activo del enzima, favoreciéndose la formación del péptido A β_{42} . Mutaciones tanto en A β PP como en la propia enzima PS que incrementan los niveles del péptido A β_{42} , se asocian con EA (Xu, 2009; Zhao y col. 2007).

3.2. Mutaciones en PS en la EA

Las mutaciones en *PSEN1* conforman casi el 90% de los casos de FAD (apartado 1.4.1). Actualmente se conocen más de 241 mutaciones en *PS1* asociadas a FAD (www.alzforum.org/mutations) y 42 mutaciones en la proteína homóloga *PS2*. Estas mutaciones se encuentran principalmente en los dominios transmembrana altamente conservados, en los residuos hidrofóbicos del NTF o en el dominio hidrofóbico situado entre los dominios transmembrana 6 y 7 (Tandon & Fraser, 2002);(Shen & Kelleher, 2007) (**Figura A4**).

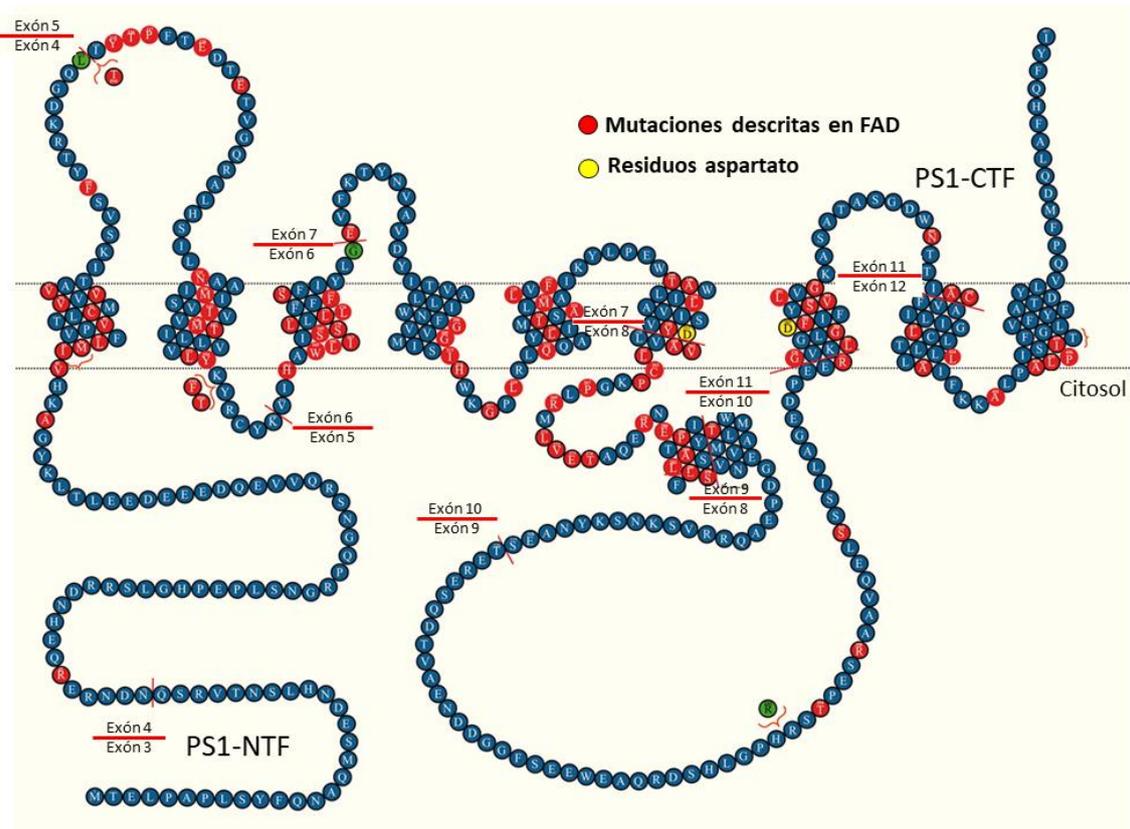


Figura A4. Mutaciones descritas en PS1. Este diagrama muestra la distribución de mutaciones de pequeñas inserciones y delecciones y de cambio sentido en PS1. Los residuos destacados en rojo indican zonas donde se han identificado mutaciones de FAD, además de la delección del exón 9, también descrita en la EA. Los aspartatos implicados en la función catalítica de la PS1 están señalados en amarillo (modificada de Shen y Kelleher, 2007).

Las mutaciones en los genes de *PS1* y *PS2* asociados a la EA aumentan la producción relativa del péptido $A\beta_{42}$ sobre la variante $A\beta_{40}$, dos productos del procesamiento de la proteína precursora amiloide. En condiciones fisiológicas, el péptido que se origina de forma mayoritaria termina en la Val40 ($A\beta_{40}$) en el extremo C-terminal y es hidrosoluble. Un pequeño porcentaje de los péptidos generados concluye en la Ala42, dando lugar al $A\beta_{42}$, un péptido más rígido e hidrofóbico. Esto le confiere una mayor tendencia a agregarse y formar placas fibrilares u oligómeros solubles, lo que lo hace más tóxico, especialmente para las neuronas (Strooper et al., 2012; G. Zhao et al., 2007).

El incremento en los niveles de $A\beta_{42}$ se debe a mutaciones de pérdida de función en la actividad presenilina. Este hecho ha quedado demostrado a través de varios experimentos. Por ejemplo: **i)** las mutaciones en *PS1* asociadas con FAD dan lugar a un acúmulo del fragmento CTF de varios de sus sustratos, acorde con un mecanismo de pérdida de función; **ii)** la inactivación condicional de *PS1* y *PS2* (Beglopoulos y col. 2004; Saura y col. 2004; Wines-Samuelson y col. 2010) en el cerebro de ratón adulto produce pérdida progresiva de memoria, neurodegeneración, inflamación e hiperfosforilación de Tau, indicando que la

pérdida de función del complejo γ -secretasa es capaz de reproducir los síntomas típicos de la EA (Tabuchi et al., 2009); **iii**) la generación de modelos de ratón *Knock-In* (KI) que poseen mutaciones en *PS1* asociadas a FAD, también refuerza la teoría de la pérdida de función del complejo γ -secretasa en esta patología (Sun y col. 2017; Xia y col. 2015). Finalmente, **iv**) el fracaso de los ensayos clínicos de fase III de inhibidores de la actividad PS supusieron la evidencia clínica necesaria para descartar un mecanismo de ganancia de función asociado a las mutaciones de esta enzima en la EA (Doody y col. 2013).

Todo ello ha llevado a postular la *hipótesis de presenilinas*, según la cual la pérdida parcial de función de PS, con el probable acúmulo de los fragmentos CTFs procedentes de sus sustratos, supone un evento iniciador en la EA (Shen & Kelleher, 2007).

3.3. Funciones biológicas de PS

Recientemente se ha demostrado que la proteína PS no sólo está implicada en funciones biológicas dependientes de la actividad del complejo γ -secretasa, sino que es capaz de llevar a cabo funciones independientes a la actividad de dicho complejo. Por este motivo, clasificamos las funciones llevadas a cabo por PS como: funciones independientes y dependientes de complejo γ -secretasa (Zhang y col. 2013).

3.3.1. Funciones independientes del complejo γ -secretasa

Dentro de las funciones de PS independientes de la actividad del complejo γ -secretasa se engloban: la estabilización de β -catenina en la ruta de señalización de Wnt (vía canónica de Wnt), la homeostasis de la regulación de Ca^{2+} y la función lisosomal y autofágica.

- **Vía canónica de Wnt**

La proteína β -catenina puede llevar a cabo dos funciones distintas en función de su localización celular: por un lado, interviene en la adhesión celular mediante la formación de un complejo proteico con E-cadherina en la membrana plasmática y, por otro, forma parte de la señalización de la vía Wnt cuando se localiza en el citoplasma.

Con respecto a la ruta de Wnt, en ausencia de ligando, GSK3 β (del inglés, *Glycogen Synthase Kinase-3 β*) fosforila a β -catenina y esta modificación permite su degradación vía ubiquitín-proteasoma. La unión de Wnt a su receptor Fzd (del inglés, *Frizzled*), bloquea la fosforilación de β -catenina mediada por GSK3 β , impidiendo de este modo su degradación. Así, β -catenina se translocaría al núcleo para activar el factor de transcripción TCF (del inglés, *T-cell-specific transcriptional factor*), quien, en último lugar, regularía la expresión de genes diana como ciclina D1, c-myc y metaloproteasas (Zhang y col. 2013).

Diferentes trabajos han demostrado que la PS1 es también sustrato de la enzima GSK3 β (Twomey & McCarthy, 2006; Uemura y col. 2007) y que, a su vez, PS1 interacciona con β -

catenina modulando negativamente la vía Wnt (Duggan & McCarthy, 2016; Xia y col. 2001). Por otro lado, se ha observado que mutaciones en PS1 asociadas con FAD inhiben la vía Wnt al favorecer la fosforilación y degradación de β -catenina (Kawamura y col. 2001).

- **Homeostasis de la regulación del Ca^{2+}**

Determinadas mutaciones en PS se asocian con una alteración en la señalización intracelular de Ca^{2+} , así como con una mayor liberación de dicho ion procedente de los reservorios del retículo endoplasmático (RE). Esta relación se debe a que PS interacciona con varias proteínas vinculadas con canales de Ca^{2+} : receptor IP3, receptor de Ryanodina (RyanR) y la ATPasa de Ca^{2+} del RE (SERCA; del inglés, *Sarco-/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase*) (Zhang y col. 2014).

- **Actividad lisosomal y autofágica**

La autofagia es el proceso a través del cual la célula fagocita componentes propios, bien del citoplasma o de la membrana plasmática, y dicho fenómeno se inicia como consecuencia del daño de determinadas organelas celulares o ante el estrés que supone la privación de nutrientes. El proceso de autofagia incluye dos pasos: la formación del autofagosoma (que contiene organelas celulares disfuncionales) y la fusión de este con el lisosoma para favorecer su degradación. Diferentes estudios sugieren que la alteración en PS1 puede ocasionar un fallo en la fusión del autofagosoma con el lisosoma o bien en la acidificación del mismo (Lee y col. 2010; S. Zhang y col. 2013).

3.3.2. Funciones dependientes del complejo γ -secretasa

La γ -secretasa pertenece a la familia de proteasas de corte intramembrana i-CLiPs (del inglés, *Intramembrane Cleaving Proteases*) que incluye a la familia de presenilinas, a la familia de metaloproteasas de Zinc y a proteasas romboidales. El complejo PS/ γ -secretasa está involucrado en la lisis de proteínas transmembrana tipo I, una vez que se escinde su dominio extracelular. Los sustratos descritos para este complejo enzimático están relacionados con funciones muy diversas, por tanto, se asume que PS/ γ -secretasa puede regular una gran variedad de eventos celulares (Duggan & McCarthy, 2016; Haapasalo & Kovacs, 2011; Zhang y col. 2013).

A pesar de la diversidad estructural y funcional de los sustratos del complejo PS/ γ -secretasa, la mayoría de ellos comparten varias características (Haapasalo & Kovacs, 2011; Zhang y col. 2013; Zhang y col. 2014). Estas características son **i)** la mayoría de los sustratos de PS/ γ -secretasa son proteínas transmembrana tipo I, **ii)** actúan como proteínas de señalización y regulación celular, **iii)** el procesamiento del sustrato se lleva a cabo tras el desprendimiento del ectodominio o dominio extracelular, **iv)** la actividad del complejo PS/ γ -

secretasa tiene lugar en o cerca del límite de los dominios transmembrana y citoplásmico, **v)** la escisión mediada por PS/ γ -secretasa libera el dominio intracelular (ICD; de inglés, *intracellular domain*) del sustrato al citosol, **vi)** la inhibición farmacológica o la delección genética de la actividad PS/ γ -secretasa impide la formación del ICD y da como resultado el acúmulo del CTF (Haapasalo & Kovacs, 2011).

3.4. Diferentes sustratos de Presenilinas

Hasta la fecha, 91 proteínas, incluyendo A β PP, han sido identificadas como sustratos de PS/ γ -secretasa. Todos ellos intervienen en procesos de determinación del tipo celular, adhesión, migración, crecimiento de neuritas y guía axonal y formación y mantenimiento de la sinapsis. Curiosamente, muchos de estos procesos se ven alterados durante la patología de Alzheimer, lo que refuerza aún más *la hipótesis de presenilinas* en la EA (Bossy-Wetze y col. 2004; Querfurth & Laferla, 2010).

Los sustratos más conocidos del complejo PS/ γ -secretasa son: **A β PP**, debido a su relación en la fisiopatología de EA, y **NOTCH**, por su implicación en el desarrollo y en la diferenciación celular. El hecho de que ambos sustratos sean procesados por el mismo complejo enzimático podría explicar el fracaso de los fármacos inhibidores de la actividad γ -secretasa en ensayos clínicos (Shen & Kelleher, 2007). Además, existen otros muchos sustratos de PS/ γ -secretasa como: N y E-cadherinas, EphA4, ErbB4, CD44, TREM2, el receptor de la hormona del crecimiento etc (Zhang y col. 2014).

EphA, miembro de la familia del receptor de Efrina, es procesado por el complejo PS/ γ -secretasa durante la sinapsis, de manera que la liberación del correspondiente fragmento ICD interviene en la formación y el mantenimiento de las espinas dendríticas (Inoue y col. 2009). Las mutaciones en PS asociadas a FAD, podrían alterar esta función fisiológica de EphA y ser responsable de la pérdida de sinapsis, y la amnesia asociada, en la EA (Ho & Shen, 2011).

Otros de los sustratos de PS/ γ -secretasa son las proteínas de adhesión celular como las E, N-cadherinas. E y N-cadherinas (*epitelial y neural-cadherinas*) pertenecen a la categoría de *Cadherinas clásicas* (o tipo I) dentro de esta gran familia. Las *Cadherinas clásicas* son glicoproteínas transmembrana tipo I, con un dominio extracelular y un dominio citoplasmático, implicadas en la adhesión celular y en la morfogénesis (Halbleib & Nelson, 2006; Niessen y col. 2011). A nivel intracelular, establecen interacción principalmente con la proteína citoplasmática β -catenina. En concreto, las N-cadherinas se localizan en las uniones sinápticas, donde la interacción entre los axones y las espinas dendríticas ha de ser muy estrecha (Giagtzoglou y col. 2009; Togashi y col. 2002). PS/ γ -secretasa interacciona

con el complejo formado por N-cadherina/ β -catenina en las regiones sinápticas y da lugar al fragmento ICD procedente del procesamiento de N-cadherina. Este ICD se transloca al núcleo para promover la degradación del represor transcripcional de genes asociados a la plasticidad sináptica: CBP/CREB (Marambaud y col. 2003). En las células epiteliales, la PS se concentra en las regiones de contacto entre células, interaccionando con el complejo formado por E-cadherina y β y γ -cateninas, de manera que favorece su estabilización y la asociación al citoesqueleto de actina (Parisiadou y col. 2004).

Junto con A β PP, el principal sustrato procesado por PS/ γ -secretasa es la proteína **NOTCH**. Los primeros estudios que demostraron esta interacción tuvieron lugar en la especie *Caenorhabditis elegans*, donde se observó interacción entre sus correspondientes proteínas homólogas, *lin-12* (homólogo de *Notch*) y *sel-12* (homólogo de *presenilin*) (Levitan & Greenwald, 1995). Los receptores NOTCH son proteínas transmembrana que se sintetizan en el RE y, posteriormente, se procesan en el aparato de Golgi. Durante su maduración, estos receptores sufren un primer corte proteolítico en el sitio1 (S1) y, tras ello, otro tipo de modificaciones postraduccionales que constituirán finalmente al receptor heterodimérico NOTCH que se localiza en la membrana plasmática (Giaino & Borggreffe, 2018). A nivel molecular, tras la unión del ligando, los receptores NOTCH se activan para dar lugar a la liberación de un fragmento intracelular (NICD; del inglés, *NOTCH Intracellular Domain*) que desencadena una cascada de señalización.

El complejo PS/ γ -secretasa juega un papel muy importante en la señalización de Notch y existen numerosas evidencias de ello. **i)** La inactivación del complejo γ -secretasa a través de la delección de alguna de sus subunidades (PS1/PS2, nicastrina o APH-1) reproduce el fenotipo resultante tras la delección de la proteína Notch (Donoviel y col. 1999; J. Li y col. 2003; Ma y col. 2005). **ii)** En el knockout de PS1, no se produce el corte transmembrana de la γ -secretasa en el receptor NOTCH, ni la consecuente liberación y traslocación al núcleo del fragmento NICD (De Strooper y col. 1999; Zhang y col. 2000). **iii)** Asimismo, las mutaciones en PS asociadas a FAD impiden la formación del NICD (Song y col. 1999). **iv)** Además, en casos de LOAD, donde la edad avanzada es el principal factor de riesgo, se ha demostrado que existe un decrecimiento en la actividad de PS/ γ -secretasa sobre el receptor NOTCH (Placanica y col. 2009).

La señalización mediada por Notch interviene, a nivel cerebral, en varios procesos biológicos que, además, se ven seriamente comprometidos durante el desarrollo de la EA. No obstante, la implicación directa de esta vía en la patogénesis de la enfermedad no ha sido claramente demostrada (Zhang y col. 2013). Alguno de los procesos relacionados con Notch son: la formación de sinapsis, la neurogénesis, la formación y estabilización de nuevos vasos

sanguíneos (angiogénesis) o el mantenimiento de la barrera hematoencefálica (BHE). (Brai y col. 2014; Phng & Gerhardt, 2009; Reis & Liebner, 2013; Roca & Adams, 2007; Siekmann & Lawson, 2007).

Todo ello, el papel del complejo PS/ γ -secretasa en la señalización de Notch y la alteración de muchos de los procesos biológicos regulados por Notch en la EA, nos lleva a interesarnos en el estudio de esta vía de señalización en dicha enfermedad.

4. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE NOTCH

La vía de Notch es una ruta molecular evolutivamente conservada en organismos invertebrados y vertebrados y tiene un papel clave en el desarrollo embrionario, en la regulación de la homeostasis de tejidos, así como en el mantenimiento del fenotipo de células madre en adultos. La ruta fue descubierta originalmente en la especie *Drosophila*, donde el primer alelo mutante dio lugar a un ala “con muescas” (en inglés, *notched*) (L. K. Phng & Gerhardt, 2009).

4.1. Receptores NOTCH

Los receptores NOTCH son sintetizados como precursores de cadena simple, se glicosilan en el RE y posteriormente sufren un corte en la región S1, entre la subunidad extracelular (NECD; del inglés, *Notch Extracellular Domain*) e intracelular (NICD), con el objetivo de establecer entre ambas una unión de tipo no covalente. Esta proteólisis convierte al receptor en un heterodímero y se lleva a cabo gracias a la enzima furina en el aparato de Golgi. La región NECD contiene entre 29-36 repeticiones en tándem con una secuencia similar a EGF (del inglés, *Epithelial Growth Factor*), necesaria para la interacción con el ligando. Los residuos localizados en esta secuencia EGF son susceptibles de sufrir O-glicosilaciones y esta modificación modula, tanto la afinidad por los diferentes ligandos, como la señalización de la vía. Junto a las repeticiones EGF del NECD, aparece una región de regulación negativa (NRR; del inglés, *Negative Regulatory Region*) que garantiza la inactividad del receptor en ausencia de ligando y, junto a esta, el fragmento transmembrana (NOTCH-TM) que contiene el sitio de corte S3 donde actuará el complejo PS/ γ -secretasa. Por otro lado, NICD contiene el dominio RAM (del inglés, *RBPJ-Associated Module*), responsable de la interacción con factores de transcripción, fusionado a siete secuencias de repetición tipo ankirina, que a su vez se encuentran flanqueadas por dos secuencias NLS (del inglés, *Nuclear localizing signal*). NLS dirige a NICD al núcleo, donde el dominio de activación transcripcional (TAD; del inglés, *Transactivation Domain*) activa la transcripción. Por último, la región C-terminal contiene una secuencia de residuos prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T) (PEST) que favorece la rápida degradación

proteolítica del fragmento. (Fortini, 2009; Roca & Adams, 2007; Weng y col. 2004) (**Figura A5**).

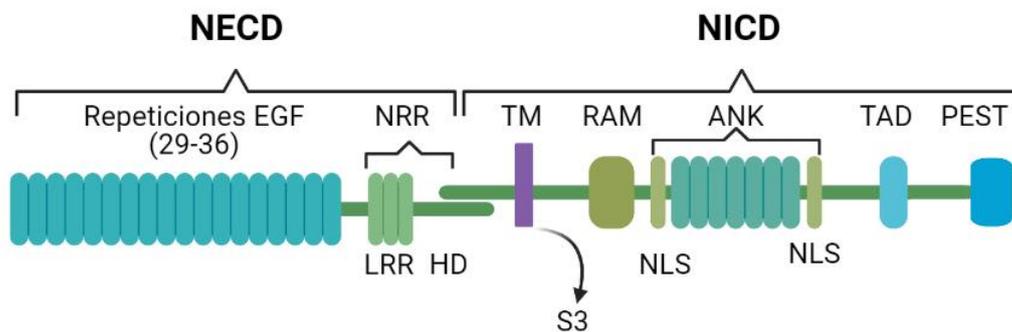


Figura A5. Esquema representativo de los dominios proteicos del receptor NOTCH (figura de elaboración propia inspirada en Weng y col. 2004).

Mientras que en el genoma de *Drosophila* hay un único receptor para NOTCH, y en *C. elegans* existen 2, con funciones redundantes, en mamíferos hay hasta 4 parálogos de NOTCH (NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3 Y NOTCH4) que presentan tanto funciones redundantes como específicas. En concreto, un dato destacado es que el dominio TAD no está conservado en todos los receptores, pues sólo se encuentra en NOTCH1 y NOTCH2. Este hecho pone de manifiesto los diferentes mecanismos de activación transcripcional usados por las proteínas NOTCH.

La activación de la vía Notch requiere de la unión de diversos ligandos al receptor de membrana. Dependiendo de la naturaleza de dichos ligandos, la regulación de la vía puede clasificarse en regulación canónica y no canónica, siendo la primera la más representativa (D'Souza y col. 2010).

4.2. Regulación canónica de Notch

Para la activación de la vía canónica de Notch se requiere una interacción entre el ligando y el receptor de dos células vecinas yuxtapuestas (célula emisora y célula receptora), por lo que los ligandos son, al igual que NOTCH, proteínas transmembrana. La naturaleza de esta interacción permite una comunicación muy focalizada (D'Souza y col. 2010).

4.2.1. Ligandos de la vía canónica

Los ligandos de la vía canónica pertenecen a la familia DSL (por sus proteínas homólogas en *Drosophila*, Delta y Serrate, o en *C. elegans*, LAG-2). Se caracterizan por la presencia de tres motivos estructurales: un dominio N-terminal DSL (Delta/Serrate/LAG2), encontrado originalmente en las proteínas homólogas de *Drosophila* y *C. elegans*, el dominio DOS (del

inglés; *Delta and OSM-11-like proteins*), y el dominio EGF (con y sin capacidad de unión al ion Ca^{2+}). Tanto el dominio DSL como DOS están especializados en la unión del receptor.

En mamíferos existen 5 ligandos para esta vía, 3 ortólogos de Delta (Dll1, 3 y 4) y dos de Serrate (Jagged1 y Jagged2). Los ligandos DSL se clasifican según la presencia/ausencia de un dominio rico en cisteínas (Jagged/Delta, respectivamente) (D'Souza y col. 2010; Kopan & Ilagan, 2009).

4.2.2. Activación de la vía canónica

Para la activación del receptor NOTCH se requieren una serie de cortes proteolíticos secuenciales. La unión del ligando induce el primer corte en el sitio S2 de la proteína NOTCH y queda a cargo de una enzima perteneciente a la familia de proteínas ADAM. El sitio de corte S2 está localizado unos 12 aminoácidos “aguas arriba” de la región transmembrana (NICD-TM). Este primer corte es un paso crítico en la regulación del procesamiento de NOTCH, no obstante, hasta la fecha no se conoce la enzima específica dentro de la familia ADAM encargada de llevarlo a cabo (Kopan & Ilagan, 2009).

El corte en el dominio extracelular de NOTCH da lugar al fragmento NECD que es fagocitado por la célula emisora de la señalización junto con el ligando al que se ha unido. Por otro lado, tras este primer corte, se obtiene además un fragmento anclado a la membrana plasmática que recibe el nombre de NEXT (del inglés; *Notch Extracellular Truncation*), el cual se convierte en el sustrato del complejo PS/ γ -secretasa. γ -Secretasa corta a NEXT dentro de la región transmembrana (TMD, de inglés; *Transmembrane Domain*) en el sitio de corte S3. Tras ello, NICD se transloca al núcleo donde, gracias a los dominios RAM y ankirina, interacciona con la familia de factores de transcripción CSL (CBF1/RBPJ, Su(H), LAG1) y recluta a coactivadores (MAML1, del inglés; *Mastermind*) para inducir la expresión de los genes diana de Notch, como la familia de genes HES (del inglés, *Hairy and Enhancer of Split*) y HEY (del inglés, *Hairy Ears, Y-linked*) (D'Souza y col. 2010) (**Figura A6**).

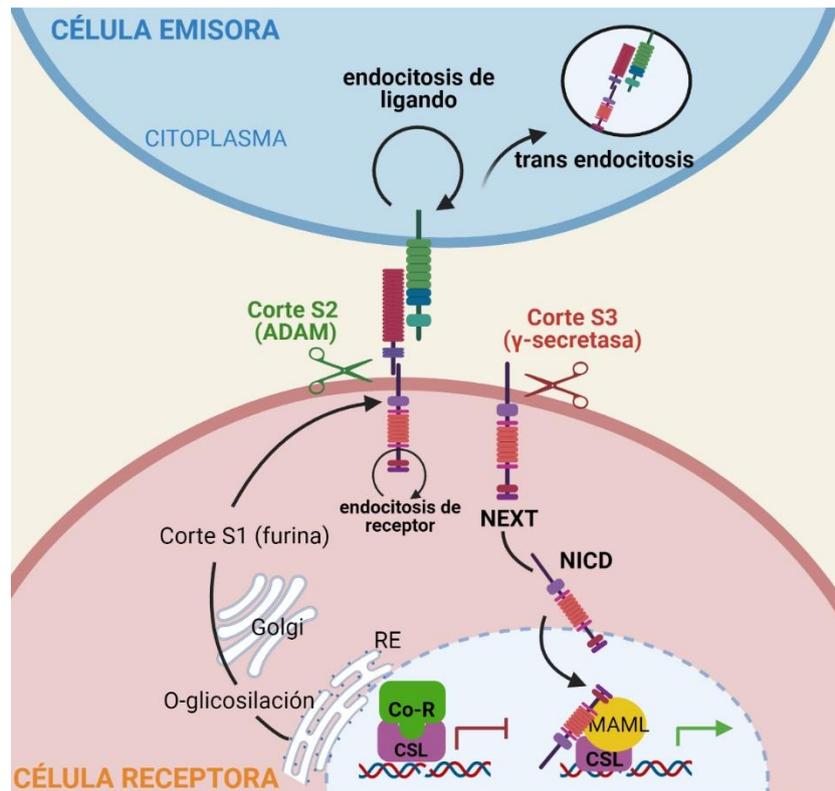


Figura A6. Activación de la vía canónica de Notch. Una vez traducida, la proteína Notch se glicosila en el retículo endoplasmático (RE) y, a continuación, en el aparato de Golgi tiene lugar el corte en el sitio S1 mediado por la enzima furina. Tras este corte, el receptor se transporta a la superficie celular en forma de heterodímero y se activa cuando se une a su ligando presente en la célula vecina (figura de elaboración propia inspirada en Kopan y Ilagan 2009).

4.2.3. Interacción ligando y receptor en la vía canónica

Cuando el ligando y el receptor de dos células vecinas entran en contacto se produce una interacción tipo *trans*. En una interacción *trans* el ligando se ubiquitina en su dominio intracelular, lo que desencadena la endocitosis por parte de la célula emisora. La internalización del ligando genera una tensión en el receptor que favorece la exposición del sitio de corte S2. La interacción en *trans* de los ligandos de la vía de Notch con sus receptores provoca la activación canónica de la vía (Gordon y col. 2007).

Por otro lado, se ha visto que los receptores Notch pueden ser inhibidos por los propios ligandos DSL presentes en la misma célula. Este proceso se conoce como interacción *cis* de la vía Notch. La interacción tipo *cis* reduce el número de receptores Notch disponibles para la interacción con otro ligando exterior, por lo que limita la capacidad de la célula de recibir señales de la célula vecina. De esta manera, la ratio entre la concentración de ligandos y receptores determinará la señalización que prevalece en cada caso. Una célula con más receptores que ligandos siempre tendrá algún receptor Notch libre para interactuar en *trans* con un ligando. Por tanto, una célula estimuladora para la vía Notch se define como aquella que expresa un mayor número de ligandos en relación a los receptores, mientras

que una célula receptora tendrá una mayor proporción de receptores (Del Álamo y col. 2011; Ladi y col. 2005; Sprinzak y col. 2010).

4.3. Regulación no canónica de Notch

Aunque la activación canónica de Notch regula un gran número de procesos biológicos, esta vía también se puede activar sin que exista una interacción ligando-receptor entre dos células yuxtapuesta. En esta línea, se han descrito los ligandos no canónicos de Notch, que carecen del dominio DSL necesario para la interacción con la región extracelular del receptor. Esta vía de activación no canónica también puede ser independiente del procesamiento mediado por γ -secretasa, al igual que prescindir de la actividad transcripcional mediada por CSL (Andersen y col. 2012; D'Souza y col. 2010).

Atendiendo a su naturaleza biológica, existe un amplio repertorio de ligandos no canónicos: ligandos anclados a la membrana plasmática, ligandos unidos al glicolípidio GPI (glicofosfatidilinositol), ligandos secretados al espacio extracelular etc. Estos ligandos son tan heterogéneos porque para la activación de la vía no canónica no se necesita el procesamiento enzimático del receptor, sólo que exista una desestabilización para que este se disocie (Andersen y col. 2012; D'Souza y col. 2010).

Estudios recientes han demostrado que Notch puede regular de forma no canónica la vía Wnt/ β catenina a nivel postraducciona. La vía Wnt/ β catenina contribuye a la angiogénesis del cerebro y a la formación de la BHE, dos procesos biológicos relacionados con la vasculatura cerebral tan sumamente afectada en los pacientes con EA (ver apartado 3.4). Todo ello sugiere que la interacción entre la vía Notch- Wnt/ β -catenina puede tener un papel muy destacado en la fisiopatología de la EA (Andersen y col. 2012; Reis & Liebner, 2013).

5. LA VÍA DE NOTCH EN LA REGULACIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS

La vía Notch puede modular la angiogénesis cerebral actuando a través de varios mecanismos moleculares. Estos mecanismos moleculares se pueden resumir en dos vías de señalización: **i)** la inhibición lateral, que depende del eje VEGF/Dll4/NOTCH entre células endoteliales yuxtapuestas y **ii)** conexión entre Notch y la vía canónica de Wnt (Wnt/ β -catenina). En este apartado se describirá con detalle el mecanismo de inhibición lateral mediado por Notch.

5.1. Inhibición lateral mediada por Notch: eje VEGF/Dll4/NOTCH

La comunicación a través de la vía Notch entre células vecinas puede dar lugar, o bien al mantenimiento de un fenotipo indiferenciado, o bien a la diferenciación/especialización de un tipo celular en concreto. En función de la naturaleza de las dos células que entran en contacto, esta señalización se denomina: inducción lateral (entre distintos tipos celulares) o inhibición lateral (entre células semejantes) (Chiba, 2006; Gierer, 1974).

En la inhibición lateral, la célula emisora expresa altos niveles del ligando de Notch, y esto induce la activación de receptores Notch en sus células vecinas. La activación de Notch en la célula vecina reprime la expresión de ligandos Notch, por un mecanismo de retro-regulación, amplificando así el proceso de diferenciación. Un ejemplo clásico de diferenciación celular en el que la inhibición lateral cumple un papel muy importante es durante la angiogénesis.

La angiogénesis es un proceso fisiológico basado en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros vasos preexistentes. En primer lugar, se forman “brotes” o “ramas” (del inglés; *sprouts*) a partir de los cuales se inicia la proliferación y la diferenciación de un nuevo vaso sanguíneo (Betz y col. 2016).

En condiciones fisiológicas o patológicas, cuando los niveles de oxígeno en un tejido bajan, el metabolismo celular se ve comprometido. En estas circunstancias se activan mecanismos transcripcionales, orquestados principalmente por el factor de transcripción inducible por hipoxia HIF (del inglés, *Hypoxia Inducible Factor*), mediante los cuales se liberan factores pro-angiogénicos al medio. El principal factor pro-angiogénico es VEGF (del inglés, *Vascular Endothelial Growth Factor*). VEGF es el encargado de iniciar la proliferación de nuevos vasos sanguíneos, así como de promover un incremento en la permeabilidad vascular (Chung & Ferrara, 2011; Fraisl y col. 2009). Concretamente, VEGF-A es el miembro más destacado de la familia de VEGFs (que también incluye VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y PGF). Estos ligandos se unen a receptores de tipo tirosina-quinasa implicados en varias rutas de señalización durante el proceso angiogénico (Betz y col. 2016).

Durante la angiogénesis, la formación del *sprouting* angiogénico requiere de la diferenciación de las células endoteliales (CE) en varios fenotipos que permitirán estabilizar los vasos sanguíneos: fenotipo *tip*, *stalk* y *phalanx*.

5.1.1. Fenotipos de las células endoteliales: *tip*, *stalk* y *phalanx*

- **Células *tip***

Las células *tips* son las encargadas de emitir ramificaciones orientadas hacia la aparición del estímulo hipóxico, por este motivo, se dice que presentan un fenotipo muy polarizado. Las proyecciones de su membrana plasmática constituyen el frente angiogénico y recuerdan a la estructura de un cono axonal en crecimiento. En la cara opuesta al frente angiogénico, la célula *tip* mantiene un contacto físico con la célula endotelial vecina, con la que se comunica (célula *stalk*) (**Figura A7**). Además, estas células *tip* se caracterizan por secretar metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP; del inglés, *Matrix Metalloproteinases*) que facilitan la migración celular al degradar los componentes del espacio extracelular. Otro rasgo llamativo de estas células es que tienen bajos índices de proliferación y que son incapaces de formar el lumen del vaso sanguíneo. El perfil genético de las células *tip* se caracteriza por la expresión de: los receptores 2 y 3 de VEGF (VEGFR 2 y 3, respectivamente), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-B; del inglés; *Platelet Derived Growth Factor*), Unc5, delta-like ligand-4 (Dll4), neurofilina-1 (NRP1), y otros (Benedito & Hellström, 2013; Betz y col. 2016; De Smet y col. 2009; Gerhardt y col. 2003).

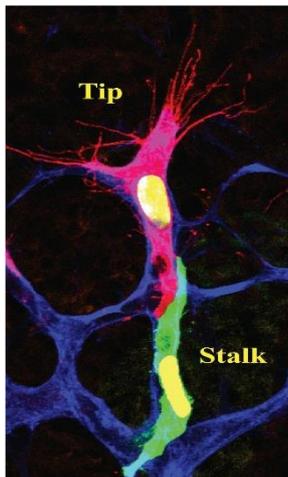


Figura A7. Microscopía de fluorescencia de un *sprout* angiogénico. La célula *tip* está delimitada en rojo y la célula *stalk* en verde (modificada de Benedito y col. 2013).

- **Células *stalk***

Las células endoteliales *stalk* mantienen una comunicación directa con las células *tips*, y dicha comunicación es responsable de la adquisición de su identidad celular. A diferencia de las células *tip*, estas tienen una alta tasa de proliferación que permite elongar el *sprouting* inicial y no presentan filopodios en su membrana plasmática. Tampoco expresan MMP, sino que secretan proteínas de la matriz extracelular con el fin de formar una membrana basal, sobre la que se puedan anclar el resto de células que componen la pared del vaso y estabilizar así el vaso sanguíneo incipiente. Además, son estas mismas células las

encargadas de reclutar a los pericitos (células contráctiles o murales que dan soporte a los capilares sanguíneos) (De Smet y col. 2009; Tetzlaff & Fischer, 2018). Se caracterizan por la represión del receptor VEGF (**Figura A8**).

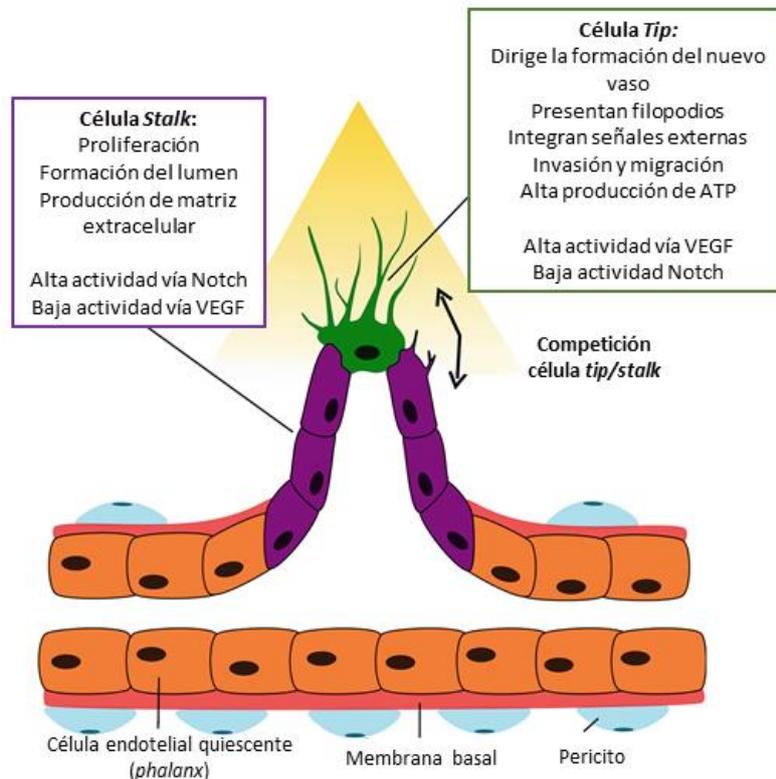


Figura A8. Esquema representativo del sprout angiogénico. En la figura se muestran las principales características de los fenotipos celulares *tip* y *stalk* (modificada de Tetzlaff y col. 2018).

- **Células phalanx**

Las células *phalanx* son el conjunto de células quiescentes que se disponen en monocapa formando la pared del vaso maduro. Estas células establecen entre ellas uniones estrechas TJs (del inglés, *Tight Junction*) que permiten conducir el contenido que hay en el lumen. Al igual que las células *phalanx*, son capaces de secretar y forma una membrana basal, sin embargo, la capacidad de respuesta de este tipo celular a la señalización dependiente de VEGF es muy baja. La baja sensibilidad a la señalización de VEGF se explica porque, por un lado, los niveles del factor angiogénico que alcanzan a estas células son muy bajos y, por otro, porque su perfil de expresión génica (altos niveles de VEGFR1 soluble) no está optimizado para responder a dicha señalización (De Smet y col. 2009; Mazzone y col. 2009).

5.1.2. Etapas del sprouting angiogénico

Los vasos sanguíneos maduros están constituidos en su mayoría por células endoteliales quiescentes que, ante un estímulo hipóxico, fisiológico o patológico, son capaces de activarse para orquestar la formación de un nuevo vaso sanguíneo a través de un proceso

llamado *sprouting* angiogénico que depende de la inhibición lateral mediada por Notch (Tetzlaff y Fischer, 2018). El proceso de *sprouting* angiogénico consta de tres fases: **i)** la inducción de la célula *tip*; **ii)** la elongación del *sprout* y **iii)** la formación del lumen del nuevo vaso.

- **Inducción de la célula *tip***

Para que se inicie la formación de un nuevo vaso sanguíneo, se requiere la liberación de factores pro-angiogénicos por parte de los tejidos comprometidos, lo que se conoce como “*switch* angiogénico” (Tetzlaff & Fischer, 2018). Diferentes estudios genéticos han mostrado que el gradiente de VEGF es clave en el proceso de selección e inducción de una célula *tip*. La unión de VEGF al receptor VEGFR2 promueve una cascada de señalización que permite que una célula endotelial se diferencie y se convierta en una célula *tip* o célula “líder”, al mismo tiempo que evita que sus células vecinas adquieran este mismo fenotipo, convirtiéndolas en células *stalk*. Esta comunicación entre la célula *tip* y su vecina recibe el nombre de inhibición lateral y depende de la señalización mediada por VEGF/Dll4/Notch (Ribatti & Crivellato, 2012).

Las células *tip* están expuestas a altos niveles de VEGF, lo que induce la expresión de Dll4 en dichas células. La unión de Dll4 al receptor NOTCH1 en la célula vecina (futura célula *stalk*) desencadena una serie de procesos proteolíticos del propio receptor que finalizan con la liberación del fragmento NICD. Este NICD se transloca al núcleo donde se une al complejo proteico RBPJ e induce la transcripción de determinados genes: genes de la familia HES y HEY. Además, la activación de la vía Notch en la célula *stalk* reprime la respuesta de esta al factor pro-angiogénico al inhibir la expresión de VEGFR2. Este hecho impide que la señalización mediada por Dll4 se active en la célula *stalk*, lo que supone un proceso de retroalimentación negativa que refuerza el fenotipo y la posición de la célula *tip* e impide la aparición de varios frentes angiogénicos (Leslie y col. 2007; Thomas y col. 2013).

Pese a que la célula *stalk* mantiene bajos niveles de expresión del ligando Dll4, sí que presenta valores de expresión basales, por lo tanto, para garantizar que durante la comunicación celular *tip-stalk* la célula *tip* no adquiera el fenotipo de *stalk*, existe un mecanismo de regulación adicional que depende de otro ligando del receptor Notch, Jagged1. Este ligando, expresado en la membrana plasmática de las células *stalk*, desplaza al ligando Dll4 uniéndose a Notch1 en las células *tip*, bloqueando la cascada de señalización desencadenada por dicho receptor. En definitiva, otra diferencia a nivel de expresión génica entre las células *tip* y las *stalk* radica en los niveles de Jagged1 (alto en el fenotipo *stalk* y

bajo en las células *tip*) y Dll4 (alto en el fenotipo *tip* y bajo en las células *stalk*) (Blanco & Gerhardt, 2013) (**Figura A9**).

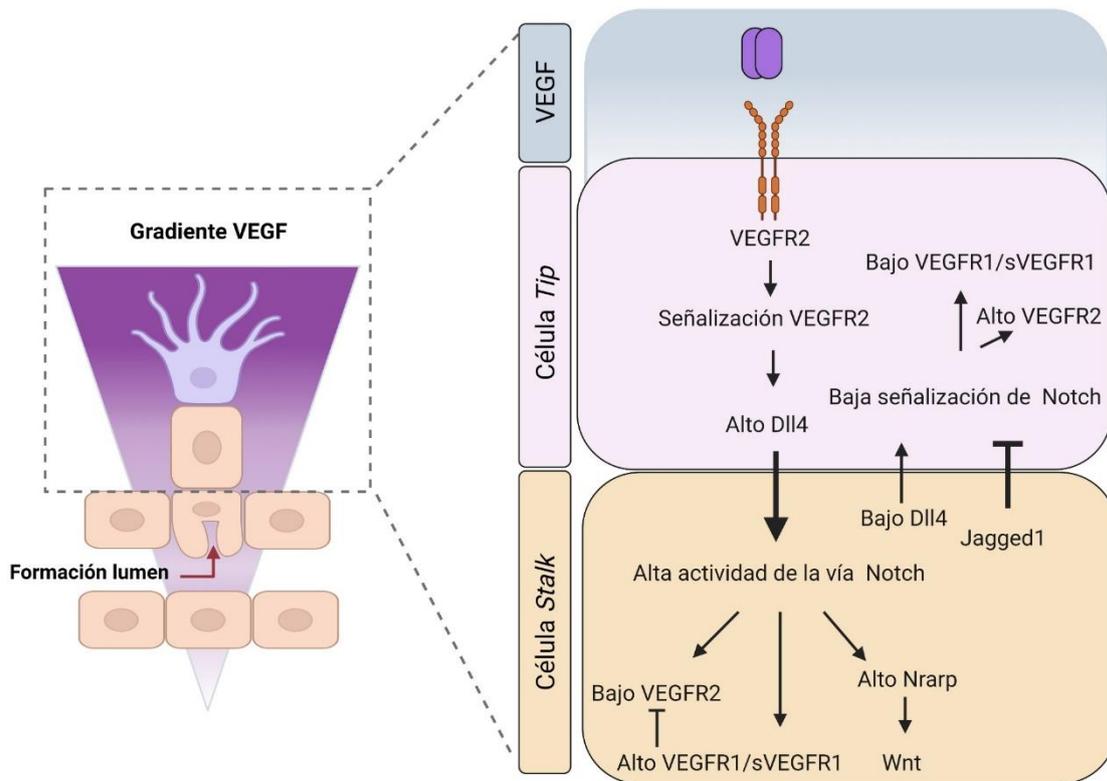


Figura A9. Esquema de la señalización bidireccional entre la célula *tip/stalk* (figura de elaboración propia inspirada en Blanco y col. 2013).

Hay experimentos que demuestran que la inhibición parcial de la señalización Dll4/Notch es suficiente para dar lugar a una angiogénesis patológica en la que, no sólo no llegan a formarse nuevos vasos funcionales, sino que los vasos preexistentes se desensamblan convirtiéndose en vasos no conductores. Esta angiogénesis anómala recibe el nombre de angiogénesis no productiva (NPA; del inglés, *Non Productive Angiogenesis*) (Noguera-Troise y col. 2007; Ridgway y col. 2006; Suchting y col. 2007) (**Figura A10**).

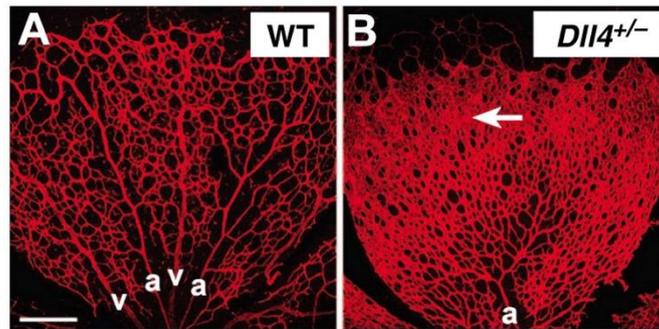


Figura A10. Angiogénesis no productiva en una retina de un ratón heterocigoto para Dll4. En el panel de la izquierda se muestra la retina de un ratón control (WT) y a la derecha se muestra la retina de un ratón *Dll4*^{+/-}, marcadas con isolectina B4 (IB4). La flecha indica el aumento de *sprouting* en el frente angiogénico del ratón heterocigoto. a: arteria; v: vena (figura tomada de Sutching y col. 2007).

- **Elongación del *sprout***

Durante la elongación del *sprout*, la célula *tip* migra siguiendo las señales de atracción o repulsión que se liberan al medio y, en este proceso, se ve acompañada por las células *stalk*, quienes, a pesar de no tener esa capacidad migratoria, proliferan para mantener en todo momento la conectividad entre el vaso parental y la nueva ramificación formada (Herbert & Stainier, 2011).

- **Formación de lumen**

Existen varias hipótesis que pretenden explicar la formación del lumen vascular. Una de ella se basa en que el lumen es el resultado de la fusión de muchas vacuolas intracelulares e intercelulares en las células *stalk* (De Smet y col. 2009; Kamei y col. 2006). En cuanto a la segunda hipótesis, estudios más recientes plantean que la presión sanguínea procedente del vaso parental ejercería una fuerza hemodinámica sobre la membrana apical de las células endoteliales que modificaría su estructura y provocaría una invaginación en las células *stalk*, impulsando así la formación del lumen (Betz y col. 2016; Gebala y col. 2016).

6. HIPOXIA

Los factores de riesgo modificables en la EA incluyen patologías sistémicas donde el aporte de oxígeno y nutrientes se ve seriamente comprometido (ver apartado 1.4.2.). Por ello, la hipoperfusión y la hipoxia podrían cumplir un papel importante en la fisiopatología de la EA (Zlokovic, 2011).

6.1. Regulación de la concentración de oxígeno

Cuando los niveles de oxígeno en una célula son bajos, debido a que el aporte de oxígeno está siendo inferior a la demanda o porque el consumo está siendo excesivo, nos

encontramos ante una situación de hipoxia. La hipoxia puede darse en condiciones fisiológicas o en determinadas patologías como en el infarto agudo de miocardio, el ictus o durante la formación de tumores sólidos.

Las células cuentan con una maquinaria de señalización que les permite adaptarse cuando la concentración de oxígeno en el medio es baja. El factor de transcripción por excelencia en la respuesta celular a la hipoxia es HIF (del inglés, *Hypoxia Inducible Factor*). Ante la caída de los niveles de oxígeno, HIF se estabiliza y activa un programa transcripcional que, por un lado, favorece el aporte de oxígeno y, por otro, permite la adaptación de la célula al ambiente hipóxico. Las dianas de HIF más conocidas son precisamente genes implicados en la formación de nuevos vasos sanguíneos como VEGF, MMP1, PDGF o Cxcr4 (del inglés, *C-X-C Chemokine Receptor type 4*) (Kaelin & Ratcliffe, 2008; Semenza, 2010).

6.2. Hipoxia en la EA

Estudios epidemiológicos recientes han demostrado un aumento del riesgo de padecer demencia y EA en aquellos pacientes en los que previamente existían enfermedades sistémicas que cursan con hipoxia, como la EPOC (Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica), apnea del sueño o enfermedades cardiovasculares como las arritmias (Love & Miners, 2016; Rusanen y col. 2013; Yaffe y col. 2011).

En concreto, la hipoxia a nivel cerebral aumenta considerablemente el riesgo de padecer demencia o EA (Zhang & Le, 2010). La hipoxia cerebral puede ser el resultado de un daño agudo, como un traumatismo craneoencefálico o un ictus cerebral (Altieri y col. 2004; Schneider y col. 2021), o de un proceso crónico que conlleve una disfunción del sistema vascular a nivel del SNC (Zlokovic, 2011). De hecho, se han detectado muchos rasgos histopatológicos a nivel cerebral que precisamente evidencian una disfunción cerebrovascular en la EA. De acuerdo con la *hipótesis vascular* en la EA, la disfunción cerebrovascular puede ser dependiente o independiente de la acumulación de A β en el parénquima cerebral. Algunos de los cambios vasculares independientes de A β son: i) degeneración y pérdida del revestimiento de pericitos en los capilares cerebrales (Dalkara y col. 2011; Uemura y col. 2020); ii) alteración funcional de los distintos tipos celulares que componen la unidad neurovascular (UNV) (neurona, microglía, astrocitos, pericitos y células endoteliales) que se encarga de acoplar el flujo sanguíneo a la actividad neuronal (**Figura A11**); iii) daño de la BHE y iv) reducción en el CBF, etc. En cuanto a los cambios vasculares inducidos por el péptido amiloide, se encuentran: **i)** efecto vasoconstrictor en la vasculatura cerebral mediado, posiblemente, por la generación de endotelina-1 (ET-1); **ii)** activación de una respuesta de estrés oxidativo en la vasculatura cerebral; **iii)** alteración de

la contractilidad de las células musculares de capilares pequeños, lo que compromete seriamente el acoplamiento neurovascular y el aclaramiento del péptido amiloide (dando lugar a CAA o depósito de $A\beta$ en las paredes de los vasos). En conclusión, las alteraciones vasculares asociadas a la EA se pueden simplificar en la alteración de los componentes celulares de la UNV y en la reducción del CBF (Kisler y col. 2017; Love & Miners, 2016).

El papel que puede llegar a cumplir la hipoxia y la disfunción vascular en la fisiopatología de la EA ha quedado también de manifiesto en estudios dirigidos a la búsqueda de marcadores preclínicos. Un ejemplo de ello es el trabajo dirigido por Iturria y col. donde se demostró que el daño vascular es el primer evento patológico que aparece durante el curso de dicha patología (Iturria-Medina y col. 2016). Este estudio se llevó a cabo mediante el uso de pruebas de imagen a nivel cerebral y de marcadores proteicos presentes en el plasma sanguíneo y el CSF de pacientes controles o con EA en diferentes estadios. Dentro de los marcadores proteicos, los que mejor correlacionan con el curso de la enfermedad son aquellos que están implicados con la respuesta vascular (FABP; del inglés, *Fatty Acid Binding Protein*; Apolipoproteína A, VEGF...) o con la respuesta inflamatoria (TNFR, S100-B, interleuquinas...).

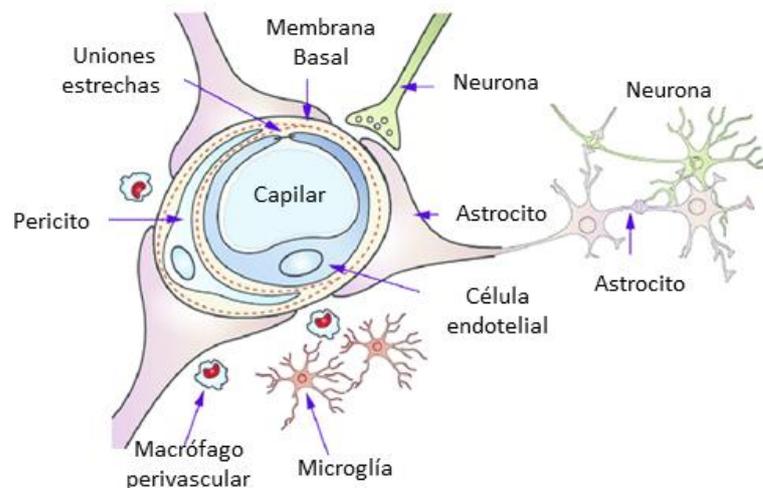


Figura A11. Esquema representativo de los componentes de la UNV (figura modificada de Chen y Liu, 2011).

En paralelo, se ha estudiado el efecto que tiene un estímulo hipóxico sobre las rutas de señalización más estudiadas en la fisiopatología de EA: acúmulo de $A\beta$ y de P-Tau. Aunque son muchos los experimentos que sugieren que la hipoxia modula la expresión de las enzimas implicadas en el procesamiento y el aclaramiento de $A\beta$ PP, potenciando la expresión de aquellas proteínas relacionadas con la vía amiloidogénica (BACE-1, PS1, Nicastrina, APH1...) (Li y col. 2009; Pluta y col. 2013; Sun y col. 2006; Wang y col. 2006) o

reduciendo los niveles de proteínas implicadas en el transporte de A β (neprilisina) (Lall y col. 2019), un estudio llevado a cabo en nuestro laboratorio (Serrano-Pozo y col. 2017) mostró argumentos en contra de que la hipoxia potencie el procesamiento amiloidogénico de A β PP. En cuanto a la acumulación de la proteína fosforilada P-Tau, se ha publicado que la hipoxia puede activar a la quinasa regulada por señalización extracelular (ERK, del inglés; *Extracellular-signal Regulated Kinase*) y esta enzima sería la responsable de incrementar los niveles de fosforilación de la proteína Tau (Fang y col. 2010).

6.3. Hipoxia e inflamación

En los tejidos sanos, la concentración de O₂ oscila entre el 2.5 y el 9%. No obstante, en condiciones patológicas, o ante un proceso inflamatorio, hay una caída en los niveles de oxígeno debido a un posible daño vascular o a un incremento en la actividad metabólica. En concreto, durante un proceso inflamatorio, la hipoxia se debe a un metabolismo celular más intenso a causa de la presencia de agentes patógenos, o a la alta tasa de infiltración en el tejido inflamado. Por tanto, y según están mostrando numerosos estudios, la inflamación puede dar lugar a un ambiente hipóxico. De hecho, las células del sistema inmunitario innato como neutrófilos o macrófagos son capaces de adaptarse a los bajos niveles de oxígeno y esta señal hipóxica promueve un cambio metabólico que garantiza su correcto funcionamiento (Giatromanolaki y col. 2003; Imtiyaz & Simon, 2010).

Del mismo modo que la inflamación causa hipoxia, la bajada en la concentración de oxígeno puede acarrear un proceso inflamatorio. Personas que pasan un periodo de tiempo en elevada altitud, experimentan un incremento en los niveles de citoquinas inflamatorias circulantes. Además, este lazo bidireccional entre hipoxia e inflamación tiene relevancia clínica pues se ha demostrado que durante el trasplante de órganos la isquemia incrementa el riesgo de inflamación y de rechazo (Krüger y col. 2009).

6.3.1. Hipoxia e inflamación en la EA

A lo largo de la historia, el cerebro ha sido considerado un órgano inmunoprivilegiado, en el que la inflamación sólo podía darse de manera directa mediante la infiltración de patógenos, o por la rotura de la BHE y la consecuente invasión de las células inmunitarias periféricas. Sin embargo, se ha demostrado la existencia de receptores PRR (del inglés, *Pattern Recognition Receptor*) en las células residentes del SNC. Estos receptores detectan tanto moléculas específicas de patógenos (PAMP; del inglés, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*), como moléculas asociadas con estrés o daño tisular (DAMP; del inglés, *Danger-Associated Molecular Patterns*). Un ejemplo de DAMPs localizados en el cerebro durante el curso de una enfermedad neurodegenerativa son los depósitos proteicos o las proteínas mal

plegadas (A β , α -sinucleína, huntingtina mutada, superóxido dismutasa mutante u oxidada, priones...) (Hane y col. 2017; Heneka y col. 2014).

La inflamación es una respuesta común en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, e implica una participación activa del sistema inmune innato del SNC, regulado principalmente por la microglía y la astrogliá (Ginhoux y col. 2015). Estas células gliales, en respuesta a antígenos o DAMPs, liberan una serie de mediadores inflamatorios con funciones quimioattractivas, fagocíticas, citotóxicas y reguladoras de linfocitos T (Ubogu y col. 2006) con el objetivo de revertir el daño y recuperar las condiciones fisiológicas del tejido, en este caso, el parénquima cerebral (Dá Mesquita y col. 2016; González y col. 2014; Liu y col. 2014). Sin embargo, la particularidad de la respuesta inflamatoria en la EA es que la exposición al antígeno (depósito de A β) es continuada en el tiempo, por lo que se desencadena un proceso inflamatorio crónico que puede ocasionar la disfunción y/o muerte neuronal.

Por otro lado, la hipoxia tiende a potenciar la respuesta inflamatoria alterando los niveles de expresión de moléculas quimiotácticas en neutrófilos y monocitos, aumentando la supervivencia de las células del sistema inmunitario y favoreciendo la infiltración de estos tipos celulares hacia el foco hipóxico (Bosco y col. 2006; Grimshaw & Balkwill, 2001; Walmsley y col. 2005). Según esta premisa, en el cerebro de un paciente con EA, donde la respuesta hipóxica e inflamatoria están activas, podría darse un lazo de retroalimentación positiva entre ambas respuestas que exacerbara aún más la neuroinflamación descrita en esta patología (Lall y col. 2019).

Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado que la neuroinflamación está implicada en la patogénesis de la EA. Por ejemplo, el uso de antiinflamatorios no esteroideos reduce el riesgo de padecer EA. Además, diferentes escenarios clínicos donde existe una potente respuesta inflamatoria, como una infección sistémica (septicemia, periodontitis etc), la obesidad y una actividad física reducida, aumentan considerablemente el riesgo de padecer EA (Heneka et al., 2014). Por otro lado, estudios genéticos masivos como son los GWAS ponen de manifiesto el papel que la microglía y la neuroinflamación cumplen en la fisiopatología de la EA, pues mutaciones en genes microgliales como *TREM2* suponen un incremento del riesgo de padecer EA de 3 a 4.5 veces. Se han registrado otras mutaciones en genes microgliales como *CR1*, *HLA-DRB1*, *CD33*, *MS4A6A* y *BIN1*, que también predisponen a sufrir EA, aunque con una menor penetrancia que las mutaciones en *TREM2* (Dansokho & Heneka, 2018; Karch y col. 2014b; Lambert y col. 2013a).

En los pacientes y modelos animales de EA, la microglía se dispone alrededor de las placas de A β . El acúmulo de células inmunitarias organizadas en torno a una placa amiloide puede desencadenar un cuadro de hipoxia local (hipoxia inflamatoria) debido, por un lado, a la alta demanda energética de estas células y, por otro, a un suministro de oxígeno limitado a consecuencia de una alteración de la morfología y la función de los vasos sanguíneos (De Smet y col. 2009; Eltzschig & Carmeliet, 2011).

La microglía que se organiza alrededor de los depósitos amiloides tiene un comportamiento y una morfología muy similar a las células derivadas de monocitos. Esta microglía próxima a la placa contiene A β citoplasmático, producto de la fagocitosis mediada por diversos receptores de superficie (receptores del complemento, receptores Fc, CD36, B1), y muestra cambios morfológicos como el aumento de tamaño del soma y la reducción de las prolongaciones (D'Andrea et al., 2004). En otras enfermedades neurológicas como el ictus isquémico, la microglía también tiene una función fagocítica muy importante, pues estas células inmunitarias responden a la liberación de proteínas del suero en el parénquima cerebral, lo que tiene un efecto quimiotáctico. Una vez recluidas en la zona infartada, la microglía fagocita a las células endoteliales alterando de este modo la BHE (Jolivel y col. 2015).

En condiciones fisiológicas, la función fagocítica de la microglía también cumple un papel importante ya que interviene el mantenimiento de los nichos de células madre neuronales en la zona subgranular (SGZ; del inglés, *Subgranular Zone*) del hipocampo. En este caso, la microglía se encarga de fagocitar los neuroblastos que entran en apoptosis antes de incorporarse en la red neuronal, y esta fagocitosis se lleva a cabo mediante la formación de bolsillos (*pouches*) en las terminaciones de las proyecciones microgliales, sin involucrar al soma de la célula (Amanda y col. 2010).

7. SISTEMA VASCULAR Y EA

Numerosos hallazgos demuestran que la disfunción neurovascular es un factor clave en la patogénesis de la EA. Entre estos hallazgos se encuentran: la comorbilidad entre enfermedades cerebrovasculares y EA, la asociación entre aterosclerosis y EA, la correlación entre el deterioro cognitivo y la CAA, la existencia de una angiogénesis insuficiente en el cerebro de los pacientes con EA y la alteración en el aclaramiento de toxinas y agregados proteicos del parénquima cerebral a través de la BHE, entre otros (Nelson y col. 2016).

7.1. Angiogénesis y EA

Curiosamente, las placas amiloides de pacientes y de modelos murinos con EA acumulan marcadores hipóxicos y angiogénicos entre los que se encuentra VEGF (Grammas y col. 2011; Kalaria y col. 1998; Pogue & Lukiw, 2004; Tang y col. 2013; Thomas y col. 2015; Yang y col. 2004). El incremento en los niveles de VEGF es una señal fisiológica que promueve la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis). Aunque la hipoxia es el principal inductor de la angiogénesis al incrementar los niveles de VEGF vía HIF, hay datos que indican que algunas citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , liberadas por las células microgliales que rodean a la placa, también podrían modular los niveles de VEGF (Pogue & Lukiw, 2004). No obstante, a pesar de la existencia de una señalización pro-angiogénica, la microvasculatura cerebral está considerablemente reducida, especialmente alrededor de las placas de A β , tanto en el cerebro de pacientes como de modelos murinos con EA (Kawai y col. 1990; Kawai y col. 1992; Kouznetsova y col. 2006; Sengillo y col. 2013). Este hallazgo sugiere que el proceso de angiogénesis, a pesar de encontrarse inducido, no se está completando de forma satisfactoria entorno a los depósitos amiloides en la EA. Por dicho motivo, en el presente proyecto de investigación nos centraremos en el estudio del sistema vascular y su implicación en la EA como un nuevo mecanismo fisiopatológico responsable del daño cerebral.

8. TRABAJO PREVIO DEL LABORATORIO

En el laboratorio se han llevado a cabo estudios previos con el objetivo de investigar la relación que guarda la hipoxia y la EA ya que, como se ha descrito, muchas enfermedades que cursan con una bajada en los niveles de oxígeno y nutrientes aumentan el riesgo de padecer Alzheimer (Livingston y col. 2017; Rusanen y col. 2013; Yaffe y col. 2011; Zlokovic, 2011). Además, la hipoperfusión cerebral es una característica temprana en el cerebro tanto de pacientes (Love & Miners, 2016; Ruitenbergh y col. 2005), como de modelos animales de EA (Iadecola, 2004; Niwa y col. 2002a; Niwa y col. 2002b), lo que sugiere que el cerebro se encuentra en condiciones de hipoxia. Siguiendo con esta hipótesis, en nuestro laboratorio se midieron los niveles de expresión de *HIF1a* en muestras de hipocampo de pacientes con EA, tanto a nivel de ARNm, mediante *quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction* (qRT-PCR), como a nivel de proteína, mediante *western blot* (WB), observándose un incremento en la expresión que correlaciona con el curso de la enfermedad. (**Figura A12**).

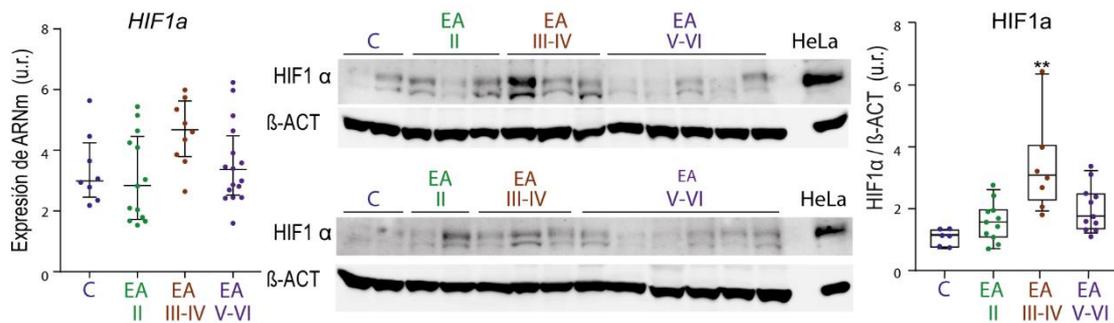


Figura A12. Medida de expresión de HIF1 α a nivel de ARNm y de proteína en muestras de hipocampo de controles y pacientes de EA. El panel izquierdo muestra los niveles de ARNm de *HIF1 α* estimados por qRT-PCR. Cada punto representa valores individuales. Se usó GAPDH como gen control (n=46 muestra de EA/Control; F=7,124; p = 0,0681; test de Kruskal Wallis) El panel central muestra los niveles de HIF1 α medidos por Western Blot en extractos de proteínas. Se usó β -actina (β -ACT) como control de carga y se utilizó un extracto de células HeLa expuestas a hipoxia (1% O₂, 4h) como control positivo para identificar el peso molecular HIF1 α . La gráfica de la derecha de cajas y bigotes muestra la cuantificación del WB usando medidas relativas a β -ACT (n = 35 muestras de EA/control; F = 15,78; ** p < 0,01; test de Kruskal Wallis). En ambos experimentos se usaron muestras de extractos de hipocampo humano de sujetos controles (C; Braak I; azul), y en estadios de Braak II (EA II; verde); III-IV (EA III-IV; marrón), y V-VI (EA V-VI; morado).

