

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA



**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA Y FUNCIÓN
ASTROGLIAL EN MODELOS Y PACIENTES DE LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

**Memoria presentada por la Lda. María Virtudes Sánchez Micó,
bajo la dirección de los Doctores Javier Vitorica Ferrández y M^a
Luisa Vizquete Chacón, para optar al grado de Doctor por la
Universidad de Sevilla**

Sevilla, 2019

ÍNDICE

A. INTRODUCCIÓN	1
1. Antecedentes: La Enfermedad de Alzheimer	3
1.1. Tipos de Alzheimer.....	5
1.1.1. Alzheimer familiar (FAD).....	5
1.1.2. Alzheimer esporádico.....	6
1.2. Rasgos Neuropatológicos.....	9
2. Abeta y Patología Amiloide	11
2.1. Proteínas implicadas en la síntesis de Abeta.....	11
2.1.1. Proteína Precursora Amiloide (APP).....	11
2.1.2. Procesamiento de APP.....	13
2.1.2.1. Ruta no amiloidogénica.....	13
2.1.2.2. Ruta amiloidogénica.....	13
2.1.3. Presenilinas: PS1 y PS2.....	15
2.2. Degradación/eliminación de Abeta.....	15
2.3. Agregación del péptido Abeta: oligomerización/fibrilación.....	17
2.3.1. Formas oligoméricas de Abeta.....	18
2.3.2. Tipos de depósitos extracelulares de Abeta.....	19
2.3.3. Abeta intracelular.....	20
3. Proteína Tau y Patología Neurofibrilar	21
3.1. Estructura y Función de Tau.....	21
3.2. Fosforilación de Tau.....	22
3.3. Ovillos Neurofibrilares de Tau.....	23
4. Patología Neurítica, Pérdida Neuronal y Sináptica	24
4.1. Disminución de la densidad sináptica.....	24
4.2. Pérdida neuronal.....	25
4.3. Patología neurítica.....	25
5. Activación Glial y Respuesta Neuroinflamatoria	26
5.1. Componentes celulares del sistema inmune del SNC.....	27
5.1.1. MICROGLÍA.....	27
5.1.1.1. Funciones fisiológicas de la microglía.....	27
5.1.1.2. Papel de la microglía en la patología de la EA.....	28
5.1.2. ASTROCITOS.....	30
5.1.2.1. Funciones fisiológicas de los astrocitos.....	31
5.1.2.2. Papel de la astrogliá en la patología de la EA.....	33
5.2. Mediadores de la respuesta inflamatoria.....	35
B. MATERIALES Y MÉTODOS	37
1. Sujetos de estudio	39
1.1. Animales de experimentación.....	39

1.2. Muestras humanas <i>postmortem</i>	40
2. Cultivos de líneas celulares	41
2.1. Línea microglial BV2.....	41
2.2. Línea microglial N13.....	41
2.3. Línea neuronal N2a.....	42
2.4. Línea astrogliar WJE.....	42
3. Cultivos celulares primarios	42
3.1. Cultivos mixtos de microglia y astrocitos.....	42
3.1.1. Aislamiento de Microglía y Astrocitos.....	42
3.2. Cultivos de neuronas.....	43
4. Aislamiento de astrocitos del tejido cerebral de ratones modelo de la EA	43
4.1. Homogeneización del tejido y gradiente de percoll.....	43
4.2. Separación Celular – <i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i> (FACS).....	44
4.2.1. Fundamento.....	44
4.2.2. Procedimiento.....	45
5. Aislamiento de proteínas solubles (S1)	46
6. Obtención de Abeta mono y oligomérico	47
7. Ensayo de estimulación de cultivos celulares	47
8. Ensayo de toxicidad en cultivos celulares, mediante citometría de flujo	48
9. Ensayo de fagocitosis de neurosinaptosomas	48
9.1. Aislamiento de neurosinaptosomas (NS).....	48
9.2. Carga/Marcaje de los neurosinaptosomas con fluorescencia.....	49
9.3. Ensayo de fagocitosis y degradación de NS.....	50
10. Aislamiento de ARN y proteínas	51
10.1. Aislamiento de ARN.....	51
10.1.1. Comprobación de la integridad del ARN purificado.....	52
10.2. Aislamiento de proteínas totales.....	52
11. Cuantificación de proteínas: Método de Lowry	53
12. Western Blot (WB)	53
12.1. Fundamento.....	53
12.2. Procedimiento.....	54
13. Dot Blot	55
14. Retrotranscripción	56
15. qPCR en tiempo real	57
15.1. Fundamento.....	57
15.2. Procedimiento.....	58
16. Microfluidic cards	59
17. Estudio Transcriptómico (Arrays)	61
18. Inmunohistoquímica	62
18.1. Marcaje inmunohistoquímico simple para microscopía óptica convencional.....	63

