

Universidad de Sevilla

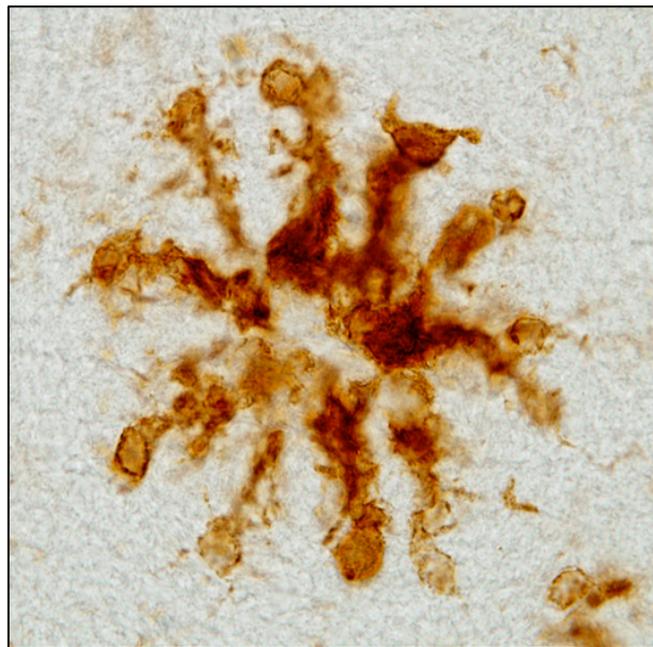
Facultad de Medicina

Dpto. de Fisiología Médica y Biofísica



**Microglía e hipoxia: Implicaciones en la
enfermedad de Alzheimer**

Tesis Doctoral



Antonio Heras Garvín
Sevilla, 2015

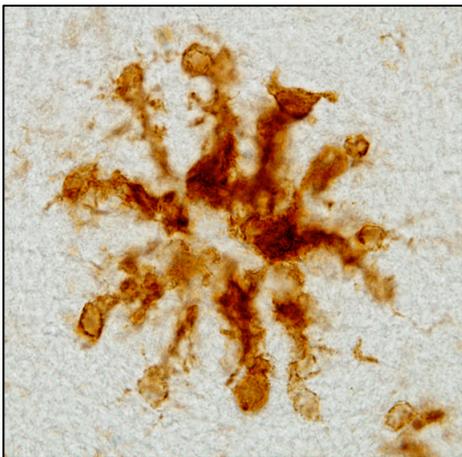


Figura de portada:

Imagen representativa de un grupo de células microgliales (marrón) alrededor de una placa de A β en el hipocampo. Esta se obtuvo mediante tinción inmunohistoquímica con DAB frente al marcador de microglía IBA1 en rodajas de cerebro de un modelo de ratón con enfermedad de Alzheimer.

Universidad de Sevilla

Facultad de Medicina

Dpto. de Fisiología Médica y Biofísica



**Microglía e hipoxia: Implicaciones en la
enfermedad de Alzheimer**

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor
por la Universidad de Sevilla

**Antonio Heras Garvín
Sevilla, 2015**

Alberto Pascual Bravo, científico titular del CSIC,

CERTIFICA:

Que la memoria de trabajo titulada (Microglía e hipoxia: Implicaciones en la enfermedad de Alzheimer” elaborada por Antonio Heras Garvín, licenciado en Biología, ha sido realizada bajo su dirección y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Para que conste firma la presenta en Sevilla, a 7 de Enero de 2015.



Fdo: ALBERTO PASCUAL BRAVO



Índice

Introducción

Hipoxia.....	4
HIF y la respuesta adaptativa a la hipoxia	5
HIF e inflamación	6
Efecto de la hipoxia sobre el sistema inmune innato	9
Células gliales: microglía y astrocitos	12
Hipoxia y demencia	14
La enfermedad de Alzheimer (EA).....	16
Fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer.....	17
Enfermedad de Alzheimer e hipoxia.....	19
Papel de la glía en la enfermedad de Alzheimer.....	21

Objetivos.....	25
-----------------------	-----------

Metodología

Modelos experimentales	27
Líneas celulares	27
Cultivos primarios	28
Animales.....	30
Muestras de cerebro humano.....	34
Tratamientos.....	34
Hipoxia	34
DMOG.....	35
M-CSF y GM-CSF	36
BrdU	36
Preparación de tejidos/Medida del HCT de los animales	37
Extracción y análisis de mRNA	38
Extracción de proteínas.....	39
Cuantificación de proteínas.....	40
ELISA	41
Western Blot	41
Dot Blot.....	42
Análisis del ciclo celular.....	42
Ensayos de apoptosis	43
Ensayos de migración	44
Inmunocitoquímica	45
Inmunohistoquímica.....	46
Tinciones de cortes de tejido.....	48
Cuantificación de los ensayos inmunocitoquímicos	50
Cuantificación de los ensayos inmunohistoquímicos	50
Análisis estadístico.....	51

Resultados

Estudio de la respuesta de la microglía a la hipoxia	53
Análisis del efecto de la combinación de hipoxia crónica y la EA sobre la microglía <i>in vivo</i>	61
Estudio de la combinación de la hipoxia y la inflamación sobre la microglía <i>in vitro</i>	68
Análisis del efecto de la hipoxia sobre el metabolismo del A β	73
Estudio del papel de la hipoxia sobre la progresión de la enfermedad de Alzheimer	77

Discusión.....	81
-----------------------	-----------

Conclusiones	92
---------------------------	-----------

Bibliografía.....	94
--------------------------	-----------

Introducción

Hipoxia

La aportación adecuada de oxígeno es esencial para que el metabolismo de la célula eucariota sea eficiente. Esto se debe al papel del oxígeno como principal aceptor de electrones en el complejo IV de la cadena transportadora de electrones mitocondrial. En condiciones fisiológicas, la mayor parte del oxígeno consumido por una célula es usado para este propósito (Taylor and Moncada 2010); sin embargo, una proporción menor del oxígeno no es consumido por la mitocondria y juega un papel importante en procesos de señalización (éste es el caso de la regulación en normoxia de la vía de HIF que se describirá posteriormente) (Hagen, Taylor et al. 2003, Chua, Dufour et al. 2010).

La hipoxia tiene lugar cuando el nivel de oxígeno requerido por una célula para mantener la homeostasis metabólica es mayor que el aporte vascular. La hipoxia es una situación fisiológica o fisiopatológica relativamente común asociada a procesos como el desarrollo fetal, la adaptación a la altitud y el funcionamiento de la barrera epitelial en la superficie de la mucosa del tracto gastrointestinal (Colgan and Taylor, 2010). Sin embargo, debido al papel clave que juega el oxígeno molecular en el metabolismo oxidativo y, como consecuencia, en el mantenimiento de los niveles celulares de ATP, la hipoxia representa un cambio potencialmente perjudicial cuando se presenta en el microambiente celular (Taylor and McElwain 2010, Semenza 2012). Entre las patologías en las que la hipoxia ha sido ampliamente demostrada o documentada se incluyen situaciones donde el aporte sanguíneo a un tejido se ha visto comprometido como en el infarto de miocardio, la arteriosclerosis o el ictus (Semenza 2012). La aparición de regiones hipóxicas también se da en la mayoría de los tumores sólidos (Semenza 2012) y recientemente se ha demostrado que la hipoxia es una característica prominente de los tejidos en multitud de enfermedades inflamatorias como la enfermedad inflamatoria intestinal, la artritis reumatoide y la infección crónica (Kempf, Lebedziejewski et al. 2005, Taylor and Colgan 2007, Kennedy, Ng et al. 2010, Werth, Beerlage et al. 2010). Es decir, la hipoxia representa una severa amenaza para la supervivencia de la célula, del tejido y del organismo y es relativamente frecuente tanto en individuos sanos como enfermos.

HIF y la respuesta adaptativa a la hipoxia

Puesto que la hipoxia es un evento que ocurre de manera frecuente, los metazoos han desarrollado una respuesta molecular protectora/adaptativa a la hipoxia que incluye la rápida activación de un programa transcripcional. Dicho programa está regulado por un factor de transcripción conocido como HIF (factor inducible por hipoxia) (Semenza 2012, Semenza 2012), un dímero constituido por una subunidad alfa sensible a oxígeno (HIF-1 α , HIF-2 α o HIF-3 α) y una subunidad beta insensible a oxígeno HIF-1 β /ARNT. HIF-1 α es expresado de manera ubicua mientras que las otras isoformas son expresadas de manera específica dependiendo del tejido (Semenza 2012).

El mecanismo por el cual HIF es regulado bajo condiciones de hipoxia ha sido revisado extensivamente en la literatura (Kaelin and Ratcliffe 2008, Semenza 2012). En condiciones de normoxia (donde el aporte de oxígeno a la célula supera la demanda), las proteínas HIF α son sintetizadas en una alta tasa pero son rápidamente marcadas para su degradación vía proteasoma. La degradación de HIF α es dependiente de hidroxilación por una familia de dioxigenasas llamadas HIF hidroxilasas. Existen cuatro miembros en esta familia, PHD1, PHD2 y PHD3 (prolilhidroxilasa 1, 2 y 3 respectivamente) y un cuarto miembro conocido FIH (como factor inhibidor de HIF). Las PHDs hidroxilan residuos de prolina específicos localizados en los dominios de degradación dependiente de oxígeno C-terminal y N-terminal (Pro402 y Pro564 en HIF-1 α en humanos). Esta modificación hace que las proteínas HIF α sean reconocidas por la proteína VHL (von Hippel-Lindau), componente de un complejo E3 ubiquitina ligasa que ubiquitina los residuos de prolina hidroxilados y marca las proteínas HIF α para su degradación en el proteasoma (Maxwell 2005, Kaelin 2008, Kaelin and Ratcliffe 2008). La FIH, a diferencia de las PHDs, hidroxila a HIF α en un residuo de asparragina (Asn804 en humanos) que previene la asociación de las proteínas HIF α con el co-activador transcripcional p300/CBP (McNeill, Hewitson et al. 2002, Zhang, Fu et al. 2010). Así, en normoxia, la hidroxilación hace a las subunidades HIF α tanto inestables como transcripcionalmente inactivas.

En condiciones de hipoxia, la alta afinidad por el oxígeno de la citocromo C oxidasa (complejo IV de la cadena transportadora de electrones) hace que la mayor parte del oxígeno disponible se dirija a la mitocondria para ser utilizado en el metabolismo oxidativo (Hagen, Taylor et al. 2003, Chua, Dufour et al. 2010, Taylor and Moncada

2010). De esta forma la actividad hidroxilasa de las PHDs y de FIH se ve profundamente reducida, dando lugar a la estabilización de HIF y a que se vuelva transcripcionalmente activo. En la Figura 1 se muestra un esquema de la regulación de las PHDs y de HIF α . Los genes diana de HIF se cuentan por cientos y están involucrados principalmente en la adaptación celular a la hipoxia a través de la activación a nivel sistémico de la angiogénesis y eritropoyesis y, a nivel celular, del cambio hacia un metabolismo más glicolítico. A pesar de que HIF es el regulador principal de la respuesta celular a la hipoxia, es importante tener en cuenta que existen otros factores de transcripción con sensibilidad a hipoxia (Cummins and Taylor 2005). No obstante, nos centraremos en el papel de HIF debido a su importancia sobre las células del sistema inmune y en los resultados obtenidos en esta tesis.

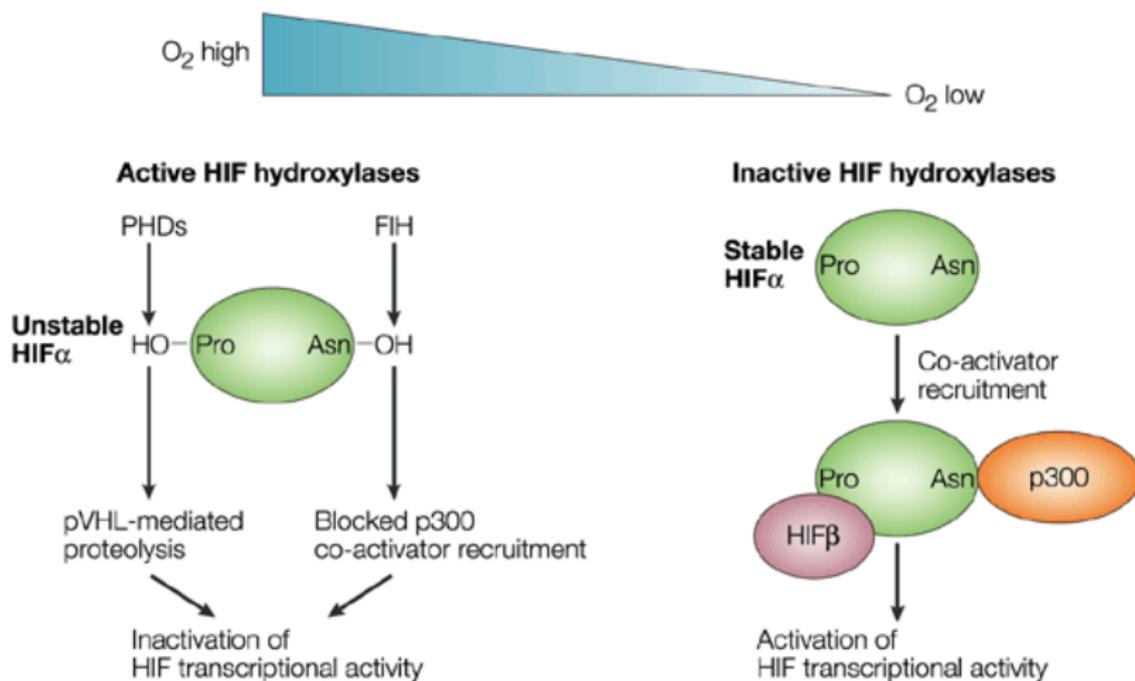


Figura 1. Esquema representativo de la regulación de HIF α y las PHDs (Schofield and Ratcliffe 2004).

HIF e inflamación

En los últimos años se ha demostrado que tejidos con inflamación crónica presentan de forma prominente regiones hipóxicas. Esto se debe a la combinación de diversos factores que incluyen la rotura de la microvasculatura (y como consecuencia reducción de la disponibilidad de oxígeno), la excesiva inflamación y fibrosis, así como el aumento del consumo de oxígeno por el elevado metabolismo de las células inmunes

residentes o infiltradas en el tejido (Taylor and Colgan 2007, Colgan and Taylor 2010). Por ejemplo, una característica de la enfermedad inflamatoria intestinal es la infiltración de neutrófilos, los cuales consumen gran cantidad de oxígeno durante la producción de peróxido de hidrógeno por la NADPH oxidasa (Colgan and Taylor 2010).

Las evidencias de hipoxia en los tejidos ha sido documentada en una gran cantidad de enfermedades inflamatorias mediante el uso de sondas específicas sensibles a niveles reducidos de oxígeno (como las tinciones basadas en el 2-nitroimidazol), así como la demostración del aumento de la expresión de HIF por análisis inmunohistoquímico y otras técnicas (Karhausen, Furuta et al. 2004, Kennedy, Ng et al. 2010, Vannay, Sziksz et al. 2010). Diversos estudios indican que las células inmunes son reclutadas hacia los sitios de inflamación y, durante ese proceso, experimentan una disminución drástica en los niveles locales de oxígeno conforme migran desde el torrente sanguíneo (rico en oxígeno) al sitio relativamente hipóxico de la inflamación. Este descenso en la concentración de oxígeno da lugar a la activación de HIF en estas células, un evento esencial que tiene un impacto significativo a través de la regulación de genes de adaptación y supervivencia (Cramer, Yamanishi et al. 2003). Del mismo modo, las células inmunes residentes en tejidos que presentan inflamación crónica están generalmente expuestas a un ambiente hipóxico.

Aparte de las vías de activación de HIF dependientes de O_2 , HIF también es inducido por citoquinas pro-inflamatorias y factores de crecimiento en condiciones de normoxia, aunque los mecanismos y vías moleculares que subyacen a esta inducción siguen sin ser conocidos completamente. Las citoquinas son proteínas producidas por las células del sistema inmune que actúan principalmente como mensajeras en la comunicación intercelular y están involucradas en procesos tales como la inflamación, la quimiotaxis, la proliferación, la diferenciación celular, etc. La mayoría de ellas pueden clasificarse en dos grupos principales, las pro-inflamatorias y las anti-inflamatorias, siendo las primeras responsables de la activación de macrófagos y otras células del sistema inmune en la respuesta innata y promoviendo la inflamación. Se ha descrito que las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α (factor de necrosis tumoral) y la IL-1 β (interleuquina 1 β) inducen la acumulación y actividad transcripcional de HIF-1 α . La estimulación de la inducción de HIF-1 α por TNF- α requiere la acción del factor de transcripción NF- κ B (*factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas*)

que actúa estabilizando la proteína HIF-1 α sin afectar a sus niveles de mRNA (Jung, Isaacs et al. 2003, Zhou, Schmid et al. 2003). De manera similar, la IL-1 β actúa sobre la estabilidad de la proteína HIF-1 α modulando la actividad del factor NF- κ B e inhibiendo la degradación mediada por la proteína VHL (Jung, Isaacs et al. 2003). El hecho de que HIF pueda ser activado en respuesta a citoquinas inflamatorias indica que este puede jugar un papel importante en la inflamación.

Además de las citoquinas, otros estímulos pro-inflamatorios como la presencia de bacterias o productos bacterianos como el LPS (lipopolisacárido) también estimulan la actividad de HIF-1 α en condiciones normales de oxígeno. Diversas rutas han sido involucradas en este proceso, incluyendo la de NF- κ B (Frede, Stockmann et al. 2006, Nishi, Oda et al. 2008, Fang, Hughes et al. 2009), ROS (especies reactivas de oxígeno) (Nishi, Oda et al. 2008), las PHDs (Peyssonnaud, Cejudo-Martin et al. 2007) y las MAPKs (proteínas quinasas activadas por mitógeno) p42/p44 (Frede, Stockmann et al. 2006). La implicación de NF- κ B en este proceso es controvertida. Frede y colaboradores han demostrado que el LPS induce la expresión del mRNA de *HIF-1 α* en monocitos humanos a través de la unión del factor NF- κ B al promotor de este gen. Usando macrófagos mutantes para IKK- β [subunidad beta de la quinasa del inhibidor de NF- κ B], también se ha demostrado que NF- κ B es responsable de la transcripción de *HIF-1 α* y de la estabilidad de la proteína, y que la deficiencia de IKK- β da lugar a una reducción de la expresión de las dianas de HIF como *Glut-1* (transportador de glucosa 1) (Rius, Guma et al. 2008). En estos mutantes, la ausencia de IKK- β tiene como consecuencia la activación del inhibidor de NF- κ B (I κ B) y por tanto la inactivación de este último. Otros estudios, sin embargo, han demostrado que la inducción de HIF-1 α por LPS no es dependiente de la actividad de NF- κ B, sino de la generación de ROS (Nishi, Oda et al. 2008). Adicionalmente, se ha demostrado que el LPS aumenta los niveles de HIF mediante la reducción de los niveles de PHD2 y PHD3 en macrófagos, proceso dependiente del receptor TLR-4 (receptor de tipo Toll 4) (Peyssonnaud, Cejudo-Martin et al. 2007). Son necesarios futuros estudios para aclarar la relación entre HIF y NF- κ B, teniendo en cuenta la importancia de estos dos factores transcripcionales en la regulación de la respuesta a hipoxia y en la inflamación, respectivamente.

Efecto de la hipoxia sobre el sistema inmune innato

Muchos de los efectos de la hipoxia sobre las células del sistema inmune son mediados por la estabilización de HIF y muchos de los genes relacionados con la respuesta inmune son regulados por este factor de transcripción, bien directamente por su unión al elemento de respuesta a HIF (HRE) en la región promotora de estos genes, o indirectamente, mediante la inducción de otras señales moleculares o factores de transcripción, como el factor NF- κ B. Algunos de los efectos de la señalización de HIF en las células del sistema inmune innato en respuesta a hipoxia y otros estímulos se resumen en la siguiente figura (Figura 2).

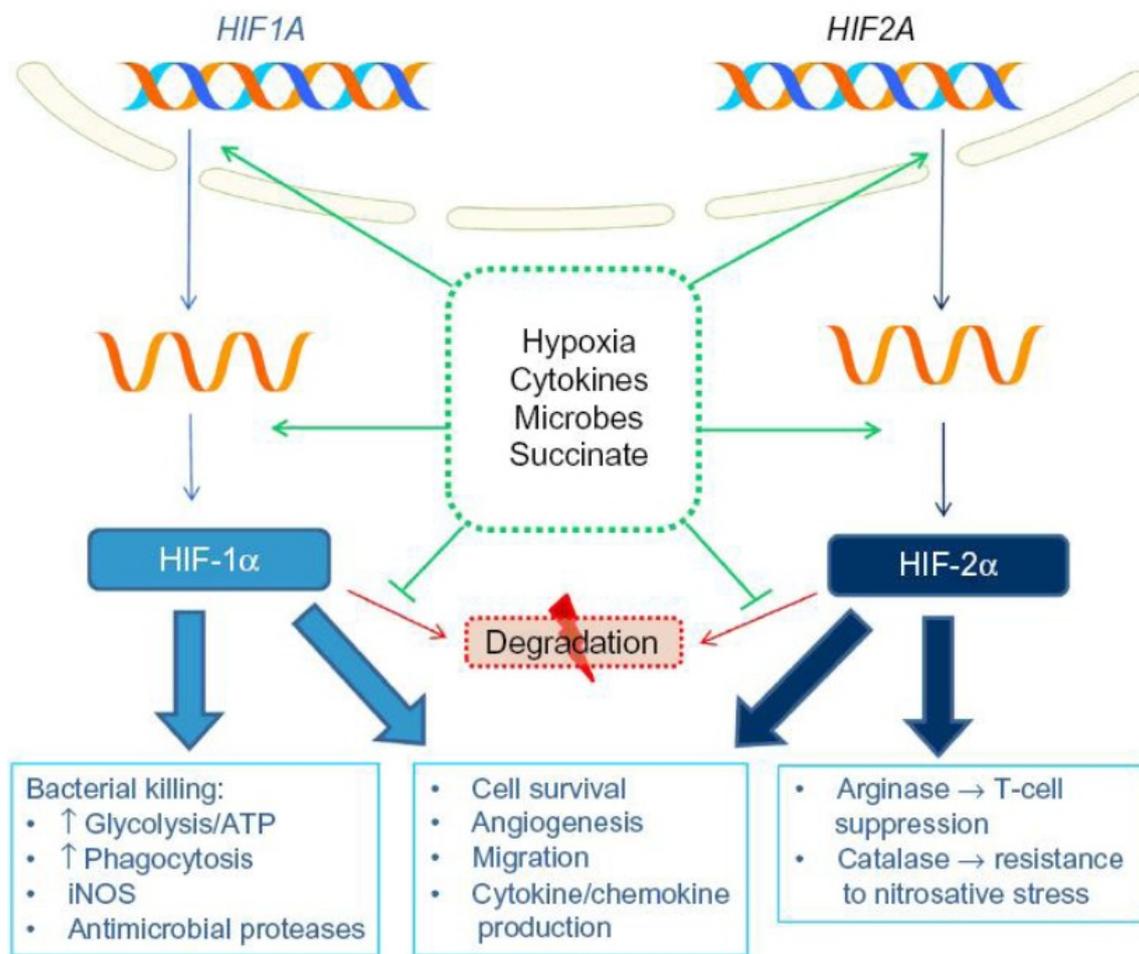


Figura 2. Papel de HIFs en la respuesta inmune a la hipoxia (Walmsley, Harris et al. 2014).

Las células del sistema inmune innato incluyen tanto a las células mieloides, como a neutrófilos, monocitos circulantes (que se diferencian en macrófagos en los tejidos) y a las células linfoides innatas (ILCs). Todas estas células tienen funciones

importantes en la defensa del hospedador, incluyendo la fagocitosis de patógenos, la liberación de proteasas antimicrobianas, y la secreción de citoquinas y quimioquinas que atraen y activan a otras células del sistema inmune. Las células del sistema inmune encuentran un rango de diferentes tensiones de oxígeno, con menos niveles en tejidos que en la sangre, y que se reducen aún más en el lugar de la inflamación. Para llevar a cabo sus funciones bajo condiciones de hipoxia, estas células aumentan la generación de ATP mediante la regulación al alza de enzimas glicolíticas y de transportadores de glucosa (Walmsley, Print et al. 2005, Roiniotis, Dinh et al. 2009). La hipoxia tiene además un abundante número de efectos adicionales sobre la respuesta inmune innata. Por ejemplo, los bajos niveles de oxígeno provocan un aumento de la expresión de moléculas de adhesión y quimioquinas en las células endoteliales, atrayendo así a monocitos y neutrófilos circulantes (Beck-Schimmer, Schimmer et al. 2001). Ambos tipos celulares aumentan también la expresión de moléculas de adhesión, como la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y CD18/CD11b al alcanzar regiones hipóxicas, promoviendo así su arresto y su migración transendotelial o transepitelial hacia el sitio de la inflamación (Kong, Eltzschig et al. 2004). En el proceso de infiltración, en el tejido inflamado se produce la maduración de los monocitos a macrófagos. Staples y colaboradores han analizado el efecto de la hipoxia crónica en este proceso y han encontrado que los monocitos continúan su maduración a macrófagos mediante la regulación al alza de los niveles de mRNA de *CD68* y *HIF-1 α* en hipoxia (Staples, Sotoodehnejadnematlahi et al. 2011). Los autores consideran estos eventos como cruciales en la maduración, supervivencia y función del linaje de células monocito-macrófago bajo condiciones de hipoxia crónica.

La hipoxia también actúa reteniendo a las células mieloides en el sitio del daño mediante la inducción de la expresión de diferentes factores que inhiben la migración (Turner, Scotton et al. 1999, Grimshaw and Balkwill 2001, Bosco, Puppo et al. 2006). Los macrófagos, al igual que monocitos y neutrófilos, migran a lo largo de un gradiente quimiotáctico hasta que alcanzan un área hipóxica donde se inhibe su capacidad de progresar más. Se ha descrito que, en respuesta a hipoxia, en macrófagos derivados de monocitos (MDMs) se produce una inhibición de la proteína quimiotáctica MCP-1, y se incrementa la expresión y función del receptor de quimioquina CXCR4. Por tanto, la capacidad quimiotáctica de los monocitos

humanos y de los MDMs está claramente regulada por hipoxia (Schioppa, Uranchimeg et al. 2003, Casazza, Laoui et al. 2013).

Por otro lado, la hipoxia tiende a potenciar la función pro-inflamatoria y tiene un efecto sobre la supervivencia en neutrófilos, monocitos y eosinófilos (Hannah, Mecklenburgh et al. 1995, Walmsley, Print et al. 2005, Roiniotis, Dinh et al. 2009, Nissim Ben Efraim, Eliashar et al. 2010). La habilidad de las células inmunes innatas para sobrevivir y llevar a cabo su función de manera efectiva bajo condiciones de hipoxia es crucial para la defensa del hospedador, sin olvidar que la apoptosis de células inmunes es, sin embargo, esencial en el proceso de resolución de la inflamación. La capacidad de supervivencia y activación prolongada de las células mieloides en condiciones de hipoxia parece jugar un papel principal en la inflamación crónica, contribuyendo de manera importante a la respuesta inmune en enfermedades como la enfermedad obstructiva pulmonar crónica, el asma o la artritis reumatoide (RA) (Rossi, Sawatzky et al. 2006).

En macrófagos y neutrófilos la hipoxia da lugar a un aumento de la expresión los receptores de Fc y del complemento, aumentando así la fagocitosis (Anand, Gribar et al. 2007). También promueve la liberación de mediadores anti-microbianos tales como la β -defensina por los macrófagos (Nickel, Busch et al. 2012). En hipoxia, tanto monocitos como macrófagos aumentan la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como el $\text{TNF}\alpha$, el interferón γ ($\text{IFN}\gamma$), la $\text{IL-1}\beta$ y diversos quimio-atrayentes, mientras que reduce la expresión de quimioquinas asociadas con la inmunidad adaptativa (Hirani, Antonicelli et al. 2001, Bosco, Puppo et al. 2006, Acosta-Iborra, Elorza et al. 2009). Además, macrófagos pre-cultivados en hipoxia han mostrado ser más efectivos en la inducción de la respuesta de células T CD8^+ , debido a la regulación al alza del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I (MHC-I) y de moléculas co-estimuladoras, pero también inhibiendo la respuesta de las células T CD4^+ mediante la producción de arginasa (Acosta-Iborra, Elorza et al. 2009, Pesce, Ramalingam et al. 2009).

Una respuesta esencial a la hipoxia es la estimulación de la angiogénesis, que da lugar a un aumento del riego sanguíneo en un esfuerzo por recuperar la homeostasis de oxígeno. Diversos factores angiogénicos se liberan en respuesta a hipoxia, y los macrófagos son reguladores esenciales en este proceso. White y colaboradores han

encontrado que HIF-2 α es el mediador básico de la angiogénesis en macrófagos humanos (White, Harris et al. 2004). Diversos estudios han documentado una inducción de genes que codifican factores angiogénicos dependiente de HIF en macrófagos en cultivo expuestos a hipoxia, tales como VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), IL-8 (interleuquina 8), FGF1, FGF2 (factor de crecimiento de fibroblastos 1 y 2 respectivamente) Y PDGF- β (subunidad beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas). Recientemente, el análisis por *microarray* de MDMs expuestos a hipoxia ha demostrado un incremento del mRNA de proteínas como VEGF, GLUT-1 y MMP-7 (metaloproteinasa de matriz 7). Esto sugiere un aumento de genes relacionados con angiogénesis, metabolismo glicolítico y procesamiento proteolítico respectivamente (Strehl, Fangradt et al. 2014).

Células gliales: microglía y astrocitos

Las células microgliales son los macrófagos del sistema nervioso central y están asociados con la patogénesis de muchas enfermedades neurodegenerativas e inflamatorias del cerebro. La microglía deriva durante la embriogénesis de macrófagos del saco vitelino, los cuales migran al neuroepitelio y dan lugar al sistema inmune en el cerebro adulto (Ginhoux, Greter et al. 2010).

Como los macrófagos en el resto del cuerpo, la microglía usa mecanismos fagocíticos y citotóxicos para destruir elementos extraños. Tanto microglía como macrófagos contribuyen a la respuesta inmune actuando como presentadores de antígenos, así como promoviendo la inflamación y mecanismos homeostáticos en el cuerpo segregando citoquinas y otras moléculas de señalización. Sin embargo, la microglía presenta ciertas diferencias con macrófagos, como la ausencia en su estado de reposo de las proteínas MHC tipo I y tipo II, el IFN- γ , el antígeno CD45 y muchos otros receptores de superficie que se requieren para la presentación de antígenos y las actividades fagocítica y citotóxica (Aloisi 2001). Otra diferencia entre la microglía y el resto de células de origen mielóide es la tasa de renovación celular. Macrófagos y células dendríticas son generados y reemplazados continuamente por células progenitoras mieloides que se diferencian en el tipo necesario. Debido a la barrera hematoencefálica, para el organismo sería muy difícil y costosa la renovación y el reemplazamiento continuo de la microglía a partir de células progenitoras mieloides. Es por esto que en su lugar la

microglía mantiene su *status quo* en un estado quiescente, proliferando rápidamente cuando es activada y así mantener su número en un nivel adecuado. Sin embargo, en ciertas ocasiones como la infección extrema, la barrera hematoencefálica se debilita y la microglía es reemplazada por células progenitoras mieloides y por macrófagos del sistema inmune innato. Una vez que la infección se reduce, se restablece la desconexión entre sistema central y periférico y sólo la microglía está presente en el periodo de recuperación (Gehrmann 1996).

Las células microgliales son extremadamente plásticas y sufren una gran variedad de cambios estructurales basados en su localización y en el papel que desempeñan en el momento. Este nivel de plasticidad es esencial para llevar a cabo la multitud de funciones inmunológicas de las que son responsables, así como en el mantenimiento de la homeostasis en el cerebro. Si la microglía no fuera capaz de esto, sería necesario reemplazarlas de manera basal continuamente (como en el caso de macrófagos), no estando disponibles para la defensa del sistema nervioso central y, en consecuencia, provocando un desequilibrio inmunológico en condiciones normales (Gehrmann, Matsumoto et al. 1995). A pesar de la importancia de la microglía en el desarrollo del sistema nervioso central, del mantenimiento de la homeostasis cerebral, de su papel central en la inflamación y en enfermedades neurodegenerativas y de la asociación de fenómenos hipóxicos con todos estos estados, no existen apenas estudios de cómo la hipoxia afecta a estas células. Sólo algunos estudios han propuesto efectos similares a los observados en macrófagos, como la activación de las células y el aumento de la producción y liberación de algunas citoquinas y moléculas pro-inflamatorias como TNF- α o IL-1 β , que puede dar lugar a un incremento del daño neuronal (Kaur, Rathnasamy et al. 2013, Yao, Kan et al. 2013).

En el cerebro encontramos otro tipo celular involucrado en el mantenimiento de la homeostasis cerebral y que derivan de un progenitor neural, los astrocitos. Estos, junto a la microglía, son englobados en una misma población que se conoce como “células gliales”, a pesar de tener orígenes diferentes en el desarrollo. La visión clásica de las células gliales ha sido la de meras células de soporte que aportan factores tróficos a las neuronas, no obstante esta visión está siendo revisada. Estudios recientes han demostrado que ambos tipos celulares están involucradas en la poda o eliminación de sinapsis redundantes o innecesarias durante el desarrollo embrionario y también de

ciertas sinapsis durante el periodo postnatal (Paolicelli, Bolasco et al. 2011, Schafer, Lehrman et al. 2012). En cuanto a los astrocitos, se ha observado que modulan la actividad sináptica mediante la liberación de pequeñas moléculas a la hendidura sináptica tales como el ATP, la adenosina, la D-serina, y posiblemente también glutamato, un proceso denominado “gliotransmisión”. De hecho, los procesos pediculares de los astrocitos están presentes en el 60% de las sinapsis excitatorias en el hipocampo de rata, como parte de la sinapsis tripartita (revisión en: (Perea, Navarrete et al. 2009). Los astrocitos son también parte de la barrera hematoencefálica, donde regulan el acoplamiento neurovascular.

Las células gliales no solo producen factores neurotróficos, sino que inspeccionan el ambiente y responden a ciertas señales que las neuronas presentan en su membrana plasmática o secretan al espacio extracelular cuando el cerebro sufre algún daño o lesión, ya sea agudo (infección, trauma, ictus) o crónico, tal como la enfermedad de Alzheimer (EA) u otra enfermedad neurodegenerativa. Esta respuesta de las células gliales es conocida como “activación” y consiste en un cambio morfológico y funcional. Por un lado sus somas se hipertrofian y sus procesos, normalmente muy ramificados y delgados, se retraen y se engrosan. Por otro lado, adquieren capacidad fagocítica, y/o secretan biomoléculas potencialmente dañinas tales como citoquinas pro-inflamatorias y ROS.

Hipoxia y demencia

Los principales procesos patológicos que dan lugar a demencia en personas de edad avanzada pueden clasificarse o separarse en dos grupos. El primero de ellos englobaría los procesos neurodegenerativos que ocurren dentro del tejido cerebral en sí. El segundo grupo correspondería a patologías vasculares o procesos de daño vascular que provocan la aparición de eventos hipóxicos o isquémicos en el cerebro y como consecuencia daños o disfunción cerebral. Mientras que en las últimas décadas se ha avanzado mucho en el conocimiento de las enfermedades neurodegenerativas y su efecto sobre la demencia, no ha sido así con las patologías vasculares.

El término “demencia vascular” ha sido acuñado para referirse a la segunda forma más común de demencia tras la EA (Jellinger 2007), en la que el deterioro cognitivo se produce por el efecto de enfermedades vasculares sobre la estructura cerebral y su

función. Sin embargo, los procesos de daño vascular que pueden dar lugar a deterioro cognitivo son muy variados pudiendo incluir enfermedades cerebrovasculares que implican a arterias pequeñas o grandes (que a menudo dan lugar a síndromes de ictus clínico), daño cerebrovascular como embolias que ascienden desde el corazón o desde grandes vasos proximales a la circulación intra-cerebral, microinfartos en la sustancia blanca o gris, leucoencefalopatía o la angiopatía cerebral amiloide (CAA).

Una extensa revisión ha demostrado que la prevalencia de la demencia entre personas con accidentes cerebrovasculares es del 10% antes del primer accidente y de un 10% adicional tras sufrirlo (Pendlebury and Rothwell 2009). La ocurrencia de un segundo accidente cerebrovascular es un potente predictor de demencia, siendo la prevalencia de demencia de un 30% entre personas con accidentes recurrentes. La prevalencia del deterioro cognitivo puede ser incluso mayor, del 50% en individuos analizados 3 meses después del ictus (Sundar and Adwani 2010).