Por otro lado, teniendo en cuenta que las células del sistema inmunitario son muy sensibles a las concentraciones de oxígeno, se decidió estudiar la respuesta de la microglía (el sistema inmunitario innato del cerebro) frente a esta hipoxia descrita en el cerebro durante la EA. Así, se obtuvo una firma genética con todos aquellos genes que se encuentran sobreexpresados en la microglía en condiciones de hipoxia. Para ello, inicialmente se expusieron cultivos primarios de microglía de ratón a condiciones de normoxia (21% O₂) o de hipoxia (1% O₂) durante 6 horas y, a continuación, se realizó un *microarray* con el que se obtuvo el listado de genes diferencialmente expresados (DE) en la microglía ante la bajada de la concentración de O₂. El listado de genes resultante constituía nuestra HMM (del inglés, *HIF1/Hypoxia-induced Microglial Module*) y fue incorporado en una base de datos de ontología de genes como es GSEA (del inglés, *Gene Set Enrichment Analysis*). GSEA recibe como “entrada” los datos crudos de un análisis de expresión diferencial y lleva a cabo un análisis de ontología de genes mediante el cual identifica los procesos biológicos o *gene sets* más relevantes en la comparativa de estudio. En nuestro laboratorio, se utilizaron los datos de *microarray* de células microgliales pertenecientes a tres modelos de EA que acumulan depósitos amiloides como son *APP-PSEN1/+* (Orre y col. 2014a); *5xfAD* (Wang y col. 2015), ambos publicados en el repositorio GEO (del inglés, *Gene Expression Omnibus*), y *APP₇₅₁SL/+* (en colaboración con el grupo del Dr. Javier Vitorica del Instituto de Biomedicina de Sevilla). Tras el análisis de ontología de genes realizado por GSEA, obtuvimos que la categoría

funcional más representativa en la microglía de los modelos de EA que acumulan los depósitos amiloides es la HMM (**Figura A13**).

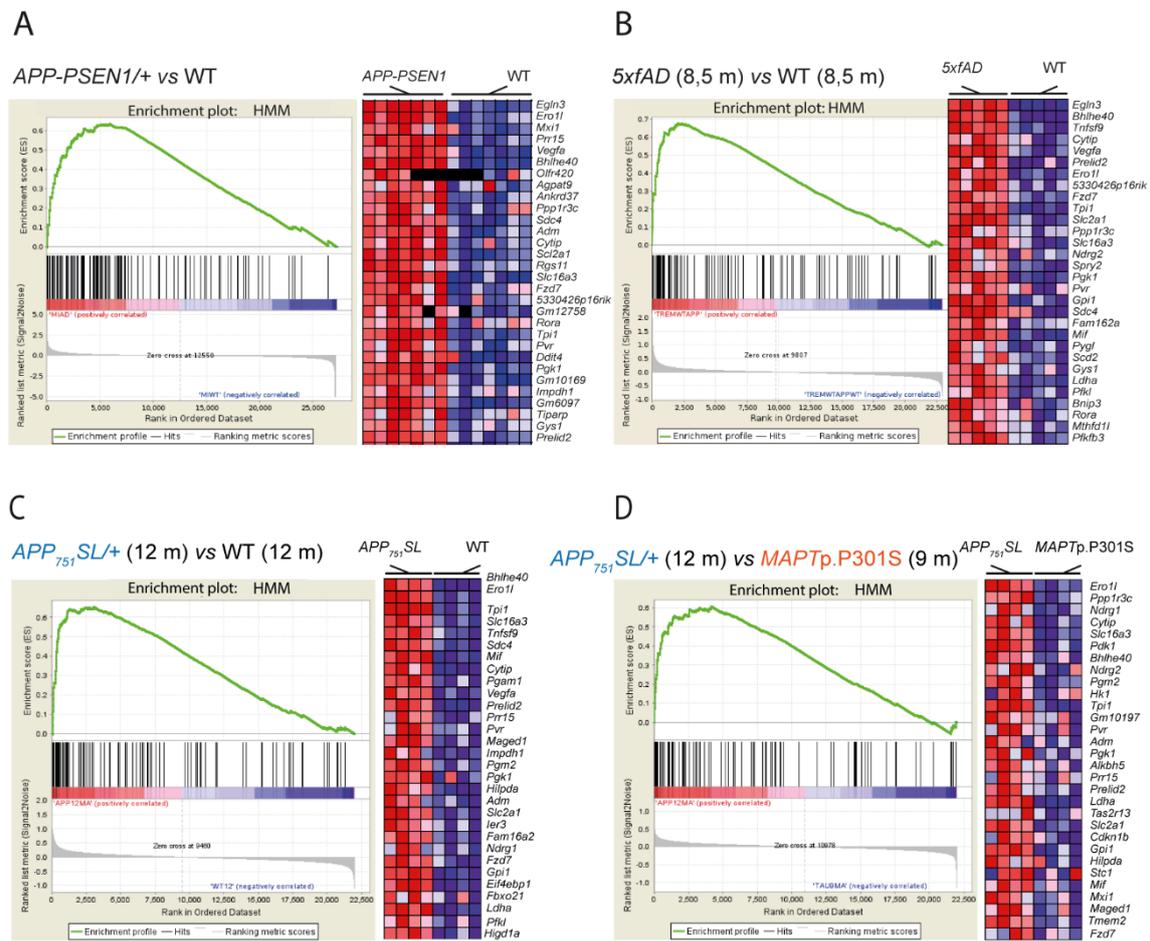


Figura A13. Estudios de enriquecimiento funcional de la firma hipóxica (HMM) en microglía aislada en diferentes modelos animales de EA mediante GSEA. En los paneles A, B y C se muestra el enriquecimiento de la firma HMM en tres modelos murinos de EA que acumulan A β (*APP-PSEN1*^{+/+}; *APP*₇₅₁*SL*^{+/+} y *5xFAD*) en relación al grupo control. En el panel D se representa el enriquecimiento de la firma HMM en el modelo *APP*₇₅₁*SL*^{+/+} en relación al modelo de EA *MAPT*_{p.P301S}, lo que confirma que la firma hipóxica es específica de la microglía en los modelos que acumulan el péptido amiloide.

Para cerciorarnos de que la firma hipóxica es una respuesta específica de la microglía cuando se acumula A β , realizamos análisis de ontología de genes por GSEA en la microglía de modelos de EA que no acumulan el péptido amiloide como el modelo *MAPT*_{p.P301S}, en el que se acumula la proteína asociada a microtúbulos en su forma fosforilada (P-Tau) (en colaboración con el grupo del Dr. Javier Vitorica del Instituto de Biomedicina de Sevilla), así como en la microglía de otros modelos de enfermedades neurodegenerativas diferentes a la patología de Alzheimer: modelo de ELA (Chiu y col. 2013) y microglía envejecida (Hickman y col. 2013). En ningún caso la HMM se encontraba dentro de las categorías funcionales más

destacadas, lo que demuestra que la hipoxia microglial es una respuesta específica ante los depósitos amiloides que se generan en la EA.

Tras estudiar la respuesta hipóxica microglial (HMM) en las placas amiloides, se validó a nivel histoquímico la presencia de un microambiente hipóxico en dichas regiones. Para ello, en el cerebro de ratones *APP-PSEN1/+* de 8 meses de edad se utilizó un marcador de hipoxia, pimonidazol (Raleigh y col. 1999) y se colocalizó con marcadores de placas amiloides de núcleo denso (Tio-S). Los resultados demuestran la existencia de una hipoxia local alrededor de las placas de A β que justificaría la presencia de marcadores hipóxicos y la HMM en la EA. (Figura A14). Finalmente, en el laboratorio hemos comprobado que la hipoxia microglial, al igual que las mutaciones de riesgo descritas en la microglía durante la enfermedad, disminuyen su capacidad defensiva y aumentan la patología.

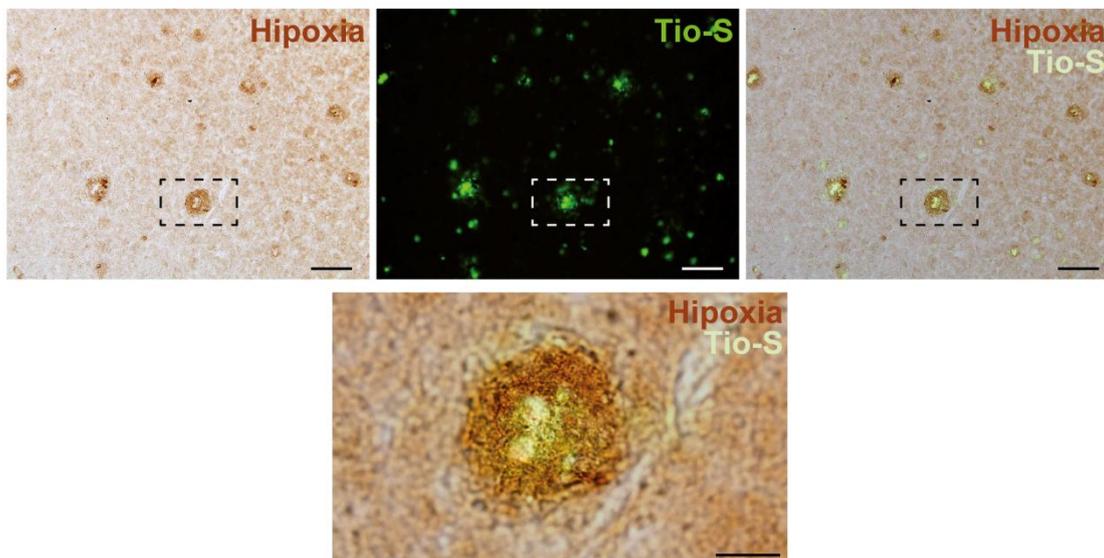


Figura A14. Las placas de A β son áreas hipóxicas. Secciones coronales representativas de cerebros de ratones *APP-PSEN1/+* de 14 meses de edad tratados con *Hypoxiprobe* (Pimonidazole HCl; 60 mg/kg intraperitoneal; 45 min) que muestran hipoxia (marrón; inmunoperoxidasa; DAB) en la proximidad de las placas de A β teñidas con Tio-S (verde). El recuadro punteado aparece ampliado en el panel inferior. Las barras de escala son de 100 μ m y 25 μ m respectivamente en las imágenes de bajo y alto aumento.

B. OBJETIVOS

La enfermedad de Alzheimer tiene una alta prevalencia en la población mundial con más de 35 millones de afectados (OMS 2020), sin embargo, los síntomas aparecen cuando la patología está establecida en el cerebro, lo que dificulta la búsqueda de marcadores diagnósticos y de estrategias terapéuticas que traten la etiología de la enfermedad. Actualmente disponemos de fármacos que actúan a nivel sintomático, compensando los niveles de diferentes neurotransmisores que se alteran durante la pérdida neuronal (acetilcolina y glutamato)(Kumar y col. 2018; Muñoz-Castro y col. 2020). En las últimas décadas, la mayoría de las terapias se han centrado en uno de los principales rasgos histopatológicos de la enfermedad, la patología amiloide, no obstante, los beneficios de la terapia no han conseguido superar los riesgos, lo que cuestiona la validez de la hipótesis amiloide en la EA (Muñoz-Castro y col. 2020).

Ante el fracaso de las nuevas terapias, ha sido necesario recurrir a estudios genéticos masivos, estudios epidemiológicos y estudios basados en el análisis de datos clínicos (*data-driven*) con el objetivo de indagar en el carácter multifactorial que subyace a la EA (Iturria-Medina y col. 2016; Sancesario & Bernardini, 2018). En esta línea, se ha demostrado que la desregulación vascular, con una reducción del CBF y de la captación de glucosa, es la primera alteración cerebral que tiene lugar en estadios preclínicos de la EA (Iturria-Medina y col. 2016). Además, según estudios epidemiológicos, en torno al 50% de pacientes diagnosticados con EA tienen comorbilidades vasculares asociadas como arteriosclerosis, aterosclerosis o microinfartos que les predisponen a padecer EA (De La Torre, 2004; Sweeney y col. 2015; Zlokovic, 2011). Debido a ello, el papel de la vasculatura cerebral está cobrando gran importancia en la EA y constituirá la línea de investigación de este trabajo.

El cerebro de pacientes con EA acumula marcadores angiogénicos, entre los que se encuentra VEGF, el factor angiogénico por excelencia (Desai y col. 2009; T. Thomas y col. 2015). En condiciones fisiológicas, VEGF se secreta ante un estímulo hipóxico y son muchos los estudios que describen la existencia de una respuesta hipóxica en el cerebro de pacientes con EA (De La Torre, 2004; March-Diaz y col. 2021; Zlokovic, 2011). En un trabajo publicado recientemente en nuestro laboratorio (March-Diaz y col. 2021), hemos demostrado que la A β AM (del inglés, *plaque A β -Associated Microglia*), las células que constituyen la primera línea de defensa y rodean los depósitos amiloides en modelos de EA, presentan una firma molecular hipóxica (HMM) que no se identifica en otros modelos de EA o de neurodegeneración que no acumulan el péptido A β (March-Diaz y col. 2021). Este resultado revela que la formación de la placa de A β genera un microambiente hipóxico, en lugar de tratarse de una respuesta hipóxica generalizada.

La presencia de una respuesta hipóxica local y la consecuente liberación de factores y mediadores relacionados con el proceso angiogénico (VEGF, trombina, integrinas...) sugieren una asociación directa entre la EA y la angiogénesis (Grammas y col. 2011). Sin embargo, a pesar del incremento de factores angiogénicos detectado en el cerebro de Alzheimer, no existen evidencias de crecimiento vascular en este contexto. Contrariamente, se ha observado una reducción de la densidad vascular, llegando a describirse incluso “agujeros vasculares” en relación a las placas de A β (Kawai y col. 1990; Kawai y col. 1992; Kouznetsova y col., 2006; Sengillo y col. 2013; Steinman y col. 2021).

En base a lo anteriormente expuesto, este trabajo propone como objetivo principal dilucidar la aparente paradoja descrita en el cerebro de Alzheimer, donde residen simultáneamente estímulos angiogénicos y una reducción de la microvasculatura cerebral. Nuestra hipótesis de trabajo propone que la creación de una placa de A β da lugar a la formación de un microambiente hipóxico, dadas sus características físicas- acúmulo de proteínas en el espacio extracelular, lo que podría desplazar los vasos existentes- y el reclutamiento de células gliales- dada su alta actividad generarían hipoxia inflamatoria. El desarrollo de hipoxia local provocaría la inducción de factores angiogénicos de forma focalizada, asociados a la formación de estos depósitos amiloides. A continuación, será necesario estudiar la vasculatura cerebral para identificar los mecanismos moleculares que subyacen en este contexto y, finalmente, diseñar estrategias terapéuticas que nos permitan abordar la EA desde otra perspectiva molecular. Para ello, planteamos los siguientes objetivos específicos:

Objetivo 1. Estudiar el microambiente hipóxico y la angiogénesis en la placa amiloide de modelos y pacientes de EA.

Objetivo 2. Estudiar la vasculatura cerebral en modelos de EA que acumulan A β .

2.1. Estudiar los mecanismos moleculares implicados en el daño vascular cerebral observado en modelos de EA.

2.2. Diseñar abordajes terapéuticos que puedan revertir el daño vascular observado en torno a las placas amiloides.

C. MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

1.1. Mantenimiento y cuidados generales

Todos los ratones usados en el estudio se mantuvieron en espacios cerrados, controlando así las condiciones de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) y humedad (55%), y con acceso a alimentación y agua *ad libitum*. Además, se establecieron ciclos de luz/oscuridad de 12 horas (8 am- 8pm). Los animales fueron manipulados de acuerdo con las pautas de cuidado animal del Consejo de la Comunidad Europea (86/60/CEE) y con las normas del comité ético del Hospital Universitario Virgen del Rocío. En el caso de los ratones que requerían una dieta específica con tamoxifeno (TMX) (400 mg de citrato de tamoxifeno por kg; Envigo) para activar la recombinación mediada por la enzima CRE (*Cre::ERT2*), se les alimentó durante 30 días cuando cumplían 1 mes de edad. El sacrificio de los animales se realizó mediante la inyección intraperitoneal de una dosis letal (60mg/kg) de Tiobarbital (Braun) al 5% p/v en solución salina (Fresenius Kabi España S.A.).

1.2. Líneas utilizadas

El objetivo de esta tesis doctoral es profundizar en la fisiopatología de la EA, por lo que los animales de investigación que se han usado mayoritariamente son modelos murinos que reproducen los rasgos histopatológicos de dicha enfermedad.

Por otro lado, en estos animales ha sido necesario incorporar herramientas genéticas que nos permiten generar deleciones o marcar la expresión de un gen. Todas las construcciones genéticas diseñadas para este fin se basan en la tecnología CRE/*LoxP*. La enzima CRE tiene actividad recombinasa, por lo que reconoce los sitios *LoxP* insertados en el genoma, corta en dicha región, elimina la secuencia comprendida entre ambos y vuelve a unir el material genético (Sauer, 1998). Aprovechando este mecanismo, los dos sitios *LoxP* se han ubicado, o bien dentro de un exón, o bien flanqueando una secuencia STOP en un gen específico. La recombinación entre los sitios *LoxP* va a depender de la expresión de la CRE, que se activará solamente en aquellos tipos celulares en los que el promotor que la regula se exprese. Además, en nuestro caso, la CRE está fusionada a un receptor de estrógenos, lo que permite que la recombinación sólo tenga lugar cuando los animales son tratados con un antagonista de estrógenos, tamoxifeno (Forde y col. 2002). En definitiva, se trata de una herramienta potente que nos permite decidir dónde y cuándo se modifica la expresión de un alelo silvestre.

Además, se han usado otros modelos murinos de enfermedades neurológicas (modelo experimental que reproduce la comorbilidad entre la diabetes tipo 2 y la EA o un modelo de esclerosis múltiple) con el objetivo de realizar estudios comparativos con la EA.

1.2.1. Modelos genéticos de EA

- *APP-PSEN1*(APP^{swe},PSEN1^{dE9})

Ratón doble transgénico heterocigoto que sobreexpresa, por un lado, la isoforma 695 de la proteína precursora amiloide (APP695), con tres residuos modificados para asemejarse a la proteína humana (Mo/HuAPP695) y la mutación *Swedish* (K594N/M596L), descrita en casos de Alzheimer familiar, y por otro, la proteína Presenilina 1 de humano con una delección del exón 9 (PSEN1dE9), asociada también con casos de Alzheimer familiar (Crook y col. 1998). Ambas mutaciones están bajo el control del promotor de la proteína priónica de ratón (*Prnp*), lo que dirige su expresión a las neuronas del SNC. El fondo genético de estos animales es C57BL/6 y proceden de Jackson Laboratory (Jankowsky y col. 2004).

- *APP₇₅₁SL*

Ratón simple transgénico heterocigoto que sobreexpresa la isoforma 751 de la proteína precursora amiloide humana (APP751) con las mutaciones *Swedish* (K670N/M671L) y *London* (V717I), descritas en casos de Alzheimer familiar, bajo el control del promotor *Thy-1*, específico de neuronas maduras del cerebro. El fondo genético de es C57BL/6 y proceden de Sanofi-Aventis (Blanchard et al., 2003)(Blanchard y col. 2003).

- *MAPT_p.P301S*

Ratón heterocigoto que expresa la proteína humana TAU asociada a microtúbulos (MAPT; del inglés, *Microtubule Associated Protein TAU*), con una mutación humana (P301S) en el dominio de unión a los microtúbulos. Esta construcción se encuentra regulada por el promotor priónico *Prnp* lo que aumenta su expresión cinco veces en relación a la proteína MAPT endógena de ratón (Yoshiyama y col. 2007). Estos ratones fueron cedidos muy amablemente por el Dr. Javier Vitorica Ferrández del Instituto de Biomedicina de Sevilla.

1.2.2. Modelos genéticos portadores del sistema CRE/LoxP

- *Rosa26::CAG::LoxP-STOP-LoxP::tdTomato*(Ai14)

Ratón heterocigoto para un transgén de la proteína fluorescente *tomato* (*tdTomato*) localizado el locus *Gt(ROSA)26Sor* y cuya expresión se encuentra regulada por un *cassette* con una secuencia STOP flanqueada por dos sitios *LoxP*. Esta herramienta genética bloquea

la expresión de la proteína fluorescente mediada por el promotor CAG en ausencia de la CRE. Los ratones fueron adquiridos en los laboratorios Jackson (Madisen y col. 2010).

- *Cdh5-Cre::ERT2/+*

Ratón heterocigoto que expresa el gen de fusión *Cre-ERT2* bajo el control del promotor del gen *Cadh5*, activo en células endoteliales. La proteína de fusión CRE-ERT2 está formada por la enzima CRE recombinasa unida a una forma triple mutante del receptor de estrógenos humano, de esta manera se modifica la capacidad de unión a su ligando endógeno (17 β -estradiol) a concentraciones fisiológicas y sólo puede unirse a ligandos sintéticos como el 4-hidroxitamoxifeno (OHT). La enzima CRE se localiza en el citoplasma y únicamente accede al núcleo para llevar a cabo su acción tras el tratamiento con OHT. Estos ratones fueron cedidos generosamente por el Prf Ralf H. Adams (Wang y col. 2010) .

- *Psen1^{Flox/Flox}::Psen2^{-/-}*

Ratón que presenta una modificación genética en los genes que codifican para la *Psen1* y *Psen2*. El gen *Psen1* tiene dos secuencias *LoxP* flanqueando los exones 2 y 3, de manera que en ausencia de la CRE recombinasa, el gen podrá traducirse y la proteína Psen1 será completamente funcional, sin embargo, cuando se da la recombinación, los exones 2 y 3 se escinden y el producto resultante no es viable (Yu y col. 2001). En cuanto a *Psen2*, estos ratones presentan una pequeña delección en el exón 5 y una inserción de un gen de resistencia a neomicina lo que altera la pauta de lectura dando lugar a una delección completa de dicho gen (Steiner y col. 1999). Esta línea fue cedida muy amablemente por el Prf. Jie Shen.

- *Cp-HIST1H2BB::Venus/+*

Ratón heterocigoto usado como herramienta genética para monitorizar a nivel celular la señalización de la vía Notch. Esta línea de ratón presenta 4 copias en tándem de la secuencia genómica de unión a CBF1 bajo la expresión del promotor SV40 y esta construcción se localiza “aguas arriba” de la fusión del gen que codifica para la histona H2B ligado al gen de la proteína fluorescente modificada YFP (del inglés, *Yellow Fluorescent Protein*), *Venus*. Estos ratones fueron cedidos muy amablemente por la Prof. A.K.A. Hadjantonakis (Nowotschin y col. 2013).

- *Cdh5-Cre::ERT2/+;Rosa26::LSL::tdTomato; APP-PSEN1*

Proceden del cruce entre los ratones *Cdh5-Cre::ERT2/+;Rosa26::CAG::LoxP-STOP-LoxP::tdTomato* y *APP-PSEN1/+*. Esta línea fue usada con el objetivo de realizar un trazado de linaje de células endoteliales en el contexto de la EA.

- *Cp-HIST1H2BB::Venus/+; APP-PSEN1*

Proceden de cruce de los ratones *Cp-HIST1H2BB::Venus/+* y *APP-PSEN1/+*. Esta línea fue usada con el objetivo de monitorizar la actividad de la vía Notch en el contexto de la EA.

1.2.3. Otros modelos genéticos de neurodegeneración

- Inducción de EAE (del inglés, *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*)

Este modelo animal reproduce la enfermedad de la esclerosis múltiple en humanos y fue cedido muy amablemente por el Dr. Fernando de Castro del Instituto Cajal (Moliné-Velázquez y col. 2011).

- *APP-PSEN1; lepr^{db/db}*

Proceden del cruce entre ratones *APP-PSEN1/+* (ratones que reproducen la EA) y ratones *lepr^{db/db}* (modelo experimental de diabetes tipo 2; T2D). Esta última línea son ratones homocigotos para la mutación espontánea que causa diabetes tipo 2 (*lepr^{db}*). La mutación consiste en una transversión intrónica (G -T) en el gen que codifica para el receptor de la leptina (*lepr*) y que origina una alteración del marco de lectura y un fallo en la traducción, dando lugar a una delección del mismo. Los ratones fueron cedidos muy generosamente por la Dr Mónica García Alloza de la universidad de Cádiz (Ramos-Rodriguez y col. 2015).

1.3. Intervenciones quirúrgicas generales

Una vez sacrificados, los ratones adultos se sometieron a una perfusión intracardiaca de 20 ml de tampón fosfato salino (PBS; del inglés, *Phosphate Buffered Saline*) (Gibco) con el objetivo de drenar la sangre y evitar así posibles artefactos en el análisis de las muestras. Tras ello, el animal se decapitaba y se extraía el cerebro. A continuación, en función del estudio que se llevase a cabo, la muestra recibía un tratamiento u otro, así, por ejemplo, en el caso de la realización de un análisis histológico, el cerebro completo se incluía en una solución fijadora y procedíamos tal y como se describe en el apartado 3. Para el análisis bioquímico, el hemisferio se diseccionaba extrayendo tres regiones anatómicas cerebrales: corteza, hipocampo y estriado. Cada una de ellas se congelaba en un molde con OCT (Tissue-Tek) en nitrógeno líquido y se almacenaba a una temperatura de -80°C hasta su uso. Estas muestras congeladas se utilizarían, posteriormente, para la extracción de ARN y/o

proteínas totales (ver apartados 9 y 10). Si se querían realizar estudios histológicos y bioquímicos en paralelo, el cerebro se separaba en sus dos hemisferios y cada uno de ellos se destinaba a una técnica.

1.4. Genotipado de los animales

El genotipado de los ratones incluidos en el estudio se realizó mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; del inglés, *polimerase chain reaction*). El ácido desoxirribonucleico genómico (ADN genómico) se extrajo a partir de biopsias que procedían del marcaje en los dedos del animal, o bien de un fragmento de cola en el caso de los animales adultos.

1.4.1. Extracción de ADN

Para la extracción del ADN a partir del tejido de los dedos se utilizó un método de lisis alcalina (Truett y col. 2000) mientras que para digerir las biopsias procedentes de las colas de los ratones adultos se recurrió a una técnica basada en el uso de proteinasas (proteínasa K) (González y col. 2011).

- **Lisis alcalina de biopsias obtenidas del dedo**

El tejido se incubó con 75 μ L de una solución alcalina (NaOH) que contenía un quelante de calcio (EDTA) para inhibir la actividad enzimática de las nucleasas presentes en la muestra [NaOH 25 mM (Sigma), EDTA 0,2 mM (Bio-Rad) en H₂O mili-Q (Millipore)]. La incubación tenía lugar a 98°C en agitación (450 revoluciones por minuto o rpm) en un Thermomixer (Eppendorf) durante 30 min. Una vez digerido el tejido, la mezcla se neutralizó añadiendo el mismo volumen de una solución ácida [Tris-HCl 40 mM (Sigma), pH 5 en H₂O mili-Q (Millipore)] y el volumen final se mezcló mediante vórtex.

- **Lisis con proteínasa K de biopsias obtenidas de la cola**

Este método combina el reactivo *direct PCR* (Thermo Scientific) con la enzima proteínasa K (Sigma), y el producto resultante puede usarse directamente como sustrato de la PCR sin necesidad de ser aislado ni purificado. Para ello, se obtiene una biopsia de la cola del ratón de un tamaño comprendido entre 2-5mm y posteriormente se incluye en 150 μ L de reactivo *direct PCR* junto a 4,5 μ L de proteínasa K. La incubación tiene lugar en un Thermomixer y consta de dos etapas: 2h y 15 min a 56°C en agitación (800- 850 rpm), seguido de 45 min a 85°C (sin agitación). Durante la primera etapa se activa la enzima proteínasa K, que es estable a altas temperaturas y puede ejercer su actividad frente a proteínas desnaturalizadas; en la segunda fase, a 85°C, la enzima se inactiva.

1.4.2. Reacción de PCR

Las reacciones de genotipado se llevaron a cabo en un termociclador (Biometra Professional Trio) y en la PCR de cada modelo genético se utilizaron unos volúmenes de reacción y temperaturas de alineamiento o extensión concretas (**Tabla C1**), así como unos oligonucleótidos (oligos) específicos (**Tabla C2**). Los reactivos usados fueron los siguientes: NH₄ 10x (Bioline), MgCl₂ (Bioline), desoxirribonucleótidostrifosfato (dNTP, Invitrogen), oligonucleótidos (Sigma), enzima ADN polimerasa (BIOTAQ™ Bioline) y agua (H₂O) mili-Q (Millipore).

Línea	PCR	Volúmenes de reacción	Programa de PCR
<i>APP-PSEN1</i>	App-Ps1	5 µl DNA 2,5 µl Tampón (10X) 1,25 µl MgCl ₂ (50 mM) 0,5 µl dNTPs (10 mM) 0,5 µl Oligo APP Lo (33 µM) 0,5 µl Oligo APP Up (33 µM) 0,15 µl ADN Polimerasa 14,6 µl H ₂ O mili-Q	10' a 94 °C 36 ciclos: 1' a 94 °C 1' a 66 °C 1' a 72 °C 10' a 72 °C
<i>APP_{751SL}</i>	App	5 µl DNA 2,5 µl Tampón (10X) 1,25 µl MgCl ₂ (50 mM) 0,5 µl dNTPs (10 mM) 0,5 µl Oligo APPsl Fwd (33 µM) 0,5 µl Oligo APPsl Rev (33 µM) 0,15 µl ADN Polimerasa 14,6 µl H ₂ O mili-Q	10' a 94 °C 36 ciclos: 1' a 94 °C 1' a 50 °C 1' a 72 °C 10' a 72 °C
<i>MAPT_{p.P301S}</i>	Mapt	5 µl DNA 2,5 µl Tampón (10X) 1,25 µl MgCl ₂ (50 mM) 0,5 µl dNTPs (10 mM) 0,5 µl Oligo Maptp Fwd (33 µM) 0,5 µl Oligo Maptp Rev (33 µM) 0,15 µl ADN Polimerasa 14,6 µl H ₂ O mili-Q	1' a 95 °C 36 ciclos: 15'' a 95 °C 15'' a 55 °C 10' a 72 °C
<i>R26-LSL-tdTomato</i>	Tomato	2 µl DNA 2,5 µl Tampón (10X) 1 µl MgCl ₂ (50 mM) 0,5 µl dNTPs (10 mM) 0,5 µl Oligo OIMR9103 (33 µM) 0,5 µl Oligo OIMR9105 (33 µM) 0,15 µl ADN Polimerasa 17,85 µl H ₂ O mili-Q	5' a 95 °C 35 ciclos: 30'' a 95 °C 30'' a 60 °C 20'' a 72 °C 2' a 72 °C
<i>Cx3cr1-Cre::ERT2</i>	W-Cre	5 µl DNA 2,5 µl Tampón (10X) 1,25 µl MgCl ₂ (50 mM) 0,5 µl dNTPs (10 mM) 1 µl Oligo Cre Lo2 (33 µM) 1 µl Oligo Cre Up2 (33 µM) 0,15 µl ADN Polimerasa 13,6 µl H ₂ O mili-Q	5' a 95 °C 38 ciclos: 30'' a 95 °C 30'' a 61.5 °C 1'30'' a 72 °C 10' a 72 °C
<i>Hif1a^{Flox/Flox}</i>	Hif1a-Flox	5 µl DNA 2,5 µl Tampón (10X) 1,25 µl MgCl ₂ (50 mM) 0,5 µl dNTPs (10 mM)	5' a 94 °C 37 ciclos: 30'' a 94 °C 45'' a 60.5 °C

		0,5 µl Oligo HIF 24b (33 µM) 0,5 µl Oligo HIF 25b (33 µM) 0,15 µl ADN Polimerasa 14,6 µl H ₂ O mili-Q	1' a 72 °C 10' a 72 °C
<i>Psen1^{Flox/Flox}::Psen2^{-/-}</i>	Psen1-Flox	5 µl DNA 2,5 µl Tampón (10X) 1,25 µl MgCl ₂ (50 mM) 0,5 µl dNTPs (10 mM) 0,5 µl Oligo 1-Ps1 (33 µM) 0,5 µl Oligo 2-Ps1 (33 µM) 0,5 µl Oligo 3-Ps1 (33 µM) 0,15 µl ADN Polimerasa 14,1 µl H ₂ O mili-Q	4' a 94 °C 40 ciclos: 1' a 94 °C 1' a 60 °C 1' a 72 °C 10' a 72 °C
<i>Psen1^{Flox/Flox}::Psen2^{-/-}</i>	Psen2 mutante	5 µl DNA 2,5 µl Tampón (10X) 1,25 µl MgCl ₂ (50 mM) 0,5 µl dNTPs (10 mM) 0,5 µl Oligo 1-Ps2 (33 µM) 0,5 µl Oligo 2-Ps2 (33 µM) 0,15 µl ADN Polimerasa 14,6 µl H ₂ O mili-Q	4' a 94 °C 40 ciclos: 1' a 94 °C 1' a 65 °C 1' a 72 °C 7' a 72 °C
<i>Psen1^{Flox/Flox}::Psen2^{-/-}</i>	Psen2 silvestre	5 µl DNA 2,5 µl Tampón (10X) 1,25 µl MgCl ₂ (50 mM) 0,5 µl dNTPs (10 mM) 0,5 µl Oligo 1-Ps2 (33 µM) 0,5 µl Oligo 3-Ps2 (33 µM) 0,15 µl ADN Polimerasa 14,6 µl H ₂ O mili-Q	4' a 94 °C 40 ciclos: 1' a 94 °C 1' a 65 °C 1' a 72 °C 7' a 72 °C
<i>Cp-HIST1H2BB::Venus</i>	CBF Venus	5 µl DNA 2,5 µl Tampón (10X) 1,25 µl MgCl ₂ (50 mM) 0,5 µl dNTPs (10 mM) 0,5 µl Oligo Venus Forward (33 µM) 0,5 µl Oligo Venus Reverse (33 µM) 0,15 µl ADN Polimerasa 14,6 µl H ₂ O mili-Q	5' a 94 °C 35 ciclos: 30" a 94 °C 30" a 58 °C 30' a 72 °C 7' a 72 °C

Tabla C1. Condiciones de reacción de PCR para genotipado. Condiciones de reacción de PCR para el genotipado de las diferentes líneas de ratones usando los oligonucleótidos de la tabla 2.

PCR	Oligonucleótidos	Secuencia
App-Ps1	APP Lo	CTTGTAAGTTGGATTCTCTATATCCG
	APP Up	GACTGACCACTCGACCAGGTTCTG
App	APPsl Fwd	GGCTGAGGAACCCTACGAAGA
	APPsl Rev	CAAAGTACCAGCGGAGATCA
Mapt	Mapt Fwd	GGCATCTCAGCAATGTCTCC
	Mapt Rev	GGTATTAGCCTATGGGGGACAC
Tomato	OIMR103	GGCATTAAAGCAGCGTATCC
	OIMR105	CTGTTCCCTGTACGGCATGG
W-Cre	Cre Lo2	TGTTTCAGGGATCGCCAGGCG
	Cre Up2	TGAAACAGCATTGCTGTCCAC
Hif1a-Flox	HIF 24b	TAAGCAGTTAAGAGCACTAGTTGG
	HIF 25b	ATGTGGAGCTATCTCTAGACCC

Psen1-Flox	1-Ps1	GGTTTCCCTCCATCTTGGTTG
	2-Ps1	TCAACTCCTCCAGAGTCAGG
	3-Ps1	TGCCCCCTCTCCATTTTCTC
Psen2-mutante	1-Ps2	CATCTACACGCCCTTCACGG
	2-Ps2	CATCTACACGCCCTTCACGG
Psen2-silvestre	1-Ps2	CATCTACACGCCCTTCACGG
	3-Ps2	AAGGGCCAGCTCATTCTCC
CBF Venus	Venus GFP Forward	GCTGATTAATCGAGATCTGGTGTAACAC
	Venus GFP Reverse	GCGAGCTAGCCAGCTTTTTTGCAAAAGCCTAG

Tabla C2. Oligonucleótidos usados para el genotipado. Secuencia de los nucleótidos empleados para el genotipado por PCR de las diferentes líneas de ratones usadas.

Para analizar el tamaño de los fragmentos resultantes de la reacción de PCR se siguió el método de electroforesis en gel de agarosa (Sambrook et al., 1989). Para ello se prepararon geles de agarosa (Bioted) al 2-2,5% (p/v) en tampón TBE [Tris-base 0,09 M (Sigma), ácido bórico 0,0899 M (Sigma), EDTA 0,2 mM (Bio-Rad)] a los que se le añadió un agente intercalante del ADN que permite su posterior visualización por luz ultravioleta: Midori Green Advance™ (Nippon Genetics) al 4% (v/v). A cada reacción de PCR se le añadió un 1/10 de volumen de tampón de carga 10x [Azul de bromofenol 0,25% (v/v) (Sigma), xilencianol FF 0,25% (v/v) (Sigma), glicerol 30% (v/v) (Sigma)] y se cargaron 20 µl de cada muestra en el gel. Para determinar el tamaño de los fragmentos de ADN se utilizó el marcador HyperLadder™ 1 kb (Bioline) y, tras la electroforesis, el ADN se visualizó en un transiluminador con luz ultravioleta (BioDoc-IT Imaging System).

2. APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS EN MODELOS DE EA

2.1. Tratamiento con sorafenib

Se trataron ratones pertenecientes al modelo genético *APP₇₅₁SL/+* de 7 meses de edad (11 animales en el grupo tratado y 10 en el control) pareados en cuanto al sexo, durante 1 mes con el fármaco anti-angiogénico Sorafenib (30mg/kg). El principio activo del fármaco se disolvió en DMSO (Sigma) y se administró cada dos días mediante una inyección intraperitoneal. Los animales que pertenecía al grupo control recibieron inyecciones de DMSO.

2.2. Tratamiento con hiperoxia

Se trataron animales del modelo genético *APP₇₅₁SL/+* de 7 meses de edad (6 animales en el grupo tratado y 6 en el control) pareados en cuanto al sexo, durante 1 mes en un cámara hiperóxica al 40% de oxígeno (Coy Laboratory Products). Las condiciones atmosféricas se

mantuvieron estables y fueron monitorizadas en todo momento reestableciéndose las condiciones experimentales (controlador de oxígeno, Coy Laboratory Products). Además, la concentración de oxígeno fue comprobada cada dos días de forma manual usando un medidor electrónico. La humedad en el interior de la cámara se mantuvo siempre por debajo del 70% usando sílica absorbente (Panreac). El CO₂ se filtró a través de un sistema especial basado en una bomba y columnas de sodasorb (Grace). El acceso a la cámara para garantizar la alimentación y la limpieza de los animales tratados se llevó a cabo a través de una precámara sellada que permitía la introducción de material sin modificar las condiciones de su interior. Los ciclos de luz, alimentación y limpieza fueron equiparables en los dos grupos. Los ratones controles se mantuvieron en paralelo fuera de la cámara en condiciones de normoxia

2.3. Tratamiento con virus adenoasociados AAV-BR1

Se inyectaron virus adenoasociados (AAV; del inglés Adeno-Associated Viruses) con un alto tropismo por el endotelio cerebral a través de las venas laterales de la cola del ratón (5×10^{10} partículas virales por ratón). La especificidad en la infección se consiguió gracias a la presencia de una secuencia peptídica (heptámero) en la proteína de la cápside viral. (Körbelin y col. 2016). Los virus adenoasociados tienen un especial interés terapéutico puesto que son poco inmunogénicos, infectan tanto células en división como células quiescentes y logran mantener el trasgén de forma estable en la célula infectada (Kalburgi y col. 2013). En concreto, la variante AAV-BR1 constituye una herramienta terapéutica muy potente en el campo de las patologías cerebrovasculares pues permiten dirigir vectores de expresión al tejido vascular cerebral específicamente (**Figura C1**).

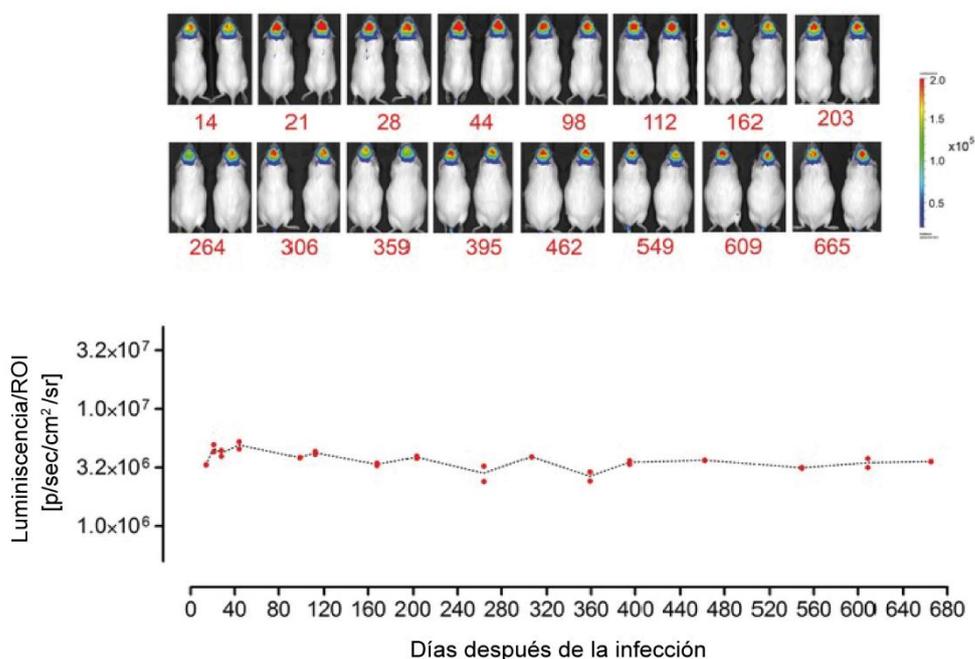


Figura C1. Expresión en cerebro del gen luciferasa mediada por el vector AAV-BR1. El vector AAV-BR1 portador del gen luciferasa regulado por la expresión del promotor CAG fue administrado por vía intravenosa (5×10^{10} partículas virales/ratón, edad 8 semanas). La expresión a largo plazo del transgén fue analizada in vivo por bioluminiscencia durante un periodo de 665 días tras la inyección, $n=2$ animales). Imágenes originales de los animales analizados (arriba) y cuantificación de luminiscencia en cerebro en las regiones de interés ROI (del inglés, Region of Interest), abajo. (Imagen tomada y modificada de Körbelin y col. 2016).

2.3.1. Síntesis de vectores basados en virus adenoasociados (AAV-BR1)

La síntesis y purificación de virus adenoasociados se realizó en el laboratorio del Prof Jakob Körbelin (Hamburgo, Alemania) y en el laboratorio del Dr. Juan Antonio Bernal en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC). Los vectores virales se obtuvieron a través del método de triple transfección usando la línea HEK 293T como células hospedadoras (Xiao y col. 1998) (**Figura C2**). La titulación viral (número de moléculas de genoma viral por ml) se determinó por RT-PCR usando los primer del promotor *CAG*.

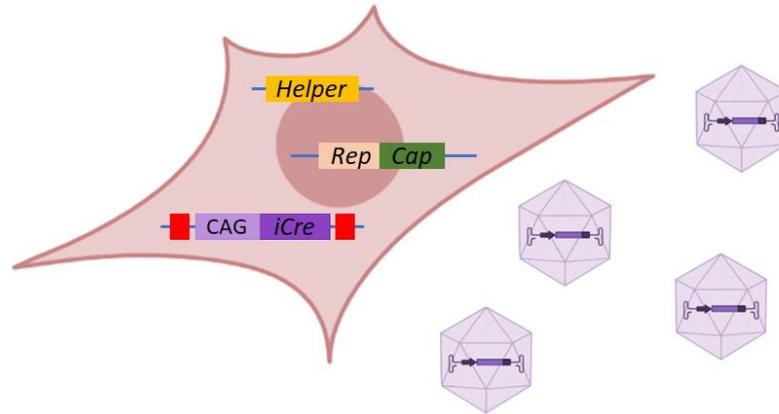


Figura C2. Método de triple transfección en células HEK293T para la obtención de virus adenoasociados AAV-BR1. Los plásmidos requeridos para la reconstrucción de virus adenoasociados en la célula hospedadora fueron: plásmido Rep/Cap (portador del heptámero BR1), plásmido helper (portador de los genes necesarios para la replicación dentro de la célula productora) y el plásmido con el cassette de expresión (*CAG-iCre*) flanqueado por regiones ITR.

2.3.2. Inyección de AAV-BR1

Para realizar la inyección viral a través de la vena de la cola, los animales se anestesiaron con 50 μ l de una mezcla de Ketanima (60 mg/kg) y xilacina (20 mg/kg) administrada por vía intraperitoneal. Una vez dormidos, se colocaron en un cepo que nos permitía inmovilizar el ratón y manipular su cola. La dilatación de la vena lateral de la cola se consiguió haciendo uso de un compresor elástico, proporcionando calor y alcohol en la zona. El volumen de inyección fue de 100 μ l por lo que, a partir del dato de titulación de cada construcción viral, se estimó el volumen necesario para suministrar al ratón el número de partículas virales adecuado (5×10^{10}) y garantizar así una concentración óptima en el órgano diana. El volumen restante hasta alcanzar los 100 μ l finales se completó con suero salino.

El tratamiento con AAV-BR1 se llevó a cabo en la línea de ratón *Psen1^{Flox/Flox}::Psen2^{-/-}*. La edad de inicio fue a los 3 meses y el tiempo transcurrido desde que tuvo lugar la inoculación hasta que se sacrificó al animal fue de 19 días en una cohorte de animales (4 tratados y 4 controles) y 2 meses en la otra cohorte (7 tratados y 5 controles). De esta manera pudimos establecer un eje temporal de los efectos derivados del tratamiento con los virus. Se usaron los siguientes vectores de expresión:

- ***CAG-iCre* (Grupo tratado):** el cDNA codifica para una versión mejorada de la enzima CRE recombinasa (*iCre*; del inglés, *Codon Improved CRE Recombinase*) que favorece su expresión en organismos eucariotas. Dicho gen se encuentra bajo el control del promotor CAG. Este plásmido fue cedido muy amablemente por el Dr Jakob Körbelin.

- **CAG-memTomatoXI (Addgene plasmid # 3735) (Grupo Control):** el cDNA codifica para la proteína fluorescente *Tomato* fusionada a una secuencia que contiene una señal de palmitoilación (5'-atgctgtgctgtatgagaagaaccaaacaggttgaaaagaatgatgaggaccaaagatc-3'), lo que le confiere a la proteína un aumento de la hidrofobicidad favoreciendo así su transporte a la membrana plasmática. Su expresión se encuentra regulada igualmente bajo el promotor CAG. Esta construcción se usó como control para validar los efectos observados en los ratones inoculados con la construcción de la CRE recombinasa.

2.3.3. Detección de la construcción inyectada mediante AAV-BR1

Tras la inyección con virus adenoasociados, la presencia del inserto en el cerebro se demostró a través de la amplificación por PCR del gen de interés. Para ello, se extrajo ADN del estriado de un hemisferio cerebral mediante una lisis con proteinasa K (ver apartado 1.4.1)

En los animales tratados, las partículas virales inoculadas expresaban la enzima CRE, por lo que para validar la inyección viral se midió el producto resultante de la actividad CRE recombinasa. Es decir, la pareja de oligos diseñada para esta reacción de PCR se encuentra flanqueando las secuencias *LoxP* entre los exones 2 y 3 del gen *Psen1*, de manera que, en ausencia de la actividad CRE, el fragmento comprendido entre ambos tiene un tamaño molecular demasiado grande como para poder amplificarse con las condiciones de reacción de la PCR, sin embargo, si la CRE escinde el fragmento comprendido entre las regiones *LoxP*, la pareja de oligos podría amplificar el fragmento que queda entre ambos y este podría observarse en un gel de agarosa (PCR de escisión) (**Figura C3**).

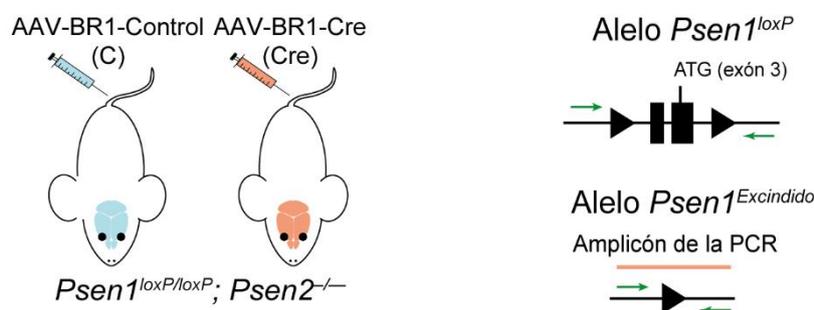


Figura C3. Diseño de oligos para detectar por PCR la delección del gen *Psen1* en los animales tratados con la enzima CRE recombinasa.

En los animales controles, la presencia del inserto se demostró mediante una PCR que amplificaba directamente la construcción *memTomatoXI*. Las condiciones de reacción y los oligos empleados en cada caso se recogen en las tablas 3 y 4 (**Tabla C3** y **Tabla C4**).

Construcción viral	PCR	Volúmenes de reacción	Programa de PCR
<i>CAG-memTomatoXI</i>	Tomato	5 µl DNA 2,5 µl Tampón (10X) 1,25 µl MgCl ₂ (50 mM) 0,5 µl dNTPs (10 mM) 0,5 µl Oligo tdTomato-F (33 µM) 0,5 µl Oligo tdTomato-R (33 µM) 0,15 µl ADN Polimerasa 14,6 µl H ₂ O mili-Qq	5' a 95 °C 35 ciclos: 30" a 95 °C 1'30" a 57 °C 2' a 72 °C 10' a 72 °C
<i>CAG-iCRE</i>	Psen1-Flox	5 µl DNA 2,5 µl Tampón (10X) 1,25 µl MgCl ₂ (50 mM) 0,5 µl dNTPs (10 mM) 0,5 µl Oligo 1-Ps1 (33 µM) 0,5 µl Oligo 2-Ps1 (33 µM) 0,5 µl Oligo 3-Ps1 (33 µM) 0,15 µl ADN Polimerasa 14,1 µl H ₂ O mili-Q	4' a 94 °C 40 ciclos: 1' a 94 °C 1' a 60 °C 1' a 72 °C 10' a 72 °C

Tabla C3. Condiciones de reacción de PCR para la detección de virus AAV-BR1 en cerebro.

PCR	Oligonucleótidos	Secuencia
Tomato	tdTomato-F	ATGCGCTTCAAGGTGCGCA
	tdTomato-R	GCCGCGCATCTTCACCTT
Psen1-Flox	1-Ps1	GGTTTCCCTCCATCTTGGTTG
	2-Ps1	TCAACTCCTCCAGAGTCAGG
	3-Ps1	TGCCCCCTCTCCATTTTCTC

Tabla C4. Oligonucleótidos usados para la detección de virus AAV-BR1 en cerebro.

3. MUESTRAS HUMANAS *POSTMORTEN*

3.1. Descripción de las muestras incluidas en el estudio

Las muestras humanas *postmortem* fueron cedidas por la Fundación CIEN (Centro de Investigación en Enfermedades Neurológicas, Madrid) y el uso de estas fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación (CEI) del Hospital Virgen del Rocío (Sevilla). En el presente estudio se incluyeron un total de 5 muestras de hipocampo pertenecientes a pacientes con EA, clasificadas en un estadio de patología Tau avanzado (Braak IV-VI) y alta carga de depósito amiloide (con valores B-C según la clasificación CERAD). Los controles usados fueron muestras de hipocampo pertenecientes a pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (ELA), pareados en sexo y edad con los anteriores, y cuyo análisis anatomopatológico no reveló ningún rasgo anatómico característico de la EA (**Tabla C5**).

SEXO	EDAD MUERTE	IPM (horas)	GRUPO	MUESTRA	DIAGNÓSTICO CLÍNICO	Braak	CERAD
V	79	4	Mixto	bcpa 212	EA	4	B
V	85	8	Mixto	bcpa 411	Demencia mixta	4	B
M	82	ND	Mixto	bcpa 395	Demencia	5	C
M	97	ND	EA	bcpa 486	Demencia	6	C
V	92	6	EA	bcpa 215	EA	6	C
M	48	8	Control	bcpa 718	ELA	1	0
V	59	6	Control	bcpa 406	ELA	0	0
V	68	7	Control	bcpa 543	ELA	0	0
M	56	2	Control	bcpa 325	ELA	0	0
M	70	7	Control	bcpa 456	ELA	3	0
M	67	ND	Control	bcpa 347	ELA	1	0

Tabla C5. Colección de muestras humanas de pacientes y controles de EA. Información recopilada en relación a las muestras humanas usadas en este trabajo (5 casos y 6 controles): sexo (varón /mujer), edad de muerte, IPM (intervalo post mortem), grupo o categoría clínica, muestra (código de la muestra), diagnóstico clínico, clasificación según el estadio Braak (1-6, siendo 6 la categoría de mayor patología) y CERAD (A, B y C).

3.2. Procesamiento de las muestras humanas *posmortem*

Las biopsias de hipocampo se procesaron según el método descrito por el grupo de la Dra. María Llorens para la detección de antígenos en muestras humanas (Flor-García y col. 2020). Para ello, se usaron muestras humanas *postmortem* que procedían de la autopsia de pacientes donantes. Un neuropatólogo se encargó de seleccionar la región anatómica de interés (hipocampo) y de emitir un informe que recogiera los valores en la escala Braak-Tau y CERAD (del inglés; *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*) obteniendo así un estadio patológico para cada muestra. A continuación, el bloque de tejido se fijó con una solución de paraformaldehído (PFA) 4% en PBS (Sigma) a 4°C durante 24h. El tiempo de fijación es un parámetro crítico a tener en cuenta en los procedimientos de detección inmunohistoquímica. Para que el tejido tenga una consistencia adecuada debe ser penetrado en su totalidad por la solución de fijación, sin embargo, cuanto mayor es el tiempo de inclusión en esta solución, la detección de determinados antígenos puede verse comprometida. Tras la fijación, el bloque de tejido se incluyó en una solución que contenía 10% sacarosa- 4% agarosa (en PBS) para darle soporte estructural al tejido y se cortó con

ayuda de un vibratomo (Leica) en secciones de 50 μ m. Las secciones se recogieron con ayuda de un pincel y se almacenaron en una solución crioprotectora que contenía glicerol a -20 $^{\circ}$ C hasta su uso (**Figura C4**).

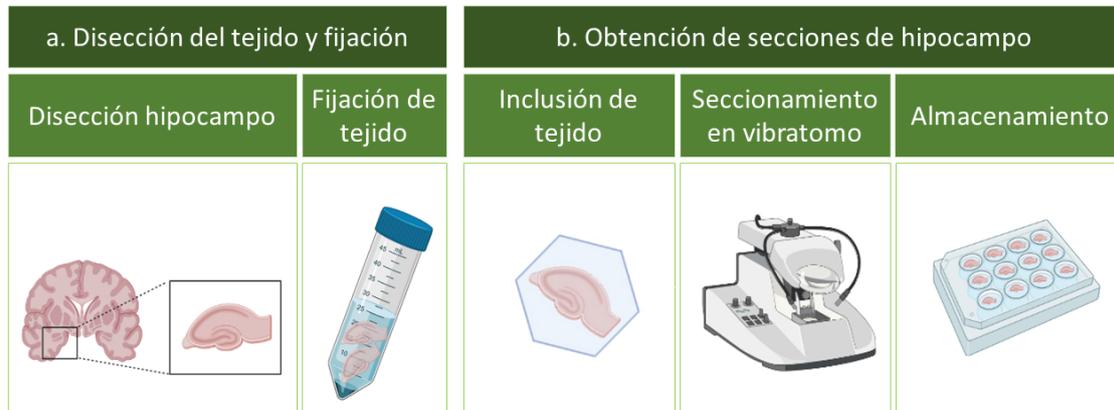


Figura C4. Flujo de trabajo en el procesamiento de las muestras humanas de pacientes y controles de EA. Figura inspirada en Flor-García y col. 2020.

3.3. Inmunohistoquímica (IHC) en muestras humanas

Para la tinción de muestras humanas se adaptó el protocolo descrito en (Wälchli y col. 2014) incluyendo algunas modificaciones. En resumen, las secciones cerebrales de hipocampo se post-fijaron durante 10 min en una solución fresca de PFA 4% en PBS. Tras ello, se llevó a cabo un tratamiento de desenmascaramiento de antígeno que constaba de tres pasos: incubación en una solución de NH_4Cl (Sigma) 50mM (en PBS) durante 30 min; incubación en una solución de glicina (Sigma) 50 mM (en PBS, pH 8) durante 5 min a 80 $^{\circ}$ C en agitación; incubación en el microondas (600W) en un *buffer* con CaCl_2 (*CaCl₂-containing buffer*) (0.1 mM CaCl_2 ; 0.1 mM MgCl_2 ; 0.1 mM MnCl en PBS pH 6.8) durante 90s. Las secciones cerebrales fueron incubadas durante 72h a 4 $^{\circ}$ C en una solución de bloqueo (CaCl_2 -containing buffer, 0.05% (v/v) Triton X-100 y 2% (v/v) de suero de cabra en PBS) con los anticuerpos primarios (anti- $\text{I}\alpha\text{v}\beta\text{3}$, Abcam, 1:50). Después de lavar las secciones con PBS, se incubó el anticuerpo secundario Alexa-568 anti-mouse (Molecular Probes, 1:500) en la solución de bloqueo. Con el objetivo de identificar los depósitos del péptido amiloide se realizó una tinción con Thioflavin-S (Sigma) (0.005% en PBS). Este reactivo tiene la capacidad de emitir fluorescencia a 488nm cuando interacciona con proteínas que tienen una conformación de lámina β , como el $\text{A}\beta$ o la proteína P-TAU que forman parte de las placas seniles o los ovillos neurofibrilares, respectivamente. Tras ello, las secciones de hipocampo fueron tratadas con un reactivo (Eliminator, Ref Merck Millipore) para eliminar la autofluorescencia del tejido provocada por los depósitos de lipofucsina en el citoplasma de las células neurales (**Figura C5**).

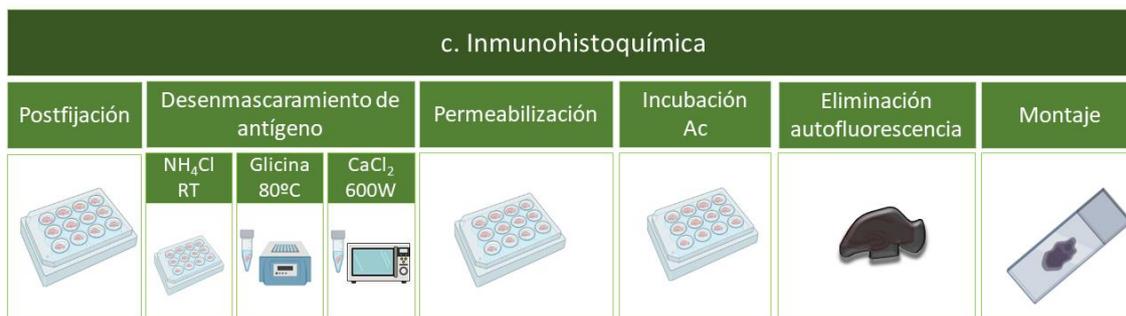


Figura C5. Flujo de trabajo durante el proceso de inmunodetección de IαVβ3 y Tio-S en hipocampo de muestras humanas. Continuación figura 5. Figura inspirada en Flor-García y col. 2020.

3.4. Adquisición de imágenes y análisis

Nuestro laboratorio, en colaboración con el laboratorio del Dr Luis María Escudero, ha desarrollado un método para cuantificar, medir y comparar la localización de las células integrina-positivas y las placas de Aβ en imágenes 2D pertenecientes a biopsias humanas de hipocampo. Esta aproximación consta de dos pasos: 1) el mapeo de las células integrina-positivas y de las placas de Aβ sobre las biopsias y 2) en el que se fija el número y la posición de cada una de las placas de Aβ y se randomiza la posición de las células integrina-positiva sobre la ROI (del inglés, *Region of interest*) (**Figura C6**). Las ROIs se definieron a partir de las muestras biológicas excluyendo artefactos derivados del plegamiento o rotura de la muestra. El flujo de trabajo que hemos seguido es el siguiente:

- **Medida experimental en las biopsias. Obtención de la *distancia mínima observada*.** A partir de cada muestra biológica, se obtuvo una imagen donde se incluían las coordenadas para cada célula integrina-positiva y para cada placa de Aβ, de manera que obtuvimos tanto el número total como la posición de ambos marcajes sobre la imagen (microscopio New Cast) (**Figura C6**). A continuación, se midió la distancia geodésica de cada célula integrina-positiva a su placa de Aβ más cercana. De esta manera, si dos marcadores se encuentran separados por un “roto”, la distancia entre ambos se calcula bordeando dicho “roto” sin llegar a atravesarlo. Con estos datos se obtuvo el valor de distancia mínima media de una célula integrina positiva a una placa de Aβ en las biopsias biológicas (*distancia mínima observada*).
- **Aleatorización de la posición de las células integrina-positivas en las biopsias. Obtención de la *distancia mínima randomizada*.** Sobre la ROI obtenida a partir de cada muestra biológica, se aleatorizó la posición del total de células integrina-positiva, manteniendo fija la posición de las placas de Aβ. Este proceso de aleatorización se repitió 500 veces. Con estos datos se obtuvo la distancia mínima

media entre una célula integrina-positiva y una placa de A β considerando entre ellas una distribución aleatoria (*distancia mínima randomizada*). Para el análisis estadístico sólo se usaron 10 simulaciones randomizadas en cada caso.

- **Comparación entre *distancia mínima observada* y *distancia mínima randomizada*.** Finalmente, se comparó la *distancia mínima observada* entre las células integrina-positivas y las placas de A β con la distancia mínima randomizada para cada muestra.

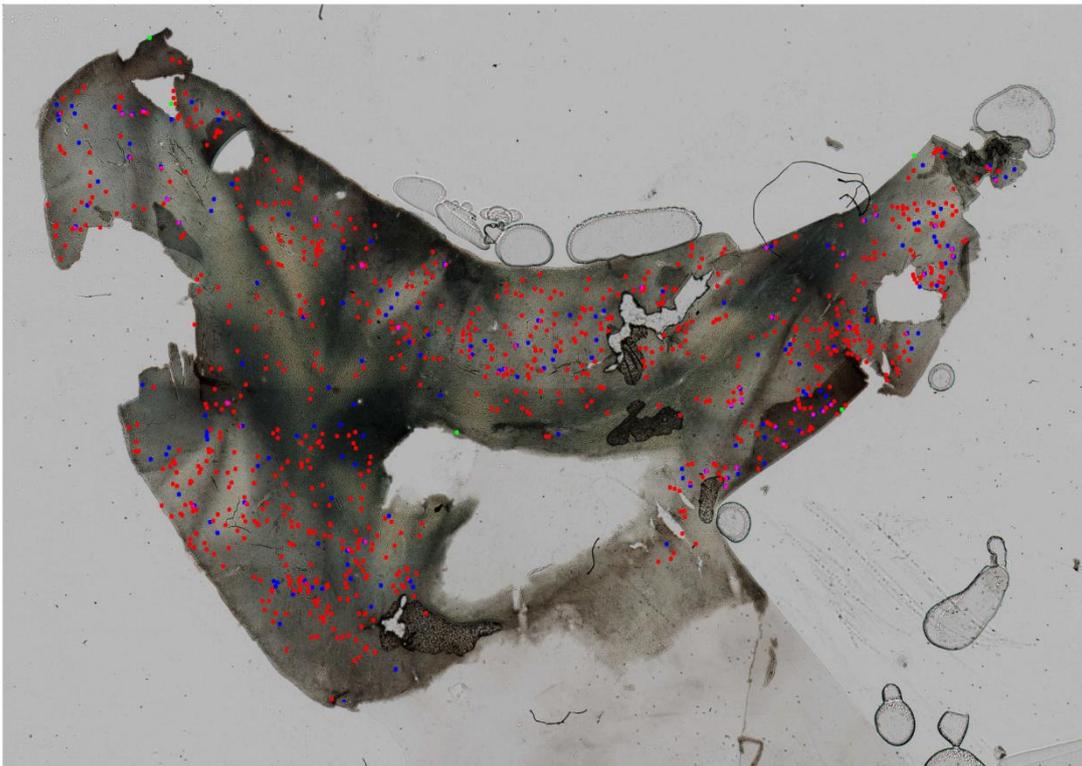


Figura C6. Obtención de las coordenadas y del número total de células I α V β 3⁺ y de placas de A β sobre cada una de las muestras humanas. Los puntos rojos destacan la presencia de células I α V β 3⁺, los azules, las placas de A β , y los puntos verdes señalan los bordes de la sección cerebral que se usaron para delimitar la ROI en cada una de las muestras.

4. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS EN MODELOS ANIMALES

En este proyecto se han llevado a cabo varias técnicas histológicas con objetivos distintos: identificación de regiones con un microambiente hipóxico (trabajo previo del laboratorio), estudios de angiografía o de perfusión vascular, estudio de marcadores asociados con la vasculatura, análisis de expresión de ARNm por *in situ* y técnicas de microscopía electrónica para estudiar depósitos proteicos localizados en la membrana basal de las células vasculares.

4.1. Inmunodetección de la perfusión vascular

4.1.1. Fundamento de la técnica

La angiografía, o estudio de la perfusión de los vasos sanguíneos, se realizó haciendo uso tanto del reactivo *Evans blue* (EB), como el marcador del precursor de glóbulos rojos TER119. El EB se une a la albúmina, una proteína plasmática presente en la sangre, por lo que todos aquellos vasos sanguíneos que sean positivos para dicho marcaje estarán perfundidos, mientras que aquellos que no lo sean, presentarán una hipoperfusión.