18.2. Marcaje inmunofluorescente múltiple para microscopía confocal.....	65
18.3. Tinciones histológicas: Tioflavina S (ThioS).....	65
18.4. Obtención y procesamiento de imágenes de microscopía óptica.....	66
18.4.1. Imágenes de microscopía óptica de campo claro.....	66
18.4.2. Imágenes de microscopía de fluorescencia.....	66
19. Inmunofluorescencia para células de cultivo.....	66
19.1. Marcaje inmunofluorescente múltiple para células de cultivo.....	67
19.2. Obtención y procesamiento de imágenes mediante Microscopía Confocal.....	67
19.2.1. Cuantificación de neuronas.....	68
19.2.2. Cuantificación de sinapsis.....	68
20. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).....	69
20.1. Procesamiento de células en cultivo para MET.....	69
20.2. Montaje y tallado de las células incluidas en resina.....	70
20.3. Ultramicrotomía.....	70
20.4. Protocolo general de la técnica de inmuno-oro para MET (inmunomarcaje).....	71
20.5. Observación y obtención de las imágenes.....	72
21. Microscopía Multifotón <i>in vivo</i>.....	72
21.1. Fundamento.....	72
21.2. Marcaje fluorescente: inyecciones intracorticales.....	73
21.3. Preparación quirúrgica: ventana craneal.....	76
21.4. Adquisición y procesamiento de imágenes.....	77
22. Análisis estadístico.....	78
C. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	79
D. RESULTADOS.....	85
1. REACTIVIDAD ASTROGLIAL EN MODELOS ANIMALES Y EN PACIENTES DE ALZHEIMER.....	87
1.1. Reactividad astrogliar en distintos modelos de la EA.....	87
1.2. Reactividad astrogliar en muestras <i>postmortem</i> de pacientes de Alzheimer.....	90
2. RESPUESTA ASTROGLIAL “IN VITRO”: RESPUESTA INFLAMATORIA Y FUNCIÓN DE NEUROPROTECCIÓN.....	93
2.1. Caracterización de las fracciones solubles S1 aisladas de la corteza cerebral de ratones transgénicos y de muestras <i>postmortem</i> de pacientes de Alzheimer.....	93
2.2. Las formas solubles de Abeta y/o tau fosforilado no producen toxicidad en la población astrogliar.....	95
2.3. Caracterización transcriptómica de los astrocitos, ante un tratamiento agudo con formas solubles de Abeta y/o tau fosforilado.....	96