Programas clínico-patológicos y estudios epidemiológicos a gran escala por todo el mundo han demostrado que muchas o incluso la mayoría de las personas con demencia presentan dos o varias patologías, asociando la EA con patologías vasculares (Schneider, Arvanitakis et al. 2007, Dotti and De Strooper 2009, Ogunshola and Antoniou 2009). A pesar de eso, es difícil extraer de la extensa literatura como se da la co-morbilidad patológica, al variar los métodos de identificación, clasificación y presentación de las frecuencias de EA y enfermedades vasculares en las mismas poblaciones de pacientes.

Desde el punto de vista de la contribución que las patologías vasculares tienen en el desarrollo de la demencia, no es sorprendente que los estudios epidemiológicos hayan encontrado evidencias de la asociación de factores de riesgo vascular tales como la hipertensión, la diabetes, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la obesidad, el colesterol, una dieta pobre o el hábito de fumar con una mayor probabilidad de desarrollar Alzheimer (Patterson, Feightner et al. 2007, Dotti and De Strooper 2009, Barnes and Yaffe 2011, Singh, Mielke et al. 2014).

La enfermedad de Alzheimer (EA)

La EA es la enfermedad neurodegenerativa más común y la mayor causa de demencia. Esta enfermedad afecta a un 6% de las personas mayores de 65 años y se ha estimado que su prevalencia dobla su valor conforme la edad aumenta 5 años, por lo que cerca del 50% de las personas mayores de 85 años sufren EA (Hirtz, Thurman et al. 2007, Thies and Bleiler 2011).

Las características patológicas de la enfermedad pueden ser clasificadas entre lesiones "positivas" y "negativas". Las lesiones positivas incluyen las placas amiloides y la angiopatía cerebral amiloidea (su equivalente en arterias y capilares), los ovillos neurofibrilares (NFTs) y la respuesta glial. Las lesiones negativas consisten en una progresiva pérdida de neuronas y sinapsis que da lugar a una atrofia de la corteza cerebral. Las características patológicas más comunes de la enfermedad, las placas amiloides y los NFTs, fueron ya descritos por Alois Alzheimer hace más de 100 años, pero el conocimiento sobre su composición e importancia es mucho más reciente.

Las placas amiloides son depósitos extracelulares de proteínas compuestos principalmente por el péptido β -amiloide ($A\beta$), un producto del catabolismo de la proteína precursora del amiloide (APP) que resulta de su escisión secuencial por las enzimas β -secretasas y γ -secretasas. Las placas se clasifican en diferentes subtipos morfológicos según sus propiedades de tinción y características asociadas a la patología. Encontramos así placas difusas, primitivas, clásicas y compactas, que representarían diferentes estados de su evolución; sin embargo, dicha clasificación podría englobarse en dos tipos principales: placas difusas y placas de núcleo denso. Las placas difusas son depósitos $A\beta$ -inmunoreactivos que no alteran el neuropilo ni inducen respuesta glial a su alrededor, por lo que son consideradas benignas; de hecho, son a menudo observadas en la corteza de personas de edad avanzada sin evidencias de declive cognitivo (Arriagada, Marzloff et al. 1992). Las placas de núcleo denso, por su parte, presentan un núcleo compacto positivo para tinciones específicas de péptidos con conformación en hoja plegada β , como son la tinción rojo congo o la tioflavina-S. Además, puesto que generalmente se encuentran rodeadas de neuritas distróficas (placas neuríticas), astrocitos reactivos y microglía activa, estas placas de núcleo denso son consideradas tóxicas y más específicas de la enfermedad de Alzheimer (Mirra, Heyman et al. 1991).

Los NFTs, son depósitos intraneuronales de la proteína asociada a microtúbulos Tau. Dichos depósitos aparecen cuando esta proteína es plegada de manera aberrante y es hiperfosforilada de forma anormal. En la EA los agregados de Tau forman parejas de filamentos helicoidales con conformación de hoja β , por lo que los NFTs también son positivos para la tinción tioflavina-S. Conforme la enfermedad avanza, muchas de las neuronas que presentan ovillos mueren, dejando dichos ovillos en la matriz extracelular. Numerosos estudios clínico-patológicos en los años 90 demostraron que la cantidad de NFTs, la pérdida de neuronas y, particularmente, la pérdida sináptica correlacionan fuertemente con la severidad del deterioro cognitivo. En estos mismo estudios se mostraba que la carga amiloide no correlaciona con el grado de deterioro cognitivo o la duración de la enfermedad (Arriagada, Growdon et al. 1992, Ingelsson, Fukumoto et al. 2004). De hecho, como se menciona anteriormente, las placas amiloides son relativamente comunes en personas sanas de edad avanzada (Arriagada, Marzloff et al. 1992). Aunque el diagnóstico patológico de la EA se ha basado durante mucho tiempo en la presencia de placas y NFTs en un número y distribución suficientes en la corteza cerebral de pacientes con historial clínico de demencia (Braak and Braak 1991, Mirra, Heyman et al. 1991); NIA-Reagan Consensus, 1997), la visión actual es que la enfermedad de Alzheimer se corresponde con un espectro patológico continuo entre envejecimiento "normal" y demencia y, como tal, los criterios de diagnóstico de la patología se han revisado recientemente para considerar también estados pre-sintomáticos (Montine, Phelps et al. 2012).

Fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer

A pesar de la ausencia de correlación entre la carga amiloide y la severidad del déficit cognitivo, la hipótesis más aceptada da al péptido $A\beta$ un papel central en la fisiopatología de la enfermedad. De acuerdo con esta hipótesis, el péptido $A\beta$ es el disparador de una cascada de eventos adversos que incluyen la disfunción sináptica, la inflamación y el estrés oxidativo mediado por la glía, la hiperfosforilación y agregación de Tau en NFTs y, finalmente, la pérdida neuronal y la demencia, por eso el nombre de "hipótesis de la cascada amiloide". La principal contribución de esta hipótesis ha sido poner las placas amiloides y los NFTs en un orden secuencial, atribuyendo al péptido $A\beta$ un efecto iniciador y considerando la patología de Tau como secundaria a la agregación del $A\beta$ (Hardy and Higgins 1992). Aunque la gran mayoría de casos de

Alzheimer son esporádicos, las bases de la hipótesis de la cascada amiloide recaen ampliamente en la genética. En este sentido se ha descubierto que los genes que causan los raros casos de Alzheimer familiar son genes que codifican para la APP (proteína precursora del amiloide) o para las enzimas involucradas en la generación del péptido A β (presenilina 1 y 2, subunidades del complejo γ -secretasa y conocidas como PSEN1 y PSEN2 respectivamente). Mutaciones en los genes que codifican estas tres proteínas dan lugar a una forma precoz de Alzheimer que es clínica y patológicamente similar a las formas esporádicas de aparición tardía. Para los casos esporádicos, el mayor factor de riesgo genético es la presencia del alelo $\epsilon 4$ en el gen de la *apolipoproteína E* (*APOE*). Dicho alelo ha sido asociado con elevados niveles de A β bien promoviendo su agregación, bien reduciendo su eliminación del parénquima cerebral (Castellano, Kim et al. 2011). En la última versión de la hipótesis de la cascada amiloide no se hace referencia a la ausencia de correlación entre la carga de placas y el deterioro cognitivo, enfatizando que la EA es una “enfermedad sináptica” y que son los oligómeros solubles de A β (más que las fibrillas de A β de las placas) las especies con efecto tóxico sobre las sinapsis (Hardy and Selkoe 2002). De hecho, se ha demostrado que los niveles de A β soluble en la corteza correlacionan con la severidad de la demencia (McLean, Cherny et al. 1999) y tanto experimentos *in vitro* como en modelos animales indican que los oligómeros de A β soluble causan disfunción y pérdida de sinapsis (Cleary, Walsh et al. 2005, Koffie, Meyer-Luehmann et al. 2009, Li, Hong et al. 2009) y pueden inducir hiperfosforilación y agregación de Tau en neuronas (Zempel, Thies et al. 2010, Jin, Shepardson et al. 2011, Chabrier, Blurton-Jones et al. 2012). Sin embargo, se han descrito una gran variedad de especies de A β oligomérico con diferentes propiedades físico-químicas (conformación terciaria, peso molecular, solubilidad en SDS, etc.) tanto *in vitro* como *in vivo* desde que la hipótesis fue reformulada. Cuáles de ellas están presentes *in vivo*, así como cuales son más tóxicas y deletéreas, sigue siendo aún tema de controversia [revisión en: (Benilova, Karran et al. 2012)].

Aunque la hipótesis de la cascada amiloide ha sido ampliamente aceptada por la mayoría de los científicos como su marco de investigación en las dos últimas décadas, numerosas críticas y preguntas han ido surgiendo al modelo en los últimos años, debido principalmente a los resultados contradictorios y a los fallos en los ensayos clínicos dirigidos contra el A β . Puesto que se ha considerado al péptido A β como el iniciador de la cascada patogénica que da lugar a la EA, la mayoría de los esfuerzos se han centrado

en el desarrollo de terapias efectivas contra el A β en los pacientes, incluyendo inhibidores y moduladores de las enzimas β y γ -secretasas, anti-A β agregantes (tramiprosate por ejemplo) y, particularmente, inmunización anti-A β . Sin embargo, ninguno de los ensayos clínicos realizados usando estas aproximaciones ha tenido un impacto importante en la tasa de deterioro cognitivo de los pacientes incluidos en los estudios (revisado en: (Haas 2012).

El uso de fármacos con supuestas acciones reductoras de A β y anti-inflamatorias, tales como fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAIDs) y estatinas, tampoco han mostrado funcionar en ensayos clínicos con pacientes con deterioro cognitivo leve (MCI) y pacientes con Alzheimer de leve a moderado, a pesar de los numerosos estudios epidemiológicos previos que indicaban una reducción sustancial del riesgo de desarrollo de EA en la población general (revisado en: (McGuinness, O'Hare et al. 2010, Jaturapatporn, Isaac et al. 2012). Aunque algunos de estos fallos podrían ser explicados por cuestiones farmacocinéticas o farmacodinámicas (como por ejemplo la insuficiente penetración del fármaco en el cerebro, dosis insuficiente o efectos secundarios) y, especialmente, por la elección de pacientes de EA en un estado avanzado de la enfermedad (Selkoe 2011), algunos autores han propuesto una revisión de la hipótesis de la cascada amiloide. Es por esto que se ha propuesto un nuevo modelo de “doble vía” en el cual el A β y Tau tienen sus propias cascadas patogénicas paralelas, pudiendo estar unidas compartiendo el mismo disparador y también por algunas moléculas diana de las cascadas. El alelo $\epsilon 4$ de la APOE y la quinasa 3 de la glucógeno sintasa (GSK3) han sido descritos como moléculas compartidas por ambas cascadas (Small and Duff 2008). Se ha propuesto también un modelo menos drástico de la cascada amiloide que consiste en la diferenciación de dos estados: un primer estado en el cual el A β inicia diversas cascadas patogénicas que incluyen estrés oxidativo, respuesta glial y hiperfosforilación y agregación de Tau, y un segundo estado en el cual estos procesos inicialmente disparados y dependientes del A β dan lugar a una pérdida sináptica y neuronal progresiva de forma independiente al A β (Hyman 2011).

Enfermedad de Alzheimer e hipoxia

Como ya se explicó anteriormente, existe una concomitancia entre la EA y las patologías vasculares; de hecho tanto en los casos familiares como esporádicos, aparte de las mutaciones descritas en los casos de Alzheimer familiar o genético, entre los

mayores factores de riesgo de desarrollar la enfermedad se encuentran la arterosclerosis, la diabetes o el ictus. La incidencia de EA y demencia vascular se incrementa enormemente tras isquemia cerebral e ictus, procesos en los que se genera un ambiente hipóxico en la región cerebral afectada. Concretamente, el ictus cerebral aumenta la prevalencia de EA en dos veces entre pacientes de edad avanzada (Altieri, Di Piero et al. 2004) siendo el riesgo muchísimo mayor cuando el ictus es concomitante con condiciones patológicas como la arterioesclerosis (Honig, Kukull et al. 2005). La hipoxia es una consecuencia directa de la hipoperfusión y de la apnea del sueño, y tiene un efecto inmediato sobre la actividad enzimática, provocando a largo plazo cambios relevantes en la expresión génica y en la síntesis de proteínas. Diversos estudios han sugerido que la hipoxia tiene efectos directos en la acumulación del A β , en la hiperfosforilación de Tau, en la disfunción de la barrera hematoencefálica y en la degeneración de neuronas.

Según algunos estudios, bajo condiciones de hipoxia intermitente y/o asfixia aumenta la producción de A β mediante el incremento de los niveles de las enzimas β y γ -secretasas (Sun, He et al. 2006, Loane, Pocivavsek et al. 2009). Así mismo, Zhou y colaboradores mostraron que en hipoxia se produce la alteración del sistema de autofagia-lisosoma en la proteólisis de la proteína APOE, alterando la normal degradación de la APOE4 y, por tanto, facilitando la acumulación del A β mediante la formación de complejos de ambas proteínas que impiden la normal eliminación del péptido amiloide del cerebro (Zhou, Scott et al. 2006). En estudios similares también se ha descrito que una lesión hipóxica transitoria puede dar lugar a disfunción mitocondrial, daño en el ADN, producción de ROS e hiperfosforilación de Tau, estando todos estos procesos relacionados con la activación de la GSK3 y de la quinasa dependiente de ciclina 5 (CDK-5) por la hipoxia (Chen, Xu et al. 2003), todos estos cambios provocan la apoptosis de neuronas y por tanto una agravación de la patología de la EA.

Como se indicó anteriormente, estos estudios se han basado en modelos de hipoxia intermitente e incluso de asfixia. No obstante, debido a la importancia clínica de la hipoxia sostenida, nuestro grupo ha llevado a cabo un estudio basado en el análisis del efecto de 16 horas o 30 días de hipoxia sobre el procesamiento del A β . Para este estudio se utilizaron dos grupos de animales, uno sometido a 21% de oxígeno (normoxia) y otro a 8,5% de oxígeno (hipoxia). En análisis del mRNA de estos animales no mostró en

ningún caso un cambio significativo en la expresión de las enzimas relacionadas con el procesamiento del péptido A β (Figura 3).

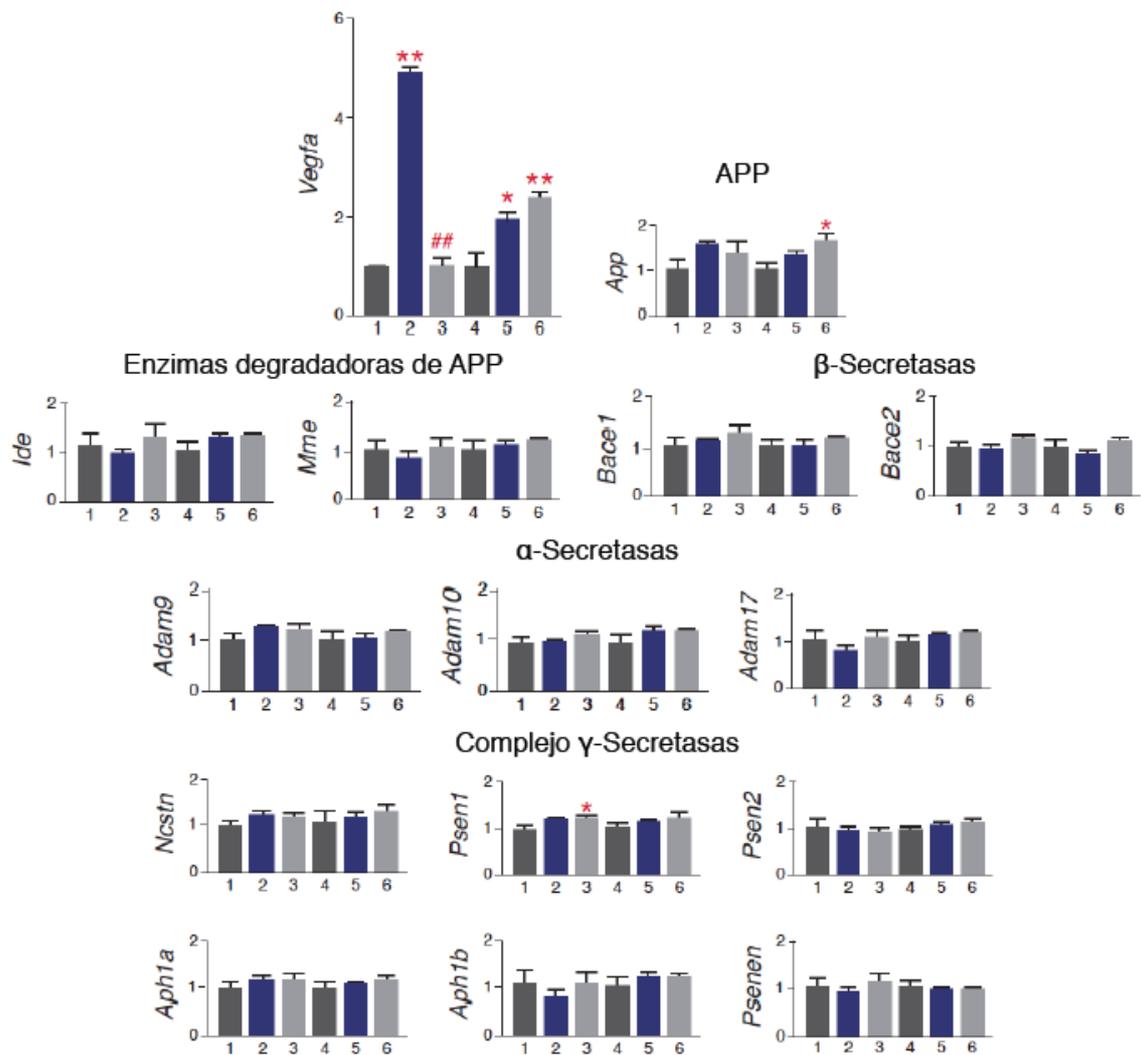


Figura 3. La hipoxia no modifica la expresión de enzimas relacionadas con el A β . En esta imagen se muestran los niveles relativos de mRNA para APP y diversas enzimas involucradas en la síntesis o degradación del péptido A β . El gen Vegfa como control de inducción por hipoxia. Los grupos son los siguientes: 1 Normoxia, 16 horas; 2 Hipoxia, 16 horas; 3 Hipoxia, 16 horas, seguido de reoxigenación, 24 horas; 4 Normoxia, 30 días; 5 Hipoxia, 30 días; 6 Hipoxia, 30 días, seguido de reoxigenación, 24 horas. Como control endógeno se analizaron los niveles de mRNA del gen 18S (n=4). Los asteriscos representan diferencias significativas respecto a la normoxia (21% de O₂, barras gris oscuro). * p < 0.05; ** p < 0.01 (mediante ANOVA usando el test de Tukey). Las almohadillas representan diferencias significativas con la hipoxia (9% O₂, barras azules). ## p < 0.01 (mediante ANOVA usando prueba de Tukey). El grupo de hipoxia-reoxigenación está representado en las barras gris claro.

Papel de la glía en la enfermedad de Alzheimer.

Aparte de las placas amiloides y los NFTs, otra lesión muy prominente presente en el cerebro de pacientes con EA (y sin embargo descuidada durante muchos años) es la

respuesta glial mediada por astrocitos reactivos y microglía activada. El papel de las células gliales en la EA es controvertido, quizás porque sus efectos son duales, inicialmente beneficiosos pero finalmente deletéreos (Wyss-Coray 2006, Lucin and Wyss-Coray 2009). En el caso de la microglía, se han descritos papeles opuestos en el desarrollo de la EA incluyendo la eliminación de A β por fagocitosis y liberación de moléculas pro-inflamatorias. Recientemente, la asociación de genes que codifican proteínas involucradas en la inmunidad innata con la EA ha reforzado la idea de que la inmunidad puede tener una alta contribución a esta enfermedad (Jones, Holmans et al. 2010, Lambert, Grenier-Boley et al. 2010, Golde, Streit et al. 2013). Además, se ha descrito que genes involucrados en la inmunidad innata están sobrerrepresentados entre los loci asociados con el Alzheimer (Lambert, Grenier-Boley et al. 2010).

En la corteza cerebral de los pacientes de EA, tanto los astrocitos reactivos como la microglía activada tienden a agruparse en y alrededor de las placas amiloides de núcleo denso, sugiriendo que el A β provoca el reclutamiento y activación de la glía e inicia una cascada inflamatoria (LaFerla 2010). Estudios de asociación y funcionales publicados recientemente han sugerido que dos genes expresados en microglía, *TREM2* y *CD33*, podrían contribuir a la patología provocando un descenso de la fagocitosis de A β en portadores de alelos de riesgo (Golde, Streit et al. 2013, Griciuc, Serrano-Pozo et al. 2013). En el caso de los astrocitos, aunque son efectivos en la formación de una cicatriz alrededor de las placas previniendo su crecimiento, su reclutamiento por las placas amiloides puede comprometer su función de modulación de la actividad sináptica y de proveedor de factores tróficos a neuronas en áreas distantes de las placas. Sorprendentemente, la progresión de las respuestas astrocítica y microglial a lo largo de la enfermedad y con respecto al resto de características neuropatológicas de la enfermedad no ha sido descrita con detalle en la literatura, a pesar del hecho de que cualquier dato puede arrojar luz sobre su papel en la enfermedad y tener tanto implicaciones de diagnóstico (como el desarrollo de biomarcadores de diagnóstico y de la progresión) como terapéuticas (desarrollo de fármacos anti-inflamatorios).

A pesar del papel propuesto para la microglía como un posible contribuidor en la progresión de la enfermedad de Alzheimer, de la asociación entre las enfermedades vasculares y esta enfermedad, y de la importancia de la hipoxia en la regulación de las células mieloides y por tanto del proceso inflamatorio, ningún estudio ha analizado

hasta ahora como la hipoxia puede afectar a la microglía en un modelo animal de Alzheimer y que efecto puede tener esto sobre el desarrollo de la enfermedad.

Objetivos

Los objetivos de esta tesis son los siguientes

- Estudiar la respuesta de la microglía a la hipoxia *in vitro* y analizar el efecto sobre sus funciones, así como conocer los mecanismos moleculares que subyacen a dicha respuesta.
- Estudiar la respuesta de la microglía a la hipoxia *in vivo* y analizar el efecto sobre sus funciones.
- Analizar el efecto de la hipoxia crónica sobre la microglía en un modelo de enfermedad de Alzheimer y si este tiene un efecto sobre el desarrollo de la patología.

Metodología

1. Modelos experimentales

1.1. Líneas celulares

1.1.1. BV2

La línea microglial transformada (v-raf/v-mic) se obtuvo a partir del Interlab Cell Line Collection (National Institute for Cancer Research and Advanced Biotechnology Center, Génova, Italia). Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 (PAA) suplementado con FBS 10% (Gibco), L-glutamina 2 mM (Gibco) y penicilina/estreptomicina 1% (Gibco). Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera saturada de agua al 5% de CO₂ y 95% de aire. Para los subcultivos las células se tripsinizaron con tripsina-EDTA 0.25% (Gibco). En todos los experimentos las células se mantuvieron entre un 30-50% de confluencia para prevenir la activación de la microglía y el desarrollo de condiciones anaeróbicas al 1% de O₂.

1.1.2. Línea celular HeLa

La línea celular humana de cáncer cervical (HeLa) se obtuvo del National Centre for Cell Science, Pune, y se cultivaron en medio “Dulbecco’s Modified Eagle Medium”, alto en glucosa (4500 mg/l) (DMEM-High Glucose, Gibco) suplementado con FBS 10%, L-glutamina 2 mM y penicilina/estreptomicina 1%. Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera saturada de agua al 5% de CO₂ y 95% de aire. Para los subcultivos las células se tripsinizaron con tripsina-EDTA 0.25% (Gibco).

1.1.3. Congelación de las líneas celulares

La congelación de células para almacenamiento en N₂-líquido, precisó que la población no fuese mayor del 50% de confluencia en el caso de las BV2 y evitar así la diferenciación de estas células. En el caso de la línea HeLa, las células se congelaron a una confluencia lata, asegurando de este modo una alta tasa de supervivencia en el momento de cultivarlas nuevamente. Así, tras retirar el medio de incubación, se realizó una tripsinización con tripsina-EDTA 0.25% durante 5 minutos, bloqueamos la tripsinización con medio completo y

centrifugamos a 500 g durante 5 minutos. El pellet celular se resuspendió en 1 mL de FBS en el caso de las BV2 y de medio en el caso de las HeLa, ambos con dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma) al 10%, y se traspasaron a un criovial estéril (Sarstedt). Este compuesto actuó como un agente lipofílico que facilitó la congelación posterior. De forma inmediata, se dispuso el vial en una caja de congelación (Nalgene) y se mantuvo durante un tiempo mínimo de 24 horas a una temperatura de -80°C, tras lo cual se almacenaron las muestras en N₂-líquido indefinidamente. La utilización de esos contenedores de congelación permitió un enfriamiento paulatino de las células, preservando así la integridad de la membrana plasmática.

1.2. Cultivos primarios.

1.2.1. Microglía

Para la obtención de cultivos primarios de microglía se usó el protocolo descrito por Saura y colaboradores en 2003 con algunas modificaciones (Saura, Tusell et al. 2003). Con este método se obtienen cultivos mixtos de astrocitos y microglía. Debemos hacer hincapié en el hecho de que este tipo de cultivos, en cuanto a su relevancia para estudiar propiedades de la microglía es restrictivo y sigue siendo tema de debate (Saura 2007).

Los cultivos mixtos astro-microgliales se prepararon a partir de ratones C57BL/6 (1-3 días de vida, Jackson Laboratory). Los animales fueron decapitados, y se les retiró el cerebelo (telencéfalo). Tras lo cual, se eliminaron las meninges bajo lupa SZX16 (Olympus) en medio Hybernat-E frío. Las células fueron disociadas mecánicamente con tijeras de microcirugía en tripsina-EDTA 1x en PBS (PAA) seguida de digestión enzimática 7 minutos a 37°C en agitador thermomixer (Thermo) a 900 rpm. El tejido fue homogenizado en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM/F-12 1:1, Gibco) suplementado con suero FBS al 10%, inactivando la tripsina, y filtrado por malla de nylon de 40 µm de poro (BD) para eliminar restos.

Para la obtención de los cultivos mixtos ricos en microglía las células se sembraron en una concentración de $2,5 \cdot 10^5$ células por cm² en medio DMEM-

F12 suplementado con FBS, penicilina/estreptomicina al 1%, L-glutamina 5 mM, aminoácidos no esenciales 1% y gentamicina 1%. Todos los reactivos usados en la preparación de este medio fueron obtenidos de la casa Gibco. El cultivo se mantuvo durante 20 días cambiando el medio cada 3-4 días. Tras esto se llevó a cabo el aislamiento de la población microglial mediante tripsinización suave. Para ello se retiró el medio condicionado por las células del cultivo mixto, que guardamos para su posterior uso, se lavaron las células con medio sin aditivos y se añadió tripsina-EDTA 0.25% diluida en proporción 1:3 en medio sin aditivos. Tras 30-45 minutos la monocapa de células no microgliales en suspensión se retira, obteniendo así cultivos prácticamente puros de microglía.

1.2.2. Astrocitos

Los cultivos de astrocitos fueron obtenidos utilizando el mismo protocolo que para obtener los cultivos mixtos en el cultivo microglía pero sembrando a una concentración de 15×10^3 células por cm^2 y manteniendo el cultivo durante una semana sin cambiar el medio. No es necesario realizar aislamiento alguno.

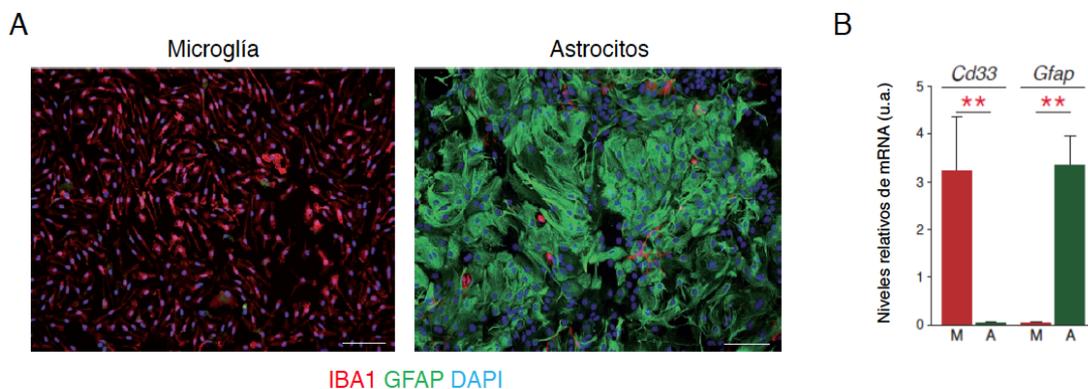


Figura 4. Cultivos primarios de microglía y astrocitos. A, Inmunocitoquímica de cultivos primarios de microglía (panel izquierdo) y de astrocitos (panel derecho) usando anticuerpos frente a IBA1 (rojo), GFAP (verde), y DAPI (azul). La barra de escala es de 100 μm . B, Niveles relativos de expresión del marcador de microglía (Cd33) y de astrocitos (Gfap) estimados por qRT-PCR (u.a. unidades arbitrarias) en los cultivos de microglía (M) y de astrocitos (A). Como control endógeno se utilizaron los niveles del gen *Hmbs* (porfobilinógeno deaminasa o hidroximetilbilano sintasa). (n = 3 –4). ** $p < 0.01$ (mediante Prueba T de Student).

En ambos tipos de cultivos se realizó un análisis de la pureza mediante inmunocitoquímica. Como marcador de microglía se utilizó la proteína IBA1

(*Ionized calcium-binding adapter molecule 1*), que se expresa específicamente en microglía y macrófagos (Ito, Imai et al. 1998), y GFAP como marcador de astrocitos (*Glial fibrillary acidic protein*), proteína expresada en el sistema nervioso central por los astrocitos (Jacque, Vinner et al. 1978) (Figura 4a). Para confirmar la pureza de los cultivos, se realizó un análisis mediante RT-qPCR del mRNA extraído de los cultivos frente a marcadores específicos de cada tipo celular, utilizando *Cd33* como marcador microglial (Griciuc, Serrano-Pozo et al. 2013) y *Gfap* como marcador de astrocitos (Figura 4b).

1.3. Animales

1.3.1. Alojamiento y manipulación

Los animales procedentes de otros laboratorios, así como los generados de manera propia, se mantuvieron en el CPYEA (*Centro de Producción y Estabulación de Animales*), donde se alojaron en locales cerrados con unas condiciones ambientales controladas, conservando una temperatura constante de 22°C (± 2) y una humedad relativa óptima. Se dispuso además de un sistema de iluminación que modulaba un ciclo de luz-oscuridad de doce horas (8 am–8 pm). La experimentación se realizó en base a la Directiva 86/609/CEE de la Unión Europea del Consejo, de 24 de noviembre de 1986, relativa a las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, mediante Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre (BOE núm. 252). El comité ético para la investigación en animales del Hospital Universitario Virgen del Rocío aprobó todos los procedimientos.

1.3.2. Animales transgénicos

1.3.2.1. *PHD1*

Esta línea de ratón presenta un alelo nulo para *PHD1* obtenido mediante la introducción de un cassette de resistencia a neomicina reemplazando los exones 2 y 3 del gen (Aragones, Schneider et al. 2008). Los ratones homocigotos KO se obtuvieron mediante cruce de parentales heterocigotos.

1.3.2.2. *PHD2*

Esta línea de ratón presenta un alelo nulo para PHD2 obtenido mediante la introducción de un cassette de resistencia a neomicina reemplazando el exón 2 de este gen (Mazzone, Dettori et al. 2009). En este caso se utilizaron para los experimentos como ratones mutantes los heterocigotos, ya que la homocigosis del alelo nulo resulta letal durante el desarrollo embrionario.

1.3.2.3. *PHD3*

Este ratón presenta un alelo nulo para PHD3 obtenido mediante la introducción de un cassette de resistencia a neomicina en el exón 1 del gen (Bishop, Gallagher et al. 2008). Los ratones homocigotos KO se obtuvieron mediante cruce de parentales heterocigotos.

Estas tres líneas se obtuvieron gracias a la colaboración con el grupo del Dr. Sir Peter Ratcliffe de la Universidad de Oxford.

1.3.2.4. *Modelo de Alzheimer*

Para estudiar el efecto de la hipoxia sobre la enfermedad de Alzheimer se utilizaron ratones transgénicos APP/PS1. Los animales se obtuvieron de los laboratorios Jackson (Strain name: B6.Cg-Tg(APP^{swe}, PSEN1^{dE9})85Dbo/J, stock number 005864). Este ratón contiene dos mutaciones humanas en dos genes que codifican para proteínas clave en el desarrollo de la enfermedad. Por un lado expresan una proteína precursora del amiloide quimérica entre la de humano y ratón (mo/huAPP) que contiene la mutación K595N/M596L (Haass, Lemere et al. 1995), descrita en una familia sueca con Alzheimer familiar. Esta mutación consiste en un cambio de la lisina en posición 595 por asparragina y de una metionina por leucina en la posición 596, precediendo ambas posiciones al fragmento de A β . El uso de una forma quimérica entre la humana y la de ratón se debe a que en éste último no se ha observado el desarrollo de ninguna enfermedad similar a la de Alzheimer aparentemente debido al hecho de que las proteínas homólogas a la APP humana, APLP1 y APLP 2 tienen propiedades diferentes.

Por otro lado, estos ratones presentan la mutación PSEN1dE9, consistente en una delección en el exón 9 del gen presenilina 1 (*Psen1*), enzima principal del complejo γ -secretasa. Estudios previos demostraron que esta mutación provoca un incremento del fragmento A β 1-42 a partir de la APP (Jankowsky, Fadale et al. 2004). Modelos transgénicos que combinan ambas mutaciones presentan deposición amiloidea temprana por lo que se consideran aceptables como modelos para la enfermedad de Alzheimer (Borchelt, Ratovitski et al. 1997, Savonenko, Xu et al. 2005). Ambas proteínas están bajo el control de expresión del promotor de la proteína del prion (PRNP) por lo que limita su expresión al sistema nervioso central (CNS). En este modelo de Alzheimer los depósitos de amiloide aparecen a las 6 meses, así como varias patologías relacionadas con el Alzheimer (Garcia-Alloza, Robbins et al. 2006, Yan, Bero et al. 2009).

Las camadas control para el modelo APP/PS1 se obtuvieron mediante el cruce de estos con ratones C56/B6J. Los grupos experimentales fueron homogéneos en composición de sexos.

1.3.3. Genotipado de los animales

1.3.3.1. Extracción de DNA genómico

La caracterización genética de los ratones se realizó a partir del DNA genómico extraído de los deditos que se les cortaban a las crías para diferenciarlas entre sí. Esta tarea la realizaba el personal técnico del CPYEA cuando los animales alcanzaban el décimo día de vida. Hasta el momento de su utilización, las muestras se almacenaron congeladas a -20°C.

Para la extracción del DNA genómico, se añadió a cada una de ellas un volumen de 200 μ L del tampón Direct PCR (Tail) (Qiagen) junto con 45 μ g de proteinasa K (Roche), y se incubaron a 55°C durante dos horas y quince minutos, 800 rpm, utilizando para ello un termoagitador (Eppendorf). A continuación, los lisados obtenidos se mantuvieron a 85°C durante cuarenta y cinco minutos, con el fin de inactivar la enzima, después de lo cual se centrifugaron tres minutos a velocidad máxima (16100 g, Eppendorf) para

eliminar los restos de tejido o pelo del animal, que quedaron acumulados en el fondo del tubo.

1.3.3.2. *Reacción en cadena de la polimerasa convencional*

Esta técnica, basada en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, se empleó en este estudio para el genotipado de los diferentes animales. Las temperaturas necesarias para la desnaturalización del DNA que actuó como molde, y para el alineamiento y extensión de los cebadores, fueron variables para cada caso, aunque en todos ellos se utilizaron los reactivos de la casa comercial Bioline (10x PCR Buffer, 25 mM MgCl₂ y dNTPs 100 mM) y una Taq polimerasa termoestable (derivada de la bacteria *Thermus aquaticus*) procedente de la misma casa. Los oligonucleótidos utilizados en la amplificación de cada gen se muestran en la Tabla 1. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en tubos estériles de 0,2 mL (Axygen), utilizando termocicladores de la casa comercial Biometra.

Oligonucleótidos para <i>Syber green</i>		
Animal	Forward	Reverse
PHD1 silvestre	GAAGGAGGACAAAGGTCTCTTGG	GGGCCACAGTCAGCTAAAG
PHD1 mutante	CCTATATTCACGGGACAGATCCTG	AGAGGCCACTTGTGTAGCGC
PHD2 silvestre	TTGCAGTGTGCAACAGTCAG	CACGGGAACTCTGATTCAT
PHD2 mutante	TTGCAGTGTGCAACAGTCAG	CCAAAATCACCAATCTAGAATAACTTC
PHD3 silvestre	GAGCACCTTATAAAAAGCAAGTGA	TGCAGAAACACCCCAGATGA
PHD3 mutante	GGAAAAGCGCCTCCCCTA	GGTTATTTAGTGCAGAAACACCCC
APP/PS1	CTTGTAAGTTGGATTCTCTATATCCG	GACTGACCACTCGACCAGGTTCTG

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en el genotipado de las diferentes líneas de ratón.