4.1.2. Procedimiento

Los ratones fueron anestesiados con una sobredosis de tiobarbital (Braun) y perfundidos con una inyección intracardiaca de *Evans blue* (Sigma) (6µl/g) al 2% p/v en suero salino, tal y como se describió previamente (Wälchli y col. 2014). Una vez que el animal había muerto a causa de la sobredosis, se procedía a la decapitación y a la extracción del cerebro. Seguidamente, se diseccionó el cerebro y se fijó toda la noche a 4°C en una solución de fijación (4% paraformaldehído, 0.05% glutaraldehído en PBS). Tras ello, el tejido se criopreservó en una solución con sacarosa al 30% en PBS, durante 48h y después se incluyó en OCT (Tissue-Tek) hasta formar un bloque que pudiera manipularse para cortarlo en el criostato (CM 1950, Leica). Los cerebros se cortaron en secciones coronales de 40µm de grosor y la inmunotinción se realizó con las rodajas en flotación, siguiendo el protocolo descrito por Wälchli y colaboradores (Wälchli y col. 2014). Las rodajas se post-fijaron en la solución de fijación durante 10 minutos y tras ello se realizó un tratamiento de desenmascaramiento de antígeno que constaba de tres pasos: incubación en una solución de NH₄Cl (Sigma) 50mM (en PBS) durante 30 min; incubación en una solución de glicina (Sigma) 50 mM (en PBS, pH 8) durante 5 min a 80 °C en agitación; incubación en un *buffer* que contiene CaCl₂ (*CaCl₂-containing buffer*) (0.1 mM CaCl₂; 0.1 mM MgCl₂; 0.1 mM MnCl en PBS pH 6.8) durante 3 ciclos de 30 segundos en el microondas a 600W. Posteriormente, se permeabilizaron las rodajas en una solución que contenía PBT-0,3% durante 10 min y se procedió a la incubación con el anticuerpo primario correspondiente (anti-Ter119, Invitrogen, 1:400) en la solución de bloqueo [Buffer de CaCl₂, 2% suero de cabra (v/v) (Gibco), 0,05% Tritón X-100 (v/v) (Sigma)] durante 72 horas a 4 °C en agitación. Después se realizaron 3 lavados de 10 minutos en PBS y el tejido se incubó con el anticuerpo anti-IgG rata conjugado con el fluorocromo Alexa-488 (Invitrogen, Cat.# A11034) a una concentración de 1:500 en la solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C en agitación. Tras esto se realizaron 3 lavados de 10 minutos en PBS y se marcaron los núcleos con DAPI (Sigma) a 1:1000 en PBS durante 10 minutos. Se realizaron 2 lavados de 5 minutos en PBS

y se procedió al montaje de las rodajas en portas con medio acuoso Fluoromont-G (Southern Biotech). Las imágenes fueron tomadas en el microscopio confocal Leica SP2.

4.1.3. Cuantificación

El estudio de perfusión se llevó a cabo en el modelo *APP-PSEN1/+* con EB y en el modelo *APP₇₅₁SL/+* con EB y TER119, utilizando animales de 8 meses de edad en ambos casos. También se estudió la perfusión en los ratones *Psen1^{Flox/Flox}::Psen2^{-/-}* inyectados con AAV-BR1, concretamente, en la cohorte de animales sometida a 2 meses de tratamiento.

- **Modelo *APP-PSEN1/+* y *APP₇₅₁SL/+*.** Se tomaron imágenes XY en el canal de emisión de ambos marcadores (633nm para el reactivo *Evans blue* y 488nm para el marcaje de TER119) en el confocal *Leica SP2*. Se hicieron imágenes pareadas cerca y lejos de la placa amiloide, localizando el centro geométrico de cada placa, tanto en el eje z como en el eje y (5 imágenes pareadas de 3 secciones cerebrales por ratón). Las imágenes pareadas sin placa se realizaron en las proximidades de la placa correspondiente sin variar la posición en el eje z. Se lanzó una ROI central de 50µm de radio entorno a la placa y en las imágenes pareadas sin placa, y se estimó la densidad del marcaje vascular en ambas ROIs mediante el porcentaje de área ocupada por el marcador en una imagen invertida fijando el tamaño de partícula en 1µm (**Figura C8**). En el caso de los controles, se tomaron imágenes xy de ratones C57] sin tener en cuenta los pareados, pues en este caso no existían placas de Aβ.
- **Modelo *Psen1^{Flox/Flox}::Psen2^{-/-}*.** Este modelo no acumula depósito amiloide, por tanto, el estudio de perfusión se realizó lanzando ROIs en torno a estructuras vasculares aberrantes delimitadas con el marcador IB4. Las imágenes pareadas se obtuvieron en regiones próximas a las anteriores donde se identificó el trazo de un vaso sanguíneo (5 imágenes pareadas de 3 secciones cerebrales por ratón).

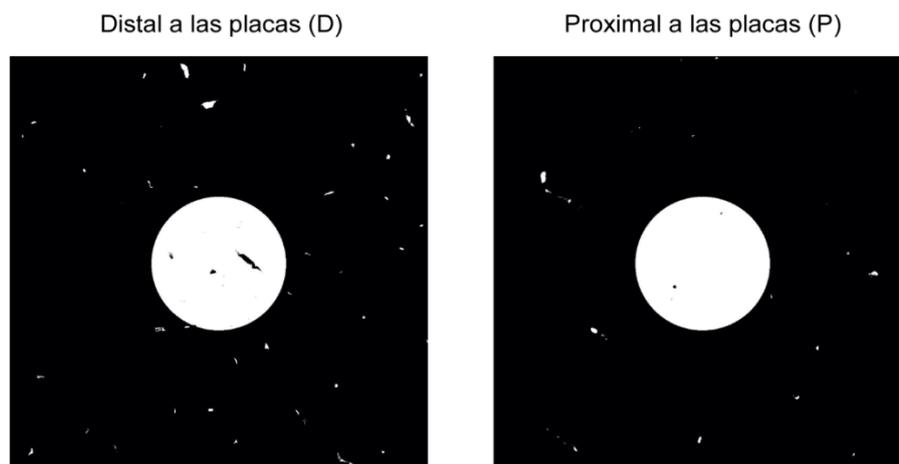


Figura C7. Imágenes obtenidas en Fiji usadas para la cuantificación de la perfusión con EB en regiones proximales y distales a placas en un ratón *APP^{751SL/+}*.

4.2. Inmunodetección de marcadores asociados con la vasculatura

4.2.1. Fundamento de la técnica

En este proyecto se han estudiado diferentes marcadores relacionados con la función vascular. Estos marcadores podrían clasificarse en: 1) marcadores de angiogénesis o célula *tip* como IB4 (*Isolectin B4*) e integrina $\alpha V\beta 3$; 2) marcadores de la unidad neurovascular (UNV) (Laminina, CD31, PDFGR β y AQP4); 3) marcadores de microglía y astrocitos (IBA1 y GFAP), que también se incluyen dentro de la UNV; 4) marcadores de fagocitosis (CD68) y; 5) marcadores de proliferación celular (Ki67).

4.2.2. Procedimiento

El procedimiento seguido es el mismo que se ha descrito para los marcadores de la perfusión vascular, con algunas modificaciones. Así, por ejemplo, para el marcador de laminina se realizó sólo el primer paso del tratamiento de desenmascaramiento del antígeno (incubación en una solución de NH_4Cl (Sigma) 50mM (en PBS) durante 30 min), con objetivo de combatir el marcaje inespecífico derivado de este marcador, mientras que para CD31, la tinción se realizó en secciones no fijadas con un grosor de 20 μm para facilitar la penetración de anticuerpo. El listado de anticuerpos usado aparece en la tabla C6 (**Tabla C6**). Posteriormente, en los casos en los que fue necesario, se incorporó el marcaje de las placas amiloides con Tio-S (Sigma) al 0,005% (ver apartado 3.3.) y los núcleos se marcaron con DAPI (Sigma, 1:1000).

ANTICUERPO	PROTEÍNA /ANTÍGENO DIANA	ESPECIE HUÉSPED	DILUCIÓN DE TRABAJO	PROVEEDOR
Anticuerpos primarios				
IαVβ3	Integrina α V β 3	Ratón	1:50	Abcam
Laminina	Glicoproteína de la matriz extracelular	Conejo	1:250	Sigma
CD31	Molécula de adhesión de células endoteliales		1:500	BD Biosciences
PDGFRβ	Receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas	Rata	1:200	Invitrogen
AQP4	Aquaporina 4	Conejo	1:5000	Sigma
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial	Ratón	1:2000	Sigma
IBA1	Molécula adaptadora de unión a calcio ionizado	Conejo	1:400	Wako
CD68	Marcador lisosomal CD68	Rata	1:100	Bio-Rad
Ki67	Marcador de proliferación celular Ki67	Conejo	1:200	Thermo Scientific
IB4	Isolectina B4	<i>Griffonia simplicifolia</i>	1:50	Sigma
Anticuerpos secundarios				
Anti Ig-G ratón	Secundario conjugado con Alexa 561	Cabra	1:800	Molecular Probes
Anti Ig-G conejo	Secundario conjugado con Alexa 488/561/647	Cabra	1:800	Molecular Probes
Streptavidina	Proteína de unión a biotina conjugada con Alexa 488/561/647	-	1:500	Jackson

Tabla C6. Relación de anticuerpos usados para la técnica de IHC.

4.2.3. Cuantificaciones

- **Marcador angiogénico IB4**

En el caso del marcador angiogénico específico de células *tip* IB4, se tomaron súper imágenes de cerebro completo en el microscopio NewCast y se determinó el área ocupada por IB4 (carga de IB4), así como el tamaño medio de partícula de este marcaje, en distintas regiones cerebrales (corteza, hipocampo y estriado) y en diferentes modelos animales: 1) ratones *APP-PSEN1/+* de 8 y 12 meses de edad 2) ratones *APP₇₅₁SL/+* de 3, 5 y 8 meses, incluidos los tratados con hiperoxia y sorafenib, y 3) ratones *Psen1^{Flox/Flox}::Psen2^{-/-}* inyectados con AAV-BR1 de 3 y 5 meses de edad (3 cortes cerebrales por ratón en cada caso).

Para ello se utilizó el programa Fiji (Schindelin y col. 2012) y se diseñaron macros que nos permitían realizar cuantificaciones automatizadas convirtiendo las imágenes a 8 bits y fijando un tamaño mínimo de detección de partícula (10 μ m) y un umbral de fluorescencia, siempre considerando la imagen de fluorescencia original.

- **Marcador angiogénico integrina α V β 3**

Se determinó la densidad de células integrina α V β 3 en regiones proximales y distales a placa en ratones *APP-PSEN1/+* de 8 meses de edad (4 controles y 4 mutantes) y en ratones *APP₇₅₁SL/+* de 8 meses de edad incluidos en el tratamiento con sorafenib (5 controles y 6 tratados). Para ello, se realizaron imágenes pareadas en zonas con y sin placa amiloide en el confocal Leica SP2 (5 imágenes pareadas de 3 secciones cerebrales por ratón) para lo que se utilizó el marcaje con Tio-S (o DAPI en su defecto). Se lanzó una ROI central de 50 μ m de radio en el centro geométrico de cada placa y en las imágenes sin placa y se determinó de forma manual el número de células integrina α V β 3 en cada caso. En los ratones mutantes (tanto en el modelo *APP₇₅₁SL/+* como en el *APP-PSEN1/+*) se observó un marcaje residual probablemente procedente de la degradación de células endoteliales que no fue considerado en la cuantificación.

- **Marcador de placas de A β (Tio-S)**

Las placas amiloides se marcaron con el reactivo tioflavina-S (Tio-S) que tiene una alta afinidad de unión por proteínas con regiones ricas en estructura de lámina beta. Las cuantificaciones de todos los marcadores vasculares siempre se hicieron en relación al marcador Tio-S. Además de estas medidas relativas, con el marcaje Tio-S se determinó tanto la carga, como el tamaño medio de partícula en distintas regiones cerebrales (corteza, hipocampo y estriado) y en diferentes modelos animales: 1) ratones *APP-PSEN1/+* de 8 y

12 meses de edad y 2) ratones *APP₇₅₁SL/+* de 3, 5 y 8 meses, incluidos los tratados con hiperoxia y sorafenib (3 secciones cerebrales por ratón en cada caso).

La cuantificación se realizó de igual manera que para el marcador IB4, fijando, en este caso, el tamaño mínimo de partícula en 1 μm .

- **Marcadores de la unidad neurovascular (UNV)**

Para los marcadores de la UNV (Laminina, CD31, PDGFR β y AQP4) se tomaron imágenes XY en el confocal *Leica SP2* de diferentes modelos animales: 1) ratones *APP-PSEN1/+* de 8 y 12 meses de edad, 2) ratones *APP₇₅₁SL/+* de 8 meses de edad y 3) ratones *Psen1^{Flox/Flox}::Psen2^{-/-}* tratados con AAV-BR1-CRE de 5 meses de edad (7 tratados y 5 controles).

- a) **Modelo *APP-PSEN1/+* y *APP₇₅₁SL/+*.**

En el caso de los modelos murinos con depósito de A β , se hicieron imágenes pareadas (con y sin placa amiloide), tal y como se describió para el marcador EB, TER119 o integrina $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ (5 imágenes pareadas de 3 secciones cerebrales por ratón). Para ello se utilizó el programa Fiji (Schindelin y col. 2012) y se crearon macros que automatizaron la cuantificación. Se lanzó una ROI central de 50 μm de radio entorno a la placa y en las imágenes pareadas sin placa y se estimó la densidad del marcaje vascular en las ROIs proximales y distales (ver apartado 4.1.3.). En los animales controles, se tomaron imágenes xy de ratones C57J sin tener en cuenta los pareados.

- b) **Modelo *Psen1^{Flox/Flox}::Psen2^{-/-}*.**

El estudio de los marcadores vasculares se realizó fijando la estructura vascular delimitada con IB4 (en lugar de la placa amiloide) y la densidad de los diferentes marcajes se obtuvo a partir de dicha ROI. Las imágenes pareadas se obtuvieron en regiones próximas a las anteriores donde se identificó el trazado de un vaso sanguíneo (5 imágenes pareadas de 3 secciones cerebrales por ratón).

- **Marcadores de astrocitos y microglía**

IBA1 (del inglés, *Ionized calcium-Binding Adapter molecule 1*) y GFAP (del inglés, *Glial Fibrillary Acidic Protein*) se usaron como marcadores de microglía y astrocitos, respectivamente.

- a) ***In situ* para *Hif1a*** (ver apartado 4.3.3.)

- b) ***In situ* para *Vegf*** (ver apartado 4.3.3.)

- c) **Interacción entre la microglía y los vasos sanguíneos en el modelo *tdTomato*.** Para medir el nivel de interacción de la microglía con los vasos

sanguíneos, se realizaron imágenes pareadas (con y sin placa amiloide) en el eje xy utilizando el confocal *Leica SP2* (5 imágenes pareadas de 3 secciones cerebrales por ratón; $n= 3$). En ambos casos, se midió la longitud total de cada uno de los vasos identificados y la longitud del vaso cubierta por microglía. El resultado supone un porcentaje del grado de interacción entre la microglía y el vaso en regiones proximales y distales a las placas.

- **Marcadores de fagocitosis**

Para estudiar la fagocitosis de estructuras vasculares por parte de la microglía se utilizó, por un lado, el modelo genético *tdTomato*, que marca los vasos sanguíneos en rojo, y por otro, el marcador CD68, una proteína localizada en la membrana plasmática de los lisosomas (3 animales mutantes). La cuantificación se realizó de forma manual, contando cada uno de estos puntos discretos y aislados *tdTomato*⁺ presentes en el citoplasma de la microglía (bolsillos fagocíticos o, en inglés, *pouches*) (Sierra y col. 2010) en las regiones cercanas a placa. Finalmente, se colocalizó este marcador con CD68 y se estimó el porcentaje de bolsillos fagocíticos que son positivos para el marcador de fagocitosis CD68.

- **Marcadores de proliferación**

El estudio de proliferación se llevó a cabo en los animales *Psen1^{Flox/Flox}::Psen2^{-/-}* de 5 meses de edad tratados con los virus AAV-BR1-CRE mediante el marcaje Ki67 (10 estructuras vasculares de 3 secciones cerebrales por ratón, 5 animales tratados). La cuantificación se realizó de forma manual localizando núcleos Ki67 positivos dentro de la estructura vascular anómala marcada con IB4 en los ratones tratados con la CRE.

4.3. Hibridación *in situ* combinada con inmunofluorescencia

4.3.1. Fundamento de la técnica

La hibridación *in situ* (ISH) consiste en la detección de moléculas de material genético, en este caso de ARNm, mediante la unión de sondas con una secuencia complementaria que están ligadas, o bien a un cromógeno, o bien a una molécula fluorescente. El kit RNAscope® 2.5 HD BROWN utiliza un sistema de detección basado en una amplificación patentada y consta de los siguientes pasos: i) fijación de la muestra y permeabilización de las células; ii) hibridación con la sonda complementaria; iii) amplificación y; iv) reacción de revelado con DAB (**Figura C8**).

Las sondas tienen una estructura en forma de Z con tres regiones: región inferior, que hibrida directamente con el ARNm, una región espaciadora y una región superior con una secuencia que será reconocida por el preamplificador. El preamplificador sólo se unirá a

una secuencia de 28 bases que resultará de la unión de dos sondas Z que hayan hibridado en paralelo. Este sistema garantiza la especificidad de la señal, pues con la unión de una única sonda aumentaría la probabilidad de detectar regiones inespecíficas de otros ARNm. Tras ello, los amplificadores se unen en las regiones de unión libres del preamplificador lo que supone un aumento considerable de la señal (Wang y col. 2012).

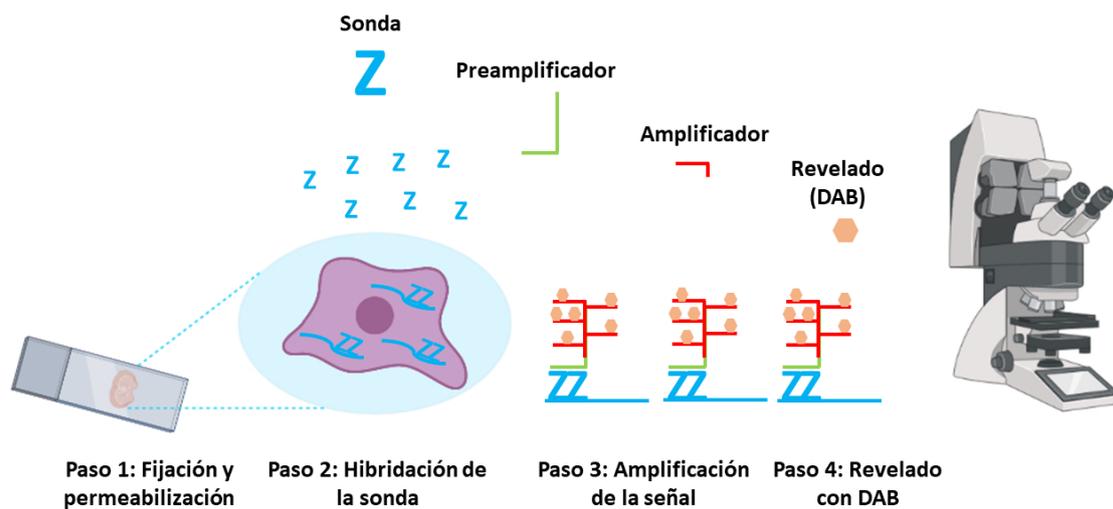


Figura C8. Esquema representativo del protocolo de ISH. En un primer paso, el tejido se fija y se permeabilizan las células para permitir el acceso de la sonda de ARN al gen de interés. En segundo lugar, las sondas de oligonucleótidos (representadas como "Z") se hibridan en parejas ("ZZ") al ARN del gen de interés, y posteriormente, durante el tercer paso, se lleva a cabo la hibridación de diferentes moléculas que amplifican la señal (preamplificadores y amplificadores), y que se unen de forma específica a la sonda utilizada en el paso 2. Finalmente, durante la cuarta etapa se procede al revelado con DAB. Figura inspirada en Wang y col. 2012.

4.3.2. Procedimiento

Los cerebros fueron extraídos y procesados tal y como se ha descrito con los marcajes anteriores (ver apartado 4.1.2.). En este caso, el tejido se cortó en secciones coronales de 20 μm de grosor utilizando un criostato (Leica) y los cortes se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Para detectar las moléculas de ARNm de *Hif1a*, *Vegfa*, *Psen1* y *Plaur*, se usó el kit de detección (marrón) de RNAscope® 2.5 HD (ACD) con las sondas de *Hif1a* (ACD, Cat.# 313821), *Vegfa* (ACD, Cat.# 43691), *Psen1* (ACD, Cat.# 451011) y *Plaur* (ACD, Cat.# 48731) y se siguieron las instrucciones del fabricante para tejido congelado, usando para ello un horno de HybEZ (ACD). Los cortes se lavaron durante 5 minutos en PBS tras lo cual se neutralizó la peroxidasa endógena mediante la adición de 3 gotas por corte de peróxido de hidrógeno al 3% (ACD) durante 10 minutos. Se lavó con H_2O destilada y se procedió al

desenmascaramiento antigénico con la incubación de los cortes durante 5 minutos en la solución Target retrieval (ACD) a una temperatura constante de 100 °C, después se lavó con H₂O destilada y luego con etanol 100%, tras lo cual se dejó secar y se dibujó una barrera con el rotulador hidrofóbico Immedge (ACD) alrededor de cada sección.

Una vez seco, se añadió a cada sección una gota de Protease Plus (ACD) y se incubaron en el horno a 40 °C durante 30 minutos, tras lo cual se realizaron 2 lavados en H₂O destilada. Después se añadió una gota de la sonda correspondiente, *Hif1a*, *Vegfa*, *Psen1*, *Plaur* y *Angpt2*, previamente calentada y se incubaron en el horno a 40 °C durante 2 horas, tras lo cual se realizaron 2 lavados en solución Wash buffer (ACD) y se dejaron durante toda la noche en solución de citrato de sodio salino a concentración 5x y pH 7 [NaCl 0.75 M (Sigma), citrato sódico dihidratado 75 mM (Sigma)].

A continuación se realizaron 2 lavados de 2 minutos en solución Wash buffer (ACD) y se procedió a la amplificación de la señal añadiendo 1 gota de los siguientes compuestos e incubando durante el tiempo indicado según el siguiente protocolo: Amp 1 (ACD) 30 minutos a 40 °C, Amp 2 (ACD) 15 minutos a 40 °C, Amp 3 (ACD) 30 minutos a 40 °C, Amp 4 (ACD) 15 minutos a 40 °C, Amp 5 (ACD) 30 minutos a temperatura ambiente para las sondas de *Hif1a* y *Vegfa* y 40 minutos para la sonda de *Egln3* y Amp 6 (ACD) 15 minutos a temperatura ambiente. Entre cada incubación se realizaron 2 lavados de 2 minutos en Wash buffer.

Se mezcló igual volumen de las soluciones BROWN-A y BROWN-B (ACD), se añadió 30 µl de la mezcla a cada corte y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente para la sonda *Hif1a*, 3 minutos para la sonda de *Vegfa* y 15 minutos para la sonda de *Egln3*, tras lo que se lavaron los cortes con PBS y se incubaron durante 10 minutos en solución PBT-0.3%. Posteriormente se lavaron con PBS y se incubaron con los anticuerpos primarios anti-IBA1 (Wako; Cat# 019-19741) a 1:100 y anti-GFAP (Sigma; Cat# G3893) a 1:400 o con la lectina biotilada IB4 (Sigma) a 1:10 en PBT-0.05% con suero de cabra al 2% (v/v) (Gibco) durante toda la noche a 4 °C. Tras la incubación se realizaron 3 lavados de 5 minutos en PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-IgG conejo conjugado con el fluorocromo Alexa-488 o 647 (Invitrogen, Cat.# A11034), anti-IgG ratón conjugado con el fluorocromo Alexa-647 (Jackson Immuno Research, Cat.# 115-605-146) o con la estreptavidina conjugada con Alexa-561, durante 1 hora a temperatura ambiente en la misma solución que los anticuerpos primarios. En los casos correspondientes se realizó la tinción con Tio-S (Sigma) al 0.005% (p/v) en PBS (apartado 1.4.2.). A continuación, se marcaron los núcleos con DAPI (Sigma) a 1:1000 en PBS y se procedió a su montaje en el medio acuoso

Fluoromont-G (Southern Biotech). Las imágenes fueron tomadas en el microscopio confocal Leica SP2.

4.3.3. Cuantificaciones

- ***Hif1a***

La cuantificación se realizó en el modelo *APP-PSEN1/+* ($n= 4$ ratones de 8 meses de edad). Se tomaron imágenes pareadas XY (con y sin placa amiloide) en el confocal Leica *SP2* combinando la señal de fluorescencia con el marcaje IBA1 y campo claro. Se lanzó una ROI central de $50\mu\text{m}$ de radio en el centro geométrico de cada placa y en las imágenes pareadas sin placas. En este caso se determinó el número de células IBA1 (microglía) que eran positivas para la señal del ARNm de *Hif1a* en individuos controles y en regiones proximales y distales a placas de los ratones mutantes.

- ***Vegf***

El número promedio de células IBA1 y GFAP positivas por placa para *Vegf* se realizó de forma manual partiendo de imágenes xy obtenidas en el confocal *Leica SP2* (25 placas de 5 animales *APP-PSEN1/+*).

- ***Plaur***

La cuantificación de *Plaur* se llevó a cabo en el modelo *APP₇₅₁SL/+* ($n=3$ ratones de 8 meses de edad). Se tomaron imágenes pareadas XY (con y sin placa amiloide) en el confocal Leica *SP2* combinando la señal de fluorescencia y campo claro. Se lanzó una ROI central de $50\mu\text{m}$ de radio en el centro geométrico de cada placa y se cuantificó el depósito de DAB procedente del marcaje de *Plaur*. En los pareados sin placa amiloide se cuantificó el campo completo. En el caso de los controles, se tomaron imágenes XY de ratones C57J sin tener en cuenta los pareados. Se invirtió la imagen y se obtuvo la densidad de marcaje en los animales controles y en las regiones proximales y distales a placa en los animales mutantes.

- ***Psen1***

La cuantificación se realizó en los ratones *Psen1^{Flox/Flox}::Psen2^{-/-}* de 3 meses de edad tratados con AAV-BR1 y sacrificados 19 días después de ser inoculados ($n=4$ ratones). Se hicieron dos aproximaciones distintas:

- Cuantificación de *Psen1* en el parénquima completo de corteza y estriado.** En este caso la cuantificación se realizó de forma automatizada con ayuda del software Fiji. Se delimitaron las regiones de corteza y estriado completo, la imagen se convirtió a 8 bits y, posteriormente, se invirtió. Se estimó la densidad mediante el porcentaje de área ocupada para el marcador *Psen1*.
- Cuantificación de *Psen1* en vasos sanguíneos presentes en corteza y estriado.** En primer lugar, se identificaron los vasos sanguíneos presentes en corteza o

estriado, y después, se cuantificó de forma manual el número de foci o puntos positivos para el ARNm de *Psen1* en estos vasos. (no me cuadra con la gráfica).

4.4. Microscopía electrónica

La microscopía electrónica se realizó en colaboración con el grupo de la Dra. Antonia Gutiérrez (Universidad de Málaga). Se obtuvieron secciones de 50 µm del hipocampo de animales *APP-PSEN1/+* (fijadas con 4% PFA/75 mM lisina/10 mM metaperiodato de sodio), se criopreservaron en una solución que contenía 25% de sacarosa 10% glicerol y se congelaron a -80°C para aumentar la eficiencia de unión de la lectina IB4. A continuación, las secciones fueron incubadas con IB4 biotilada (Sigma) a 1:100 y, tras ello, se añadió la estreptavidina conjugada con partículas de oro 1.4 nm (1:100, Nanoprobes, Yaphank, NY). Estas secciones fueron postfijadas en glutraldehído al 2% y después se lavaron en una solución de 50mM de citrato de sodio. Posteriormente las secciones se fijaron en tetróxido de osmio al 2% (Electron Microscopic Science), se tiñieron con acetato de uranilo y se embebieron en Araldite (EMS, EE.UU) Por último, las áreas seleccionadas se cortaron en secciones ultrafinas y se examinaron con un microscopio electrónico (JEOL JEM 1400).

5. CLARIFICACIÓN DEL CEREBRO MEDIANTE LA TÉCNICA DE iDISCO

5.1. Fundamento de la técnica

Las técnicas de histología clásicas sólo aportan información de secciones muy finas de tejido debido a que la luz tiene una capacidad de penetración muy baja por sus propiedades de dispersión. Sin embargo, para poder estudiar estructuras biológicas que tengan un grosor determinado, como sería el caso de una red vascular, sería necesario analizar secciones más amplias de tejido, o incluso, el órgano completo. Para hacer frente a esta limitación, en los últimos años se han descrito numerosas técnicas de clarificación que consiguen obtener imágenes en 3D de órganos transparentes previamente inmunotiquetados (Du y col. 2018).

En este trabajo, se llevó a cabo una clarificación de cerebro siguiendo la técnica de iDISCO (del inglés, *3D Imaging of Solvent Cleared Organs*) (Ertürk y col. 2012; Renier y col. 2014). Este procedimiento se basa en el uso de solventes orgánicos que, por un lado, elimina los componentes lipídicos del tejido cerebral sin alterar la estructura de proteínas, y por otro, homogeniza los índices de refracción de las diferentes capas celulares para favorecer así la penetración de la luz.

5.2. Procedimiento

En este caso se siguió el protocolo descrito por Renier y colaboradores (Renier y col. 2014) aunque se incluyeron algunas modificaciones. Se extrajo el cerebro de ratones silvestres (C57J) y *APP-PSEN1/+* de 8 meses de edad perfundidos inicialmente con una solución de PBS-*Evans blue* (6ul/g) y, tras ello, con una solución fijadora (4% PFA- 0,05% gluradaldehído en PBS). Las muestras no fueron tratadas con metanol para preservar la tinción con el marcador IB4. El proceso de clarificación consta de 4 etapas: 1) fijación, 2) permeabilización y eliminación de componentes lipídicos (incubación a 37°C), 3) inmunodetección (incubación a 37°C), 4) homogenización de los índices de refracción y clarificación del cerebro (**Figura C9**).

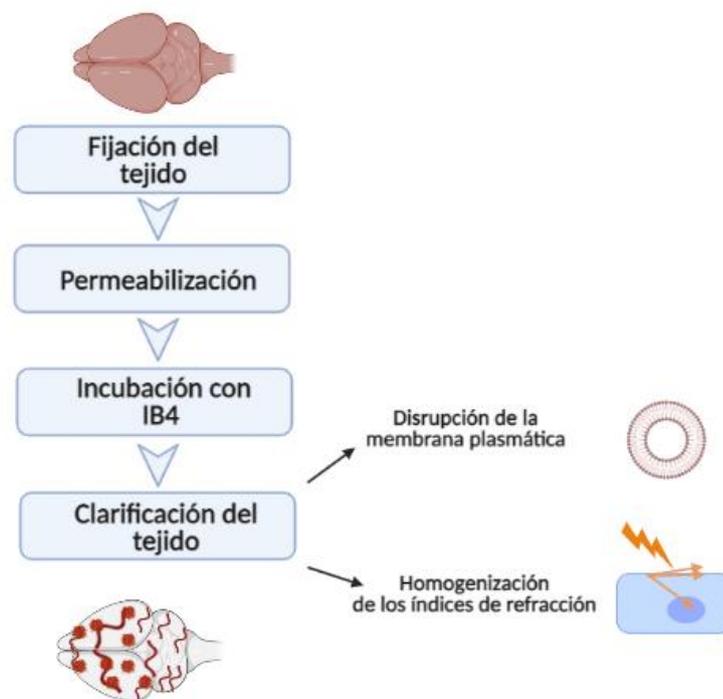


Figura C9. Esquema representativo del flujo de trabajo durante el proceso de clarificación de cerebro mediante la técnica de iDISCO.

La incubación con la lectina IB4 (1:50) se realizó en *CaCl₂-containing buffer* durante 3 días a 37°C para favorecer la tinción de los filopodios y células endoteliales. Tras ello, se incubó la estreptavidina conjugada con Cy3 (1:500) durante 3 días a 37°C. Todas las soluciones de incubación incluían azida al 0,02% para evitar posibles contaminaciones. Para el marcaje nuclear se usó DAPI (1:1000 en PBS-0,2% Tween-20; 10 µg/ml heparina). Finalmente, para la clarificación del cerebro, las muestras se incubaron durante toda la noche con 10 ml de una solución de tetrahydrofuran-H₂O (THF; SIGMA) al 50% (en agua destilada) y, tras ello, se hicieron lavados secuenciales de 1h cada uno de concentraciones crecientes de THF (80% y 100%). A continuación, la muestra se incluyó en otro solvente

orgánico, diclorometano (Sigma) hasta que se hundió en el fondo del vial. Por último, las muestras se incluyeron en 18ml de dibenzyl ether (DBE, Sigma) donde se clarificaron por completo en un tiempo máximo de 2h y se incubaron a temperatura ambiente.

5.3. Adquisición de imágenes

La obtención de imágenes en 3D de cerebros clarificados se realizó íntegramente en el laboratorio de la Dra. Eloisa Herrera (universidad Miguel Hernández, Alicante) con un microscopio bidireccional *light sheet* (Ultramicroscope II, LaVision BioTec), controlado por el software InspectorPro (LaVision BioTec), con un estereomicroscopio (MVX10, Olympus, Japón) equipado con un objetivo 2x (MVPLAPO, Olimpo). Las imágenes se adquirieron utilizando una cámara Neo sCMOS (Andor, Oxford Instruments) con un aumento de 0,8x, 1,6x y 6,3x, con el tejido sumergido en etil cinamato. El fluoróforo Cy3 al que se conjugó la estreptavidina se excitó con un láser de 561 nm y su emisión se recogió con un filtro BP 620/60. La apertura numérica (NA) del microscopio se estableció en 0,078, por lo que el tamaño del paso se fijó en 2 μ m. Para crear los vídeos con imágenes tridimensionales se utilizó el software Imaris (Bitplane, <http://www.bitplane.com/imaris/imaris>).

6. AISLAMIENTO DE CÉLULAS ENDOTELIALES CEREBRALES MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

El método utilizado para aislar células endoteliales de la corteza cerebral en ratones adultos fue una modificación del procedimiento seguido por Orre y colaboradores (Orre y col. 2014) para aislar células microgliales. Los ratones (3 animales C57) y 3 animales *APP-PSEN1/+* de 18 meses de edad) se anestesiaron y se les realizó perfusión intracardiaca con PBS (Gibco) seguida de HBSS (-CaCl₂/-MgCl₂) (Gibco). Se extrajo el cerebro y se aisló la corteza bajo lupa SZX16 (Olympus), el tejido se disoció con un Tissue Chopper (Vibratome 800 series). Tras la digestión mecánica, se realizó una digestión química con papaína (Worthington), a una concentración final de 8 U/ml, y DNasa I (Sigma) a una concentración final de 80 unidades Kunitz/ml en un buffer tamponado con PIPES [EDTA 1,1 mM (Bio-Rad), L-Cisteína 5,5 mM (Sigma), glucosa 0,41% (v/v) (Sigma), NaCl 112,5 mM (Sigma), KCl 4,5 mM (Sigma), NaOH 36 mM (Sigma) y PIPES 18 mM (Sigma), a pH 7,4]. Con esta solución se incubó el tejido durante 50 minutos a 37 °C en un agitador de noria. Tras este tiempo se añadió 25 unidades Kunitz/ml de DNasa I en medio MEM (Gibco) suplementado con albúmina de suero bovino (BSA; del inglés, *Bovine Serum Albumin*) (AppliChem) al 0,5% (p/v), y se incubó durante 15 minutos más. La suspensión de células obtenidas tras la digestión enzimática se centrifugó y el pellet se disgregó con ayuda de una pipeta en el medio MEM suplementado con BSA hasta obtener una suspensión de células, que se filtró

con un filtro de nylon de 70 μm de poro (BD) para eliminar fragmentos de tejido no disgregado.

La suspensión de célula única obtenida tras el filtrado se resuspendió en una solución que contenía MEM con BSA y se depositó cuidadosamente sobre Percoll (GE healthcare) al 90% (v/v) preparado en PBS 10x [NaCl 1,4 M (Sigma), KCl 27 mM (Sigma), Na₂HPO₄ 100 mM (Sigma), KH₂PO₄ (Sigma) a pH 7,4], para generar un gradiente. A continuación, mediante centrifugación obtuvieron 3 fases, una fase superior que contenía restos celulares y se descartó, y las fases intermedia e inferior que contenían la mielina y las células, respectivamente. Las dos últimas fases se recogieron y se diluyeron en 5 veces su volumen usando el medio MEM suplementado con BSA. Tras centrifugación el pellet de células se resuspendió en medio GKN [NaCl 136,89 mM (Sigma), KCl 5,37 mM (Sigma), Na₂HPO₄ 10 mM (Sigma), NaH₂PO₄.H₂O 5 mM (Sigma), D-(1)-glucosa 11,10 mM (Sigma) y BSA al 0,5% (p/v) a pH 7,4] y se procedió al aislamiento específico de las células endoteliales por citometría mediante FACS (del inglés, *Fluorescence-Activated Cell Sorting*).

Para ello se incubó la suspensión celular con los anticuerpos primarios monoclonales conjugados anti-CD11b-APC (eBioscience, Cat.# 17-0112) y anti-CD31-PE (eBioscience; Cat.# 12-0451) a una dilución 1:200 en PBS (Gibco) con BSA (AppliChem) al 0,5% (p/v) durante 30 minutos a 4 °C. Como control negativo se tiñeron las células con el isotipo control-APC (eBioscience, Cat.# 17-4031) y el isotipo control-PE (eBioscience, Cat.# 12-4031) a una dilución 1:200 en la misma solución. Tanto las muestras control como las muestras experimentales se incubaron con el anticuerpo bloqueador anti-CD16 /CD32 (BD, Cat.# 553142) a dilución 1:200 simultáneamente con los anticuerpos correspondientes. La viabilidad celular se midió con 7AAD (BD bioscience). Las células se separaron usando el citómetro de flujo FACS Aria Fusion (Becton Dickinson) y los datos adquiridos fueron analizados con el software de FACSDiva 8.0 (Becton Dickinson). La estrategia de selección de las poblaciones y el análisis de datos se hicieron de acuerdo con directrices e informes anteriores (Herzenberg y col. 2006; Orre y col. 2014). Las células muertas y los residuos de desecho de la suspensión fueron descartados a través de los valores obtenidos en los ejes FSC y SSC (del inglés, *Forward and Side Scatter Pattern*). Los ejes FSC-A (del inglés, *Forward Scatter Area*) y FSC-H (del inglés, *Forward Scatter Height*) fueron usados para seleccionar sólo células individuales, descartando los dobletes. Las células endoteliales fueron positivas para el marcador CD31 y negativas para CD11b. Los porcentajes obtenidos son relativos al total de células únicas aisladas.

7. EXTRACCIÓN DE ARN Y qRT-PCR

7.1. Extracción de ARN

En este estudio, el ARN procedía o bien de muestras de hemicorteza, o bien de células endoteliales cerebrales aisladas por FACS, y en ambos casos fue extraído usando el reactivo TRIzol™ (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El proceso de extracción se llevó a cabo con puntas con filtro y en un entorno limpio de ARNasas.

7.1.1. Muestras de corteza

Se obtuvieron muestras de corteza del hemisferio derecho a partir de ratones del modelo genético *APP-PSEN1/+* (6 y 12 meses de edad; 4 controles y 4 mutantes a 6 meses y 6 ratones controles y 6 mutantes a 12 meses de edad). Los animales se perfundieron con PBS con flujo constante durante 4 minutos. Se extrajo el cerebro y se diseccionaron las diferentes regiones anatómicas (corteza, hipocampo y estriado) bajo la lupa SZX16 (Olympus) en solución con PBS y sobre hielo. Tras la disección, las muestras se congelaron en criotubos libres de ARNasas en nitrógeno líquido y, posteriormente, se almacenaron a -80°C.

Para la extracción del ARN se pasó el tejido a microtubos con cierre de seguridad (Safe Lock, Eppendorf), se añadieron 200 µl iniciales de reactivo TRIzol para las muestras de corteza, y el mismo volumen de microbolas de vidrio de 0,5 µm de diámetro (GB05, Next Advanced Inc.) que de tejido inicial. Todo ello se llevó a cabo manteniendo las muestras en hielo. Tras sellar con parafilm los tubos, se introdujeron en el homogeneizador Bullet Blender™ (Next Advance Inc., Averill Park, NY) y se sometieron a 3 minutos de homogenización a velocidad 8 en la cámara fría. Posteriormente, se añadieron 500 µl más de TRIzol y se continuó con el protocolo. Se incubaron las muestras durante 5 minutos a temperatura ambiente y tras ello se añadió la cantidad de cloroformo (Sigma) necesaria según el volumen inicial de TRIzol en cada caso. Las muestras se agitaron y se incubaron durante 3 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se centrifugaron a 4 °C. Esta centrifugación separó el contenido en 3 fases, una fase superior acuosa donde se encontraba el ARN, una interfase blanca donde se encontraba el ADN y una fase inferior roja de fenol-cloroformo donde se encontraban las proteínas. La fase donde se encontraba el ARN se recogió y se puso en un microtubo al que se le añadió isopropanol (Sigma), según el volumen de TRIzol de partida. Después se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron. El pellet de ARN se lavó con el mismo volumen de etanol (Merk) al 70% que de TRIzol y se volvió a centrifugar. El precipitado de ARN se resuspendió en 200 µl de H₂O libre de nucleasas (Promega). Las muestras se almacenaron a -80 °C al menos durante una noche antes de proceder a su retrotranscripción, para asegurar su total resuspensión.

7.1.2. Células endoteliales aisladas por FACS

Las células endoteliales aisladas por FACS fueron precipitadas con una centrifugación de 2400 g durante 5 minutos a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y se añadió 500 µl de TRIzol. El protocolo seguido fue el mismo que para la extracción en corteza, pero escalando las cantidades de cada reactivo en función del volumen inicial usado de TRIzol. Otra salvedad es que, en este caso, la incubación con isopropanol se realizó durante toda la noche a -20°C e incluía glicógeno (Roche) al 0,1% (v/v) para ayudar a precipitar el ARN. El pellet de ARN se resuspendió en 10 µl de H₂O libre de nucleasas (Promega) y se almacenó a -80 °C al menos durante una noche para asegurar su total resuspensión, antes de proceder a su amplificación.

7.2. qRT-PCR

7.2.1. Tratamiento con DNasa y retrotranscripción

Antes de la retrotranscripción del ARN, se realizó un tratamiento con DNasa, una enzima encargada de eliminar el ADN genómico contaminante.

El ARN se cuantificó en Nanodrop 2000 (Thermo Scientific), y se trataron, 750 ng con el kit PerfeCTa® DNase I (Quanta Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se añadió al ARN 1,45 µl de 10x Reaction buffer (Quanta Bioscience) y 1 µl de DNase I (2 U/µl) (Quanta Bioscience) en un volumen final de reacción de 14,55 µl y se incubó la mezcla en el termociclador Professional Trio (Biometra) a 37 °C durante 30 minutos. La reacción se paró mediante la adición de 1,45 µl de 10x Stop buffer (Quanta Bioscience) y su incubación durante 10 minutos a 65 °C. La inactivación de la enzima es crucial antes de la síntesis de cDNA, pues la presencia de DNasa podría alterar los niveles de expresión de la reacción de RT-PCR.

La reacción de retrotranscripción se encarga de sintetizar la primera hebra de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN, para ello se utilizó la enzima retrotranscriptasa qScript™ cDNA Super Mix (Quanta Biosciences). Se añadió 4 µl de esta enzima a los 16 µl de reacción finales del tratamiento con DNasa. La síntesis de la hebra de ADNc se llevó a cabo en el termociclador Professional Trio (Biometra), y las condiciones utilizadas fueron: 5 minutos a 25 °C, 30 minutos a 42 °C, 5 minutos a 85 °C. El ADNc resultante se almacenó a -20 °C y se procuró congelar y descongelar el menor número de veces posibles.

7.2.2. RT-PCR

Para medir los niveles de expresión de ARNm de todos los genes del estudio (**tabla C7**), se recurrió a la técnica de RT-PCR (del inglés, *Real Time-Polymerase Chain Reaction*). En todos los casos se usó como indicador de fluorescencia *Sybr Green* (Applied Biosystems), una

molécula que se une al surco menor de la doble hélice de ADN y emite fluorescencia. El diseño de los oligos se realizó con ayuda del software Primer Express 2.0 (Applied Biosystems). La reacción tenía un volumen final de 20 μ L e incluía: 0,5 μ L de ADNc molde, 3,33 μ L de oligonucleótido forward 2 Mm (Sigma), 3,33 μ L de oligonucleótido reverse 2 mM (Sigma), 10 μ L de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) y 2,84 μ L de H₂O libre de nucleasas (Promega). Una vez mezcladas, las reacciones se cargaron en una placa de 96 pocillos Fast Optical de 0,1 mL (Applied Biosystems) que se selló con un adhesivo óptico Optical Adhesive Film (Applied Biosystems) y posteriormente se centrifugó durante 1 minuto a 1500 rpm.

La RT-PCR se llevó a cabo en el termociclador ViiA7 (Applied Biosystems) y se siguió el siguiente programa de amplificación: 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C, 45 ciclos de 15 segundos a 95 °C (desnaturalización) y 1 minuto a 60 °C (hibridación y elongación), tras los cuales las muestras fueron expuestas 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C y 15 segundos a 95 °C. Este último ciclo en el que la temperatura sube progresivamente desde los 60 a los 95°C nos permite conocer la temperatura de disociación o de *melting* (T_m) del fragmento amplificado. La comparación entre la T_m obtenida y la T_m esperada para el amplicón nos da una idea de la especificidad en la amplificación. Mediante el método del Δ CT (Livak & Schmittgen, 2001) se compararon los niveles de expresión de diferentes muestras entre sí y el gen control usado para realizar las medidas relativas de expresión fue *Hmbs*.

En cuanto al modelo *Psen1 Flox/Flox::Psen2-/-*, el nivel de delección de *Psen1* tras la inyección de la CRE se midió por RT-PCR, pero usando como material de partida ADN genómico de estriado (ver apartado 2.3.3). En este caso no se realizó el tratamiento con DNasa ni fue necesario el proceso de retrotranscripción. Además, los oligos empleados para dicha amplificación se encontraban dentro de un mismo exón para que el amplicón resultante fuese compatible con la técnica de RT-PCR. En este caso el gen control fue *Sntb2* pues disponíamos de oligos para su amplificación dentro de un mismo exón.

GEN	OLIGONUCLEÓTIDO FORWARD	OLIGONUCLEÓTIDO REVERSE
<i>Cadh5</i>	TCTCTGCAACAGACAAGGATGTG	TGTTGGCGGTGTTGTCATG
<i>cd33</i>	GAGGCAGGAAGCGATCACAT	GTGTATGGAACATCCTGGAGTCAC
<i>Erg</i>	GCGAGGAGAAGATGGTTATCGT	CCCGGTACCTGGACATGCT
<i>Fzd4</i>	GCCCACGTCAAGGAGTATTTCTAC	CAAACACGACTGCAAGATTGGA
<i>Gfap</i>	GCCACCAGTAACATGCAAGAGA	TGCCAACTTAGACCGATACCACTC
<i>Gstp1</i>	ATGCCACCATACACCATTGTC	GGGAGCTGCCCATACAGAC
<i>Hmbs</i>	CCATACTACCTCCTGGCTTTACTATTG	GGTTTTCCCGTTTGCAGATG
<i>Iba1</i>	ATCAACAAGCAATTCCTCGATGA	CAGCATTCGCTTCAAGGACATA
<i>Psen1</i>	GGTTTTCCCTCCATCTTGGTTG	TCAACTCCTCCAGAGTCAGG

<i>Stt</i>	ACCGGAAACAGGAAGTGG	TTGCTGGGTTCGAGTTGGC
<i>Stnb2</i>	AACACCTTGATCTTACGCTGCAA	GCCTCCCCTGTACTGGTT
<i>Tspan7</i>	TGCCGAGTTGTCTTCTCCAAA	AAGGCACAGAGCTAATACAGATGGT

Tabla C7. Oligonucleótidos usados para qPCR. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para medir el nivel de expresión de ARNm por qPCR.

8. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y ELISA

8.1. Extracción de proteínas

La extracción de proteínas se llevó a cabo en las hemicortezas cerebrales de los ratones *APP_{751SL}/+* incluidos en el tratamiento con sorafenib, siguiendo el protocolo descrito en Jiménez y col. (Jiménez y col. 2014). El peso húmedo del tejido se determinó antes de proceder con la extracción. La homogenización se realizó manualmente empleando un homogenizador de tejidos Dounce (Sigma) en 400µl de tampón Tris-salino (TBS; 20mM Tris Base, 140mM NaCl; pH 7,4), suplementado con inhibidores de fosfatasa (Sigma, 1:100) e inhibidores de proteasas (Sigma, 1:100).

Los extractos de proteínas se centrifugaron (60 minutos a 4°C) a 100000g usando una ultracentrífuga Optima-Max (Beckman-Coulter) (rotor TLA110) a fin de separar la fracción soluble (S1) e insoluble (pellet). El sobrenadante, donde se localizaba la fracción S1 (péptidos solubles de A β ₄₀ y A β ₄₂), se cuantificó directamente mediante la técnica de Bradford. El pellet resultante de la ultracentrifugación, formado por los extractos totales (Σ), se tuvo que disolver en 500 µl de una solución de guanidina 8,2 M HCl / 50 mM Tris dejándolo toda la noche en agitación a temperatura ambiente.

8.2. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de la fracción S1 y del pellet se llevó a cabo siguiendo el método de Bradford, usando el reactivo *Protein Assay* (BIO-RAD). Este método se basa en la capacidad de unión a proteínas del reactivo Coomassie G-250. Una vez unido, el pico de absorbancia del Coomassie es de 595 nm, por tanto, cuanto mayor sea la absorbancia a esta longitud de onda, tanto mayor será la concentración de proteínas de la muestra.

En este caso, los pellets se diluyeron en agua hasta conseguir una concentración final de 5M guanidina que fuera compatible con el método de detección de ELISA. Para la curva estándar se utilizó albúmina del suero bovino (BSA, Applichem) y la lectura de absorbancias se realizó en el espectrofotómetro BECKMAN DU SERIE 640.

8.3. ELISA A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂

Para determinar la concentración de A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂ en la fracción soluble e insoluble de las muestras de hemicorteza de los ratones *APP₇₅₁SL* tratados con sorafenib, se llevó a cabo un ELISA tipo sándwich para cada uno de los péptidos, siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen).

La medida se realizó con 50 μ l, tanto de la fracción S1 (sin diluir), como de una dilución 1:5000 de los pellets (en un buffer de dilución que contenía cada uno de los kits). La recta patrón se obtuvo con diluciones seriadas de A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂. La concentración de A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂ obtenida en cada caso se normalizó teniendo en cuenta la concentración de proteínas totales obtenidas mediante el método de Bradford.

9. ESTUDIO TRANSCRIPTÓMICO

9.1. Arrays de expresión

Para el estudio transcriptómico de las células endoteliales procedente de muestras de corteza cerebral se utilizó el array de hibridación de Affymetrix (Thermo Scientific), la versión MTA 1.0 (del inglés, *Mouse Transcriptome Assay*). El uso de arrays de hibridación y, en concreto de la versión MTA 1.0, permite de manera rápida y simple analizar el transcriptoma completo de una célula y enfocar el estudio a nivel de transcritos, codificantes o no codificantes. En este caso, se estima que hay unas diez sondas por exón y cuatro sondas para cada *junction* en cada gen.

El ARN de las muestras se extrajo tal y como se describió en el apartado 9 de materiales y métodos (extracción de ARN) y, tras la cuantificación y el análisis de su calidad mediante electroforesis en capilares con el bionalizador Agilent 2100 (Agilent), se usaron solo aquellas muestras de ARN que tenían un número de integridad de ARN (RIN; del inglés, *RNA Integrity Number*) superior a 7. Todo el ARN extraído de partida se amplificó y marcó haciendo uso de GeneChip® WT Pico Reagent Kit (Thermo Scientific) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc amplificado se cuantificó, fragmentó y etiquetó para la hibridación en el GeneChip® Mouse Transcriptome 1.0 Array (Thermo Scientific) usando 5,5 μ g de producto de ADNc monocatenario y siguiendo los protocolos descritos en el manual del usuario.

El lavado, marcaje (GeneChip® Fluidics Station 450; Thermo Scientific) y escaneo (GeneChip® Scanner 3000; Thermo Scientific) se llevó a cabo siguiendo también los protocolos descritos en el manual del usuario correspondiente. Los datos brutos del

software de extracción Expression Console (Thermo Scientific) se importaron al programa estadístico “R” (<http://www.R-project.org/>) utilizando el paquete LIMMA/ Bioconductor (Ritchie y col. 2015). La calidad de los datos se evaluó utilizando el paquete Array Quality Metrics (Kauffmann y col. 2009). Los datos se normalizaron utilizando el método Robust Multi-Array (RMA), y el análisis de expresión diferencial se realizó mediante el paquete LIMMA / Bioconductor (Ritchie y col. 2015). Finalmente se obtuvo una matriz normalizada de expresión para cada uno de los genes incluidos en el estudio y dicha matriz se utilizó como “entrada” en el programa de ontología de genes de GSEA.

9.2. Ontología de genes con GSEA

9.2.1. Fundamento de la técnica

Para identificar los procesos biológicos más destacados en las células endoteliales procedentes de la corteza cerebral del modelo murino APP-PSEN1/+ se usó el programa de ontología de genes GSEA (del inglés, *Gene Set Enrichment Analysis*) (Subramanian y col. 2005). GSEA cuenta con una estadística muy potente que estudia cambios entre fenotipos teniendo en cuenta un conjunto de genes, es decir, en lugar de analizar un gen de forma independiente, donde puede haber cambios sutiles, estudia la correlación entre varios de ellos que se ven implicados en la misma función. GSEA asigna un valor de ES (del inglés, *Enrichment Score*) a cada set de genes en un estudio comparativo y dicho valor viene dado por la correlación de expresión que guarda ese grupo de genes dentro del array. El valor ES se normaliza (NES) teniendo en cuenta varios parámetros como el tamaño del set de genes. Finalmente, se asigna un valor de significancia a cada ES obtenido mediante un test de permutación basado en fenotipo, en el que se vuelven a estimar nuevos ES asignando de forma aleatoria las etiquetas de los fenotipos.

9.2.2. Procedimiento

Los datos de expresión (normalizados) para cada gen del array de cada una de las muestras (muestras controles y muestras del modelo murino APP-PSEN1/+) se incorporaron en este programa. A la librería de “Biological Processes C5” versión 6.2 que tiene GSEA, con 825 categorías de genes, se le añadió otra categoría funcional que incluye el listado con los 50 genes más sobreexpresados ($FDR < 0,05$) en la retina de un ratón heterocigoto para Dll4 (Dll4^{+/-}_Up) (Del Toro y col. 2010).

10. PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO

Los animales del modelo murino APP_{751SL}/+ que recibieron el tratamiento con sorafenib fueron sometidos a estudios comportamentales de campo abierto (OF; del inglés, *Open Field*) y de reconocimiento de un nuevo objeto (NOR; del inglés, *Nobel Object Recognition*).

10.1. Prueba de campo abierto

La prueba se realizó en un cubículo de metacrilato de 45cm x 45cm y consistía en dejar que el ratón explorara el espacio de manera libre durante 15 minutos. Su actividad fue resgistrada desde un plano superior a través de una cámara y los parámetros de porcentaje de actividad, velocidad media y distancia recorrida se obtuvieron con el software Smart 3.0.

10.2. Prueba de reconocimiento de un nuevo objeto

En el mismo cubículo donde se realizó el test de campo abierto se colocaron dos objetos idénticos y adheridos a la base, manteniendo la misma distancia entre ellos que con las paredes. El ratón permaneció durante 10 minutos explorando los objetos hasta familiarizarse. Después de 1 hora, se sustituyó uno de los objetos por otro nuevo y se estudió el número de interacciones que el ratón tenía con el objeto nuevo y con el antiguo durante 10 minutos. Esta aproximación nos permitió determinar un índice de memoria (IM) a corto plazo que se calcula como: $IM = \frac{T_n - T_a}{T_t}$, siendo T_n , tiempo medio de interacción con el objeto nuevo; T_a , tiempo medio de interacción con el objeto antiguo; y T_t , tiempo medio de interacción considerando los dos objetos (**Figura C10**).

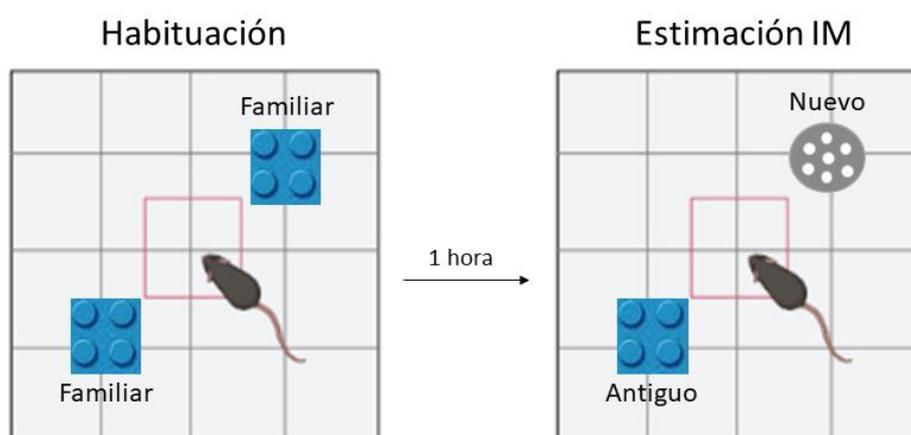


Figura C10. Esquema representativo de la prueba de reconocimiento de un nuevo objeto. A la izquierda se representa la fase de habituación en la que el ratón se familiariza con un objeto, que se convierte en familiar. A la derecha se muestra la interacción del ratón con el objeto antiguo y un objeto nuevo 1 hora después del proceso de habituación. Figura de elaboración propia.

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las muestras con un $n \geq 9$ fueron evaluadas para estudiar si su distribución era normal o no mediante la prueba de normalidad de *D'Agostino y Pearson*. Las muestras que no seguían una distribución normal se analizaron usando tests no paramétricos. Las muestras con un $n < 9$ se analizaron mediante el uso de tests paramétricos. Las comparaciones entre dos grupos se realizaron usando la prueba *t* de Student no pareada (para datos distribuidos normalmente), excepto para las imágenes pareadas de regiones proximales y distales a las placas que se usó la prueba *t* de Student pareada, o la prueba Mann Whitney (para datos no distribuidos normalmente). Las comparaciones entre más de dos grupos se realizaron con ANOVA seguido de la prueba de Tukey. Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando se obtiene un p-valor (p) $< 0,05$, y se muestra el nivel de significación de la siguiente manera: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) o $p < 0,001$ (***). Los análisis estadísticos y los gráficos se realizaron en GraphPad Prism versión 6.0 (GraphPad Inc.).

D. RESULTADOS

El apartado de resultados se ha estructurado en función de los objetivos planteados a fin de facilitar su comprensión.

1. OBJETIVO 1: ESTUDIAR EL MICROAMBIENTE HIPÓXICO Y LA ANGIOGÉNESIS EN LA PLACA AMILOIDE DE MODELOS Y PACIENTES DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

1.1. Las placas de A β constituyen un microambiente hipóxico e inducen una elevada expresión de HIF1 en las células que la rodean

Los focos de células inmunitarias innatas normalmente originan hipoxia inflamatoria e hipoperfusión (De Bock y col. 2009; Eltzschig & Carmeliet, 2011). En la EA, las células inmunitarias innatas del cerebro (microglía) migran y se agrupan alrededor de las placas seniles (Serrano-Pozo y col. 2013) y constituye la primera línea celular de defensa frente a estos depósitos dando lugar a un foco inflamatorio hipóxico (March-Diaz y col. 2021).

Para demostrar que la hipoxia local detectada entorno a los depósitos amiloides (**Figura A14**) es dependiente de HIF1A, se estudió la expresión de *Hif1a* mediante hibridación *in situ* (ISH; del inglés, *In Situ Hybridization*). Se combinó la ISH con inmunofluorescencia para el marcador microglial IBA1 (del inglés, *Ionized Calcium Binding Adaptor Molecule 1*) y se cuantificó el número de células IBA1 positivas para *Hif1a* en regiones próximas y distales a los depósitos de A β , así como en ratones silvestres. La cuantificación revela que la microglía asociada a placa (A β AM; del inglés, *A β -Associated Microglia*) expresa altos niveles de expresión del ARNm de *Hif1a*, lo que supone una clara implicación de la respuesta hipóxica en dichas regiones (**Figura D1**).

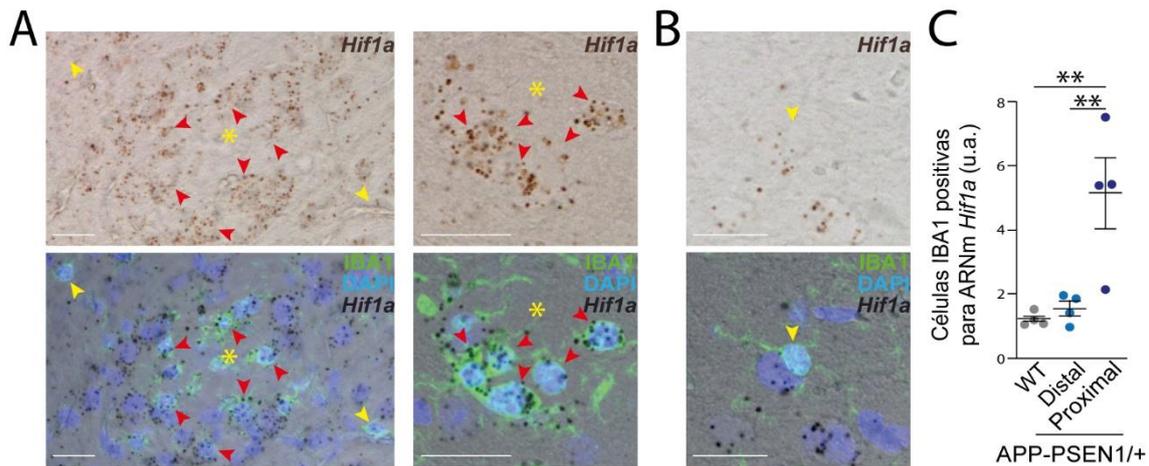


Figura D1. La expresión del ARNm de *Hif1a* en microglía se restringe a la zona cercana a depósitos amiloides. Imágenes representativas de secciones coronales de cerebros *APP-PSEN1/+* de 8 meses tras ISH con sonda *Hif1a* (marrón), inmunotinción con anticuerpo anti-IBA1 (verde) y tinción nuclear con DAPI (azul). Los asteriscos indican la posición de las placas amiloides. Las barras de escala son de 20 μ m. (A) Se muestran los marcadores IBA1, DAPI y *Hif1a* en regiones próximas a las placas (asteriscos). Las puntas de flecha rojas destacan a la microglía próxima a la placa con altos niveles de ARNm de *Hif1a*, mientras que las puntas de flecha amarillas destacan a la microglía con bajos niveles de expresión del mensajero. (B) Región cerebral alejada de placas amiloides donde la microglía tiene bajos niveles de expresión del ARNm de *Hif1a* (punta de flecha amarilla). (C) Cuantificación de células IBA1 positivas para *Hif1a* en regiones proximales y distales a placas amiloides, así como en animales controles. Se representa la media \pm el error estándar de la media ($n=4$; ** $p < 0,01$; test ANOVA seguido del test de Tukey).

1.2. Marcadores pro-angiogénicos enriquecidos en torno a las placas de A β

La presencia de estos depósitos extracelulares de naturaleza proteica (placas de A β) podría causar hipoxia local, no sólo por la inducción de una respuesta inflamatoria en las células inmunitarias que los rodean, sino por la propia disrupción o, incluso, desplazamiento de los capilares sanguíneos periféricos (Figura D2.A).

Ante un estímulo hipóxico, se promueve la liberación de factores pro-angiogénicos que inician la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes (angiogénesis). En el sistema nervioso central la formación de nuevos vasos viene determinada por la secreción del factor pro-angiogénico VEGF (del inglés, *Vascular Endothelial Growth Factor*) por parte de los astrocitos (Stone y col. 1995) (Figura D2.A). Varios estudios han mostrado que la expresión de VEGF está aumentada en el cerebro de pacientes con EA (Kalaria y col. 1998; Tang y col. 2013; Thomas y col. 2015) y, además, se ha localizado dentro de las placas de A β (Yang y col. 2004). Para demostrar la presencia de VEGF alrededor de los depósitos amiloides en el modelo murino *APP-PSEN1/+*, se estudió la expresión del ARNm para *Vegfa* mediante ISH y se combinó con inmunofluorescencia para el marcador microglial IBA1 y astrocítico GFAP (del inglés, *Glial Fibrillary Acidic*

Protein) (otro tipo celular asociado a los depósitos amiloides) (**Figura D2.B**). Se cuantificó el número promedio de células IBA1 y GFAP positivas para *Vegfa* en diferentes placas de A β y se concluyó que la principal fuente de producción de VEGF en torno a las placas son los astrocitos (**Figura D2.C**).

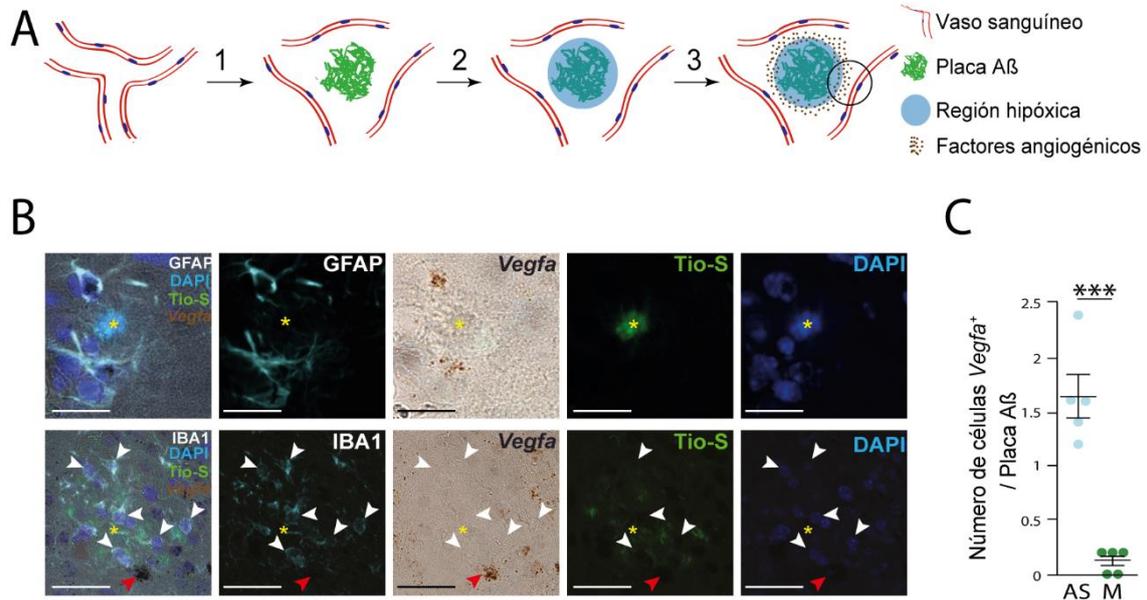


Figura D2. La expresión de VEGF se asocia a las placas amiloides y es producido principalmente por los astrocitos. (A) Modelo de trabajo de la iniciación de un proceso de angiogénesis en las proximidades de las placas de A β . Las placas de A β dan lugar a una hipoxia local (2), lo que induce la expresión de factores pro-angiogénicos, como VEGF (3). (B) Imágenes representativas de secciones coronales de cerebros *APP-PSEN1/+* de 8 meses de edad marcadas por ISH con *Vegfa* combinadas con marcadores inmunofluorescentes de placa amiloide (Tioflavina -S, Tio-S) microglía (IBA1) o astrocitos (GFAP). Los asteriscos indican la presencia de placas amiloides. Las puntas de flecha blancas señalan a células IBA1 con altos niveles de expresión para *Vegfa*, mientras que las rojas hacen referencia a células con altos niveles de *Vegf* que son IBA1 negativas. Las barras de escala son de 20 μ m (C) El panel de la derecha muestra el número promedio de células GFAP (astrocitos) o IBA1 (microglía) positivas para *Vegfa*. Se representa la media \pm el error estándar de la media (se analizaron 25 placas amiloides pertenecientes a 5 animales, $n=5$ ratones; *** $p < 0,001$; prueba t de Student).