2.3.1. <i>Activación de una respuesta inflamatoria astrogliar, en presencia de Abeta y/o fosfo-tau solubles</i>	102
2.4. Papel de los astrocitos en la supervivencia neuronal e integridad sináptica, en presencia de Abeta y/o fosfo-tau solubles.....	104
2.4.1. <i>Efecto de los astrocitos sobre la supervivencia neuronal</i>	104
2.4.2. <i>Efecto de los astrocitos sobre la integridad sináptica</i>	107
3. RESPUESTA ASTROGLIAL “IN VITRO”: FAGOCITOSIS DE DISTROFIAS NEURÍTICAS	110
3.1. Aislamiento y caracterización de neurosinaptosomas (NS).....	112
3.2. Cinéticas de fagocitosis y procesamiento de neurosinaptosomas por los astrocitos <i>in vitro</i>	113
3.2.1. <i>Captación/fagocitosis de neurosinaptosomas por astrocitos</i>	113
3.2.2. <i>Degradación/procesamiento de neurosinaptosomas por astrocitos</i>	114
3.2.3. <i>Caracterización estructural de los astrocitos tras fagocitar neurosinaptosomas</i>	117
3.2.4. <i>El Abeta soluble es el responsable del retraso en la cinética de fagocitosis de los neurosinaptosomas de animales APP</i>	121
3.2.5. <i>El retraso en la cinética de fagocitosis de neurosinaptosomas con Abeta es específico de astrocitos</i>	121
3.3. Los neurosinaptosomas no son tóxicos para los astrocitos primarios.....	122
3.4. Caracterización de la respuesta de los astrocitos tratados con neurosinaptosomas...	123
3.5. Efecto funcional de la respuesta de los astrocitos ante los diferentes neurosinaptosomas, sobre la activación microglial y/o la toxicidad neuronal.....	124
4. CARACTERIZACIÓN DE LOS ASTROCITOS “IN VIVO”	127
4.1. Caracterización transcriptómica de los astrocitos en distintos modelos de la EA.....	127
4.1.1. <i>Aislamiento de los astrocitos de la corteza cerebral e hipocampo de distintos modelos murinos de la EA</i>	127
4.1.2. <i>Análisis transcriptómico de los astrocitos aislados de distintos modelos murinos de la EA</i>	128
4.2. Estudio de los niveles de calcio y estrés oxidativo en las mitocondrias de los astrocitos tratados con Abeta soluble, mediante microscopía multifotón <i>in vivo</i>	133
4.2.1. <i>Niveles de calcio en las mitocondrias de los astrocitos tratados con Abeta soluble</i> ..	133
4.2.2. <i>Estrés oxidativo en las mitocondrias de los astrocitos tratados con Abeta soluble</i> ...	133
4.3. Caracterización transcriptómica de los astrocitos en muestras humanas <i>postmortem</i> de pacientes de Alzheimer.....	135
E. DISCUSIÓN	141
1. Reactividad Astrogliar en modelos animales y en pacientes de Alzheimer	143

2. Respuesta Astrogial <i>in vitro</i> a las formas solubles de Abeta y/o fosfo-tau: Activación de una respuesta pro-inflamatoria y disminución de la función neuroprotectora.....	145
3. Alteración de la fagocitosis de distrofias neuríticas ricas en Abeta por los astrocitos reactivos <i>in vitro</i>.	150
4. Caracterización <i>in vivo</i> de los astrocitos en la EA.	157
4.1. Caracterización transcriptómica de los astrocitos en distintos modelos de la EA.....	157
4.2. Aumento en los niveles de calcio y el estrés oxidativo en las mitocondrias de los astrocitos, debido al Abeta soluble.....	164
4.3. Caracterización transcriptómica de los astrocitos en muestras humanas <i>postmortem</i> de pacientes de Alzheimer.....	166
4.4. Comparación de la respuesta astrogial en modelos transgénicos y en pacientes de Alzheimer.....	170
F. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	177
G. SUMMARY	181
1. Introduction	183
2. Methods	184
3. Results and Discussion	186
4. Conclusions	189
H. BIBLIOGRAFÍA	191

A. INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES: LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer (EA) fue descrita por primera vez en 1907 por el psiquiatra y neurólogo Alois Alzheimer (Alzheimer, 1907). Sus hallazgos se refieren a Auguste Deter (**Fig.A1**), la primera paciente diagnosticada con esta enfermedad a los 51 años de edad, que sufría pérdida progresiva de memoria, entre otros trastornos característicos, y que, finalmente, falleció en estado total de invalidez. El análisis anatómico patológico del cerebro de esta paciente reveló la presencia de depósitos proteicos extracelulares (placas seniles) y agregados fibrilares intracelulares (ovillos), localizados principalmente en la corteza cerebral e hipocampo. Ambas lesiones histopatológicas son actualmente los principales marcadores *postmortem* de esta enfermedad. No fue hasta 1910 cuando se le dio nombre a esta nueva entidad clínica y patológica, conocida hoy en día como *Enfermedad de Alzheimer*.