1.3.3.3. *Electroforesis en gel de agarosa*

Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1-2%. Como buffer de electroforesis se utilizó TBE 1x [Tris Base 89 mM, ácido bórico 89 mM, 2 mM EDTA pH 8 (todos de la casa Sigma)] en H₂O destilada (H₂O_d). El gel se dejó correr 90 voltios durante 30 minutos

aproximadamente y fue teñido con Midori (Nippon Genetics), para su posterior observación en transiluminador.

1.4. Muestras de cerebro humano

Las muestras de tejido humano fueron amablemente donadas por el Dr. Alberto Rábano Gutiérrez Arroyo, director del *Banco de Tejido para la Investigación Neurológica* (BTIN) de Madrid, y al Dr. Isidre Ferrer del Instituto de Neuropatología, coordinador del *Banco de Tejidos Neurológicos del Servicio de Anatomía Patológica IDIBELL-Hospital Universitario de Bellvitge*, Barcelona. Se usaron 26 cerebros post-mortem: 4 controles jóvenes (edad promedio 45.25 ± 5.4 años; tiempo promedio post-mortem: 8.25 ± 4.6 horas), 5 ADII (edad promedio 80.8 ± 4.9 años; tiempo promedio post-mortem: 8.2 ± 6.3 horas); 6 ADIII-IV (edad promedio 74.3 ± 13 años; tiempo promedio post-mortem: 6 ± 5.9 horas), y 11 ADV-VI (edad promedio 80.7 ± 10.6 años; tiempo promedio post-mortem: 10.8 ± 5 horas). Todo el material se extrajo de la misma zona del hipocampo y fue rápidamente congelado tras su obtención. Todos los casos de Alzheimer fueron macheados por edad, sexo y tiempo post-mortem (PMT). Los datos se presentan como media \pm desviación estándar.

2. Tratamientos

2.1. Hipoxia

2.1.1. In vitro

En todos los experimentos se hicieron dos grupos, células en condiciones de hipoxia (1% O₂, 5% CO₂) y sus controles en normoxia (condiciones atmosféricas normales). La exposición a hipoxia fue posible mediante el uso de un incubador con capacidad de control de la concentración de oxígeno, variable y ajustada con un mezclador de gases (cámara de hipoxia invivo2 300, RUSKIN). Los tiempos de exposición variaron según los diferentes experimentos.

2.1.2. *In vivo*

Los ratones fueron expuestos a normoxia (20 % de O₂) o hipoxia (9 % de O₂). Los tratamientos se hicieron durante 20 días consecutivos a las edades de 8 meses, edad a la que ya es visible la deposición de amiloide, y 14 meses, cuando ya se observa daño neuronal e inflamación en los cerebros de los ratones (Murphy, Beckett et al. 2007). La exposición de los cuatro grupos se llevó a cabo en una cámara de oxígeno variable modificada para tal efecto (Coy Laboratory Products). Las condiciones atmosféricas se mantuvieron estables y fueron monitorizadas automáticamente ante cambios (gas guard, Thermo Electron Corp.), en cuyo caso el sistema reestablecía las condiciones experimentales (controlador de oxígeno, Coy Laboratory Products). A pesar de ello, la concentración de oxígeno fue comprobada cada dos días de forma manual usando un medidor electrónico, dándose por aceptables diferencias menores al 0.5% respecto al porcentaje establecido. 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), diseñado especialmente como parte de la cámara. Todas las partes del sistema y los reactivos se reemplazaron según su estado funcional. El acceso a la cámara para la alimentación y limpieza se llevó a cabo a través de una precámara sellada que permitía la introducción de material sin modificar las condiciones de la cámara. Los ciclos de luz, alimentación y limpieza se mantuvieron uniformes para todos los grupos. Todos los tratamientos se realizaron de acuerdo con las instrucciones del Comité Ético del Hospital Universitario Virgen del Rocío de acuerdo con la Normativa de la Unión Europea.

2.2. *DMOG*

La dimetiloxalilglicina (DMOG) es un compuesto utilizado como mimético químico de la hipoxia al producir la inhibición de las prolin-hidroxilasas y dar lugar a la estabilización de HIF1 α en normoxia (Jaakkola, Mole et al. 2001). Los tratamientos con DMOG (Frontier Scientific) se realizaron tanto en la línea BV2 como en cultivos primarios. El DMOG se utilizó a 1mM en el caso de la línea celular, tal como está descrito en la literatura (Jaakkola, Mole et al. 2001) y 100 μ M en los

cultivos primarios, partiendo en ambos casos de un stock a 1 M en DMSO. El uso de una concentración menor para los cultivos primarios se realizó debido a la alta toxicidad que el DMOG mostró tener sobre estas células a la concentración de uso habitual. Que esto sea consecuencia de la estabilización de HIF o un efecto directo del DMOG sobre el metabolismo de las células está siendo objeto de análisis por parte de nuestro grupo. Los tiempos de exposición variaron según los diferentes experimentos. Como control, en todos los experimentos se utilizaron cultivos a los que se añadió el mismo volumen de DMSO que el añadido de DMOG.

2.3. *M-CSF* y *GM-CSF*

Ambas citoquinas (PeproTech) están descritas como moléculas que producen en la microglía efectos antagónicos, siendo tanto el M-CSF como el GM-CSF responsables en la polarización de macrófagos a fenotipos anti y pro-inflamatorio respectivamente *in vitro* (Fischer, Bielinsky et al. 1993, Re, Belyanskaya et al. 2002). Para obtener poblaciones de microglía en ambos estados, los cultivos primarios fueron llevados a cabo en presencia de ambas citoquinas. Las concentraciones de uso del M-CSF y del GM-CSF fueron de 5 ng/mL y 10 ng/mL respectivamente. Tras el tratamiento crónico de los cultivos con ambas citoquinas caracterizamos los fenotipos de ambos cultivos mediante el análisis por RT-qPCR de diferentes marcadores microgliales, entre ellos *Il-1 β* , *Tnfa* como marcadores de M1 (fenotipo pro-inflamatorio) y *Arg1*(arginasa 1) y *Ym1*(como marcadores de M2 (fenotipo de activación alternativo) (Cherry, Olschowka et al. 2014).

2.4. *BrdU*

La bromodeoxiuridina (BrdU, Sigma) es un análogo de la timidina que se incorpora al ADN de células en proliferación y que puede detectarse mediante técnicas de inmunocitoquímica. El uso de este compuesto en cultivos primarios puede utilizarse para calcular la tasa proliferativa de las células *in vitro*. La concentración de uso y la duración del tratamiento varía según el tipo celular. El ensayo realizado en cultivos primarios de microglía consistió en su adición a los cultivos a una concentración final de 10 μ M durante las 3 últimas horas del tratamiento normóxico, hipóxico o en presencia de DMOG, que en el caso de este experimento fue de 24 horas.

3. Preparación de tejidos/Medida del HCT de los animales

Con el objetivo de confirmar que la exposición a hipoxia y normoxia se llevó a cabo correctamente medimos el hematocrito (HCT) de todos los animales. Para ello, en todos los casos, los animales se anestesiaron de manera general e irreversible, con anestesia parenteral. Se utilizó pentobarbital sódico (B. Braun Medical S.A) en suero fisiológico (Fresenius Kabi España S.A) al 0,05% (relación peso/volumen –p/v-) inyectado con aguja hipodérmica de 25G, por vía intraperitoneal, a la dosis recomendada en mg/kg de peso corporal para cada especie (30-40 mg/kg, en el caso de ratón). Como indicadores de anestesia total se tomaron la ausencia de reflejo al dolor en cola y ojo. Los animales fueron entonces fijados a un tablón con agujas y se extrajo sangre para las medidas del hematocrito a partir de la aurícula derecha siguiendo el siguiente procedimiento quirúrgico: tras la desinfectar con Etanol 70% (EtOH, Sigma), se cortó la piel de forma epigástrica, separándola del animal, tras lo que se hizo una incisión horizontal infracostal dejando la cavidad abdominal al aire. Tras esto se diseccionó el diafragma con cuidado de no dañar ni pulmones ni corazón, dejando la caja torácica al aire, seguida de la separación de ésta exponiendo así el corazón. Se realizó una incisión en la aurícula derecha, mientras que el corazón seguía latiendo y se recogió sangre venosa en un capilar. Este fue sellado con plastilina y se centrifugó 5 minutos a 5000 rpm. Para calcular el HCT, la longitud de la parte del capilar con materia sólida se dividió entre la longitud total del capilar (las partes selladas con plastilina se excluyeron del cálculo).

Tras la obtención de la sangre los animales fueron decapitados con una guillotina. La piel fue separada del cráneo tras una incisión por la línea media. Usando una gubia se abrió el cráneo desde el bulbo olfatorio y separando también por la línea media se retiraron los huesos con cuidado alrededor de todo el cerebro. Tras esto se extrajeron los cerebros completos con una espátula y se pusieron en placas de Petri con PBS 1x (Gibco) a 4°C. Bajo la lupa SZX16 (Olympus) el cerebro se separó en dos mitades por la línea media con una cuchilla. El hemisferio izquierdo se diseccionó obteniendo corteza, hipocampo y estriado que se congelaron por separado usando nitrógeno líquido y guardándose posteriormente a -80°C para posteriores análisis moleculares de proteínas y RNA. El tiempo total de cirugía hasta el almacenamiento se llevó a cabo en menos de 10 minutos tras confirmar la muerte del animal.

Para la fijación en parafina el hemisferio derecho se dejó 12 horas a 4°C en paraformaldehído (PFA, Sigma) al 4% en PBS 1x. Tras esto las muestras fueron transferidas a EtOH 70% hasta la inclusión en parafina 9 horas más tarde. Los hemisferios se fijaron usando un protocolo uniforme llevado a cabo automáticamente por un aparato de inclusión (ASP300S, Leica). Los bloques de parafina se guardaron a 4°C hasta su procesamiento completo. La obtención de cortes de 20 µm de grosor se realizó por microtomo (RM2125RT, Leica).

4. Extracción y análisis de mRNA

Se determinaron los niveles de expresión de diferentes genes en los cultivos primarios y en los hipocampos de los animales mediante qRT-PCR. El RNA se extrajo usando el reactivo TRIzol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante, de forma directa en el caso de los cultivos y con un homogenizador (Omni TH) en el caso de los hipocampos. Las muestras de RNA se resuspendieron en H₂O destilada suplementada con dietil pirocarbonato (depc, Sigma) en una proporción volumen/volumen (v/v) de 1:10000 (H₂O-depc), fría y estéril. El RNA (0,5 µg) fue tratado con DNasa libre de RNasa (GE Healthcare) y retrotranscrita a cDNA usando la retrotranscriptasa reversa SuperScriptII (Invitrogen) en un volumen final de 20 µl. La PCR en tiempo real se realizó en un Sistema de detección de secuencias ABI Prism 7500 (Applied-Biosystems) usando Master Mix de expresión génica Syber green o TaqMan (Applied-Biosystems). Los niveles de *18S* y *Hmbs* se utilizaron para normalizar las cantidades de RNA. Los oligonucleótidos o sondas utilizadas para el análisis de la expresión de los diferentes genes se indican en la siguiente tabla (Tabla 2 y 3).

Sondas para qRT-PCR	
Gen	Referencia
<i>Arg-1</i>	Mm00475988_m1
<i>Hmbs</i>	Mm00660262_g1
<i>NpY</i>	Mm00445771_m1
<i>Sms</i>	Mm00436671_m1
<i>Tlr-4</i>	Mm00445273_m1
<i>Tnf-α</i>	Mm00443258_m1
<i>Ym1</i>	Mm00657889_mH
<i>18s</i>	Mm03928990_g1

Tabla 2. Referencias de sondas utilizadas para el análisis por qRT-PCR de la expresión de los distintos genes.

Oligonucleótidos para <i>Syber green</i>		
Gen	Forward	Reverse
<i>Brcal</i>	AGGCTTCCCCAGGTCGAA	ACCTAGGCTGTCCTTCAAGGTG
<i>Ccr2</i>	TTAGACCAGGCCATGCAGGT	GCAGCAGTGTGTCATTCCAAGA
<i>Cd33</i>	GAGGCAGGAAGCGATCACAT	GTGTATGGAACATCCTGGAGTCAC
<i>Cd36</i>	TTGGAACAGAGGATGACAACCTCA	CAGCTGCTACAGCCAGATTTCAG
<i>Gfap</i>	GCCACCAGTAACATGCAAGAGA	TGCAAACCTTAGACCCGATACCACTC
<i>Glut1</i>	GCTCTACGTGGAGCCCTA	CACATCGGCTGTCCCTCGA
<i>Hif1α</i>	AGATGACGGCGACATGGTTT	AGCTCCGCTGTGTGTTTAGT
<i>Hif2α</i>	TAAAGCGGCAGCTGGAGTAT	ACTGGGAGGCATAGCACTGT
<i>Hmbs</i>	CCATACTACCTCCTGGCTTTACTATTG	GGTTTTCCCGTTTGCAGATG
<i>Il-1β</i>	CCTGTGTAATGAAAGACGGCAC	GATCCACACTCTCCAGCTGCA
<i>Igf1</i>	AAGTCCCCGTCCCGTCCCTATCGA	CCTTCTCCTTTGCAGCTTCGT
<i>Mif</i>	GCACAGTACATCGCAGTGCA	CCGCTAAAAGTCATGAGCTGGT
<i>P21</i>	CAGACCAGCCTGACAGATTTCTATC	GCAGAAGACCAATCTGCGCT
<i>Phd1</i>	CGCTGCATCACCTGTATCTATTACC	CACCTTAACATCCCAGTTCTGATTC
<i>Phd2</i>	TGACCGGCGTAACCCTCAT	TGCGTACCTTGTGGCGTATG
<i>Phd3</i>	CAGACCGCAGGAATCCACAT	CATCGAAGTACCAGACAGTCATAGC
<i>Vegf</i>	CGCAAGAAATCCCGGTTTAA	CAAATGCTTTCTCCGCTCTGA

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos utilizadas para el análisis por qRT-PCR de la expresión de los distintos genes.

5. Extracción de proteínas

5.1. Tejido de ratón

El peso húmedo de los hemiserebros se determinó previo a la extracción. La homogenización se realizó manualmente empleando un homogeneizador de tejidos Dounce (Sigma) en un volumen de PBS 1x (Tampón PBS: 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄, todos obtenidos de la casa Sigma, en H₂O destilada (H₂O_d); pH 7,4) 4 veces superior al peso del tejido, suplementado con coctel de inhibidores de proteasas (Sigma, 1:1000) e inhibidores de fosfatasa (Sigma, 1:100). Una alícuota se centrifugó 10 minutos a 2000 g a 4°C y el sobrenadante se guardó a -20°C y se usó posteriormente para análisis por western-blot.

Para la obtención de los extractos solubles los sobrenadantes se centrifugaron primero a 600 g a 4°C para descartar células no lisadas, seguida de otra a 15000 g para retirar grandes orgánulos. Por último los sobrenadantes se sometieron a una última centrifugación a 100000 g a 4°C para descartar proteínas asociadas a

membrana usando una ultracentrífuga Optima-Max (Beckman-Coulter). Las fracciones solubles obtenidas se guardaron a -80°C hasta su uso. Los pellets obtenidos en la ultracentrifugación constituyen los extractos totales, que también se almacenaron para su posterior análisis.

Para la preparación de las muestras para ELISA, en el caso de los extractos totales, los pellets se disolvieron con una solución de guanidina 8,2 M HCl / 50 mM Tris HCl dejando la guanidina a una molaridad final de 5 M, incubando 4 horas a temperatura ambiente con volteos casuales. Tras la incubación las muestras se guardaron a -20°C.

5.2. Cerebros humanos

Las proteínas totales fueron obtenidas de muestras congeladas de tejido de hipocampo humano tras extracción secuencial del RNA y proteínas mediante Tripure™ Isolation Reagent (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los pellets de proteínas se solubilizaron dejando en rotación toda la noche a temperatura ambiente en una solución de SDS 4% (p/v), urea 8 M, Tris-HCl 40 mM, pH 7,4 en agua destilada.

5.3. Cultivos celulares

Las proteínas de los cultivos se obtuvieron tras la lisis y homogenización con TRIzol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los pellets de proteínas se disolvieron en buffer de lisis celular estándar 1 pH 8.5 [30 mM Tris-HCl, 2 M thiourea, 7 M urea, 4% (p/v) CHAPS, todos de la casa Sigma, en H₂O_d] mediante incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos, seguida de centrifugación a máxima velocidad a 4°C para descartar células no lisadas o restos celulares, quedándonos sólo con el sobrenadante que se guardó a -20°C hasta su uso.

6. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas de las muestras se realizó usando el sistema *RCDC protein assay kit* (BIO-RAD) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la curva estándar se utilizó albúmina del suero bovino (BSA, Applichem). Se consideraron aceptables coeficientes de correlación de $R^2 > 0.997$.

7. *ELISA A β 1-42*

El análisis por ELISA de los niveles de A β 1-42 humano en los extractos totales y solubles en los cerebros de los ratones se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen). De manera previa al ELISA, las muestras en guanidina 5 M se diluyeron 1:50 en buffer de reacción BSAT-DPBS (PBS 1X con 5% de BSA y 0.03 % Tween-20) con inhibidores de proteasas (Invitrogen, 1:1000). Tras una centrifugación a 16000 g durante 20 minutos a 4°C, el sobrenadante se retiró cuidadosamente y se mantuvo en hielo hasta su uso. Los extractos solubles se utilizaron directamente. Como muestras para la recta patrón se utilizaron diluciones seriadas de A β 1-42 sintético liofilizado.

8. *Western Blot*

Para la detección y cuantificación de las distintas proteínas se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes, comúnmente conocida como SDS-PAGE (del inglés, SDS-polyacrylamide gel electroforesis) (Sambrook, Fritsch et al. 1989). Se utilizó para ello el sistema Mini-PROTEAN® II Cell (BIO-RAD). La concentración de poliacrilamida (40% Acrylamide/Bis Solution, 29:1, 3.3% C, BIO-RAD) de la parte separadora del gel fue del 8-12%, y la electroforesis se llevó a cabo a 200 V durante 40 minutos aproximadamente en buffer de electroforesis [25 mM Tris-HCl (pH 8.3), 192 mM glicina (Sigma) y 0.1% SDS (BIO-RAD) en H₂O_d] utilizando el sistema Mini-Protean (BIO-RAD).

En todos los casos, se partió de 20 μ g de extracto total de proteína, previamente desnaturizada mediante una incubación de cinco minutos en Buffer de carga [50,0 mM Tris-HCl (pH 6,8), 5 % de glicerol, 0.8 % de SDS, 0,02 % de azul de bromofenol (Amersham) y 0,01 % de beta-mercaptoetanol (Sigma), en H₂O_d], a una temperatura de 95°C. Una vez realizada la separación electroforética de las proteínas, éstas se transfirieron a membranas de polifluoruro de vinilideno (*PVDF Transfer membrane Immobilon-P*, Millipore) previamente activadas con metanol (Merck). Se utilizó un sistema de transferencia semi-seco (Sigma) durante dos horas, en una solución de 149 mM Tris; 1,2 mM glicina y 20% de metanol (v/v), en H₂O_d. El amperaje escogido dependió de la superficie de la membrana, en función del cálculo “cm² x 1,2”. Posteriormente, se procedió al bloqueo de la membrana, que se realizó en PBS 1x

suplementado con Tween-20 (Sigma) al 0,1% (PBTween-20) y leche desnatada en polvo al 5% (p/v) (Central lechera asturiana). Transcurridas dos horas, las membranas se incubaron durante toda la noche a una temperatura de 4°C en solución bloqueante junto con el anticuerpo primario, en cámaras de incubación. A continuación, se lavaron cuatro veces en PBTween-20 durante un total de veinte minutos (cinco minutos/lavado), después de lo cual se incubaron una hora con el anticuerpo secundario en las mismas condiciones que el anterior, pero esta vez a temperatura ambiente. Realizados los cuatro lavados correspondientes con PBTween-20, se procedió al revelado por quimioluminiscencia utilizando el kit Immun-Star™ WesternC™ Chemiluminescence Kit (BIO-RAD) y el lector ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare). La fluorescencia emitida se cuantificó mediante el programa informático ImageQuant, y se correlacionó directamente con la cantidad de proteína marcada.

Los anticuerpo primarios usados fueron anti-HIF1 α (Cayman, 1:100), anti-HIF2 α (Abcam, 1:1000), anti- β -actina (Sigma, 1:5000), anti-APP α (IBL, 1:500), Anti-A β 82e1 (IBL, 1:5,000) y anti-A β 6E10 (Signet, 1:6000). La detección de la señal se realizó usando anticuerpos secundarios anti-rabbit y anti-mouse conjugados con HRP (Sigma, 1:10000 y GE Healthcare, 1:10000 respectivamente).

9. Dot Blot

Las fracciones solubles de los ratones APP/PS1 (1 μ g) se colocaron sobre una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare) y se secaron al aire durante 30 minutos. Tras esto la membrana se incubó toda la noche a 4°C en PBTween 20 con el anticuerpo primario anti-A β fibrilar OC (Millipore, 1:5000). Los lavados, incubación con el anticuerpo secundario y la detección de la señal se llevaron a cabo de igual manera al western blot.

10. Análisis del ciclo celular

Las células de la línea celular BV2 fueron expuestas a normoxia, hipoxia, DMOG 1 mM o reoxigenación (este último caso a 24 horas en hipoxia seguidas de 24 horas en normoxia). Tras los tratamientos, se recogieron 1×10^6 , se centrifugaron a 500 g en frío, se lavaron con PBS 1x, centrifugadas de nuevo y resuspendidas en EtOH 70% frío. Las células se fijaron a 4°C toda la noche, centrifugadas y resuspendidas en 700 μ L de

FACS/EDTA [2 mg/ml BSA, 10 mM HEPES (Sigma), en medio L15 (Gibco) al 88% (v/v), suplementado con 0,1% penicilina/estreptomicina (Gibco) y 5 mM EDTA (Sigma)]. Tras la incubación a temperatura ambiente durante 15 minutos, las células se lavaron dos veces con 500 μ L de FACS/EDTA y resuspendidas finalmente en 800 μ L del mismo buffer suplementado con 0.2 mg/ml de RNAsa A (Qiagen). Las muestras se incubaron a 37°C en agitación durante 1 hora y 30 minutos antes del análisis por citometría de flujo, tras los que se añadieron 0.04 mg/ml de yoduro de propidio (Calbiochem) y se incubaron a 4°C durante 15 minutos en oscuridad. Finalmente, las células se resuspendieron en 500 μ L de FACS/EDTA. La citometría de flujo se realizó en el aparato BD LSRFortessa™ y la distribución del ciclo celular fue analizada usando el software BD FACSDiva™.

11. Ensayos de apoptosis

Las células BV2 se expusieron al igual que para los ensayos de ciclo celular a normoxia, hipoxia y DMOG 1 mM. La muerte celular por apoptosis se determinó, mediante citometría de flujo, mediante el uso del kit (Immunostep) siguiendo las instrucciones del fabricante. La Anexina V es una proteína anticoagulante vascular que posee una gran afinidad por la fosfatidilserina (PS). El análisis de la apoptosis realizado se basa en el reconocimiento y unión de la anexina a la PS. Esta última, se encuentra de manera normal en el interior de la membrana plasmática de las células, sin embargo, en las células apoptóticas se transloca al exterior. De este modo, la Anexina unida a un fluorocromo permite la identificación de las células apoptóticas tras su unión a la fosfatidilserina localizada en su superficie celular.

No obstante, la Anexina V puede también reconocer a la PS en el interior de la célula si la membrana plasmática de estas no se encuentra intacta, característico de células necróticas. Por lo que para diferenciarlas se añadió el compuesto 7-AAD, colorante capaz de unirse al DNA de las células necróticas. De este modo podemos diferenciar entre células viables (sin marcaje para ninguno de los dos compuestos), células apoptóticas tempranas (con marcaje sólo para Anexina V), células apoptóticas tardías (positivas para ambos marcadores) y células necróticas (positivas para ambos marcadores o sólo para el 7-AAD).

12. Ensayos de migración

12.1. Preparación y uso de A β oligomérico

El péptido A β (1-42) sintético liofilizado (Anaspec) se resuspendió y diluyó en hexafluoro-2-propanol 1 mM (HFIP; Sigma) y se incubó una hora a 4°C en mixer rotatorio de microtubos para asegurarnos la monomerización del péptido. Tras esto, el HFIP fue eliminado por evaporación usando el sistema Speed Vacuum durante 30 minutos y se almacenó a -80°C hasta su uso. De manera previa a su utilización, se llevó a cabo la oligomerización del péptido mediante la resuspensión del péptido en DMSO durante 15 minutos a temperatura ambiente hasta una concentración final de 5 mM seguido de su dilución en PBS1x frío hasta una concentración final de 100 μ M. Finalmente, para oligomerizar el A β y obtener ligandos difusibles derivados del β -amiloide (ADDLs) vortexamos 30 segundos e incubamos toda la noche a 4°C en mixer rotatorio (Lambert, Velasco et al. 2007, Querfurth and LaFerla 2010).

Para su uso y analizar el efecto del péptido sobre cultivos primarios y la línea BV2, se usó a una concentración final de 1 μ M, en tratamientos de 24 horas.

12.2. BV2

El A β oligomerizado se añadió a placa de 24 pocillos (Nunc) a un 30-50% de confluencia a una concentración final de 10 μ M y se incubó en normoxia o hipoxia. Tras 24 horas se tomaron fotos en contraste de fase usando un microscopio IX-71 (Olympus) a magnificación 40x. La quimiotaxis se cuantificó calculando el porcentaje de células en contacto con el A β polimérico con respecto al total de células (n=25 imágenes cuantificadas por condición en tres experimentos diferentes).

12.3. Cultivos primarios

Los análisis se realizaron mediante ensayo con cámara boyden. Las células de microglía fueron tripsinizadas con tripsina-EDTA 0.25% (Gibco) durante 5 minutos, bloqueamos la tripsinización con medio completo y centrifugamos a 500 g durante 5 minutos y resuspendidas en medio condicionado para eliminar la tripsina. Se sembraron 80.000 células en el compartimento superior de insertos (6,5mm de

diámetro) con una membrana de polycarbonato de 8µm de poro en placa de 24 pocillos (Transwell Costar 3422; Corning Life Sciences, Lowell, MA). El medio condicionado con o sin Aβ oligomérico 1 µM o ATP (Sigma) 100 µM se añadió al compartimento inferior. Tras 24 horas las células del compartimento superior se retiraron con un descamador, seguido de un lavado del inserto con PBS1x y fijación en metanol 10 minutos a -20°C. Por último se tiñeron las células con Cristal violeta al 0.1% (Sigma) diluido en metanol 20% (Merck) durante 20 minutos a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con agua destilada y se dejaron secar hasta el conteo. Las células en la cara inferior del inserto se contaron por microscopía en contraste de fase (5 campos por condición, n=3-16) usando microscopio IX-71 (Olympus) a magnificación 20x.

13. Inmunocitoquímica

13.1. IBA1/GFAP/DAPI

Para comprobar la pureza de los cultivos primarios y analizar su viabilidad o proliferación en condiciones de hipoxia se realizaron ensayos de inmunocitoquímica. Independientemente del anticuerpo el proceso fue el mismo para ambos tipos de cultivo. Los cultivos se realizaron en well de 24 pocillos (Nunc) sobre lamelas de cristal de 12 mm de diámetro (Thermo Scientific) previamente tratados con poly-L-lisina (Sigma) durante 16 horas a 37°C, lavados y esterilizados en campana con luz ultra-violeta.

Tras retirar el medio y lavar una vez con PBS 1x (Gibco) las células se fijaron con PFA 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de permeabilización con PBS 1x con Tritón (Sigma) al 0,5% durante 15 minutos. Los lavados se realizaron usando PBS 1x con Tritón al 0,1% (PBTrition 0,1%) durante 5 minutos en agitación suave usando agitador orbital (Heidolph). El bloqueo durante una hora y la incubación con los anticuerpos primarios durante toda la noche se llevó a cabo en en PBTrition 0,1% suplementado con BSA al 1%, suero de cabra (Goat-Serum, Gibco) al 10%. Al día siguiente, tras los lavados, las células se incubaron con los anticuerpos secundarios durante una hora en PBTrition 0,1%, seguido de 5 lavados con PBTrition 0,1%. En el tercer lavado las células se incubaron con DAPI (Sigma, 1:1000) durante 10 minutos para teñir los núcleos. El montaje de las lamelas se

realizó sobre portas con el medio de montaje Fluoromont (Fluorescent Mounting Medium, DAKO) y se dejaron secar toda la noche.

13.2. BrdU/IBA1/DAPI

La inmuno frente a BrdU se realizó siguiendo el protocolo anterior modificado. Tras la fijación y permeabilización, el ADN fue desnaturalizado tratando las células 15 minutos con HCl 2 M seguido de tres lavados rápidos con PBS 1x y 15 minutos con borato sódico (Sigma) 0.1 M pH 6,8 para inactivar la acción del clorhídrico. Tras esto continuamos la inmuno siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

Los anticuerpos y las concentraciones de uso fueron las siguientes: anti-Iba1 (Wako, 1:400); anti-GFAP (Sigma, 1:2000); anti-BrdU (Abcam, 1:250). Los anticuerpos secundarios fluorescentes fueron anti-mouse, anti-rabbit y anti-rat AlexaFluor 568 y 488 (Invitrogen, 1:800).

14. Inmunohistoquímica

Todas las secciones fueron desparafinadas con la ayuda de xileno, una serie de concentraciones decrecientes de EtOH y por último agua (2xEtOH 100% 5 minutos, EtOH 90% 5 minutos, EtOH 70% 5 minutos, 3xH₂O destilada en un total de 5 minutos).

14.1. Tinción de Aβ1-42

Se utilizaron dos métodos diferentes para la tinción de placas de Aβ. Por un lado se realizó una aproximación basada en anticuerpos considerando varias técnicas de optimización. La segunda aproximación incluyó el reactivo Tioflavina-S (Thio-S) como se describirá más tarde.

En el caso del anticuerpo frente al péptido Aβ (rabbit polyclonal Aβ1-42, Calbiochem), tras la desparafinización eliminamos la actividad peroxidasa remanente incubando con H₂O₂ al 3% durante 30 minutos seguido de 2 lavados de 5 minutos con H₂O destilada y uno con PBS 1x 5 minutos. Tras lo cual llevamos a cabo la recuperación antigénica mediante incubación en ácido fórmico al 99% durante 3 minutos, seguido de otro paso de lavados. Posteriormente, las rodajas se bloquearon con leche desnatada al 5% en PBS 1x durante una hora a temperatura

ambiente. Tras esto se añadió el anticuerpo primario diluido a 1:100 en solución de bloqueo y se dejó incubando toda la noche a 4°C. Al día siguiente y tras una serie de lavados en PBTrition 0,1%, incubamos el anticuerpo secundario (IgG goat anti-rabbit, DAKO) en solución de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Tras otro lavado con PBTrition el revelado se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante del kit EnVision+System-HRP (DAKO) usando el cromógeno DAB. Tras dos minutos de exposición al cromógeno inactivamos con un lavado adicional. Las secciones se montaron con un medio de montaje acuoso (DAKO), dejando secar selladas con laca de uñas incolora.

14.2. Tinción de Iba1

La tinción inmunohistoquímica se realizó siguiendo los mismos pasos que en la tinción A β con modificaciones. En este caso, la recuperación antigénica se llevó a cabo incubando en ácido cítrico 10 mM (pH 6) a 95°C durante 20 minutos seguidos de 45 minutos a 4°C. Tras el bloqueo, incubamos con el anticuerpo primario (Iba1, polyclonal rabbit, Wako) durante una hora en solución de bloqueo. Los lavados, incubación con anticuerpo secundario, revelado fueron iguales a los de la tinción A β , a excepción de la incubación con el cromógeno, que fue de 4 minutos.

14.3. Neu-N, Ubiquitina (UB) y Tau fosforilada (P-Tau)

En estas tres tinciones inmunohistoquímicas tras la rehidratación la recuperación antigénica se llevó a cabo incubando en ácido cítrico 10mM (pH 6) a 95°C durante 20 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Tras unos lavados en H₂O destilada se eliminó la actividad peroxidasa remanente incubando con H₂O₂ al 3% durante 30 minutos seguido de 2 lavados de 5 minutos con H₂O destilada y uno con PBS 1x 5 minutos. Tras esto se bloqueó durante una hora a temperatura ambiente con BSA 1%, Donkey Serum 5% en PBTrition 0,2% y se incubó con los anticuerpos primarios toda la noche a 4°C diluidos en PBS 1x con BSA al 1% y Donkey Serum al 5% (Sigma). La segunda parte de la inmuno se realizó de igual forma que para la tinción de A β pero utilizando PBS 1x en lugar de PBTrition. Los tiempos del cromógeno variaron según el anticuerpo, siendo de 2 minutos para Neu-N, 5 minutos para ubiquitina y 5 minutos para P-Tau. Tras el revelado con DAB y hacer un par de lavados con PBS 1x, los placas se contra-tiñeron con Tioflavina-S para la

visualización de las placas siguiendo el protocolo que se describirá más tarde. El montaje se realizó usando medio de montaje Fluoromont (Fluorescent Mounting Medium, DAKO) y se dejó secar.

La concentración de los anticuerpos fue para Neu-N de 1:1000 (Millipore), para anti-ubiquitina de 1:400 (DAKO) y para anti-P-Tau de 1:500 (Pierce).

14.4. KI67/Iba1

El protocolo que se siguió fue el mismo que para Neu-N, ubiquitina o P-Tau, pero en este caso KI67 se reveló mediante DAB e Iba1 por fluorescencia. Para ello, ya que los anticuerpos primarios están producidos en distintas especies, la incubación de ambos se realizó al mismo tiempo, sin embargo en el segundo día incubamos primero con el anticuerpo secundario Anti-mouse de DAKO para KI67, y tras revelar 5 minutos con DAB y aplicar 2 minutos CuSO₄ para potenciar la señal, lavamos y procedimos a incubar con el secundario fluorescente Anti-rabbit AlexaFluo (Invitrogen, 1:400) frente a Iba1 durante una hora a temperatura ambiente. Tras los lavados contra-teñimos las placas con Tioflavina-S y montamos.

La concentración de los anticuerpos fue para KI67 de 1:300 (BD) y para IBA1 de 1:400 (Wako).

14.5. GFAP

La inmuno para GFAP (Sigma, 1:1000) se realizó siguiendo el mismo protocolo que la anterior, pero en este caso al tratarse de una inmuno de fluorescencia exclusivamente no fue necesario el revelado con sistema EnVision+System-HRP. En el segundo día, tras los lavados, incubamos con el secundario anti-mouse AlexaFluo (Invitrogen, 1:500) durante una hora seguido de lavados, contra-tinción de placas con Tioflavina-S y montaje.

15. Tinciones de cortes de tejido

15.1. Tinción Tioflavina-S (Thio-S)

El reactivo fluorescente Tioflavina-S (Sigma) reacciona con las estructuras lámina β , por lo que reconoce las placas de A β así como los ovillos neurofibrilares (NFT).

Los vasos muestran una alta auto-fluorescencia bajo este tipo de tinción debido a propiedades desconocidas, lo cual limita su uso para análisis cuantitativos, aunque sin embargo es efectivo para procedimientos de tinción doble. Tras llevar a cabo el lavado de las rodajas pre-teñidas estas se incubaron con Tioflavina al 0.05% en EtOH 50% durante 8 minutos en oscuridad. Posteriormente las rodajas se trataron 3 veces con EtOH 80% durante 10 segundos para eliminar un posible fondo de auto-fluorescencia, seguido de un lavado similar con H₂O destilada. Para el montaje se utilizó medio de montaje para fluorescencia (DAKO). La señal se observó bajo luz UV.

15.2. *Lectina de tomate*

La lectina de tomate es una proteína obtenida del tomate (*Lycopersicon esculentum*) con una afinidad específica por los residuos del azúcar poli-N-acetil lactosamina, que se encuentra en la membrana plasmática y en el citoplasma de la microglía. Tras la rehidratación y la recuperación antigénica, las secciones se incubaron una hora a 37°C en presencia de la lectina de tomate (Vector, 1:400), seguida de incubación con estreptavidina conjugada con fluoróforo Cy3 (Jackson, 1:500) durante dos horas a temperatura ambiente. Por último, las secciones se lavaron en PBS 1x, sobre tiñeron con Tioflavina-S y montadas en Fluoromont.

15.3. *Tinción Prussian.*

Este compuesto tiñe el hierro férrico, y por tanto, la hemoglobina de los glóbulos rojos. De este modo mediante esta técnica puede ser analizada la presencia de hemorragias. Se analizó así, si bajo las condiciones de tratamiento se produce una rotura excesiva de vasos. Tras la desparafinación y rehidratación de las secciones, estas fueron teñidas durante 20 minutos con una solución hecha a partes iguales con una solución acuosa de ácido clorhídrico al 20% y otra de ferrocianida potásica al 10% (Protocolo obtenido de IHCworld). La contra-tinción se realizó con nuclear fast red (Sigma) durante 5 minutos.