Además, mediante la realización de ISH para *Vegfa*, combinada esta vez con un marcador endotelial (isolectina B4, IB4), se ha observado que las células con alta expresión de VEGF son reconocidas y rodeadas por filopodios procedentes de células endoteliales cercanas, sugiriendo actividad angiogénica en este contexto (**Figura D3**).

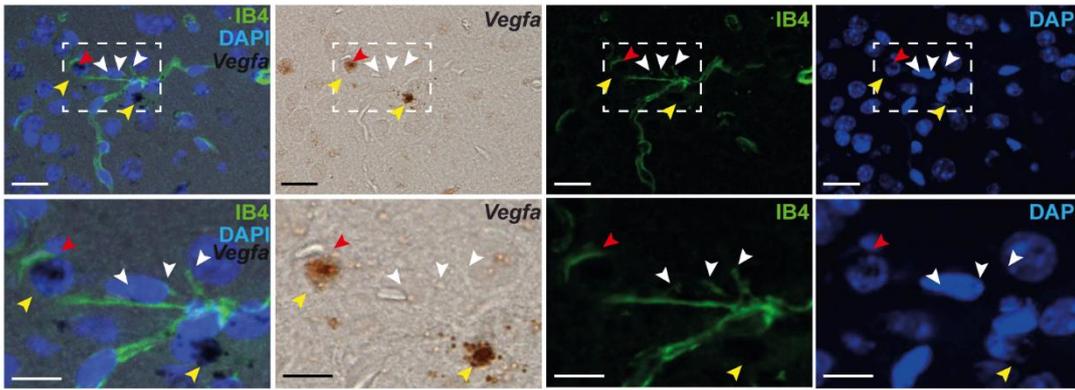


Figura D3. Las células endoteliales emiten filopodios dirigidos a los focos VEGF⁺. Imágenes representativas de secciones coronales del cerebro de ratones *APP-PSEN1/+* de 8 meses de edad marcadas por ISH con *Vegfa* (marrón) combinadas con un marcador nuclear (DAPI, azul) y endotelial (IB4, verde). En el panel inferior se muestra la región destacada con un marco discontinuo en la parte superior. Las puntas de flecha amarillas destacan células VEGF⁺, las blancas señalan la aparición de filopodios procedentes de células endoteliales y las rojas la localización de uno de estos filopodios rodeando completamente una célula VEGF⁺. Las barras de escala son de 20 μ m.

VEGF es reconocido por las células endoteliales cercanas y su unión al receptor promueve la conversión del fenotipo *phalanx* al fenotipo *tip*, que sería la célula encargada de guiar la migración del nuevo vaso sanguíneo hacia el estímulo hipóxico (**Figura D4.A**). Con el objetivo de estudiar la angiogénesis en el cerebro de modelos murinos y pacientes con EA, se analizó, en primer lugar, la expresión de la integrina $\alpha v\beta 3$ ($I\alpha v\beta 3$) en el modelo *APP-PSEN1/+*. $I\alpha v\beta 3$ es un marcador angiogénico implicado en la estabilización del receptor 2 de VEGF (VEGFR2) una vez que se ha unido su ligando (Brooks y col. 1994; Soldi y col. 1999). Desai y colaboradores ya describieron que en el cerebro de pacientes con EA se acumulaban células reactivas para $I\alpha v\beta 3$ ($I\alpha v\beta 3^+$) (Desai et al., 2009). Nuestro análisis ha demostrado que las células $I\alpha v\beta 3^+$ se concentran alrededor de las placas de A β en comparación con las regiones distales a las placas o el cerebro de ratones silvestres (**Figura D4.B**). Además, no se encontraron diferencias en la cuantificación de la densidad de células $I\alpha v\beta 3^+$ entre los ratones silvestres y las regiones distales de los depósitos amiloides (**Figura D4.C**).

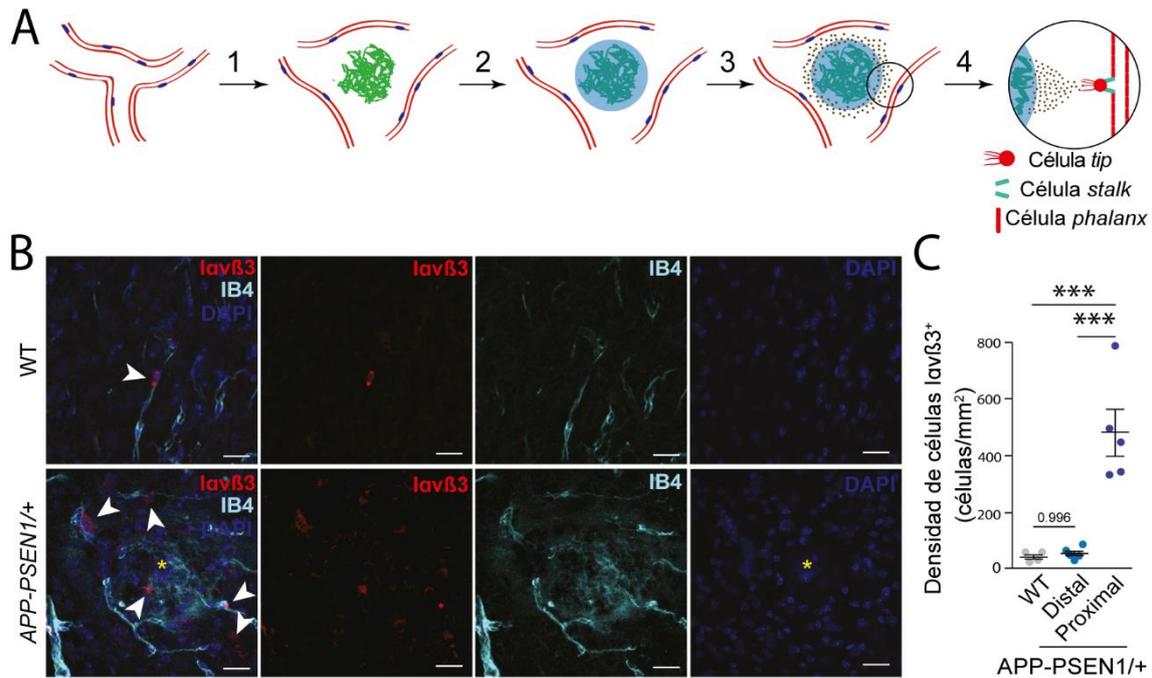


Figura D4. El marcador angiogénico $Iav\beta3$ se acumula alrededor de las placas amiloides en el modelo $APP-PSEN1/+$. (A) (Continuación de la figura 2A) La detección de VEGF por parte de células endoteliales maduras (célula *phalanx*) favorece la conversión a célula *tip* que se moviliza hacia el foco hipóxico y promueve la formación del nuevo capilar (4). (B) Secciones corticales cerebrales de ratones $APP-PSEN1/+$ y ratones controles de 8 meses de edad teñidas con el marcador angiogénico $Iav\beta3$ (rojo), el marcador endotelial IB4 (blanco) y el marcador nuclear DAPI (azul). Las barras de escala son de 20 μm . (C) Cuantificación de la densidad de células $Iav\beta3^+$ en las regiones proximales y distales a las placas amiloides del modelo $APP-PSEN1/+$, así como en los animales controles. Se representa la media \pm error estándar de la media ($n= 5$ animales $APP-PSEN1/+$ y 4 animales controles; *** $p < 0,001$; test ANOVA seguido del test de Tukey).

Para extender nuestros análisis a pacientes de EA, se utilizaron muestras humanas de hipocampo estrictamente clasificadas en los estadios IV-VI según la escala Braak y estas muestras se compararon con controles de la misma edad clasificados en un estadio 0-I (Tabla C5). En estas muestras se combinó el marcaje de las placas amiloides Tioflavina-S (Tio-S) con el marcador pro-angiogénico $Iav\beta3^+$ y el análisis de sus posiciones relativas sugirió una relación entre ambos (Figura D5).

Para confirmar a nivel cuantitativo la asociación entre angiogénesis y los depósitos de $A\beta$, primero se identificó la posición de cada una de las placas y de las células $Iav\beta3^+$ en las cinco muestras humanas (Figura D6.A), y se midió la carga de ovillos neurofibrilares, otro rasgo patológico de la enfermedad. Se observó una perfecta relación directa entre la carga de patología amiloide y el número de células $Iav\beta3^+$, mientras que no se encontró ninguna asociación entre el número de células $Iav\beta3^+$ y la presencia de ovillos (Figura D6.B). Por otro lado, el número de células $Iav\beta3^+$ en las muestras controles en relación con los pacientes fue muy escaso (55 células $Iav\beta3^+$ totales en las 5 muestras controles, en

comparación con las 3209 células $\text{I}\alpha\text{v}\beta\text{3}^+$ de los 5 pacientes de Alzheimer) (**Figura D6.B**). En segundo lugar, para los casos de EA se realizaron 500 simulaciones en las que la posición de las placas de $\text{A}\beta$ y la posición de las células $\text{I}\alpha\text{v}\beta\text{3}^+$ fue aleatorizada. En cada simulación aleatoria y en los casos experimentales se midió la distancia mínima geodésica de cada célula $\text{I}\alpha\text{v}\beta\text{3}^+$ a su placa de $\text{A}\beta$ más cercana (**Figura D6.C**). Los resultados demostraron que, en los cinco casos de EA estudiados, las distancias mínimas experimentales entre las células $\text{I}\alpha\text{v}\beta\text{3}^+$ y las placas de $\text{A}\beta$ fueron siempre significativamente más pequeñas que en las simulaciones aleatorizadas (**Figura 6D**).

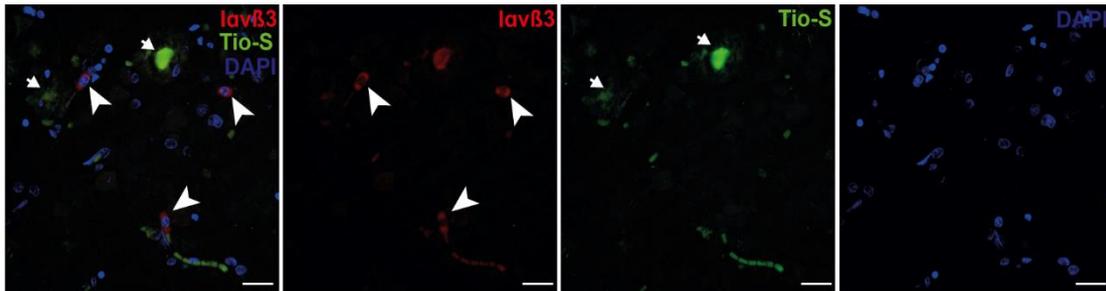


Figura D5. Expresión de $\text{I}\alpha\text{v}\beta\text{3}$ en el cerebro de pacientes de EA. Secciones de hipocampo de pacientes con EA teñidas con $\text{I}\alpha\text{v}\beta\text{3}$ y el marcador de placas amiloides (Tio-S). Las puntas de flecha señalan células $\text{I}\alpha\text{v}\beta\text{3}^+$ mientras que las flechas indican la presencia de depósito amiloide. Las barras de escala son de 20 μm .

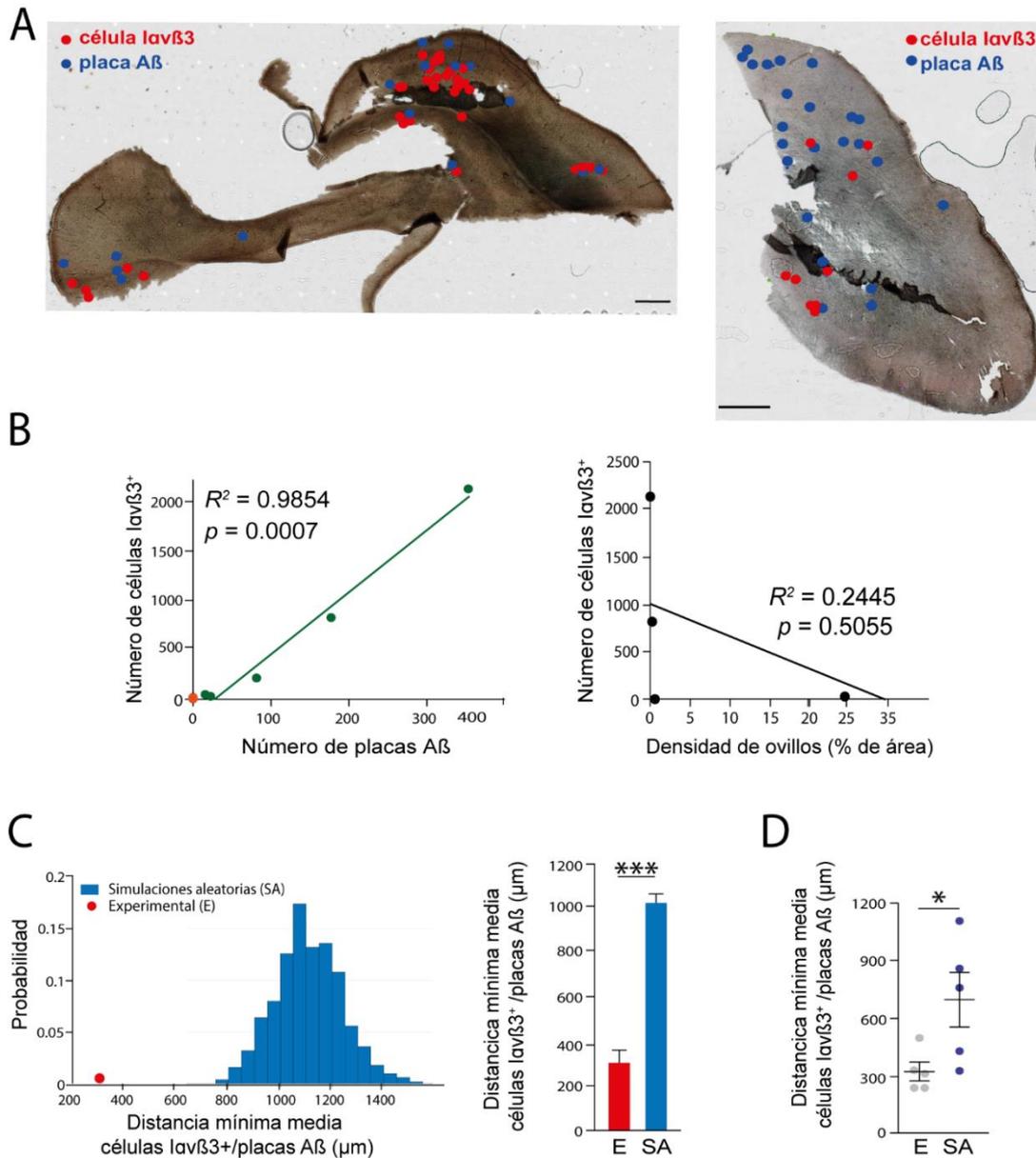


Figura D6. El marcador angiogénico Iαvβ3 se acumula alrededor de las placas amiloides en muestras de pacientes con EA. (A) Secciones de hipocampo de pacientes con EA donde se localizan las coordenadas de cada célula Iαvβ3+ (círculos rojos) y de cada placa de Aβ (círculos azules). Las barras de escala son de 1 mm. **(B)** En el gráfico de la izquierda se muestra la correlación entre el número de células Iαvβ3+ y el número de placas de Aβ en 5 casos de Alzheimer (Braak IV-VI) (puntos verdes) y 6 controles (Braak 0-I) (puntos naranjas). En el gráfico de la derecha se representa la correlación con la densidad de ovillos neurofibrilares. Correlación de Spearman. **(C)** En el gráfico de la izquierda se representa la probabilidad de distribución de distancias mínimas (geodésicas) entre cada célula Iαvβ3+ a su placa de Aβ más cercana, en un total de 500 simulaciones por muestra, donde se fija la posición de las placas de Aβ y las células Iαvβ3+ se distribuyen de forma aleatoria. En el gráfico de la derecha se muestra la distancia mínima media experimental (E) y la distancia mínima media aleatoria (SA), procedente de las primeras diez simulaciones aleatorias, en uno de los casos de EA. **(D)** Cuantificación de la distancia mínima media entre células Iαvβ3+ y las placas de Aβ de 5 muestras de hipocampo de pacientes (experimental; E) y de las simulaciones procedentes de todas las muestras (SA). Se representa la media ± error estándar de la media ($n=5$; $* p < 0,05$; prueba t de Student).

Por otro lado, con el marcador angiogénico $\alpha v\beta 3$ no sólo se han identificado células aisladas formando parte de la estructura de un vaso, sino que se han observado estructuras anómalas $\alpha v\beta 3^+$ alrededor de las placas amiloides y de ovillos neurofibrilares (**Figura D7**). Estas estructuras recuerdan a los depósitos de heparán sulfato observados en pacientes con EA entorno a las placas amiloides y que recibieron el nombre de fantasmas vasculares (del inglés, *Vascular Gosht*). Dichos depósitos podrían tener un origen vascular debido al alto contenido de heparán sulfato presente en la membrana basal de las células endoteliales y refleja una movilización anómala de la misma, sugiriendo un daño vascular en la EA (Berzin y col. 2000; Jucker y col. 1996; Perlmutter, 1994; Perlmutter y col. 1990; Verbeek y col. 1999).

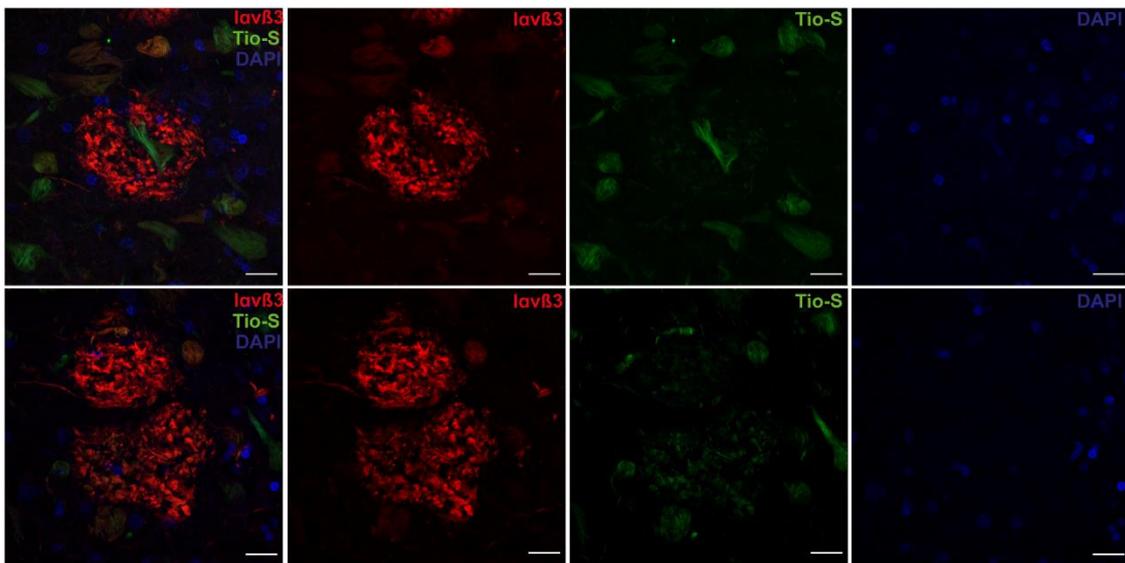


Figura D7. La $\alpha v\beta 3$ forma un depósito anómalo entorno a las placas amiloides en muestras humanas. Muestras de hipocampos de pacientes con EA donde se observan depósitos anómalos $\alpha v\beta 3^+$ localizados en las proximidades de placas amiloides. La barra de escala es de 20 μm .

En resumen, podemos concluir que, la hipoxia local alrededor de las placas amiloides induce la expresión de HIF1 en microglía y otras células vecinas y de VEGF en los astrocitos, principalmente. Este hecho correlaciona con el aumento en el número de células angiogénicas en las regiones cercanas a las placas, sugiriendo que la angiogénesis se inicia alrededor de los depósitos de $A\beta$ tanto en el cerebro de pacientes como de modelos murinos de EA.

1.3. Las placas de A β se encuentran hipoperfundidas

Para identificar si la causa de la hipoxia local entorno a las placas de A β se debía a una disminución de la perfusión vascular, se realizaron estudios de angiografía con el reactivo *Evans blue* en dos modelos murinos de EA que acumulan A β : *APP-PSEN1/+* y *APP751SL/+*. En ambos modelos, los datos demuestran que las regiones cercanas a las placas están hipoperfundidas en relación con las regiones distales (**Figura D8**) (**Figura D9.A**). Además, en el caso del modelo *APP751SL/+*, el estudio de perfusión se completó con el marcador de glóbulos rojos TER119. El resultado refleja la pérdida de perfusión en las regiones cercanas a las placas, sin embargo, no se encontraron diferencias entre los ratones silvestres y las regiones distales a las placas amiloides (**Figura D9.A**).

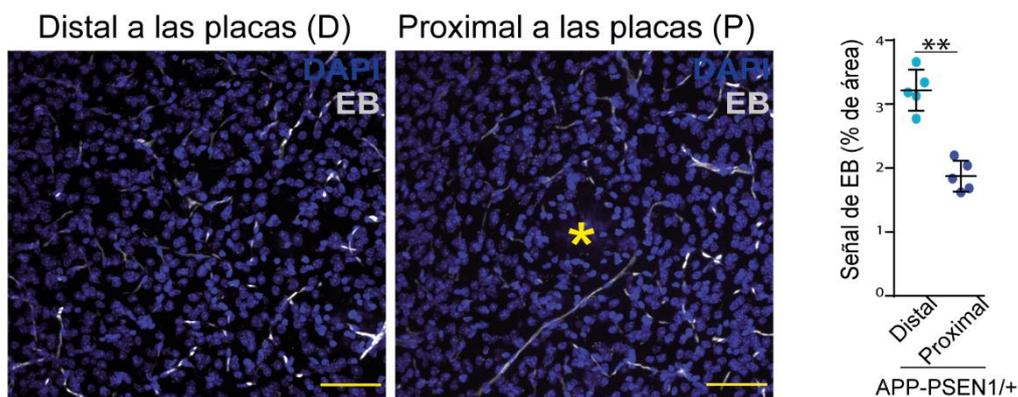


Figura D8. Las placas de A β en el modelo murino *APP-PSEN1/+* están hipoperfundidas. En el panel de la izquierda se muestran imágenes representativas de 7 μ m de grosor en el eje z de cortes coronales de corteza cerebral perteneciente a ratones *APP-PSEN1/+* de 8 meses de edad en regiones distales (D) y proximales (P) a las placas. El estudio se llevó a cabo con el marcador de perfusión *Evans blue* (EB, blanco) y el marcador nuclear DAPI (azul). El asterisco muestra la presencia de una placa amiloide que autofluoresce en el canal del DAPI. Las barras de escala son de 20 μ m. En la gráfica de la derecha se muestra la cuantificación del porcentaje de área ocupada por el marcador de perfusión EB en regiones proximales y distales a las placas. Se representa la media \pm el error estándar de la media ($n=5$ ratones, 10 imágenes pareadas, distal y proximal a placa, por ratón ; ** $p < 0,01$; prueba t de Student).

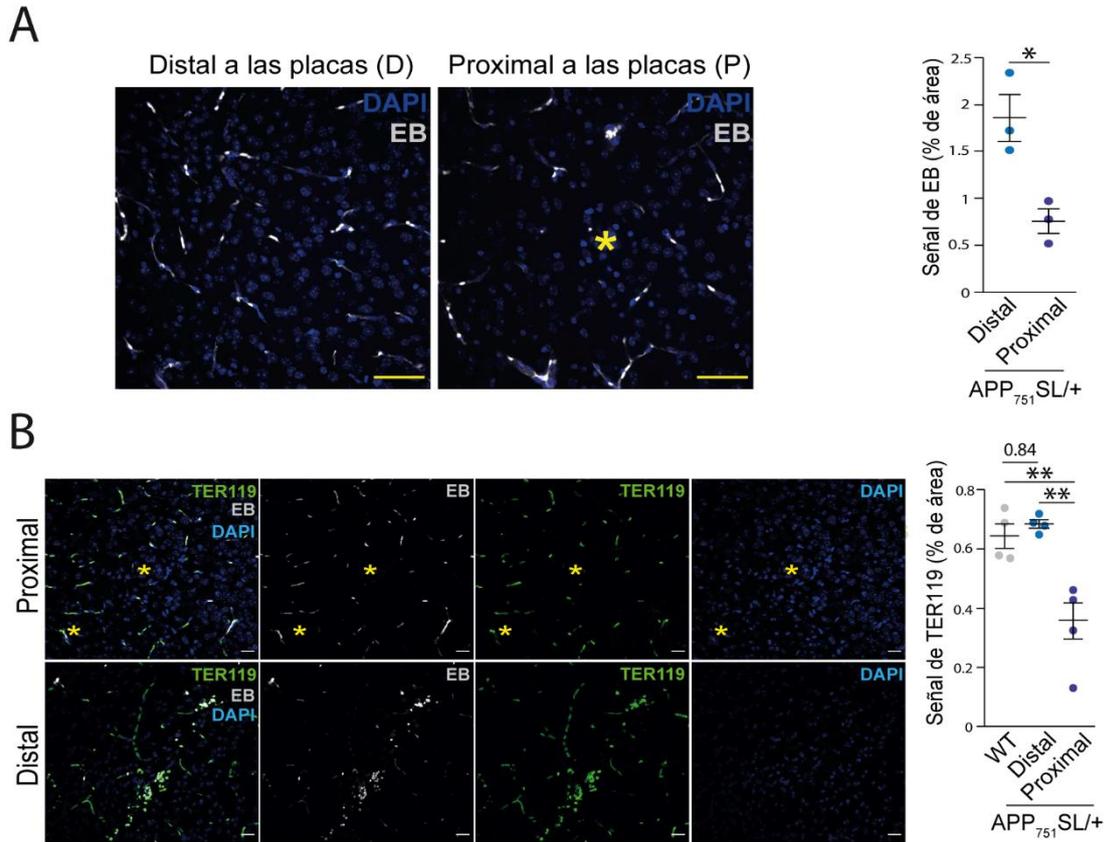


Figura D9. Las placas de A β en el modelo *APP*₇₅₁*SL*/*+* están hipoperfundidas. (A) Estudio de perfusión con el marcador EB (blanco) en ratones *APP*₇₅₁*SL*/*+* de 8 meses de edad. Se muestran imágenes representativas de 7 μ m de grosor en el eje z de cortes coronales de corteza cerebral en regiones proximales y distales a las placas de A β . El asterisco marca la placa de A β . En la gráfica de la derecha se representa la cuantificación del porcentaje de área ocupada por el marcador de perfusión EB en regiones proximales y distales a placa. Se representa la media \pm el error estándar de la media ($n=3$ ratones, 10 imágenes pareadas, distal y proximal a la placa, por ratón; ** $p < 0,05$; prueba t de Student). **(B)** Estudio de perfusión con el marcador de glóbulos rojos TER119. En el panel de la izquierda se muestran imágenes xy de secciones coronales de corteza cerebral de ratones *APP*₇₅₁*SL*/*+* de 8 meses de edad marcadas con TER119 (verde), EB (blanco) y el marcador nuclear DAPI (azul).

2. OBJETIVO 2: ESTUDIAR LA VASCULATURA CEREBRAL EN MODELOS DE EA QUE ACUMULAN A β

2.1. OBJETIVO 2.1: Estudiar los mecanismos moleculares implicados en el daño vascular cerebral observado en modelos de EA

2.1.1. Alrededor de las placas de A β se inicia un proceso patológico de angiogénesis no productiva (NPA)

La existencia de marcadores angiogénicos, junto con la pérdida de perfusión registrada en el cerebro durante la patología de Alzheimer sugiere la posibilidad de un fallo en el proceso de angiogénesis. Tras la detección del gradiente de VEGF por parte de las células endoteliales y la consecuente estabilización del receptor (VEGFR2), se produce un fenómeno de especificación celular denominado inhibición lateral (**Figura D11.A**). Durante este proceso tiene lugar una competición celular que determina los fenotipos endoteliales de las células de la punta (*tip*; que guía, pero no tiene lumen) y de las células del tallo (*stalk*; que tienen lumen y proliferan, pero no detectan VEGF). Cuando este sistema de competición celular falla, los vasos se sustituyen por células de la punta que no conducen sangre, en un proceso denominado angiogénesis no productiva (NPA; del inglés, *Non-Productive Angiogenesis*) (Lobov y col. 2007; Noguera-Troise y col. 2007; Ridgway y col. 2006; Suchting y col. 2007)..

Para identificar posibles alteraciones en la inhibición lateral en la EA, se aislaron células CD31 positivas (un marcador células del sistema inmunitario innato y de células endoteliales) y CD11b negativas (un marcador de células del sistema inmunitario innato) mediante FACS (del inglés, *Fluorescence Activated Cell Sorting*) (**Figura D10.A-C**) procedentes de animales controles y *APP-PSEN1/+* envejecidos de 18 meses de edad. La pureza de la población celular aislada se midió por qRT-PCR y el resultado mostró que el nivel de ARNm para el marcador endotelial *Cdh5* (*Cadherin5*) estaba considerablemente elevado en relación con otros marcadores microgliales, astrocíticos, oligodendrocíticos o neuronales, lo que confirmó la pureza de las células endoteliales aisladas (**Figura D10.D**). Se llevó a cabo un análisis transcricional global mediante microarray y el listado de genes expresados de forma diferencial (GED) en la comparativa *APP-PSEN1/+* frente a la condición control se muestra en la tabla 1 del apartado Anexos (Apartado H).

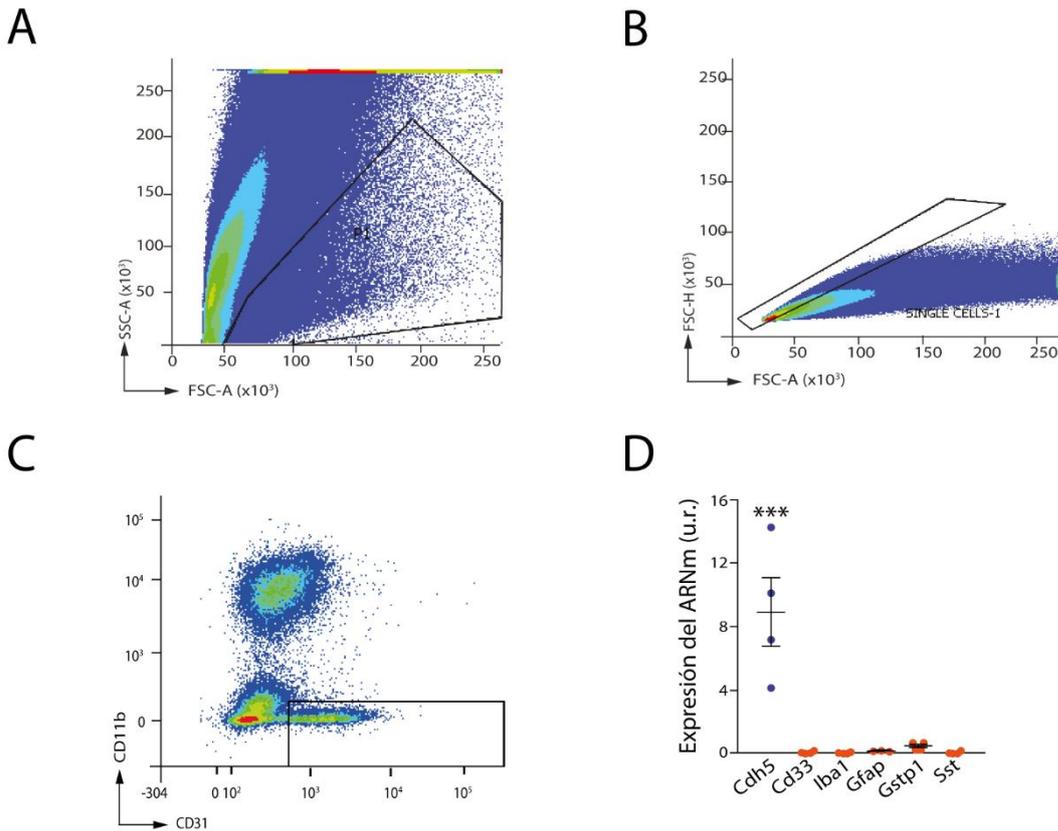


Figura D10. Aislamiento de células endoteliales de la corteza cerebral en ratones *APP-PSEN1/+* adultos. (A) Las células muertas y los desechos presentes en la suspensión celular fueron descartados por la dispersión frontal (FSC) y lateral (SSC). (B) Los eventos únicos fueron seleccionados según los parámetros de altura (FSC-H) y de área (FSC-A). (C) Se aislaron las células negativas para el marcador mieloide CD11b y positivas para el marcador endotelial CD31. (D) La pureza en células endoteliales de la población aislada por FACS fue determinada por qRT-PCR haciendo uso de los siguientes marcadores: *Cdh5* (marcador endotelial), *Cd33* (marcador microglial), *Iba1* (marcador microglial), *Gfap* (marcador astrocítico), *Gstp1* (marcador de oligodendrocitos), *Sst* (marcador neuronal). Se usó *Hmbs* como gen control. Se representa la media \pm el error estándar de la media (u.r. unidades relativas) ($n=3$; *** $p < 0,001$; prueba de la t de Student).

Para validar si la angiogénesis inducida en un modelo murino de EA que acumula A β se está viendo alterada y presenta una firma molecular de NPA, se llevó a cabo un estudio de ontología de genes por GSEA (del inglés, *Gene Set Enrichment Analysis*). Al listado de categorías funcionales de genes que incluye el programa GSEA, se añadió una última categoría de un modelo de NPA que contenía los genes que aumentaban su expresión en una retina de un ratón neonato heterocigoto para *Dll4* (*Dll4+/-_Up*) (Del Toro y col. 2010) (Figura D11.A). La reducción en la señalización de *Dll4* supone la alteración en la inhibición lateral *Dll4/Notch*, que es el mecanismo molecular implicado en la diferenciación del fenotipo *tip* y *stalk* de la célula endotelial durante el proceso de angiogénesis (Lobov y col. 2007; Noguera-Troise y col. 2007; Ridgway y col. 2006; Suchting y col. 2007).

Sorprendentemente, la categoría de genes más enriquecida en este análisis, y la única con un FWER-pvalor significativo de un listado de más de 800 categorías de genes analizadas, fue la NPA, lo que sugiere firmemente un fallo en la inhibición lateral de las células endoteliales cerebrales de los modelos murinos de EA. (**Figura D11.B-C**).

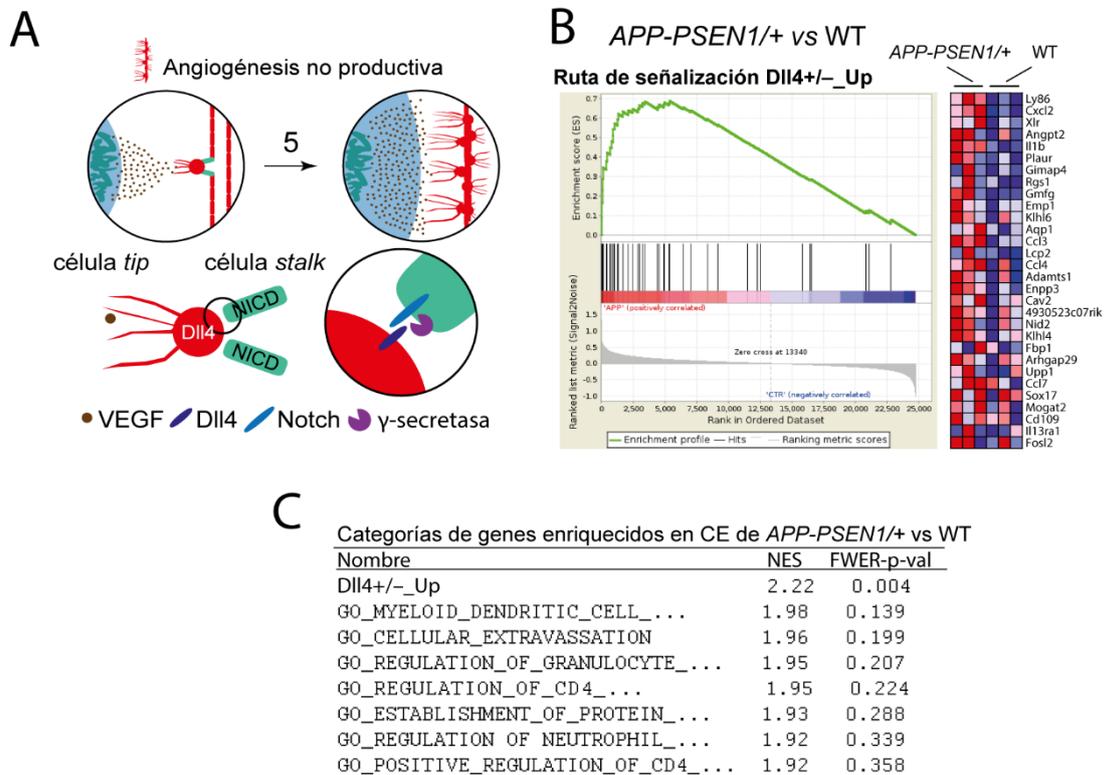


Figura D11. La angiogénesis no es productiva (NPA) alrededor de las placas de Aβ. (A) Modelo de trabajo de la iniciación de un proceso de angiogénesis en las proximidades de las placas de Aβ (continuación de la figura 2A). El proceso patológico de NPA convierte las células *phalanx* en células *tip* no conductoras, lo que mantiene la hipoxia local de partida (5). El proceso de inhibición lateral mediado por Notch está involucrado en la conversión del fenotipo *tip* a *stalk* y dicho proceso está modulado por la γ -secretasa. (**B, C**) La ontología de genes por GSEA reveló que la categoría de NPA (*Dll4+/-_UP*) está enriquecida en células endoteliales cerebrales de ratones *APP-PSEN1/+* de 18 meses de edad versus controles de la misma edad. (**B**) En el panel de la derecha se muestra el mapa de calor de los 30 primeros genes incluidos en la firma de NPA. El color rojo representa sobreexpresión, mientras que el azul refleja represión del gen. (**C**) La tabla muestra las 8 categorías de genes más enriquecidas en la comparativa *APP-PSEN1/+* versus control ordenadas según los parámetros *NES* y valor *FWER*.

El análisis por *microarray* también reveló la inhibición de la vía Wnt/ β -catenina. Esta vía está implicada en el establecimiento de la BHE, así como en la formación de uniones estrechas (TJ) y uniones adherentes entre las células endoteliales cerebrales (Daneman y col. 2009; Quiñonez-Silvero y col. 2020). En concreto, se obtuvo una fuerte reducción en la expresión del receptor de Wnt específico de células endoteliales, *Fzd4* (del inglés, *Frizzled-4*), el cual desempeña un papel clave en la estabilización vascular a través de la activación del factor de transcripción ERG (del inglés, *ETS Related Gene*) (Birdsey y col. 2015), y de

Tspan7 (del inglés, *Tetraspanin 7*), quien pertenece a una familia de amplificadores de la señal del receptor *Fzd4* implicada en la angiogénesis (Lai y col. 2017). En este punto cabe destacar que la vía Wnt/ β catenina y la vía de Notch están interconectadas y la regulación entre ambas determina la estabilidad vascular (Phng y col. 2009; Reis & Liebner, 2013). Los datos obtenidos en el microarray se confirmaron midiendo por qRT-PCR los niveles de ARNm de los genes *Fzd4*, *Tspan7* y *Erg* en extractos de corteza de ratones *APP-PSEN1/+* de 12 meses de edad (**Figura D12.A**). Sin embargo, está caída en los genes de la vía Wnt/ β catenina no fue detectada en ratones *APP-PSEN1/+* de 6 meses de edad (**Figura D12.B**), lo que sugiere su asociación con las placas de A β .

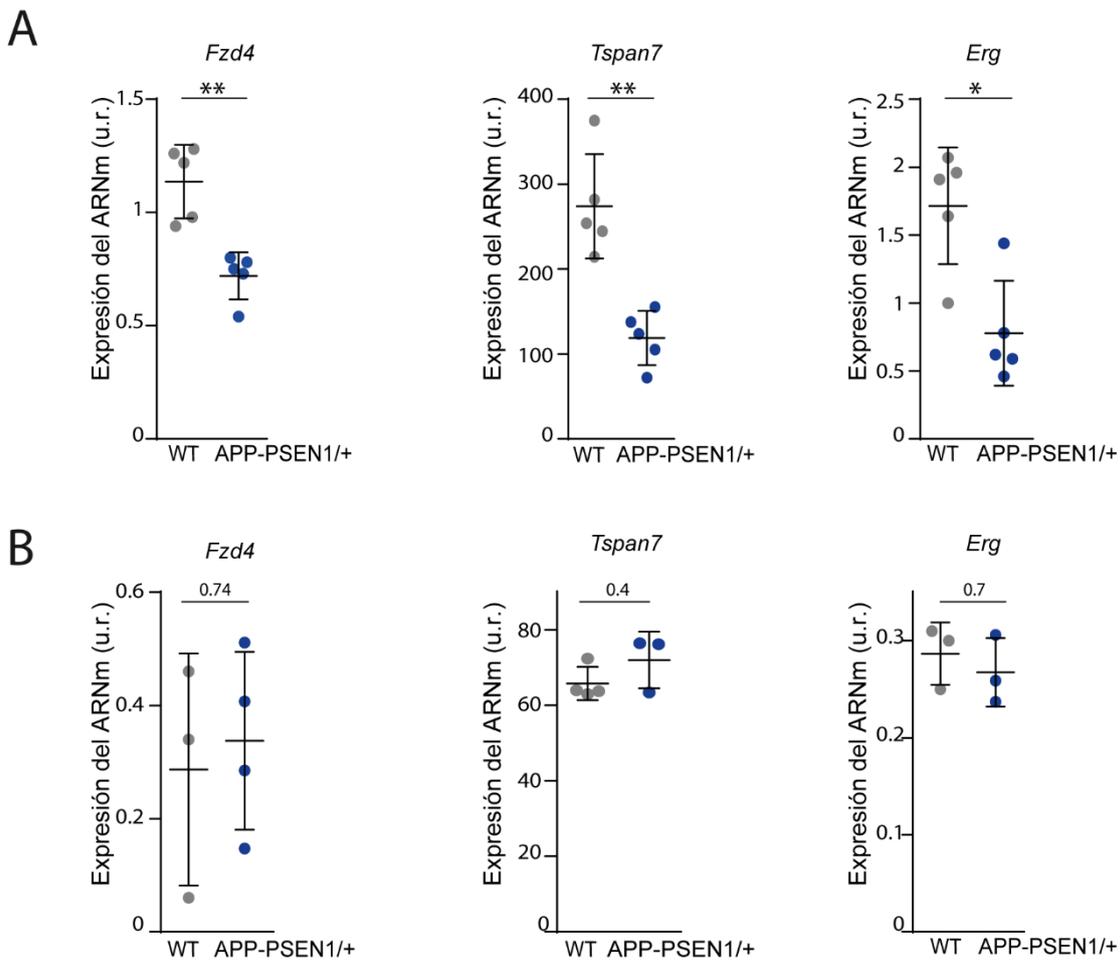


Figura D12. Validación de la represión de la vía Wnt/ β -catenina observada en el microarray de células endoteliales. (A) Validación de la represión de la vía Wnt/ β catenina a través del estudio por qRT-PCR de tres genes implicados en dicha vía (*Fzd4*, *Tspan7* y *Erg*) en muestras de corteza cerebral de ratones controles (WT) y *APP-PSEN1/+* de 12 meses de edad. Se usó *Hmbs* como gen control. Se representa la media \pm el error estándar de la media (u.r. unidades relativas) ($n=5$ ratones; ** $p < 0,01$; prueba de la t de Student). **(B)** La represión en los niveles de expresión de los genes implicados en la vía Wnt/ β catenina no se observa en muestras de corteza cerebral de ratones de 6 meses de edad. Se usó *Hmbs* como gen control. Se representa la media \pm el error estándar de la media (u.r. unidades relativas) ($n=3$ ratones; prueba de la t de Student).

2.1.2. Anomalías vasculares IB4+ compatibles con NPA alrededor de las placas de A β

La existencia de un fenómeno de NPA debería ir asociado con un incremento en el número de células *tip* (Figura D11.A). Para comprobar esta predicción y validar el estudio transcriptómico, seleccionamos uno de los genes específicos de células *tip* (Del Toro y col. 2010) que también se incluye en el listado de genes con expresión aumentada de nuestro estudio y en la firma *Dll4+/-_Up: Plaur* (del inglés, *Plasminogen Activator Urokinase Receptor*). En este caso, la validación se realizó a nivel histológico mediante ISH combinada con isolectina B4 (IB4) (obtenida de la planta *Griffonia simplicifolia*), un marcador bien descrito de células endoteliales maduras y también de células *tip* angiogénicas (Wälchli y col. 2014). El marcaje con IB4 reveló una caída en la expresión del ARNm de *Plaur* tanto en los animales controles como en las regiones distales a las placas de A β en un modelo murino de EA (Figura D13). Este dato sugiere que la alteración en la inhibición lateral *Dll4/Notch* tiene lugar en las regiones cercanas a las placas de A β .

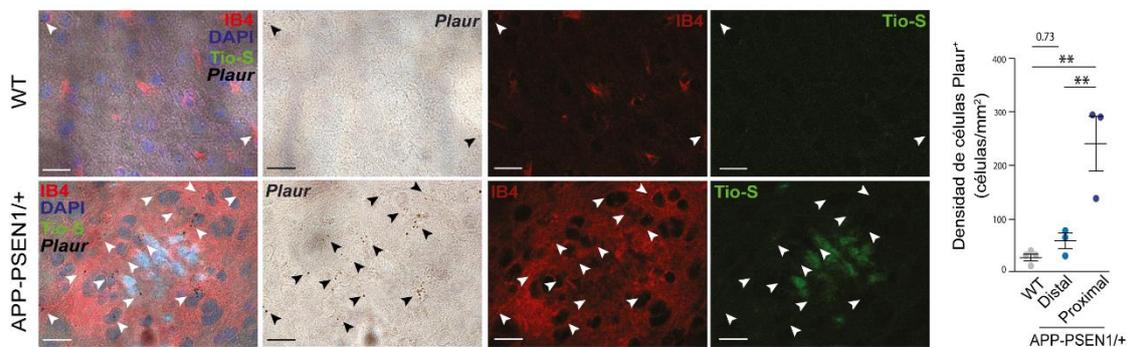


Figura D13. *Plaur* está sobreexpresado en regiones próximas a las placas amiloides. Imágenes xy de cortes coronales de corteza cerebral pertenecientes a ratones *APP-PSEN1/+* de 8 meses de edad teñidas por ISH con la sonda para el gen *Plaur* combinada con los marcadores de placas de A β (Tio-S) y el marcador endotelial IB4. En el panel superior se muestran imágenes de un ratón control y en el inferior imágenes tomadas en un ratón *APP-PSEN1/+*. Las puntas de flecha señalan focos *Plaur*⁺. Las barras de escala son de 20 μ m. El gráfico de la derecha representa la densidad de células *Plaur*⁺ (células/mm²) en animales controles y en regiones distales y proximales a las placas. Se muestra la media \pm el error estándar de la media ($n=3$; ** $p<0,01$; prueba de la t de Student).

IB4 es un marcador bien descrito de las anomalías vasculares observadas en modelos de NPA (Lobov y col. 2007; Noguera-Troise y col. 2007; Ridgway y col. 2006; Suchting y col. 2007) y, morfológicamente, estas anomalías se caracterizan por un acúmulo de células *tip*. En las regiones alejadas a las placas, IB4 delimita la estructura del vaso sanguíneo, sin

embargo, este marcaje desaparece y es sustituido por una estructura de depósito anómala alrededor de las placas de A β (**Figura D14**), reminiscente, aunque no idéntica, a las encontradas en la retina de modelos de NPA. Las anomalías estructurales IB4⁺ no están perfundidas (EB⁻) y se originan a partir de vasos sanguíneos bien delimitados y perfundidos (IB4⁺; EB⁺) recordando a la forma típica de un algodón de azúcar.

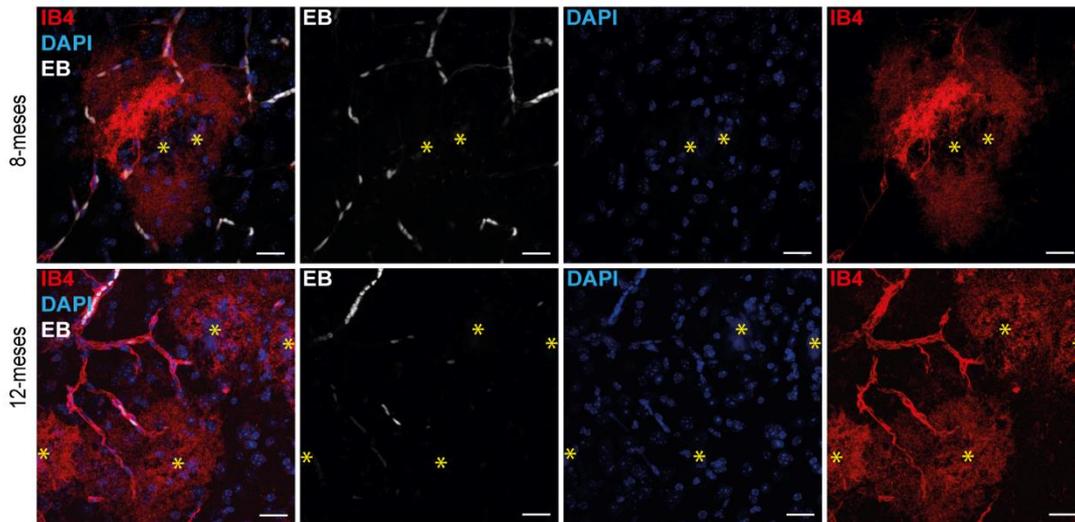
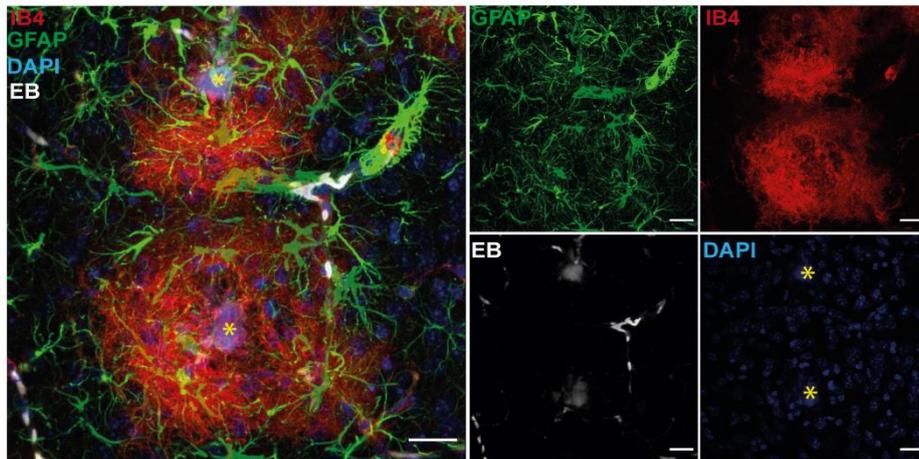


Figura D14. El estudio de la NPA mediante IHC con el marcador IB4 muestra la presencia de anomalías IB4⁺ hipoperfundidas alrededor de las placas de A β . Proyecciones de corteza cerebral obtenidas en el microscopio confocal de ratones APP-PSEN1/+ de 8 meses (panel superior) y 12 meses de edad (panel inferior) inyectados con el marcador de perfusión EB (blanco) y teñidos con el marcador de células endoteliales IB4 (rojo) y el marcador nuclear DAPI (azul). Las placas de A β están marcadas con un asterisco. Las barras de escala son de 20 μ m.

Debido a la estrecha relación observada entre las placas de A β y las anomalías estructurales IB4⁺, nos planteamos si este depósito pudiera proceder de los dos tipos celulares asociados a las placas amiloides: astrocitos y microglía. No obstante, tras estudios exhaustivos por IHC, en ningún caso se observó colocalización entre estas estructuras y los astrocitos o las células microgliales (**Figura D15**). Además, con objetivo de evaluar la posible contribución de la activación del sistema inmunitario cerebral a la formación de dichas estructuras, se recurrió a un modelo experimental murino de esclerosis múltiple (EAE; del inglés, *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*, modelo cedido por el laboratorio del Dr. Fernando de Castro, Instituto Cajal/CSIC, Madrid) en el que la respuesta inmunitaria está hiperactiva. Se incluyeron 3 animales controles y 12 ratones EAE distribuidos en tres estadios clínicos dentro de la patología (4 inicio, 4 pico, 4 post-pico). Los resultados demuestran que no existen estructuras anómalas IB4⁺ en este modelo, a pesar de la fuerte actividad glial observada alrededor de las células endoteliales (0 estructuras IB4⁺ en 103 focos autoinmunes examinados) (**Figura D16**). Los resultados de

este análisis histológico apoyan fuertemente la naturaleza vascular de la estructura IB4⁺ localizada en torno a las placas de A β .

A



B

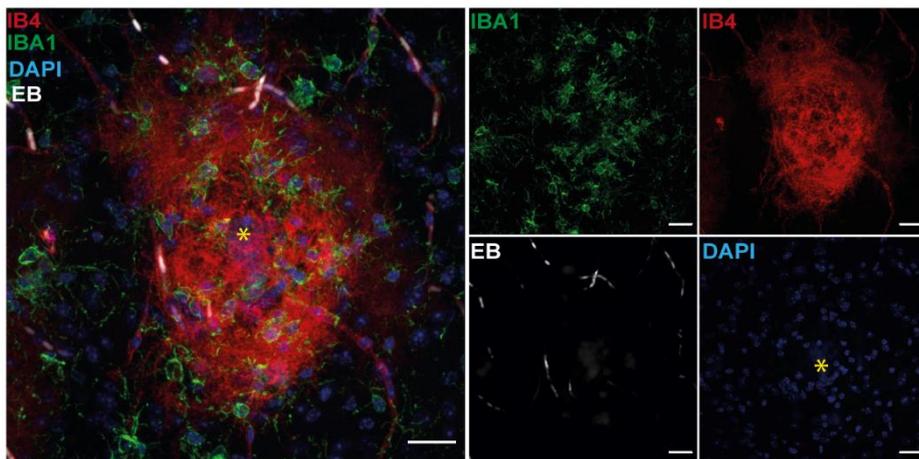


Figura D15. Las anomalías IB4⁺ no se originan a partir de los astrocitos ni de la microglía asociados a las placas de A β . Proyecciones coroneales de corteza cerebral de ratones *APP-PSEN1*/⁺ de 8 meses de edad obtenidas en el confocal. (A, B) Imágenes representativas de corteza cerebral marcadas con EB (perfusión), IB4 (rojo; marcador endotelial), GFAP (verde; marcador de astrocitos) (A) o IBA1 (verde; marcador de microglía (B) y DAPI (azul; marcador nuclear) en las que queda reflejado que la estructura anómala IB4 no coincide con el marcaje de astrocitos ni de microglía

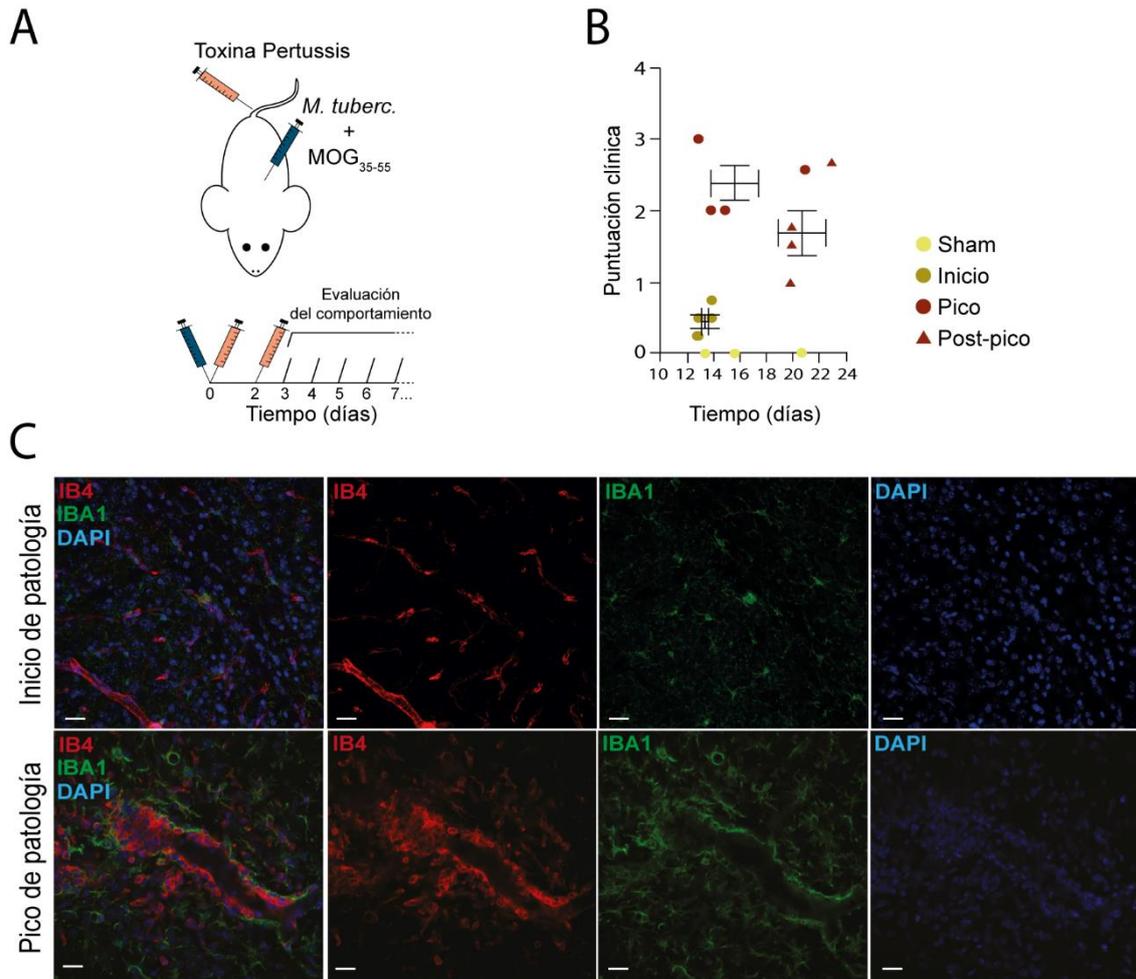


Figura D16. El modelo murino de EAE no presenta anomalías IB4+. (A) Representación esquemática de la generación de un modelo murino de EAE. MOG₃₅₋₅₅: *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein*, incluyendo los aminoácidos desde la posición 30 a la 55. Modelo cedido por el laboratorio del Dr. Fernando de Castro, Instituto Cajal/CSIC, Madrid. (B) La puntuación clínica basada en el comportamiento y la evolución en el tiempo se usaron para clasificar a los ratones como: control (Sham), inicio, pico o post-pico de patología. (C) Proyecciones coronales de corteza cerebral de ratones clasificados en el inicio (panel superior) y pico de patología (panel inferior) teñidas con el

En el modelo murino *APP-PSEN1/+* las anomalías vasculares siempre se encontraron en zonas que contenían placas de A β (Figura D17.A-B), independientemente de la región anatómica cerebral (corteza, hipocampo y cuerpo calloso) (Figura D17.C) y cubrían hasta el 5% del total de la corteza en ratones de 12 meses de edad. En animales de 8 meses el porcentaje de carga de IB4 se reducía a la mitad, lo que sugiere que estas anomalías vasculares se acumulan con el transcurso de la patología, no siendo detectadas en ningún caso en los controles (Figura D17.D). Además, mediante la técnica de clarificación iDISCO, se obtuvo una reconstrucción del cerebro completo de un ratón *APP-PSEN1/+* marcado con IB4, que sirvió para mostrar nuevamente la elevada carga de anomalías vasculares distribuidas uniformemente por todo el cerebro en un modelo de EA (Figura D18).

Nuestro estudio de expresión diferencial global en células endoteliales y la acumulación de marcadores de NPA a nivel histológico (Plaur y tinción anormal IB4) sugieren un fallo en la señalización mediada por Notch, lo que involucra directamente al complejo γ -secretasa, cuya subunidad catalítica es precisamente la PSEN1, encargada de procesar al receptor NOTCH (**Figura D11.A**). Aunque el modelo *APP-PSEN1/+* sólo expresa mutaciones dominantes en neuronas (dirigidas bajo la expresión del promotor priónico *Prpn*), para evitar posibles implicaciones del alelo de *PSEN1* mutado en las células endoteliales, se decidió recurrir al modelo *APP₇₅₁SL/+* y evaluar así la presencia de anomalías vasculares IB4⁺ en ausencia de mutaciones en *PSEN1*.

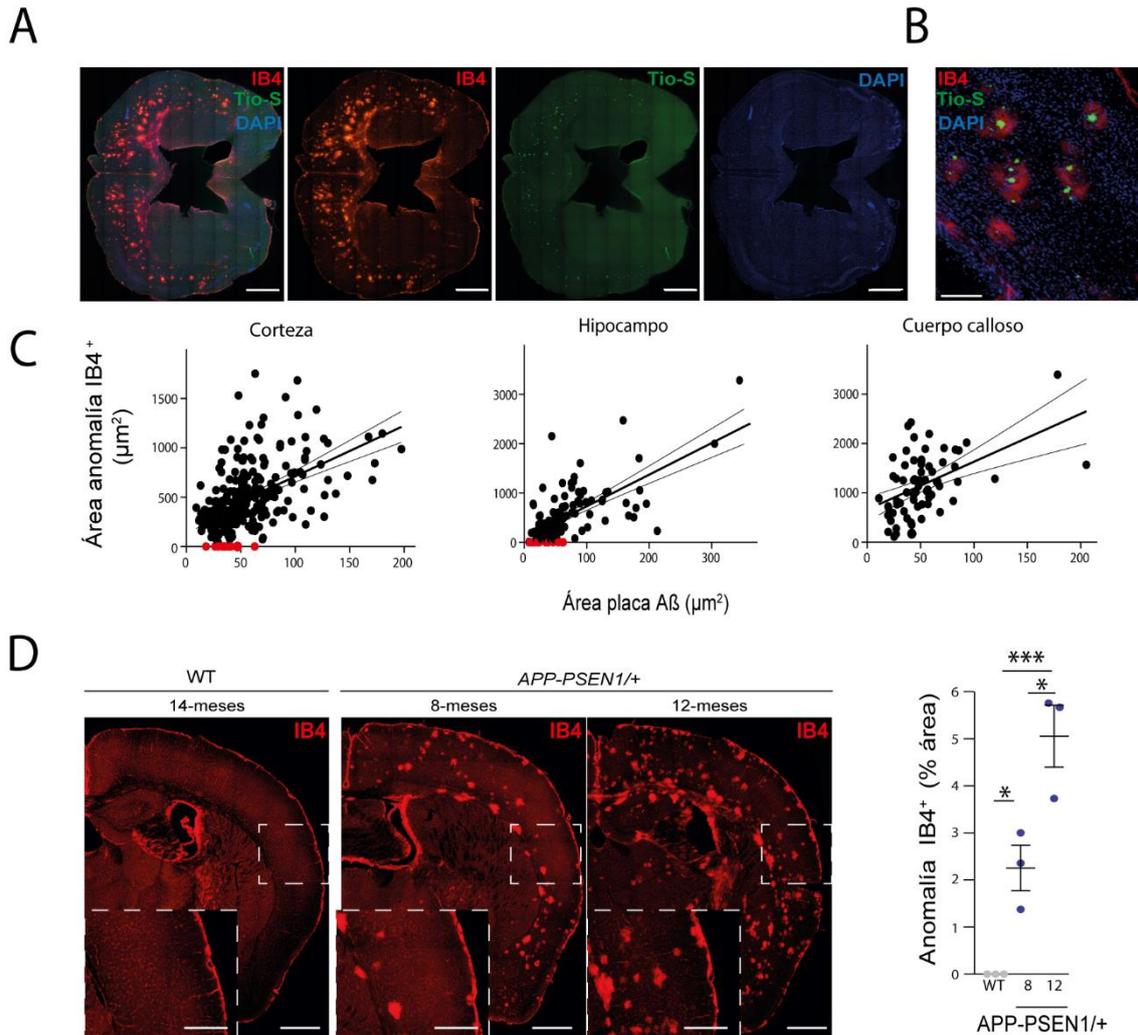


Figura D17. Las anomalías vasculares IB4⁺ se asocian a las placas de A β y se acumulan en el cerebro de ratones *APP-PSEN1/+* durante el curso de la patología. (A) Super imagen xy obtenida en el microscopio New Cast del cerebro de un ratón *APP-PSEN1/+* de 12 meses de edad teñidas con IB4 (rojo), el marcador de placas amiloides (Tio-S; verde) y DAPI (azul). En el panel de la izquierda se muestra la super imagen fusionada de los tres canales. Las barras de escala son de 500 μm . (B) Imagen de confocal de una sección coronal de corteza cerebral perteneciente a un ratón *APP-PSEN1/+* de 8 meses de edad marcada con IB4, Tio-S y DAPI. La barra de escala es de 100 μm . (C) Correlación entre el tamaño de las anomalías vasculares IB4⁺ y el tamaño de las placas de A β en diferentes regiones cerebrales de ratones *APP-PSEN1/+* de 8 y 12 meses de edad. La línea gruesa representa el ajuste de correlación, mientras que las líneas delgadas determinan el intervalo de confianza del 95%. Los puntos rojos representan placas de A β sin anomalías vasculares asociadas. Corteza: $n = 263$ placas procedentes de 5 ratones; $r^2 = 0.2487$; $y = 5.193x + 197.3$; $p < 0.0001$; Correlación de Spearman. Hipocampos: $n = 125$ placas procedentes de 5 ratones; $r^2 = 0.4672$; $y = 6.411x + 89.35$; $p < 0.0001$; Correlación de Spearman. Cuerpo calloso: $n = 69$ plaques procedentes de 5 ratones; $r^2 = 0.2415$; $y = 9.7x + 660.7$; $p < 0.0001$; Correlación de Spearman. (D) Cuantificación del porcentaje de corteza cerebral ocupada por anomalías vasculares IB4⁺. Se representa la media \pm el error estándar de la media. ($n = 3$ ratones *APP-PSEN1/+* de 8 meses de edad, WT y *APP-PSEN1/+* de 12 meses de edad); * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; test ANOVA seguido del test de Tukey). Las barras de escala son de 1 mm en las imágenes de bajo aumento y de 500 μm en las imágenes de alto aumento.