15.4. Tinción Hematoxilina/Eosina.

Con el objetivo de evaluar cambios estructurales bajo el tratamiento, especialmente angiogénesis, empleamos Hematoxilina y Eosina de Harry (Accustain, Sigma) siguiendo el procedimiento estándar.

16. Cuantificaciones de los ensayos inmunocitoquímicos

Las lamelas que contenían los cultivos primarios de microglía teñidas con IBA1/BrdU/DAPI fueron fotografiadas completamente usando el sistema newCAST. Para la cuantificación se realizó el conteo de células positivas para los tres marcadores de manera manual cubriendo la imagen completa.

17. Cuantificación de los ensayos inmunohistoquímicos

Para la estimación de la carga de placas Tioflavina-S positivas, la carga de ubiquitina, el número de microglía asociada a placas, el área de placa cubierta por IBA1 o P-Tau, y el número de células microgliales positivas para KI67 se seleccionaron hipocampo y corteza en dos puntos Bregma específicos de 4 animales independientes. A partir de estas secciones, una vez teñidas, se generó una super imagen conteniendo el hemiserebro completo mediante el Sistema newCAST, analizándose la corteza y el hipocampo de estas secciones completamente (no tomando muestras randomizadas).

La carga Tioflavina-S y de ubiquitina fue estimada usando el programa ImageJ (National Institutes of Health, USA). Esta carga fue definida como el porcentaje del área total del cerebro analizada cubierta o teñida para estos dos marcadores. El número de placas fue normalizado al área de muestra. Para la cuantificación del número de microglía asociada a placa, las placas en un área de muestreo fueron randomizadas sistemáticamente, y la microglía alrededor de ellas contada basándonos en el marcaje IBA1 más contra-tinción hematoxilina. Tras esto, las placas se analizaron de forma separada para calcular su área mediante ImageJ. Para estimar el porcentaje de placas Tioflavina-S cubiertas por marcaje P-Tau o IBA1, se tiñeron secciones de forma separada para estos dos marcadores y se contra-tiñeron con Tioflavina-S. Las placas se seleccionaron de manera azarosa por la tinción Thio-S, y el área Thio-S, P-Tau o IBA1 fue estimada mediante el uso de ImageJ. Los resultados se presentan como porcentaje de área IBA1 o P-Tau por área de placas de A β .

Para evaluar el número de células de microglía usamos una aproximación estereológica imparcial usando un microscopio Olympus BX61 y el sistema CAST con un área de disección de 28.521,3 μm^2 . El giro dentado fue escogido como área de muestreo. El área de muestra fue manualmente delimitada y el área total analizada mediante el software CAST.

18. Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media más el error estándar si se ajustan a una distribución normal (test Kolmogorov-Smirnov). Los datos que presentaron una distribución no normal se representaron usando diagramas de caja. Cuando las muestras presentaron una distribución normal, la comparación entre dos grupos se analizó mediante prueba t de Student (de dos colas) y la comparación entre varios grupos se realizó mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido de test de Tukey. El análisis univariante de la varianza se empleó cuando fue requerido, seguido prueba de Bonferroni. Se consideró como estadísticamente significativo un $p < 0.05$. Cuando las muestras no se ajustaron a una distribución normal, se emplearon test no paramétricos (Kruskal-Wallis). El software utilizado para el análisis estadístico fue el SPSS.

Resultados

Estudio de la respuesta de la microglía a la hipoxia

Para el analizar el efecto de la hipoxia sobre la microglía, se llevó a cabo un estudio basado en diferentes aproximaciones experimentales sobre dos modelos *in vitro*. Partiendo del efecto que la hipoxia tiene sobre las células mieloides se estudió si los bajos niveles de oxígeno tienen alguna consecuencia sobre la proliferación, supervivencia o la capacidad quimiotáctica de la línea celular microglial murina BV2, que ha mostrado ser un buen modelo para el estudio de los mecanismo moleculares implicados en estos procesos (Choi, Lim et al. 2009, Stansley, Post et al. 2012).

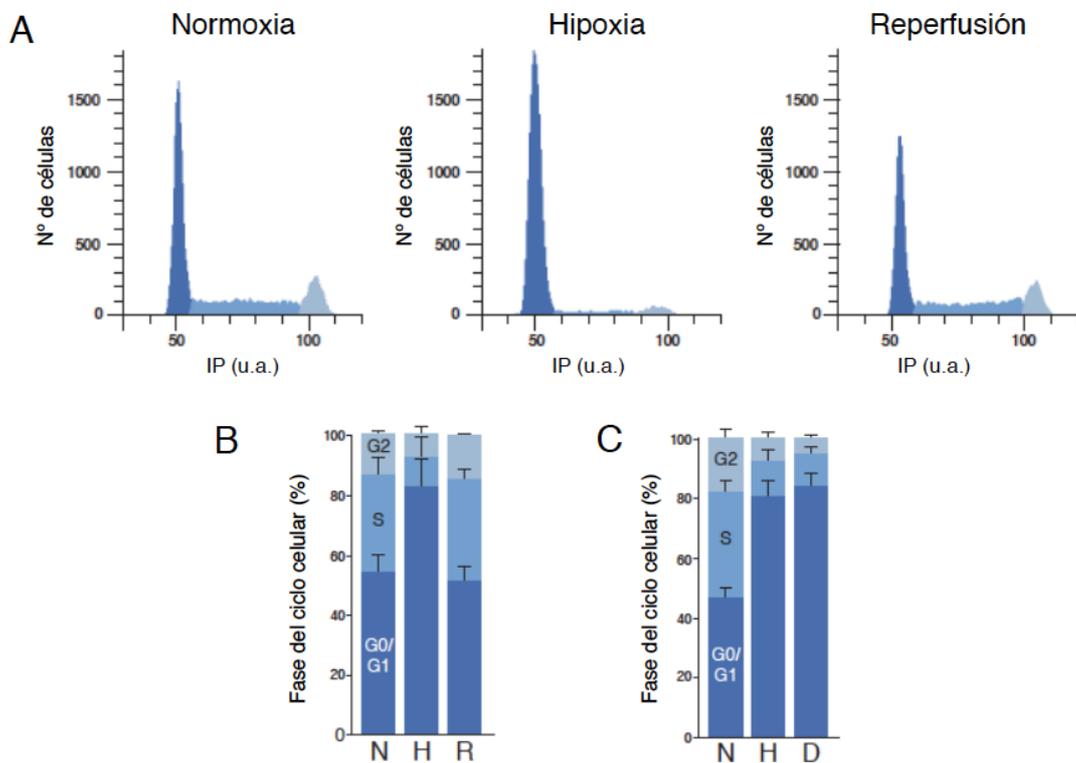


Figura 5. La hipoxia y el DMOG producen una parada del ciclo celular en la línea BV2. A, Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo usando Ioduro de propidio (IP) en células BV2 expuestas a normoxia (N: 21% O₂, 48 horas, panel izquierdo), hipoxia (H: 1% O₂, 48 horas panel central), o reoxigenación (R: 24 horas H and 24 horas N panel derecho). El pico azul oscuro corresponde a la fase G0/G1, la fase en azul, y G2 en azul claro. B, Cuantificación de los porcentajes de células encontrados en las diferentes fases en A (n = 3). C, Cuantificación del porcentaje de células en las distintas fases al tratar las células con DMOG 1 (D: 1 mM, 24 horas).

La exposición de estas células a hipoxia moderada (de 4 a 48 horas al 1% de O₂) tuvo como resultado una parada en la proliferación y por tanto del ciclo celular. Para cuantificar el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo se realizó un análisis por citometría de flujo mediante incorporación de ioduro de propidio. De este modo se

observó un claro descenso de número de células en las fases S y G₂, encontrándose la mayor parte de ellas en G₀/G₁ tras 24 horas en hipoxia (Figura 5a y 5b). Esta respuesta se mantuvo en el tiempo puesto que se obtuvieron los mismo porcentajes tras 48 horas en hipoxia (Figura 5c). Así mismo, se observó que se trata de un proceso reversible, ya que se recuperaron los porcentajes normales al exponer las células a 24 horas de normoxia tras las 24 horas de hipoxia (Figura 5c). Sin embargo, esta dramática parada del ciclo celular no se observó cuando las células fueron expuestas a hipoxia breve (4 horas) (Datos no mostrados). El tratamiento de las células con el inhibidor no específico de las PHDs dimetiloxalilglicina (DMOG) a una concentración final de 1 mM durante 24 horas mimetizó el efecto de la hipoxia, indicando que la regulación de la proliferación podría ser dependiente de prolil-hidroxilasas (Figura 5a).

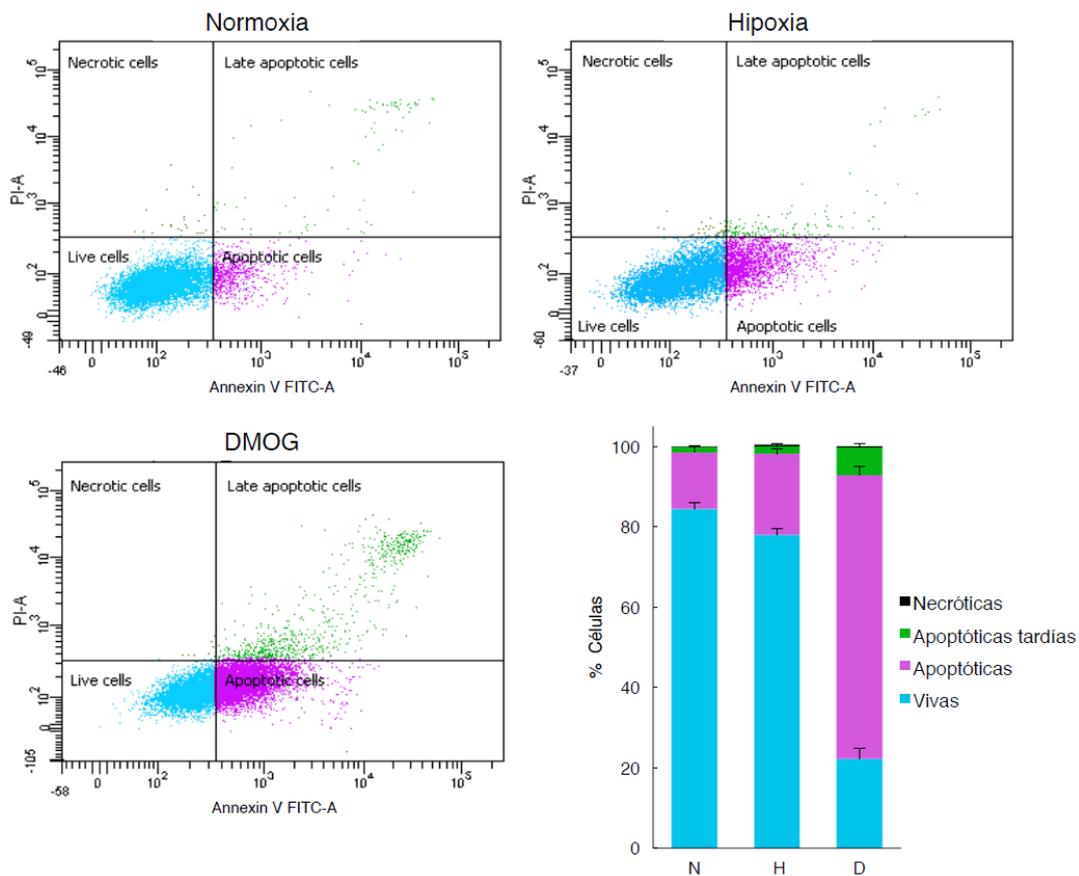


Figura 6. El DMOG induce apoptosis en la microglía. Análisis de la incorporación de Anexina V (Annexin V) y Ioduro de propidio (PI) en células BV2 tras 24 horas en normoxia (panel superior izquierdo), hipoxia (panel superior derecho) y DMOG 1 mM (panel inferior izquierdo). También se representa la cuantificación de los porcentajes de células en cada estado (panel inferior derecho).

Por otro lado, se realizó un análisis de la viabilidad de la microglía mediante citometría de flujo basado en la incorporación de Anexina V (Figura 6a). La cuantificación de las células mostró un incremento de la apoptosis en hipoxia (Figura 6b), siendo mucho mayor cuando las células fueron tratadas con DMOG 1 mM.

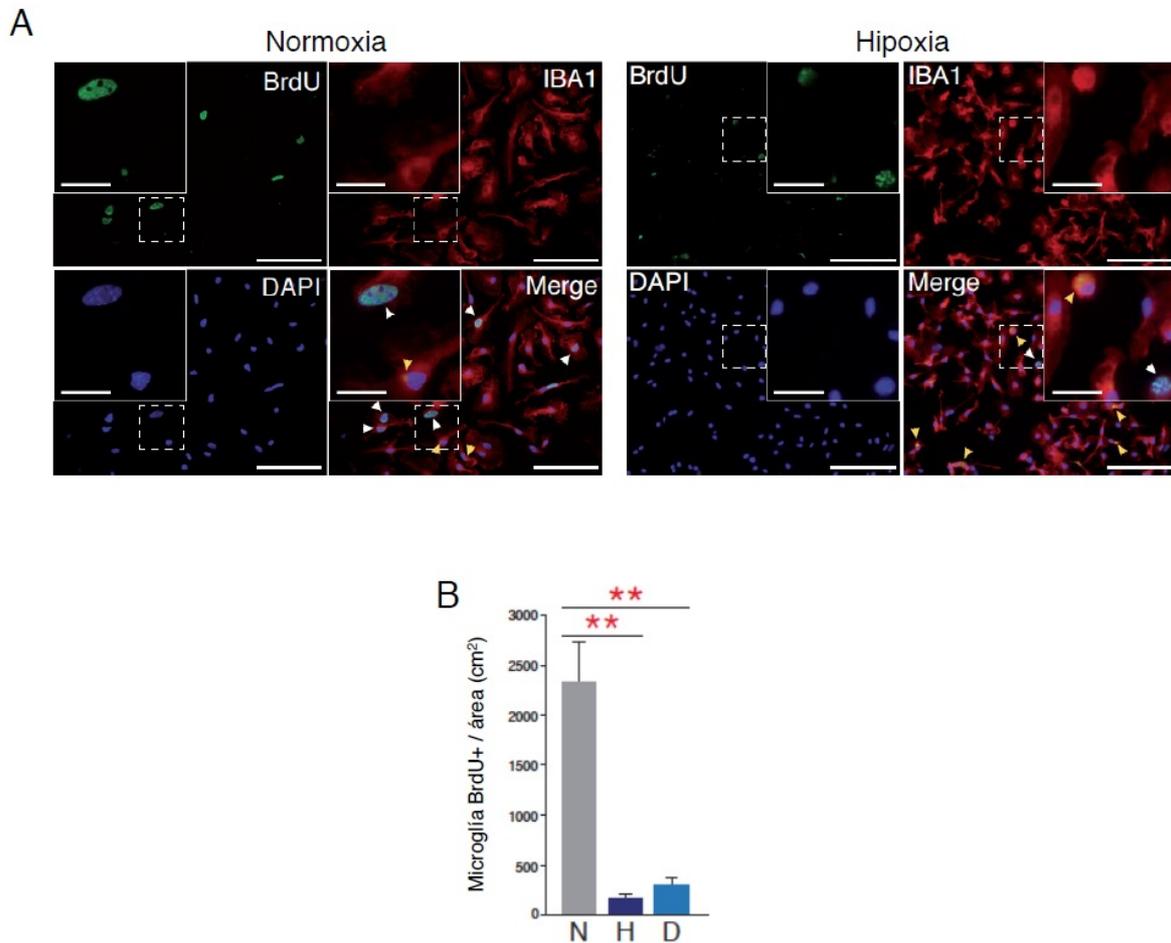


Figura 7. La hipoxia y el DMOG producen una parada de la proliferación en cultivos primarios de microglía. A, Imágenes representativas de la proliferación en cultivos primarios de microglía. La incorporación del marcador de proliferación BrdU se muestra en verde, IBA1 en rojo, y los núcleos en azul (DAPI). Los cuadrados blancos muestran una magnificación de los cuadrados delimitados por una línea blanca discontinua. Las flechas blancas indican núcleos de microglía BrdU⁺ y las amarillas indican marcaje BrdU no nuclear. La barra de escala es de 100 μ m y de 25 μ m en las magnificaciones. Los cultivos fueron expuestos a normoxia (N: 21% O₂, 24 horas, paneles izquierdos) o hipoxia (H: 1% O₂, 24 horas, paneles derechos) e incubados con BrdU 10 μ M las últimas 3 horas. **B,** Cuantificación del número de microglía positiva para BrdU en A, y tras 24 horas en presencia de DMOG (D, 0.1 mM (n = 4). ** p < 0.01 (Prueba T de Student).

Tras realizar esta observación en la línea celular BV2, se desarrolló otra aproximación diferente para extender estos resultados a cultivos primarios de microglía de ratón. Debido a la baja tasa de proliferación basal de estos cultivos, el análisis del efecto de la

hipoxia sobre la proliferación se llevó a cabo mediante la estimación de la replicación del DNA por incorporación de BrdU, observando que tras 24 horas tanto en hipoxia como en presencia de DMOG se produce una drástica reducción del número de microglía con núcleos positivos para BrdU, y por tanto de la tasa de proliferación (Figura 7). Si hay que destacar que en las células tanto en hipoxia como en presencia de DMOG se observa un claro marcaje BrdU no nuclear que podría ser resultado de procesos de autofagia. En este sentido, sería interesante realizar experimentos dirigidos a estudiar este efecto. De cualquier modo, este resultado junto al observado en la línea BV2 confirma que la hipoxia da lugar a una parada de la proliferación *in vitro* en la microglía, del mismo modo que en otros tipos celulares (Koshiji, Kageyama et al. 2004).

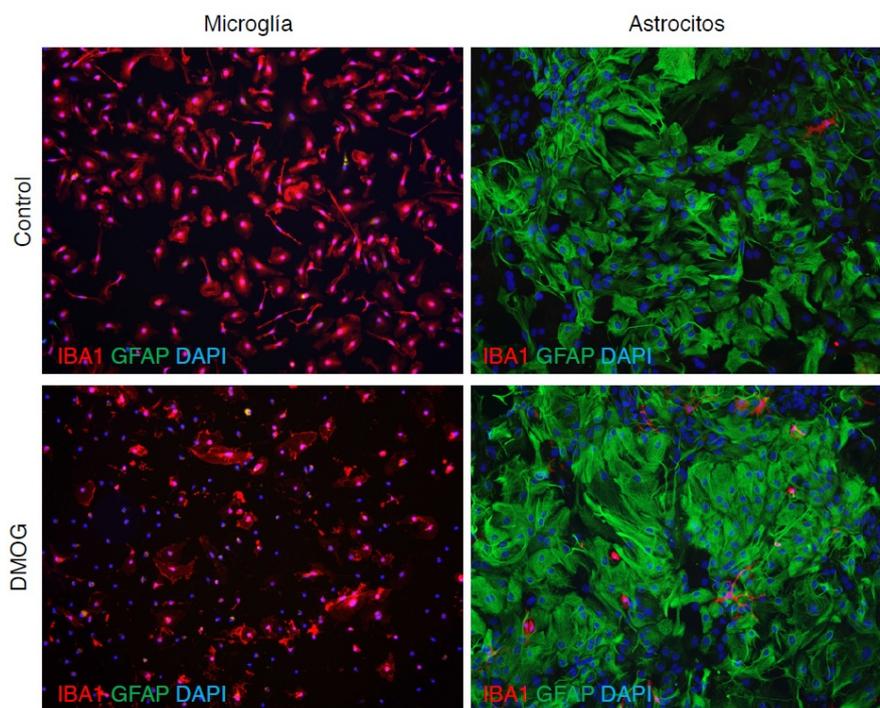


Figura 8. El DMOG no afecta a la viabilidad de los astrocitos. Imágenes representativas de cultivos de microglía (paneles izquierdos) y astrocitos (paneles derechos) en ausencia y presencia de DMOG 1 mM obtenidas mediante inmunocitoquímica. IBA1 en rojo, GFAP en verde y DAPI en azul. Se observa cómo tras 24 horas en presencia del DMOG se produce una clara afectación de la microglía y no de los astrocitos.

Hay que puntualizar que la concentración de uso del DMOG en los cultivos primarios fue de 100 μ M, ya que los cultivos primarios mostraron alta sensibilidad y toxicidad a la concentración de uso habitual, observándose una clara muerte celular tras 24 horas en presencia de este inhibidor (Figura 8). La causa de esta alta sensibilidad al DMOG en los cultivos de microglía, tanto primarios como en la línea BV2 está siendo analizada.

En el caso de los astrocitos la viabilidad no se vio afectada ni por la hipoxia ni por el DMOG, por lo que este efecto parece ser específico de la población microglial (Figura 8).

Ha sido descrito que la hipoxia da lugar a una inhibición de la quimiotaxis en macrófagos (Turner, Scotton et al. 1999, Bosco, Puppo et al. 2006), por lo que se quiso averiguar si la exposición a bajos niveles de oxígeno provoca el mismo efecto sobre la microglía. En este caso, también se llevaron a cabo dos aproximaciones experimentales distintas. La línea BV2 fue expuesta durante 24 horas a normoxia e hipoxia en presencia de A β polimérico en el medio. Tras lo cual se cuantificó del total de células presentes el porcentaje de células en contacto con los agregados de A β , observando una clara reducción en los cultivos hipóxicos (Figura 9).

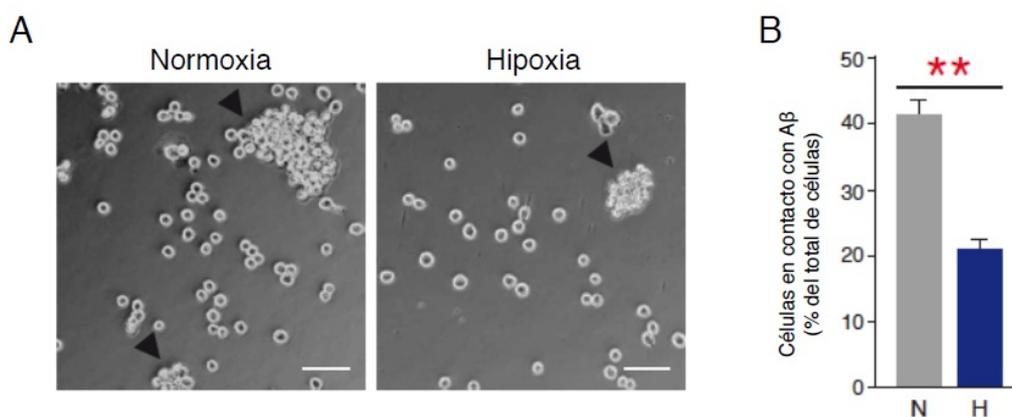


Figura 9. La hipoxia da lugar a una reducción de la quimiotaxis de la línea BV2 hacia el A β . A, Imágenes de contraste de fase de células BV2 en contacto con A β polimérico (triángulos negros) tras 24 horas en normoxia (panel izquierdo) o hipoxia (panel derecho). La barra de escala es de 50 μ m. B, Cuantificación del porcentaje de células respecto al total en contacto con en normoxia (N, columna gris) e hipoxia (H: 1% de O $_2$, columna azul) (n = 25 imágenes cuantificadas por condición obtenidas de tres experimentos distintos) ** p < 0.01, * p < 0.05 (Prueba T de Student).

En cuanto a los cultivos primarios, el efecto de la hipoxia sobre la quimiotaxis se analizó mediante el uso de un ensayo Boyden modificado. De este modo se analizó el efecto de la hipoxia sobre la capacidad quimiotáctica de la microglía hacia el A β y el ATP, compuestos descritos como quimioatrayentes para este tipo celular en estudios previos (Honda, Sasaki et al. 2001, Huang, Yen et al. 2010), observando una clara reducción del número de células atraídas tras 24 horas de hipoxia, por lo que parece que la afectación de la quimiotaxis de la microglía por la hipoxia ocurre de manera no específica (Figura 10). Este mismo efecto fue reproducido en presencia de DMOG por

lo que al igual que en otros tipos celulares las PHDs parecen controlar tanto el ciclo celular como la quimiotaxis en la microglía (Koshiji, Kageyama et al. 2004, Walmsley, Print et al. 2005). Futuros estudios de silenciamiento serán necesarios para profundizar en el papel que HIF o las distintas PHDs tienen en cada una de estas funciones de la microglía.

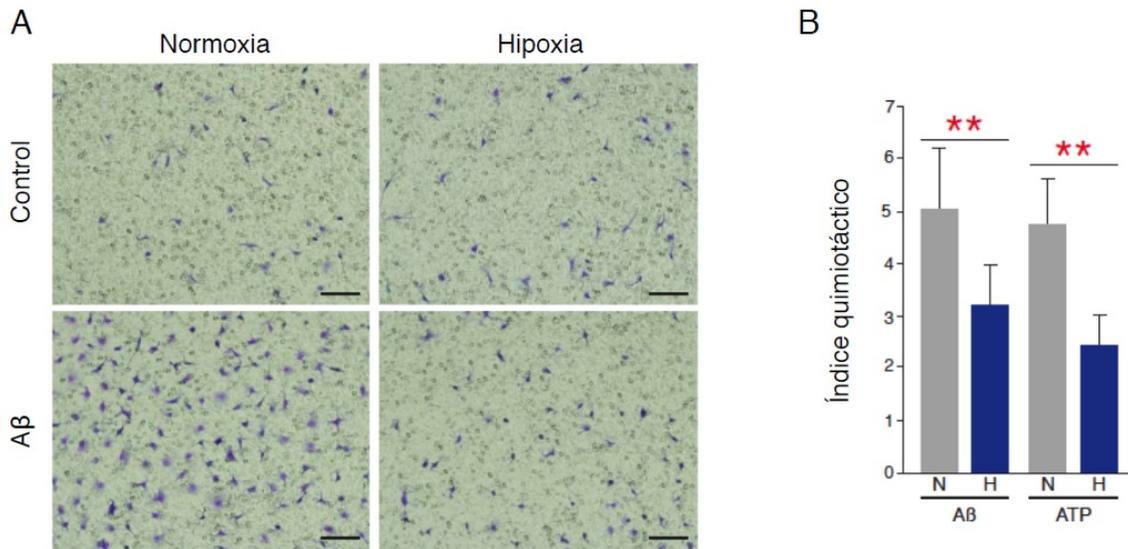


Figura 10. La hipoxia da lugar a una reducción de la quimiotaxis en cultivos primarios. A, Imágenes ensayo con cámaras Boyden ilustrando la migración de la microglía en diferentes condiciones experimentales. La barra de escala es de 100 μm . B, Cuantificación del índice quimiotáctico de las células hacia el A β y el ATP tras 24 horas en normoxia (N, columnas grises) o hipoxia (H:1% de O $_2$, columnas azules). ($n > 6$ trasnwells de al menos 3 experimentos independientes). ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (Prueba T de Student). El índice quimiotáctico se calcula dividiendo el número de células que migran en presencia del quimioatrayente por el número de células que lo hacen en ausencia de este.

El análisis molecular de la respuesta a hipoxias cortas (6 horas al 1 % de O $_2$) de cultivos primarios de microglía reveló una estabilización de HIF1 α menor que la observada en astrocitos, y la ausencia de estabilización de HIF2 α , a diferencia de lo que ocurre en astrocitos (Figura 11a). Ambos resultados sugieren que la regulación de la respuesta a la hipoxia o su dinámica en este tipo celular difiere de los mecanismos de respuesta típicos. Así mismo, se observó una sensibilidad mayor de la microglía al DMOG, estabilizando HIF1 α a concentraciones menores que las de uso normal y presentando una respuesta exacerbada al analizar tanto por Western blot los niveles de HIF1 α (Figura 11a), como por qRT-PCR los niveles de expresión de genes dianas de este factor, tales como *Glut1*, *Phd2* y *Phd3* (Figura 11b). Destacó la elevada sobreexpresión de *Phd3* en presencia de DMOG en microglía con respecto a astrocitos.

Esta enzima es responsable de la hidroxilación de HIF para su degradación en condiciones de hipoxia como mecanismo de retroalimentación negativo, una vez que HIF ya ha iniciado la respuesta adaptativa a la hipoxia (del Peso, Castellanos et al. 2003).

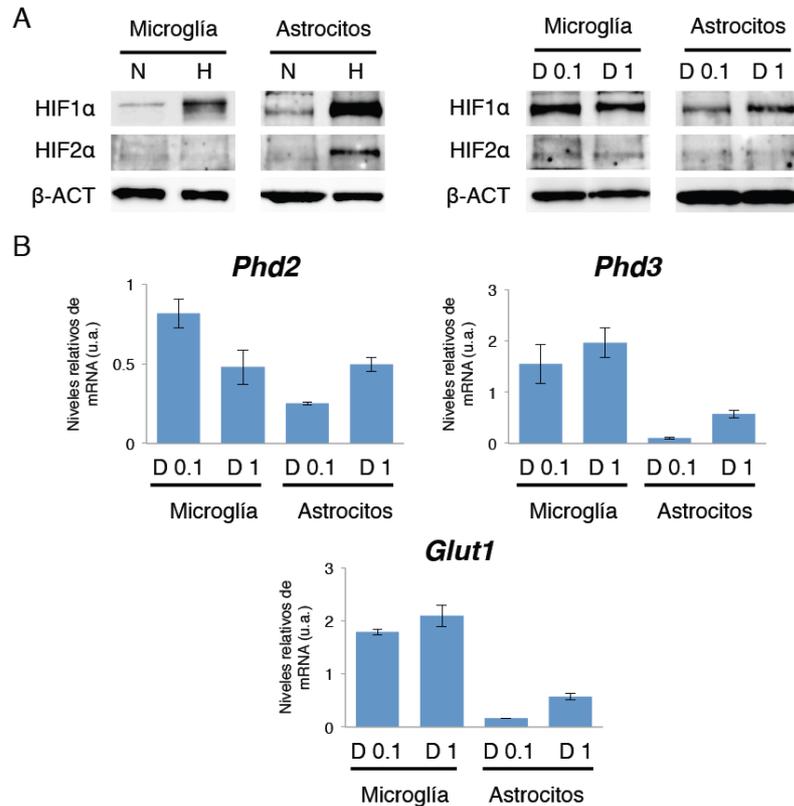


Figura 11. La microglía muestra una fuerte estabilización de HIF1α al incubarlas en presencia de DMOG. A, Imagen de un Western Blot representativo que muestra los niveles de HIF1α y HIF2α en cultivos primarios de microglía y de astrocitos expuestos a normoxia (N), hipoxia (H; 1% O₂), o DMOG (D, 0.1 mM o 1 mM) durante 6 h. Como control de carga se usó la β-act. **B,** Niveles relativos de mRNA (u.a. unidades arbitrarias) de los genes diana de HIF1α Phd3, Phd2 y Glut1 estimados mediante qRT-PCR en ambos tipos de cultivos tras el tratamiento con DMOG 0.1 mM o 1 mM durante 6 horas (n = 3). Como control endógeno se utilizó el Hmbs.

La alta expresión de esta PHD por la microglía en condiciones de hipoxia, mucho mayor en presencia de DMOG, unida a la apoptosis observada en ambas condiciones, especialmente en los cultivos tratados con DMOG, sugiere un posible papel esencial de esta enzima en la supervivencia de la microglía. Para evaluar el papel de la PHD3 en la adaptación a la hipoxia de la microglía realizamos cultivos primarios a partir de ratones *Phd3*^{-/-}. Tras el aislamiento observamos una reducción importante del número de células en comparación con los cultivos silvestres (Figura 12a y b). Sin embargo no se observaron diferencias con respecto a los controles al exponer estos cultivos a hipoxia o

tratarlos con DMOG (Figura 12c). Cultivos de microglía a partir de ratones mutantes heterocigotos para la PHD2 con un alelo nulo para esta enzima mostraron el mismo fenotipo que los PHD3, presentando una reducción similar en el número total de células en condiciones normales con respecto a los animales silvestres (Figura 12a y b). No se observaron diferencias en cultivos realizados a partir de ratones KO y silvestres para la PHD1 (Figura 12a y b). Las dos primeras enzimas son las principales involucradas en el control de la estabilización de la proteína HIF1 α , por lo que sería muy interesante profundizar en el papel de este factor sobre la microglía.

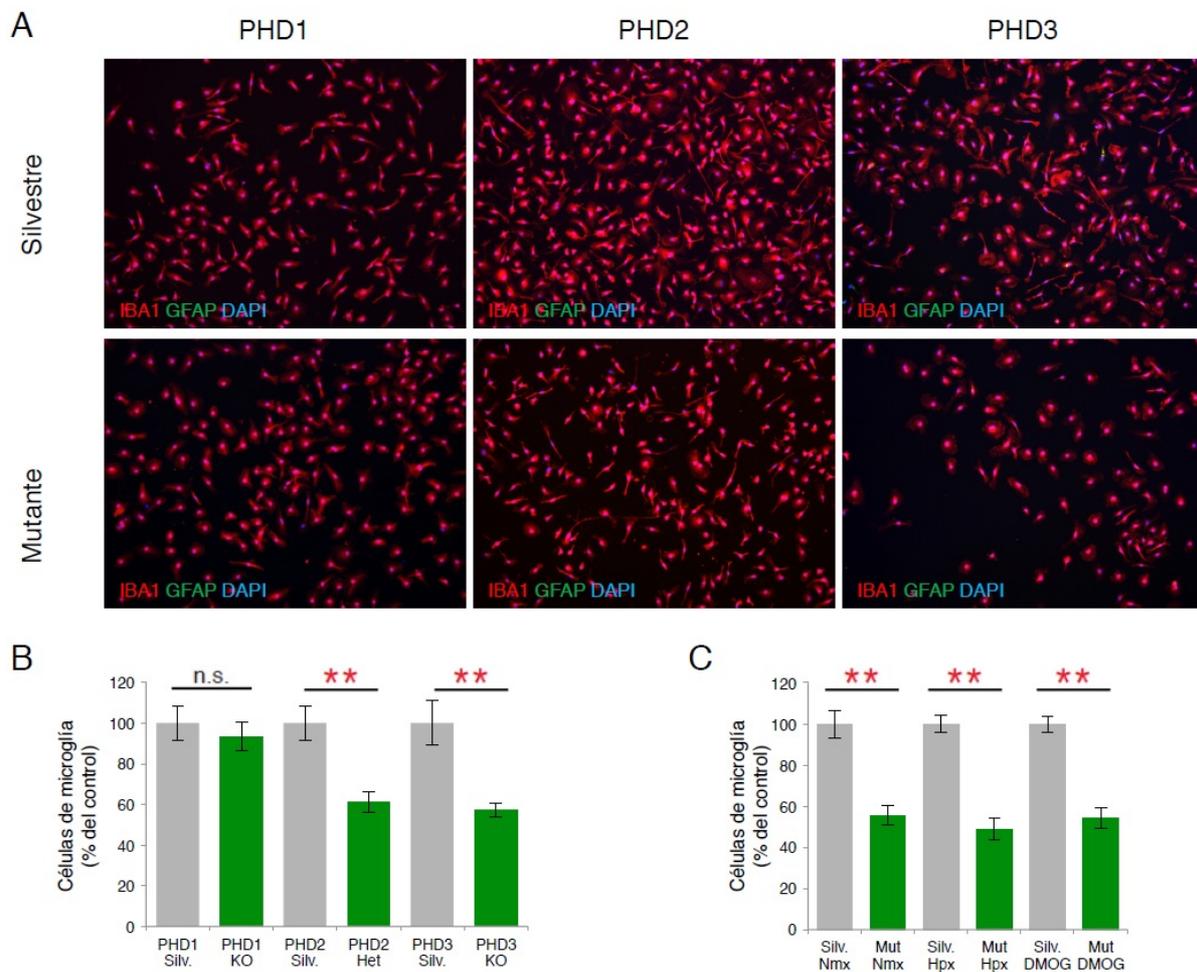


Figura 12. La ausencia de PHD2 o PHD3 afecta a los cultivos de microglía. A, Imágenes representativas obtenidas mediante inmunocitoquímica de cultivos de microglía de ratones silvestres o mutantes para las PHDs [*Egln2*^{-/-} (PHD1), *Egln1*^{+/-} (PHD2), or *Egln3*^{-/-} (PHD3)] usando IBA1 (rojo), GFAP (verde) y DAPI (azul). B, Cuantificación del porcentaje de células presentes en cada mutante (columnas verdes) respecto a su control (columnas grises). C, Cuantificación del porcentaje de células en los cultivos mutantes para PHD3 con respecto a los silvestres tras 24 horas en normoxia (nmx), hipoxia (hpx) y DMOG 0.1 mM (DMOG) ** $p < 0.01$; n.s. diferencia no significativa (Prueba T de Student).

Debido a que los cultivos primarios de microglía se basan en un método agresivo, y como consecuencia dan lugar a una alta muerte neuronal, suponen un ambiente pro-inflamatorio para la microglía. Los resultados observados también podrían sugerir que la PHD2 y la PHD3 juegan un papel importante en el proceso de adaptación y diferenciación de la microglía hacia un fenotipo pro-inflamatorio, algo descrito en el caso de PHD3 en macrófagos (Escribese, Sierra-Filardi et al. 2012). Serán necesarios futuros estudios para dilucidar dicho papel así como el del factor HIF1 α en dicho proceso.

Análisis del efecto de la combinación de hipoxia crónica y la patología de Alzheimer sobre la microglía in vivo

Estudios con modelos animales han descrito que con el desarrollo de la patología de Alzheimer se produce un incremento en el número de células microgliales en el cerebro así como una quimiotaxis de estas células hacia las placas de A β (Bondolfi, Calhoun et al. 2002, El Khoury, Toft et al. 2007, Meyer-Luehmann, Spiess-Jones et al. 2008, Kamphuis, Orre et al. 2012, Serrano-Pozo, Muzikansky et al. 2013). Es por esto que, en base a los resultados obtenidos *in vitro*, dichos modelos podrían constituir un buena herramienta para estudiar el efecto de la hipoxia sobre la microglía *in vivo*. A partir de los estudios epidemiológicos descritos en la introducción y con el objetivo de analizar el efecto que la hipoxia tiene sobre la EA, y si este se debe a un efecto de la hipoxia sobre la microglía, se expuso a normoxia o hipoxia crónica (20 % y 9 % de O $_2$ durante 20 días respectivamente) un modelo de ratón de Alzheimer en fase inicial (8 meses de edad) y en fase avanzada (14 meses de edad) del desarrollo de la enfermedad, así como animales control sin modificación genética. Es importante resaltar que esta exposición se llevó a cabo en un incubador especialmente habilitado para animales, con un control preciso de la atmósfera, temperatura y humedad.

Lo primero que se analizó tras el sacrificio de los diferentes grupos de animales fue el hematocrito para evaluar el efecto sistémico de la hipoxia. La hipoxia produjo un claro incremento del hematocrito que no se vio afectado en ningún caso por el genotipo (sin diferencias entre animales control y animales transgénicos) o por edad (8 meses versus 14 meses de edad) (Figura 13a). También se evaluó la presencia de microinfartos o hemorragias cerebrales en los animales hipóxicos mediante tinción con Prussian Blue, que reconoce los grupos hemo de las células rojas sanguíneas. De este modo se observó

que la rotura de vasos y la consecuente salida de células rojas al tejido sólo se produjo de forma marginal en los animales hipóxicos y estuvo restringida al bulbo olfatorio y a pocas regiones del hipocampo (Figura 13b), por lo que se pudieron descartar la generación de eventos isquémicos de importancia en los ratones expuestos a hipoxia.

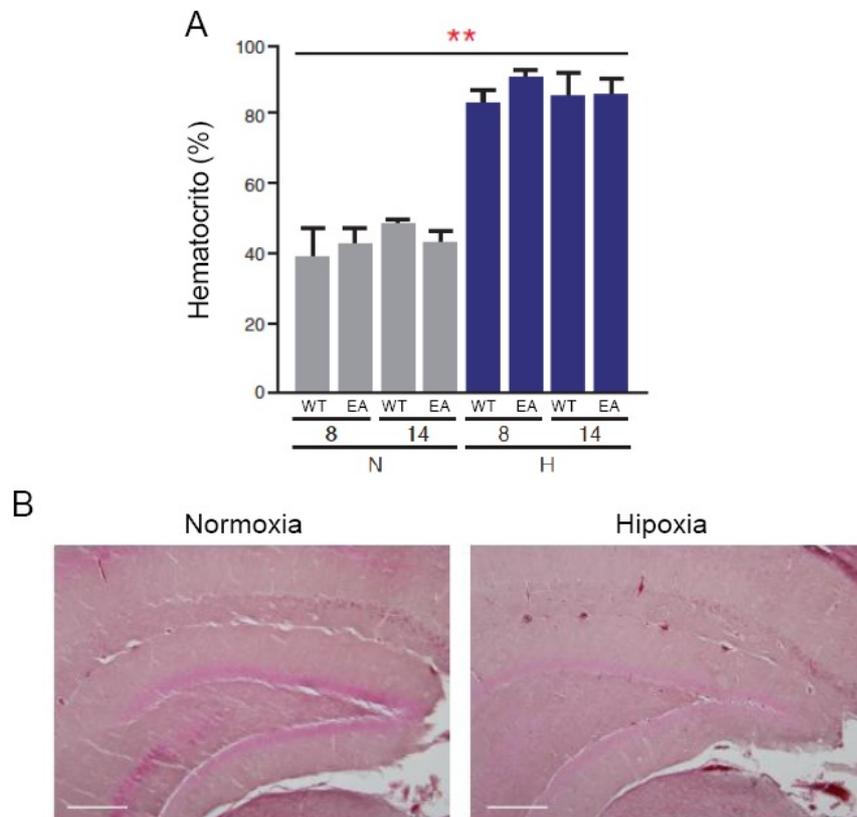


Figura 13. La hipoxia crónica provoca un aumento del hematocrito y no provoca isquemia generalizada en el cerebro. A, Cuantificación de los niveles de hematocrito en los animales silvestres (WT) y con EA expuestos a normoxia (N: 21% O₂, columnas grises) o hipoxia (H: 9% O₂, columnas azules) durante 20 días. Los datos se presentan como la media + SEM (desviación estándar) (n =3-7 animales por grupo) Los asteriscos representan diferencias significativas de los animales expuestos a hipoxia con los de normoxia. ** p <0.01 (análisis univariante de la varianza). B, Imágenes representativas del hipocampo de estos animales teñidos con Prussian Blue tras la exposición a normoxia o hipoxia.

Para evaluar el efecto de la hipoxia sobre la microglía en el cerebro de los ratones se llevó a cabo un análisis inmunohistoquímico frente a este tipo celular utilizando el marcador IBA1. La tinción reveló que con el desarrollo de la enfermedad se produce un incremento del número de células microgliales en el hipocampo de los ratones transgénicos, siendo mayor en los animales de 14 meses que en los de 8, sin embargo en los ratones expuestos a hipoxia este incremento fue claramente inferior (Figura 14a).

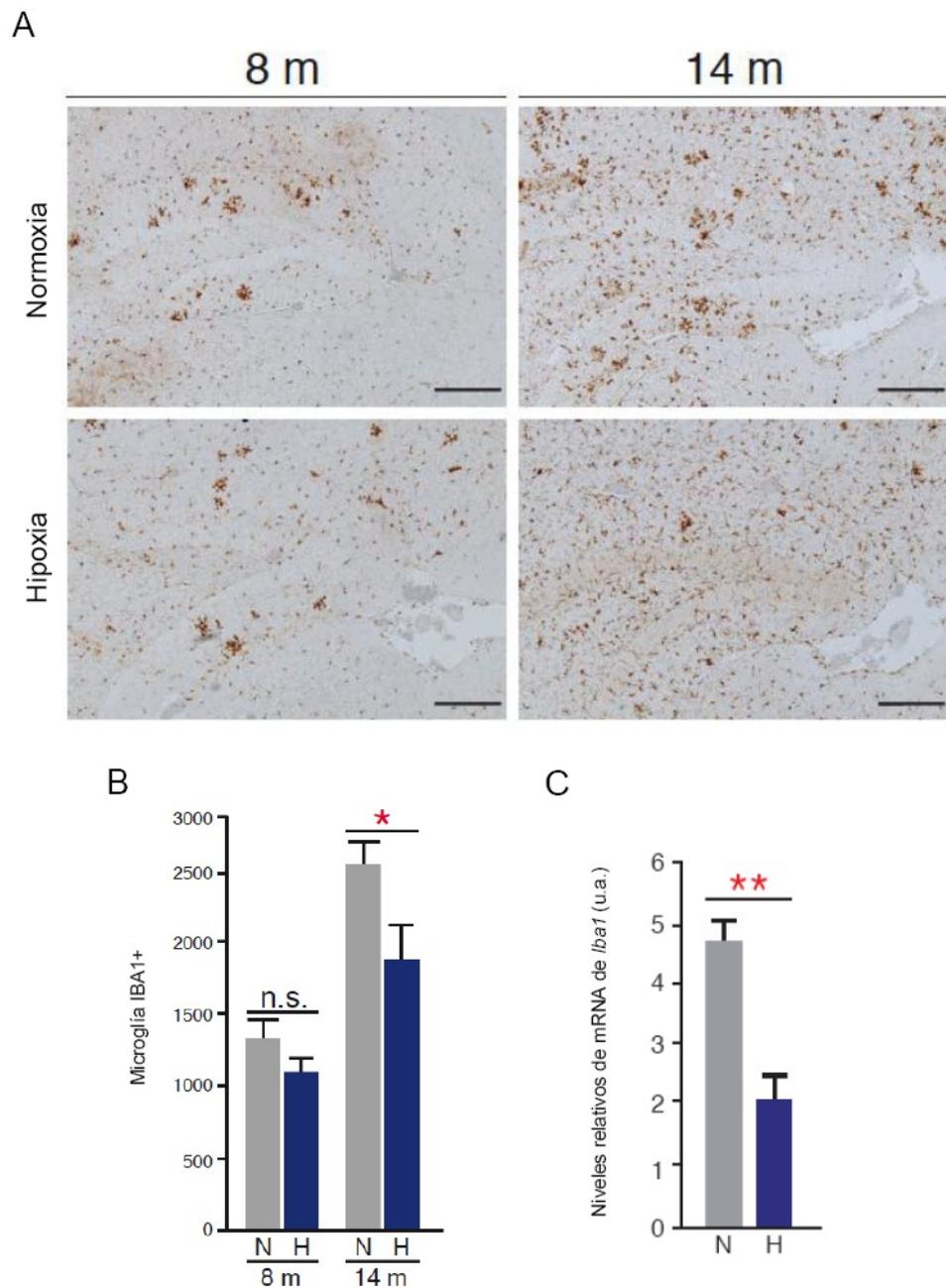


Figura 14. La hipoxia produce una reducción de la densidad microglial. A, Imágenes representativas de secciones de hipocampo de los ratones con EA de 8 (8m) y 14 meses (14m) de edad expuestos a normoxia (20 días al 9%) o hipoxia crónica (20 días al 9%) obtenidas mediante tinción inmunohistoquímica frente a IBA1. La barra de escala es de 100 μ m. B, Cuantificación del número de células microgliales (IBA1+) en el hipocampo de los animales expuestos a normoxia (N, columnas grises) o hipoxia (H, columnas azules). ** $p < 0.01$; n.s. diferencias no significativas (mediante ANOVA aplicando el test de Tukey). C, Niveles relativos de mRNA del marcador de microglía Iba1 obtenidos mediante qRT-PCR del RNA extraído del hipocampo de los animales de 14 meses con EA expuestos a normoxia (columna gris) o hipoxia (columna azul). Como control endógeno se analizaron los niveles de Gapdh ($n = 3 - 4$ animales). ** $p < 0.01$ (Prueba T de Student).

A 8 meses de edad no se observaron diferencias significativas en el número de células microgliales entre los animales expuestos a normoxia o hipoxia, ni en los transgénicos

ni en los animales silvestres, aunque se observó una tendencia de pérdida de células IBA1+ en los ratones transgénicos de hipoxia (Figura 14a y 15). Sin embargo, si se observó una clara tendencia a la reducción del número de células IBA1+ en el hipocampo de los animales de 14 meses, tanto silvestres como transgénicos. Este descenso fue altamente significativo en los animales transgénicos (Figura 14a). Para confirmar este resultado, se cuantificaron por qRT-PCR los niveles de expresión de *Iba1* a partir del RNA extraído del hipocampo de los ratones transgénicos de 14 meses, observando un claro descenso en los animales hipóxicos al compararlos con los animales expuestos a niveles normales de oxígeno (Figura 14b).

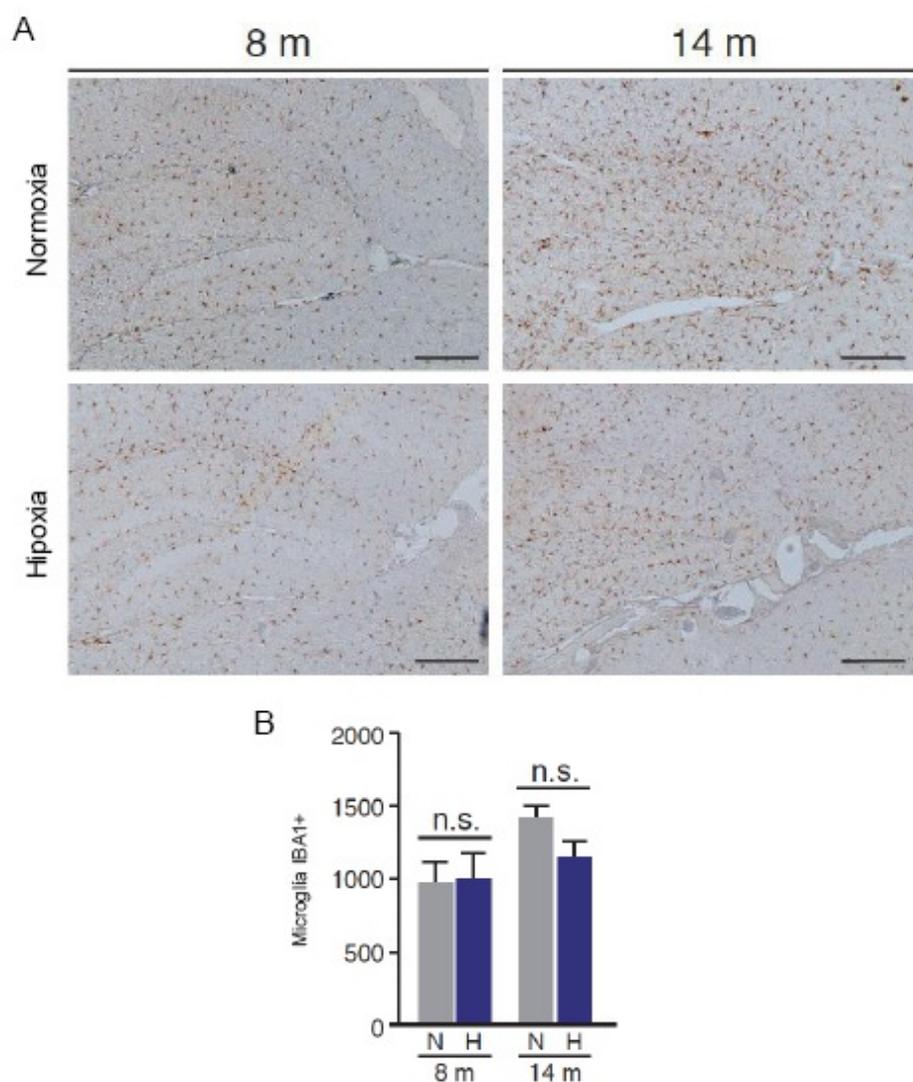


Figura 15. La microglía no se afecta por la hipoxia en los animales silvestres. A, Rodajas de hipocampo teñidas con el anticuerpo frente a IBA1 de animales silvestres de 8 (8m) y 14 meses (14m) expuestos a normoxia (21% O₂) o hipoxia (9% O₂) durante 20 días. La barra de escala es de 100 μ m. B, Cuantificación de microglía (células IBA1+) en el hipocampo de los animales expuestos a normoxia (N, columnas grises) o hipoxia (H, columnas azules) (n = 4, de al menos 4 animales). n.s. diferencias no significativas (mediante ANOVA aplicando el test de Tukey).

Un análisis en profundidad de las regiones de hipocampo y corteza reveló que en los animales de 14 meses expuestos a hipoxia la microglía asociada a las placas de A β o bien presentaba sus prolongaciones retraídas o en otros muchos casos simplemente estaba ausente (Figura 16a). La cuantificación del número de microglía asociada a las placas Tioflavina S positivas mostró una reducción de estas en el hipocampo en comparación con el grupo de normoxia, siendo incluso más evidente en regiones corticales (Figura 16b). La cuantificación del porcentaje de área de placas amiloides recubierta de marcaje IBA1 se realizó usando placas Tioflavina S positivas seleccionadas al azar, mostrando un fuerte descenso en el contenido IBA1 tanto en corteza como en hipocampo en los animales hipóxicos de 14 meses (Figura 16c). En ambos análisis, el tamaño medio de placas de A β analizadas fue similar entre los dos grupos.

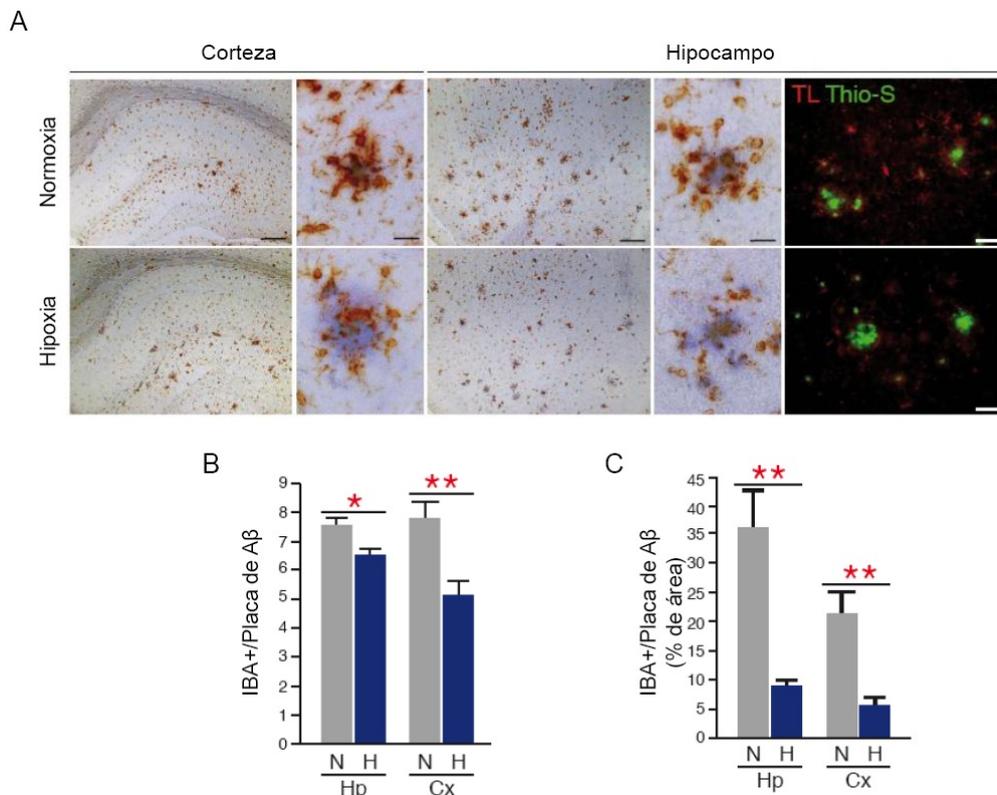


Figura 16. La combinación de hipoxia crónica y EA reducen la microglía asociada a placa. A, Secciones de hipocampo (izquierda) y corteza (derecha) de los animales de 14 meses teñidas con IBA1 y Tioflavina S (Thio-S) o lectina de tomate (TL) y Thio-S (en ambos casos rojo/verde). En la tinción IBA1/Thio-S la barra de escala es de 200 μ m en los paneles de la izquierda y de 20 μ m en las magnificaciones de la derecha. En estas últimas, la tinción Thio-S está coloreada en azul para mejor apreciación. La escala de la tinción TL/Thio-S es de 50 μ m. B, Cuantificación de las células microgliales IBA1+ por placa de A β (n = 77 - 99 placas de 4 animales). C, cuantificación del porcentaje de área de placa de A β ocupado por microglía IBA1+ (n = 27 - 48 placas de 4 animales). ** p < 0.01; *p < 0.05 (Prueba T de Student). Hp: Hipocampo; Cx: Corteza; N: Normoxia; H: Hipoxia.

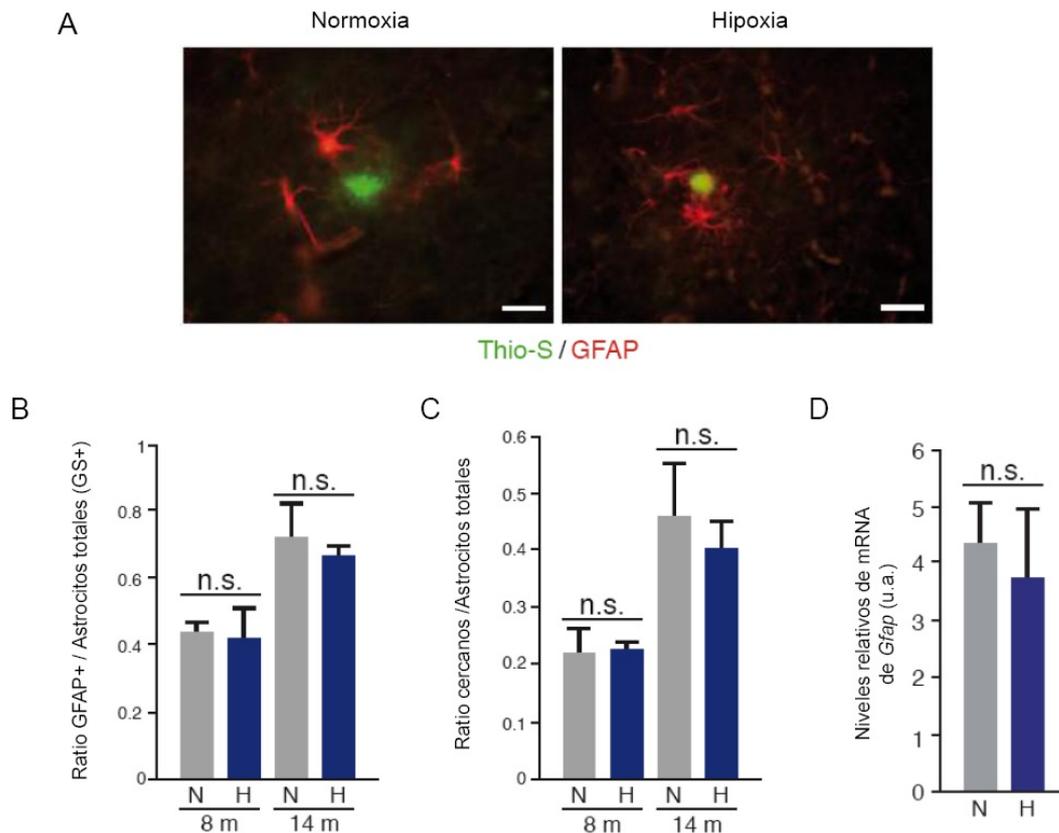


Figura 17. La hipoxia crónica en combinación con la EA no afecta a los astrocitos. A, Imagen representativa de una placa cortical de A β tras tinción inmunohistoquímica con Thio-S (verde) y un anticuerpo frente a GFAP (rojo) en un ratón de 14 meses con EA expuesto a normoxia (21% de O $_2$) o hipoxia crónica (9% de O $_2$). La barra de escala es de 20 μ m. B, Cuantificación del ratio de astrocitos reactivos (GFAP+) frente al número total de astrocitos (GS+) en los ratones con EA de 8 y 14 meses expuestos a normoxia (N, columnas grises) o hipoxia (H, columnas azules). C, Cuantificación del ratio de astrocitos asociados a placa frente al número de astrocitos totales en los mismos animales (n = 3 – 4). ** p < 0.01; n.s. diferencias no significativas (mediante ANOVA aplicando el test de Tukey). D, Niveles relativos del mRNA del gen Gfap mediante qRT-PCR a partir del RNA extraído del hipocampo de los ratones con EA de 14 meses. Como control endógeno se analizaron los niveles de Gapdh (n = 3 – 4 animales). ** p < 0.01; n.s. diferencias no significativas (Prueba T de Student).

Está descrito que asociados a las placas de A β además de microglía se encuentran también astrocitos (Itagaki, McGeer et al. 1989). Al igual que para la microglía, el papel de estos sobre las placas amiloides sigue siendo objeto de debate. Con el objetivo de estudiar si el efecto de la hipoxia es exclusivamente sobre la población microglial, se realizó el mismo tipo de análisis inmunohistoquímico y estereológico para los astrocitos, usando en este caso el marcador GFAP (glial fibrillary acidic protein) (Figura 17a). En claro contraste con la microglía, la cuantificación del número de astrocitos reactivos (GFAP+) por el total de astrocitos (glutamina sintetasa, GS+) no se vio afectada por el tratamiento hipóxico ni en los animales jóvenes ni en los viejos (Figura 17b). La cuantificación de los de astrocitos asociados o cercanos a placas de A β sobre el

total de astrocitos tampoco mostró ninguna diferencia significativa (Figura 17c). El análisis de los niveles de expresión de *Gfap* en hipocampo de los animales transgénicos de 14 meses por qRT-PCR, no reveló diferencias significativas en la expresión de este gen entre los animales normóxicos e hipóxicos (Figura 17d). Tomando en conjunto todos estos resultados, las evidencias sugieren de manera clara que la hipoxia en combinación con la enfermedad de Alzheimer induce un comportamiento aberrante en la microglía, dando lugar a un descenso de su número en el cerebro y una despoblación de este tipo celular de las placas de A β .

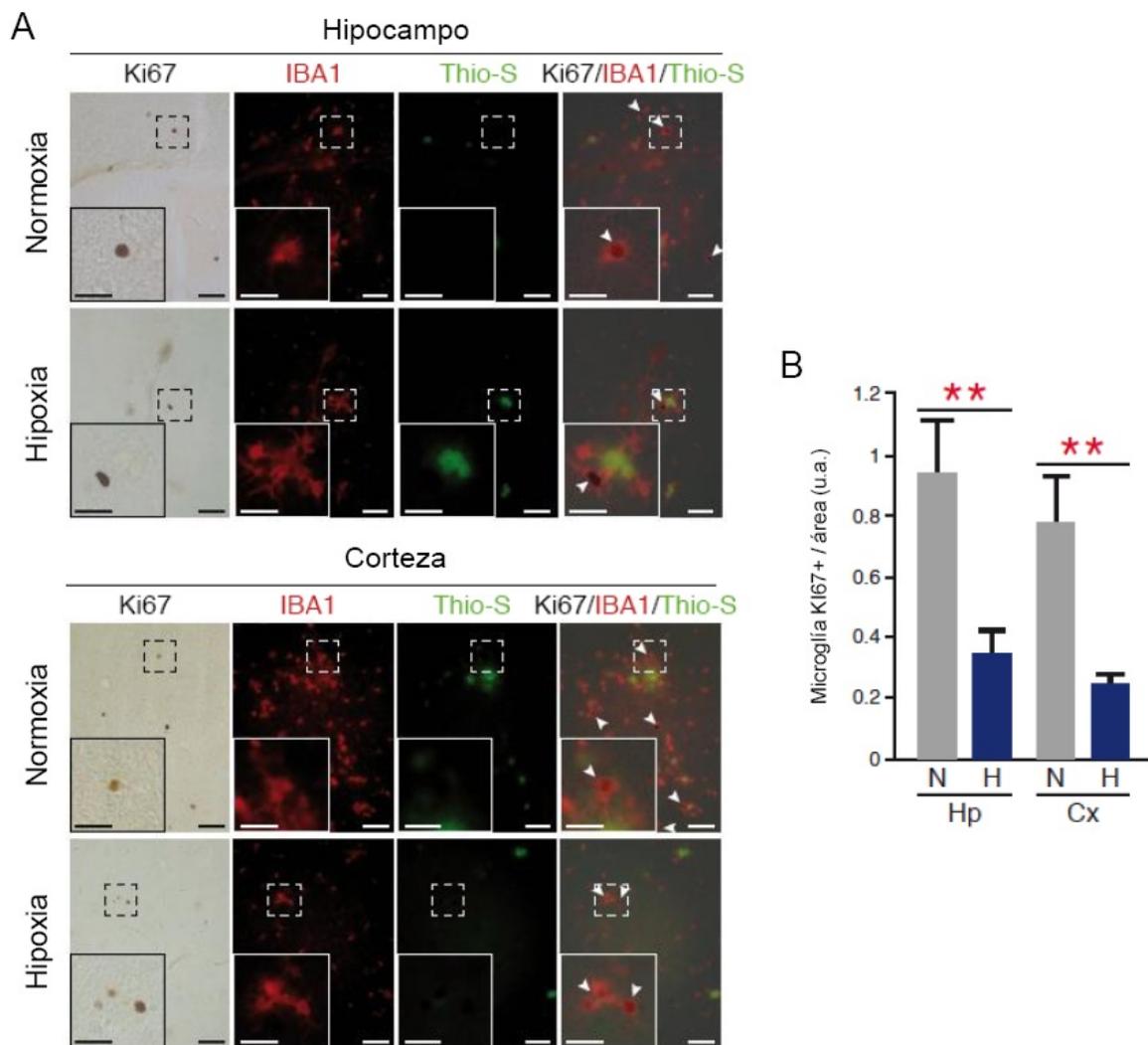


Figura 18. La hipoxia crónica en combinación con la EA reduce la capacidad proliferativa en la microglía. *A*, Imágenes representativas de secciones de hipocampo (paneles superiores) y corteza (paneles inferiores) teñidas con Ki67 (marrón en imágenes de contraste de fase) de animales de 14 meses con EA expuestos a normoxia o hipoxia, IBA1 (rojo), y Thio-S (verde). Las flechas indican la microglía positiva para Ki67, y los cuadrados magnificaciones del área delimitada por los cuadrados de línea discontinua. La barra de escala es de 50 μ m en los paneles de bajo aumento y de 25 μ m en las magnificaciones. *B*, Cuantificación de la densidad de microglía Ki67+ en hipocampo (Hp) o corteza (Cx) de los animales expuestos a normoxia (N) o hipoxia (H) ($n = 8$). ** $p < 0.01$ (Prueba T de Student).

Efecto de la EA en combinación con la hipoxia sobre la capacidad proliferativa de la microglía in vivo

En base a los resultados observados en los ensayos *in vitro*, y con el objetivo de determinar si la hipoxia crónica (9% O₂, 20 días) provoca una inhibición de la proliferación de la microglía *in vivo* que explique el fenotipo observado en los ratones con EA, se cuantificó el número de células de microglía KI67 positivas en corteza e hipocampo en los animales transgénicos de 14 meses. El análisis estereológico reveló un claro descenso del número de células IBA1+/KI67+ en ambas regiones cerebrales (Figura 18), y aunque este fenotipo podría atribuirse al descenso en el número total de células microgliales o asociadas a placas de A β , esta causa fue descartada al ser mucho mayor el descenso en el número de microglía positiva para el marcador proliferativo KI67. Estos resultados, junto a los resultados obtenidos *in vitro* sugieren firmemente que la hipoxia produce un arresto celular y por tanto una inhibición de la proliferación de la microglía *in vivo* e *in vitro*.

Estudio de la combinación de la hipoxia y la inflamación sobre la microglía in vitro

Como se indicaba en la introducción, entre la señalización de la inflamación y la de la hipoxia existe un solapamiento, convergiendo ambas rutas en HIF1 α . En el primer caso por la regulación al alza del factor Nf κ B y en el segundo por la reducción de la actividad de las PHDs, dando lugar de este modo a un aumento sinérgico de HIF1 α (Eltzschig and Carmeliet 2011, Harris, Thompson et al. 2014). Debido a que la patología avanzada de Alzheimer en combinación con la hipoxia provoca una disfunción microglial, y a que con el desarrollo de esta enfermedad se produce una acumulación de moléculas pro-inflamatorias en el cerebro en modelos animales (Jimenez, Baglietto-Vargas et al. 2008), se quiso comprobar si existe una sinergia entre la hipoxia e inflamación que de lugar a un aumento de la actividad de HIF α en la microglía y si esto puede estar relacionado con la afectación de estas células. Para corroborar esta hipótesis y profundizar en los mecanismos moleculares que subyacen a esta respuesta, se realizaron experimentos *in vitro* consistentes en la exposición a hipoxias cortas (6 horas al 1% de O₂) de cultivos primarios de microglía realizados en presencia de las citocinas M-CSF and GM-CSF, las cuales han sido descritas como moléculas que pueden inducir en la microglía efectos antagónicos (Re, Belyanskaya et

al. 2002). Lo primero que se observó fue que en presencia del GM-CSF los cultivos de microglía se polarizaron hacia un fenotipo activado, caracterizado por el aumento de la expresión de genes como *Tnf- α* , *Arg-1*, *Ym1* en condiciones de normoxia, sin embargo el tratamiento con M-CSF no mostró cambios con respecto a los cultivos control (Figura 19). No se observaron diferencias sin embargo en otros genes como *Il-1 β* , *Tlr4* o *Igf1* entre el control y los diferentes tratamientos.

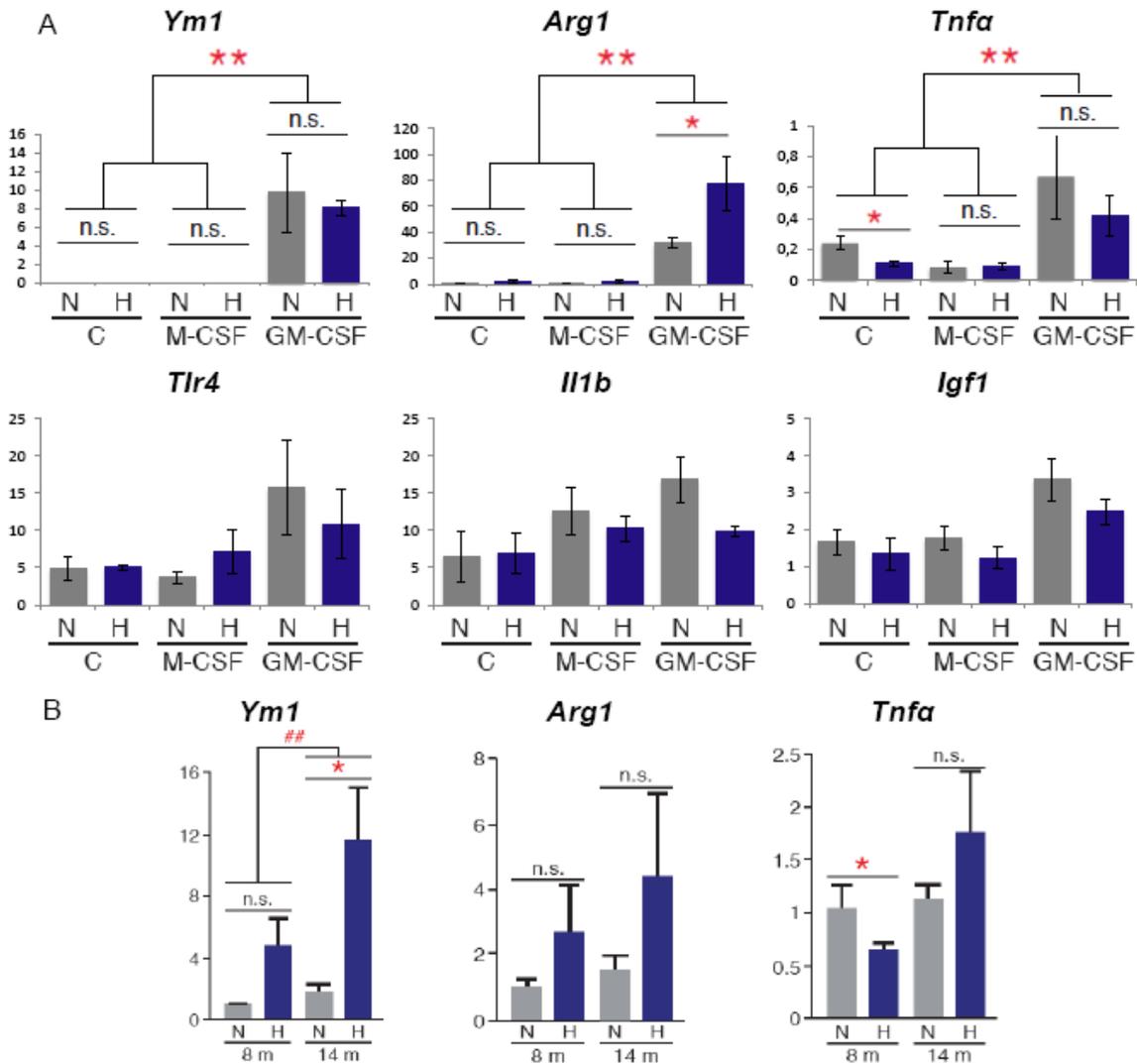


Figura 19. Los cultivos tratados con la citokina GM-CSF presentan un fenotipo activado, similar al de la microglía en el cerebro de la EA. A, Niveles relativos del mRNA en unidades arbitrarias de diferentes genes marcadores de activación de la microglía en cultivos primarios sin tratar (C) o tratados con las citoquinas M-CSF y GM-CSF de manera crónica (20 días), y expuestos 6 horas a normoxia (N, 21% de O₂, columnas grises) o a hipoxia (H, 1% de O₂, columnas azules). Como control endógeno se utilizó el gen *Hmbs* (n=8). B, Niveles relativos de mRNA en unidades arbitrarias de diferentes genes en el hipocampo de ratones con EA expuestos a normoxia (N, 21% de O₂, columnas grises) o hipoxia (H, 9% de O₂, columnas azules). Como control endógeno se utilizó el gen *18S* (n=3 - 4 animales por condición). ## $p < 0.01$ (Prueba de Bonferroni). Los asteriscos representan diferencias significativas entre normoxia e hipoxia. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; n.s. diferencias no significativas (Prueba T de Student).