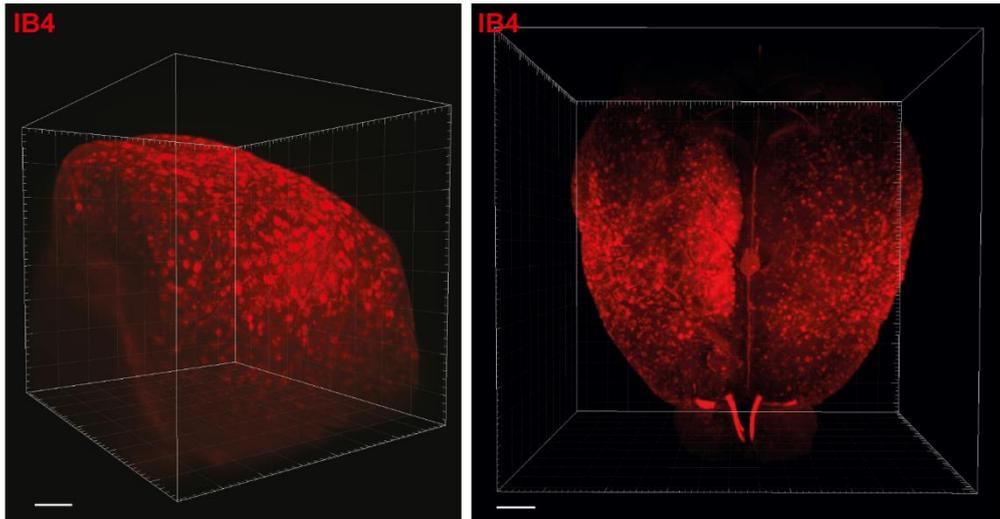


Figura D18. Representación en 3D del cerebro de un ratón *APP-PSEN1/+* clarificado mediante la técnica iDISCO. Cerebro completo de un ratón *APP-PSEN1/+* de 10 meses de edad marcado con IB4 para visualizar las estructuras vasculares y clarificado mediante la técnica de iDISCO. Las barras de escala son de 500 μm . Las imágenes fueron adquiridas por Rocío González Martínez en el laboratorio de la Dra. Eloisa Herrera, Instituto de Neurociencias/CSIC, Alicante).

En el modelo *APP₇₅₁SL/+*, un modelo más rápido de deposición de placas de A β , el patrón de distribución de las anomalías vasculares era idéntico al que se había observado en el modelo anterior. Es decir, estas estructuras siempre aparecían asociadas a una placa amiloide, la proporción de tamaño entre anomalías y placas era equiparable (**Figura D19.A**) y la carga de IB4 en la corteza a 8 meses de edad era considerablemente mayor que en ratones *APP-PSEN1/+* de la misma edad, debido a la mayor carga de placas de A β (**Figura D19.B**). Para confirmar cuantitativamente la conexión entre las estructuras anómalas IB4⁺ y las placas de A β , se realizaron tinciones combinadas con Tio-S e IB4 en ratones *APP₇₅₁SL/+* de 3 y 5 meses de edad. En este caso, en el que el número de placas de A β era nulo (3 meses) o muy escaso (5 meses) la presencia de anomalías vasculares siempre se asoció con el depósito Tio-S⁺ (**Figura D19.C**). Estos datos excluyen la posibilidad de que la mutación de *PSEN1* en el modelo *APP-PSEN1/+* sea la responsable de las alteraciones vasculares y sugiere firmemente que es la placa de A β la que induce tal desorganización.

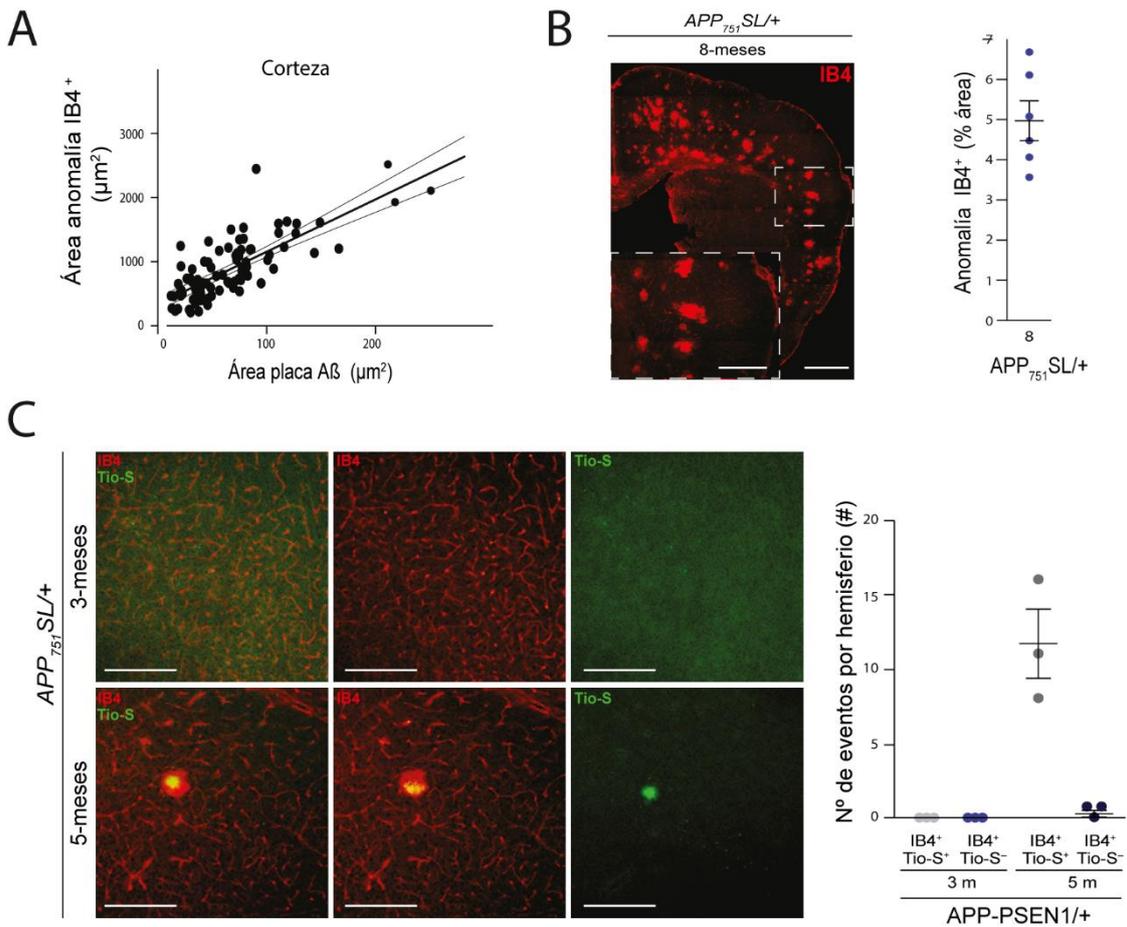


Figura D19. Las anomalías vasculares IB4⁺ del modelo *APP*₇₅₁*SL/+* son idénticas a las observadas en el modelo *APP-PSEN1/+*. (A) Correlación entre el tamaño de las anomalías vasculares IB4⁺ y el tamaño de las placas de Aβ en la corteza cerebral de ratones *APP*₇₅₁*SL/+* de 8 meses de edad. La línea gruesa representa el ajuste de correlación, mientras que las líneas delgadas determinan el intervalo de confianza del 95%. Corteza: $n = 90$ placas pertenecientes a 6 ratones; $r^2 = 0.5943$; $y = 4.107x + 360.1$; $*** p < 0.0001$; Correlación de Spearman. (B) Porcentaje de área de la corteza cerebral ocupada con las anomalías vasculares IB4⁺ en ratones *APP*₇₅₁*SL/+* de 8 meses de edad. Se representa la media \pm el error estándar de la media ($n=6$ ratones). (C) Estudio temporal de la aparición de anomalías vasculares IB4⁺ en relación a las placas de Aβ (Tio-S⁺). En el panel de la izquierda se muestran imágenes coronales representativas de corteza cerebral pertenecientes a ratones *APP*₇₅₁*SL/+* de 3 (parte superior) y 5 meses de edad (parte inferior) marcadas con IB4 (rojo) y el marcador de placas amiloides Tio-S (verde). Las barras de escala son de 200 μm. En la gráfica de la derecha se muestra la cuantificación del número de anomalías vasculares (IB4⁺) y placas de Aβ (Tio-S⁺) en ratones de 3 y 5 meses de edad. Se representa la media \pm el error estándar de la media ($n=3$ ratones por grupo).

Una última aproximación que confirmaría si la placa de Aβ es responsable de la formación de la anomalía vascular, sería estudiar su aparición en otros modelos de Alzheimer diferentes a los ya estudiados. Para ello, seleccionamos un modelo que deposita la proteína TAU fosforilada (*MAPT*_{p.P301S}) y otro que deposita el péptido amiloide sobre un fondo genético de diabetes tipo 2 (*APP-PSEN1; lepr*^{db/db}, cedidos por la Dra. Mónica García-Alloza, Universidad de Cádiz). En el primer caso, se realizaron tinciones combinadas

de IB4, EB y AT8, que reacciona con la forma fosforilada mutada de la proteína TAU, y no se detectaron alteraciones vasculares entorno a los ovillos neurofibrilares tan característicos de este modelo (**Figura D20**). Por otro lado, en el modelo genético que combina la patología de Alzheimer con la diabetes tipo 2, sí que se identificaron anomalías vasculares entorno a las placas, tal y como habíamos descrito anteriormente (**Figura D21**). Todos estos resultados confirman que los depósitos amiloides son los responsables de la desorganización vascular observada entorno a ellos.

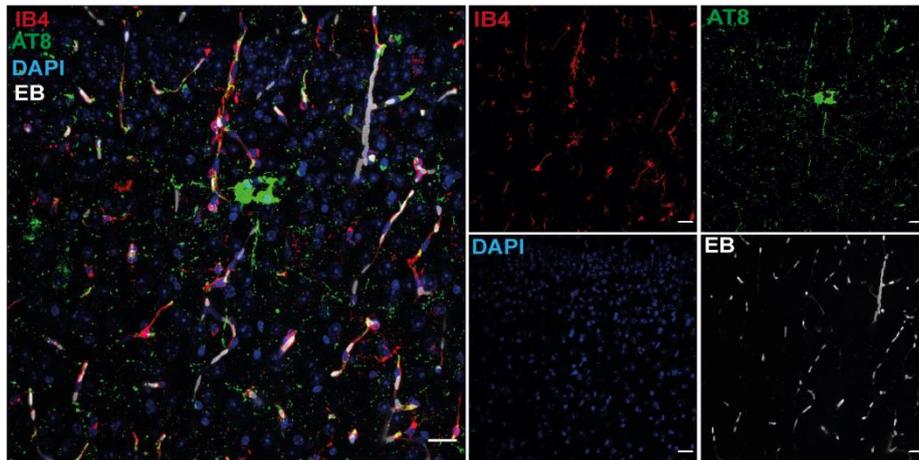


Figura D20. Estudio de la vasculatura cerebral en el modelo murino *MAPT^{p.P301S}*. Se muestra una proyección de una sección coronal de hipocampo cerebral de un ratón *MAPT^{p.P301S}* de 7 meses de edad teñida con el marcador endotelial IB4 (rojo), el marcador de ovillos neurofibrilares AT8 (verde), el marcador de perfusión *Evans blue* (EB; blanco) y DAPI (azul). Las barras de escala son de 20 μ m.

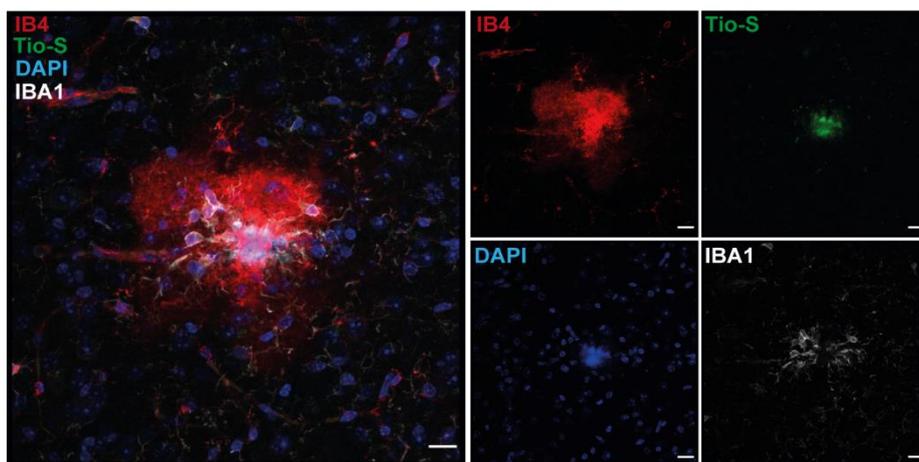


Figura D21. Estudio de la vasculatura cerebral en el modelo murino *APP-PSEN1; lepr^{db/db}*. Se muestra una proyección de una sección coronal de corteza cerebral de un ratón *APP-PSEN1; lepr^{db/db}* de 7 meses de edad teñida con el marcador endotelial IB4 (rojo), el marcador de placas amiloides Tio-S (verde), el marcador de perfusión *Evans blue* (EB; blanco) y DAPI (azul). Las barras de escala son de 20 μ m.

2.1.3. Las anomalías IB4⁺ son cicatrices vasculares (VaS) que sustituyen a los vasos sanguíneos

Para evaluar si las anomalías IB4⁺ se caracterizaban por la pérdida de marcadores vasculares, tal y como se había observado en las proximidades de las placas de A β del cerebro de pacientes (Kalaria, 1997; M. Kawai y col. 1990; Mitsuru Kawai y col. 1992; Sengillo y col. 2013; Sweeney y col. 2018) y de modelos murinos (Kouznetsova y col. 2006; Lee y col. 2005; Meyer y col. 2008), se decidió estudiar la morfología de los capilares sanguíneos mediante los marcadores que forman parte de la unidad neurovascular (UNV). La UNV garantiza el acoplamiento entre el flujo sanguíneo y la actividad neuronal y dicha función se obtiene gracias a diferentes tipos celulares y a las características específicas de las células endoteliales cerebrales: Laminina (marcador de la membrana basal), CD31 o PECAM1 (del inglés, *Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule 1*) (marcador de las células endoteliales), PDGFR β (del inglés, *Platelet Derived Growth Factor Receptor β*) (marcador de pericitos) y AQP4 (del inglés, *Aquaporin-4*) (marcador de los pies astrocitarios) (**Figura A11**). Desde este momento, y salvo que se especifique lo contrario todos los estudios fueron realizados en el modelo *APP_{751SL}/+*, pues a pesar de haberse demostrado que la expresión de *PSEN1* no era la responsable de las alteraciones vasculares, quisimos evitar cualquier distorsión en los resultados por la presencia de mutaciones en esta proteína.

En primer lugar, se examinó la distribución de Laminina, un componente de la membrana basal de las células endoteliales, combinándola con el marcador IB4. Como era de esperar, ambos marcadores delimitan el trayecto de los vasos que se encuentran alejados de las placas de A β , sin embargo, la tinción de Laminina se redujo en las anomalías vasculares (**Figura D22**). Se cuantificó el área ocupada por Laminina en un radio de 50 μ m entorno a la placa de A β y en la región delimitada por la anomalía vascular y se observó una reducción significativa en ambos casos en relación a las regiones distales o a los ratones controles. Nuevamente, no se obtuvieron diferencias entre los ratones controles y las regiones distales del modelo de EA (**Figura D22**).

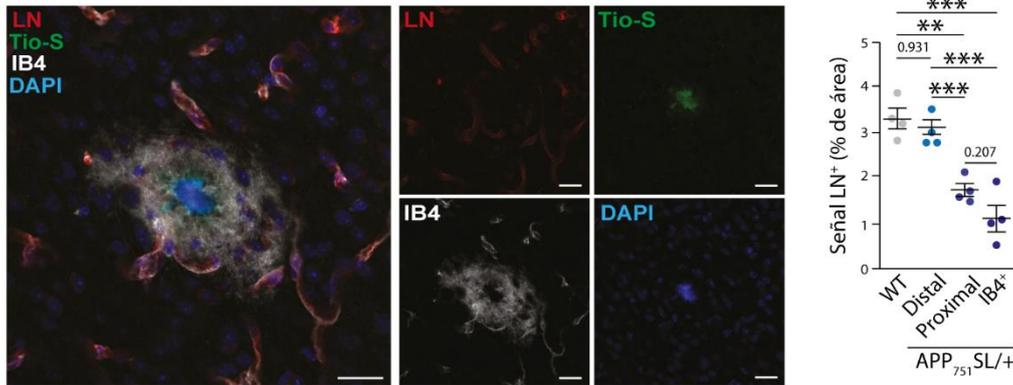


Figura D22. Reducción de la membrana basal endotelial en las proximidades de las placas de A β . En el panel de la izquierda se observa la proyección de una sección coronal de corteza cerebral perteneciente a un ratón $APP_{751}SL/+$ de 8 meses de edad teñida con un marcador de membrana basal endotelial (Laminina; LN, rojo), IB4 (blanco), Tio-S (verde) y el marcador nuclear DAPI (azul). Las barras de escala son de 20 μ m. La gráfica de la derecha representa la cuantificación del área ocupada por el marcador LN en animales controles (WT), así como en regiones distales y proximales a las placas amiloides, y en la región ocupada por la anomalía vascular IB4 (IB4⁺). Se representa la media \pm el error estándar de la media ($n=4$ ratones; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; test ANOVA seguido del test de Tukey).

Al igual que sucedía con la laminina, el marcador CD31 (PECAM1; del inglés, *Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule 1*), que intervienen en las uniones estrechas TJ favoreciendo la función barrera del endotelio cerebral, también se reducía en las regiones proximales a placa, mientras que no se observaron diferencias entre los ratones controles y las regiones distales del ratón mutante (**Figura D23**).

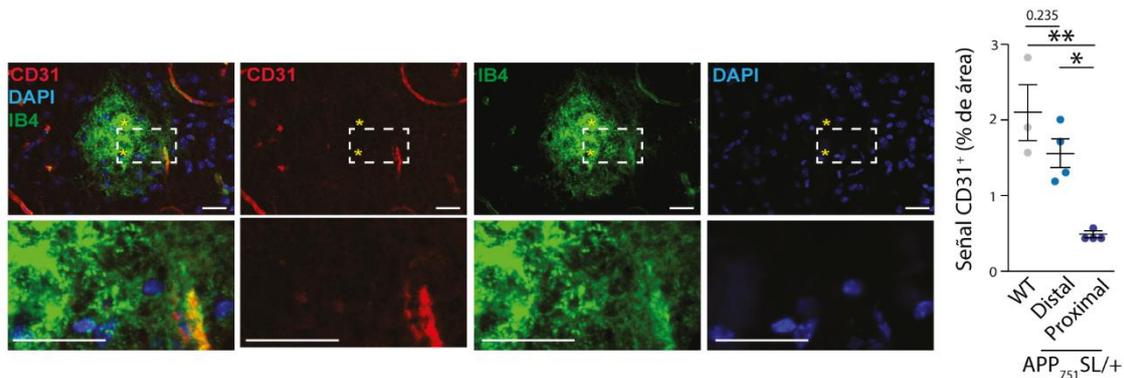


Figura D23. Reducción de células endoteliales en las proximidades de las placas de A β . En el panel de la izquierda se muestra la proyección de una sección coronal de corteza cerebral perteneciente a un ratón $APP_{751}SL/+$ de 8 meses de edad teñida con el marcador de uniones estrechas (CD31; rojo), IB4 (verde) y el marcador nuclear DAPI (azul). Los asteriscos marcan la presencia de placas de A β . En el panel inferior se muestra un aumento de la región destacada arriba con un cuadro discontinuo. Las barras de escala son de 20 μ m. En la gráfica de la derecha se muestra la cuantificación del área ocupada por el marcador CD31 en animales controles (WT), así como en regiones distales y proximales a las placas amiloides. Se representa la media \pm el error estándar de la media ($n=4$ ratones; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; test ANOVA seguido del test de Tukey).

En cuanto a los pericitos, se ha descrito una reducción del número en pacientes y modelos de EA que correlaciona la carga de placas de A β (Sengillo y col. 2013; Sweeney y col. 2018). De igual manera, el marcador de pericitos, PDGFR β , se pierde en la anomalía vascular y, al igual que con el resto de los marcadores, no se observaron diferencias entre los ratones controles y las regiones distales a las placas (**Figura D24**).

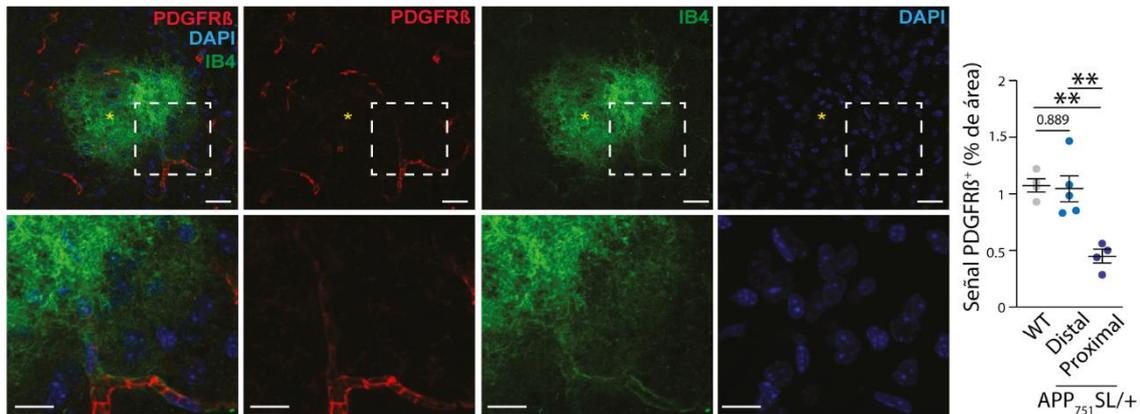


Figura D24. Reducción de pericitos (PDGFR β) en las proximidades de las placas de A β . A la izquierda se observa la proyección de una sección coronal perteneciente a un ratón *APP₇₅₁SL/+* de 8 meses de edad teñida con un marcador de pericitos (PDGFR β ; rojo), IB4 (verde) y el marcador nuclear DAPI (azul). En el panel inferior se aumenta la región destacada arriba con un cuadro discontinuo. Las placas de A β se indican con asteriscos. Las barras de escala son de 20 μ m. En la gráfica de la derecha se muestra la cuantificación del área ocupada por PDGFR β en animales controles (WT) y en las regiones distales y proximales a placas de los ratones modelo de EA. Se representa la media \pm el error estándar de la media ($n=4-5$ ratones; ** $p < 0,01$; test ANOVA seguido del test de Tukey).

Finalmente se estudió la distribución de AQP4 (del inglés, *Aquaporin-4*), un marcador del pie astrocitario que supone la última línea celular de la BHE. Este marcaje delimita la estructura del vaso sanguíneo en las regiones distales a las placas de A β , pero dentro de la anomalía vascular aparece una señal difusa que en algunas regiones colocaliza con IB4, incluyendo algunas regiones en las que el pie astrocitario se encuentra preservado. La cuantificación de la señal AQP4 $^+$ no reveló diferencias entre los individuos controles y las regiones distales del modelo de EA, pero sí mostró una caída entorno a las placas amiloides (**Figura D25**). Los resultados obtenidos en el análisis histológico de los marcadores vasculares indican que las placas de A β son áreas avasculares donde los vasos han sido sustituidos por una señal anómala IB4 $^+$.

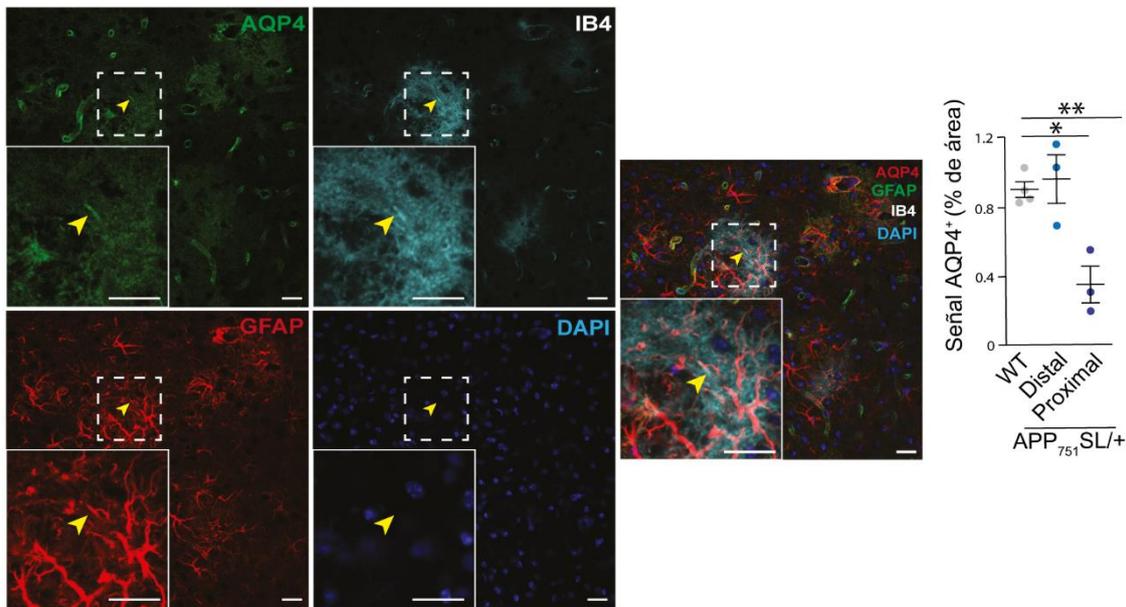


Figura D25. Los vasos sanguíneos localizados en las regiones cercanas a las placas de A β pierden el pie astrocitario. En el panel de la izquierda se muestra una proyección coronal procedente de la corteza cerebral de un ratón *APP₇₅₁SL/+* de 8 meses de edad teñida con un marcador del pie astrocitario (AQP4; verde), IB4 (blanco), un marcador astrocítico (GFAP; rojo) y DAPI (azul). El recuadro muestra la región destacada con un cuadro discontinuo en la imagen de menos aumento. Las puntas de flecha amarillas señalan la presencia de un pie astrocitario (AQP4⁺) que está yuxtapuesto a la estructura IB4⁺. Las barras de escala son de 20 μ m. En la gráfica de la derecha se muestra la cuantificación del área ocupada por el marcaje AQP4 en animales controles y en regiones distales y proximales a las placas de A β del ratón mutante. Se representa la media \pm el error estándar de la media ($n=4$ ratones; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; test ANOVA seguido del test de Tukey).

Para localizar el marcador IB4 a nivel ultraestructural, se utilizó un anticuerpo anti IB4 conjugado con partículas de oro y se recurrió a la microscopía electrónica. El marcaje IB4⁺ fue restringido al espacio extracelular que rodea las fibras de A β , una región del parénquima que normalmente está invadida por microglía y proyecciones astrocitarias (**Figura D26**). Basándonos en su marcaje continuo en el trazado de los vasos sanguíneos alejados de las placas y en su acumulación en el espacio extracelular de las regiones próximas a estas, se decidió asignar el nombre de cicatrices vasculares (VaS; del inglés, *Vascular Scars*) a las anomalías vasculares IB4⁺. Este término también hace alusión a la persistencia del depósito IB4 en el tiempo, lo que recuerda a la evolución clínica de una cicatriz.

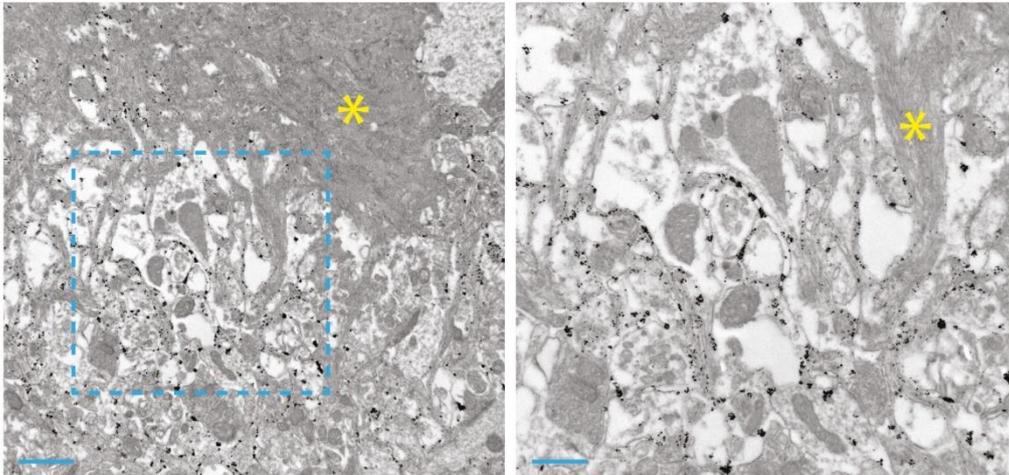


Figura D26. El estudio por microscopía electrónica revela que las anomalías IB4⁺ tienen naturaleza de cicatrices vasculares (VaS). Análisis por microscopía electrónica de la corteza de un ratón *APP_{751SL}/+* de 8 meses de edad teñida con el marcador IB4 conjugado con partículas de oro (puntos negros). La imagen de la derecha es una magnificación a alto aumento del cuadrado discontinuo resaltado en la imagen de la izquierda. Los asteriscos amarillos muestran la presencia de una placa amiloide. Las barras de escala son de 1 μ m y 0,5 μ m en las imágenes de bajo y alto aumento, respectivamente. La técnica se realizó por el Dr. José Carlos Dávila en el laboratorio de la Prof. Antonia Gutiérrez, Universidad de Málaga, Málaga.

2.1.4. La NPA induce la fagocitosis de los vasos sanguíneos asociados a las placas de A β por parte de la A β AM.

La existencia de NPA entorno a las placas, nos llevó a postular que las células endoteliales que habían entrado en angiogénesis y habían frenado su diferenciación fenotípica podrían ser reconocidas y fagocitadas debido a la expresión de marcadores endoteliales inmaduros. Las células microgliales son las principales células fagocíticas del cerebro, por tanto, decidimos estudiar la actividad fagocítica de este tipo celular asociadas a las VaS.

Con el objetivo de estudiar la contribución de la fagocitosis microglial en la pérdida de vasos sanguíneos asociada a las placas de A β , se generó un nuevo modelo genético en el que la proteína fluorescente tdTomato se expresaba condicionalmente en el citoplasma de las células endoteliales (*APP-PSEN1/+; Cdh5-Cre::ERT2/+; tdTomato/+*) tras realizarse un tratamiento con tamoxifeno (TMX). Los ratones no tratados con TMX no expresaron la proteína tdTomato (datos no mostrados), mientras que aquellos que recibieron el tratamiento mostraron dicho marcaje, independientemente de si eran ratones control o *APP-PSEN1/+*. Además, en este modelo también se observaron, aunque con baja frecuencia, células tdTomato⁺ que se movilizaban a partir de un vaso sanguíneo emitiendo filopodios, lo que podría representar el fenotipo intermedio entre célula *tip/stalk* (Figura D27.A). Curiosamente, estas células siempre se encontraban rodeadas por microglía y sus

proyecciones fueron cubiertas total o parcialmente por las proyecciones citoplasmáticas de las células microgliales (**Figura D27.A**).

Para confirmar que la actividad microglial es responsable de la pérdida local de los vasos sanguíneos asociados a las placas, se estudió la relación espacial entre ambos tipos celulares (microglía- célula endotelial) en animales controles y en regiones distales y proximales a las placas amiloides en los ratones mutantes. Imágenes a bajo aumento mostraron que A β AM rodeaba completamente a los vasos sanguíneos cercanos, hecho que no fue observado ni en los ratones controles y en la microglía alejada de las placas (**Figura D27.B**). La cuantificación de la longitud del vaso cubierta por microglía en controles y en zonas distales de las placas no mostraba diferencias, sin embargo, se observó un aumento de la cobertura del vaso alrededor de las placas de A β (**Figura D27.B**).

Finalmente, en la A β AM se observaron partículas tdTomato⁺ en el interior del citoplasma que, por su morfología circular, recordaban a los bolsillos fagocíticos descritos anteriormente en la microglía (Sierra y col. 2010). Estos bolsillos fagocíticos tdTomato⁺ se encontraron en casi en todas las placas de A β analizadas (**Figura D27.C**) y en el 97% de los casos el marcaje tdTomato⁺ colocalizaba con el marcador lisosomal CD68 (**Figura D28**), indicando actividad fagocítica.

En resumen, nuestros resultados confirman que los vasos sanguíneos asociados a las placas de A β sufren un proceso de NPA en el que se acumulan células endoteliales con un fenotipo indiferenciado entre *tip/stalk* y dada su naturaleza patológica son reconocidas por la A β AM que las elimina por fagocitosis (**Figura 29**).

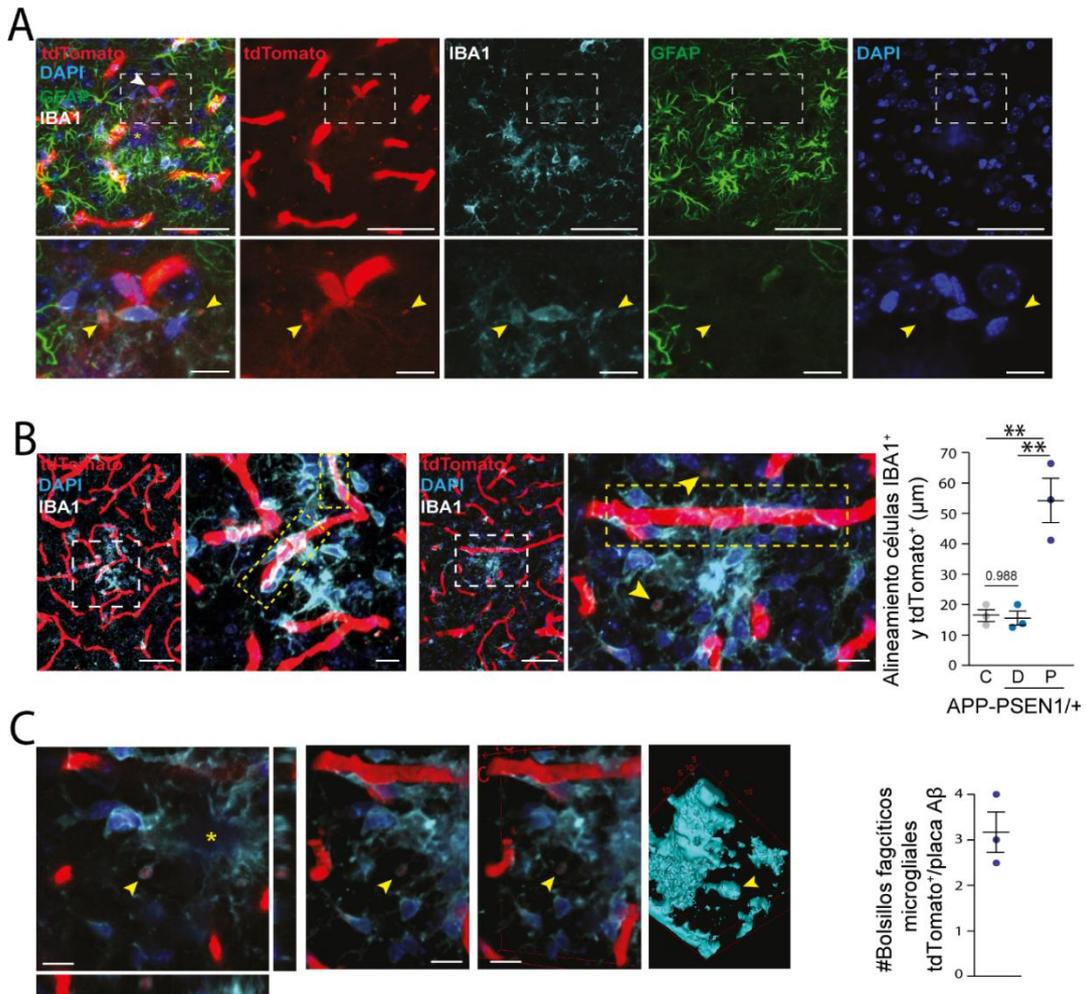


Figura D27. La AβAM fagocita los vasos sanguíneos que sufren un proceso de NPA. (A-C) Imágenes de secciones coronales de corteza cerebral pertenecientes a ratones *Cadh5-Cre::ERT2/+; R26-LSL- tdTomato/+; APP-PSEN1/+* tratados con tamoxifeno y marcadas con el anticuerpo tdTomato (A), o con la fluorescencia emitida directamente por esta proteína fluorescente (B,C), y marcadores microgliales (IBA1; blanco), astrocíticos (GFAP; verde) y nucleares (DAPI; azul). (A) El panel inferior se muestra la región destacada en la imagen superior. Las puntas de flecha amarillas indican la internalización de partículas tdTomato⁺ en el citoplasma de la microglía. La punta de flecha blanca señala la presencia de una célula *tip* que emite proyecciones hacia una placa de Aβ. (B) Las regiones donde existe un alto alineamiento entre la microglía y los vasos sanguíneos son destacadas con un cuadro discontinuo blanco y a la derecha se muestra la imagen aumentada de dicha región (las zonas con alta alineamiento se muestran ahora con rectángulos discontinuos de color amarillo). En la gráfica de la derecha se muestra la cuantificación de la longitud de vasos tdTomato⁺ ocupada por la señal IBA1⁺ en animales controles “C” y en regiones distales “D” y proximales “P” a las placas del ratón mutante. Se representa la media ± el error estándar de la media ($n=3$ ratones; ** $p < 0,01$; test ANOVA seguido del test de Tukey). (C) El panel de la izquierda muestra una proyección en el eje z de una región aumentada destacada en (B) y los paneles de la derecha muestran diferentes giros de la visión en 3D de la imagen proyectada y una representación en 3D del volumen de la microglía (celestes). Los asteriscos indican la presencia de una placa de Aβ. En la gráfica de la derecha se muestra la cuantificación del número de bolsillos fagocíticos tdTomato⁺ promedio, localizados en las regiones proximales a las placas. Se representa la media ± el error estándar de la media ($n=3$ ratones). Las barras de escala son de 50 μm en las imágenes de menor aumento y de 10 μm en las de mayor aumento.

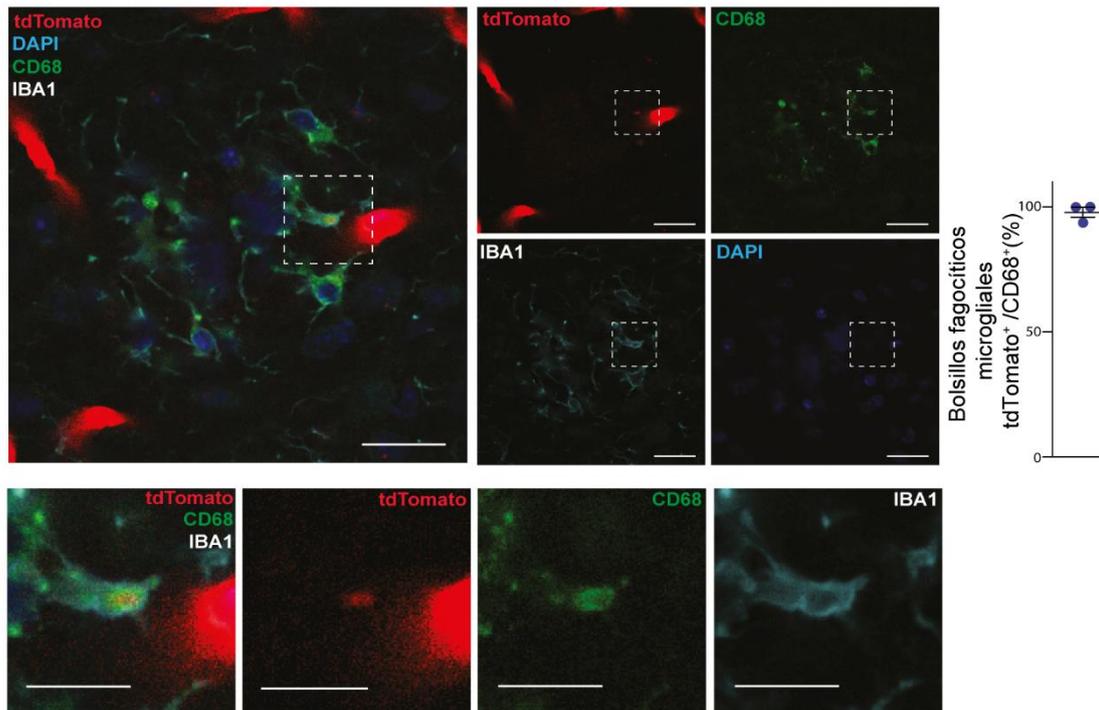


Figura D28. El marcador lisosomal CD68 confirma que las células microgliales fagocitan los vasos sanguíneos en las proximidades de las placas amiloides. En los paneles superiores se muestran imágenes representativas de secciones coronales de corteza cerebral pertenecientes a ratones *Cdh5-Cre::ERT2/+; R26-LSL-tdTomato/+; APP-PSEN1/+* tratados con tamoxifeno y marcadas con la fluorescencia emitida directamente por la proteína tdTomato (rojo) y con el marcador microglial (IBA1; blanco), lisosomal (CD68; verde) y nuclear (DAPI; azul). En el panel inferior se muestran las imágenes ampliadas destacadas con cuadros discontinuos en el panel superior. Las barras de escala son de 50 μm en las imágenes de menor aumento y de 10 μm en las de mayor aumento. En la gráfica de la derecha se muestra el porcentaje de bolsillos fagocíticos tdTomato⁺ que son positivos para el marcador lisosomal CD68. Se representa la media \pm el error estándar de la media ($n=3$ ratones).

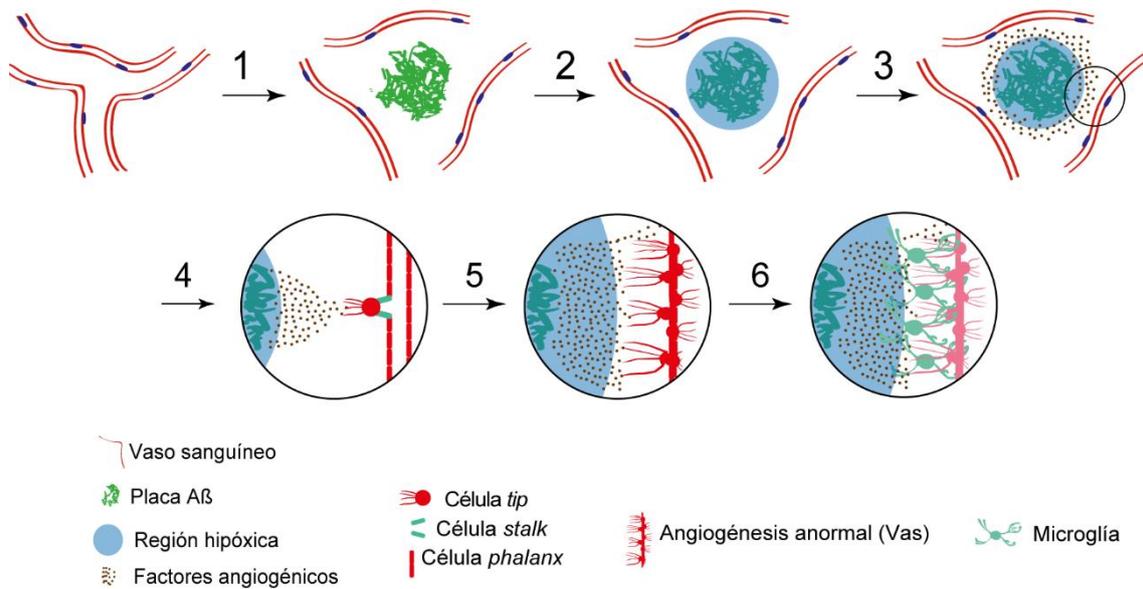


Figura D29. Modelo de trabajo del proceso de formación de VaS. La formación de una placa de Aβ supone el desplazamiento de los vasos sanguíneos periféricos, dando lugar a la aparición de un foco hipóxico (1 y 2). La hipoxia local induce la expresión de factores angiogénicos como VEGF (3) que serán reconocidos por las células endoteliales vecinas, que adquieren un fenotipo de célula *tip* (4). En las proximidades de las placas de Aβ existen un proceso de angiogénesis anormal (NPA) mediante el cual aumenta la densidad de células *tip* en el vaso inducido (5). Estas células con un fenotipo patológico indiferenciado son reconocidas por la AβAM quien da lugar a la formación de la VaS (6).

2.1.5. La pérdida de función de la inhibición lateral mediada por Notch es responsable de la formación de las VaS

Hasta ahora, se han obtenido evidencias moleculares e histológicas de NPA. La NPA supone la pérdida de función de la inhibición lateral mediada por Notch en el proceso de angiogénesis. Para confirmar la pérdida de actividad de Notch alrededor de las placas de Aβ, se generó un nuevo modelo de EA cruzando ratones *APP-PSEN1/+* con un reportero de Notch que expresa una proteína nuclear fluorescente (la histona H2B fusionada a la proteína fluorescente Venus) bajo el control sitios de unión al factor de transcripción CBF1 (Nowotschin y col. 2013) (**Figura D30.A**). Una vez que se une el ligando, NOTCH se corta por diferentes proteasas, incluyendo un corte final por el complejo γ -secretasa que libera el dominio intracelular de NOTCH (NICD) quien se transloca al núcleo, se asocia al factor de transcripción CBF1 y el complejo formado por ambos reconoce sitios de unión a CBF1 en el genoma activando la transcripción.

En primer lugar, fue necesario confirmar que la expresión del reportero coincidía con la actividad de NOTCH descrita en el cerebro adulto. En este sentido, se prestó especial atención a la zona neurogénica subventricular donde se ha observada una alta expresión y actividad para dicho receptor (Stump y col. 2002) y los resultados obtenidos mostraron una

clara señal nuclear de la proteína Venus recubriendo los ventrículos (datos no mostrados), que sirvió para validar el modelo.

En la corteza cerebral, se observó expresión del reportero en diferentes tipos celulares incluyendo el endotelio (**Figura D30.B**). La cuantificación de la expresión en el endotelio del reportero de NICD mostró una reducción significativa dentro de la anomalía vascular IB4⁺ en comparación con los animales controles o las regiones distales a placas del ratón *APP-PSEN1/+* (**Figura D30.B**).

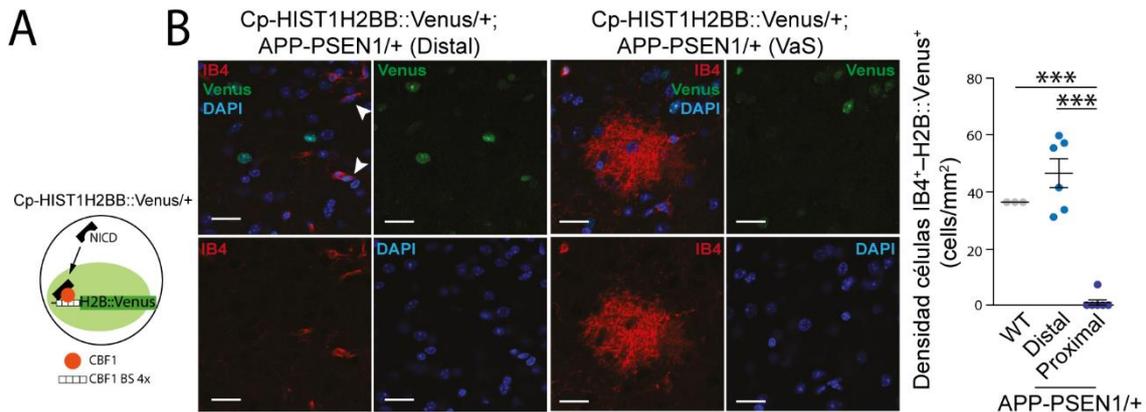


Figura D30. La vía Notch está inhibida en las proximidades de las placas amiloides. (A) Representación esquemática del modelo murino *Cp-HIST1H2BB::Venus/+*. NICD: *NOTCH intracelular domain*. CBF1 BS: CBF1 *binding sites*. (B) Secciones corticales coronales de ratones *Cp-HIST1H2BB::Venus/+; APP-PSEN1/+* de 6 meses de edad en regiones proximales y distales a las placas teñidas con IB4, DAPI y con la fluorescencia emitida directamente por la proteína Venus. Las puntas de flecha blancas muestran la presencia de células IB4⁺ que no son positivas para Venus. Las barras de escala son de 20 μ m. En la gráfica de la derecha se muestra la densidad de células doblemente positivas para IB4/Venus en los animales controles (WT) y en las regiones distales y proximales a las

En conclusión, la inducción de marcadores angiogénicos (VEGF e $I\alpha\nu\beta 3^+$), la firma molecular de NPA en las células vasculares, la presencia de VaS alrededor de las placas de A β y la pérdida de actividad de NICD asociada a estas VaS, sugieren firmemente que las placas de A β están asociadas con NPA.

2.1.6. La pérdida de función de la actividad γ -secretasa en células endoteliales reproduce las VaS en ausencia de patología amiloide

La pérdida de función de la γ -secretasa se ha relacionado tanto con casos de FAD (mutaciones en *PSEN1* y *PSEN2*) (De Strooper, 2007; Goate & Hardy, 2012; Shen & Kelleher, 2007) como con LOAD (decrecimiento en el procesamiento de NOTCH asociado con la edad) (Placanica et al., 2009). Debido al papel de la γ -secretasa en la producción de A β , la mayoría de los estudios relacionados con la actividad de γ -secretasa se han centrado en su papel en las neuronas (Shen & Kelleher, 2007). Sin embargo, las mutaciones detectadas en *PSEN1/PSEN2* modificarán la actividad γ -secretasa en todas las células y, con el

envejecimiento, la pérdida de actividad de este complejo tendrá consecuencias en distintos tipos celulares, pudiendo contribuir de este modo a la progresión de la EA. Además, se ha propuesto que los altos niveles de $A\beta_{42}$ monomérico disponibles en las proximidades de las placas de $A\beta$ pueden alterar la actividad del complejo γ -secretasa al inhibir por producto el centro activo de la PSEN1 (Shen & Kelleher, 2007).

Siguiendo esta hipótesis, se investigó la repercusión de la reducción de la actividad γ -secretasa en células endoteliales de un cerebro adulto. Para ello, se inhibió genéticamente la actividad γ -secretasa en endotelio inyectando ratones *Psen1^{loxP/loxP}; Psen2^{-/-}* con vectores adenoasociados que infectan exclusivamente el endotelio cerebral y expresan la enzima Cre recombinasa (AAV-BR1; **Figura D31.A-B**) (Körbelin y col. 2016). Primero, se validó que los vectores virales inducían una eliminación del gen *Psen1* en el endotelio cerebral. Se diseñó un amplicón por qPCR para detectar la forma de *Psen1* escindida (**Figura D31.C**) y se verificó que en los ratones inyectados se inducía la pérdida del alelo *Psen1* a los 19 y 60 días tras la inyección del vector viral (**Figura D31.C**). Curiosamente, los niveles de expresión del alelo escindido a los 60 días tendían a ser menores que a los 19 (19 días, 0.34 ± 0.12 frente a 60 días, 0.13 ± 0.06 ; t de Student: $p = 0.126$) (**Figura D31.C**).

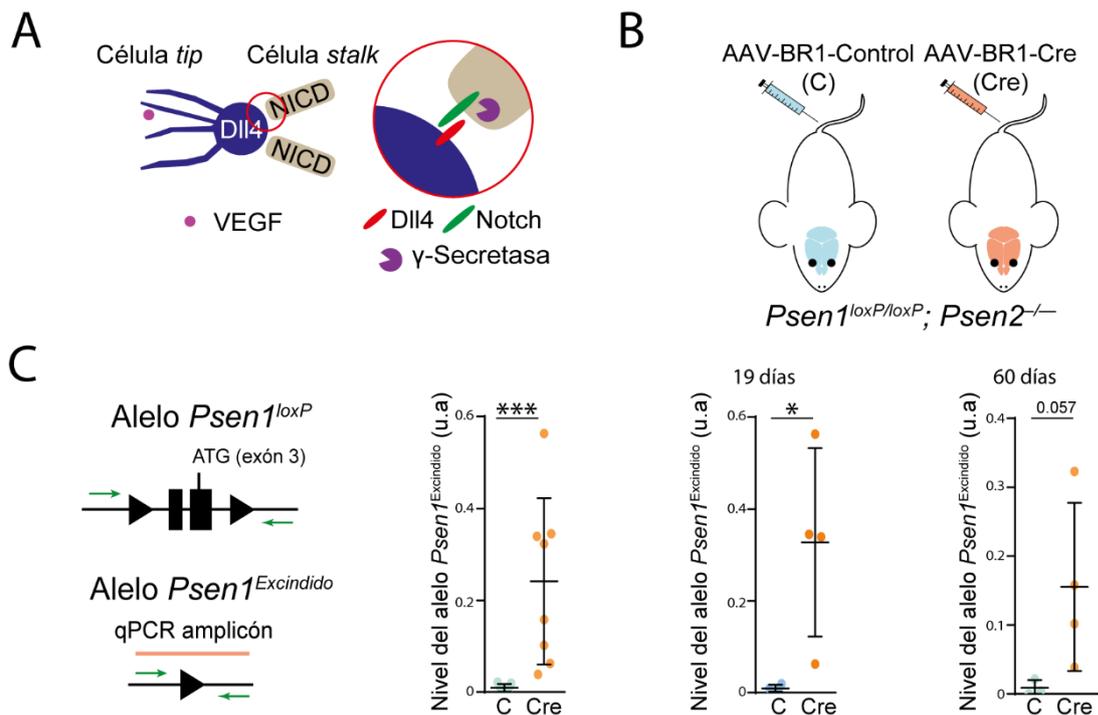


Figura D31. Modelo de inhibición de la actividad γ -secretasa en células endoteliales cerebrales. (A) Mecanismo de inhibición lateral mediado por Notch implicado en el establecimiento del fenotipo de célula *stalk*. La enzima γ -secretasa es la encargada de procesar a NOTCH y dar lugar a NICD (B) Representación esquemática de un modelo de ratón con inhibición de la actividad γ -secretasa en células endoteliales cerebrales. Se inyectaron ratones *Psen1^{loxP/LoxP}; Psen2^{-/-}* con vectores adenoasociados controles (AAV-BR1-Control; C) o virus que expresaban la enzima Cre recombinasa (AAV-BR1-Cre; Cre). Los vectores fueron cedidos por el laboratorio del Dr. Jakob Körbelin, Univeristy of Hamburg/Eppendorf. (C) Representación esquemática del amplicón de qPCR usado para detectar la presencia del alelo escindido (barra naranja). A la derecha se muestran las cuantificaciones del grado de escisión de *Psen1* (u.a.: unidades arbitrarias) en el estriado del grupo C (puntos azules) y el grupo Cre (puntos naranjas) considerando el número total de animales tratados (gráfica de la izquierda) o separados por el tiempo transcurrido tras la inyección viral (19 y 60 días). Se representa la media \pm el error estándar de la media. $n=4$ ratones en el grupo de 19 días. $n=3$ ratones “C” y 4 “Cre” en el grupo de 60 días; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; prueba de la t de Student.

Tras comprobar la efectividad de la inyección de los AAV, se verificó si la eliminación de *Psen1* tenía lugar específicamente en las células endoteliales. Para este fin, se midió la expresión de *Psen1* mediante ISH combinada con inmunofluorescencia para el marcador endotelial IB4 y se cuantificó el número de focos de ARN para *Psen1* en el parénquima cerebral (corteza y estriado). Como cabría esperar, no había diferencias significativas entre los ratones controles y los tratados con la Cre en cuanto al número total de focos de ARNm para *Psen1* (Figura D32.A). Sin embargo, cuando se cuantificaron los focos de ARNm para *Psen1* que colocalizaban con la señal de IB4, se observaba caída tanto en estriado como en corteza, siendo en este último caso un cambio significativo (Figura D32.B).

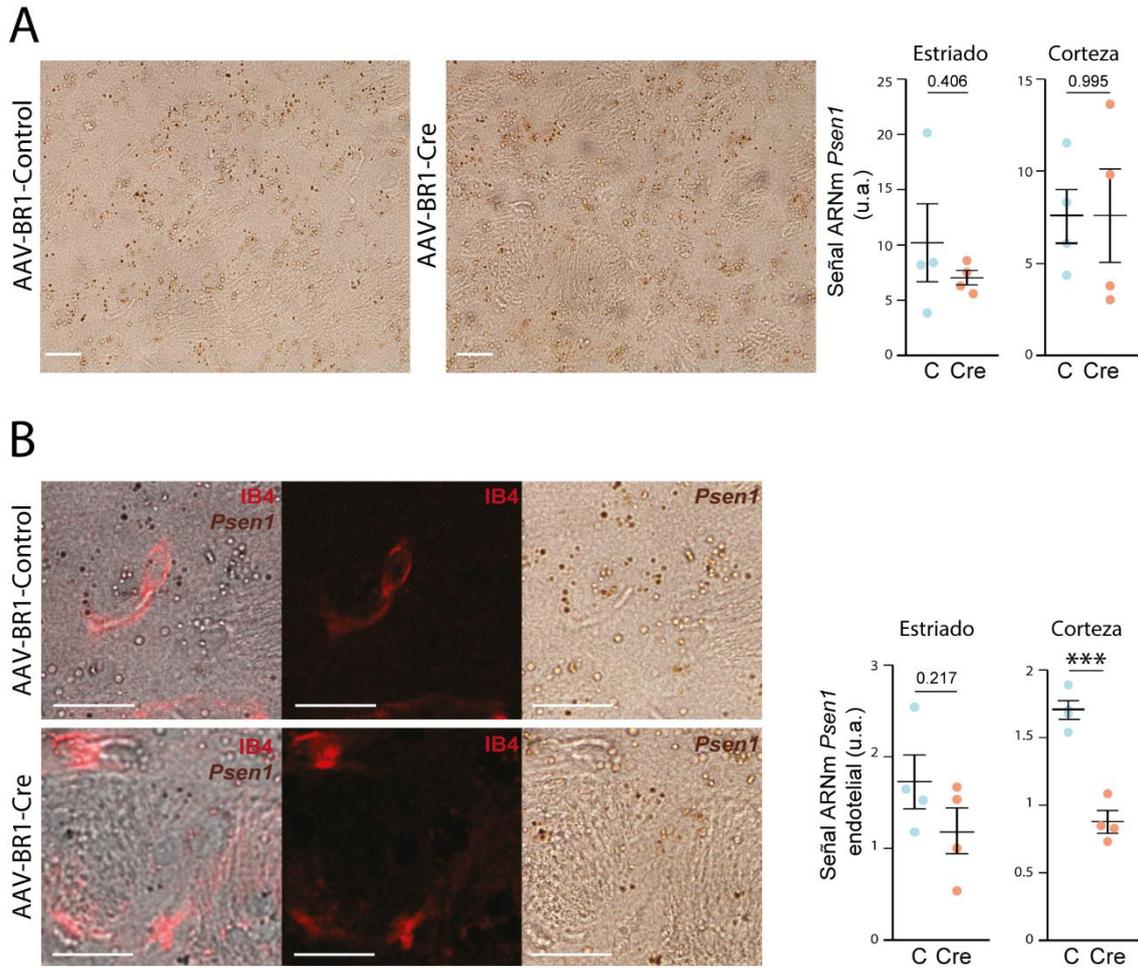


Figura D32. Validación por ISH de la pérdida del gen *Psen1* en el cerebro de los ratones tratados con la Cre tras 19 días de la inyección viral. Imágenes XY del estriado de ratones *Psen1^{loxP/loxP}; Psen2^{-/-}* y de ratones controles “C” e inyectados con la Cre “Cre” marcadas por ISH con la sonda del gen *Psen1* y combinadas por inmunofluorescencia con el marcador endotelial IB4. Las barras de escala son de 20 μ m. **(A)** A la derecha se muestra la cuantificación de la señal total de *Psen1*⁺ (u.a.: unidades arbitrarias) en el estriado (gráfica de la izquierda) y en la corteza (gráfica de la derecha) del grupo C (puntos azules) y Cre (puntos naranjas). **(B)** En las gráficas de la derecha se muestra la cuantificación de la señal de *Psen1*⁺ a nivel endotelial en el estriado (gráfica de la izquierda) y en la corteza (gráfica de la derecha) del grupo C (puntos azules) y Cre (puntos naranjas). *n*=4 ratones; *** *p* < 0,001; prueba de la *t* de Student.

Para evaluar la vasculatura en aquellos animales donde se indujo una pérdida de la actividad γ -secretasa en el endotelio cerebral, se usaron marcadores de vasos/VaS (IB4), perfusión (EB y TER119), así como marcadores de la UNV presentes en la BHE (PDGFR β y AQP4). A los 19 días tras la inyección viral no se encontraron anomalías vasculares IB4⁺ (datos no mostrados). A los 60 días, en los ratones controles la microvasculatura cerebral presentaba una estructura normal (**Figura D33**), sin embargo, en los animales tratados con la Cre los vasos estaban considerablemente alterados (**Figura D33**). Sorprendentemente, las alteraciones vasculares que se observaron eran idénticas a las VaS localizadas alrededor de las placas de A β en los modelos de EA (comparar **Figura D14** con la **Figura D33**), a pesar

de que el modelo empleado para inducir la pérdida de actividad de la γ -secretasa no acumulaba depósito amiloide. En este modelo, las anomalías vasculares IB4+ se encontraron principalmente en el estriado e hipocampo (**Figura D33**) y se caracterizaban por una caída en el marcador de pericitos (PDGFRB β , **Figura D34**) y del pie astrocitario (AQP4, **Figura D34**), así como por una pérdida de perfusión (EB y TER119, **Figura D34**). Por otro lado, para verificar que la anomalía vascular observada en estos modelos no se debía a una proliferación descontrolada, sino al proceso patológico descrito como NPA, se realizó un estudio de proliferación celular con el marcador Ki67. Los datos mostraron que las anomalías vasculares IB4+ eran negativas para dicho marcador, lo que sugería que igualmente existía una NPA que bloqueaba la diferenciación al fenotipo proliferativo de célula *stalk*. El marcaje de núcleos en la zona subgranular del hipocampo sirvió como control para validar la tinción con Ki67 (datos no mostrados).

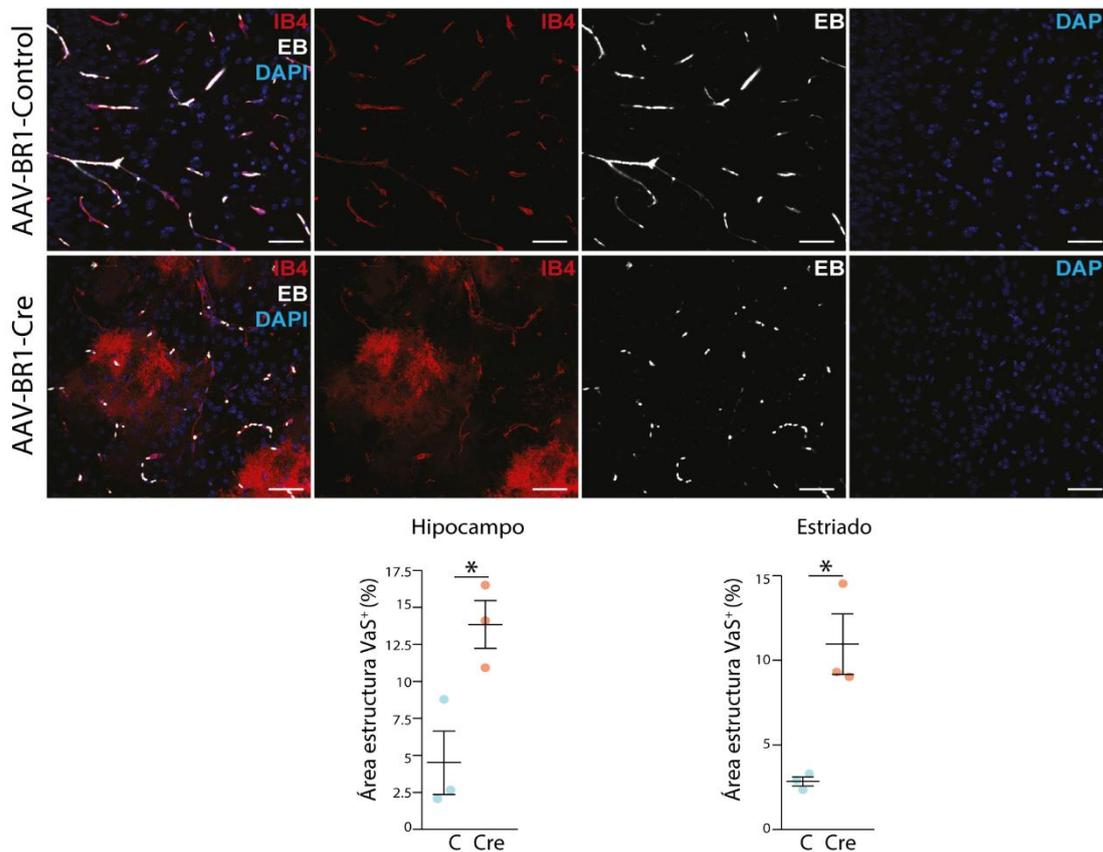


Figura D33. La inhibición endotelial de la actividad γ -secretasa es suficiente para generar anomalías vasculares IB4+. Proyecciones del estriado de ratones *Psen1^{loxP/loxP}; Psen2^{-/-}* inyectados con virus AAV-BR1-Control “C” o AAV-BR1-Cre “Cre” sacrificados 60 días después del tratamiento, perfundidos con Evans blue (EB) y marcados con IB4. Las barras de escala son de 40 μ m. Las gráficas muestran la cuantificación del porcentaje de área de hipocampo (a la izquierda) o estriado (derecha) ocupado por estructuras similares a las VaS. Se representa la media \pm el error estándar de la media. $n=3$ ratones; * $p < 0,05$; prueba de la t de Student).