El análisis de la expresión de marcadores de activación en la microglía expuesta a hipoxia mostró que la respuesta de los cultivos tratados con GM-CSF es similar a la observada en los cerebros de los animales transgénicos de 14 meses expuestos a hipoxia, donde se observa una tendencia al aumento de la expresión de *Tnf-α*, *Arg-1*, *Ym1*, siendo sólo significativo en el caso de *Ym1* (Figura 19b) por lo que tal vez podrían extrapolarse estos resultados a la microglía *in vivo*.

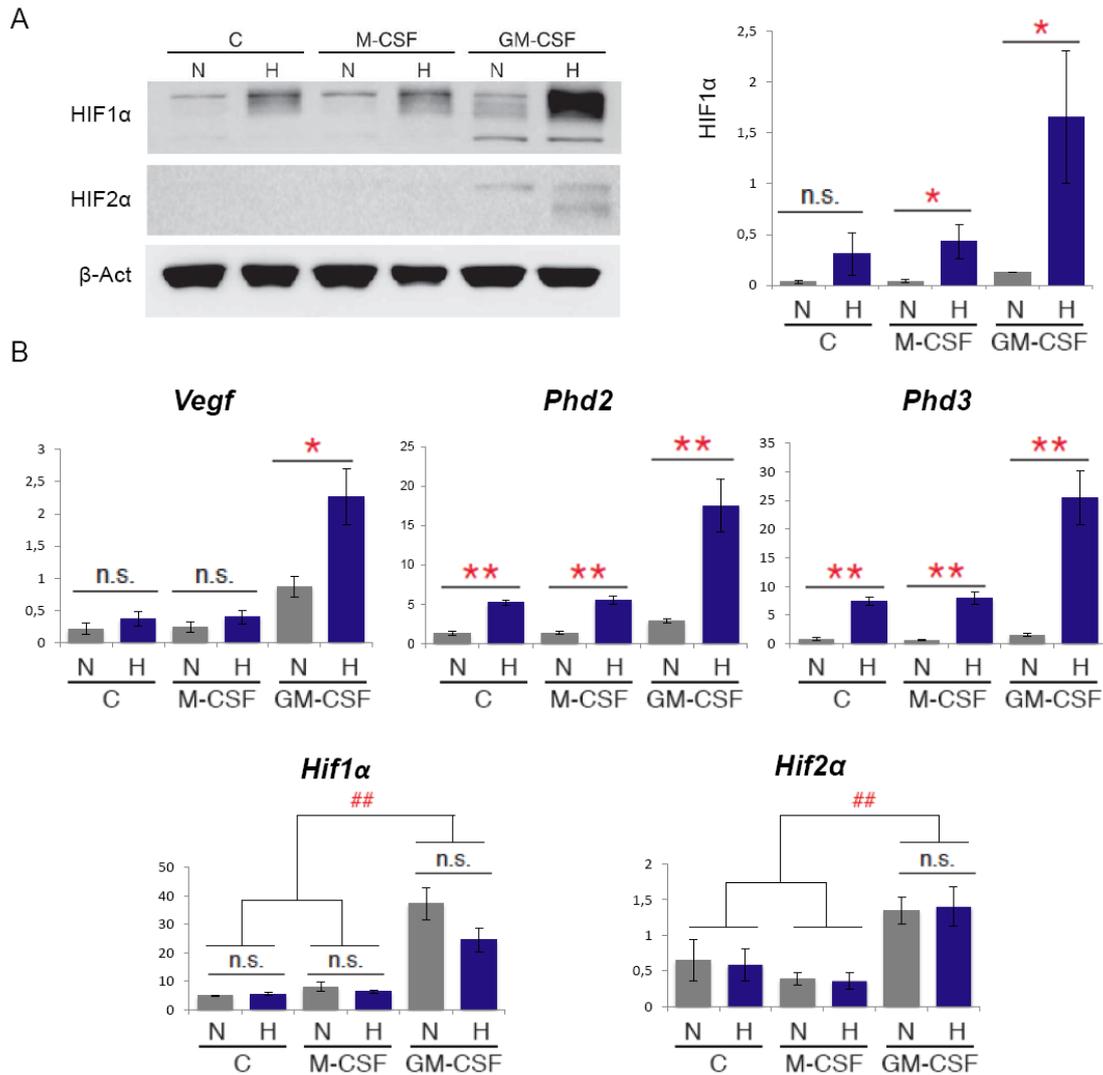


Figura 20. La combinación de inflamación e hipoxia da lugar a una exarcebación de la respuesta de HIF1α. A, Imagen representativa de los niveles de HIF1α obtenida por Western Blot (gráfico de la izquierda) en los cultivos primarios tratados con las citoquinas M-CSF y GM-CSF de manera crónica (20 días) y expuestos a normoxia (21% de O₂, columnas grises) o hipoxia (1% de O₂, columnas azules). Como control de carga se usó la β-Act. En el panel gráfico de la derecha se muestra la cuantificación de los niveles de proteína de HIF1α/β-Act [n = 4; Análisis univariante de la varianza (UAV)]. B, Niveles relativos de mRNA en unidades arbitrarias de los genes diana de HIF1α *Vegf*, *Phd2* y *Phd3*, así como de los genes *Hif1α* y *Hif2α* estimados por qRT-PCR de las células tratadas como en A. Como control endógeno se analizaron los niveles del gen *Hmbs* (n = 8) ## p < 0.01 (Prueba de Bonferroni). * p < 0.05; ** p < 0.01; n.s. diferencias no significativas (Prueba T de Student).

Análisis por WB frente a HIF1 α mostraron un claro aumento de este factor en los cultivos tratados con GM-CSF expuestos a hipoxia en comparación con los cultivos control o tratados con M-CSF, donde la respuesta a la hipoxia fue claramente inferior (Figura 20a). Para confirmar estos resultados se cuantificó la expresión de los genes diana de HIF1 α *Phd2*, *Vegf* y *Phd3*, observando una clara exacerbación de la respuesta a la hipoxia en los cultivos tratados con GM-CSF (Figura 20b). Todos estos datos confirman la hipótesis de que existe una sinergia entre hipoxia e inflamación que da lugar a una exacerbación de la respuesta a la hipoxia en la microglía en presencia de un estímulo pro-inflamatorio. Este aumento de los niveles de la proteína HIF1 α en hipoxia puede explicarse por el incremento de la expresión del gen *Hif1 α* en los cultivos tratados con GM-CSF (Figura 20b) en condiciones normales de oxígeno, disparándose su estabilización en hipoxia al inhibirse la acción de las PHDs. También se observó un incremento de la expresión del gen *Hif2 α* aunque inferior a los niveles de acumulación de *Hif1 α* , sin embargo sólo se observó una ligera estabilización de esta proteína en hipoxia en los cultivos tratados con GM-CSF (Figura 20b) por lo que no parece que HIF2 α tenga un papel relevante en la respuesta de la microglía a la hipoxia ni en condiciones normales ni bajo un estímulo pro-inflamatorio.

Con el objetivo de profundizar en los mecanismos moleculares que regulan los efectos de la hipoxia y la inflamación sobre la quimiotaxis/migración y el ciclo celular de la microglía, se analizó la expresión de diferentes genes relacionados con estos procesos celulares. La hipoxia regula el ciclo celular contrarrestando la función de Myc. HIF1 α desplaza a Myc de diversos promotores, dando lugar entre otros efectos a la activación del locus *p21^{CIP1}*, un regulador clave del punto de control de G1 (Koshiji, Kageyama et al. 2004). Se quiso comprobar si la acumulación de HIF1 α producida por la combinación de hipoxia y el tratamiento con GM-CSF podía dar lugar a un aumento de la expresión de *p21^{CIP1}*. De este modo se observó que la hipoxia *per se* o en combinación con el tratamiento de M-CSF no produjo ninguna activación del mRNA de *p21^{CIP1}*. Sin embargo la combinación de hipoxia y GM-CSF dio lugar a un claro aumento de los niveles de mRNA de este gen (Figura 21). También se comprobaron otros genes relacionados con ciclo celular y migración, como el gen *Mif* (*Macrophage migration inhibitory factor*) relacionado con la inhibición de ambos procesos celulares (Oda, Oda et al. 2008) observando una clara acumulación en los cultivos expuestos a hipoxia independientemente del tratamiento, siendo este incremento más marcado en los

cultivos tratados con GM-CSF (Figura 21). No se observaron, sin embargo, diferencias en otros genes relacionados con el ciclo celular como *Brc1* (*breast cancer 1* o “cáncer de mama 1”), o con la quimiotaxis o migración como *Ccr2* (receptor de quimioquinas C-C tipo 2), *Cd36* (Cluster de diferenciación 36 o traslocasa de ácidos grasos) o *Tlr4*. Serán necesarios estudios de silenciamiento frente a los genes *Mif* y *p21^{CIP1}* para determinar su papel en la regulación de la microglía por la hipoxia.

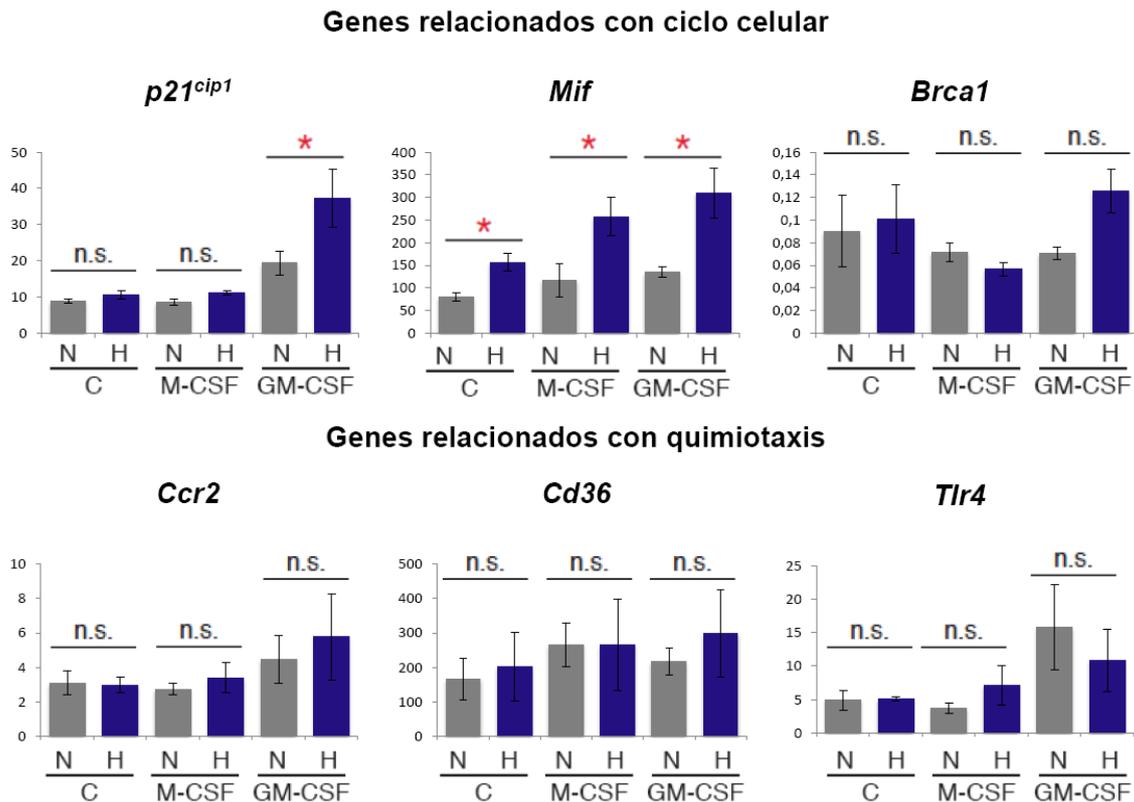


Figura 21. La combinación de inflamación e hipoxia da lugar a un aumento de la expresión de algunos genes relacionados con el ciclo celular. Niveles relativos de mRNA en unidades arbitrarias de genes relacionados con el ciclo celular y la quimiotaxis estimados por qRT-PCR a partir del RNA de las células tratadas con citoquinas M-CSF y GM-CSF de manera crónica (20 días) y expuestas a normoxia (21% de O₂, columnas grises) o hipoxia (1% de O₂, columnas azules) Como control endógeno se utilizó el gen *Hmbs* (n = 8). * $p < 0.05$; n.s. diferencias no significativas (Prueba T de Student).

Por último, como se indicaba en la introducción, diversos estudios sugieren que junto con la inflamación asociada a la enfermedad de Alzheimer se produce un descenso concomitante de los niveles de oxígeno en el cerebro (Roher, Debbins et al. 2012). En este sentido se ha demostrado que en modelos animales de EA se produce un incremento de los niveles de HIF1 α en comparación con animales silvestres (Soucek, Cumming et al. 2003). Para determinar si realmente se genera un ambiente hipóxico en

los cerebros de pacientes y si la sinergia observada entre hipoxia e inflamación puede ser relevante en humanos, se analizaron los niveles de HIF1 α mediante WB a partir de extractos de hipocampo obtenidos de sujetos control sanos jóvenes y de enfermos de edad avanzada estratificados siguiendo la clasificación de estados Braak and Braak (Braak and Braak 1991). De este modo se observó un incremento en los niveles de HIF1 α en las muestras correspondientes a los pacientes en estados tempranos de la enfermedad, siendo muy marcado en los estados II y III/IV de la patología (Figura 22). En los estados V y VI se observó un ligero descenso en los niveles de HIF1 α asociado a la atrofia y muerte celular descrita en esos estados de la enfermedad (Braak and Braak 1991).

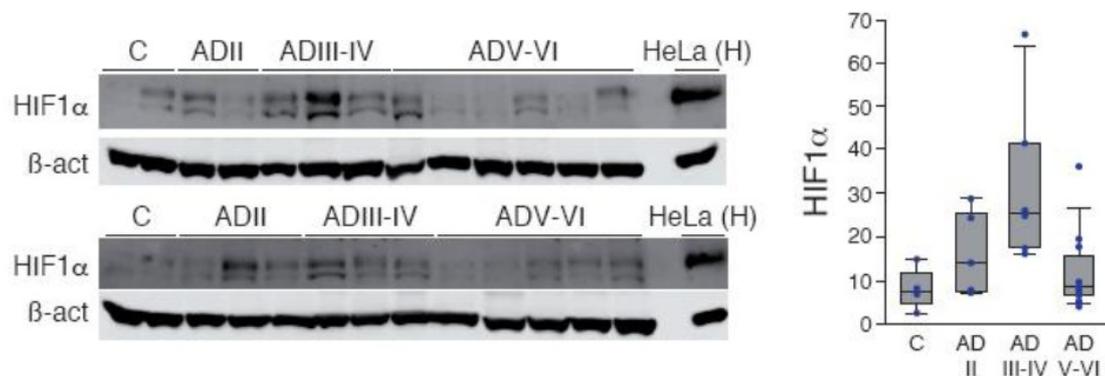


Figura 22. Los cerebros de pacientes con EA presentan elevados niveles del marcador de hipoxia HIF1 α . Los niveles de HIF1 α se estimaron mediante Western Blot a partir de los extractos proteicos de hipocampo humanos. Se usaron muestras obtenidas de sujetos control sanos (C) y de pacientes con EA clasificadas en los estados Braak and Braak II (ADII), III-IV (ADII-IV), y V-VI (ADV-VI). Como control de carga se usaron los niveles de β -act. Para identificar el peso molecular de HIF1 α se utilizó un extracto de proteínas de células HeLa expuestas a hipoxia (1% de O $_2$, 4 h). El gráfico de la derecha muestra la cuantificación de los niveles de HIF1 α / β -act (Test Kruskal-Wallis).

Análisis del efecto de la hipoxia sobre el metabolismo del A β

Como se indicaba en la introducción, resultados previos del grupo habían demostrado que la hipoxia no tiene ningún efecto sobre la expresión de las enzimas relacionadas con el metabolismo del A β *in vivo*. Para analizar si el efecto de la hipoxia sobre la microglía tiene alguna consecuencia sobre la acumulación de A β en el cerebro se llevaron a cabo análisis frente al beta amiloide de los cerebros de los ratones con EA expuestos a normoxia e hipoxia. De este modo se observó mediante inmunohistoquímica para A β 1-42 que con el desarrollo de la enfermedad se produce un aumento de la carga y del número de placas de A β en el hipocampo de los animales con EA, siendo mayor en los

animales transgénicos de 14 meses que en los de 8. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los animales expuestos a normoxia o hipoxia, independientemente de la edad (Figura 23a, b y c). Así mismo, el análisis de la cantidad de A β mediante ELISA en los extractos totales de los cerebros tampoco mostró diferencias entre los grupos de normoxia e hipoxia (Figura 23d).

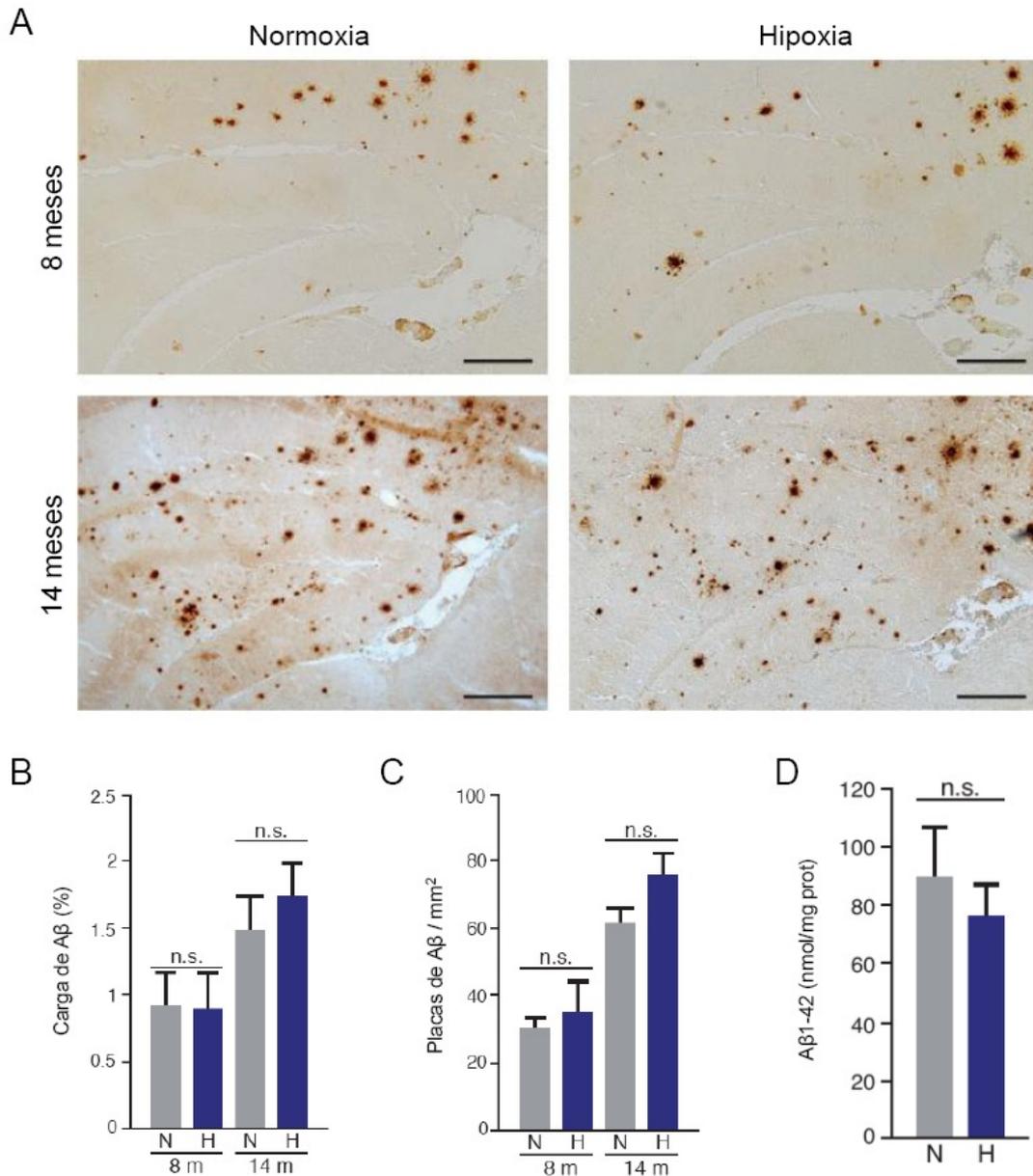


Figura 23. Los niveles de A β no se ven modificados por la hipoxia crónica sostenida. A, Imágenes representativas de secciones de hipocampo de los ratones con EA de 8 (8m) y 14 meses (14m) de edad expuestos a normoxia (20 días al 21%) o hipoxia crónica (20 días al 9%) obtenidas mediante tinción inmunohistoquímica frente a A β . La barra de escala es de 100 μ m. B, La carga de A β se estimó en las rodajas de hipocampo calculando el porcentaje de área total teñida para A β (n = 8; 4 animales). C, Cuantificación del número de placas por área en mm² (n = 8; 4 animales). D, Cuantificación por ELISA de los niveles de A β 1-42 en los extractos totales obtenidos a partir de los animales con EA de 14 meses expuestos a normoxia e hipoxia. n.s. diferencias no significativas (Prueba T de Student).

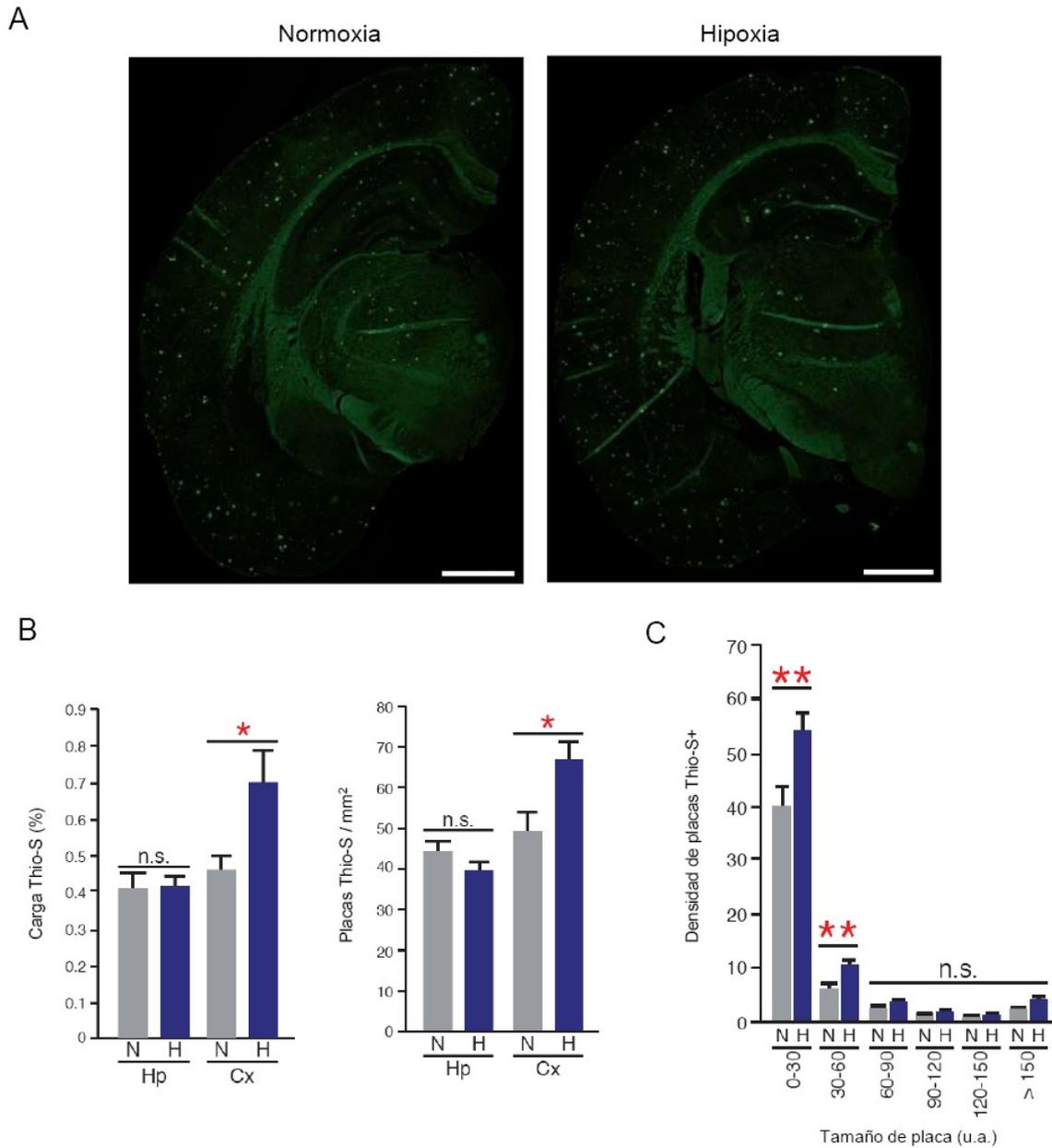


Figura 24. La hipoxia crónica modifica la distribución de placas de A β . A, Imágenes representativas de secciones de cerebro completo de los ratones con EA de 14 meses (14m) de edad expuestos a normoxia (20 días al 21%) o hipoxia crónica (20 días al 9%) obtenidas mediante tinción Thio-S. La barra de escala es de 1 mm. B, En el gráfico izquierdo se muestra la carga de Thio-S en porcentaje con respecto al área total en la corteza (Cx) y en el hipocampo (Hp) de los animales en A. El gráfico derecho representa la cuantificación del número de placas por área en mm² (n = 8; 4 animales). D, Distribución de tamaño de la densidad de placamThio-S (n = 8; 4 animals). * p < 0.05; ** p < 0.01; n.s. diferencias no significativas (Prueba T de Student).

Se ha propuesto que la microglía podría actuar como una barrera rodeando las placas de núcleo denso (Lucin and Wyss-Coray 2009) por lo que, para estudiar si la despoblación de microglía en los animales hipóxicos con EA tiene un efecto sobre la formación de placas, se analizó la cantidad de placas de núcleo denso Thio-S positivas en la corteza e

hipocampo en los ratones viejos con EA. Se observó un aumento significativo tanto de la carga como del número de placas Thio-S en la corteza de los animales hipóxicos (Figura 24a y b). La comparación de la distribución del tamaño de placa Thio-S positivas en la corteza mostró un aumento significativo del número de placas de pequeño tamaño en los animales hipóxicos con respecto al grupo de normoxia (Figura 24c), sugiriendo la formación de nuevas placas de núcleo denso en estos animales. Sin embargo, no se observaron diferencias ni en la carga ni en el número de placas Thio-S positivas entre los animales de hipoxia y normoxia al analizar el hipocampo (Figura 24a y b), una región donde la acumulación de A β comienza antes pero a una tasa más baja que en la corteza (Garcia-Alloza, Robbins et al. 2006).

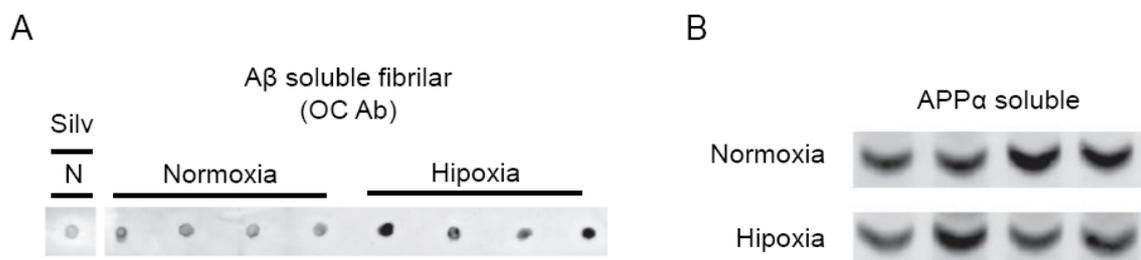


Figura 25. La hipoxia crónica aumenta la cantidad de A β fibrilar soluble en los cerebros de los ratones con EA. A, Imagen representativa de análisis por Dot Blot de los niveles de A β fibrilar en los extractos solubles de corteza obtenidos de animales de 14 meses silvestres (Silv.) y con EA expuestos 20 días a normoxia (21% de O₂) o hipoxia (9% de O₂) mediante el uso del anticuerpo OC. B, Análisis mediante Western Blot de los niveles de APP α soluble en los mismos extractos que en A.

Posteriormente se cuantificaron los niveles de A β 1-42 en la fracción soluble de extractos de corteza mediante ELISA, no observándose diferencias significativas entre los animales expuestos a normoxia o hipoxia (Datos no mostrados) al igual que ocurre con los niveles totales. Debido a la importancia de los oligómeros de A β en la enfermedad se analizaron estas especies usando anticuerpos sensibles a la conformación (Glabbe 2008) observando diferencias entre las dos condiciones en los animales de 14 meses. El estudio mediante western blot no reveló diferencias en formas oligoméricas entre los animales normóxicos e hipóxicos usando los anticuerpos 6e10 y 82e1 (Datos no mostrados), sin embargo, el análisis de los extractos solubles por Dot Blot con el anticuerpo OC, que reconoce formas fibrilares de A β , mostró un incremento de éstas en los animales hipóxicos (Figura 25a) y se descartó que se debiera a un cambio en la proteólisis de la APP al no observarse diferencias en los niveles de APP α entre los animales (Figura 25b). Por lo que se podría decir que la hipoxia no parece tener un

efecto sobre la producción, acumulación o eliminación del A β , pero si sobre su solubilidad.

Estudio del papel de la hipoxia sobre la progresión de la enfermedad de Alzheimer

Las placas seniles están rodeadas de neuritas distróficas que pueden ser el resultado de un efecto neurotóxico del A β , sin embargo, como se mostró anteriormente, el contenido total de A β no se modifica con la hipoxia crónica (Figura 23). La presencia de oligómeros y formas fibrilares del A β en los extractos solubles de cerebros de modelo de EA ha sido relacionada con un aumento del deterioro cognitivo y de la patología de Tau (Benilova, Karran et al. 2012, Chabrier, Blurton-Jones et al. 2012) y, como se indicaba en el apartado previo, los extractos solubles de corteza de los animales hipóxicos presentaron un claro incremento en la acumulación de las formas fibrilares (Figura 25a). Para ver si la afectación de la microglía y el aumento del A β fibrilar en la fracción soluble tienen un efecto sobre la progresión de la enfermedad, se llevó a cabo un estudio inmunohistoquímico con diversos marcadores descritos como buenos indicadores del daño neuronal.

La forma fosforilada de la proteína Tau (P-Tau) se encuentra asociada normalmente con las placas de A β y es un marcador de afectación sináptica bien establecido (Tanzi and Bertram 2005). Junto al aumento del número de neuritas distróficas y del daño neuronal también está descrito que se produce un incremento de los niveles de ubiquitina, por lo que además de los niveles de marcaje P-Tau se evaluaron los de ubiquitina alrededor de placa en los animales transgénicos de 14 meses expuestos a normoxia o hipoxia crónica. Las placas corticales de los animales hipóxicos mostraron un claro incremento de la tinción para ubiquitina (Figura 26a). El efecto fue el mismo al analizar el marcaje P-Tau y su cuantificación reveló un aumento significativo de neuritas distróficas (Figura 26b), por lo que la hipoxia daría lugar a una aceleración de la patología en la corteza. Sin embargo, asociado a las placas de A β en el hipocampo no se observó ningún aumento significativo de ninguno de estos dos marcadores. El análisis de la apoptosis alrededor de placa en corteza e hipocampo mediante inmunohistoquímica frente a Caspasa 3 activada mostró un claro aumento de marcaje asociado a las placas pero tampoco reveló diferencias entre animales expuestos a normoxia o hipoxia (Figura 26c).

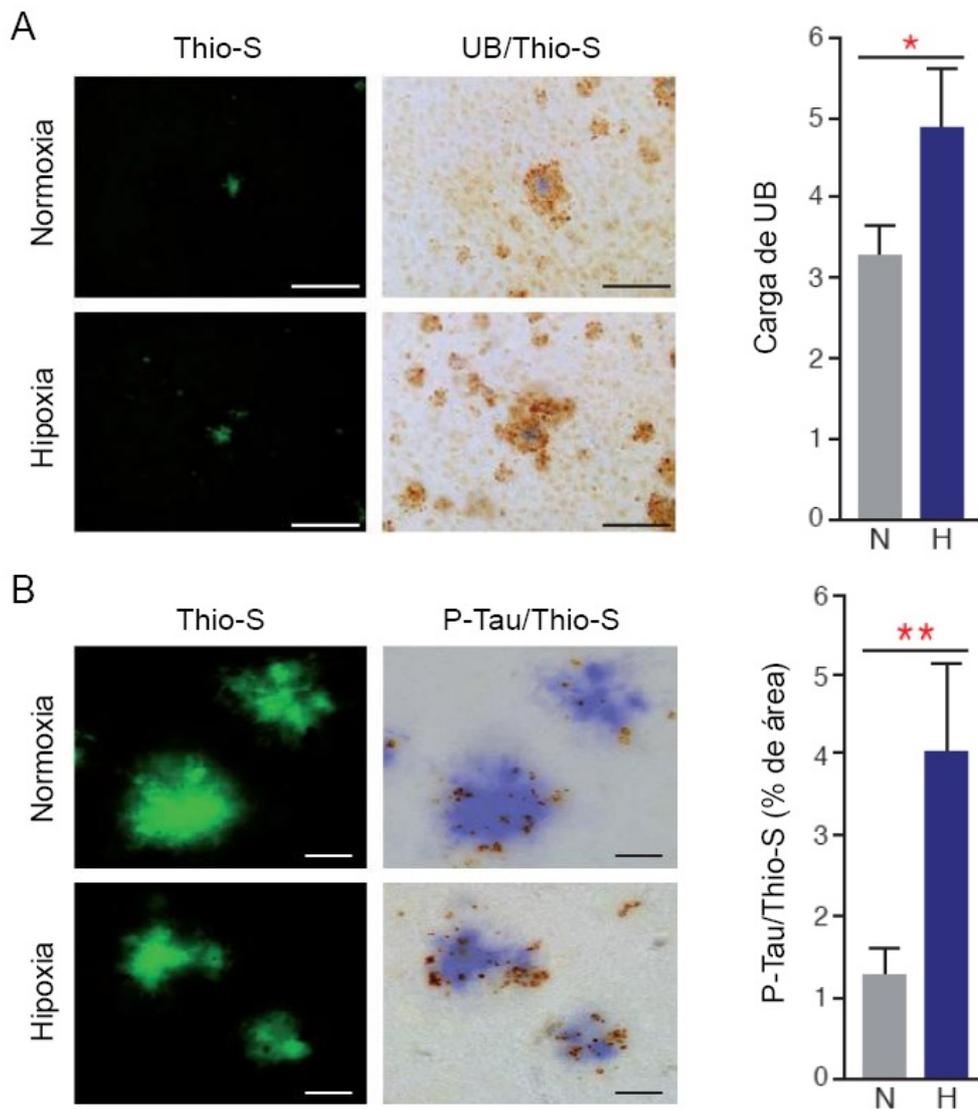


Figura 26. La hipoxia acelera la progresión de la EA. Los animales de 14 meses con EA fueron expuestos a normoxia (N, 21% de O₂) o hipoxia (H, 8.5% de O₂) durante 20 días. A, Secciones corticales teñidas con Thio-S (paneles izquierdos) y ubiquitina/Thio-S (UB/Thio-S, paneles derechos). Barra de escala de 100 μ m. El gráfico de la derecha muestra la cuantificación del porcentaje de carga de UB (n = 8; 4 animales). B, Secciones corticales teñidas con Thio-S (paneles de la izquierda) y fosfo-Tau/Thio-S (P-Tau/Thio-S, paneles de la derecha). La barra de escala es de 20 μ m. El gráfico de la derecha muestra la cuantificación del porcentaje de área de placa de A β ocupada por neuritas P-Tau+ (n = 13 – 18 placas de 4 animales). * p < 0.05; ** p < 0.01 (Prueba T de Student).

Para profundizar en el efecto de la hipoxia sobre la progresión de la enfermedad en el hipocampo, se analizaron los niveles de mRNA de somatostatina (*Sst*) y neuropéptido Y (*Npy*) por RT-qPCR, ambos marcadores de poblaciones neuronales descritas como ser las primeras en verse afectadas en fases tempranas de la enfermedad en modelos animales en esta región del cerebro (Ramos, Baglietto-Vargas et al. 2006). El análisis del hipocampo de los animales hipóxicos reveló un claro descenso de ambos marcadores cuando lo comparamos con los animales normóxicos (Figura 27a). A pesar

de ello, no se observaron diferencias en el número de neuronas mediante el análisis inmunohistoquímico frente al marcador Neu-N en ninguna de las dos regiones del cerebro (Figura 27b).

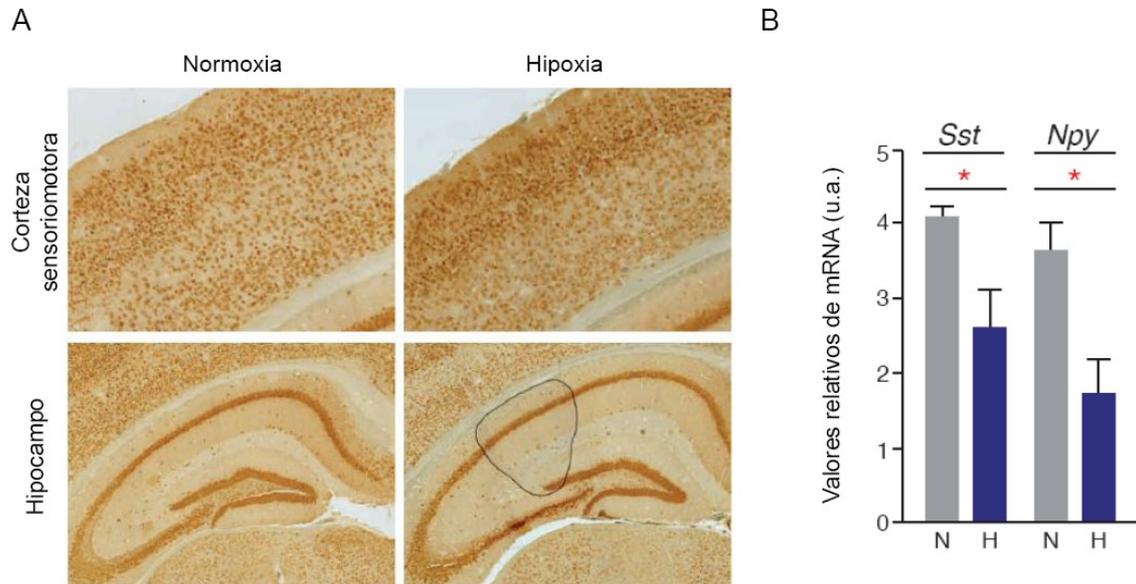


Figura 27. Afectación neuronal bajo hipoxia crónica en los ratones con EA de 14 meses. A, Imágenes representativas de secciones de corteza (paneles superiores) e hipocampo (paneles inferiores) de rodajas de cerebro teñidas con anticuerpo frente a Neu-N de animales de 14 meses con EA expuestos a normoxia (21% de O₂, paneles izquierdos) o hipoxia (9% de O₂, paneles derechos) durante 20 días. B, Estimación mediante qRT-PCR de los niveles de mRNA de los marcadores neuronales somatostatina (Sst) y neuropéptido Y (Npy) en extractos de hipocampo de los animales de 14 meses expuesto a normoxia (N, columnas grises) o hipoxia (H, columnas azules) (u.a. unidades arbitrarias). Como control endógeno se usó el gen *Gapdh*. (n = 4). * $p < 0.05$ (Prueba T de Student).

Todas estas observaciones sugieren claramente que la patología de A β está extendida en los animales hipóxicos debido probablemente a la ausencia de una barrera microglial normal cercana a las placas.

Discusión

Diversos estudios epidemiológicos sugieren que patologías que cursan una hipoxia sistémica están asociadas con un incremento del riesgo de desarrollar demencia en pacientes de Alzheimer (Schneider, Arvanitakis et al. 2007, Ogunshola and Antoniou 2009). Por otro lado, estudios de asociación han propuesto además un papel de la inmunidad innata en la modulación de la EA (Jones, Holmans et al. 2010, Lambert, Grenier-Boley et al. 2010, Golde, Streit et al. 2013), en este sentido se ha demostrado recientemente mediante el análisis funcional de dos variantes génicas asociadas con el Alzheimer que la a la baja de la fagocitosis en la microglía puede ser causa o provocar el desarrollo de la enfermedad (Golde, Streit et al. 2013, Griciuc, Serrano-Pozo et al. 2013).

El linaje mieloide se regula por hipoxia, en particular, los macrófagos regulan su capacidad fagocítica y migratoria por hipoxia, sufriendo cambios profundos en su programa genético a bajos niveles de oxígeno (Turner, Scotton et al. 1999, Murdoch and Lewis 2005, Anand, Gribar et al. 2007, Fang, Hughes et al. 2009). A pesar de esto, ningún estudio ha analizado el papel de la microglía en modelos de enfermedad de Alzheimer que cursen con hipoxia sostenida. Para investigar el efecto que pudiera tener la hipoxia sobre el progreso de la enfermedad se ha analizado *in vivo* como la hipoxia modifica el comportamiento de la microglía en un modelo de la enfermedad.

De manera complementaria también se estudió el efecto de la hipoxia fisiológica sobre la microglía y los astrocitos *in vitro*, así como el papel de las PHDs en dicho proceso, y se determinó por otro lado la existencia de una activación hipóxica en los cerebros de pacientes de Alzheimer.

La hipoxia produce un descenso de la densidad de la microglía así como una depopulación de las placas de A β en un modelo de EA

En esta tesis se muestra que animales con EA expuestos a hipoxia crónica presentan una alteración específica de la de la microglía, en su densidad total y más concretamente alrededor de las placas seniles, que no se observa en astrocitos. Este último descenso se da tanto en el número de células rodeando las placas de A β como en la superficie de placa ocupada por proyecciones de microglía.

El análisis de los animales silvestres reveló un descenso no significativo en el número

de células de microglía en el hipocampo de los animales viejos expuestos a hipoxia. Los animales jóvenes con Alzheimer (8 meses de edad) presentaban también una tendencia a disminución en hipoxia, pero este descenso sólo fue significativo en los animales viejos (14 meses de edad). Así, sólo observamos un fuerte fenotipo en la microglía cuando combinamos hipoxia y animales viejos de Alzheimer. Diversos estudios han mostrado una afectación de la microglía asociada al envejecimiento, tanto en ratones como en humanos. Baron y colaboradores mostraron que la microglía en animales viejos (21 meses de edad) presenta menos ramificaciones que en animales jóvenes (Baron, Babcock et al. 2014). Esta "patología microglial" se observa entre los 9-15 meses en diferentes modelos de Alzheimer, sugiriendo que la acumulación de A β puede acelerar el envejecimiento de la microglía. Estudios realizados en humanos también muestran una patología similar en la microglía (Streit 2006). El análisis de la fragmentación del DNA en cerebros de pacientes de EA han mostrado que una de las poblaciones más afectadas por la enfermedad es la microglía asociada a placas (Lassmann, Bancher et al. 1995), siendo este resultado confirmado en un estudio posterior (Yang, Sun et al. 1998). En los cerebros de pacientes de Alzheimer se pueden encontrar células microgliales distróficas asociadas con placas seniles tau-positivas, lo que sugiere que la senescencia de la microglía puede contribuir a la progresión de la enfermedad (Streit and Xue 2009). Todo esto lleva a suponer que tanto en animales modelo como en humanos, la patología de la microglía se encuentra asociada a la edad y parece acelerarse por la enfermedad de Alzheimer. Los datos presentados en esta tesis sugieren claramente que la hipoxia podría ser uno de los factores que contribuyen en gran medida a esta patología de la microglía observada tanto en el envejecimiento como con la EA.

La pérdida de la microglía alrededor de las placas podría dar lugar a un aumento de la extensión de la patología de A β a través del parénquima cerebral adyacente. Algunos autores han propuesto que la ausencia de microglía no cambia la progresión de la enfermedad en modelos animales (Grathwohl, Kalin et al. 2009), sin embargo, ellos sólo analizaron la tinción APP en neuritas distróficas, un parámetro que es a la vez la causa de la enfermedad en el modelo animal que emplean. Para analizar si la afectación de la microglía tiene un efecto sobre la enfermedad se estimaron los oligómeros solubles de A β fibrilar, observando un incremento en las fracciones de hipocampo extraídas de animales hipóxicos, lo que sugiere una reducción en la función de barrera de la microglía. En consonancia con esta observación, una investigación previa mostró

el mismo efecto en un modelo genético deficiente en *Ccr2*, donde la acumulación de la microglía alrededor de las placas de A β se vio también afectada de manera importante y que presenta una aceleración de la patología de Alzheimer (El Khoury, Toft et al. 2007). Sin embargo, no puede aseverarse que el aumento de dichos oligómeros fibrilares se deba a un incremento de la liberación a partir de las placas, y que a su vez esto sea consecuencia de la ausencia de microglía. En este sentido, el análisis de los oligómeros solubles totales mediante el uso de anticuerpos específicos no mostró un incremento de estos en los animales hipóxicos. El hecho de que sólo aumenten los niveles de A β fibrilar y no de otros oligómeros solubles podría deberse a un efecto de la hipoxia sobre la oligomerización del A β , su solubilidad o sobre la capacidad fagocítica de la microglía.

La hipoxia provoca una reducción de la proliferación y de la quimiotaxis de la microglía

El arresto o parada del ciclo celular es una consecuencia de la hipoxia bien descrita (Koshiji, Kageyama et al. 2004) donde HIF1 α juega un papel importante desplazando la unión de *Myc* del promotor del inhibidor del ciclo celular *p21^{cip1}*, dando lugar a la sobreexpresión de este último. Sin embargo, el arresto celular está normalmente asociado a unos niveles de oxígeno menores que los que se usaron en esta tesis. El análisis realizado tanto en líneas celulares como cultivos primarios reveló una clara caída en la proliferación en condiciones de hipoxia, que mostró ser reversible y que puede reproducirse en normoxia mediante la adición del inhibidor de las proli-hidroxilasas DMOG, sugiriendo la implicación de HIF o de las PHDs en su regulación. Además, el análisis en cultivos primarios del efecto combinado de la hipoxia e inflamación mediante la adición de la citocina GM-CSF, mostró que la combinación de los dos estímulos da lugar a un aumento de la expresión del gen *p21^{cip1}*. Así mismo, el análisis inmunohistoquímico de los cerebros de los ratones con EA avanzada reveló una clara reducción de la proliferación microglial en los expuestos a hipoxia, donde se combinaba al igual que en los cultivos estímulo pro-inflamatorio y bajos niveles de oxígeno. Por todo esto, sería interesante profundizar en futuros estudios en la posible implicación del gen *p21^{cip1}* en la regulación del ciclo celular por la hipoxia. Por otro lado, la hipoxia normalmente también da lugar a una reducción en el crecimiento celular (Koshiji, Kageyama et al. 2004), algo que también se observó en los cultivos primarios

cuando fueron expuestos a hipoxias largas.

Las células mieloides deben llevar a cabo su acción defensiva en ambientes hipóxicos donde combaten la infección, facilitan la inflamación, estimulan la inmunidad adaptativa o participan en funciones de reparación de tejidos (Lewis, Lee et al. 1999). Por otro lado, estas células están altamente adaptadas a la hipoxia debido a su metabolismo glicolítico y a un programa genético que les permite sobrevivir a bajos niveles de oxígeno (Cramer, Yamanishi et al. 2003, Murdoch and Lewis 2005, Walmsley, Print et al. 2005, Bosco, Puppo et al. 2008). Está bien descrito que los monocitos son atraídos a tejidos hipóxicos donde se diferencian a macrófagos. En este proceso, monocitos y macrófagos regulan genes relacionados con la migración y quedan atrapados en dichos ambientes hipóxicos (Turner, Scotton et al. 1999, Bosco, Puppo et al. 2008). A pesar de la importancia de la hipoxia en la progresión de la enfermedad de Alzheimer, ningún estudio previo analiza en control de la quimiotaxis de la microglía por la hipoxia. Los resultados presentados en esta tesis muestran un claro descenso en la quimiotaxis de la microglía hacia el A β y el ATP al exponerla a condiciones de hipoxia, tanto en una línea celular como en cultivo primario. Este fenómeno también se reprodujo en normoxia en presencia de DMOG, lo que sugiere un papel de HIF o de las PHDs en la inhibición observada en hipoxia de la quimiotaxis, al igual que se observó en la proliferación. No se pudo analizar, sin embargo, el efecto de la hipoxia sobre la capacidad migratoria o quimiotáctica de la microglía *in vivo*, al realizarse dicha exposición dentro de una cámara sin un sistema de imagen acoplado.

La adaptación de los macrófagos a la hipoxia depende principalmente de los factores de transcripción HIF, aunque se han descrito otros mediadores (Cramer, Yamanishi et al. 2003, Walmsley, Chilvers et al. 2009). La adaptación de la microglía a la hipoxia es reminiscente de macrófagos atrapados en tejidos hipóxicos, una situación que puede ser en algunos casos deletérea para el hospedador debido a la secreción de citocinas pro-angiogénicas. Como se indicaba previamente, se ha descrito que la microglía activa alrededor o asociada a las placas muere por apoptosis (Lassmann, Bancher et al. 1995, Yang, Sun et al. 1998), como consecuencia de inflamación crónica o de la fagocitosis de A β (Streit 2006, Baron, Babcock et al. 2014). Bajo circunstancias no patogénicas, la microglía residente se mantendrá en su lugar y se preparará para realizar su función inmune normal. En los cerebros con EA, en condiciones normales, la microglía del

parénquima adyacente prolifera y migra hacia las placas de A β y recupera la barrera. Imágenes *in vivo* han mostrado que las placas pueden formarse en 24 horas (García-Alloza, Robbins et al. 2006) y análisis *ex vivo* ha mostrado que la microglía se encuentra casi siempre asociada a ellas, indicando un proceso altamente dinámico (Jimenez, Baglietto-Vargas et al. 2008). Sin embargo, es posible especular que en cerebros que sufran hipoxia y Alzheimer, la muerte celular de la microglía alrededor de las placas en combinación con la reducción de la capacidad quimiotáctica y de la tasa proliferativa, de lugar a una despoblación o ausencia de estas células alrededor de las placas seniles. La clara reducción de la densidad microglial en el cerebro completo y en particular de la asociada a las placas de A β en sólo 20 días de hipoxia podría ser indicativo de la existencia un proceso dinámico alrededor de estas.

Para apoyar esta hipótesis, un estudio reciente ha demostrado que la microglía tiene una alta capacidad proliferativa, así como la existencia de precursores en el cerebro capaces de repoblarlo de manera completa en menos de una semana (Elmore, Najafi et al. 2014). Además, se ha descrito la existencia de marcadores mitóticos alrededor de placa en modelos de Alzheimer (Kamphuis, Mamber et al. 2012). Sin embargo, la capacidad proliferativa de la microglía en los pacientes de Alzheimer se ha puesto en duda en un estudio reciente (Serrano-Pozo, Gomez-Isla et al. 2013). Por tanto, es necesario llevar a cabo análisis más profundos para extender las observaciones encontradas a modelos animales y a la enfermedad en humanos.

La importancia de la vía de HIF o de las PHDs en los fenotipos observados en la microglía debería ser objeto de estudio, por lo que el uso de modelos genéticos que sobreexpresen o tengan suprimido alguno de estos genes e incluso la combinación de estos con un modelo de Alzheimer podrían ser de ayuda, por un lado, para dilucidar los mecanismos que subyacen a dichos cambios, así como, por otro lado, analizar el efecto sobre la migración o quimiotaxis de la microglía *in vivo*, algo que no se ha podido analizar en esta tesis. Sin embargo, si se ha observado mediante análisis moleculares de cultivos primarios de microglía y astrocitos expuestos a hipoxia, que la estabilización de HIF1 α en la microglía es menor a la observada en otros tipos celulares, lo cual podría indicar una regulación de la respuesta a hipoxia en estas células diferente a la habitual. Así mismo, estos cultivos mostraron una mayor sensibilidad al DMOG, presentando una elevada estabilización de HIF1 α a concentraciones de este inhibidor menores a las

normales de uso, así como una alta apoptosis a concentraciones normales. No observamos en ningún caso estabilización de HIF2 α en la microglía, a diferencia de lo que ocurre en astrocitos. Que este efecto del DMOG sobre la viabilidad sea específico de la inhibición de las prolihidroxilasas o de la estabilización de HIF1 α , o que por el contrario se deba a un efecto inespecífico sobre el metabolismo mitocondrial u otro efecto adverso, requiere un estudio en mayor profundidad. El uso de otros inhibidores específicos de las PHDs o estudios de silenciamiento de estos genes o de *Hif1 α* podrían esclarecer el papel de cada uno de ellos en la respuesta de la microglía. En este sentido, se observó que cultivos primarios de microglía realizados a partir de ratones mutantes para PHD3 y PHD2 presentan *per se* en normoxia una clara reducción en el número de células en comparación con los animales silvestres, no observándose cambios por contra en cultivos mutantes para PHD1, lo que sugiere una posible implicación de estas dos primeras enzimas en la supervivencia o en la proliferación de la microglía. Este resultado también sugiere un papel de HIF1 α en todo el proceso, al ser estas dos PHDs las principales responsables de la regulación de su estabilización. En el caso de PHD3, a partir de los datos observados, esta hipótesis de la posible implicación e importancia en la función de la microglía se corresponde con los resultados de un estudio reciente, donde se demuestra que este gen es uno de los más sobreexpresados en la microglía de cerebros de ratones con EA (Orre, Kamphuis et al. 2014).

Sin embargo, hay que tener en cuenta que el protocolo utilizado en esta tesis para la obtención de cultivos primarios de microglía sigue siendo objeto de debate (Saura 2007). Los cultivos obtenidos mediante el procedimiento descrito presentan una alta tasa de muerte neuronal y de otros tipos celulares, por lo que presentan una alta cantidad de restos celulares y detritos que podrían dar lugar a una activación de la microglía. Sería adecuado por tanto en futuros estudios, realizar estos mismos experimentos sobre microglía aislada directamente de cerebros adultos mediante citometría de flujo como ha sido descrito en un estudio reciente (Orre, Kamphuis et al. 2014). De este modo, se obtendría una microglía más parecida a la que se encuentra de manera natural en el cerebro, una microglía quiescente que poder utilizar como verdadero control.

La hipoxia sostenida no modifica el metabolismo de A β

Diversos estudios han sugerido la modulación del procesamiento de A β por hipoxia. No

obstante, estos estudios *in vivo* se basaron en la exposición de los animales a ciclos de hipoxia reperusión (Sun, He et al. 2006, Li, Hong et al. 2009), condición que regula por sí misma gran cantidad de genes y que se ha asociado con un incremento del estrés oxidativo en varias situaciones patológicas (Dewhirst, Cao et al. 2008, Lavie and Polotsky 2009). Sun y colaboradores expusieron los animales a 30 días de hipoxia a ciclos diarios de 16 horas al 8% de O₂ seguidos de 8 horas bajo condiciones de normoxia. Li y colaboradores usaron un protocolo de 60 días donde los animales sufrían una asfixia, durante unos pocos segundos, una vez al día. Aunque estos modelos eran interesantes, no se asemejan a patologías humanas que cursan con hipoxia sostenida, como la enfermedad obstructiva pulmonar crónica (COPD), enfermedades cardiovasculares, o situaciones en las que el flujo sanguíneo cerebral se reduce. Algunas de estas patologías humanas se han sugerido como importantes contribuidoras en la demencia en la enfermedad de Alzheimer (Dotti and De Strooper 2009). Es por esto que un modelo de hipoxia sostenida podría ser muy relevante de cara a clarificar si la hipoxia tiene un efecto sobre la regulación de la producción o degradación del péptido A β .

Los resultados presentados en esta tesis muestran que la reducción de los niveles de oxígeno no produce cambios en la expresión de los principales genes codificantes para enzimas involucradas en el metabolismo del A β . Cabe destacar que en análisis de la expresión de estos genes, en los ratones sometidos a un solo ciclo de reperusión al final del experimento, algunos de los genes relacionados con el A β se regularon al alza por reoxigenación, reforzando la idea de que la hipoxia intermitente más que la hipoxia sostenida puede regular *in vivo* el procesamiento del APP (Shiota, Takekawa et al. 2013). El descenso de los niveles de oxígeno tampoco tuvo un efecto en los niveles y carga total del péptido A β y del APP α soluble en los cerebros del modelo de enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, el análisis de los cerebros de los ratones APP/PS1 hipóxicos sí mostró cambios en la distribución de placas en la corteza, observándose un aumento del número de placas de pequeño tamaño, lo que podría ser indicativo de un aumento de placas *de novo*. Que este incremento esté relacionado de manera directa con el incremento de A β fibrilar observado en la fracción soluble o con el descenso de la población microglial requiere de un estudio en más profundidad.

La hipoxia acelera la patología de Alzheimer

Como se indicaba previamente, en los animales hipóxicos se observó un aumento del A β fibrilar en la fracción soluble. En este sentido, se ha descrito una relación entre el aumento de A β fibrilar soluble, la patología tau y la afectación cognitiva (Chabrier, Blurton-Jones et al. 2012), por lo que se analizó el daño neuronal en estos ratones, observando un aumento del número de neuritas distróficas alrededor de placa en corteza mediante marcaje P-Tau, así como del contenido en ubiquitina en el cerebro de los ratones expuestos a hipoxia, ambos marcadores de daño neuronal. Sin embargo, no se observaron diferencias en el número de neuritas distróficas alrededor de placa en el hipocampo, probablemente debido al hecho de que la patología Tau se encuentra muy avanzada a esta edad en el hipocampo de los animales usados para este estudio, así como tampoco se observó un descenso del número de neuronas. Sí se observó en cambio un descenso en los niveles de mRNA de Somatostatina y Neuropeptido Y, marcadores de dos poblaciones neuronales descritas como las primeras poblaciones afectadas en fases tardías de la neurodegeneración en este modelo animal (Ramos, Baglietto-Vargas et al. 2006). Tomando todos los resultados en conjunto se propone un modelo esquematizado en la Figura 28.

No se puede asegurar que la agravación de la enfermedad observada no esté relacionada con otros efectos del tratamiento hipóxico, ya que la hipoxia sostenida puede tener muchas consecuencias en la progresión de la enfermedad de Alzheimer. Muchos autores se han centrado en la modificación que la hipoxia tiene sobre el sistema vascular (Zlokovic 2011), o en el papel de HIF1 α en la neuroprotección de neuronas en casos normales de Alzheimer (Soucek, Cumming et al. 2003, Vangeison, Carr et al. 2008). Sin embargo, el hecho de que el aumento de la patología Tau se observe alrededor de placas despobladas de microglía sugiere de manera clara una relación entre la disfunción microglial y agravación de la progresión de la enfermedad por la hipoxia. Futuros estudios que impliquen deleciones de genes relacionados con la respuesta a hipoxia en la microglía serán necesarios para evaluar como de importante es la disfunción de la microglía en la aceleración de la patología de Alzheimer por bajos niveles de oxígeno. Estos modelos genéticos también nos permitirán realizar estudios de comportamiento, algo que no es viable hacer con los animales expuestos a hipoxia debido a su alto nivel de hematocrito.

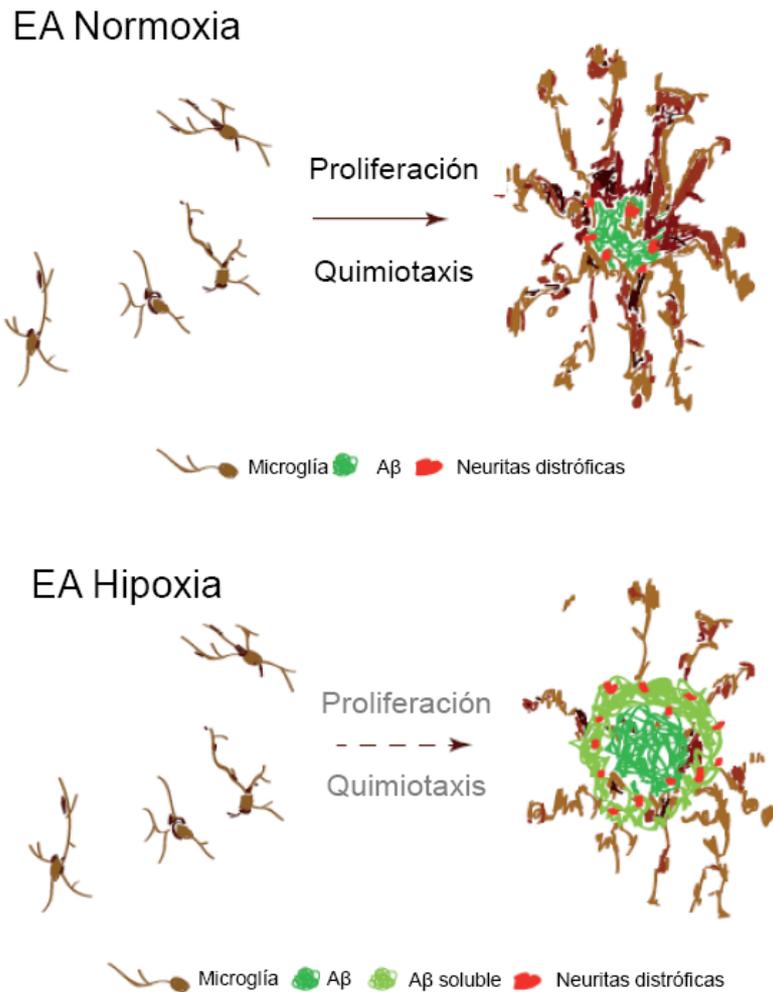


Figura 28. Esquema propuesto a partir de los resultados obtenidos y presentados en esta tesis. En condiciones normales de oxígeno en los cerebros de pacientes con EA se produce una muerte de la microglía asociada a las placas de A β como resultado de su activación y del proceso inflamatorio consecuente. No obstante, esta microglía es sustituida por células de nueva generación que migran hacia las placas desde los nichos progenitores gracias a su capacidad quimiotáctica, repoblando y manteniendo así su función de barrera. Sin embargo, en aquellos pacientes que sufran alguna patología vascular la hipoxia asociada dará lugar a una inhibición de la capacidad proliferativa y quimiotáctica de la microglía, que tendrá como consecuencia la pérdida de capacidad para repoblar las placas y por tanto para realizar su función de barrera, produciéndose un aumento de la liberación de oligómeros solubles tóxicos y finalmente del daño neuronal, acelerando así la patología en estos pacientes.

Acumulación de HIF1 α en cerebros de pacientes de Alzheimer

En estudios previos se ha mostrado que la progresión de la enfermedad de Alzheimer da lugar a una reducción de los niveles de HIF1 α y de sus dianas GLUT1 y GLUT3 (Liu, Liu et al. 2008). Sin embargo, el análisis de las muestras de pacientes mostró la acumulación de HIF1 α en los estadios iniciales de la enfermedad seguida de una caída repentina en los estadios V/VI. La razón principal para esta discrepancia podría ser la

estratificación de los pacientes usada para cada estudio.

Liu y colaboradores usaron muestras de pacientes en estados II/III como grupos control mientras que en el análisis realizado en esta tesis se presentan muestras estratificadas incluyendo de forma separada los grupos de estado II y III/IV, y usando como referencia para el análisis controles jóvenes. Otra diferencia entre ambos estudios es la región del cerebro analizada, mientras que Liu y colaboradores utilizaron la corteza, en esta tesis se utiliza el hipocampo. En este sentido, un estudio recientemente publicado coincide con los resultados presentados, aunque con un número menor de pacientes analizados. En dicha publicación los autores muestran que VEGF muestra un perfil de expresión similar en el cerebro de pacientes de Alzheimer al que se muestra aquí para HIF1 α (Tang, Mao et al. 2013). Por otra parte, la acumulación de HIF1 α no se encuentra regulada sólo por la hipoxia, sino también por estímulos inflamatorios. El hecho de que se observe una caída de HIF1 α o de sus dianas (VEGF) en los grupos que se corresponden con estados avanzados de la enfermedad y por tanto de mayor estado inflamatorio (estados V/VI) sugiere de manera robusta que la expresión de HIF1 α es neuronal y que la muerte celular asociada a estos estados podría dar lugar o tener un efecto sobre la reducción observada.

El hecho de que en el cerebro de pacientes de la enfermedad de Alzheimer junto al proceso inflamatorio asociado a la patología se desarrolle un ambiente hipóxico, tal como sugiere el análisis de los niveles de HIF1 α presentado, permite plantear que los resultados obtenidos y el modelo propuesto para el animal APP/PS1 podrían ser interesantes en el conocimiento de la patología humana. De este modo, podrían explicarse la comorbilidad observada entre patologías vasculares y enfermedad de Alzheimer en los estudios epidemiológicos realizados en pacientes con demencia, así como el mayor riesgo de desarrollar la EA en personas con problemas vasculares.

Conclusiones

1. La hipoxia o el tratamiento con DMOG provocan una reducción de la proliferación y de la quimiotaxis de la microglía *in vitro*, por lo que podría tratarse de un proceso dependiente de las PHDs. Así mismo, la ausencia de la PHD2 o la PHD3 dan lugar a un descenso del número de células en los cultivos primarios. La microglía presenta además una alta sensibilidad al DMOG, respondiendo de manera exacerbada a concentraciones bajas del inhibidor y produciéndose la apoptosis de estas células a concentraciones normales de uso.
2. La hipoxia crónica en combinación con la enfermedad de Alzheimer produce un descenso de la capacidad proliferativa de la microglía *in vivo*, de la densidad de esta en el cerebro, así como una depopulación de las placas de A β .
3. La hipoxia sostenida no modifica el metabolismo de A β , no produciendo cambios en las enzimas relacionadas con la generación o degradación del péptido A β , ni en la carga total de este.
4. La hipoxia crónica da lugar a un aumento del A β fibrilar soluble y a un cambio en la distribución de placas Thio-S, aumentando el número de placas de pequeño tamaño, lo que podría sugerir un aumento del número de placas *de novo*.
5. La hipoxia crónica acelera la patología de Alzheimer dando lugar a un aumento del número de neuritas distróficas y del daño neuronal en la corteza, así como afectando a poblaciones neuronales en el hipocampo.
6. En los cerebros de pacientes con EA se produce una acumulación del marcador hipóxico HIF1 α , por lo que los resultados obtenidos en el modelo de ratón de EA expuesto a hipoxia crónica podrían ser de interés para el conocimiento de la patología en humanos y poder de esta manera explicar la comorbilidad entre patologías vasculares y enfermedad de Alzheimer.

Bibliografía

Acosta-Iborra, B., A. Elorza, I. M. Olazabal, N. B. Martin-Cofreces, S. Martin-Puig, M. Miro, M. J. Calzada, J. Aragones, F. Sanchez-Madrid and M. O. Landazuri (2009). "Macrophage oxygen sensing modulates antigen presentation and phagocytic functions involving IFN-gamma production through the HIF-1 alpha transcription factor." Journal of immunology **182**(5): 3155-3164.

Aloisi, F. (2001). "Immune function of microglia." Glia **36**(2): 165-179.

Altieri, M., V. Di Piero, M. Pasquini, M. Gasparini, N. Vanacore, E. Vicenzini and G. L. Lenzi (2004). "Delayed poststroke dementia: a 4-year follow-up study." Neurology **62**(12): 2193-2197.

Anand, R. J., S. C. Gribar, J. Li, J. W. Kohler, M. F. Branca, T. Dubowski, C. P. Sodhi and D. J. Hackam (2007). "Hypoxia causes an increase in phagocytosis by macrophages in a HIF-1alpha-dependent manner." Journal of leukocyte biology **82**(5): 1257-1265.

Aragones, J., M. Schneider, K. Van Geyte, P. Fraisl, T. Dresselaers, M. Mazzone, R. Dirx, S. Zacchigna, H. Lemieux, N. H. Jeoung, D. Lambrechts, T. Bishop, P. Lafuste, A. Diez-Juan, S. K. Harten, P. Van Noten, K. De Bock, C. Willam, M. Tjwa, A. Grosfeld, R. Navet, L. Moons, T. Vandendriessche, C. Deroose, B. Wijeyekoon, J. Nuyts, B. Jordan, R. Silasi-Mansat, F. Lupu, M. Dewerchin, C. Pugh, P. Salmon, L. Mortelmans, B. Gallez, F. Gorus, J. Buyse, F. Sluse, R. A. Harris, E. Gnaiger, P. Hespel, P. Van Hecke, F. Schuit, P. Van Veldhoven, P. Ratcliffe, M. Baes, P. Maxwell and P. Carmeliet (2008). "Deficiency or inhibition of oxygen sensor Phd1 induces hypoxia tolerance by reprogramming basal metabolism." Nature genetics **40**(2): 170-180.

Arriagada, P. V., J. H. Growdon, E. T. Hedley-Whyte and B. T. Hyman (1992). "Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease." Neurology **42**(3 Pt 1): 631-639.

Arriagada, P. V., K. Marzloff and B. T. Hyman (1992). "Distribution of Alzheimer-type pathologic changes in nondemented elderly individuals matches the pattern in Alzheimer's disease." Neurology **42**(9): 1681-1688.

Barnes, D. E. and K. Yaffe (2011). "The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence." The Lancet. Neurology **10**(9): 819-828.

Baron, R., A. A. Babcock, A. Nemirovsky, B. Finsen and A. Monsonego (2014). "Accelerated microglial pathology is associated with Abeta plaques in mouse models of Alzheimer's disease." *Aging Cell* **13**(4): 584-595.

Beck-Schimmer, B., R. C. Schimmer, C. Madjdpour, J. M. Bonvini, T. Pasch and P. A. Ward (2001). "Hypoxia mediates increased neutrophil and macrophage adhesiveness to alveolar epithelial cells." *American journal of respiratory cell and molecular biology* **25**(6): 780-787.

Benilova, I., E. Karran and B. De Strooper (2012). "The toxic Abeta oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes." *Nature neuroscience* **15**(3): 349-357.

Bishop, T., D. Gallagher, A. Pascual, C. A. Lygate, J. P. de Bono, L. G. Nicholls, P. Ortega-Saenz, H. Oster, B. Wijeyekoon, A. I. Sutherland, A. Grosfeld, J. Aragones, M. Schneider, K. van Geyte, D. Teixeira, A. Diez-Juan, J. Lopez-Barneo, K. M. Channon, P. H. Maxwell, C. W. Pugh, A. M. Davies, P. Carmeliet and P. J. Ratcliffe (2008). "Abnormal sympathoadrenal development and systemic hypotension in PHD3-/- mice." *Mol Cell Biol* **28**(10): 3386-3400.

Bondolfi, L., M. Calhoun, F. Ermini, H. G. Kuhn, K. H. Wiederhold, L. Walker, M. Staufenbiel and M. Jucker (2002). "Amyloid-associated neuron loss and gliogenesis in the neocortex of amyloid precursor protein transgenic mice." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**(2): 515-522.

Borchelt, D. R., T. Ratovitski, J. van Lare, M. K. Lee, V. Gonzales, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, D. L. Price and S. S. Sisodia (1997). "Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins." *Neuron* **19**(4): 939-945.

Bosco, M. C., M. Puppo, F. Blengio, T. Fraone, P. Cappello, M. Giovarelli and L. Varesio (2008). "Monocytes and dendritic cells in a hypoxic environment: Spotlights on chemotaxis and migration." *Immunobiology* **213**(9-10): 733-749.

Bosco, M. C., M. Puppo, C. Santangelo, L. Anfosso, U. Pfeffer, P. Fardin, F. Battaglia and L. Varesio (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." *Journal of immunology* **177**(3): 1941-1955.

Braak, H. and E. Braak (1991). "Neuropathological staging of Alzheimer-related changes." Acta neuropathologica **82**(4): 239-259.

Casazza, A., D. Laoui, M. Wenes, S. Rizzolio, N. Bassani, M. Mambretti, S. Deschoemaeker, J. A. Van Ginderachter, L. Tamagnone and M. Mazzone (2013). "Impeding macrophage entry into hypoxic tumor areas by Sema3A/Nrp1 signaling blockade inhibits angiogenesis and restores antitumor immunity." Cancer cell **24**(6): 695-709.

Castellano, J. M., J. Kim, F. R. Stewart, H. Jiang, R. B. DeMattos, B. W. Patterson, A. M. Fagan, J. C. Morris, K. G. Mawuenyega, C. Cruchaga, A. M. Goate, K. R. Bales, S. M. Paul, R. J. Bateman and D. M. Holtzman (2011). "Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid-beta peptide clearance." Science translational medicine **3**(89): 89ra57.

Cleary, J. P., D. M. Walsh, J. J. Hofmeister, G. M. Shankar, M. A. Kuskowski, D. J. Selkoe and K. H. Ashe (2005). "Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function." Nature neuroscience **8**(1): 79-84.

Colgan, S. P. and C. T. Taylor (2010). "Hypoxia: an alarm signal during intestinal inflammation." Nature reviews. Gastroenterology & hepatology **7**(5): 281-287.

Cramer, T., Y. Yamanishi, B. E. Clausen, I. Forster, R. Pawlinski, N. Mackman, V. H. Haase, R. Jaenisch, M. Corr, V. Nizet, G. S. Firestein, H. P. Gerber, N. Ferrara and R. S. Johnson (2003). "HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation." Cell **112**(5): 645-657.

Cummins, E. P. and C. T. Taylor (2005). "Hypoxia-responsive transcription factors." Pflugers Archiv : European journal of physiology **450**(6): 363-371.

Chabrier, M. A., M. Blurton-Jones, A. A. Agazaryan, J. L. Nerhus, H. Martinez-Coria and F. M. LaFerla (2012). "Soluble abeta promotes wild-type tau pathology in vivo." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **32**(48): 17345-17350.