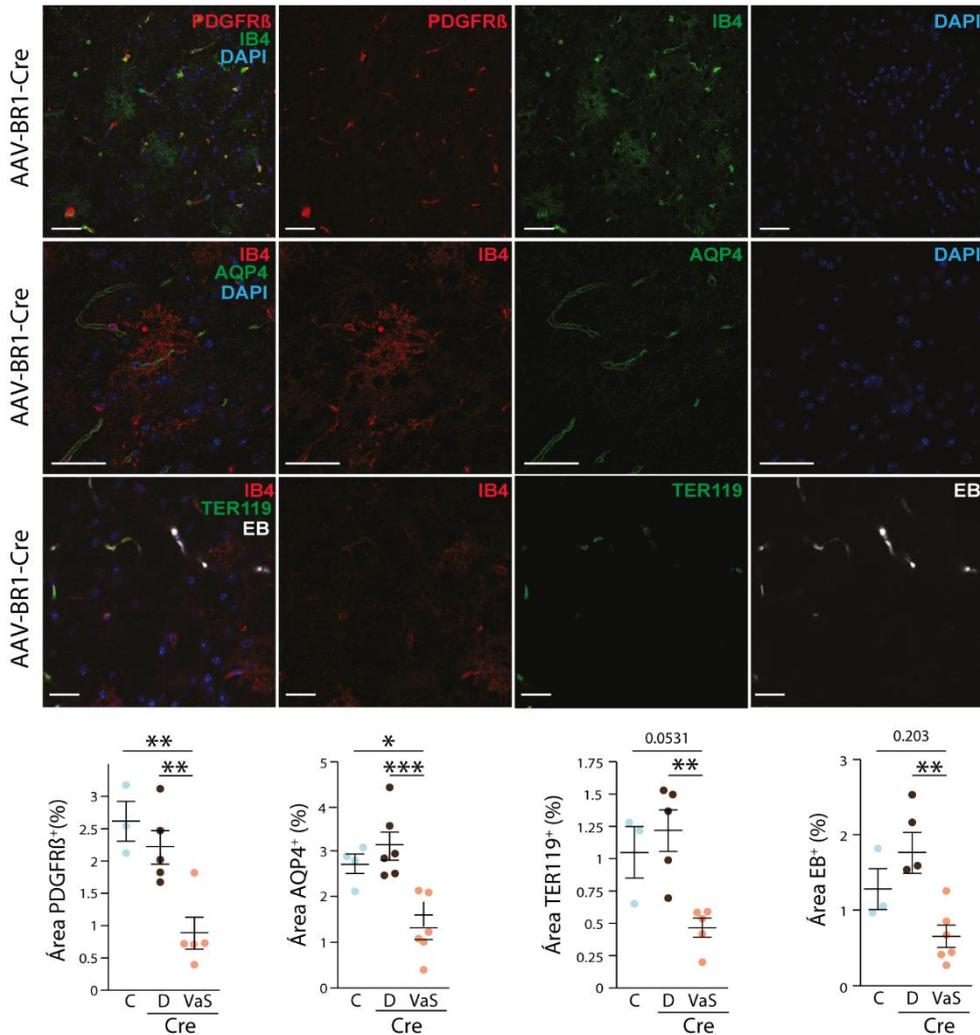


Figura D34. Las VaS originadas en el modelo de pérdida de actividad del complejo γ -secretasa también sustituyen a los marcadores de la UNV. Se muestran proyecciones de secciones de hipocampo de ratones *Psen1*^{loxP/loxP}; *Psen2*^{-/-} inyectados con virus AAV-BR1-Cre “Cre” sacrificados 60 días después del tratamiento, teñidas con distintos marcadores de perfusión y de la UNV. Panel superior: PDGFR β ; panel central: AQP4 y panel inferior: TER119 y EB. Las barras de escala son de 40 μ m. En las gráficas inferiores se muestran las cuantificaciones del porcentaje de área ocupada por cada uno de los marcadores en animales controles “C” y en regiones distales y regiones delimitadas por los VaS en el grupo de animales Cre. n=3 “C” y 6 “Cre” ratones; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; test ANOVA seguido del test de Tukey.

Por último, se planteó la posibilidad de que en este modelo la microglía también reconociera a las células endoteliales indiferenciadas y las eliminara por fagocitosis basándonos en: 1) los niveles del alelo *Psen1* escindido son mayores a los 19 días tras la inyección (donde no se observan anomalías vasculares) con respecto a los 60 y 2) la caída de los focos de ARNm de *Psen1* en endotelio es mayor en la corteza (una región donde no se observan anomalías vasculares) en relación al estriado, sugiriendo en ambos casos que las células que pierden *Psen1* y entran en un proceso de NPA son eliminadas por fagocitosis. Para verificar nuestra hipótesis se realizaron tinciones con IBA1 en dicho modelo y se

observaron bolsillos fagocíticos IB4⁺ en la microglía similares a los observados en el modelo *APP-PSEN1/+; Cadh5-Cre::ERT2/+; tdTomato/+* (Figura D35) lo que confirma la actividad fagocítica de la microglía .

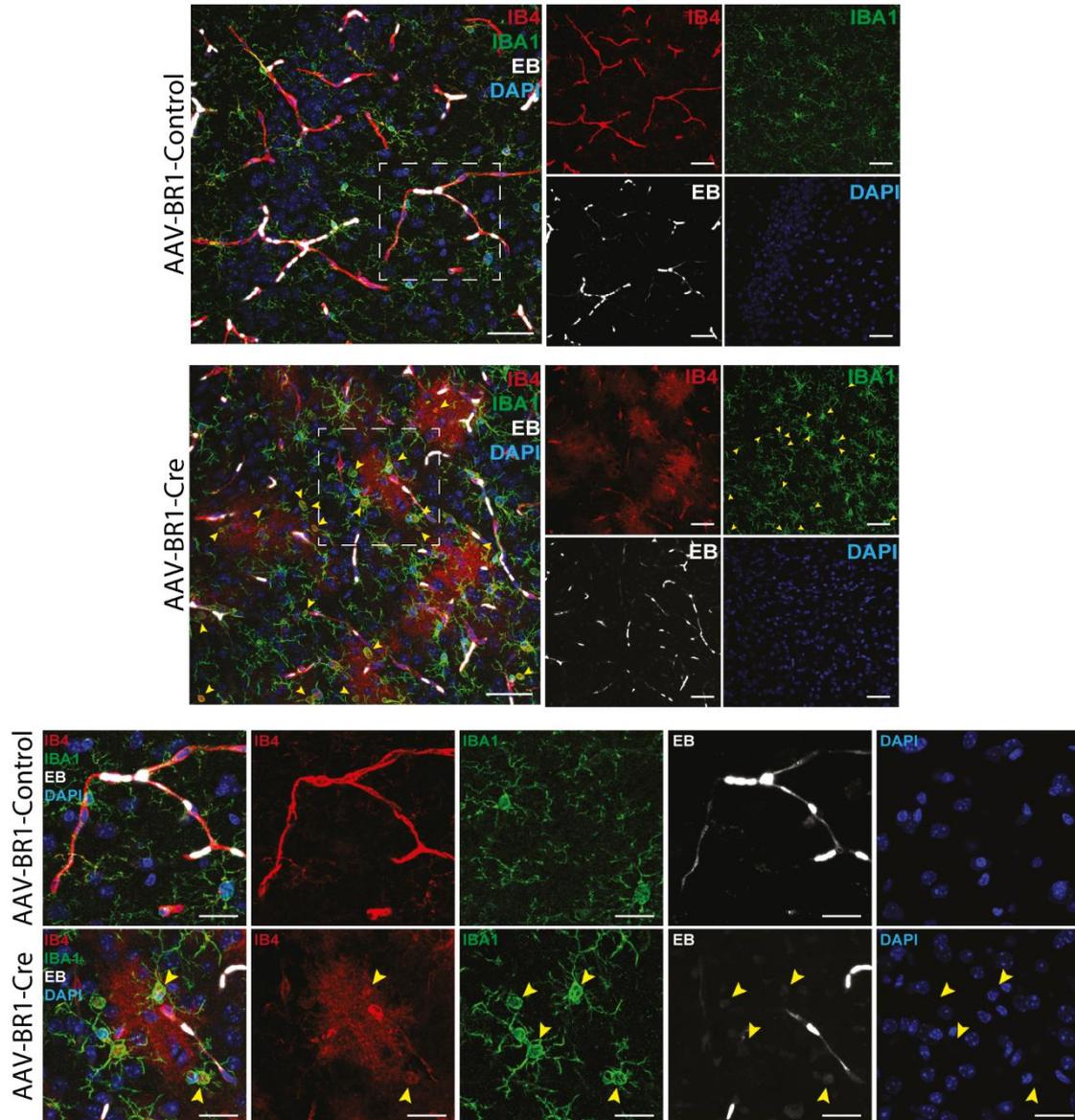


Figura D35. En el modelo de pérdida de función del complejo γ -secretasa la microglía también fagocita los vasos sanguíneos asociados a las VaS. Imágenes XY del estriado de ratones *Psen1^{loxP/LoxP}; Psen2^{-/-}* inyectados con virus AAV-BR1-Control o AAV-BR1-Cre sacrificados 60 días después del tratamiento, perfundidos con Evans blue (EB; blanco) y marcados con IB4 (rojo), IBA1 (verde) y DAPI (azul). Las puntas de flecha amarilla destacan la presencia de bolsillos fagocíticos en el citoplasma de la microglía IB4⁺. Las imágenes del panel inferior muestran las regiones destacadas en el panel de arriba con un marco discontinuo. Las barras de escala son de 20 μ m en las imágenes de bajo aumento y de 10 μ m en las imágenes de mayor aumento.

En definitiva, nuestros datos sugieren que la pérdida de actividad γ -secretasa en células endoteliales en ausencia de patología amiloide es suficiente para reproducir las VaS observadas en los modelos murinos que depositan A β .

2.2. OBJETIVO 2.2. Diseñar abordajes terapéuticos que puedan revertir el daño vascular observado en torno a las placas de A β

2.2.1. El tratamiento con sorafenib valida la inducción de NPA entorno a las placas amiloides

Con el objetivo de evaluar la contribución de una angiogénesis anormal a la progresión de la enfermedad en modelos de EA, se trataron animales *APP_{751SL}/+* de 8 meses edad con sorafenib, un fármaco que inhibe la actividad intracelular de varias kinasas implicadas en angiogénesis: VEGFR (del inglés, *VEGF Receptor*), PDGFR (del inglés, *PDGF Receptor*) y RAF. El tratamiento con sorafenib (30 mg/kg cada 2 días durante 1 mes) redujo la acumulación de células $\alpha\text{v}\beta 3$ en el cerebro de los ratones tratados en relación a los controles (**Figura D36.A**), lo que indica que la dosis y las pautas de administración del tratamiento fueron adecuadas para inhibir la angiogénesis cerebral. Seguidamente, se analizó a nivel histológico la carga de placas de A β (marcaje con Tio-S) y de anomalías vasculares (marcaje con IB4) y se obtuvo una tendencia a la reducción tanto del tamaño como de la carga de placas en los animales tratados (**Figura D36.B-C**). Sin embargo, la reducción de la patología amiloide a nivel de histología no se vio reflejada en cambios en los valores de A β_{40} , A β_{42} , ni en la ratio A β_{42} / A β_{40} estimados por ELISA (**Figura D36.D**). A pesar de ello, el tratamiento sí que supuso una mejora en la cobertura de pericitos de los vasos sanguíneos en las regiones cercanas a las placas de A β (proximal) en relaciones a las distales, lo que se sirvió como marcador de la normalización vascular (**Figura D36.E**). Finalmente, se midió la memoria a corto plazo usando la prueba de reconocimiento de objeto y se obtuvo una tendencia de mejora en los animales tratados (**Figura D36.F**). Por consiguiente, aunque este tratamiento anti-angiogénico podría retrasar la progresión de la enfermedad, una aproximación farmacológica mediante la cual se pueda reanudar la actividad angiogénica una vez que ha sido inducida, podría ser más acertada.

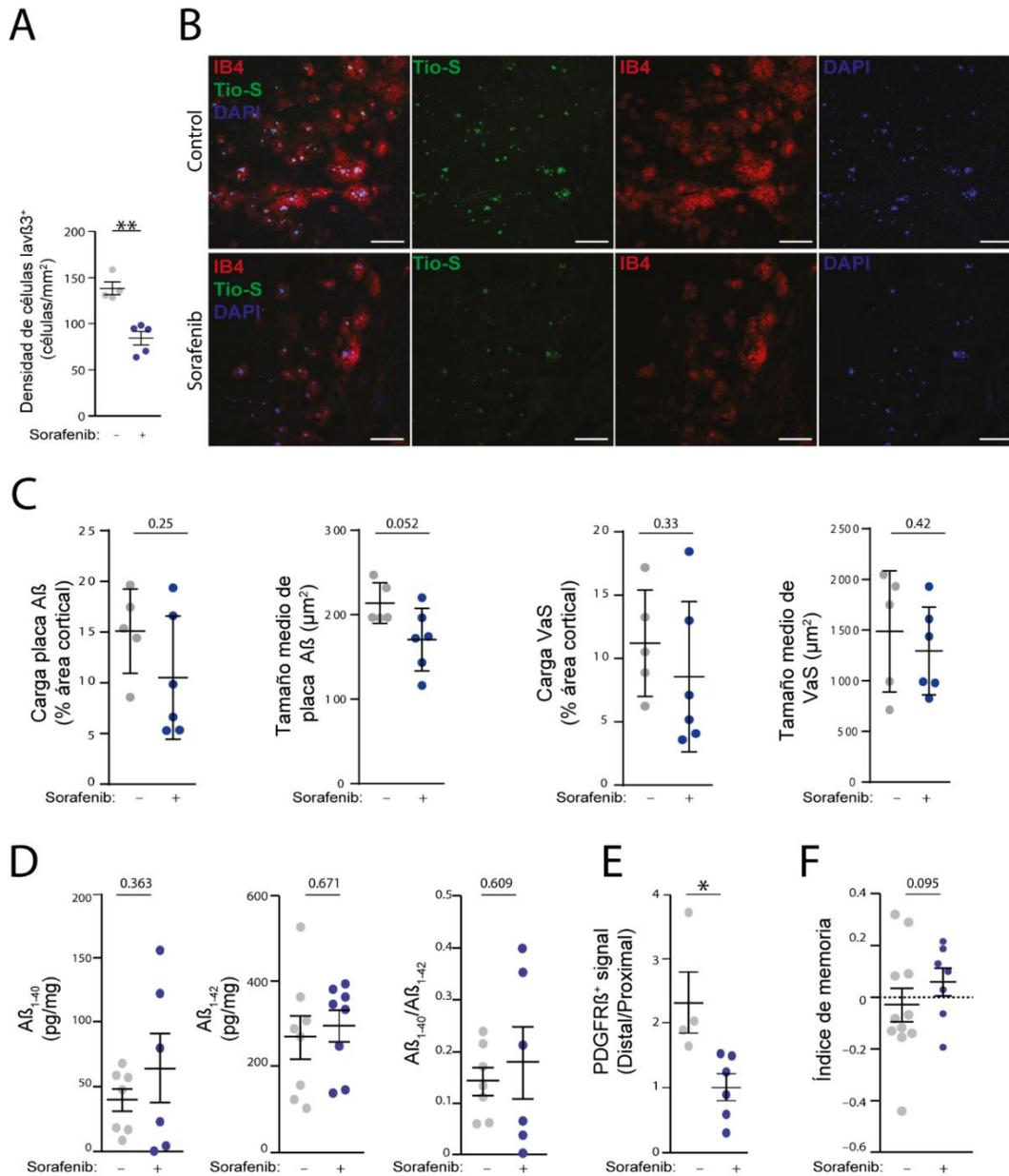


Figura D36. Inhibición de angiogénesis mediante el tratamiento con Sorafenib en ratones *APP751SL/+*. (A-F) Ratones *APP751SL/+* de 7 meses de edad tratados con Sorafenib (+) o con el vehículo del fármaco (-) durante un mes (30mg/kg/cada 2 días durante 30 días). (A) Cuantificación de la densidad de células Iαvβ3⁺ en controles (-; puntos grises) y Sorafenib (+; puntos azules). n= 4 “-” y 5 “+” ratones; ** p < 0,01; prueba de la t de Student. (B) Secciones corticales cerebrales marcadas con Tio-S (marcador de placa amiloide, verde), IB4 (rojo) y DAPI (azul). Las barras de escala son de 200 µm. (C) Cuantificación de la carga de Aβ, el tamaño medio de placa de Aβ, la carga de VaS y el tamaño medio de VaS. Se representa la media ± el error estándar de la media. n=5 “-” y 6 “+” ratones; prueba de la t de Student. (D) Los niveles de Aβ₁₋₄₀ (gráfica de la izquierda) y Aβ₁₋₄₂ (gráfica central) monoméricos, así como la ratio Aβ₁₋₄₂/Aβ₁₋₄₀ (gráfica de la derecha) se determinaron mediante ELISA. Se representa la media ± el error estándar de la media. n = 5 “-” y 6 “+” ratones; prueba de la t de Student. (E) Cuantificación del cociente de la cobertura de vasos sanguíneos por PDGFRβ en regiones proximales entre regiones distales a las placas de Aβ. Se representa la media ± el error estándar de la media. n=4 “-” y 5 “+”; * p < 0,05; prueba de la t de Student. (F) Determinación del índice de memoria a corto plazo mediante la prueba de reconocimiento de objeto nuevo. Se representa la media ± el error estándar de la media. n=11 “-” y 7 “+” ratones; prueba de la t de Student.

2.2.2. El tratamiento con oxígeno para mejorar la estabilidad vascular presenta variabilidad ligada al género

Dado que la NPA se desarrolla ante un estímulo hipóxico, se planteó un abordaje terapéutico que consistía en suministrar oxígeno a animales *APP₇₅₁SL/+* de 8 meses edad con el objetivo de inhibir la inducción de la angiogénesis. Para ello, el grupo de animales tratados fue expuesto al 40% de oxígeno durante 1 mes en un cámara hiperóxica. Estos animales experimentaron una caída del porcentaje de hematocrito en relación a los controles que sirvió para validar el tratamiento, no observándose diferencias entre machos y hembras (**Figura D37.A**). Tras ello, se analizó a nivel histológico la carga de placas de A β (marcaje con Tio-S) y de anomalías vasculares (marcaje con IB4) sin obtenerse ningún cambio significativo entre el grupo tratado y el control (**Figura D37.B**), sin embargo, observamos que la tendencia de estos datos estaba siendo radicalmente opuesta entre machos y hembras (**D38.A-B**), es decir, mientras que en los machos se observaba una caída en la carga y en el tamaño medio de las VaS (*p*-valor: 0.2 y 0.1, respectivamente), en las hembras existía incluso una tendencia al agravamiento de la patología vascular (**38.A-B**). No obstante, las cohortes de ratones tratados y no tratados disgregados por género son demasiado pequeñas como para concluir un resultado significativo.

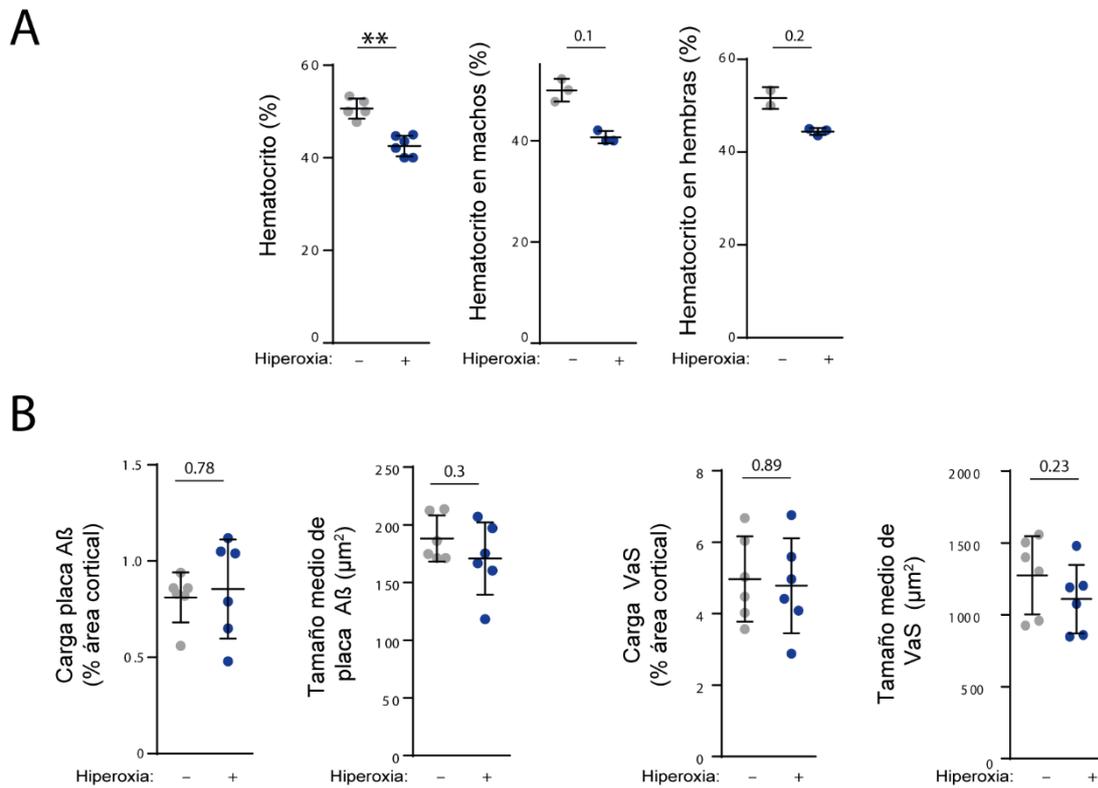


Figura D37. Inhibición de angiogénesis mediante el tratamiento con hiperoxia en ratones *APP751SL/+*. (A-B) Ratones *APP751SL/+* de 7 meses de edad tratados con hiperoxia (40% O₂) “+” o mantenidos en condiciones de normoxia “-” durante un mes. n= 6 ratones (A) Determinación del hematocrito en el grupo tratado y el grupo control en el total de animales que forman parte del experimento (gráfica de la izquierda) y disgregados por sexo (gráfica central y gráfica derecha). Machos: n=3 ratones. Hembras: n=3 ratones. Se representa la media \pm el error estándar de la media; ** $p < 0,01$; prueba de la t de Student. (B) Cuantificación de la carga de A β , el tamaño medio de placa de A β , la carga de VaS y el tamaño medio de VaS. sin distinción del sexo del animal. Se representa la media \pm el error estándar de la media. n=6 ratones; prueba de la t de Student.

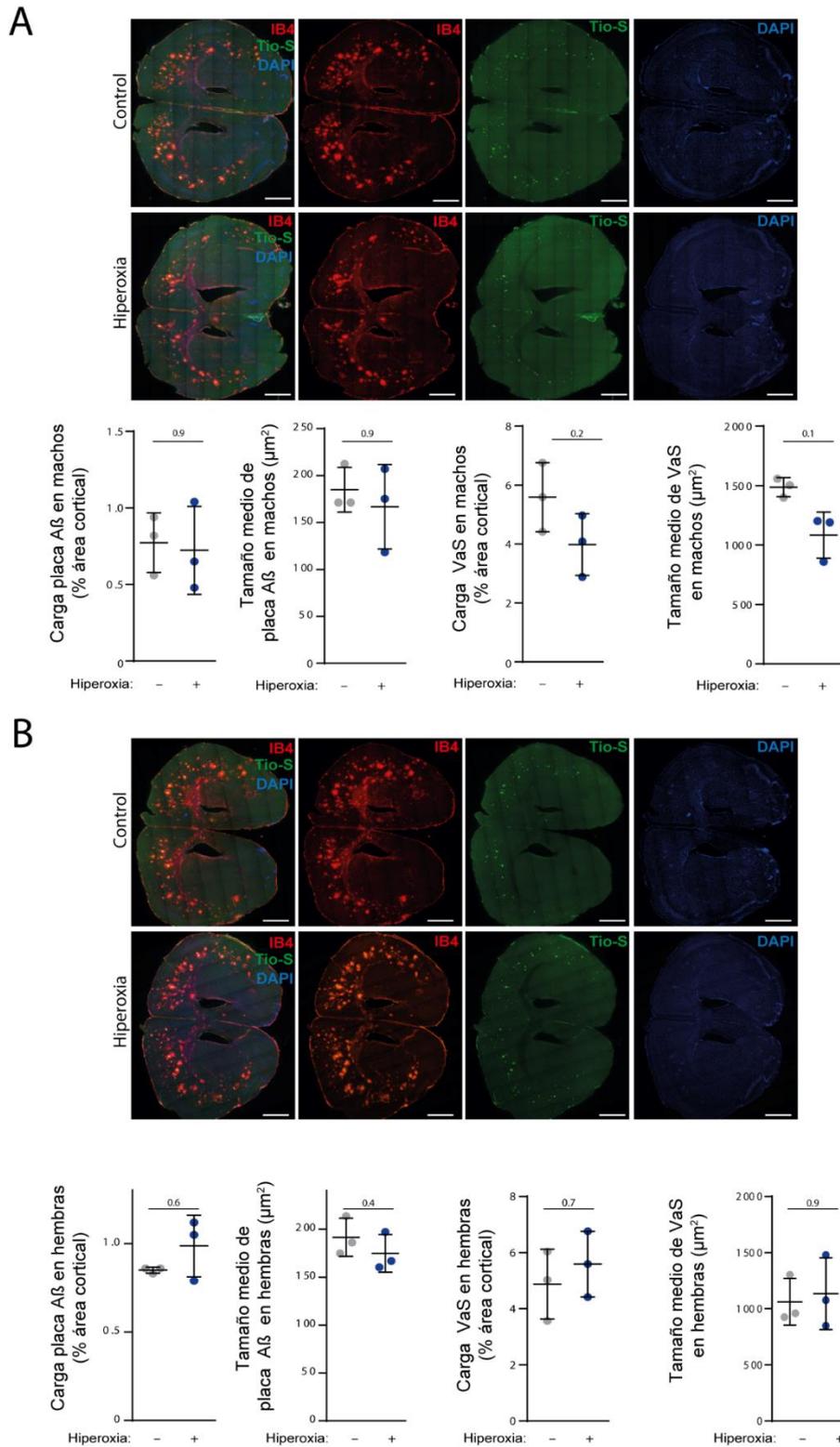


Figura D38. El estudio histológico del tratamiento con hiperoxia mostró diferencia ligadas al sexo. (A-B) En la parte superior se muestran superimágenes del cerebro completo obtenidas con el microscopio NewCast de los machos (A) y hembras (B) *APP751SL/+* incluidos en el experimento marcadas con IB4, Tio-S y DAPI. En la parte inferior se muestran las cuantificaciones de la carga de placas de A β , el tamaño medio de placas de A β , la carga de VaS y el tamaño medio de VaS en machos (A) y hembras (B) controles “-” y sometidos a hiperoxia “+”. Se representa la media \pm el error estándar de la media Machos: $n=3$ ratones. Hembras: $n=3$ ratones; prueba de la t de Student.

E. DISCUSIÓN

En el año 1907 el descubridor de la patología de Alzheimer, Aloïs Alzheimer, ya observó cambios morfológicos en los vasos sanguíneos durante el transcurso de la enfermedad, llegando a describir arterioesclerosis en los vasos de gran calibre y un sobrecrecimiento y proliferación del endotelio que no se asociaba con infiltración vascular (Alzheimer, 1907). Además, según estudios epidemiológicos, en torno al 50% de pacientes diagnosticados con EA tienen patologías vasculares asociadas como arteriosclerosis, aterosclerosis o microinfartos y la aparición de dichas enfermedades les predisponen a padecer EA (Sweeney y col. 2015; Zlokovic, 2011). Por otro lado, estudios de biomarcadores preclínicos dirigidos al diagnóstico señalan que el flujo sanguíneo cerebral (CBF; del inglés, *Cerebral Brain Flow*) y el metabolismo de la glucosa están reducidos en estadios iniciales de la patología, tanto en el cerebro de pacientes (Korte y col. 2020), como en modelos murinos de EA que acumulan el péptido amiloide (Niwa y col. 2002a) o que expresan la isoforma Apoe4 (Michels y col. 2016). Asimismo, se ha demostrado que la desregulación de la vasculatura cerebral (reflejada mediante la alteración en plasma o en LCR de los niveles de proteínas asociadas con la función vascular) es el primer evento patológico detectado en estadios preclínicos de EA (Iturria-Medina y col. 2016).

Dado que existe una reducción del CBF en estadios iniciales de la EA y que la región vascular que regula el aporte de flujo al cerebro son los capilares (acoplamiento neurovascular) (Kisler y col. 2017), se planteó la posibilidad de que los capilares cerebrales en la EA fueran disfuncionales (Kimura y col. 1991). En esta línea, se han identificado daños en los capilares cerebrales durante la EA que puede ser ocasionados por **efectos dependientes e independientes de la acumulación de A β** . En cuanto a los **efectos independientes de la acumulación de A β** se encuentran todos aquellos factores de riesgo vascular como la hipertensión, la diabetes, enfermedades cardíacas o ictus, que pueden acarrear consigo: i) reducción del calibre de los capilares cerebrales, ii) degeneración y disfunción de los pericitos (Kisler y col. 2017), iii) contracción mantenida en el tiempo mediada por pericitos (Mattsson y col. 2014) ; iv) disfunción de la BHE y v) incremento de la infiltración de células del sistema inmunitario innato a través de los capilares cerebrales (Cao & Zheng, 2018) (Esta disfunción vascular comprometería el aclaramiento de productos tóxicos cerebrales, entre los que se encuentra el A β , dando lugar a un daño neuronal y un deterioro cognitivo (Korte y col. 2020; Mattsson y col. 2014; Sweeney y col. 2015; Z. Zhao y col. 2015; Zlokovic, 2011). Por otro lado, en cuanto a las **alteraciones vasculares ocasionadas directamente por el péptido A β** se encuentran: i) el depósito de A β en la

pared de los vasos sanguíneos cerebrales (CAA) (Kisler y col. 2017); ii) el A β induce vasoconstricción al modular directamente diferentes vías implicadas en esta función (ET-1, tromboxano A2, acetilcolina) (Nortley y col. 2019); iii) el A β puede ocasionar disfunción vascular mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Park y col. 2005) y, por último; iv) se ha observado una reducción en el número de capilares cerebrales y una alteración de la BHE en las regiones cercanas a las placas (Kalaria, 1997; Kawai y col. 1990; Kouznetsova y col. 2006; G. Lee y col. 2005; Meyer y col. 2008; Sengillo y col. 2013; Sweeney y col. 2018). Sin embargo, en torno a los depósitos amiloides se acumulan marcadores angiogénicos e hipóxicos (Kisler y col. 2017; Love & Miners, 2016; March-Diaz y col. 2021), lo que sugiere un papel importante de las placas de A β en la disfunción de la vasculatura cerebral y en la inducción compensatoria de un proceso angiogénico. En este trabajo se muestra que, aunque la angiogénesis se inicia alrededor de las placas de A β , este proceso no es productivo, lo que origina una desorganización de los vasos sanguíneos asociados que promueve la actividad fagocítica de la microglía.

Para facilitar la comprensión, la discusión se presenta de acuerdo con los objetivos planteados.

1. OBJETIVO 1: ESTUDIAR EL MICROAMBIENTE HIPÓXICO Y LA ANGIOGÉNESIS EN LA PLACA AMILOIDE DE MODELOS Y PACIENTES DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

1.1. Las placas de A β constituyen un microambiente hipóxico e inducen una elevada expresión de HIF1 y de marcadores pro-angiogénicos.

La formación de las placas de A β podría alterar la distribución de los capilares cerebrales produciendo, junto con el reclutamiento de células del sistema inmunitario innato, una respuesta de hipoxia local, y la consecuente expresión de VEGF. De hecho, hay trabajos que confirman la presencia de hipoxia y VEGF alrededor de las placas de A β (Kalaria y col. 1998; March-Diaz y col. 2021; Tang y col. 2013; Thomas y col. 2015; Yang y col. 2004) y, a pesar de que algunos autores proponen que el VEGF podría ser secuestrado en el interior de las placas limitando su función neurotrófica y angiogénica (Carmeliet & De Almodovar, 2013; Yang y col. 2004), nosotros hemos observado altos niveles de expresión de VEGF en los astrocitos que rodean a las placas de A β y se ha confirmado una asociación entre la aparición de estos focos de expresión de VEGF y la existencia de proyecciones citoplasmáticas procedentes de células endoteliales que recuerdan a los filopodios de las células *tip*. Este

dato confirma la actividad angiogénica de VEGF alrededor de las placas. Otro marcador angiogénico que hemos identificado próximo a estos depósitos es la $\text{I}\alpha\text{v}\beta\text{3}$, unas glicoproteínas presentes en la superficie de células endoteliales que interviene en la estabilización de la unión entre VEGF y su receptor VEGFR2 (Brooks y col. 1994; Soldi y col. 1999). Desai y colaboradores observaron un incremento del marcador $\text{I}\alpha\text{v}\beta\text{3}$ en muestras humanas *postmortem*, sin embargo, no observaron ningún tipo de asociación entre este marcador y la presencia de patología amiloide, tampoco observaron ninguna correlación con los valores de densidad vascular, lo que confirmaría su función angiogénica (Desai y col. 2009). En nuestro caso, hemos demostrado la existencia de una mayor densidad de células $\text{I}\alpha\text{v}\beta\text{3}^+$ en las proximidades de las placas de $\text{A}\beta$, tanto en pacientes como en modelos de EA, lo que demuestra que la angiogénesis está inducida entorno a los depósitos amiloides.

1.2. Las placas de $\text{A}\beta$ se encuentran hipoperfundidas

No obstante, a pesar del incremento de marcadores angiogénicos en las proximidades de las placas de $\text{A}\beta$, numerosos trabajos han señalado que estos depósitos son áreas hipoperfundidas y que existe una reducción en la densidad de vasos sanguíneos maduros en dichas regiones (Kalaria, 1997; Kawai y col. 1990). Asimismo, otros estudios han descrito “agujeros vasculares” (*vascular holes*) en los espacios ocupados por los depósitos amiloides que están rodeados por zonas hipervascularizadas lo que sugiere, de nuevo, la existencia de un proceso angiogénico compensatorio (Kouznetsova y col. 2006; G. Lee y col. 2005; Meyer y col. 2008). Los estudios de perfusión con *Evans Blue* y TER119 que hemos llevado a cabo en el modelo *APP-PSEN1/+* y *APP₇₅₁SL/+* validan la hipoperfusión descrita en torno a las placas. Además, el Dr. José Luis Trillo perteneciente al grupo de la Dra. Miriam Echevarría del IBIS, realizó un estudio hemodinámico en el cerebro de los ratones *APP₇₅₁SL/+* con el objetivo de valorar si la hipoperfusión local observada podría originar cambios en el flujo sanguíneo cerebral (datos cedidos a nuestro laboratorio). Según este estudio, el fluido intersticial que se filtra a través del espacio perivascular de los capilares cerebrales es una fuente alternativa importante de LCR. Así, la producción del LCR sería una medida indirecta del flujo sanguíneo cerebral. En este caso, se registró la presión intracraneal (PIC), como un indicador del flujo sanguíneo, mediante punción estereotáxica con una aguja en el ventrículo lateral (**Figura E1.A**). Los resultados mostraron una caída de PIC en *APP₇₅₁SL/+* (**Figura E1.A-B**) sin que existieran cambios ni en la velocidad de flujo del LCR, ni en la complianza del ventrículo (**Figura E1.C-E**), lo que sugiere una reducción en la producción de LCR en este modelo. Los datos proponen que la hipoperfusión local descrita alrededor de las placas podrían suponer una reducción de la producción de LCR, siendo esta una medida indirecta de la reducción de CBF (Abbott y col. 2018).

La disminución en la producción de LCR ya ha sido descrita en pacientes con EA (Silverberg y col. 2003; Suzuki y col. 2015) y en modelos murinos que acumulan el péptido amiloide (Igarashi y col. 2014; Liu y col. 2020), sugiriendo la existencia de daños vasculares responsables de dicho desequilibrio dinámico. Además, existen evidencias de que la producción y el recambio de LCR en el cerebro están implicados con el lavado de productos tóxicos del parénquima cerebral, entre los que se incluye el aclaramiento de A β (Igarashi y col. 2014; Iliff y col. 2012; Li & Buxbaum, 2011; Silverberg y col. 2003), por lo que la disminución de LCR en el modelo *APP₇₅₁SL/+* podría estar agravando a su vez la patología amiloide.

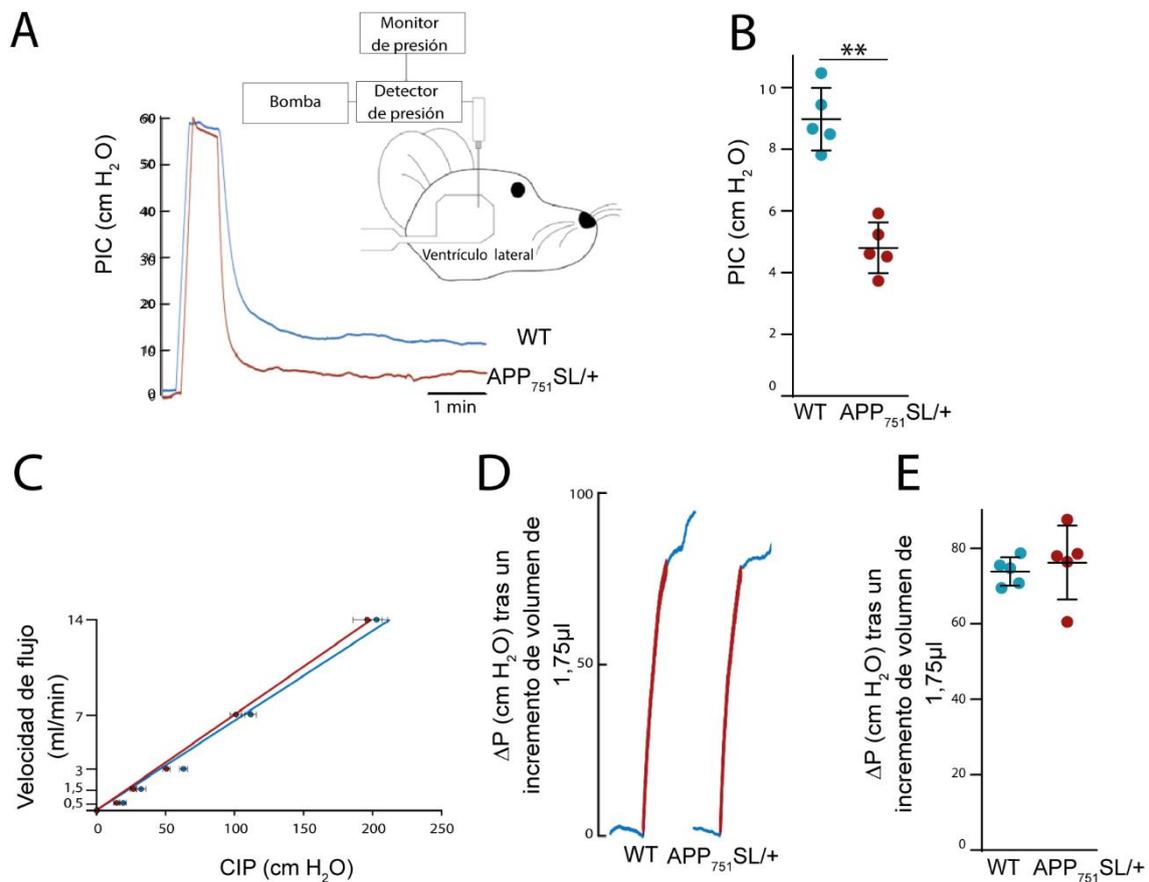


Figura E1. Reducción de la PIC en el cerebro de ratones *APP₇₅₁SL/+*. Experimento realizado por el Dr. José Luis Trillo del laboratorio de la Dra. Miriam Echevarría. **(A)** Diagrama que ilustra el procedimiento de medida de PIC en ratón y gráfica de la medida representativa de PIC de un ratón control (WT, azul) y un ratón *APP₇₅₁SL/+* (*APP₇₅₁SL/+*, rojo). **(B)** Valores de PIC registrados en ratones controles (azul) y *APP₇₅₁SL/+* (rojo). Se representa la media \pm el error estándar de la media (n=5; ** $p < 0,01$; prueba de t de Student). **(C)** Medida de velocidad de flujo en WT (azul) y *APP₇₅₁SL/+* (rojo). La comparación entre pendientes no muestra diferencias significativas en los cambios de flujo dependientes de presión en ambos grupos. **(D)** Registros representativos del método de la medida de complianza ventricular en WT y en *APP₇₅₁SL/+*. La línea roja muestra el incremento de PIC detectado tras infundir 1,75 μ l de aCSF. **(E)** Análisis cuantitativo de la complianza ventricular en los dos grupos experimentales. Se representa la media \pm el error estándar de la media (n=5; prueba de la t de Student).

2. OBJETIVO 2: ESTUDIAR LA VASCULATURA CEREBRAL EN MODELOS DE EA QUE ACUMULAN A β

2.1. OBJETIVO 2.1. Estudiar los mecanismos moleculares implicados en el daño vascular cerebral observado en modelos de EA.

2.1.1. Alrededor de las placas de A β se inicia un proceso patológico de angiogénesis no productiva (NPA)

Nuestro trabajo ha demostrado la existencia de una angiogénesis no productiva en torno a las placas de A β mediante: i) estudios transcriptómicos: la firma molecular de NPA (Del Toro y col. 2010) está enriquecida en las células endoteliales cerebrales aisladas de un ratón que acumula A β y ii) estudios inmunohistoquímicos: dos marcadores de NPA se acumulan en las cicatrices vasculares (VaS) (IB4 y el ARNm de *Plaur*) (Del Toro y col. 2010; Lobov y col. 2007; Noguera-Troise y col. 2007; Ridgway y col. 2006; Suchting y col. 2007) IB4 es una lectina que se une a glicoproteínas presentes en la cara luminal y abluminal de células endoteliales por lo que es un marcador de la membrana basal de células endoteliales maduras y de pericitos (Wälchli y col. 2014). Sin embargo, durante el proceso de angiogénesis, IB4 es, a nivel histológico, el mejor marcador de las células *tip*, pues delimita la longitud completa de los filopodios que este tipo celular emite (Wälchli y col. 2014). Por otro lado, el receptor de uroquinasa activador del plasminógeno (*Plaur*; del inglés, *Plasminogen Activator, Urokinase Receptor*) es uno de los pocos genes altamente enriquecidos en las células *tip* en relación con los otros tipos celulares endoteliales, y, a nivel funcional, está implicado en la degradación de la matriz extracelular para favorecer la migración de la célula durante el proceso de angiogénesis (Tkachuk, 1996).

2.1.2. Anomalías vasculares IB4⁺ compatibles con NPA alrededor de las placas de A β .

Las anomalías vasculares IB4⁺ son probablemente el resultado de un vaso sanguíneo movilizado, con la consecuente pérdida de las propiedades de barrera cerebrales, para favorecer la formación de una nueva “rama” vascular. Esta “apertura” del vaso preexistente supone la activación de diferentes procesos biológicos: la desestabilización de la membrana basal debido a la activación de proteasas de la matriz extracelular (De Smet y col. 2009; Yana y col. 2007), la pérdida de las uniones estrechas entre las células endoteliales cerebrales (*tight junction*) (Potter y col. 2005), la pérdida de células de soporte que rodean la pared de los capilares cerebrales (pericitos y astrocitos), en definitiva, la pérdida de la

BHE con la formación de un posible edema transitorio. En esta línea, se ha descrito que la estimulación mantenida en el tiempo de factores pro-angiogénicos como VEGFA, durante un proceso inflamatorio, por ejemplo, podría dar lugar a un fenómeno de hiperpermeabilidad vascular crónica (del inglés; *Chronic Vascular Hyperpermeability*), con la formación de un edema y la posterior movilización de las proteínas implicadas en el sistema de coagulación (fibrina, factor tisular...) (Nagy y col. 2008; Weis & Cheresh, 2005). Este escenario recuerda al que hemos descrito en las proximidades de la placa de A β , con altos niveles crónicos de VEGF e I α v β 3 y, curiosamente, existen trabajos que demuestran la presencia de depósitos de inmunoglobulina G, fibrina y restos de microhemorragias en torno a las placas de A β en pacientes de EA, lo que confirmaría la presencia de posibles edemas (Hansra y col. 2019; Sengillo y col. 2013).

Por otro lado, inicialmente y de forma intuitiva nos planteamos que la “maraña” vascular observada con la tinción de IB4 podría deberse a una mayor densidad de células *tip* originadas durante el proceso de NPA en los vasos sanguíneos maduros próximos a los depósitos amiloides. A pesar de que fuimos capaces de identificar algunas de estas células usando como herramienta el modelo genético de marcaje de células endoteliales, la densidad observada no fue lo suficientemente alta como para justificar el depósito tan abundante de IB4 entorno a las placas (Del Toro y col. 2010; Suchting y col. 2007). Un aspecto muy llamativo es que, en todos los casos, estas células que recuerdan por su morfología a las células *tip*, están completamente rodeadas por las principales células fagocíticas del cerebro, la microglía (Wolf y col. 2017), lo que sugiere que, aunque estas células existan circunstancialmente en torno a la placa, dada su naturaleza patológica y su fenotipo indiferenciado son reconocidas y fagocitadas de forma similar a como ya se había descrito en determinados procesos de regresión vascular o durante el recambio fisiológico mitocondrial de los cardiomiocitos (Gurevich y col. 2018; Nicolás-Ávila y col. 2020). Finalmente, consideramos que la tinción vascular aberrante obtenida con el marcador IB4 podría ser el resultado de la movilización de la membrana basal endotelial durante el proceso de angiogénesis y diferentes experimentos llevados a cabo en este trabajo respaldan nuestra hipótesis: i) altos niveles de *Plaur* I α v β 3 observados entorno a la placa (proteínas relacionadas con la movilización de la membrana basal); ii) la observación mediante microscopía electrónica del depósito IB4 localizado en la región abluminal; iii) la pérdida de los marcadores de la UNV, y finalmente; iv) el hecho de que la inducción de NPA (por inhibición genética de la γ -secretasa) en ausencia de patología amiloide sea suficiente para inducir VaS IB4⁺. Además, en estudios previos donde se usaron diferentes marcadores de la membrana basal endotelial para marcar el cerebro de pacientes de EA, se han observado fantasmas vasculares (del inglés, *Vascular Ghost*) que proceden de capilares sanguíneos

situados en las proximidades de las placas de A β . Estos fantasmas vasculares tienen origen en proteínas de la membrana basal vascular, como los heparan sulfato proteoglicanos (HSPG) o las lamininas, y aparecen fragmentados formando un depósito en torno a la placa a consecuencia, probablemente, de la activación de las metaloproteasas durante el inicio de la angiogénesis. La morfología de los fantasmas vasculares podría recordar al depósito de IB4 identificado en este trabajo (Berzin y col. 2000; Perlmutter, 1994; Perlmutter y col. 1990; Verbeek y col. 1999).

El estudio inmunohistoquímico de las anomalías vasculares IB4⁺ reveló su naturaleza de cicatriz vascular (VaS), pues procede de un remodelado de los vasos sanguíneos preexistentes que ha sido resuelto y sellado para garantizar la estabilidad del resto de la vasculatura cerebral y que se acumula con el transcurso de la patología. En este sentido, para obtener información dinámica del proceso de NPA y de la formación de la VaS, se necesitan realizar estudios *in vivo* con microscopia de doble fotón que nos permitan seguir, por un lado, el depósito amiloide y, por otro, el comportamiento de la vasculatura en dichas regiones (Bacsikai & Hyman, 2002).

2.1.3. La NPA induce la fagocitosis de los vasos sanguíneos asociados a las placas de A β por parte de la A β AM.

En este estudio postulamos que la NPA ocasionada por la pérdida de inhibición lateral mediada por Notch podría desensamblar los vasos sanguíneos maduros localizados en las proximidades de las placas y convertirlos en vasos con una alta densidad de células *tip* no conductoras de sangre (Lobov y col. 2007; Noguera-Troise y col. 2007; Ridgway y col. 2006; Suchting y col. 2007). Sin embargo, tal como hemos descrito anteriormente, no se identificaron muchas células *tip* en este contexto, y siempre se asociaban con células microgliales, lo que nos sugirió que aquellas células con un fenotipo patológico indiferenciado podrían estar siendo eliminadas del parénquima cerebral. Además, la pérdida de marcadores vasculares en torno a las placas también nos hizo plantearnos que la microglía A β AM podría estar reconociendo y eliminando aquellos vasos que entran en el proceso patológico de NPA. Para ello, con el modelo genético que marca las células endoteliales hemos observado que la microglía reacciona fuertemente con este tipo celular en las proximidades de las placas de A β y que, además, internalizan partículas procedentes de vasos sanguíneos dando lugar a los llamados bolsillos (del inglés, *Pouches*) fagocíticos (Dudvarski Stankovic y col. 2016; Sierra y col. 2010). Esta reacción microglial ya fue descrita anteriormente en un modelo de ictus isquémico donde la microglía fagocita los vasos sanguíneos en la zona de penumbra atraída por las inmunoglobulinas liberadas al parénquima (Jolivel y col. 2015). Sin embargo, con estos experimentos no podríamos

descartar que el desensamblaje y la fagocitosis de los vasos observado alrededor de la placa fuera consecuencia de una activación inespecífica de la microglía mediada por el A β . Curiosamente, la firma molecular de supresión de la inhibición lateral (Del Toro y col. 2010) contiene, además de genes enriquecidos en células *tip*, varios mediadores inflamatorios que inducirían una activación de la A β AM. Otro tipo celular que podría estar implicado con la fagocitosis son los astrocitos y los macrófagos residentes en el cerebro. Los astrocitos podrían regular la fagocitosis de los vasos sanguíneos de manera independiente, o modulando la actividad de la microglía. De hecho, se han reportado casos en los que los astrocitos adquieren un fenotipo fagocítico ante un daño cerebral, como, por ejemplo, un ictus, o frente a una ablación y disfunción microglial inducidas (Konishi y col. 2020; Morizawa y col. 2017). Tampoco podemos descartar un posible papel de los macrófagos residentes en el cerebro en la fagocitosis de vasos sanguíneos pues el único marcador que discrimina entre estos macrófagos y la microglía es TEM119 y, precisamente, este marcador se encuentra reprimido en la A β AM (Bennett y col. 2016). Sin embargo, estudios de secuenciación en célula única sugieren un papel muy minoritario de estos en relación a la microglía en la enfermedad de Alzheimer y, además, estudios recientes han demostrado que las células mieloides asociadas a las placas de A β derivan de células microgliales (Keren-shaul y col. 2017; Reed-Geaghan y col. 2020).

2.1.4. La pérdida de función de la inhibición lateral mediada por Notch es responsable de la formación de las VaS

A pesar de que la gran mayoría de estudios se centran en la pérdida de función de γ -secretasa en células neuronales, debido al papel tan importante que cumple A β PP en la EA (Saura y col. 2004; Xia y col. 2015), nuestros resultados demuestran que la inhibición de la γ -secretasa en células endoteliales podría jugar un papel clave en la patología de Alzheimer al ser responsable de un proceso de NPA. Por otro lado, gracias al modelo genético reportero de la actividad de Notch, hemos comprobado que existe una reducción en su función transcripcional en torno a las VaS, datos que están en consonancia con los modelos de NPA descritos anteriormente, en los que existe una reducción de la señalización Dll4/Notch (Lobov y col. 2007; Noguera-Troise y col. 2007; Ridgway y col. 2006; Suchting y col. 2007). En definitiva, nuestro trabajo sugiere que la inhibición endotelial de γ -secretasa supone una pérdida de función de NOTCH y el desarrollo de un proceso de NPA alrededor de las placas de A β .

Existe mucha controversia en la literatura en cuanto al papel de la vía NOTCH en la EA y casi todos los estudios se centran en su implicación en las células neuronales. Se ha descrito que la reducción en NOTCH1 afecta a la plasticidad sináptica, la memoria o el olfato (Alberi

y col. 2013; Brai y col. 2014; Costa y col. 2003). Por otro lado, la sobre activación de NOTCH1 registrada en modelos de ictus hemorrágico podría ser responsable de la astrogliosis o del daño neuronal asociados (Chen y col. 2016; Zhong y col. 2018). En cuanto a la EA, diferentes estudios señalan que existe una sobreexpresión de NOTCH1 en el cerebro de pacientes con LOAD (Berezovska y col. 1998). Por otro lado, se ha observado una reducción de la variante soluble de la isoforma 1 del receptor Notch (sNotch1) en el plasma de pacientes con EA, así como de la proteína completa NOTCH1 en muestras de LCR. Estos datos correlacionan inversamente con la sobreexpresión a nivel de ARNm y de proteínas de NOTCH1 en muestras de hipocampo de pacientes y con el depósito de NOTCH1 en las placas amiloides, sugiriendo su acumulación en el parénquima cerebral (Brai y col. 2016; Cho y col. 2019). Recientemente, se ha publicado un trabajo en el que se han aislado las diferentes poblaciones celulares del cerebro de pacientes controles y con EA y esta herramienta nos ha permitido conocer la expresión diferencial de determinados genes de la vía Notch específicamente en células endoteliales (Grubman y col. 2019). Los niveles de expresión de *Notch1* en células endoteliales están incrementados en los pacientes, dato que está en consonancia con lo que se había descrito anteriormente sin especificación del tipo celular. Curiosamente, no sólo se observan altos niveles de *Notch1*, sino también de diferentes genes incluidos en la vía Wnt/ β catenina, la cual se encuentra reprimida en el estudio transcriptómico que llevamos a cabo en células endoteliales de ratones *APP-PSEN1/+* envejecidos. Estos datos aparentemente tan contradictorios en relación a la vía de Notch y Wnt/ β catenina entre modelos y pacientes de EA resaltarían, por un lado, que el mecanismo de ambas vías de señalización se está viendo alterado durante la patología y, por otro, la existencia de un mecanismo compensatorio por parte de las células endoteliales resistentes en humanos en estadios avanzados de la patología.

2.1.5. La pérdida de función de la actividad γ -secretasa en células endoteliales reproduce las VaS en ausencia de patología amiloide.

Nuestro modelo de inhibición de la enzima γ -secretasa en células endoteliales en ausencia de patología amiloide, reproduce las VaS observadas en los modelos de EA que acumulan A β . De igual manera que en el modelo de EA, estas VaS se caracterizan por la pérdida de marcadores de la UNV y además son reconocidas por las células microgliales de la periferia quienes inducen su fagocitosis. La actividad fagocítica de la microglía en este contexto parece ser más llamativa, con un mayor número de bolsillos fagocíticos observados, lo que podría deberse a una mayor capacidad de respuesta hacia el daño vascular, a diferencia de la A β AM quien ha de atender también al acúmulo del péptido amiloide. Con esta aproximación experimental, podemos confirmar que el daño patológico

asociado a NPA es suficiente para activar la microglía, sin necesidad de que esta experimente un acondicionamiento previo.

Un rasgo distintivo de las VaS observadas en el modelo de pérdida de función de la enzima γ -secretasa en relación a los modelos de EA es su localización cerebral. Mientras que en el modelo de EA las VaS siempre se asocian con una placa de A β , indistintamente de la región anatómica, en ausencia de patología amiloide aparecen fundamentalmente en estriado e hipocampo, dos zonas próximas a los nichos de células madre neurales como la zona subventricular (ZSV) o la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (ZSG). Todo indica a que en estas regiones la angiogénesis se está viendo inducida por distintos factores: i) la ZSV y ZSG son regiones especialmente hipóxicas y los astrocitos ubicados en estas zonas expresan altos niveles de VEGF (Chatzi y col. 2015; Licht y col. 2011); ii) hay varios trabajos que demuestran que la vasculatura asociada a la ZSV y ZSG expresa altos niveles de VEGFR2 (Licht y col. 2011) y ; iii) existe un acoplamiento neurovascular en estas zonas mediante el cual la inducción de neurogénesis conlleva un incremento de la densidad de capilares asociados (angiogénesis) que promueve la migración de neuronas diferenciadas a distintas regiones cerebrales (Sawada y col. 2014; Xiong y col. 2010). Por todo ello, la NPA sólo se pone de manifiesto en aquellas regiones donde previamente se ha activado la angiogénesis.

Existen diversas alternativas para explicar cómo la pérdida de función del complejo γ -secretasa podría desarrollar un fenotipo patológico vascular en la EA.

- **Mutaciones en PSEN1 asociadas a fAD alteran el procesamiento de otros sustratos de la γ -secretasa.**

Curiosamente, se ha visto que la gran mayoría de mutaciones descritas en *PSEN1* en fAD que alteran el procesamiento de A β PP también afectan al procesamiento de NOTCH, lo que sugiere un daño generalizado en la función del complejo γ -secretasa que no se limita a un único sustrato. Se han descrito mutaciones en *PSEN1* como la L166P que causa EA en edades muy tempranas y que cursa con una disminución en la señalización de AICD y NICD, lo que apoya la idea de que el corte citoplasmático de la γ -secretasa sobre A β PP y NOTCH está mediado por una actividad proteolítica bastante similar (Moehlmann y col. 2002; Song y col. 1999).

- **Se ha descrito una pérdida de actividad del complejo γ -secretasa asociada al envejecimiento.**

En los casos de LOAD, el principal factor de riesgo asociado es el envejecimiento y, curiosamente, se ha descrito la pérdida de actividad del complejo γ -secretasa en individuos envejecidos. Esta pérdida de función correlaciona con un incremento del cociente $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ en edades avanzadas, así como con una reducción en la actividad del complejo sobre el procesamiento de NOTCH1. Ambas vías confluyen para originar un proceso de neurodegeneración que podría desencadenar en LOAD (Placanica y col. 2009). Además, Guix y colaboradores (Guix y col. 2012) describieron modificaciones específicas (nitrotirosinación) asociadas a la edad en residuos de los fragmentos NTF y CTF de la PSEN1 causadas por fenómenos de estrés oxidativo. Estas modificaciones suponían un incremento del cociente $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ y también se observaron en pacientes enfermos de EA (Funato y col. 1998). En definitiva, en los casos de LOAD en los que la edad puede comprometer la actividad del complejo γ -secretasa, las alteraciones vasculares también podrían tener un papel relevante.

- **Posible actividad angiogénica del péptido $A\beta_{42}$.**

La estrecha asociación que existe entre la aparición de una VaS y una placa de $A\beta$, así como la proporción de tamaño constante que se da entre el VaS y la placa (área VaS/área placa $A\beta$), parecen señalar a la existencia de un factor difusible que pudiera inducir la inhibición de la angiogénesis. El principal candidato es precisamente el péptido $A\beta$ y, aunque su papel en la angiogénesis es bastante controvertido hasta la fecha, existen muchos estudios que sugieren una función anti-angiogénica.

Se han llevado cabo diferentes estudios para validar el efecto pro-angiogénico o anti-angiogénico del péptido $A\beta$. Se han realizado ensayos *in vitro* sobre células endoteliales cerebrales, ensayos *ex vivo* sobre la arteria aórtica o arteria cerebral media de ratas incluidas en una matriz rica en proteínas de la membrana basal (matrigel) o, incluso, ensayos *in vivo* mediante los cuales se inyectaba el péptido amiloide a nivel intratumoral, en glioblastomas, o intraperitoneal, en adenocarcinomas de pulmón. En todos los casos, los resultados mostraban un efecto antiangiogénico dosis dependiente del péptido amiloide (Paris y col. 2004, 2005; Patel y col. 2008). Se ha descrito que algunos péptidos con estructura de hoja plegada β , similar a la del péptido amiloide, tienen efecto anti-angiogénico (Anginex y endostatina), por ello, se planteó que esta función residiera en su conformación estructural (Griffioen y col. 2001; Skovseth, 2009; Sulochana y col. 2005). Sin embargo, diferentes estudios demuestran que los oligómeros solubles tienen mayor

actividad anti-angiogénica que las formas fibrilares (Paris y col. 2005) y se han llegado a identificar motivos aminoacídicos dentro de la proteína A β PP a los que se le asignan dicha función. Por otro lado, en función de la conformación del péptido, determinados motivos de su secuencia pueden quedar expuestos o escondidos, lo que explica cómo la conformación estructural puede modular el efecto angiogénico del A β (Patel y col. 2008).

A pesar de identificarse secuencias específicas y de estudiar el efecto de la conformación estructural de A β sobre su función angiogénica, no se conoce el mecanismo molecular exacto que media tal función, no obstante, se han propuesto los siguientes:

a) Se ha demostrado que los péptidos A β_{42} y A β_{43} , tan abundantes en el parénquima cerebral en la EA, podrían internalizarse en el centro activo de la γ -secretasa, ya que contienen la secuencia de corte para el A β_{40} , sin embargo, como carecen de los residuos próximos a los sitios de corte, el corte no tendría lugar de forma satisfactoria llegando a bloquear el centro activo. Dicho mecanismo supone una **inhibición competitiva por producto** que afectaría al procesamiento de otros sustratos del complejo, entre los que se encuentra NOTCH (De Strooper, 2007; Moehlmann y col. 2002; Shen & Kelleher, 2007; Song y col. 1999). Este mecanismo explicaría el desarrollo de NPA a consecuencia de la pérdida de función de la γ -secretasa y supondría un círculo vicioso que perpetuaría la enfermedad, en el que la acumulación de A β_{42} , un producto intermedio que inhibiría la actividad del complejo γ -secretasa, daría lugar a NPA, limitando de este modo el aclaramiento de A β y favoreciendo a su vez la acumulación en el parénquima cerebral.

b) El grupo de Patel y colaboradores (Patel y col. 2010) describieron que A β_{42} es capaz de **competir con VEGFA para unirse a VEGFR2** e inhibir la fosforilación de los residuos tirosina bloqueando así los mecanismos de migración y de permeabilidad vascular asociados a la unión de VEGF. Aunque este mecanismo contradice, *a priori*, nuestra hipótesis de trabajo, donde planteamos que la angiogénesis se induce, pero se bloquea en el punto de diferenciación del fenotipo endotelial *tip/stalk*, al tratarse de un proceso dinámico, que conlleva la formación de la placa amiloide, la creación de un microambiente hipóxico, con el consecuente reclutamiento de las células microgliales y los astrocitos, y la inducción de la angiogénesis, cada una de estas vías moleculares podría tener distinta relevancia en el tiempo y, en este sentido, la afinidad del A β por los receptores o enzimas de las distintas vías también tendría un papel crítico.

2.2. OBJETIVO 2.2. Diseñar abordajes terapéuticos que puedan revertir el daño vascular observado en torno a las placas amiloides.

2.2.1. El tratamiento con sorafenib valida la inducción de NPA entorno a las placas amiloides

Con nuestra hipótesis de trabajo planteamos que la inducción de la angiogénesis no productiva (NPA) alrededor de la placa de A β podría acarrear la pérdida de los vasos sanguíneos preexistentes al aumentar en ellos la densidad de células con un fenotipo indiferenciado *tip/stalk* que no conducen sangre y ser, finalmente, reconocidas y fagocitadas por la A β AM. Este proceso en el que se acaban deconstruyendo los vasos preexistentes agravaría aún más la hipoxia de partida. Por consiguiente, en este proyecto propusimos inhibir el inicio de la angiogénesis para preservar la estructura de la vasculatura cerebral y favorecer, de este modo, el aclaramiento del péptido amiloide. Para ello recurrimos al fármaco Sorafenib, ampliamente comercializado frente a ciertos tumores (carcinoma renal, hepático etc)(Escudier y col. 2007; Viallard & Larrivé, 2017). Sorafenib es un fármaco de pequeño tamaño que inhibe la actividad tirosina quinasa de determinados receptores implicados en el proceso angiogénico, como, por ejemplo, PDGFR β (Goel y col. 2012), por lo que se considera un fármaco de amplio espectro, aunque presenta una mayor afinidad por VEGFR2.

Sorafenib no sólo inhibe la angiogénesis, sino que tendría un papel clave como normalizador de la vasculatura, efecto que ha quedado de manifiesto en el tratamiento de distintos tumores. La vasculatura tumoral suele ser una vasculatura bastante laxa, con una membrana basal alterada, desprovista de células murales y de las proteínas asociadas con las TJs, con una gran cantidad de fenestras para favorecer la migración de las células tumorales (Nagy y col. 2009; Viallard & Larrivé, 2017), lo que recuerda bastante a la vasculatura descrita en torno a los depósitos amiloides. La normalización vascular consiste en aumentar la funcionalidad del vaso, reestablecer sus propiedades de transporte y de barrera, mejorando la perfusión de los vasos y conseguir, por ejemplo, que la distribución de los fármacos antitumorales sea más efectiva o que se dificulte la migración de las células tumorales. De hecho, el tratamiento combinado de paclitaxel y sorafenib han mostrado efectos beneficiosos en el cáncer renal metastásico (Escudier y col. 2007). En el caso de la EA, normalizar la vasculatura supondría mejorar la perfusión sanguínea, lo que conllevaría una reducción de la hipoxia local en torno a la placa, que es la responsable del desarrollo de la NPA generando las VaS. Con este tratamiento no esperábamos reducir el tamaño de los VaS ya formados, dada su naturaleza de cicatriz vascular, no obstante, se podría recuperar

la funcionalidad de los vasos adyacentes a estas anomalías lo que mejoraría el aclaramiento del péptido amiloide. Además, sería interesante definir una ventana terapéutica en la que encontremos el mayor número posible de VaS en proceso de formación. En nuestro caso iniciamos el tratamiento a los 7 meses de edad, donde se establece el pico máximo de patología en el modelo *APP₇₅₁SL/+*.

Existen múltiples estrategias para normalizar la vasculatura cerebral en el contexto de EA: aumento de la cobertura de células murales (pericitos) (sobreexpresión de PDGF β , sobreexpresión de Ang1 e inhibición de la Ang2), aumento de la expresión de proteínas implicadas con las TJs etc (Viallard & Larrivé, 2017), sin embargo, nosotros seleccionamos Sorafenib debido a su capacidad para atravesar la BHE y a la alta afinidad por VEGFR2, sin que se esto comprometa otras funciones cerebrales derivadas de VEGF (Hohman y col. 2015; Shim & Madsen, 2018).