Chen, G. J., J. Xu, S. A. Lahousse, N. L. Caggiano and S. M. de la Monte (2003). "Transient hypoxia causes Alzheimer-type molecular and biochemical abnormalities in cortical neurons: potential strategies for neuroprotection." Journal of Alzheimer's disease : JAD **5**(3): 209-228.

Cherry, J. D., J. A. Olschowka and M. K. O'Banion (2014). "Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed." Journal of neuroinflammation **11**: 98.

Choi, Y., S. Y. Lim, H. S. Jeong, K. A. Koo, S. H. Sung and Y. C. Kim (2009). "Oligonucleotide microarray analysis of apoptosis induced by 15-methoxypinusolidic acid in microglial BV2 cells." British journal of pharmacology **157**(6): 1053-1064.

Chua, Y. L., E. Dufour, E. P. Dassa, P. Rustin, H. T. Jacobs, C. T. Taylor and T. Hagen (2010). "Stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha protein in hypoxia occurs independently of mitochondrial reactive oxygen species production." The Journal of biological chemistry **285**(41): 31277-31284.

del Peso, L., M. C. Castellanos, E. Temes, S. Martin-Puig, Y. Cuevas, G. Olmos and M. O. Landazuri (2003). "The von Hippel Lindau/hypoxia-inducible factor (HIF) pathway regulates the transcription of the HIF-proline hydroxylase genes in response to low oxygen." The Journal of biological chemistry **278**(49): 48690-48695.

Dewhirst, M. W., Y. Cao and B. Moeller (2008). "Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response." Nature reviews. Cancer **8**(6): 425-437.

Dotti, C. G. and B. De Strooper (2009). "Alzheimer's dementia by circulation disorders: when trees hide the forest." Nature cell biology **11**(2): 114-116.

El Khoury, J., M. Toft, S. E. Hickman, T. K. Means, K. Terada, C. Geula and A. D. Luster (2007). "Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease." Nature medicine **13**(4): 432-438.

Elmore, M. R., A. R. Najafi, M. A. Koike, N. N. Dagher, E. E. Spangenberg, R. A. Rice, M. Kitazawa, B. Matusow, H. Nguyen, B. L. West and K. N. Green (2014). "Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain." Neuron **82**(2): 380-397.

Eltzschig, H. K. and P. Carmeliet (2011). "Hypoxia and inflammation." The New England journal of medicine **364**(7): 656-665.

Escribese, M. M., E. Sierra-Filardi, C. Nieto, R. Samaniego, C. Sanchez-Torres, T. Matsuyama, E. Calderon-Gomez, M. A. Vega, A. Salas, P. Sanchez-Mateos and A. L. Corbi (2012). "The prolyl hydroxylase PHD3 identifies proinflammatory macrophages and its expression is regulated by activin A." Journal of immunology **189**(4): 1946-1954.

Fang, H. Y., R. Hughes, C. Murdoch, S. B. Coffelt, S. K. Biswas, A. L. Harris, R. S. Johnson, H. Z. Imityaz, M. C. Simon, E. Fredlund, F. R. Greten, J. Rius and C. E. Lewis (2009). "Hypoxia-inducible factors 1 and 2 are important transcriptional effectors in primary macrophages experiencing hypoxia." Blood **114**(4): 844-859.

Fischer, H. G., A. K. Bielinsky, B. Nitzgen, W. Daubener and U. Hadding (1993). "Functional dichotomy of mouse microglia developed in vitro: differential effects of macrophage and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on cytokine secretion and antitoxoplasmic activity." Journal of neuroimmunology **45**(1-2): 193-201.

Frede, S., C. Stockmann, P. Freitag and J. Fandrey (2006). "Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-kappaB." The Biochemical journal **396**(3): 517-527.

Garcia-Alloza, M., E. M. Robbins, S. X. Zhang-Nunes, S. M. Purcell, R. A. Betensky, S. Raju, C. Prada, S. M. Greenberg, B. J. Bacskai and M. P. Frosch (2006). "Characterization of amyloid deposition in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer disease." Neurobiology of disease **24**(3): 516-524.

Gehrmann, J. (1996). "Microglia: a sensor to threats in the nervous system?" Research in virology **147**(2-3): 79-88.

Gehrmann, J., Y. Matsumoto and G. W. Kreutzberg (1995). "Microglia: intrinsic immuneffector cell of the brain." Brain research. Brain research reviews **20**(3): 269-287.

Ginhoux, F., M. Greter, M. Leboeuf, S. Nandi, P. See, S. Gokhan, M. F. Mehler, S. J. Conway, L. G. Ng, E. R. Stanley, I. M. Samokhvalov and M. Merad (2010). "Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages." Science **330**(6005): 841-845.

Glabe, C. G. (2008). "Structural classification of toxic amyloid oligomers." The Journal of biological chemistry **283**(44): 29639-29643.

Golde, T. E., W. J. Streit and P. Chakrabarty (2013). "Alzheimer's disease risk alleles in TREM2 illuminate innate immunity in Alzheimer's disease." Alzheimer's research & therapy **5**(3): 24.

Grathwohl, S. A., R. E. Kalin, T. Bolmont, S. Prokop, G. Winkelmann, S. A. Kaeser, J. Odenthal, R. Radde, T. Eldh, S. Gandy, A. Aguzzi, M. Staufenbiel, P. M. Mathews, H. Wolburg, F. L. Heppner and M. Jucker (2009). "Formation and maintenance of Alzheimer's disease beta-amyloid plaques in the absence of microglia." Nature neuroscience **12**(11): 1361-1363.

Griciuc, A., A. Serrano-Pozo, A. R. Parrado, A. N. Lesinski, C. N. Asselin, K. Mullin, B. Hooli, S. H. Choi, B. T. Hyman and R. E. Tanzi (2013). "Alzheimer's disease risk gene CD33 inhibits microglial uptake of amyloid beta." Neuron **78**(4): 631-643.

Grimshaw, M. J. and F. R. Balkwill (2001). "Inhibition of monocyte and macrophage chemotaxis by hypoxia and inflammation--a potential mechanism." European journal of immunology **31**(2): 480-489.

Haas, C. (2012). "Strategies, development, and pitfalls of therapeutic options for Alzheimer's disease." Journal of Alzheimer's disease : JAD **28**(2): 241-281.

Haass, C., C. A. Lemere, A. Capell, M. Citron, P. Seubert, D. Schenk, L. Lannfelt and D. J. Selkoe (1995). "The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway." Nature medicine **1**(12): 1291-1296.

Hagen, T., C. T. Taylor, F. Lam and S. Moncada (2003). "Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1alpha." Science **302**(5652): 1975-1978.

Hannah, S., K. Mecklenburgh, I. Rahman, G. J. Bellingan, A. Greening, C. Haslett and E. R. Chilvers (1995). "Hypoxia prolongs neutrophil survival in vitro." FEBS letters **372**(2-3): 233-237.

Hardy, J. and D. J. Selkoe (2002). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics." Science **297**(5580): 353-356.

Hardy, J. A. and G. A. Higgins (1992). "Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis." Science **256**(5054): 184-185.

Harris, A., A. A. R. Thompson, M. K. B. Whyte and S. Walmsley (2014). "HIF-mediated innate immune responses: cell signaling and therapeutic implications." Hypoxia **2**: 47-58.

Hirani, N., F. Antonicelli, R. M. Strieter, M. S. Wiesener, P. J. Ratcliffe, C. Haslett and S. C. Donnelly (2001). "The regulation of interleukin-8 by hypoxia in human macrophages--a potential role in the pathogenesis of the acute respiratory distress syndrome (ARDS)." Molecular medicine **7**(10): 685-697.

Hirtz, D., D. J. Thurman, K. Gwinn-Hardy, M. Mohamed, A. R. Chaudhuri and R. Zalutsky (2007). "How common are the "common" neurologic disorders?" Neurology **68**(5): 326-337.

Honda, S., Y. Sasaki, K. Ohsawa, Y. Imai, Y. Nakamura, K. Inoue and S. Kohsaka (2001). "Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **21**(6): 1975-1982.

Honig, L. S., W. Kukull and R. Mayeux (2005). "Atherosclerosis and AD: analysis of data from the US National Alzheimer's Coordinating Center." Neurology **64**(3): 494-500.

Huang, W. C., F. C. Yen, F. S. Shie, C. M. Pan, Y. J. Shiao, C. N. Yang, F. L. Huang, Y. J. Sung and H. J. Tsay (2010). "TGF-beta1 blockade of microglial chemotaxis toward Abeta aggregates involves SMAD signaling and down-regulation of CCL5." Journal of neuroinflammation **7**: 28.

Hyman, B. T. (2011). "Amyloid-dependent and amyloid-independent stages of Alzheimer disease." Archives of neurology **68**(8): 1062-1064.

Ingelsson, M., H. Fukumoto, K. L. Newell, J. H. Growdon, E. T. Hedley-Whyte, M. P. Frosch, M. S. Albert, B. T. Hyman and M. C. Irizarry (2004). "Early Abeta accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain." Neurology **62**(6): 925-931.

Itagaki, S., P. L. McGeer, H. Akiyama, S. Zhu and D. Selkoe (1989). "Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease." Journal of neuroimmunology **24**(3): 173-182.

Ito, D., Y. Imai, K. Ohsawa, K. Nakajima, Y. Fukuuchi and S. Kohsaka (1998). "Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1." Brain Res Mol Brain Res **57**(1): 1-9.

Jaakkola, P., D. R. Mole, Y. M. Tian, M. I. Wilson, J. Gielbert, S. J. Gaskell, A. von Kriegsheim, H. F. Hebestreit, M. Mukherji, C. J. Schofield, P. H. Maxwell, C. W. Pugh and P. J. Ratcliffe (2001). "Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation." Science **292**(5516): 468-472.

Jacque, C. M., C. Vinner, M. Kujas, M. Raoul, J. Racadot and N. A. Baumann (1978). "Determination of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in human brain tumors." J Neurol Sci **35**(1): 147-155.

Jankowsky, J. L., D. J. Fadale, J. Anderson, G. M. Xu, V. Gonzales, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, M. K. Lee, L. H. Younkin, S. L. Wagner, S. G. Younkin and D. R. Borchelt (2004). "Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase." Hum Mol Genet **13**(2): 159-170.

Jaturapatporn, D., M. G. Isaac, J. McCleery and N. Tabet (2012). "Aspirin, steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of Alzheimer's disease." The Cochrane database of systematic reviews **2**: CD006378.

Jellinger, K. A. (2007). "The enigma of vascular cognitive disorder and vascular dementia." Acta neuropathologica **113**(4): 349-388.

Jimenez, S., D. Baglietto-Vargas, C. Caballero, I. Moreno-Gonzalez, M. Torres, R. Sanchez-Varo, D. Ruano, M. Vizuet, A. Gutierrez and J. Vitorica (2008). "Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **28**(45): 11650-11661.

Jin, M., N. Shepardson, T. Yang, G. Chen, D. Walsh and D. J. Selkoe (2011). "Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **108**(14): 5819-5824.

Jones, L., P. A. Holmans, M. L. Hamshere, D. Harold, V. Moskvina, D. Ivanov, A. Pocklington, R. Abraham, P. Hollingworth, R. Sims, A. Gerrish, J. S. Pahwa, N. Jones, A. Stretton, A. R. Morgan, S. Lovestone, J. Powell, P. Proitsi, M. K. Lupton, C. Brayne, D. C. Rubinsztein, M. Gill, B. Lawlor, A. Lynch, K. Morgan, K. S. Brown, P. A. Passmore, D. Craig, B. McGuinness, S. Todd, C. Holmes, D. Mann, A. D. Smith, S. Love, P. G. Kehoe, S. Mead, N. Fox, M. Rossor, J. Collinge, W. Maier, F. Jessen, B. Schurmann, R. Heun, H. Kolsch, H. van den Bussche, I. Heuser, O. Peters, J. Kornhuber, J. Wiltfang, M. Dichgans, L. Frolich, H. Hampel, M. Hull, D. Rujescu, A. M. Goate, J. S. Kauwe, C. Cruchaga, P. Nowotny, J. C. Morris, K. Mayo, G. Livingston, N. J. Bass, H. Gurling, A. McQuillin, R. Gwilliam, P. Deloukas, A. Al-Chalabi, C. E. Shaw, A. B. Singleton, R. Guerreiro, T. W. Muhleisen, M. M. Nothen, S. Moebus, K. H. Jockel, N. Klopp, H. E. Wichmann, E. Ruther, M. M. Carrasquillo, V. S. Pankratz, S. G. Younkin, J. Hardy, M. C. O'Donovan, M. J. Owen and J. Williams (2010). "Genetic evidence implicates the immune system and cholesterol metabolism in the aetiology of Alzheimer's disease." PloS one **5**(11): e13950.

Jung, Y., J. S. Isaacs, S. Lee, J. Trepel, Z. G. Liu and L. Neckers (2003). "Hypoxia-inducible factor induction by tumour necrosis factor in normoxic cells requires receptor-interacting protein-dependent nuclear factor kappa B activation." The Biochemical journal **370**(Pt 3): 1011-1017.

Jung, Y. J., J. S. Isaacs, S. Lee, J. Trepel and L. Neckers (2003). "IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **17**(14): 2115-2117.

Kaelin, W. G., Jr. (2008). "The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O2 sensing and cancer." Nature reviews. Cancer **8**(11): 865-873.

Kaelin, W. G., Jr. and P. J. Ratcliffe (2008). "Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway." Molecular cell **30**(4): 393-402.

Kamphuis, W., C. Mamber, M. Moeton, L. Kooijman, J. A. Sluijs, A. H. Jansen, M. Verveer, L. R. de Groot, V. D. Smith, S. Rangarajan, J. J. Rodriguez, M. Orre and E. M. Hol (2012). "GFAP isoforms in adult mouse brain with a focus on neurogenic astrocytes and reactive astrogliosis in mouse models of Alzheimer disease." PloS one **7**(8): e42823.

Kamphuis, W., M. Orre, L. Kooijman, M. Dahmen and E. M. Hol (2012). "Differential cell proliferation in the cortex of the APPswePS1dE9 Alzheimer's disease mouse model." Glia **60**(4): 615-629.

Karhausen, J., G. T. Furuta, J. E. Tomaszewski, R. S. Johnson, S. P. Colgan and V. H. Haase (2004). "Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis." The Journal of clinical investigation **114**(8): 1098-1106.

Kaur, C., G. Rathnasamy and E. A. Ling (2013). "Roles of activated microglia in hypoxia induced neuroinflammation in the developing brain and the retina." Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology **8**(1): 66-78.

Kempf, V. A., M. Lebedziejewski, K. Alitalo, J. H. Walzlein, U. Eehalt, J. Fiebig, S. Huber, B. Schutt, C. A. Sander, S. Muller, G. Grassl, A. S. Yazdi, B. Brehm and I. B. Autenrieth (2005). "Activation of hypoxia-inducible factor-1 in bacillary angiomatosis: evidence for a role of hypoxia-inducible factor-1 in bacterial infections." Circulation **111**(8): 1054-1062.

Kennedy, A., C. T. Ng, M. Biniecka, T. Saber, C. Taylor, J. O'Sullivan, D. J. Veale and U. Fearon (2010). "Angiogenesis and blood vessel stability in inflammatory arthritis." Arthritis and rheumatism **62**(3): 711-721.

Koffie, R. M., M. Meyer-Luehmann, T. Hashimoto, K. W. Adams, M. L. Mielke, M. Garcia-Alloza, K. D. Micheva, S. J. Smith, M. L. Kim, V. M. Lee, B. T. Hyman and T. L. Spires-Jones (2009). "Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**(10): 4012-4017.

Kong, T., H. K. Eltzschig, J. Karhausen, S. P. Colgan and C. S. Shelley (2004). "Leukocyte adhesion during hypoxia is mediated by HIF-1-dependent induction of beta2 integrin gene expression." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(28): 10440-10445.

Koshiji, M., Y. Kageyama, E. A. Pete, I. Horikawa, J. C. Barrett and L. E. Huang (2004). "HIF-1alpha induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc." The EMBO journal **23**(9): 1949-1956.

LaFerla, F. M. (2010). "Pathways linking Abeta and tau pathologies." Biochemical Society transactions **38**(4): 993-995.

Lambert, J. C., B. Grenier-Boley, V. Chouraki, S. Heath, D. Zelenika, N. Fievet, D. Hannequin, F. Pasquier, O. Hanon, A. Brice, J. Epelbaum, C. Berr, J. F. Dartigues, C.

Tzourio, D. Champion, M. Lathrop and P. Amouyel (2010). "Implication of the immune system in Alzheimer's disease: evidence from genome-wide pathway analysis." Journal of Alzheimer's disease : JAD **20**(4): 1107-1118.

Lambert, M. P., P. T. Velasco, L. Chang, K. L. Viola, S. Fernandez, P. N. Lacor, D. Khuon, Y. Gong, E. H. Bigio, P. Shaw, F. G. De Felice, G. A. Krafft and W. L. Klein (2007). "Monoclonal antibodies that target pathological assemblies of Abeta." Journal of neurochemistry **100**(1): 23-35.

Lassmann, H., C. Bancher, H. Breitschopf, J. Wegiel, M. Bobinski, K. Jellinger and H. M. Wisniewski (1995). "Cell death in Alzheimer's disease evaluated by DNA fragmentation in situ." Acta neuropathologica **89**(1): 35-41.

Lavie, L. and V. Polotsky (2009). "Cardiovascular aspects in obstructive sleep apnea syndrome--molecular issues, hypoxia and cytokine profiles." Respiration **78**(4): 361-370.

Lewis, J. S., J. A. Lee, J. C. Underwood, A. L. Harris and C. E. Lewis (1999). "Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms." Journal of leukocyte biology **66**(6): 889-900.

Li, S., S. Hong, N. E. Shepardson, D. M. Walsh, G. M. Shankar and D. Selkoe (2009). "Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake." Neuron **62**(6): 788-801.

Liu, Y., F. Liu, K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal and C. X. Gong (2008). "Decreased glucose transporters correlate to abnormal hyperphosphorylation of tau in Alzheimer disease." FEBS letters **582**(2): 359-364.

Loane, D. J., A. Pocivavsek, C. E. Moussa, R. Thompson, Y. Matsuoka, A. I. Faden, G. W. Rebeck and M. P. Burns (2009). "Amyloid precursor protein secretases as therapeutic targets for traumatic brain injury." Nature medicine **15**(4): 377-379.

Lucin, K. M. and T. Wyss-Coray (2009). "Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little?" Neuron **64**(1): 110-122.

Maxwell, P. H. (2005). "The HIF pathway in cancer." Seminars in cell & developmental biology **16**(4-5): 523-530.

Mazzone, M., D. Dettori, R. Leite de Oliveira, S. Loges, T. Schmidt, B. Jonckx, Y. M. Tian, A. A. Lanahan, P. Pollard, C. Ruiz de Almodovar, F. De Smet, S. Vinckier, J. Aragones, K. Debackere, A. Luttun, S. Wyns, B. Jordan, A. Pisacane, B. Gallez, M. G. Lampugnani, E. Dejana, M. Simons, P. Ratcliffe, P. Maxwell and P. Carmeliet (2009). "Heterozygous deficiency of PHD2 restores tumor oxygenation and inhibits metastasis via endothelial normalization." Cell **136**(5): 839-851.

McGuinness, B., J. O'Hare, D. Craig, R. Bullock, R. Malouf and P. Passmore (2010). "Statins for the treatment of dementia." The Cochrane database of systematic reviews(8): CD007514.

McLean, C. A., R. A. Cherny, F. W. Fraser, S. J. Fuller, M. J. Smith, K. Beyreuther, A. I. Bush and C. L. Masters (1999). "Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease." Annals of neurology **46**(6): 860-866.

McNeill, L. A., K. S. Hewitson, T. D. Claridge, J. F. Seibel, L. E. Horsfall and C. J. Schofield (2002). "Hypoxia-inducible factor asparaginyl hydroxylase (FIH-1) catalyses hydroxylation at the beta-carbon of asparagine-803." The Biochemical journal **367**(Pt 3): 571-575.

Meyer-Luehmann, M., T. L. Spires-Jones, C. Prada, M. Garcia-Alloza, A. de Calignon, A. Rozkalne, J. Koenigsknecht-Talboo, D. M. Holtzman, B. J. Bacskai and B. T. Hyman (2008). "Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease." Nature **451**(7179): 720-724.

Mirra, S. S., A. Heyman, D. McKeel, S. M. Sumi, B. J. Crain, L. M. Brownlee, F. S. Vogel, J. P. Hughes, G. van Belle and L. Berg (1991). "The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease." Neurology **41**(4): 479-486.

Montine, T. J., C. H. Phelps, T. G. Beach, E. H. Bigio, N. J. Cairns, D. W. Dickson, C. Duyckaerts, M. P. Frosch, E. Masliah, S. S. Mirra, P. T. Nelson, J. A. Schneider, D. R. Thal, J. Q. Trojanowski, H. V. Vinters and B. T. Hyman (2012). "National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease: a practical approach." Acta neuropathologica **123**(1): 1-11.

Murdoch, C. and C. E. Lewis (2005). "Macrophage migration and gene expression in response to tumor hypoxia." Int J Cancer **117**(5): 701-708.

Murphy, M. P., T. L. Beckett, Q. Ding, E. Patel, W. R. Markesbery, D. K. St Clair, H. LeVine, 3rd and J. N. Keller (2007). "Abeta solubility and deposition during AD progression and in APPxPS-1 knock-in mice." Neurobiology of disease **27**(3): 301-311.

Nickel, D., M. Busch, D. Mayer, B. Hagemann, V. Knoll and S. Stenger (2012). "Hypoxia triggers the expression of human beta defensin 2 and antimicrobial activity against Mycobacterium tuberculosis in human macrophages." Journal of immunology **188**(8): 4001-4007.

Nishi, K., T. Oda, S. Takabuchi, S. Oda, K. Fukuda, T. Adachi, G. L. Semenza, K. Shingu and K. Hirota (2008). "LPS induces hypoxia-inducible factor 1 activation in macrophage-differentiated cells in a reactive oxygen species-dependent manner." Antioxidants & redox signaling **10**(5): 983-995.

Nissim Ben Efraim, A. H., R. Eliashar and F. Levi-Schaffer (2010). "Hypoxia modulates human eosinophil function." Clinical and molecular allergy : CMA **8**: 10.

Oda, S., T. Oda, K. Nishi, S. Takabuchi, T. Wakamatsu, T. Tanaka, T. Adachi, K. Fukuda, G. L. Semenza and K. Hirota (2008). "Macrophage migration inhibitory factor activates hypoxia-inducible factor in a p53-dependent manner." PloS one **3**(5): e2215.

Ogunshola, O. O. and X. Antoniou (2009). "Contribution of hypoxia to Alzheimer's disease: is HIF-1alpha a mediator of neurodegeneration?" Cellular and molecular life sciences : CMLS **66**(22): 3555-3563.

Orre, M., W. Kamphuis, L. M. Osborn, A. H. Jansen, L. Kooijman, K. Bossers and E. M. Hol (2014). "Isolation of glia from Alzheimer's mice reveals inflammation and dysfunction." Neurobiology of aging.

Orre, M., W. Kamphuis, L. M. Osborn, J. Melief, L. Kooijman, I. Huitinga, J. Klooster, K. Bossers and E. M. Hol (2014). "Acute isolation and transcriptome characterization of cortical astrocytes and microglia from young and aged mice." Neurobiol Aging **35**(1): 1-14.

Paolicelli, R. C., G. Bolasco, F. Pagani, L. Maggi, M. Scianni, P. Panzanelli, M. Giustetto, T. A. Ferreira, E. Guiducci, L. Dumas, D. Ragozzino and C. T. Gross (2011). "Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development." Science **333**(6048): 1456-1458.

Patterson, C., J. Feightner, A. Garcia and C. MacKnight (2007). "General risk factors for dementia: a systematic evidence review." Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association **3**(4): 341-347.

Pendlebury, S. T. and P. M. Rothwell (2009). "Prevalence, incidence, and factors associated with pre-stroke and post-stroke dementia: a systematic review and meta-analysis." The Lancet. Neurology **8**(11): 1006-1018.

Perea, G., M. Navarrete and A. Araque (2009). "Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information." Trends in neurosciences **32**(8): 421-431.

Pesce, J. T., T. R. Ramalingam, M. M. Mentink-Kane, M. S. Wilson, K. C. El Kasmi, A. M. Smith, R. W. Thompson, A. W. Cheever, P. J. Murray and T. A. Wynn (2009). "Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis." PLoS pathogens **5**(4): e1000371.

Peyssonnaud, C., P. Cejudo-Martin, A. Doedens, A. S. Zinkernagel, R. S. Johnson and V. Nizet (2007). "Cutting edge: Essential role of hypoxia inducible factor-1alpha in development of lipopolysaccharide-induced sepsis." Journal of immunology **178**(12): 7516-7519.

Querfurth, H. W. and F. M. LaFerla (2010). "Alzheimer's disease." The New England journal of medicine **362**(4): 329-344.

Ramos, B., D. Baglietto-Vargas, J. C. del Rio, I. Moreno-Gonzalez, C. Santa-Maria, S. Jimenez, C. Caballero, J. F. Lopez-Tellez, Z. U. Khan, D. Ruano, A. Gutierrez and J. Vitorica (2006). "Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1xAPP transgenic model of Alzheimer's disease." Neurobiology of aging **27**(11): 1658-1672.

Re, F., S. L. Belyanskaya, R. J. Riese, B. Cipriani, F. R. Fischer, F. Granucci, P. Ricciardi-Castagnoli, C. Brosnan, L. J. Stern, J. L. Strominger and L. Santambrogio (2002). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces an expression program in neonatal microglia that primes them for antigen presentation." Journal of immunology **169**(5): 2264-2273.

Rius, J., M. Guma, C. Schachtrup, K. Akassoglou, A. S. Zinkernagel, V. Nizet, R. S. Johnson, G. G. Haddad and M. Karin (2008). "NF-kappaB links innate immunity to

the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha." Nature **453**(7196): 807-811.

Roher, A. E., J. P. Debbins, M. Malek-Ahmadi, K. Chen, J. G. Pipe, S. Maze, C. Belden, C. L. Maarouf, P. Thiyyagura, H. Mo, J. M. Hunter, T. A. Kokjohn, D. G. Walker, J. C. Kruchowsky, M. Belohlavek, M. N. Sabbagh and T. G. Beach (2012). "Cerebral blood flow in Alzheimer's disease." Vascular health and risk management **8**: 599-611.

Roiniotis, J., H. Dinh, P. Masendycz, A. Turner, C. L. Elsegood, G. M. Scholz and J. A. Hamilton (2009). "Hypoxia prolongs monocyte/macrophage survival and enhanced glycolysis is associated with their maturation under aerobic conditions." Journal of immunology **182**(12): 7974-7981.

Rossi, A. G., D. A. Sawatzky, A. Walker, C. Ward, T. A. Sheldrake, N. A. Riley, A. Caldicott, M. Martinez-Losa, T. R. Walker, R. Duffin, M. Gray, E. Crescenzi, M. C. Martin, H. J. Brady, J. S. Savill, I. Dransfield and C. Haslett (2006). "Cyclin-dependent kinase inhibitors enhance the resolution of inflammation by promoting inflammatory cell apoptosis." Nature medicine **12**(9): 1056-1064.

Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). Molecular cloning a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Saura, J. (2007). "Microglial cells in astroglial cultures: a cautionary note." J Neuroinflammation **4**: 26.

Saura, J. (2007). "Microglial cells in astroglial cultures: a cautionary note." Journal of neuroinflammation **4**: 26.

Saura, J., J. M. Tusell and J. Serratos (2003). "High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization." Glia **44**(3): 183-189.

Savonenko, A., G. M. Xu, T. Melnikova, J. L. Morton, V. Gonzales, M. P. Wong, D. L. Price, F. Tang, A. L. Markowska and D. R. Borchelt (2005). "Episodic-like memory deficits in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease: relationships to beta-amyloid deposition and neurotransmitter abnormalities." Neurobiology of disease **18**(3): 602-617.

Schafer, D. P., E. K. Lehrman, A. G. Kautzman, R. Koyama, A. R. Mardinly, R. Yamasaki, R. M. Ransohoff, M. E. Greenberg, B. A. Barres and B. Stevens (2012).

"Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner." Neuron **74**(4): 691-705.

Schioppa, T., B. Uranchimeg, A. Saccani, S. K. Biswas, A. Doni, A. Rapisarda, S. Bernasconi, S. Saccani, M. Nebuloni, L. Vago, A. Mantovani, G. Melillo and A. Sica (2003). "Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia." The Journal of experimental medicine **198**(9): 1391-1402.

Schneider, J. A., Z. Arvanitakis, W. Bang and D. A. Bennett (2007). "Mixed brain pathologies account for most dementia cases in community-dwelling older persons." Neurology **69**(24): 2197-2204.

Schofield, C. J. and P. J. Ratcliffe (2004). "Oxygen sensing by HIF hydroxylases." Nature reviews. Molecular cell biology **5**(5): 343-354.

Selkoe, D. J. (2011). "Resolving controversies on the path to Alzheimer's therapeutics." Nature medicine **17**(9): 1060-1065.

Semenza, G. L. (2012). "Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine." Cell **148**(3): 399-408.

Semenza, G. L. (2012). "Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy." Trends in pharmacological sciences **33**(4): 207-214.

Serrano-Pozo, A., T. Gomez-Isla, J. H. Growdon, M. P. Frosch and B. T. Hyman (2013). "A phenotypic change but not proliferation underlies glial responses in Alzheimer disease." Am J Pathol **182**(6): 2332-2344.

Serrano-Pozo, A., A. Muzikansky, T. Gomez-Isla, J. H. Growdon, R. A. Betensky, M. P. Frosch and B. T. Hyman (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.

Shiota, S., H. Takekawa, S. E. Matsumoto, K. Takeda, F. Nurwidya, Y. Yoshioka, F. Takahashi, N. Hattori, T. Tabira, H. Mochizuki and K. Takahashi (2013). "Chronic intermittent hypoxia/reoxygenation facilitate amyloid-beta generation in mice." Journal of Alzheimer's disease : JAD **37**(2): 325-333.

Singh, B., M. M. Mielke, A. K. Parsaik, R. H. Cha, R. O. Roberts, P. D. Scanlon, Y. E. Geda, T. J. Christianson, V. S. Pankratz and R. C. Petersen (2014). "A prospective study of chronic obstructive pulmonary disease and the risk for mild cognitive impairment." JAMA neurology **71**(5): 581-588.

Small, S. A. and K. Duff (2008). "Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis." Neuron **60**(4): 534-542.

Soucek, T., R. Cumming, R. Dargusch, P. Maher and D. Schubert (2003). "The regulation of glucose metabolism by HIF-1 mediates a neuroprotective response to amyloid beta peptide." Neuron **39**(1): 43-56.

Stansley, B., J. Post and K. Hensley (2012). "A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease." Journal of neuroinflammation **9**: 115.

Staples, K. J., F. Sotoodehnejadnematalahi, H. Pearson, M. Frankenberger, L. Francescut, L. Ziegler-Heitbrock and B. Burke (2011). "Monocyte-derived macrophages matured under prolonged hypoxia transcriptionally up-regulate HIF-1alpha mRNA." Immunobiology **216**(7): 832-839.

Strehl, C., M. Fangradt, U. Fearon, T. Gaber, F. Buttgereit and D. J. Veale (2014). "Hypoxia: how does the monocyte-macrophage system respond to changes in oxygen availability?" Journal of leukocyte biology **95**(2): 233-241.

Streit, W. J. (2006). "Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration date?" Trends in neurosciences **29**(9): 506-510.

Streit, W. J. and Q. S. Xue (2009). "Life and death of microglia." Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology **4**(4): 371-379.

Sun, X., G. He, H. Qing, W. Zhou, F. Dobie, F. Cai, M. Staufenbiel, L. E. Huang and W. Song (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.

Sundar, U. and S. Adwani (2010). "Post-stroke cognitive impairment at 3 months." Annals of Indian Academy of Neurology **13**(1): 42-46.

Tang, H., X. Mao, L. Xie, D. A. Greenberg and K. Jin (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.

Tanzi, R. E. and L. Bertram (2005). "Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective." Cell **120**(4): 545-555.

Taylor, C. T. and S. P. Colgan (2007). "Hypoxia and gastrointestinal disease." Journal of molecular medicine **85**(12): 1295-1300.

Taylor, C. T. and J. C. McElwain (2010). "Ancient atmospheres and the evolution of oxygen sensing via the hypoxia-inducible factor in metazoans." Physiology **25**(5): 272-279.

Taylor, C. T. and S. Moncada (2010). "Nitric oxide, cytochrome C oxidase, and the cellular response to hypoxia." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **30**(4): 643-647.

Thies, W. and L. Bleiler (2011). "2011 Alzheimer's disease facts and figures." Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association **7**(2): 208-244.

Turner, L., C. Scotton, R. Negus and F. Balkwill (1999). "Hypoxia inhibits macrophage migration." European journal of immunology **29**(7): 2280-2287.

Vangeison, G., D. Carr, H. J. Federoff and D. A. Rempe (2008). "The good, the bad, and the cell type-specific roles of hypoxia inducible factor-1 alpha in neurons and astrocytes." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **28**(8): 1988-1993.

Vannay, A., E. Sziksz, A. Prokai, G. Veres, K. Molnar, D. N. Szakal, A. Onody, I. R. Korponay-Szabo, A. Szabo, T. Tulassay, A. Arato and B. Szebeni (2010). "Increased expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in coeliac disease." Pediatric research **68**(2): 118-122.

Walmsley, S., A. Harris, A. A. R. Thompson and M. K. B. Whyte (2014). "HIF-mediated innate immune responses: cell signaling and therapeutic implications." Hypoxia: 47.

Walmsley, S. R., E. R. Chilvers and M. K. Whyte (2009). "Hypoxia. Hypoxia, hypoxia inducible factor and myeloid cell function." Arthritis Res Ther **11**(2): 219.

Walmsley, S. R., C. Print, N. Farahi, C. Peyssonnaud, R. S. Johnson, T. Cramer, A. Sobolewski, A. M. Condliffe, A. S. Cowburn, N. Johnson and E. R. Chilvers (2005). "Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1alpha-dependent NF-kappaB activity." The Journal of experimental medicine **201**(1): 105-115.

Werth, N., C. Beerlage, C. Rosenberger, A. S. Yazdi, M. Edelmann, A. Amr, W. Bernhardt, C. von Eiff, K. Becker, A. Schafer, A. Peschel and V. A. Kempf (2010). "Activation of hypoxia inducible factor 1 is a general phenomenon in infections with human pathogens." PloS one **5**(7): e11576.

White, J. R., R. A. Harris, S. R. Lee, M. H. Craigon, K. Binley, T. Price, G. L. Beard, C. R. Mundy and S. Naylor (2004). "Genetic amplification of the transcriptional response to hypoxia as a novel means of identifying regulators of angiogenesis." Genomics **83**(1): 1-8.

Wyss-Coray, T. (2006). "Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response?" Nature medicine **12**(9): 1005-1015.

Yan, P., A. W. Bero, J. R. Cirrito, Q. Xiao, X. Hu, Y. Wang, E. Gonzales, D. M. Holtzman and J. M. Lee (2009). "Characterizing the appearance and growth of amyloid plaques in APP/PS1 mice." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **29**(34): 10706-10714.

Yang, F., X. Sun, W. Beech, B. Teter, S. Wu, J. Sigel, H. V. Vinters, S. A. Frautschy and G. M. Cole (1998). "Antibody to caspase-cleaved actin detects apoptosis in differentiated neuroblastoma and plaque-associated neurons and microglia in Alzheimer's disease." Am J Pathol **152**(2): 379-389.

Yao, L., E. M. Kan, J. Lu, A. Hao, S. T. Dheen, C. Kaur and E. A. Ling (2013). "Toll-like receptor 4 mediates microglial activation and production of inflammatory mediators in neonatal rat brain following hypoxia: role of TLR4 in hypoxic microglia." Journal of neuroinflammation **10**: 23.

Zempel, H., E. Thies, E. Mandelkow and E. M. Mandelkow (2010). "Abeta oligomers cause localized Ca(2+) elevation, missorting of endogenous Tau into dendrites, Tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines." The Journal of

neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **30**(36): 11938-11950.

Zhang, N., Z. Fu, S. Linke, J. Chicher, J. J. Gorman, D. Visk, G. G. Haddad, L. Poellinger, D. J. Peet, F. Powell and R. S. Johnson (2010). "The asparaginyl hydroxylase factor inhibiting HIF-1alpha is an essential regulator of metabolism." Cell metabolism **11**(5): 364-378.

Zhou, J., T. Schmid and B. Brune (2003). "Tumor necrosis factor-alpha causes accumulation of a ubiquitinated form of hypoxia inducible factor-1alpha through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway." Molecular biology of the cell **14**(6): 2216-2225.

Zhou, W., S. A. Scott, S. B. Shelton and K. A. Crutcher (2006). "Cathepsin D-mediated proteolysis of apolipoprotein E: possible role in Alzheimer's disease." Neuroscience **143**(3): 689-701.

Zlokovic, B. V. (2011). "Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders." Nature reviews. Neuroscience **12**(12): 723-738.