Los resultados obtenidos con esta aproximación terapéutica demuestran una mejora a nivel histológico en el aclaramiento de las placas de A β en los ratones tratados, sin que esto suponga un cambio en los valores de A β ₄₀ y A β ₄₂ solubles. Asimismo, se observa una mayor cobertura de pericitos en los vasos próximos a las placas de A β , lo que sugiere un efecto normalizador de la vasculatura derivado del sorafenib, además, los estudios comportamentales muestran una tendencia a la mejora del índice de memoria. En definitiva, este tratamiento anti-angiogénico confirma la existencia de una angiogénesis alterada en el cerebro de modelos con EA y podría postularse como un posible tratamiento modulador de la cinética de la enfermedad retrasando la aparición de los síntomas. No obstante, se han reportado casos de hipertensión en pacientes de cáncer renal tratados con este fármaco (Wu y col. 2008) lo que limitaría mucho su uso en clínica como tratamiento en la EA. Por otro lado, al tratarse de un fármaco anti-angiogénico, y dado que no existen evidencias claras del papel de la angiogénesis en el cerebro de un individuo adulto en condiciones fisiológicas, su aplicación podría ser bastante controvertida (Plate, 1999; Stiver y col. 2004)

En cualquier caso, aunque los resultados sugieren una posible mejora de la patología amiloide, no se trata de un efecto muy llamativo, por ello, en el laboratorio hemos planteado nuevas estrategias terapéuticas con las que abordar la angiogénesis. Estas aproximaciones pueden clasificarse en:

- **Inhibidores del metabolismo glicolítico.**

A pesar de que las células endoteliales tienen un acceso inmediato al oxígeno que se transporta en la sangre, su principal vía metabólica para la obtención de ATP es la vía glicolítica. Este fenómeno se conoce como efecto *Cabtree* y debe su nombre a su descubridor,

el bioquímico inglés Herbert Grace Crabtree. El efecto *Crabtree* se basa en que, debido a la alta disponibilidad de glucosa en el torrente sanguíneo, la célula endotelial recurre a este sustrato para obtener ATP mediante la vía glicolítica en lugar de la fosforilación oxidativa, independientemente de la concentración de oxígeno disponible en el medio (Dobrina & Rossi, 1983)

Uno de los puntos de velocidad limitante en el proceso de glicólisis es la conversión de fructosa-6-Fosfato (F6P) a fructosa-1,6-bifosfato (F1,6P₂) y dicha reacción está catalizada por la enzima 6-fosfofructo-1-quinasa (PFK-1). La enzima fosfofructoquinasa-2/fructosa-2,6-bifosfatasa (PFKFB) sintetiza la fructosa-2,6-bifosfato (F2,6P₂), un activador alostérico de la PFK-1 y el mayor estimulador de la glicólisis. En este sentido, se ha descrito que las células *tip* expresan altos niveles de la isoforma 3 de PFKFB (PFKFB3) y que el bloqueo de esta enzima supone una reducción en el número de filopodios y, por tanto, una alteración en el proceso de *sprouting* liderado por la célula *tip*. Además, se ha confirmado que esta sobreexpresión no existe en las células *stalk*, lo que refuerza aún más su implicación en la migración durante la angiogénesis (Cruys y col. 2016; De Bock y col. 2013; Schoors y col. 2014). Un inhibidor de la PFKFB (3PO) ha sido usado en diferentes enfermedades que cursan con angiogénesis patológica, como retinopatías o enfermedad inflamatorias intestinales (Schoors y col. 2014). Sorprendentemente, en estos casos, donde la mayoría de las células endoteliales están quiescentes, el tratamiento con 3PO no tuvo ningún efecto sobre la vasculatura sana, y sólo se observaron efectos en el frente angiogénico de la vasculatura patológica, lo que confirma que las células endoteliales que migran y proliferan durante el proceso de *sprouting* tienen unos niveles más altos de glicólisis que las células quiescentes y, por consiguiente, 3PO inhibe específicamente el hipermetabolismo asociado a la angiogénesis patológica.

Estos experimentos proponen modular el metabolismo glicolítico para normalizar la vasculatura. En esta línea, hemos planteado el tratamiento con 3PO en modelos animales con EA, así como recurrir a modelos genéticos donde se elimine genéticamente uno de los principales factores de transcripción asociados a la glucólisis anaerobia: HIF1a (Hu y col. 2003; Wang y col. 2017). De nuevo, sería interesante establecer una ventana terapéutica para tratar a los ratones con el fármaco tamoxifeno e inducir la delección del gen mediante la activación de la Cre recombinasa en el pico de patología.

- **Inductores de la angiogénesis.**

La aproximación terapéutica con sorafenib, así como la modulación metabólica que acabamos de describir, pretende bloquear la angiogénesis una vez que se ha inducido, sin embargo, otro planteamiento totalmente distintivo sería potenciarla sobreexpresando aquellas proteínas que se encuentren “aguas abajo” de la activación transcripcional mediada por NICD. En nuestro trabajo se confirma la pérdida de señalización de Notch en células endoteliales cerebrales próximas a las placas de A β y se ha descrito el papel de esta vía en la determinación del fenotipo de célula *stalk*, que sobreexpresa proteínas asociadas con las TJs, promueve la cobertura de las células de la pared del vaso, reestablece las propiedades de la membrana basal etc (De Smet y col. 2009). De esta manera, la sobreexpresión de proteínas relacionadas con la vía Notch podrían contribuir a la normalización de la vasculatura cerebral. Para ello, proponemos sobreexpresar proteínas como NICD1, NICD4 (versiones truncadas pertenecientes a las isoformas endoteliales 1 y 4 del receptor NOTCH) o ERG (factor de transcripción específico de células endoteliales que activa genes diana de la vía Wnt/ β catenina) (Birdsey y col. 2015) específicamente en el endotelio cerebral mediante el uso de los vectores virales adenoasociados ya usados en este trabajo (Körbelin y col. 2016).

2.2.2. El tratamiento de hiperoxia para mejorar la estabilidad vascular presenta variabilidad ligada al género

En este trabajo se ha demostrado que la formación de la placa amiloide supone la creación de un microambiente hipóxico que desencadena el inicio de la angiogénesis. Siguiendo esta premisa, nos planteamos realizar un tratamiento de hiperoxia en ratones *APP₇₅₁SL/+* para poder combatir el estímulo hipóxico de partida e impedir el desarrollo de NPA. Los resultados obtenidos con esta aproximación no mostraron ningún indicio de mejora en el aclaramiento del péptido amiloide, ni en el tamaño de los VaS formados. Una posible explicación que justificaría el fracaso del tratamiento es que los animales se sometieron al 40% de O₂ de forma continua en el tiempo, lo que pudo ocasionar una aclimatación fisiológica sin que supusiera realmente una mayor disponibilidad de oxígeno en sangre. Existe mucha bibliografía disponible sobre la aparición de efectos fisiológicos compensatorios frente a la exposición crónica de altos niveles oxígeno, por ejemplo, se ha descrito que, en humanos, la hiperoxia puede inducir fragilidad osmótica de los glóbulos rojos o hemólisis a consecuencia de procesos de peroxidación lipídica (Larkin y col. 1973; Mengel y col. 1964). Estos datos están en consonancia con la reducción del valor de hematocrito observada en el grupo de animales tratados.

El suministro de oxígeno de un tejido depende del flujo de sangre y de la densidad capilar de la zona (Jain, 2017). Según esto, se ha demostrado que la hiperoxia puede ocasionar vasoconstricción, reducción de la densidad capilar y alteraciones en el flujo sanguíneo, lo que podría desencadenar una disminución en el suministro final de oxígeno (Benderro y col. 2012; Tajima y col. 2014) No obstante, otros estudios sostienen que el incremento en la concentración de oxígeno inspirado sí que se traduce en un aumento de la disponibilidad de oxígeno en el cerebro, lo que ha demostrado tener efecto beneficioso en el tratamiento de pacientes con enfermedades cerebrovasculares (Lu y col. 2009; Tajima y col. 2014; Terraneo y col. 2017). En este trabajo no se han medido directamente los niveles de oxígeno en sangre, pero podría ser un punto crítico para realizar un estudio de correlación con la carga de patología amiloide observada en cada individuo.

Por otro lado, un dato muy llamativo es que el efecto del tratamiento de hiperoxia varía en función del sexo de los individuos: en machos se observa una tendencia a la disminución de la patología amiloide, tanto a nivel de la carga como del tamaño de las placas de A β , mientras que en las hembras parece obtenerse incluso un agravamiento de la patología. No obstante, no debemos dejar pasar que, en modelos de EA la gravedad de la patología es mayor en hembras que en machos, de igual manera que la prevalencia de la enfermedad es mayor en mujeres que en hombres (Niu y col. 2017). Es decir, para un mismo estadio temporal de la enfermedad, las hembras tienen una mayor carga de patología amiloide, lo que sugiere que en estas la acumulación de A β se inicia antes que en los machos (Wang y col. 2003). Varios estudios plantean que las diferencias hormonales entre sexos, especialmente en los niveles de estrógenos, podrían explicar los resultados obtenidos. De hecho, se han diseñado diferentes planteamientos para dilucidar el efecto de los cambios hormonales observados durante la menopausia en la patología de Alzheimer: efectos del tratamiento con estrógenos (17 α -estradiol o 17 β -estradiol) o de una ovariectomía realizada a diferentes edades sobre el depósito de la proteína amiloide. En cualquier caso, aunque parece que existe una asociación entre los niveles hormonales y la EA, no se conoce exactamente el mecanismo molecular implicado (Wang y col. 2003; Yang y col. 2018)

Además del efecto obtenido por las posibles diferencias hormonales, otro aspecto a tener en cuenta es que la ventana terapéutica de actuación para el tratamiento de hiperoxia fue la misma en el grupo de machos y hembras (7 meses), a pesar de que en las hembras la cinética de progresión de la enfermedad es mayor. Los datos sugieren adelantar la ventana terapéutica en el grupo de las hembras para conseguir un mayor efecto del tratamiento.

En conclusión, el potencial terapéutico de la hiperoxia en la EA ha sido evaluado en trabajos anteriores (Choi y col. 2019; Gao y col. 2011) y nuestros datos, aunque son

preliminares, también proponen una mejora en la patología en ratones macho. Evidentemente, se necesitan resultados más concluyentes para validar tal efecto y por ello hemos planteado varias alternativas: i) en primer lugar, aumentar el tamaño muestral para conseguir una mayor significancia estadística e, incluso; ii) iniciar el tratamiento en una cohorte de ratones más jóvenes a fin de ajustar aún más la ventana terapéutica de actuación. iii) Además, habría que realizar pruebas cognitivas en paralelo con el objetivo de evaluar el efecto del tratamiento directamente sobre los síntomas de la enfermedad. iv) Por último, hemos propuesta realizar un tratamiento intermitente de hiperoxia durante 1 mes, en lugar de crónico, lo que reproduciría mucho mejor al tratamiento con oxígeno disponible en clínica.

3. CONSIDERACIONES FINALES

El tratamiento disponible actualmente para abordar la EA no modifica la progresión de la enfermedad, sino que actúa a nivel sintomático compensando el desbalance entre neurotransmisores generado a consecuencia de la neurodegeneración. Las nuevas estrategias terapéuticas han sido diseñadas principalmente para abordar dos de los principales rasgos histopatológicos descritos en esta demencia: la patología amiloide y la patología Tau. No obstante, tanto las terapias que pretenden reducir los niveles de A β del parénquima cerebral, como aquellas dirigidas a disminuir los niveles de fosforilación y agregación de Tau, han fracasado en la clínica, debido a la detección tardía de los síntomas lo que dificulta el tratamiento eficaz en las etapas iniciales. Este escenario nos impulsa a indagar nuevas dianas terapéuticas que puedan abordar la enfermedad desde otra perspectiva (Muñoz-Castro et al., 2020; Yiannopoulou & Papageorgiou, 2020)

En este trabajo hemos descrito que el cerebro de modelos y pacientes de EA acumulan marcadores hipóxicos y angiogénicos, pero, paradójicamente, la microvasculatura cerebral está reducida alrededor de las placas de A β . Hemos demostrado que la angiogénesis se induce en las regiones próximas a los depósitos amiloides, tanto en muestras de humanos como de modelos animales, sin embargo, las células endoteliales expresan una firma molecular de angiogénesis no productiva (NPA) y, a consecuencia de este proceso patológico, acumulan un marcador de células *tip* y favorecen la formación de anomalías vasculares reactivas para IB4 que presentan una reducción en la actividad del receptor NOTCH. Sorprendentemente, la inducción de NPA mediante la pérdida endotelial de la función de PSEN1 en ausencia de patología amiloide, reproduce el fenotipo vascular observado en los modelos de EA que acumulan A β . En este trabajo se muestra que la NPA asociada a las placas de A β acabaría por desensamblar los vasos sanguíneos que se ven comprometidos durante el proceso de angiogénesis, dando lugar a la formación de cicatrices

vasculares (VaS) que son reconocidas por la A β AM, quien contribuye mediante la fagocitosis a la pérdida de vasos sanguíneos observada en estas regiones.

El principal hallazgo derivado de nuestra investigación es destacar el papel que cumple el complejo PS/ γ -secretasa sobre la función vascular y su implicación en la fisiopatología de la EA. Este nexo funcional no había sido considerado hasta la fecha dada la visión neurocéntrica con la que se ha abordado la enfermedad. No obstante, la implicación de PSEN1 en la patología está ampliamente descrita, tanto en casos de fAD como en LOAD (Dorszewska y col. 2016; Placanica y col. 2009). En cuanto a los casos de fAD se han identificado hasta 241 mutaciones en *PSEN1* (<http://www.alzforum.org/mutations>) y, paradójicamente, son mutaciones de pérdida de función que se caracterizan por la incapacidad para procesar otros sustratos entre los que se encuentran NOTCH (De Strooper, 2007; Shen & Kelleher, 2007), Neurexina (Saura y col. 2011; Servián-Morilla y col. 2018), TREM2 (Güner & Lichtenthaler, 2020; Wunderlich y col. 2013), etc., todos ellos relacionados con funciones que se ven comprometidas durante el curso de la EA (función sináptica, fagocitosis y adaptación metabólica de la microglía, etc.) (Kleinberger y col. 2014; Ulland y col. 2017). Por otro lado, se ha demostrado que la actividad del complejo PS/ γ -secretasa decae con la edad, lo que supone el principal factor de riesgo en la LOAD (Placanica y col. 2009). Además, el fracaso obtenido en los ensayos clínicos con los inhibidores de γ - y β -secretasa, ocasionando incluso un empeoramiento de los síntomas cognitivos, ponen de manifiesto la relevancia de este complejo enzimático en la EA (Cummings y col. 2019).

En definitiva, el patrón de expresión ubicuo de PSEN1 en el cerebro, la gran variedad de sustratos descritos relacionados con funciones que se ven comprometidas durante la EA y los diferentes estudios que apuntan a un inicio no neuronal de la patología, destacando el papel vascular y de la respuesta inmune (Golde y col. 2013; Iturria-Medina y col. 2016), suponen el desarrollo de un nuevo mecanismo fisiopatológico en la EA centrado en el papel de PSEN1, más allá de su función en la acumulación del péptido amiloide.

F. CONCLUSIONES

1. La placa de A β constituye un microambiente hipóxico caracterizado por un enriquecimiento en la expresión del ARNm de *Hif1a* en la A β AM.
2. El microambiente hipóxico en torno a las placas de A β induce la expresión de factores pro-angiogénicos como VEGF e integrina α V β 3.
3. La principal fuente de producción de VEGF en el cerebro de modelos de EA son los astrocitos ubicados en las proximidades de las placas amiloides.
4. La expresión de integrina α V β 3 está íntimamente relacionada con la formación de una placa de A β . Este hecho pone de manifiesto la existencia de un proceso angiogénico activo en las proximidades de las placas.
5. Los estudios de angiografía con EB y TER119 revelan que el área que rodea a las placas de A β está hipoperfundida.
6. La firma molecular de angiogénesis no productiva (NPA) está enriquecida en las células endoteliales de la corteza cerebral procedentes del modelo murino *APP-PSEN1/+*.
7. La validación del *microarray* de células endoteliales por inmunohistoquímica demostró que los marcadores específicos de células *tip*, *Plaur* e Isolectina B4 (IB4), están enriquecidos en las proximidades de las placas de A β .
8. La vía Wnt/ β -catenina está reprimida en las células endoteliales de la corteza cerebral procedentes del modelo murino *APP-PSEN1/+*.
9. Existen anomalías vasculares IB4⁺ alrededor de las placas de A β . Estas anomalías vasculares son áreas hipoperfundidas y se acumulan en el parénquima cerebral durante el curso de la patología.
10. Las anomalías vasculares IB4⁺ son consideradas cicatrices vasculares (VaS) y están desprovistas de los marcadores de la unidad neurovascular (UNV).
11. La A β AM interacciona estrechamente con los vasos sanguíneos próximos a las placas de A β y fagocita componentes vasculares en dichas regiones, lo que podría contribuir a la pérdida de vasos sanguíneos observada en torno a las placas.
12. El modelo genético reportero de la actividad transcripcional de Notch revela la pérdida de función de la inhibición lateral mediada por Notch en las proximidades de las VaS.
13. La pérdida de función de la actividad γ -secretasa en células endoteliales reproduce las VaS en ausencia de patología amiloide. Estas estructuras se caracterizan por ser áreas hipoperfundidas, estar desprovistas de marcadores de la UNV y ser fagocitadas por la microglía asociada a dichas regiones, rasgos que comparte con las VaS descritas en la EA.

14. El tratamiento con Sorafenib en el modelo *APP₇₅₁SL/+* valida la existencia de un proceso de NPA en torno a las placas amiloides y podría postularse con un posible tratamiento ralentizador de la progresión de la enfermedad.
15. El tratamiento de hiperoxia en el modelo *APP₇₅₁SL/+* presenta variabilidad ligada al género, observándose una mejora de la patología vascular en el grupo de machos en comparación con un empeoramiento descrito en las hembras. Esta respuesta diferencial en función del sexo podría estar relacionada con la neuropatología y la progresión de la enfermedad.

G. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, N. J., Pizzo, M. E., Preston, J. E., Janigro, D., & Thorne, R. G. (2018). The role of brain barriers in fluid movement in the CNS: is there a 'glymphatic' system? In *Acta Neuropathologica* (Vol. 135, Issue 3, pp. 387–407). Springer Verlag.
<https://doi.org/10.1007/s00401-018-1812-4>
- Alberi, L., Hoey, S. E., Brai, E., Scotti, A. L., & Marathe, S. (2013). Notch signaling in the brain: In good and bad times. *Ageing Research Reviews*, *12*(3), 801–814.
<https://doi.org/10.1016/j.arr.2013.03.004>
- Altieri, M., Di Piero, V., Pasquini, M., Gasparini, M., Vanacore, N., Vicenzini, E., & Lenzi, G. L. (2004). Delayed poststroke dementia: A 4-year follow-up study. *Neurology*, *62*(12), 2193–2197. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000130501.79012.1A>
- Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige erkankung der hirnrinde". *Allgemeine Zeitschrift Psychiatrie Und Psychisch-Gerichtliche Medizin*, *64*, 146–148.
<https://doi.org/10.1002/ca.980080612>
- Andersen, P., Uosaki, H., Shenje, L. T., & Kwon, C. (2012). Non-canonical Notch signaling: Emerging role and mechanism. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 22, Issue 5, pp. 257–265). Trends Cell Biol. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.02.003>
- Armstrong, R. A. (2019). Risk factors for Alzheimer's disease. In *Folia Neuropathologica* (Vol. 57, Issue 2, pp. 87–105). Termedia Publishing House Ltd.
<https://doi.org/10.5114/fn.2019.85929>
- Bacskaï, B. J., & Hyman, B. T. (2002). Alzheimer's disease: What multiphoton microscopy teaches us. *Neuroscientist*, *8*(5), 386–390. <https://doi.org/10.1177/107385802236963>
- Bagyinszky, E., Youn, Y. C., An, S. S. A., & Kim, S. (2014). The genetics of Alzheimer's disease. In *Clinical Interventions in Aging* (Vol. 9, pp. 535–551). DOVE Medical Press Ltd.
<https://doi.org/10.2147/CIA.S51571>
- Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D., & Jones, E. (2011). Alzheimer's disease. *The Lancet*, *377*(9770), 1019–1031. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61349-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61349-9)
- Beglopoulos, V., Sun, X., Saura, C. A., Lemere, C. A., Kim, R. D., & Shen, J. (2004). Reduced β -amyloid production and increased inflammatory responses in presenilin conditional knock-out mice. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(45), 46907–46914.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M409544200>
- Benderro, G. F., Sun, X., Kuang, Y., & Lamanna, J. C. (2012). Decreased VEGF expression and microvascular density, but increased HIF-1 and 2α accumulation and EPO expression in chronic moderate hyperoxia in the mouse brain. *Brain Research*, *1471*, 46–55.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.06.055>
- Benedito, R., & Hellström, M. (2013). Notch as a hub for signaling in angiogenesis. *Experimental Cell Research*, *319*(9), 1281–1288.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.01.010>
- Bennett, M. L., Bennett, F. C., Liddelow, S. A., Ajami, B., Zamanian, J. L., Fernhoff, N. B., Mulinyawe, S. B., Bohlen, C. J., Adil, A., Tucker, A., Weissman, I. L., Chang, E. F., Li, G., Grant, G. A., Hayden Gephart, M. G., & Barres, B. A. (2016). New tools for studying

- microglia in the mouse and human CNS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(12), E1738–E1746.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1525528113>
- Berezovska, O., Xia, M. Q., & Hyman, B. T. (1998). Notch is expressed in adult brain, is coexpressed with presenilin-1, and is altered in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 57(8), 738–745.
<https://doi.org/10.1097/00005072-199808000-00003>
- Bertram, L., Lill, C. M., & Tanzi, R. E. (2010). The genetics of alzheimer disease: Back to the future. In *Neuron* (Vol. 68, Issue 2, pp. 270–281). Neuron.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.10.013>
- Berzin, T. M., Zipser, B. D., Rafii, M. S., Kuo - Leblanc, V., Yancopoulos, G. D., Glass, D. J., Fallon, J. R., & Stopa, E. G. (2000). Agrin and microvascular damage in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 21(2), 349–355. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(00\)00121-4](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(00)00121-4)
- Betz, C., Lenard, A., Belting, H. G., & Affolter, M. (2016). Cell behaviors and dynamics during angiogenesis. *Development (Cambridge)*, 143(13), 2249–2260.
<https://doi.org/10.1242/dev.135616>
- Bierer, L. M., Carlin, L., Schmeidler, J., Davis, K. L., Hof, P. R., Purohit, D. P., & Perl, D. P. (1995). Neocortical Neurofibrillary Tangles Correlate with Dementia Severity in Alzheimer's Disease. *Archives of Neurology*, 52(1), 81–88.
<https://doi.org/10.1001/archneur.1995.00540250089017>
- Birdsey, G. M., Shah, A. V., Dufton, N., Reynolds, L. E., Almagro, L. O., Yang, Y., Aspalter, I. M., Khan, S. T., Mason, J. C., Dejana, E., Göttgens, B., Hodivala-Dilke, K., Gerhardt, H., Adams, R. H., & Randi, A. M. (2015). The endothelial transcription factor erg promotes vascular stability and growth through Wnt/ β -catenin signaling. *Developmental Cell*, 32(1), 82–96.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.11.016>
- Blanchard, V., Moussaoui, S., Czech, C., Touchet, N., Bonici, B., Planche, M., Canton, T., Jedidi, I., Gohin, M., Wirths, O., Bayer, T. A., Langui, D., Duyckaerts, C., Tremp, G., & Pradier, L. (2003). Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with A β deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Experimental Neurology*, 184(1), 247–263.
[https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(03\)00252-8](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00252-8)
- Blanco, R., & Gerhardt, H. (2013). VEGF and Notch in tip and stalk cell selection. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(1), 1–20.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006569>
- Bosco, M. C., Puppo, M., Santangelo, C., Anfosso, L., Pfeffer, U., Fardin, P., Battaglia, F., & Varesio, L. (2006). Hypoxia Modifies the Transcriptome of Primary Human Monocytes: Modulation of Novel Immune-Related Genes and Identification Of CC-Chemokine Ligand 20 as a New Hypoxia-Inducible Gene. *The Journal of Immunology*, 177(3), 1941–1955.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.3.1941>
- Bossy-Wetze, E., Schwarzenbacher, R., & Lipton, S. A. (2004). Molecular pathways to neurodegeneration. *Nature Medicine*, 10(7), S2. <https://doi.org/10.1038/nm1067>
- Brai, E., Alina Raio, N., & Alberi, L. (2016). Notch1 hallmarks fibrillary depositions in sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, 4(1), 64.
<https://doi.org/10.1186/s40478-016-0327-2>
- Brai, E., Marathe, S., Zentilin, L., Giacca, M., Nimpf, J., Kretz, R., Scotti, A., & Alberi, L. (2014).

- Notch1 activity in the olfactory bulb is odour-dependent and contributes to olfactory behaviour. *European Journal of Neuroscience*, *40*(10), 3436–3449. <https://doi.org/10.1111/ejn.12719>
- Brooks, P. C., Clark, R. A., & Cheresh, D. A. (1994). Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, *264*(5158), 569–571. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7512751>
- Cao, W., & Zheng, H. (2018). Correction to: Peripheral immune system in aging and Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, *13*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13024-018-0290-4>
- Carmeliet, P., & De Almodovar, C. R. (2013). VEGF ligands and receptors: Implications in neurodevelopment and neurodegeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *70*(10), 1763–1778. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1283-7>
- Chatzi, C., Schnell, E., & Westbrook, G. L. (2015). Localized hypoxia within the subgranular zone determines the early survival of newborn hippocampal granule cells. *ELife*, *4*, 1–18. <https://doi.org/10.7554/eLife.08722>
- Chen, M., Sun, J., Lu, C., Chen, X., Ba, H., Lin, Q., Cai, J., & Dai, J. (2016). The impact of neuronal Notch-1/JNK pathway on intracerebral hemorrhage-induced neuronal injury of rat model. *Oncotarget*, *7*(45), 73903–73911. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12094>
- Chiba, S. (2006). Concise Review: Notch Signaling in Stem Cell Systems. *Stem Cells*, *24*(11), 2437–2447. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0661>
- Chiu, I. M., Morimoto, E. T. A., Goodarzi, H., Liao, J. T., O'Keeffe, S., Phatnani, H. P., Muratet, M., Carroll, M. C., Levy, S., Tavazoie, S., Myers, R. M., & Maniatis, T. (2013). A neurodegeneration-specific gene-expression signature of acutely isolated microglia from an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Cell Reports*, *4*(2), 385–401. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.06.018>
- Cho, S. J., Yun, S. M., Jo, C., Jeong, J., Park, M. H., Han, C., & Koh, Y. H. (2019). Altered expression of Notch1 in Alzheimer's disease. *PLoS ONE*, *14*(11), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224941>
- Choi, J., Kwon, H. J., Lee, J. E., Lee, Y., Seoh, J. Y., & Han, P. L. (2019). Hyperoxygenation revitalizes Alzheimer's disease pathology through the upregulation of neurotrophic factors. *Aging Cell*, *18*(2), 1–13. <https://doi.org/10.1111/ace1.12888>
- Chung, A. S., & Ferrara, N. (2011). Developmental and pathological angiogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *27*, 563–584. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154002>
- Costa, R. M., Honjo, T., & Silva, A. J. (2003). Learning and memory deficits in notch mutant mice. *Current Biology*, *13*(15), 1348–1354. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00492-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00492-5)
- Cruys, B., Wong, B. W., Kuchnio, A., Verdegem, D., Cantelmo, A. R., Conradi, L. C., Vandekeere, S., Bouche, A., Cornelissen, I., Vinckier, S., Merks, R. M. H., Dejana, E., Gerhardt, H., Dewerchin, M., Bentley, K., & Carmeliet, P. (2016). Glycolytic regulation of cell rearrangement in angiogenesis. *Nature Communications*, *7*, 1–15. <https://doi.org/10.1038/ncomms12240>
- Cummings, J., Lee, G., Ritter, A., Sabbagh, M., & Zhong, K. (2019). Alzheimer's disease drug development pipeline: 2019. *Alzheimer's and Dementia: Translational Research and*

- Clinical Interventions*, 5, 272–293. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2019.05.008>
- Czech, C., Tremp, G., & Pradier, L. (2000). Presenilins and Alzheimer's disease: Biological functions and pathogenic mechanisms. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 60, Issue 4, pp. 363–384). Prog Neurobiol. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(99\)00033-7](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(99)00033-7)
- D'Andrea, M. R., Cole, G. M., & Ard, M. D. (2004). The microglial phagocytic role with specific plaque types in the Alzheimer disease brain. *Neurobiology of Aging*, 25(5), 675–683. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2003.12.026>
- D'Souza, B., Meloty-Kapella, L., & Weinmaster, G. (2010). Canonical and non-canonical notch ligands. *Current Topics in Developmental Biology*, 92(C), 73–129. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(10\)92003-6](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(10)92003-6)
- Dá Mesquita, S., Ferreira, A. C., Sousa, J. C., 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. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 68, pp. 547–562). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.06.014>
- Dalkara, T., Gursoy-Ozdemir, Y., & Yemisçi, M. (2011). Brain microvascular pericytes in health and disease. *Acta Neuropathologica*, 122(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0847-6>
- Daneman, R., Agalliu, D., Zhou, L., Kuhnert, F., Kuo, C. J., & Barres, B. A. (2009). Wnt/ β -catenin signaling is required for CNS, but not non-CNS, angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(2), 641–646. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805165106>
- Dansokho, C., & Heneka, M. T. (2018). Neuroinflammatory responses in Alzheimer's disease. In *Journal of Neural Transmission* (Vol. 125, Issue 5, pp. 771–779). Springer-Verlag Wien. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1831-7>
- De Bock, K., De Smet, F., De Oliveira, R. L., Anthonis, K., & Carmeliet, P. (2009). Endothelial oxygen sensors regulate tumor vessel abnormalization by instructing phalanx endothelial cells. In *Journal of Molecular Medicine* (Vol. 87, Issue 6, pp. 561–569). J Mol Med (Berl). <https://doi.org/10.1007/s00109-009-0482-z>
- De Bock, K., Georgiadou, M., Schoors, S., Kuchnio, A., Wong, B. W., Cantelmo, A. R., Quaegebeur, A., Ghesquière, B., Cauwenberghs, S., Eelen, G., Phng, L. K., Betz, I., Tembuyser, B., Brepoels, K., Welti, J., Geudens, I., Segura, I., Cruys, B., Bifari, F., ... Carmeliet, P. (2013). XRole of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting. *Cell*, 154(3), 651–663. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.037>
- de la Torre, J. (2018). The Vascular Hypothesis of Alzheimer's Disease: A Key to Preclinical Prediction of Dementia Using Neuroimaging. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 63(1), 35–52. <https://doi.org/10.3233/JAD-180004>
- De La Torre, J. C. (2004). Is Alzheimer's disease a neurodegenerative or a vascular disorder? Data, dogma, and dialectics. *Lancet Neurology*, 3(3), 184–190. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(04\)00683-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(04)00683-0)
- De La Torre, J. C. (2010). The vascular hypothesis of Alzheimer's disease: Bench to bedside and beyond. *Neurodegenerative Diseases*, 7(1–3), 116–121. <https://doi.org/10.1159/000285520>
- De Smet, F., Segura, I., De Bock, K., Hohensinner, P. J., & Carmeliet, P. (2009). Mechanisms of

- vessel branching: Filopodia on endothelial tip cells lead the way. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(5), 639–649.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.185165>
- De Strooper, B. (2007). Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer disease. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease. *EMBO Reports*, 8(2), 141–146. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400897>
- De Strooper, B. (2010). Proteases and proteolysis in alzheimer disease: A multifactorial view on the disease process. *Physiological Reviews*, 90(2), 465–494.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2009>
- De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Schrijvers, V., Wolfe, M. S., Ray, W. J., Goate, A., & Kopan, R. (1999). A presenilin-1-dependent γ -secretase-like protease mediates release of notch intracellular domain. *Nature*, 398(6727), 518–522. <https://doi.org/10.1038/19083>
- De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Schrijvers, V., Wolfe, M. S., Ray, W. J., Goate, A., Kopan, R., Placanica, L., Zhu, L., Yue-Ming, L., Adam D. Friedman, S. E. C. and R. L., Bacskai, B. J., Hyman, B. T., Loscalzo, D. E. H. R. C. J., ... Alzheimer, A. (2020). 基因的改变 NIH Public Access. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 23(1), 1–7.
<https://doi.org/10.1016/S>
- Del Álamo, D., Rouault, H., & Schweisguth, F. (2011). Mechanism and significance of cis-inhibition in notch signalling. *Current Biology*, 21(1), 40–47.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.10.034>
- Del Toro, R., Prahst, C., Mathivet, T., Siegfried, G., Kaminker, J. S., Larrivee, B., Breant, C., Duarte, A., Takakura, N., Fukamizu, A., Penninger, J., & Eichmann, A. (2010). Identification and functional analysis of endothelial tip cell-enriched genes. *Blood*, 116(19), 4025–4033.
<https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-270819>
- Delacourte, A. (2005). Tauopathies: recent insights into old diseases. In *Folia Neuropathologica* (Vol. 43, Issue 4). Termedia.
- Desai, B. S., Schneider, J. A., Li, J. L., Carvey, P. M., & Hendey, B. (2009). Evidence of angiogenic vessels in Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, 116(5), 587–597.
<https://doi.org/10.1007/s00702-009-0226-9>
- Dobrina, A., & Rossi, F. (1983). Metabolic properties of freshly isolated bovine endothelial cells. *BBA - Molecular Cell Research*, 762(2), 295–301. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(83\)90084-8](https://doi.org/10.1016/0167-4889(83)90084-8)
- Donoviel, D. B., Hadjantonakis, A. K., Ikeda, M., Zheng, H., Hyslop, P. S. G., & Bernstein, A. (1999). Mice lacking both presenilin genes exhibit early embryonic patterning defects. *Genes and Development*, 13(21), 2801–2810. <https://doi.org/10.1101/gad.13.21.2801>
- Doody, R. S., Raman, R., Farlow, M., Iwatsubo, T., Vellas, B., Joffe, S., Kieburtz, K., He, F., Sun, X., Thomas, R. G., Aisen, P. S., Siemers, E., Sethuraman, G., & Mohs, R. (2013). A Phase 3 Trial of Semagacestat for Treatment of Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*, 369(4), 341–350. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1210951>
- Dorszewska, J., Prendecki, M., Oczkowska, A., Dezor, M., & Kozubski, W. (2016). Molecular Basis of Familial and Sporadic Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*, 13(9), 952–963. <https://doi.org/10.2174/1567205013666160314150501>

- Du, H., Hou, P., Zhang, W., & Li, Q. (2018). Advances in CLARITY-based tissue clearing and imaging (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, *16*(3), 1567–1576. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6374>
- Dudvarski Stankovic, N., Teodorczyk, M., Ploen, R., Zipp, F., & Schmidt, M. H. H. (2016). Microglia–blood vessel interactions: a double-edged sword in brain pathologies. *Acta Neuropathologica*, *131*(3), 347–363. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1524-y>
- Duggan, S. P., & McCarthy, J. V. (2016). Beyond γ -secretase activity: The multifunctional nature of presenilins in cell signalling pathways. In *Cellular Signalling* (Vol. 28, Issue 1, pp. 1–11). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.10.006>
- Eltzschig, H. K., & Carmeliet, P. (2011). Hypoxia and Inflammation. *New England Journal of Medicine*, *364*(7), 656–665. <https://doi.org/10.1056/nejmra0910283>
- Ertürk, A., Becker, K., Jährling, N., Mauch, C. P., Hojer, C. D., Egen, J. G., Hellal, F., Bradke, F., Sheng, M., & Dodt, H. U. (2012). Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nature Protocols*, *7*(11), 1983–1995. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.119>
- Escudier, B., Eisen, T., Stadler, W. M., Szczylik, C., Oudard, S., Siebels, M., Negrier, S., Chevreau, C., Solska, E., Desai, A. A., Rolland, F., Demkow, T., Hutson, T. E., Gore, M., Freeman, S., Schwartz, B., Shan, M., Simantov, R., & Bukowski, R. M. (2007). Sorafenib in Advanced Clear-Cell Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine*, *356*(2), 125–134. <https://doi.org/10.1056/nejmoa060655>
- Fang, H., Zhang, L. F., Meng, F. T., Du, X., & Zhou, J. N. (2010). Acute hypoxia promote the phosphorylation of tau via ERK pathway. *Neuroscience Letters*, *474*(3), 173–177. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.03.037>
- Farlow, M. R., Miller, M. L., & Pejovic, V. (2008). Treatment options in Alzheimer’s disease: Maximizing benefit, managing expectations. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, *25*(5), 408–422. <https://doi.org/10.1159/000122962>
- Flor-García, M., Terreros-Roncal, J., Moreno-Jiménez, E. P., Ávila, J., Rábano, A., & Llorens-Martín, M. (2020). Unraveling human adult hippocampal neurogenesis. *Nature Protocols*, *15*(2), 668–693. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0267-y>
- Forde, A., Constien, R., Gröne, H. J., Hämmerling, G., & Arnold, B. (2002). Temporal Cre-mediated recombination exclusively in endothelial cells using Tie2 regulatory elements. *Genesis*, *33*(4), 191–197. <https://doi.org/10.1002/gene.10117>
- Fortini, M. E. (2009). Notch Signaling: The Core Pathway and Its Posttranslational Regulation. *Developmental Cell*, *16*(5), 633–647. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.03.010>
- Fraisl, P., Mazzone, M., Schmidt, T., & Carmeliet, P. (2009). Regulation of Angiogenesis by Oxygen and Metabolism. *Developmental Cell*, *16*(2), 167–179. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.01.003>
- Funato, H., Yoshimura, M., Kusui, K., Tamaoka, A., Ishikawa, K., Ohkoshi, N., Namekata, K., Okeda, R., & Ihara, Y. (1998). Quantitation of amyloid β -protein (A β) in the cortex during aging and in Alzheimer’s disease. *American Journal of Pathology*, *152*(6), 1633–1640.
- Gao, B., Long, Z., Zhao, L., & He, G. (2011). Effect of normobaric hyperoxia on behavioral deficits and neuropathology in alzheimer’s disease mouse model. *Journal of Alzheimer’s Disease*, *27*(2), 317–326. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-110308>

- Gebala, V., Collins, R., Geudens, I., Phng, L. K., & Gerhardt, H. (2016). Blood flow drives lumen formation by inverse membrane blebbing during angiogenesis in vivo. *Nature Cell Biology*, *18*(4), 443–450. <https://doi.org/10.1038/ncb3320>
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., & Betsholtz, C. (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *Journal of Cell Biology*, *161*(6), 1163–1177. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302047>
- Giagtzoglou, N., Ly, C. V., & Bellen, H. J. (2009). Cell adhesion, the backbone of the synapse: “vertebrate” and “invertebrate” perspectives. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *1*(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003079>
- Gaiimo, B. D., & Borggreffe, T. (2018). Introduction to molecular mechanisms in notch signal transduction and disease pathogenesis. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1066, pp. 3–30). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/978-3-319-89512-3_1
- Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Maltezos, E., Papazoglou, D., Simopoulos, C., Gatter, K. C., Harris, A. L., & Koukourakis, M. I. (2003). Hypoxia inducible factor 1 α and 2 α overexpression in inflammatory bowel disease. *Journal of Clinical Pathology*, *56*(3), 209–213. <https://doi.org/10.1136/jcp.56.3.209>
- Gierer, A. (1974). Molecular models and combinatorial principles in cell differentiation and morphogenesis. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *38*, 951–961. <https://doi.org/10.1101/SQB.1974.038.01.097>
- Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D., & Huber, T. (2015). Origin and differentiation of microglia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*(8), 1–15. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3627983&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Goate, A., & Hardy, J. (2012). Twenty years of Alzheimer’s disease-causing mutations. *Journal of Neurochemistry*, *120*(SUPPL. 1), 3–8. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07575.x>
- Goedert, M., & Spillantini, M. G. (2006). A century of Alzheimer’s disease. *Science*, *314*(5800), 777–781. <https://doi.org/10.1126/science.1132814>
- Goel, S., Duda, D. G., Xu, L., Munn, L. L., Boucher, Y., Fukumura, D., & Jain, R. K. (2012). Normalization of the Vasculature for Treatment of. *Physiological Reviews*, *91*(3), 1071–1121. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2010.NORMALIZATION>
- Golde, T. E., Streit, W. J., & Chakrabarty, P. (2013). Alzheimer’s disease risk alleles in TREM2 illuminate innate immunity in Alzheimer’s disease. *Alzheimer’s Research and Therapy*, *5*(3). <https://doi.org/10.1186/alzrt178>
- Gómez-Isla, T., Price, J. L., McKeel, D. W., Morris, J. C., Growdon, J. H., & Hyman, B. T. (1996). Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer’s disease. *Journal of Neuroscience*, *16*(14), 4491–4500. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.16-14-04491.1996>
- Gomez-Isla, T., Spires, T., De Calignon, A., & Hyman, B. T. (2008). Neuropathology of Alzheimer’s Disease. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 89, pp. 233–243). Handb Clin Neurol. [https://doi.org/10.1016/S0072-9752\(07\)01222-5](https://doi.org/10.1016/S0072-9752(07)01222-5)
- González, H., Elgueta, D., Montoya, A., & Pacheco, R. (2014). Neuroimmune regulation of

- microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. In *Journal of Neuroimmunology* (Vol. 274, Issues 1–2, pp. 1–13). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.07.012>
- González, N., Rodríguez, N., Torres, W., ÓCallaghan, J., & De Jesús, R. (2011). Un protocolo simple adn. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad Del Zulia*, 21(3), 233–238.
- Gordon, W. R., Vardar-Ulu, D., Histen, G., Sanchez-Irizarry, C., Aster, J. C., & Blacklow, S. C. (2007). Structural basis for autoinhibition of Notch. *Nature Structural and Molecular Biology*, 14(4), 295–300. <https://doi.org/10.1038/nsmb1227>
- Grammas, P., Tripathy, D., Sanchez, A., Yin, X., & Luo, J. (2011). Brain microvasculature and hypoxia-related proteins in Alzheimer's disease. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 4(6), 616–627.
- Griffioen, A. W., Van der Schaft, D. W. J., Barendsz-Janson, A. F., Cox, A., Struijker Boudier, H. A. J., Hillen, H. F. P., & Mayo, K. H. (2001). Anginex, a designed peptide that inhibits angiogenesis. *Biochemical Journal*, 354(2), 233–242. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3540233>
- Grimshaw, M. J., & Balkwill, F. R. (2001). Inhibition of monocyte and macrophage chemotaxis by hypoxia and inflammation - A potential mechanism. *European Journal of Immunology*, 31(2), 480–489. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200102\)31:2<480::AID-IMMU480>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200102)31:2<480::AID-IMMU480>3.0.CO;2-L)
- Grubman, A., Chew, G., Ouyang, J. F., Sun, G., Choo, X. Y., McLean, C., Simmons, R. K., Buckberry, S., Vargas-Landin, D. B., Poppe, D., Pflueger, J., Lister, R., Rackham, O. J. L., Petretto, E., & Polo, J. M. (2019). A single-cell atlas of entorhinal cortex from individuals with Alzheimer's disease reveals cell-type-specific gene expression regulation. *Nature Neuroscience*, 22(12), 2087–2097. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0539-4>
- Guimerà, A., Gironès, X., & Cruz-Sánchez, F. (2002). Actualización sobre la patología de la enfermedad de Alzheimer. *Revista Española de Patología*, 35(1), 264–269.
- Guix, F. X., Wahle, T., Vennekens, K., Snellinx, A., Chávez-Gutiérrez, L., Ill-Raga, G., Ramos-Fernandez, E., Guardia-Laguarta, C., Lleó, A., Arimon, M., Berezovska, O., Muñoz, F. J., Dotti, C. G., & De Strooper, B. (2012). Modification of γ -secretase by nitrosative stress links neuronal ageing to sporadic Alzheimer's disease. *EMBO Molecular Medicine*, 4(7), 660–673. <https://doi.org/10.1002/emmm.201200243>
- Güner, G., & Lichtenthaler, S. F. (2020). The substrate repertoire of γ -secretase/presenilin. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 105(January), 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.05.019>
- Gurevich, D. B., Severn, C. E., Twomey, C., Greenhough, A., Cash, J., Toye, A. M., Mellor, H., & Martin, P. (2018). Live imaging of wound angiogenesis reveals macrophage orchestrated vessel sprouting and regression. *The EMBO Journal*, 37(13). <https://doi.org/10.15252/emboj.201797786>
- Haapasalo, A., & Kovacs, D. M. (2011). The many substrates of presenilin/ γ -secretase. In *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 25, Issue 1, pp. 3–28). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-101065>
- Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G., & Sisodia, S. (2012). Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(5).

- <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006270>
- Halbleib, J. M., & Nelson, W. J. (2006). Cadherins in development: Cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes and Development*, *20*(23), 3199–3214. <https://doi.org/10.1101/gad.1486806>
- Hane, F. T., Lee, B. Y., & Leonenko, Z. (2017). Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 1: Pathology. *Journal of Alzheimer's Disease*, *57*(1), 1–28. <https://doi.org/10.3233/JAD-160882>
- Hane, F. T., Robinson, M., Lee, B. Y., Bai, O., Leonenko, Z., & Albert, M. S. (2017). Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 3: Diagnosis and Treatment. *Journal of Alzheimer's Disease*, *57*(3), 645–665. <https://doi.org/10.3233/JAD-160907>
- Hansra, G. K., Popov, G., Banaczek, P. O., Vogiatzis, M., Jegathees, T., Goldbury, C. S., & Cullen, K. M. (2019). The neuritic plaque in Alzheimer's disease: perivascular degeneration of neuronal processes. *Neurobiology of Aging*, *82*, 88–101. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2019.06.009>
- Hardy, J., & Selokoe, D. (2002). The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease. *Amyloid International Journal Of Experimental And Clinical Investigation*, *297*(5580), 353–357.
- Helmes, E., & Østbye, T. (2002). Beyond memory impairment: Cognitive changes in Alzheimer's disease. *Archives of Clinical Neuropsychology*, *17*(2), 179–193. [https://doi.org/10.1016/S0887-6177\(00\)00109-8](https://doi.org/10.1016/S0887-6177(00)00109-8)
- Heneka, M. T., Carson, M. J., Khoury, J. El, Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., ... Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. In *The Lancet Neurology* (Vol. 14, Issue 4, pp. 388–405). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5)
- Heneka, M. T., Kummer, M. P., & Latz, E. (2014). Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Immunology*, *14*(7), 463–477. <https://doi.org/10.1038/nri3705>
- Herbert, S. P., & Stainier, D. Y. R. (2011). Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *12*(9), 551–564. <https://doi.org/10.1038/nrm3176>
- Herzenberg, L. A., Tung, J., Moore, W. A., Herzenberg, L. A., & Parks, D. R. (2006). Interpreting flow cytometry data: A guide for the perplexed. *Nature Immunology*, *7*(7), 681–685. <https://doi.org/10.1038/ni0706-681>
- Hickman, S. E., Kingery, N. D., Ohsumi, T. K., Borowsky, M. L., Wang, L. C., Means, T. K., & El Khoury, J. (2013). The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nature Neuroscience*, *16*(12), 1896–1905. <https://doi.org/10.1038/nn.3554>
- Ho, A., & Shen, J. (2011). Presenilins in synaptic function and disease. *Trends in Molecular Medicine*, *17*(11), 617–624. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.06.002>
- Hohman, T. J., Bell, S. P., & Jefferson, A. L. (2015). The role of vascular endothelial growth factor in neurodegeneration and cognitive decline: Exploring interactions with biomarkers of Alzheimer disease. *JAMA Neurology*, *72*(5), 520–529. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.4761>

- Hu, C.-J., Wang, L.-Y., Chodosh, L. A., Keith, B., & Simon, M. C. (2003). Differential Roles of Hypoxia-Inducible Factor 1 α (HIF-1 α) and HIF-2 α in Hypoxic Gene Regulation. *Molecular and Cellular Biology*, 23(24), 9361–9374. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.24.9361-9374.2003>
- Hunting, P. (2015). Alois Alzheimer (1864–1915). *Journal of Medical Biography*, 23(4), 238–239. <https://doi.org/10.1177/0967772015589881>
- Iadecola, C. (2004). Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 5, Issue 5, pp. 347–360). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrn1387>
- Igarashi, H., Suzuki, Y., Kwee, I. L., & Nakada, T. (2014). Water influx into cerebrospinal fluid is significantly reduced in senile plaque bearing transgenic mice, supporting beta-amyloid clearance hypothesis of Alzheimer's disease. *Neurological Research*, 36(12), 1094–1098. <https://doi.org/10.1179/1743132814Y.0000000434>
- Iliff, J. J., Wang, M., Liao, Y., Plogg, B. A., Peng, W., Gundersen, G. A., Benveniste, H., Vates, G. E., Deane, R., Goldman, S. A., Nagelhus, E. A., & Nedergaard, M. (2012). A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Science Translational Medicine*, 4(147). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003748>
- Imbimbo, B. P., Lombard, J., & Pomara, N. (2005). Pathophysiology of Alzheimer's disease. *Neuroimaging Clinics of North America*, 15(4), 727–753. <https://doi.org/10.1016/j.nic.2005.09.009>
- Imtiyaz, H. Z., & Simon, M. C. (2010). *Hypoxia-Inducible Factors as Essential Regulators of Inflammation*. 215, 105–120. https://doi.org/10.1007/82_2010_74
- Inoue, E., Deguchi-Tawarada, M., Togawa, A., Matsui, C., Arita, K., Katahira-Tayama, S., Sato, T., Yamauchi, E., Oda, Y., & Takai, Y. (2009). Synaptic activity prompts γ -secretase-mediated cleavage of EphA4 and dendritic spine formation. *Journal of Cell Biology*, 185(3), 551–564. <https://doi.org/10.1083/jcb.200809151>
- Iturria-Medina, Y., Sotero, R. C., Toussaint, P. J., Mateos-Pérez, J. M., Evans, A. C., Weiner, M. W., Aisen, P., Petersen, R., Jack, C. R., Jagust, W., Trojanowki, J. Q., Toga, A. W., Beckett, L., Green, R. C., Saykin, A. J., Morris, J., Shaw, L. M., Khachaturian, Z., Sorensen, G., ... Furst, A. J. (2016). Early role of vascular dysregulation on late-onset Alzheimer's disease based on multifactorial data-driven analysis. *Nature Communications*, 7(May). <https://doi.org/10.1038/ncomms11934>
- Jahn, H. (2013). Memory loss in alzheimer's disease. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 15(4), 445–454. <https://doi.org/10.31887/dcns.2013.15.4/hjahn>
- Jain, K. K. (2017). Textbook of Hyperbaric Medicine. *Textbook of Hyperbaric Medicine*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-47140-2>
- Jankowsky, J. L., Fadale, D. J., Anderson, J., Xu, G. M., Gonzales, V., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Lee, M. K., Younkin, L. H., Wagner, S. L., Younkin, S. G., & Borchelt, D. R. (2004). Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue β -amyloid peptide in vivo: Evidence for augmentation of a 42-specific γ secretase. *Human Molecular Genetics*, 13(2), 159–170. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh019>
- Jolivel, V., Bicker, F., Binamé, F., Ploen, R., Keller, S., Gollan, R., Jurek, B., Birkenstock, J., Poisa-Beiro, L., Bruttger, J., Opitz, V., Thal, S. C., Waisman, A., Bäuerle, T., Schäfer, M. K., Zipp,

- F., & Schmidt, M. H. H. (2015). Perivascular microglia promote blood vessel disintegration in the ischemic penumbra. *Acta Neuropathologica*, *129*(2), 279–295. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1372-1>
- Jucker, M., Tian, M., & Ingram, D. K. (1996). Laminins in the adult and aged brain. *Molecular and Chemical Neuropathology*, *28*(1–3), 209–218. <https://doi.org/10.1007/BF02815224>
- Kaelin, W. G., & Ratcliffe, P. J. (2008). Oxygen Sensing by Metazoans: The Central Role of the HIF Hydroxylase Pathway. *Molecular Cell*, *30*(4), 393–402. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.04.009>
- Kalaria, R. N., Cohen, D. L., Premkumar, D. R. D., Nag, S., Lamanna, J. C., & Lust, W. D. (1998). Vascular endothelial growth factor in Alzheimer's disease and experimental cerebral ischemia. *Molecular Brain Research*, *62*(1), 101–105. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(98\)00190-9](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(98)00190-9)
- Kalaria, Rajesh N. (1997). Cerebrovascular degeneration is related to amyloid- β protein deposition in Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *826*, 263–271. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1997.tb48478.x>
- Kalburgi, S. N., Khan, N. N., & Gray, S. J. (2013). Recent gene therapy advancements for neurological diseases. *Discovery Medicine*, *15*(81), 111–119. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23449113/>
- Kamei, M., Brian Saunders, W., Bayless, K. J., Dye, L., Davis, G. E., & Weinstein, B. M. (2006). Endothelial tubes assemble from intracellular vacuoles in vivo. *Nature*, *442*(7101), 453–456. <https://doi.org/10.1038/nature04923>
- Karch, C. M., Cruchaga, C., & Goate, A. M. (2014a). Alzheimer's disease genetics: From the bench to the clinic. *Neuron*, *83*(1), 11–26. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.05.041>
- Karch, C. M., Cruchaga, C., & Goate, A. M. (2014b). Alzheimer's disease genetics: From the bench to the clinic. *Neuron*, *83*(1), 11–26. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.05.041>
- Kauffmann, A., Gentleman, R., & Huber, W. (2009). arrayQualityMetrics - A bioconductor package for quality assessment of microarray data. *Bioinformatics*, *25*(3), 415–416. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn647>
- Kawai, M., Kalaria, R. N., Harik, S. I., & Perry, G. (1990). The relationship of amyloid plaques to cerebral capillaries in Alzheimer's disease. *American Journal of Pathology*, *137*(6), 1435–1446.
- Kawai, Mitsuru, Cras, P., & Perry, G. (1992). Serial reconstruction of β -protein amyloid plaques: relationship to microvessels and size distribution. *Brain Research*, *592*(1–2), 278–282. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)91686-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)91686-9)
- Kawamura, Y., Kikuchi, A., Takada, R., Takada, S., Sudoh, S., Shibamoto, S., Yanagisawa, K., & Komano, H. (2001). Inhibitory effect of a presenilin 1 mutation on the Wnt signalling pathway by enhancement of β -catenin phosphorylation. *European Journal of Biochemistry*, *268*(10), 3036–3041. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02197.x>
- KAY, D. W., BEAMISH, P., & ROTH, M. (1964). Old Age Mental Disorders in Newcastle Upon TynE. PART I. *The British Journal of Psychiatry : The Journal of Mental Science*, *110*, 146–158. <https://doi.org/10.1192/bjp.110.465.146>
- Keren-shaul, H., Spinrad, A., Weiner, A., Colonna, M., Schwartz, M., Amit, I., Keren-shaul, H., Spinrad, A., Weiner, A., Matcovitch-natan, O., & Dvir-szternfeld, R. (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*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.018>
- Kimberly, W. T., Xia, W., Rahmati, T., Wolfe, M. S., & Selkoe, D. J. (2000). The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for γ -secretase activity and amyloid β -protein generation. *Journal of Biological Chemistry*, 275(5), 3173–3178. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.5.3173>
- Kimura, T., Hashimura, T., & Miyakawa, T. (1991). Observations of Microvessels in the Brain with Alzheimer's Disease by the Scanning Electron Microscopy. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 45(3), 671–676. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1819.1991.tb01189.x>
- Kisler, K., Nelson, A. R., Rege, S. V., Ramanathan, A., Ahuja, A., Lazic, D., Tsai, P. S., Zhao, Z., Zhou, Y., David, A., Zlokovic, B. V., Angeles, L., Diego, S., Jolla, L., Medical, T. M., District, S., & Hospital, M. G. (2017). *HHS Public Access*. 20(3), 406–416. <https://doi.org/10.1038/nn.4489.Pericyte>
- Kleinberger, G., Yamanishi, Y., Suárez-Calvet, M., Czirr, E., Lohmann, E., Cuyvers, E., Struyfs, H., Pettkus, N., Wenninger-Weinzierl, A., Mazaheri, F., Tahirovic, S., Lleó, A., Alcolea, D., Fortea, J., Willem, M., Lammich, S., Molinuevo, J. L., Sánchez-Valle, R., Antonell, A., ... Haass, C. (2014). TREM2 mutations implicated in neurodegeneration impair cell surface transport and phagocytosis. *Science Translational Medicine*, 6(243). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009093>
- Konishi, H., Okamoto, T., Hara, Y., Komine, O., Tamada, H., Maeda, M., Osako, F., Kobayashi, M., Nishiyama, A., Kataoka, Y., Takai, T., Udagawa, N., Jung, S., Ozato, K., Tamura, T., Tsuda, M., Yamanaka, K., Ogi, T., Sato, K., & Kiyama, H. (2020). Astrocytic phagocytosis is a compensatory mechanism for microglial dysfunction. *The EMBO Journal*, 39(22), 1–18. <https://doi.org/10.15252/emj.2020104464>
- Kopan, R., & Ilagan, M. X. G. (2009). The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. *Cell*, 137(2), 216–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.045>
- Körbelin, J., Dogbevia, G., Michelfelder, S., Ridder, D. A., Hunger, A., Wenzel, J., Seismann, H., Lampe, M., Bannach, J., Pasparakis, M., Kleinschmidt, J. A., Schwaninger, M., & Trepel, M. (2016). A brain microvasculature endothelial cell-specific viral vector with the potential to treat neurovascular and neurological diseases. *EMBO Molecular Medicine*, 8(6), 609–625. <https://doi.org/10.15252/emmm.201506078>
- Korte, N., Nortley, R., & Attwell, D. (2020). Cerebral blood flow decrease as an early pathological mechanism in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 140(6), 793–810. <https://doi.org/10.1007/s00401-020-02215-w>
- Kouznetsova, E., Klingner, M., Sorger, D., Sabri, O., Großmann, U., Steinbach, J., Scheunemann, M., & Schliebs, R. (2006). Developmental and amyloid plaque-related changes in cerebral cortical capillaries in transgenic Tg2576 Alzheimer mice. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 24(2–3), 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2005.11.011>
- Krüger, B., Krick, S., Dhillon, N., Lerner, S. M., Ames, S., Bromberg, J. S., Lin, M., Walsh, L., Vella, J., Fischeder, M., Krämer, B. K., Colvin, R. B., Heeger, P. S., Murphy, B. T., & Schröppel, B. (2009). Donor toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9), 3390–3395. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810169106>

- Kumar, A., Jaskirat, S., Amandeep, G., & Tsao, J. W. (2018). *Alzheimer Disease - StatPearls - NCBI Bookshelf*. StatPearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499922/>
- Kumar, A., & Tsao, J. W. (2018). Alzheimer Disease: REVUE. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499922/>
- Ladi, E., Nichols, J. T., Ge, W., Miyamoto, A., Yao, C., Yang, L. T., Boulter, J., Sun, Y. E., Kintner, C., & Weinmaster, G. (2005). The divergent DSL ligand Dll3 does not activate Notch signaling but cell autonomously attenuates signaling induced by other DSL ligands. *Journal of Cell Biology*, *170*(6), 983–992. <https://doi.org/10.1083/jcb.200503113>
- Lai, M. B., Zhang, C., Shi, J., Johnson, V., Khandan, L., McVey, J., Klymkowsky, M. W., Chen, Z., & Junge, H. J. (2017). TSPAN12 Is a Norrin Co-receptor that Amplifies Frizzled4 Ligand Selectivity and Signaling. *Cell Reports*, *19*(13), 2809–2822. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.004>
- Lall, R., Mohammed, R., & Ojha, U. (2019). What are the links between hypoxia and alzheimer's disease? *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, *15*, 1343–1354. <https://doi.org/10.2147/NDT.S203103>
- Lambert, J. C., Ibrahim-Verbaas, C. A., Harold, D., Naj, A. C., Sims, R., Bellenguez, C., Jun, G., DeStefano, A. L., Bis, J. C., Beecham, G. W., Grenier-Boley, B., Russo, G., Thornton-Wells, T. A., Jones, N., Smith, A. V., Chouraki, V., Thomas, C., Ikram, M. A., Zelenika, D., ... Seshadri, S. (2013a). Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, *45*(12), 1452–1458. <https://doi.org/10.1038/ng.2802>
- Lambert, J. C., Ibrahim-Verbaas, C. A., Harold, D., Naj, A. C., Sims, R., Bellenguez, C., Jun, G., DeStefano, A. L., Bis, J. C., Beecham, G. W., Grenier-Boley, B., Russo, G., Thornton-Wells, T. A., Jones, N., Smith, A. V., Chouraki, V., Thomas, C., Ikram, M. A., Zelenika, D., ... Seshadri, S. (2013b). Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, *45*(12), 1452–1458. <https://doi.org/10.1038/ng.2802>
- Larkin, E. C., Williams, W. T., & Ulvedal, F. (1973). Human hematologic responses to 4 hr of isobaric hyperoxic exposure (100 per cent oxygen at 760 mm Hg). *Journal of Applied Physiology*, *34*(4), 417–421. <https://doi.org/10.1152/jappl.1973.34.4.417>
- Lee, G. D., Aruna, J. H., Barrett, P. M., Lei, D. L., Ingram, D. K., & Mouton, P. R. (2005). Stereological analysis of microvascular parameters in a double transgenic model of Alzheimer's disease. *Brain Research Bulletin*, *65*(4), 317–322. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2004.11.024>
- Lee, J. H., Yu, W. H., Kumar, A., Lee, S., Mohan, P. S., Peterhoff, C. M., Wolfe, D. M., Martinez-Vicente, M., Massey, A. C., Sovak, G., Uchiyama, Y., Westaway, D., Cuervo, A. M., & Nixon, R. A. (2010). Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell*, *141*(7), 1146–1158. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.008>
- Leijenaar, J. F., van Maurik, I. S., Kuijper, J. P. A., van der Flier, W. M., Scheltens, P., Barkhof, F., & Prins, N. D. (2017). Lower cerebral blood flow in subjects with Alzheimer's dementia, mild cognitive impairment, and subjective cognitive decline using two-dimensional phase-contrast magnetic resonance imaging. *Alzheimer's and Dementia: Diagnosis, Assessment and Disease Monitoring*, *9*, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.dadm.2017.10.001>

- Leslie, J. D., Ariza-McNaughton, L., Bermange, A. L., McAdow, R., Johnson, S. L., & Lewis, J. (2007). Endothelial signalling by the Notch ligand Delta-like 4 restricts angiogenesis. *Development*, *134*(5), 839–844. <https://doi.org/10.1242/dev.003244>
- Levitan, D., & Greenwald, I. (1995). Facilitation of lin-12-mediated signalling by sel-12, a *Caenorhabditis elegans* S182 Alzheimer's disease gene. In *Nature* (Vol. 377, Issue 6547, pp. 351–354). <https://doi.org/10.1038/377351a0>
- Li, H., Wolfe, M. S., & Selkoe, D. J. (2009). Toward Structural Elucidation of the γ -Secretase Complex. *Structure*, *17*(3), 326–334. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.01.007>
- Li, J., Fici, G. J., Mao, C. A., Myers, R. L., Shuang, R., Donoho, G. P., Pauley, A. M., Himes, C. S., Qin, W., Kola, I., Merchant, K. M., & Nye, J. S. (2003). Positive and negative regulation of the γ -secretase activity by Nicastrin in a murine model. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(35), 33445–33449. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301288200>
- Li, L., Zhang, X., Yang, D., Luo, G., Chen, S., & Le, W. (2009). Hypoxia increases A β generation by altering β - and γ -cleavage of APP. *Neurobiology of Aging*, *30*(7), 1091–1098. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.10.011>
- Li, X., & Buxbaum, J. N. (2011). Transthyretin and the brain re-visited: Is neuronal synthesis of transthyretin protective in Alzheimer's disease? *Molecular Neurodegeneration*, *6*(1), 79. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-79>
- Licht, T., Goshen, I., Avital, A., Kreisel, T., Zubedat, S., Eavri, R., Segal, M., Yirmiya, R., & Keshet, E. (2011). Reversible modulations of neuronal plasticity by VEGF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(12), 5081–5086. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007640108>
- Liu, C., Cui, G., Zhu, M., Kang, X., & Guo, H. (2014). Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Chemokines produced by astrocytes and chemokine receptors. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, *7*(12), 8342–8355.
- Liu, G., Mestre, H., Sweeney, A. M., Sun, Q., Weikop, P., Du, T., & Nedergaard, M. (2020). Direct Measurement of Cerebrospinal Fluid Production in Mice. *Cell Reports*, *33*(12), 108524. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108524>
- Livingston, G., Sommerlad, A., Orgeta, V., Costafreda, S. G., Huntley, J., Ames, D., Ballard, C., Banerjee, S., Burns, A., Cohen-Mansfield, J., Cooper, C., Fox, N., Gitlin, L. N., Howard, R., Kales, H. C., Larson, E. B., Ritchie, K., Rockwood, K., Sampson, E. L., ... Mukadam, N. (2017). Dementia prevention, intervention, and care. *The Lancet*, *390*(10113), 2673–2734. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31363-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31363-6)
- Lobov, I. B., Renard, R. A., Papadopoulos, N., Gale, N. W., Thurston, G., Yancopoulos, G. D., & Wiegand, S. J. (2007). Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(9), 3219–3224. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611206104>
- Love, S., & Miners, J. S. (2016). Cerebral Hypoperfusion and the Energy Deficit in Alzheimer's Disease. *Brain Pathology*, *26*(5), 607–617. <https://doi.org/10.1111/bpa.12401>
- Lu, J., Dai, G., Egi, Y., Huang, S., Kwon, S. J., Lo, E. H., & Kim, Y. R. (2009). Characterization of cerebrovascular responses to hyperoxia and hypercapnia using MRI in rat. *NeuroImage*, *45*(4), 1126–1134. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2008.11.037>
- Ma, G., Li, T., Price, D. L., & Wong, P. C. (2005). APH-1a is the principal mammalian APH-1 isoform present in γ -secretase complexes during embryonic development. *Journal of*

- Neuroscience*, 25(1), 192–198. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3814-04.2005>
- Madisen, L., Zwingman, T. A., Sunkin, S. M., Oh, S. W., Zariwala, H. A., Gu, H., Ng, L. L., Palmiter, R. D., Hawrylycz, M. J., Jones, A. R., Lein, E. S., Zeng, H., Hatim, A., Gu, H., Ng, L. L., Palmiter, R. D., Hawrylycz, M. J., Allan, R., Lein, E. S., & Zeng, H. (2010). A robust and high-throughput Cre Repointing and characterization. *Nat Neurosci*, 13(1), 133–140. <https://doi.org/10.1038/nn.2467.A>
- Marambaud, P., Wen, P. H., Dutt, A., Shioi, J., Takashima, A., Siman, R., & Robakis, N. K. (2003). A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/ ϵ -cleavage of N-Cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations. *Cell*, 114(5), 635–645. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2003.08.008>
- March-Diaz, R., Lara-Ureña, N., Romero-Molina, C., Heras-Garvin, A., Ortega-de San Luis, C., Alvarez-Vergara, M. I., Sanchez-Garcia, M. A., Sanchez-Mejias, E., Davila, J. C., Rosales-Nieves, A. E., Forja, C., Navarro, V., Gomez-Arboledas, A., Sanchez-Mico, M. V., Viehweger, A., Gerpe, A., Hodson, E. J., Vizueté, M., Bishop, T., ... Pascual, A. (2021). Hypoxia compromises the mitochondrial metabolism of Alzheimer's disease microglia via HIF1. *Nature Aging*, 1(4), 385–399. <https://doi.org/10.1038/s43587-021-00054-2>
- Mattson, M. P., & Arumugam, T. V. (2018). Hallmarks of Brain Aging: Adaptive and Pathological Modification by Metabolic States. In *Cell Metabolism* (Vol. 27, Issue 6, pp. 1176–1199). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.05.011>
- Mattsson, N., Tosun, D., Insel, P. S., Simonson, A., Jack, C. R., Beckett, L. A., Donohue, M., Jagust, W., Schuff, N., & Weiner, M. W. (2014). Association of brain amyloid- β with cerebral perfusion and structure in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Brain*, 137(5), 1550–1561. <https://doi.org/10.1093/brain/awu043>
- Mazzone, M., Dettori, D., Leite de Oliveira, R., Loges, S., Schmidt, T., Jonckx, B., Tian, Y. M., Lanahan, A. A., Pollard, P., Ruiz de Almodovar, C., De Smet, F., Vinckier, S., Aragonés, J., Debackere, K., Luttun, A., Wyns, S., Jordan, B., Pisacane, A., Gallez, B., ... Carmeliet, P. (2009). Heterozygous Deficiency of PHD2 Restores Tumor Oxygenation and Inhibits Metastasis via Endothelial Normalization. *Cell*, 136(5), 839–851. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.020>
- Meckler, X., & Checler, F. (2016). Presenilin 1 and presenilin 2 target γ -secretase complexes to distinct cellular compartments. *Journal of Biological Chemistry*, 291(24), 12821–12837. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.708297>
- Mengel, C. E., Kann, H. E., Smith, W. W., & Hokton, B. D. (1964). Effects of in vivo Hyperoxia on Erythrocytes 1. Hemolysis in Mice Exposed to Hyperbaric Oxygenation. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 116(2), 259–261. <https://doi.org/10.3181/00379727-116-29218>
- Meyer, E. P., Ulmann-Schuler, A., Staufienbiel, M., & Krucker, T. (2008). Altered morphology and 3D architecture of brain vasculature in a mouse model for Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(9), 3587–3592. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709788105>
- Michels, L., Warnock, G., Buck, A., Macaуда, G., Leh, S. E., Kaelin, A. M., Riese, F., Meyer, R., O'gorman, R., Hock, C., Kollias, S., & Gietl, A. F. (2016). Arterial spin labeling imaging reveals widespread and A β -independent reductions in cerebral blood flow in elderly apolipoprotein epsilon-4 carriers. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 36(3), 581–595. <https://doi.org/10.1177/0271678X15605847>

- Moehlmann, T., Winkler, E., Xia, X., Edbauer, D., Murrell, J., Capell, A., Kaether, C., Zheng, H., Ghetti, B., Haass, C., & Steiner, H. (2002). Presenilin-1 mutations of leucine 166 equally affect the generation of the Notch and APP intracellular domains independent of their effect on A β 42 production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(12), 8025–8030. <https://doi.org/10.1073/pnas.112686799>
- Moliné-Velázquez, V., Cuervo, H., Vila-Del Sol, V., Ortega, M. C., Clemente, D., & De Castro, F. (2011). Myeloid-derived suppressor cells limit the inflammation by promoting T lymphocyte apoptosis in the spinal cord of a murine model of multiple sclerosis. *Brain Pathology*, *21*(6), 678–691. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2011.00495.x>
- Morizawa, Y. M., Hirayama, Y., Ohno, N., Shibata, S., Shigetomi, E., Sui, Y., Nabekura, J., Sato, K., Okajima, F., Takebayashi, H., Okano, H., & Koizumi, S. (2017). Reactive astrocytes function as phagocytes after brain ischemia via ABCA1-mediated pathway. *Nature Communications*, *8*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00037-1>
- Mott, R. T., & Hulette, C. M. (2005). Neuropathology of Alzheimer's disease. In *Neuroimaging Clinics of North America* (Vol. 15, Issue 4, pp. 755–765). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.nic.2005.09.003>
- Mufson, E. J., Counts, S. E., Perez, S. E., & Ginsberg, S. D. (2008). Cholinergic system during the progression of Alzheimer's disease: Therapeutic implications. *Expert Review of Neurotherapeutics*, *8*(11), 1703–1718. <https://doi.org/10.1586/14737175.8.11.1703>
- Muñoz-Castro, C., Romero-Molina, C., & Vitorica, J. (2020). *Redirigiendo las estrategias terapéuticas en la Enfermedad de Alzheimer Reframing the therapeutic approaches for Alzheimer ' s Disease*. *1*(1), 18–33.
- Nagy, J. A., Chang, S. H., Dvorak, A. M., & Dvorak, H. F. (2009). Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? *British Journal of Cancer*, *100*(6), 865–869. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604929>
- Nagy, Janice A., Benjamin, L., Zeng, H., Dvorak, A. M., & Dvorak, H. F. (2008). Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. *Angiogenesis*, *11*(2), 109–119. <https://doi.org/10.1007/s10456-008-9099-z>
- Nelson, A. R., Sweeney, M. D., Sagare, A. P., & Zlokovic, B. V. (2016). Neurovascular dysfunction and neurodegeneration in dementia and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1862*(5), 887–900. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.12.016>
- Nicolás-Ávila, J. A., Lechuga-Vieco, A. V., Esteban-Martínez, L., Sánchez-Díaz, M., Díaz-García, E., Santiago, D. J., Rubio-Ponce, A., Li, J. L. Y., Balachander, A., Quintana, J. A., Martínez-de-Mena, R., Castejón-Vega, B., Pun-García, A., Través, P. G., Bonzón-Kulichenko, E., García-Marqués, F., Cussó, L., A-González, N., González-Guerra, A., ... Hidalgo, A. (2020). A Network of Macrophages Supports Mitochondrial Homeostasis in the Heart. *Cell*, *183*(1), 94-109.e23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.031>
- Niessen, C. M., Leckband, D., & Yap, A. S. (2011). Tissue organization by cadherin adhesion molecules: Dynamic Molecular and Cellular Mechanisms of Morphogenetic Regulation. *Physiological Reviews*, *91*(2), 691–731. <https://doi.org/10.1152/physrev.00004.2010>
- Niu, H., Álvarez-Álvarez, I., Guillén-Grima, F., & Aguinaga-Ontoso, I. (2017). Prevalencia e incidencia de la enfermedad de Alzheimer en Europa: metaanálisis. *Neurología*, *32*(8), 523–532. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2016.02.016>

- Niwa, K., Kazama, K., Younkin, L., Younkin, S. G., Carlson, G. A., & Iadecola, C. (2002). Cerebrovascular autoregulation is profoundly impaired in mice overexpressing amyloid precursor protein. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *283*(1 52-1). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00022.2002>
- Niwa, K., Kazama, K., Younkin, S. G., Carlson, G. A., & Iadecola, C. (2002a). Alterations in cerebral blood flow and glucose utilization in mice overexpressing the amyloid precursor protein. *Neurobiology of Disease*, *9*(1), 61–68. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2001.0460>
- Niwa, K., Kazama, K., Younkin, S. G., Carlson, G. A., & Iadecola, C. (2002b). Alterations in cerebral blood flow and glucose utilization in mice overexpressing the amyloid precursor protein. *Neurobiology of Disease*, *9*(1), 61–68. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2001.0460>
- Noguera-Troise, I., Daly, C., Papadopoulos, N. J., Coetzee, S., Boland, P., Gale, N. W., Hsin, C. L., Yancopoulos, G. D., & Thurston, G. (2007). Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Novartis Foundation Symposium*, *283*(2006), 106–120. <https://doi.org/10.1002/9780470319413.ch9>
- Nortley, R., Korte, N., Izquierdo, P., Hirunpattarasilp, C., Mishra, A., Jaunmuktane, Z., Kyrargyri, V., Pfeiffer, T., Khennouf, L., Madry, C., Gong, H., Richard-Loendt, A., Huang, W., Saito, T., Saido, T. C., Brandner, S., Sethi, H., & Attwell, D. (2019). Amyloid b oligomers constrict human capillaries in Alzheimer's disease via signaling to pericytes. *Science*, *365*(6450), 1–33. <https://doi.org/10.1126/science.aav9518>
- Nowotschin, S., Xenopoulos, P., Schrode, N., & Hadjantonakis, A. K. (2013). A bright single-cell resolution live imaging reporter of Notch signaling in the mouse. *BMC Developmental Biology*, *13*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-213X-13-15>
- O'Brien, R. J., & Wong, P. C. (2011). Amyloid precursor protein processing and alzheimer's disease. *Annual Review of Neuroscience*, *34*, 185–204. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113613>
- Orre, M., Kamphuis, W., Osborn, L. M., Jansen, A. H. P., Kooijman, L., Bossers, K., & Hol, E. M. (2014). Isolation of glia from Alzheimer's mice reveals inflammation and dysfunction. *Neurobiology of Aging*, *35*(12), 2746–2760. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.06.004>
- Oshio, K., Watanabe, H., Song, Y., Verkman, A. S., & Manley, G. T. (2005). Reduced cerebrospinal fluid production and intracranial pressure in mice lacking choroid plexus water channel Aquaporin-1. *The FASEB Journal*, *19*(1), 76–78. <https://doi.org/10.1096/fj.04-1711fje>
- Paris, D., Quadros, A., Patel, N., DelleDonne, A., Humphrey, J., & Mullan, M. (2005). Inhibition of angiogenesis and tumor growth by β and γ -secretase inhibitors. *European Journal of Pharmacology*, *514*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.02.050>
- Paris, D., Townsend, K., Quadros, A., Humphrey, J., Sun, J., Brem, S., Wotoczek-Obadia, M., DelleDonne, A., Patel, N., Obregon, D. F., Crescentini, R., Abdullah, L., Coppola, D., Rojiani, A. M., Crawford, F., Sebti, S. M., & Mullan, M. (2004). Inhibition of angiogenesis by A β peptides. *Angiogenesis*, *7*(1), 75–85. <https://doi.org/10.1023/B:AGEN.0000037335.17717.bf>
- Parisiadou, L., Fassa, A., Fotinopoulou, A., Bethani, I., & Efthimiopoulos, S. (2004). Presenilin 1 and cadherins: Stabilization of cell-cell adhesion and proteolysis-dependent regulation of transcription. *Neurodegenerative Diseases*, *1*(4–5), 184–191. <https://doi.org/10.1159/000080984>

- Park, L., Anrather, J., Zhou, P., Frys, K., Pitstick, R., Younkin, S., Carlson, G. A., & Iadecola, C. (2005). NADPH oxidase-derived reactive oxygen species mediate the cerebrovascular dysfunction induced by the amyloid β peptide. *Journal of Neuroscience*, *25*(7), 1769–1777. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5207-04.2005>
- Patel, N. S., Mathura, V. S., Bachmeier, C., Beaulieu-Abdelahad, D., Laporte, V., Weeks, O., Mullan, M., & Paris, D. (2010). Alzheimer's β -amyloid peptide blocks vascular endothelial growth factor mediated signaling via direct interaction with VEGFR-2. *Journal of Neurochemistry*, *112*(1), 66–76. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06426.x>
- Patel, N. S., Quadros, A., Brem, S., Wotoczek-Obadia, M., Mathura, V. S., Laporte, V., Mullan, M., & Paris, D. (2008). Potent anti-angiogenic motifs within the Alzheimer β -amyloid peptide. *Amyloid*, *15*(1), 5–19. <https://doi.org/10.1080/13506120701814723>
- Perl, D. P. (2010). Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mount Sinai Journal of Medicine*, *77*(1), 32–42. <https://doi.org/10.1002/msj.20157>
- Perlmutter, L. S. (1994). Microvascular pathology and vascular basement membrane components in Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology*, *9*(1–3), 33–40. <https://doi.org/10.1007/BF02816103>
- Perlmutter, L. S., Chui, H. C., Saperia, D., & Athanikar, J. (1990). Microangiopathy and the colocalization of heparan sulfate proteoglycan with amyloid in senile plaques of Alzheimer's disease. *Brain Research*, *508*(1), 13–19. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91111-S](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91111-S)
- Phng, L. K., & Gerhardt, H. (2009). Angiogenesis: A Team Effort Coordinated by Notch. *Developmental Cell*, *16*(2), 196–208. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.01.015>
- Phng, Li Kun, Potente, M., Leslie, J. D., Babbage, J., Nyqvist, D., Lobov, I., Ondr, J. K., Rao, S., Lang, R. A., Thurston, G., & Gerhardt, H. (2009). Nrarp Coordinates Endothelial Notch and Wnt Signaling to Control Vessel Density in Angiogenesis. *Developmental Cell*, *16*(1), 70–82. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.12.009>
- Placanica, L., Zhu, L., & Yue-Ming, L. (2009). Gender- and age-dependent γ -secretase activity in mouse brain and its implication in sporadic Alzheimer disease. *PLoS ONE*, *4*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005088>
- Plate, K. H. (1999). Mechanisms of angiogenesis in the brain. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *58*(4), 313–320. <https://doi.org/10.1097/00005072-199904000-00001>
- Pluta, R., Jabłoński, M., Ułamek-Kozioł, M., Kocki, J., Brzozowska, J., Januszewski, S., Furmaga-Jabłońska, W., Bogucka-Kocka, A., Maciejewski, R., & Czuczwar, S. J. (2013). Sporadic alzheimer's disease begins as episodes of brain ischemia and ischemically dysregulated alzheimer's disease genes. *Molecular Neurobiology*, *48*(3), 500–515. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8439-1>
- Pogue, A. I., & Lukiw, W. J. (2004). Angiogenic signaling in Alzheimer's disease. *NeuroReport*, *15*(9), 1507–1510. <https://doi.org/10.1097/01.wnr.0000130539.39937.1d>
- Potter, M. D., Barbero, S., & Cheresch, D. A. (2005). Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120- and β -catenin and maintains the cellular mesenchymal state. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(36), 31906–31912. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505568200>
- Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W., & Ferri, C. P. (2013). The global

- prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. In *Alzheimer's and Dementia* (Vol. 9, Issue 1, pp. 63-75.e2). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.11.007>
- Prince, M., Comas-Herrera, A., Knapp, M., Guerchet, M., & Karagiannidou, M. (2016). World Alzheimer Report 2016 Improving healthcare for people living with dementia. Coverage, Quality and costs now and in the future. *Alzheimer's Disease International (ADI)*.
- Querfurth, H. W., & Laferla, F. M. (2010). *Alzheimer's Disease*. 329–344.
- Quiñonez-Silvero, C., Hübner, K., & Herzog, W. (2020). Development of the brain vasculature and the blood-brain barrier in zebrafish. In *Developmental Biology* (Vol. 457, Issue 2, pp. 181–190). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.03.005>
- Raleigh, J. A., Chou, S. C., Arteel, G. E., & Horsman, M. R. (1999). Comparisons among pimonidazole binding, oxygen electrode measurements, and radiation response in C3H mouse tumors. *Radiation Research*, 151(5), 580–589. <https://doi.org/10.2307/3580034>
- Ramos-Rodriguez, J. J., Jimenez-Palomares, M., Murillo-Carretero, M. I., Infante-Garcia, C., Berrocoso, E., Hernandez-Pacho, F., Lechuga-Sancho, A. M., Cozar-Castellano, I., & Garcia-Alloza, M. (2015). Central vascular disease and exacerbated pathology in a mixed model of type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Psychoneuroendocrinology*, 62, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.07.606>
- Reed-Geaghan, E. G., Croxford, A. L., Becher, B., & Landreth, G. E. (2020). Plaque-associated myeloid cells derive from resident microglia in an Alzheimer's disease model. *Journal of Experimental Medicine*, 217(4), 3–10. <https://doi.org/10.1084/jem.20191374>
- Reis, M., & Liebner, S. (2013). Wnt signaling in the vasculature. *Experimental Cell Research*, 319(9), 1317–1323. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.12.023>
- Reitz, C., & Mayeux, R. (2014). Alzheimer disease: Epidemiology, Diagnostic Criteria, Risk Factors and Biomarkers. *Biochemical Pharmacology*, 88(4), 640–651. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.024>.Alzheimer
- Renier, N., Wu, Z., Simon, D. J., Yang, J., Ariel, P., & Tessier-Lavigne, M. (2014). IDISCO: A simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell*, 159(4), 896–910. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.010>
- Ribatti, D., & Crivellato, E. (2012). "Sprouting angiogenesis", a reappraisal. *Developmental Biology*, 372(2), 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.09.018>
- Ridgway, J., Zhang, G., Wu, Y., Stawicki, S., Liang, W. C., Chanthery, Y., Kowalski, J., Watts, R. J., Callahan, C., Kasman, I., Singh, M., Chien, M., Tan, C., Hongo, J. A. S., De Sauvage, F., Plowman, G., & Yan, M. (2006). Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature*, 444(7122), 1083–1087. <https://doi.org/10.1038/nature05313>
- Ringman, J. M., Liang, L. J., Zhou, Y., Vangala, S., Teng, E., Kremen, S., Wharton, D., Goate, A., Marcus, D. S., Farlow, M., Ghetti, B., McDade, E., Masters, C. L., Mayeux, R. P., Rossor, M., Salloway, S., Schofield, P. R., Cummings, J. L., Buckles, V., ... Morris, J. C. (2015). Early behavioural changes in familial Alzheimer's disease in the Dominantly Inherited Alzheimer Network. *Brain*, 138(4), 1036–1045. <https://doi.org/10.1093/brain/awv004>
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K. (2015). Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 43(7), e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>

- Robinson, M., Lee, B., & Hanes, F. (2018). Erratum: Recent progress in alzheimer's disease research, part 2: Genetics and epidemiology (*Journal of Alzheimer's Disease* (2017) 57:2 (317-330) DOI: 10.3233/JAD-161149). In *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 61, Issue 1, p. 459). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/JAD-179007>
- Robinson, M., Lee, B. Y., & Hane, F. T. (2017). Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 2: Genetics and Epidemiology. In *Journal of Alzheimer's disease : JAD* (Vol. 57, Issue 2, pp. 317–330). <https://doi.org/10.3233/JAD-161149>
- Roca, C., & Adams, R. H. (2007). Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling. *Genes and Development*, 21(20), 2511–2524. <https://doi.org/10.1101/gad.1589207>
- Ruitenbergh, A., Den Heijer, T., Bakker, S. L. M., Van Swieten, J. C., Koudstaal, P. J., Hofman, A., & Breteler, M. M. B. (2005). Cerebral hypoperfusion and clinical onset of dementia: The Rotterdam Study. *Annals of Neurology*, 57(6), 789–794. <https://doi.org/10.1002/ana.20493>
- Rusanen, M., Ngandu, T., Laatikainen, T., Tuomilehto, J., Soininen, H., & Kivipelto, M. (2013). Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Asthma and the Risk of Mild Cognitive Impairment and Dementia: A Population Based CAIDE Study. *Current Alzheimer Research*, 10(5), 549–555. <https://doi.org/10.2174/1567205011310050011>
- Saido, T., & Leissring, M. A. (2012). Proteolytic degradation of amyloid β -protein. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006379>
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. In *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Sancesario, G. M., & Bernardini, S. (2018). Alzheimer's disease in the omics era. *Clinical Biochemistry*, 59(December 2017), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.06.011>
- Sassi, C., Guerreiro, R., Gibbs, R., Ding, J., Lupton, M. K., Troakes, C., Al-Sarraj, S., Niblock, M., Gallo, J. M., Adnan, J., Killick, R., Brown, K. S., Medway, C., Lord, J., Turton, J., Bras, J., Morgan, K., Powell, J. F., Singleton, A., & Hardy, J. (2014). Investigating the role of rare coding variability in Mendelian dementia genes (APP, PSEN1, PSEN2, GRN, MAPT, and PRNP) in late-onset Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 35(12), 2881.e1-2881.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.06.002>
- Sauer, B. (1998). Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 14(4), 381–392. <https://doi.org/10.1006/meth.1998.0593>
- Saura, C. A., Choi, S. Y., Beglopoulos, V., Malkani, S., Zhang, D., Rao, B. S. S., Chattarji, S., Kelleher, R. J., Kandel, E. R., Duff, K., Kirkwood, A., & Shen, J. (2004). Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration. *Neuron*, 42(1), 23–36. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(04\)00182-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00182-5)
- Saura, C. A., Servián-Morilla, E., & Scholl, F. G. (2011). Presenilin/ γ -secretase regulates neurexin processing at synapses. *PLoS ONE*, 6(4), 19430. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019430>
- Sawada, M., Matsumoto, M., & Sawamoto, K. (2014). Vascular regulation of adult neurogenesis under physiological and pathological conditions. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 8, p. 53). Frontiers Media SA.

- <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00053>
- Scheltens, P., Blennow, K., Breteler, M. M. B., de Strooper, B., Frisoni, G. B., Salloway, S., & Van der Flier, W. M. (2016). Alzheimer's disease. *The Lancet*, *388*, 505–517. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01124-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01124-1)
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. In *Nature Methods* (Vol. 9, Issue 7, pp. 676–682). Nat Methods. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schneider, A. L. C., Selvin, E., Latour, L., Turtzo, L. C., Coresh, J., Mosley, T., Ling, G., & Gottesman, R. F. (2021). Head injury and 25-year risk of dementia. *Alzheimer's and Dementia*. <https://doi.org/10.1002/alz.12315>
- Schoors, S., Cantelmo, A. R., Georgiadou, M., Stapor, P., Wang, X., Quaegebeur, A., Cauwenberghs, S., Wong, B. W., Bifari, F., Decimo, I., Schoonjans, L., De Bock, K., Dewerchin, M., & Carmeliet, P. (2014). Incomplete and transitory decrease of glycolysis. *Cell Cycle*, *13*(1), 16–22. <https://doi.org/10.4161/cc.27519>
- Selkoe, D. J. (2003). Aging, Amyloid, and Alzheimer's Disease: A Perspective in Honor of Carl Cotman. *Neurochemical Research*, *28*(11), 1705–1713. <https://doi.org/10.1023/A:1026065122854>
- Semenza, G. L. (2010). Vascular responses to hypoxia and ischemia. In *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* (Vol. 30, Issue 4, pp. 648–652). Arterioscler Thromb Vasc Biol. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.181644>
- Sengillo, J. D., Winkler, E. A., Walker, C. T., Sullivan, J. S., Johnson, M., & Zlokovic, B. V. (2013). Deficiency in mural vascular cells coincides with blood-brain barrier disruption in alzheimer's disease. *Brain Pathology*, *23*(3), 303–310. <https://doi.org/10.1111/bpa.12004>
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., & Hyman, B. T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *1*(1), 1–23. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006189>
- Serrano-Pozo, A., & Growdon, J. H. (2019). Is Alzheimer's Disease Risk Modifiable? In *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 67, Issue 3, pp. 795–819). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/JAD181028>
- 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. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3182933788>
- Serrano-Pozo, A., Sánchez-García, M. A., Heras-Garvín, A., March-Díaz, R., Navarro, V., Vizuete, M., López-Barneo, J., Vitorica, J., & Pascual, A. (2017). Acute and Chronic Sustained Hypoxia Do Not Substantially Regulate Amyloid- β Peptide Generation In Vivo. *PLoS ONE*, *12*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170345>
- Servián-Morilla, E., Robles-Lanuza, E., Sánchez-Hidalgo, A. C., Camacho-García, R. J., Paez-Gomez, J. A., Mavillard, F., Saura, C. A., Martínez-Mir, A., & Scholl, F. G. (2018). Proteolytic processing of neurexins by presenilins sustains synaptic vesicle release. *Journal of Neuroscience*, *38*(4), 901–917. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1357->

17.2017

- Shen, J., & Kelleher, R. J. (2007). The presenilin hypothesis of Alzheimer's disease: Evidence for a loss-of-function pathogenic mechanism. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol. 104, Issue 2, pp. 403–409). Proc Natl Acad Sci U S A. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608332104>
- Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., Tsuda, T., Mar, L., Foncin, J. F., Bruni, A. C., Montesi, M. P., Sorbi, S., Rainero, I., Pinessi, L., Nee, L., ... St George-Hyslop, P. H. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*, *375*(6534), 754–760. <https://doi.org/10.1038/375754a0>
- Shim, J. W., & Madsen, J. R. (2018). VEGF signaling in neurological disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(1), 1–22. <https://doi.org/10.3390/ijms19010275>
- Siekman, A. F., & Lawson, N. D. (2007). Notch signalling and the regulation of angiogenesis. *Cell Adhesion & Migration*, *1*(2), 104–105. <https://doi.org/10.4161/cam.1.2.4488>
- Sierra, A., Encinas, J. M., Deudero, J., Chancey, H., Enikolopov, G., Overstreet-WadicheLinda, S., E. Tsirka, S., & Maletic-Savatic, M. (2010). Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell*, *7*(4), 483–495. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.08.014>.Microglia
- Silverberg, G. D., Mayo, M., Saul, T., Rubenstein, E., & McGuire, D. (2003). Alzheimer's disease, normal-pressure hydrocephalus, and senescent changes in CSF circulatory physiology: A hypothesis. *Lancet Neurology*, *2*(8), 506–511. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(03\)00487-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(03)00487-3)
- Skovseth. (2009). Endostatin dramatically inhibits endothelial cell migration, vascular morphogenesis, and perivascular cell recruitment in vivo (*Blood* (2005) 105, 3, (1044-1051)). *Blood*, *114*(1), 227. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-01-202630>
- Soldi, R., Mitola, S., Strasly, M., Defilippi, P., Tarone, G., & Bussolino, F. (1999). Role of $\alpha(v)\beta3$ integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *EMBO Journal*, *18*(4), 882–892. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.4.882>
- Song, W., Nadeau, P., Yuan, M., Yang, X., Shen, J., & Yankner, B. A. (1999). Proteolytic release and nuclear translocation of Notch-1 are induced by presenilin-1 and impaired by pathogenic presenilin-1 mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(12), 6959–6963. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.12.6959>
- Sprinzak, D., Lakhapal, A., Lebon, L., Santat, L. A., Fontes, M. E., Anderson, G. A., Garcia-Ojalvo, J., & Elowitz, M. B. (2010). Cis-interactions between Notch and Delta generate mutually exclusive signalling states. *Nature*, *465*(7294), 86–90. <https://doi.org/10.1038/nature08959>
- Steiner, H., Duff, K., Capell, A., Romig, H., Grim, M. G., Lincoln, S., Hardy, J., Yu, X., Picciano, M., Fichteler, K., Citron, M., Kopan, R., Pesold, B., Keck, S., Baader, M., Tomita, T., Iwatsubo, T., Baumeister, R., & Haass, C. (1999). A loss of function mutation of presenilin-2 interferes with amyloid β - peptide production and Notch signaling. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(40), 28669–28673. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.40.28669>
- Steinman, J., Sun, H. S., & Feng, Z. P. (2021). Microvascular Alterations in Alzheimer's Disease. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 14, p. 618986). Frontiers Media S.A.

<https://doi.org/10.3389/fncel.2020.618986>

- Stiver, S. I., Tan, X., Brown, L. F., Hedley-Whyte, E. T., & Dvorak, H. F. (2004). VEGF-A angiogenesis induces a stable neovasculature in adult murine brain. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *63*(8), 841–855. <https://doi.org/10.1093/jnen/63.8.841>
- Stone, J., Itin, A., Alon, T., Pe'er, J., Gnessin, H., Chan-Ling, T., & Keshet, E. (1995). Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *Journal of Neuroscience*, *15*(7 1), 4738–4747. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.15-07-04738.1995>
- Strassnig, M., & Ganguli, M. (2005). (2005). About a Peculiar Disease of the Cerebral Cortex : Alzheimer's Original Case. *Psychiatry (Edgmont)*, *2*(9), 30–33.
- Strooper, B. De, Iwatsubo, T., & Wolfe, M. S. (2012). The identification of the presenilin in secretase. *Cold Spring Harb Perspect Med*, *2*(a006304), 1–19.
- Stump, G., Durrer, A., Klein, A. L., Lütolf, S., Suter, U., & Taylor, V. (2002). Notch1 and its ligands Delta-like and Jagged are expressed and active in distinct cell populations in the postnatal mouse brain. *Mechanisms of Development*, *114*(1–2), 153–159. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(02\)00043-6](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(02)00043-6)
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., & Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(43), 15545–15550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>
- Suchting, S., Freitas, C., Toro, R. del, Noble, F., Benedito, R., Breant, C., Duarte, A., & Eichmann, A. (2007). The Notch ligand Delta-like 4 (Dll4) negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *The FASEB Journal*, *21*(5), 3225–3230. <https://doi.org/10.1096/fasebj.21.5.a15-a>
- Sulochana, K. N., Fan, H., Jois, S., Subramanian, V., Sun, F., Kini, R. M., & Ge, R. (2005). Peptides derived from human decorin leucine-rich repeat 5 inhibit angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(30), 27935–27948. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414320200>
- Sun, L., Zhou, R., Yang, G., & Shi, Y. (2017). Analysis of 138 pathogenic mutations in presenilin-1 on the in vitro production of A β 42 and A β 40 peptides by γ -secretase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(4), E476–E485. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618657114>
- Sun, X., He, G., Qing, H., Zhou, W., Dobie, F., Cai, F., Staufenbiel, M., Huang, L. E., & Song, W. (2006). Hypoxia facilitates Alzheimer's disease pathogenesis by up-regulating BACE1 gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(49), 18727–18732. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606298103>
- Suzuki, Y., Nakamura, Y., Yamada, K., Igarashi, H., Kasuga, K., Yokoyama, Y., Ikeuchi, T., Nishizawa, M., Kwee, I. L., & Nakada, T. (2015). Reduced CSF water influx in Alzheimer's disease supporting the β -amyloid clearance hypothesis. *PLoS ONE*, *10*(5), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123708>
- Sweeney, M. D., Sagare, A. P., & Zlokovic, B. V. (2015). Cerebrospinal fluid biomarkers of neurovascular dysfunction in mild dementia and Alzheimer's disease. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *35*(7), 1055–1068. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.76>

- Sweeney, M. D., Sagare, A. P., & Zlokovic, B. V. (2018). Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neurology*, *14*(3), 133–150. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.188>
- Tabuchi, K., Chen, G., Südhof, T. C., & Shen, J. (2009). Conditional forebrain inactivation of nicastrin causes progressive memory impairment and age-related neurodegeneration. *Journal of Neuroscience*, *29*(22), 7290–7301. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1320-09.2009>
- Tajima, Y., Takuwa, H., Nishino, A., Matsuura, T., Kawaguchi, H., Ikoma, Y., Taniguchi, J., Seki, C., Masamoto, K., Kanno, I., Saeki, N., & Ito, H. (2014). Cerebral hemodynamic response to acute hyperoxia in awake mice. *Brain Research*, *1557*, 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.01.053>
- Tandon, A., & Fraser, P. (2002). The presenilins. In *Genome Biology* (Vol. 3, Issue 11, p. 23). BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-11-reviews3014>
- Tang, H., Mao, X. O., Xie, L., Greenberg, D. A., & Jin, K. (2013). Expression level of vascular endothelial growth factor in hippocampus is associated with cognitive impairment in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *34*(5), 1412–1415. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.10.029>
- Tanovic, A., & Alfaro, V. (2006). Neuroprotección con memantina (antagonista no competitivo del receptor NMDA-glutamato) frente a la excitotoxicidad asociada al glutamato en la enfermedad de Alzheimer y en la demencia vascular. *Revista de Neurología*, *42*(10), 607. <https://doi.org/10.33588/rn.4210.2005252>
- Tarasoff-Conway, J. M., Carare, R. O., Osorio, R. S., Glodzik, L., Butler, T., Fieremans, E., Axel, L., Rusinek, H., Nicholson, C., Zlokovic, B. V., Frangione, B., Blennow, K., Ménard, J., Zetterberg, H., Wisniewski, T., & De Leon, M. J. (2015). Clearance systems in the brain - Implications for Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, *11*(8), 457–470. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.119>
- Terraneo, L., Paroni, R., Bianciardi, P., Giallongo, T., Carelli, S., Gorio, A., & Samaja, M. (2017). Brain adaptation to hypoxia and hyperoxia in mice. *Redox Biology*, *11*(September 2016), 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.10.018>
- Tetzlaff, F., & Fischer, A. (2018). Control of blood vessel formation by notch signaling. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *1066*, 319–338. https://doi.org/10.1007/978-3-319-89512-3_16
- Thinakaran, G., & Koo, E. H. (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 283, Issue 44, pp. 29615–29619). J Biol Chem. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800019200>
- Thomas, J. L., Baker, K., Han, J., Calvo, C., Nurmi, H., Eichmann, A. C., & Alitalo, K. (2013). Interactions between VEGFR and Notch signaling pathways in endothelial and neural cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *70*(10), 1779–1792. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1312-6>
- Thomas, T., Miners, S., & Love, S. (2015). Post-mortem assessment of hypoperfusion of cerebral cortex in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Brain*, *138*(4), 1059–1069. <https://doi.org/10.1093/brain/awv025>
- Tkachuk, V. (1996). Regulation and role of urokinase plasminogen activator in vascular remodelling. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, *23*(9), 759–765.

- <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1996.tb01177.x>
- Togashi, H., Abe, K., Mizoguchi, A., Takaoka, K., Chisaka, O., & Takeichi, M. (2002). Cadherin regulates dendritic spine morphogenesis. *Neuron*, *35*(1), 77–89. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00748-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00748-1)
- Trillo-Contreras, J. L., Ramírez-Lorca, R., Hiraldo-González, L., Sánchez-Gomar, I., Galán-Cobo, A., Suárez-Luna, N., Sánchez de Rojas-de Pedro, E., Toledo-Aral, J. J., Villadiego, J., & Echevarría, M. (2018). Combined effects of aquaporin-4 and hypoxia produce age-related hydrocephalus. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1864*(10), 3515–3526. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.08.006>
- Truett, G. E., Heeger, P., Mynatt, R. L., Truett, A. A., Walker, J. A., & Warman, M. L. (2000). Preparation of PCR-quality mouse genomic dna with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *BioTechniques*, *29*(1), 52–54. <https://doi.org/10.2144/00291bm09>
- Twomey, C., & McCarthy, J. V. (2006). Presenilin-1 is an unprimed glycogen synthase kinase-3 β substrate. *FEBS Letters*, *580*(17), 4015–4020. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.06.035>
- Ubogu, E. E., Cossoy, M. B., & Ransohoff, R. M. (2006). The expression and function of chemokines involved in CNS inflammation. In *Trends in Pharmacological Sciences* (Vol. 27, Issue 1, pp. 48–55). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.11.002>
- Uemura, K., Kuzuya, A., Shimozone, Y., Aoyagi, N., Ando, K., Shimohama, S., & Kinoshita, A. (2007). GSK3 β activity modifies the localization and function of presenilin 1. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(21), 15823–15832. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610708200>
- Uemura, M. T., Maki, T., Ihara, M., Lee, V. M. Y., & Trojanowski, J. Q. (2020). Brain Microvascular Pericytes in Vascular Cognitive Impairment and Dementia. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *12*(April), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00080>
- Ulland, T. K., Song, W. M., Huang, S. C. C., Ulrich, J. D., Sergushichev, A., Beatty, W. L., Loboda, A. A., Zhou, Y., Cairns, N. J., Kambal, A., Loginicheva, E., Gilfillan, S., Cella, M., Virgin, H. W., Unanue, E. R., Wang, Y., Artyomov, M. N., Holtzman, D. M., & Colonna, M. (2017). TREM2 Maintains Microglial Metabolic Fitness in Alzheimer's Disease. *Cell*, *170*(4), 649–663.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.023>
- Van Cauwenberghe, C., Van Broeckhoven, C., & Sleegers, K. (2016). The genetic landscape of Alzheimer disease: Clinical implications and perspectives. *Genetics in Medicine*, *18*(5), 421–430. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.117>
- Van Gassen, G., & Annaert, W. (2003). Amyloid, presenilins, and Alzheimer's disease. In *Neuroscientist* (Vol. 9, Issue 2, pp. 117–126). Neuroscientist. <https://doi.org/10.1177/1073858403252227>
- Verbeek, M. M., Otte-Höller, I., Van Den Born, J., Van Den Heuvel, L. P. W. J., David, G., Wesseling, P., & De Waal, R. M. W. (1999). Agrin is a major heparan sulfate proteoglycan accumulating in Alzheimer's disease brain. *American Journal of Pathology*, *155*(6), 2115–2125. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65529-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65529-0)
- Viallard, C., & Larrivé, B. (2017). Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*, *20*(4), 409–426. <https://doi.org/10.1007/s10456-017-9562-9>
- Wälchli, T., Mateos, J. M., Weinman, O., Babic, D., Regli, L., Hoerstrup, S. P., Gerhardt, H., Schwab, M. E., & Vogel, J. (2014). Quantitative assessment of angiogenesis, perfused

- blood vessels and endothelial tip cells in the postnatal mouse brain. *Nature Protocols*, 10(1), 53–74. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.002>
- Walmsley, S. R., Print, C., Farahi, N., Peyssonnaud, C., Johnson, R. S., Cramer, T., Sobolewski, A., Condliffe, A. M., Cowburn, A. S., Johnson, N., & Chilvers, E. R. (2005). Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1 α -dependent NF- κ B activity. *Journal of Experimental Medicine*, 201(1), 105–115. <https://doi.org/10.1084/jem.20040624>
- Wang, F., Flanagan, J., Su, N., Wang, L. C., Bui, S., Nielson, A., Wu, X., Vo, H. T., Ma, X. J., & Luo, Y. (2012). RNAscope: A novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Journal of Molecular Diagnostics*, 14(1), 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2011.08.002>
- Wang, H., Megill, A., He, K., Kirkwood, A., & Lee, H. K. (2012). Consequences of inhibiting amyloid precursor protein processing enzymes on synaptic function and plasticity. In *Neural Plasticity* (Vol. 2012). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2012/272374>
- Wang, J., Tanila, H., Puoliväli, J., Kadish, I., & Van Groen, T. (2003). Gender differences in the amount and deposition of amyloid β in APP^{swe} and PS1 double transgenic mice. *Neurobiology of Disease*, 14(3), 318–327. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2003.08.009>
- Wang, R., Zhang, Y.-W., Zhang, X., Liu, R., Zhang, X., Hong, S., Xia, K., Xia, J., Zhang, Z., Xu, H., Wang, R., Zhang, Y.-W., Zhang, X., Liu, R., Zhang, X., Hong, S., Xia, K., Xia, J., Zhang, Z., & Xu, H. (2006). Transcriptional regulation of APH-1A and increased γ -secretase cleavage of APP and Notch by HIF-1 and hypoxia. *The FASEB Journal*, 20(8), 1275–1277. <https://doi.org/10.1096/fj.06-5839fje>
- Wang, T., Liu, H., Lian, G., Zhang, S. Y., Wang, X., & Jiang, C. (2017). HIF1 α -Induced Glycolysis Metabolism Is Essential to the Activation of Inflammatory Macrophages. *Mediators of Inflammation*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9029327>
- Wang, Y., Nakayama, M., Pitulescu, M. E., Schmidt, T. S., Bochenek, M. L., Sakakibara, A., Adams, S., Davy, A., Deutsch, U., Lüthi, U., Barberis, A., Benjamin, L. E., Mäkinen, T., Nobes, C. D., & Adams, R. H. (2010). Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature*, 465(7297), 483–486. <https://doi.org/10.1038/nature09002>
- Wardlaw, J. M., Valdés Hernández, M. C., & Muñoz-Maniega, S. (2015). What are white matter hyperintensities made of? Relevance to vascular cognitive impairment. *Journal of the American Heart Association*, 4(6), 001140. <https://doi.org/10.1161/JAHA.114.001140>
- Weis, S. M., & Cheresch, D. A. (2005). Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature*, 437(7058), 497–504. <https://doi.org/10.1038/nature03987>
- Weng, A. P., Ferrando, A. A., Lee, W., Morris IV, J. P., Silverman, L. B., Sanchez-Irizarry, C., Blacklow, S. C., Look, A. T., & Aster, J. C. (2004). Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*, 306(5694), 269–271. <https://doi.org/10.1126/science.1102160>
- Wilkins, H. M., & Swerdlow, R. H. (2017). Amyloid precursor protein processing and bioenergetics. In *Brain Research Bulletin* (Vol. 133, pp. 71–79). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.08.009>
- Winblad, B., Amouyel, P., Andrieu, S., Ballard, C., Brayne, C., Brodaty, H., Cedazo-Minguez, A., Dubois, B., Edvardsson, D., Feldman, H., Fratiglioni, L., Frisoni, G. B., Gauthier, S.,

- Georges, J., Graff, C., Iqbal, K., Jessen, F., Johansson, G., Jönsson, L., ... Zetterberg, H. (2016). Defeating Alzheimer's disease and other dementias: A priority for European science and society. *The Lancet Neurology*, *15*, 455–532. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)00062-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)00062-4)
- Wines-Samuelson, M., Schulte, E. C., Smith, M. J., Aoki, C., Liu, X., Kelleher, R. J., & Shen, J. (2010). Characterization of age-dependent and progressive cortical neuronal degeneration in Presenilin conditional mutant mice. *PLoS ONE*, *5*(4), 10195. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010195>
- Wiseman, F. K., Al-Janabi, T., Hardy, J., Karmiloff-Smith, A., Nizetic, D., Tybulewicz, V. L. J., Fisher, E. M. C., & Strydom, A. (2015). A genetic cause of Alzheimer disease: Mechanistic insights from Down syndrome. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 16, Issue 9, pp. 564–574). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrn3983>
- Wolf, S. A., Boddeke, H. W. G. M., & Kettenmann, H. (2017). Microglia in Physiology and Disease. *Annual Review of Physiology*, *79*, 619–643. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034406>
- Wolfe, M. S., Xia, W., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Kimberly, W. T., & Selkoe, D. J. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and γ -secretase activity. *Nature*, *398*(6727), 513–517. <https://doi.org/10.1038/19077>
- Wu, S., Chen, J. J., Kudelka, A., Lu, J., & Zhu, X. (2008). Incidence and risk of hypertension with sorafenib in patients with cancer: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Oncology*, *9*(2), 117–123. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(08\)70003-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70003-2)
- Wunderlich, P., Glebov, K., Kemmerling, N., Tien, N. T., Neumann, H., & Walter, J. (2013). Sequential proteolytic processing of the triggering receptor expressed on myeloid cells-2 (TREM2) protein by ectodomain shedding and γ -secretase-dependent intramembranous cleavage. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(46), 33027–33036. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.517540>
- Xia, D., Watanabe, H., Wu, B., Lee, S. H., Li, Y., Tsvetkov, E., Bolshakov, V. Y., Shen, J., & Kelleher, R. J. (2015). Presenilin-1 knockin mice reveal loss-of-function mechanism for familial Alzheimer's disease. *Neuron*, *85*(5), 967–981. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.02.010>
- Xia, X., Qian, S., Soriano, S., Wu, Y., Fletcher, A. M., Wang, X. J., Koo, E. H., Wu, X., & Zheng, H. (2001). Loss of presenilin 1 is associated with enhanced β -catenin signaling and skin tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(19), 10863–10868. <https://doi.org/10.1073/pnas.191284198>
- Xiao, X., Li, J., & Samulski, R. J. (1998). Production of High-Titer Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors in the Absence of Helper Adenovirus. *Journal of Virology*, *72*(3), 2224–2232. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.3.2224-2232.1998>
- Xiong, Y., Mahmood, A., & Chopp, M. (2010). Angiogenesis, neurogenesis and brain recovery of function following injury. In *Current Opinion in Investigational Drugs* (Vol. 11, Issue 3, pp. 298–308). NIH Public Access. [/pmc/articles/PMC2836170/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22836170/)
- Xu, X. (2009). γ -Secretase catalyzes sequential cleavages of the A β PP transmembrane domain. *Journal of Alzheimer's Disease*, *16*(2), 211–224. <https://doi.org/10.3233/JAD-2009-0957>
- Yaffe, K., Laffan, A. M., Harrison, S. L., Redline, S., Spira, A. P., Ensrud, K. E., Ancoli-Israel, S., & Stone, K. L. (2011). Sleep-disordered breathing, hypoxia, and risk of mild cognitive

- impairment and dementia in older women. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 306(6), 613–619. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.1115>
- Yana, I., Sagara, H., Takaki, S., Takatsu, K., Nakamura, K., Nakao, K., Katsuki, M., Taniguchi, S. I., Aoki, T., Sato, H., Weiss, S. J., & Seiki, M. (2007). Crosstalk between neovessels and mural cells directs the site-specific expression of MT1-MMP to endothelial tip cells. *Journal of Cell Science*, 120(9), 1607–1614. <https://doi.org/10.1242/jcs.000679>
- Yang, J. T., Wang, Z. J., Cai, H. Y., Yuan, L., Hu, M. M., Wu, M. N., & Qi, J. S. (2018). Sex Differences in Neuropathology and Cognitive Behavior in APP/PS1/tau Triple-Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neuroscience Bulletin*, 34(5), 736–746. <https://doi.org/10.1007/s12264-018-0268-9>
- Yang, S. P., Bae, D. G., Kang, H. J., Gwag, B. J., Gho, Y. S., & Chae, C. B. (2004). Co-accumulation of vascular endothelial growth factor with β -amyloid in the brain of patients with Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 25(3), 283–290. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(03\)00111-8](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(03)00111-8)
- Yiannopoulou, K. G., & Papageorgiou, S. G. (2020). Current and Future Treatments in Alzheimer Disease: An Update. *Journal of Central Nervous System Disease*, 12, 117957352090739. <https://doi.org/10.1177/1179573520907397>
- Yoshiyama, Y., Higuchi, M., Zhang, B., Huang, S. M., Iwata, N., Saido, T. C. C., Maeda, J., Suhara, T., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2007). Synapse Loss and Microglial Activation Precede Tangles in a P301S Tauopathy Mouse Model. *Neuron*, 53(3), 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.01.010>
- Yu, H., Saura, C. A., Choi, S. Y., Sun, L. D., Yang, X., Handler, M., Kawarabayashi, T., Younkin, L., Fedeles, B., Wilson, M. A., Younkin, S., Kandel, E. R., Kirkwood, A., & Shen, J. (2001). APP processing and synaptic plasticity in presenilin-1 conditional knockout mice. *Neuron*, 31(5), 713–726. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00417-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00417-2)
- Zhang, S., Zhang, M., Cai, F., & Song, W. (2013). Biological function of Presenilin and its role in AD pathogenesis. *Translational Neurodegeneration*, 2(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/2047-9158-2-15>
- Zhang, Xian, Li, Y., Xu, H., & Zhang, Y. W. (2014). The γ -secretase complex: From structure to function. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(DEC), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00427>
- Zhang, Xin, & Le, W. (2010). Pathological role of hypoxia in Alzheimer's disease. *Experimental Neurology*, 223(2), 299–303. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.07.033>
- Zhang, Y. W., Thompson, R., Zhang, H., & Xu, H. (2011a). APP processing in Alzheimer's disease. In *Molecular Brain* (Vol. 4, Issue 1, p. 3). BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-4-3>
- Zhang, Y. W., Thompson, R., Zhang, H., & Xu, H. (2011b). APP processing in Alzheimer's disease. In *Molecular Brain* (Vol. 4, Issue 1). Mol Brain. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-4-3>
- Zhang, Z., Nadeau, P., Song, W., Donoviel, D., Yuan, M., Bernstein, A., & Yankner, B. A. (2000). Presenilins are required for γ -secretase cleavage of β -APP and transmembrane cleavage of Notch-1. *Nature Cell Biology*, 2(7), 463–465. <https://doi.org/10.1038/35017108>
- Zhao, G., Tan, J., Mao, G., Cui, M. Z., & Xu, X. (2007). The same γ -secretase accounts for the multiple intramembrane cleavages of APP. *Journal of Neurochemistry*, 100(5), 1234–1246. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04302.x>

- Zhao, Z., Nelson, A. R., Betsholtz, C., Zlokovic, B. V., & Angeles, L. (2015). Establishment and dysfunction of the BBB. *Cell*, 163(5), 1064–1078. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.067>. Establishment
- Zhong, J. H., Zhou, H. J., Tang, T., Cui, H. J., Yang, A. L., Zhang, Q. M., Zhou, J. H., Zhang, Q., Gong, X., Zhang, Z. H., & Mei, Z. G. (2018). Activation of the Notch-1 signaling pathway may be involved in intracerebral hemorrhage-induced reactive astrogliosis in rats. *Journal of Neurosurgery*, 129(3), 732–739. <https://doi.org/10.3171/2016.11.JNS162121>
- Zlokovic, B. V. (2011). Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 12, Issue 12, pp. 723–738). Nat Rev Neurosci. <https://doi.org/10.1038/nrn3114>
- Zlokovic, B. V., Yamada, S., Holtzman, D., Ghiso, J., & Frangione, B. (2000). Clearance of amyloid β -peptide from brain: Transport or metabolism? [1] (multiple letters). In *Nature Medicine* (Vol. 6, Issue 7, pp. 718–719). Presse Dienstleistungsgesellschaft mbH und Co. KG. <https://doi.org/10.1038/77397>

H. ANEXOS

Tabla suplementaria 1. Genes expresados diferencialmente en las células endoteliales cerebrales de ratones *APP-PSEN1/+* versus a ratones controles. Genes que incrementan y disminuyen su expresión en células endoteliales de ratones *APP-PSEN1/+* de 18 meses de edad *versus* a la microglía de ratones WT de 12 meses de edad. ($|\log FC| > 0,5$ y $p < 0,05$).

Nombre del gen	Log FC	P.Valor	adj.P.Valor
<i>Bcl2a1a</i>	2,070	0,001	0,993
<i>Ttr</i>	1,773	0,042	0,993
<i>Cst7</i>	1,596	0,000	0,381
<i>Snord72</i>	1,515	0,028	0,993
<i>Ptgs2</i>	1,391	0,000	0,794
<i>Casp4</i>	1,351	0,003	0,993
<i>Tyrobp</i>	1,282	0,001	0,993
<i>Igk</i>	1,251	0,013	0,993
<i>Mir5623</i>	1,223	0,008	0,993
<i>Igh-VJ558</i>	1,202	0,032	0,993
<i>Ctss</i>	1,107	0,003	0,993
<i>Gm9946</i>	1,098	0,014	0,993
<i>Cxcl2</i>	1,079	0,011	0,993
<i>Tas2r143</i>	1,054	0,036	0,993
<i>Cxcr4</i>	1,041	0,041	0,993
<i>Ifi211</i>	1,016	0,023	0,993
<i>Snord16a</i>	1,012	0,011	0,993
<i>Hmgn5</i>	0,942	0,021	0,993
<i>Gm19279</i>	0,924	0,019	0,993
<i>Igh-V7183</i>	0,919	0,005	0,993
<i>Mir219a-1</i>	0,889	0,005	0,993
<i>Mir7652</i>	0,844	0,025	0,993
<i>Snord49b</i>	0,838	0,026	0,993
<i>Bcl2a1d</i>	0,838	0,000	0,789
<i>Noct</i>	0,834	0,009	0,993
<i>Gm3625</i>	0,818	0,024	0,993
<i>Lilrb4a</i>	0,816	0,025	0,993
<i>Mndal</i>	0,810	0,037	0,993
<i>Ube2a</i>	0,806	0,009	0,993
<i>Higd1a</i>	0,801	0,015	0,993
<i>Tceb1</i>	0,800	0,026	0,993
<i>Ly86</i>	0,795	0,005	0,993
<i>Nop58</i>	0,773	0,009	0,993
<i>Gm19579</i>	0,770	0,022	0,993
<i>Dnttip2</i>	0,765	0,008	0,993
<i>Sele</i>	0,763	0,007	0,993
<i>Ppp1r2</i>	0,758	0,008	0,993

Nombre del gen	Log FC	P.Valor	adj.P.Valor
<i>Mir3110</i>	0,750	0,004	0,993
<i>Rgs16</i>	0,749	0,009	0,993
<i>Gm4802</i>	0,749	0,032	0,993
<i>Gm13249</i>	0,748	0,041	0,993
<i>Gm19474</i>	0,745	0,049	0,993
<i>Ppp1r2-ps3</i>	0,743	0,019	0,993
<i>Mir7006</i>	0,740	0,018	0,993
<i>Rnu2-10</i>	0,740	0,030	0,993
<i>Mir340</i>	0,736	0,029	0,993
<i>Gm6987</i>	0,735	0,019	0,993
<i>Ifi204</i>	0,733	0,036	0,993
<i>Igkv4-53</i>	0,719	0,040	0,993
<i>Rnd1</i>	0,706	0,009	0,993
<i>Rpl35</i>	0,704	0,015	0,993
<i>Gm11425</i>	0,698	0,009	0,993
<i>Gm5481</i>	0,689	0,041	0,993
<i>Lama4</i>	0,688	0,013	0,993
<i>Phlda1</i>	0,675	0,036	0,993
<i>Ppp1r2-ps2</i>	0,665	0,011	0,993
<i>Txn11</i>	0,665	0,004	0,993
<i>Olfr1282</i>	0,659	0,018	0,993
<i>Cdc42ep3</i>	0,658	0,045	0,993
<i>Plscr1</i>	0,657	0,040	0,993
<i>Rnu2-10</i>	0,650	0,011	0,993
<i>Rpl12</i>	0,650	0,014	0,993
<i>Gm12666</i>	0,649	0,005	0,993
<i>Mir7094-2</i>	0,646	0,048	0,993
<i>Stx11</i>	0,644	0,009	0,993
<i>C1qb</i>	0,640	0,035	0,993
<i>Mir7675</i>	0,640	0,001	0,993
<i>Rgs2</i>	0,637	0,049	0,993
<i>Rps11</i>	0,634	0,006	0,993
<i>Ifrd1</i>	0,631	0,033	0,993
<i>Rpl12</i>	0,630	0,011	0,993
<i>Gm14816</i>	0,626	0,014	0,993
<i>Gm6613</i>	0,625	0,033	0,993
<i>Rpl2211</i>	0,624	0,021	0,993
<i>9530027D23Rik</i>	0,620	0,043	0,993
<i>Lactb</i>	0,613	0,037	0,993
<i>Hcst</i>	0,610	0,009	0,993
<i>Ints6</i>	0,609	0,013	0,993
<i>Nxpe2</i>	0,607	0,038	0,993

Nombre del gen	Log FC	P.Valor	adj.P.Valor
<i>Al662270</i>	0,604	0,012	0,993
<i>Gm7429</i>	0,600	0,029	0,993
<i>Zfp131</i>	0,598	0,001	0,993
<i>St8sia4</i>	0,593	0,050	0,993
<i>Chic2</i>	0,592	0,021	0,993
<i>Rnf141</i>	0,590	0,014	0,993
<i>Snx6</i>	0,588	0,002	0,993
<i>Gm9794</i>	0,579	0,028	0,993
<i>Snord53</i>	0,578	0,016	0,993
<i>Dusp5</i>	0,578	0,039	0,993
<i>Anxa1</i>	0,574	0,027	0,993
<i>Larp7</i>	0,573	0,007	0,993
<i>Mir7004</i>	0,569	0,037	0,993
<i>Gm20094</i>	0,569	0,012	0,993
<i>Magoh</i>	0,568	0,015	0,993
<i>Rps6-ps4</i>	0,567	0,022	0,993
<i>Acot9</i>	0,564	0,037	0,993
<i>Snhg5</i>	0,563	0,008	0,993
<i>1810011010Rik</i>	0,560	0,005	0,993
<i>Gm9979</i>	0,557	0,019	0,993
<i>Nol7</i>	0,552	0,049	0,993
<i>Fcer1g</i>	0,549	0,001	0,993
<i>Gm13981</i>	0,544	0,017	0,993
<i>Mir673</i>	0,542	0,015	0,993
<i>Gm19945</i>	0,542	0,050	0,993
<i>Gm17745</i>	0,541	0,013	0,993
<i>Hn1</i>	0,539	0,019	0,993
<i>D13Ert608e</i>	0,538	0,028	0,993
<i>Csf1</i>	0,535	0,020	0,993
<i>Lpar6</i>	0,535	0,010	0,993
<i>Arl13b</i>	0,532	0,005	0,993
<i>Pcna</i>	0,524	0,018	0,993
<i>Gm4832</i>	0,516	0,037	0,993
<i>Eef1b2</i>	0,512	0,009	0,993
<i>Sar1a</i>	0,511	0,016	0,993
<i>Gm10846</i>	0,509	0,043	0,993
<i>Gm38411</i>	0,504	0,011	0,993
<i>Mex3b</i>	0,503	0,012	0,993
<i>Zfand5</i>	0,503	0,017	0,993
<i>A3galt2</i>	0,501	0,028	0,993
<i>Ranbp3l</i>	-0,501	0,040	0,993
<i>Usp54</i>	-0,501	0,015	0,993

Nombre del gen	Log FC	P.Valor	adj.P.Valor
Hlf	-0,504	0,036	0,993
Irak2	-0,512	0,015	0,993
Epo	-0,525	0,006	0,993
Mir1932	-0,539	0,031	0,993
Zhx3	-0,541	0,002	0,993
Mir669h	-0,543	0,037	0,993
Pdgfc	-0,543	0,003	0,993
Extl3	-0,546	0,013	0,993
Hist2h2be	-0,559	0,042	0,993
Mgll	-0,567	0,023	0,993
Pou3f4	-0,568	0,006	0,993
Lym4	-0,569	0,030	0,993
Hacd3	-0,584	0,014	0,993
1700029I15Rik	-0,585	0,012	0,993
Elovl5	-0,587	0,048	0,993
Hdac8	-0,601	0,045	0,993
Gcnt4	-0,621	0,014	0,993
Eci2	-0,622	0,029	0,993
Mapk4	-0,632	0,039	0,993
Prr5	-0,635	0,042	0,993
Trp53inp1	-0,667	0,008	0,993
Lhx2	-0,681	0,006	0,993
Mxd4	-0,684	0,006	0,993
Ciart	-0,685	0,003	0,993
Kbtbd11	-0,692	0,028	0,993
Net1	-0,708	0,035	0,993
Rpe65	-0,730	0,031	0,993
Fjx1	-0,737	0,034	0,993
Tmem47	-0,743	0,048	0,993
Garem1	-0,751	0,007	0,993
5930403L14Rik	-0,756	0,048	0,993
Mir6391	-0,772	0,029	0,993
Fam163a	-0,807	0,021	0,993
Sult1a1	-0,822	0,013	0,993
Ddah1	-0,831	0,002	0,993
Tmc7	-0,864	0,004	0,993
Apoe	-0,878	0,033	0,993
Mir6541	-0,900	0,010	0,993
Sesn1	-0,917	0,001	0,993
Gatsl3	-0,956	0,013	0,993
Mt3	-0,995	0,046	0,993
Kcnk1	-1,004	0,044	0,993

Nombre del gen	Log FC	P.Valor	adj.P.Valor
Nkain4	-1,008	0,046	0,993
Baalc	-1,100	0,047	0,993
Tril	-1,106	0,028	0,993
Kcnn2	-1,183	0,010	0,993
Enho	-1,194	0,049	0,993
Thrsp	-1,197	0,037	0,993
Clu	-1,209	0,046	0,993
Fzd4	-1,224	0,026	0,993
Cldn10	-1,259	0,022	0,993
Gm10115	-1,302	0,050	0,993
Slc7a11	-1,307	0,049	0,993
Zbtb16	-1,310	0,010	0,993
Ldhb	-1,337	0,030	0,993
Paqr8	-1,381	0,049	0,993
Rfx4	-1,386	0,044	0,993
Dio2	-1,415	0,040	0,993
Ttyh1	-1,457	0,049	0,993
Chst1	-1,481	0,042	0,993
Ppargc1a	-1,530	0,039	0,993
Fabp7	-1,565	0,032	0,993
Gpc5	-1,576	0,042	0,993
Cxcl14	-1,701	0,049	0,993
Scrg1	-1,716	0,040	0,993
Htra1	-1,801	0,033	0,993
Lcat	-1,868	0,040	0,993
Nat8f5	-1,898	0,033	0,993
Gpr37l1	-1,905	0,027	0,993
Pla2g7	-1,964	0,040	0,993
Fam107a	-2,090	0,008	0,993
Ptprz1	-2,173	0,048	0,993
Aldoc	-2,201	0,048	0,993
Slc4a4	-2,217	0,043	0,993
Gpm6a	-2,283	0,025	0,993
Slc1a3	-2,347	0,045	0,993
Luzp2	-2,348	0,033	0,993
Plpp3	-2,414	0,042	0,993
Slc39a12	-2,750	0,030	0,993
Slc1a2	-2,803	0,046	0,993
Ndrg2	-2,818	0,048	0,993
Tspan7	-3,015	0,026	0,993

Tabla suplementaria 2. Genes incluidos en el GS "Dll4+/-_UP". Genes que incrementan su expresión en la retina de un ratón Dll4 heterocigoto (Del Toro y col. 2010).

Nombre del gen
<i>Cxcl2</i>
<i>Esm1</i>
<i>MGI:1915703</i>
<i>Ccl3</i>
<i>Tgfb1</i>
<i>Cd38</i>
<i>B3gnt1</i>
<i>Cd109</i>
<i>Aqp1</i>
<i>Fbp1</i>
<i>4930523C07Rik</i>
<i>Fosl2</i>
<i>Gimap4</i>
<i>Enpp3</i>
<i>Gmfg</i>
<i>Lcp2</i>
<i>Rasgrp3</i>
<i>Cxcl4</i>
<i>Xlr</i>
<i>Il1b</i>
<i>Nid2</i>
<i>Lamb1-1</i>
<i>Ccl7</i>
<i>Klh6</i>
<i>C730049O14Rik</i>
<i>Plaur</i>
<i>Upp1</i>
<i>Rgs1</i>
<i>9430028L06Rik</i>
<i>A630026L20</i>
<i>Cav2</i>
<i>Clec1a</i>
<i>Mmrn1</i>
<i>Mogat2</i>
<i>Zfp69</i>
<i>Ccl4</i>
<i>Arhgap29</i>
<i>Plvap</i>
<i>Ly86</i>
<i>Rgs5</i>
<i>Emp1</i>
<i>Il13ra1</i>
<i>Gja1</i>
<i>Klh4</i>
<i>Ebi2</i>
<i>Cmya4</i>

<i>Angpt2</i>
<i>Adamts1</i>
<i>Sox17</i>
9430022A14

Tabla suplementaria 3. Los 20 GeneSet de la categoría “Biological Processes” que más incrementan su expresión en las células endoteliales cerebrales de ratones APP-PSEN1/+ de 12 meses versus WT de 12 meses

GENE SET	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR	FWER p-val
DLL4_UP_50_GENES	40	0.69	2.22	0.000	0.003	0.004
GO_MYELOID_DENDRITIC_CELL_ACTIVATION	22	0.70	1.98	0.000	0.050	0.139
GO_CELLULAR_EXTRAVASATION	23	0.68	1.96	0.000	0.049	0.199
GO_REGULATION_OF_GRANULOCYTE_CHEMOTAXIS	34	0.62	1.95	0.000	0.038	0.207
GO_REGULATION_OF_CD4_POSITIVE_ALPHA_BETA_T_CELL_ACTIVATION	32	0.63	1.95	0.000	0.033	0.224
GO_ESTABLISHMENT_OF_PROTEIN_LOCALIZATION_TO_ENDOPLASMIC_RETICULUM	63	0.55	1.93	0.000	0.037	0.288
GO_REGULATION_OF_NEUTROPHIL_CHEMOTAXIS	23	0.67	1.92	0.000	0.039	0.339
GO_POSITIVE_REGULATION_OF_CD4_POSITIVE_ALPHA_BETA_T_CELL_ACTIVATION	25	0.66	1.92	0.000	0.036	0.358
GO_POSITIVE_REGULATION_OF_NEUTROPHIL_MIGRATION	24	0.65	1.88	0.002	0.053	0.518
GO_NUCLEAR_TRANSCRIBED_MRNA_CATABOLIC_PROCESS_NONSENSE_MEDIATED_DECAY	78	0.51	1.87	0.000	0.056	0.583
GO_POSITIVE_REGULATION_OF_CYTOKINE_BIOSYNTHETIC_PROCESS	57	0.54	1.85	0.000	0.070	0.697
GO_POSITIVE_REGULATION_OF_T_HELPER_CELL_DIFFERENTIATION	17	0.70	1.85	0.002	0.069	0.727
GO_LEUKOCYTE_CELL_CELL_ADHESION	226	0.43	1.84	0.000	0.076	0.780
GO_GRANULOCYTE_MIGRATION	59	0.52	1.83	0.002	0.079	0.819
GO_TRANSLATIONAL_INITIATION	99	0.48	1.83	0.000	0.075	0.825
GO_REGULATION_OF_INTERLEUKIN_2_PRODUCTION	42	0.56	1.83	0.000	0.071	0.826
GO_POSITIVE_REGULATION_OF_INTERLEUKIN_2_PRODUCTION	29	0.60	1.82	0.000	0.067	0.829
GO_REGULATION_OF_T_HELPER_CELL_DIFFERENTIATION	23	0.64	1.82	0.002	0.066	0.846
GO_MYELOID_DENDRITIC_CELL_DIFFERENTIATION	19	0.67	1.81	0.002	0.068	0.872
GO_MONOCYTE_CHEMOTAXIS	28	0.60	1.79	0.002	0.087	0.939

Tabla suplementaria 4.. Los 20 GeneSet de la categoría “Biological Processes” que más reducen su expresión en las células endoteliales cerebrales de ratones APP-PSEN1/+ de 12 meses versus WT de 12 meses

GENE SET	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR	FWER p-val
GO_ORGANIC_ACID_CATABOLIC_PROCESS	186	-0.52	-2.30	0.000	0.005	0.003
GO_CELLULAR_CARBOHYDRATE_CATABOLIC_PROCESS	26	-0.74	-2.28	0.000	0.003	0.004
GO_CELLULAR_AMINO_ACID_CATABOLIC_PROCESS	101	-0.55	-2.24	0.000	0.002	0.004
GO_SMALL_MOLECULE_CATABOLIC_PROCESS	294	-0.48	-2.24	0.000	0.002	0.004
GO_SYNAPSE_ORGANIZATION	137	-0.52	-2.22	0.000	0.001	0.004
GO_REGULATION_OF_SODIUM_ION_TRANSPORT	72	-0.57	-2.21	0.000	0.001	0.004
GO_OLIGODENDROCYTE_DIFFERENTIATION	56	-0.62	-2.20	0.000	0.001	0.004
GO_GLUKAN_METABOLIC_PROCESS	48	-0.62	-2.20	0.000	0.001	0.004
GO_THIOESTER_BIOSYNTHETIC_PROCESS	45	-0.63	-2.20	0.000	0.001	0.005
GO_GLUKAN_BIOSYNTHETIC_PROCESS	21	-0.75	-2.18	0.000	0.002	0.012
GO_HOMOPHILIC_CELL_ADHESION_VIA_PLASMA_MEMBRANE_ADHESION_MOLECULES	106	-0.53	-2.16	0.000	0.003	0.022
GO_ACIDIC_AMINO_ACID_TRANSPORT	21	-0.74	-2.15	0.000	0.004	0.027
GO_ALPHA_AMINO_ACID_CATABOLIC_PROCESS	85	-0.54	-2.13	0.000	0.006	0.044
GO_REGULATION_OF_SMOOTHENED_SIGNALING_PATHWAY	61	-0.57	-2.13	0.000	0.005	0.044
GO_MONOCARBOXYLIC_ACID_CATABOLIC_PROCESS	87	-0.54	-2.12	0.000	0.005	0.045
GO_POSITIVE_REGULATION_OF_SODIUM_ION_TRANSPORT	31	-0.66	-2.12	0.000	0.005	0.045
GO_SYNAPSE_ASSEMBLY	66	-0.57	-2.12	0.000	0.004	0.046
GO_REGULATION_OF_SODIUM_ION_TRANSMEMBRANE_TRANSPORTER_ACTIVITY	35	-0.63	-2.11	0.000	0.004	0.049
GO_LIPID_OXIDATION	66	-0.55	-2.10	0.000	0.005	0.054
GO_POSTSYNAPTIC_MEMBRANE_ORGANIZATION	25	-0.68	-2.10	0.000	0.005	0.056