Figura A1. Alois Alzheimer y su paciente. El Dr. Alois Alzheimer (1864-1915) a la izquierda y su paciente Auguste Deter (1850-1906) a la derecha.

La EA se puede definir como un proceso neurodegenerativo progresivo e irreversible, que se manifiesta con deterioro de las funciones cognitivas y alteraciones conductuales. Se caracteriza por la pérdida de memoria (manifestada como la dificultad de recordar hechos recientemente y de adquirir nueva información), de habilidades intelectuales y de razonamiento, así como por la presencia de desorientación espacio-temporal, cambios de humor, alteraciones conductuales, afasia (disminución progresiva de la capacidad del lenguaje), apraxia (alteración de los gestos e incapacidad de llevar a cabo tareas rutinarias, a pesar de tener la capacidad física) y/o agnosia (incapacidad de reconocimiento de personas u objetos) (Van Strien y col. 2009; Hane y col. 2017b; Kumar y Tsao, 2018). Finalmente, la muerte suele atribuirse a enfermedades no relacionadas o indirectamente relacionadas con la demencia; sólo un 20% de las muertes son directamente atribuibles a esta o a sus complicaciones durante la fase terminal, siendo la malnutrición o la neumonía las más comunes (Castellani y col. 2010; McKhann y col. 2011; Webster y col. 2014; Kumar y Tsao, 2018).

Desde el punto de vista clínico, dependiendo del grado de alteración cognitiva, la EA se clasifica en 3 fases (**Fig.A4**) (Kumar y Tsao, 2018). Así pues, la enfermedad comienza con una fase "preclínica" asintomática, con una amiloidosis cerebral, afectando en primer lugar a la corteza entorrinal y al hipocampo; a continuación, hay una fase "prodrómica" o de "deterioro cognitivo leve" (MCI, del inglés *mild cognitive impairment*), que ya se caracteriza por una reducción en las funciones cognitivas, ya que la patología progresa hacia distintas áreas de la corteza cerebral; y, finalmente, una fase de "demencia", como consecuencia de la pérdida de sinapsis y neuronas en toda la corteza, afectando principalmente a las regiones

cerebrales responsables de los procesos cognitivos, como son la corteza entorrinal, el hipocampo, la amígdala y áreas neocorticales (Serrano-Pozo y col. 2011a; Karch y col. 2014; Scheltens y col. 2016; Winblad y col. 2016; Hane y col. 2017b; Kumar y Tsao, 2018). El curso clínico de la EA suele durar 4-8 años, pudiendo llegar hasta los 20, tras los primeros signos de la enfermedad (Kumar y Tsao, 2018).

La EA representa, hoy en día, el tipo de demencia de mayor incidencia y la más común afectando al 10% de la población mayor de 65 años, así como una de las patologías neurodegenerativas más graves que afecta a este sector de la población (Kumar y Tsao, 2018). En la actualidad, se estima que el número de personas que padecen demencia es de unos 47 millones a nivel mundial (OMS 2017; Prince y col. 2016), siendo la EA la más común, ya que constituye un 60-70% de todos los casos de demencia (OMS 2017; Robinson y col. 2017). Debido al envejecimiento progresivo de la población (Robinson y col. 2017) y en ausencia de terapias efectivas, se calcula que este número se duplique para 2030 y triplique para 2050 (OMS 2017; Prince y col. 2016; <https://www.alz.co.uk/research/world-report-2016>; Kumar y Tsao, 2018), alcanzándose los 132 millones de afectados en todo el mundo en el año 2050 (Prince y col. 2016), de las cuales, la mayoría sufrirá demencia tipo Alzheimer (Neugroschl y Sano, 2010). La incidencia de la EA de tipo esporádica aumenta de forma exponencial con la edad; así, aunque sólo afecta a un 1-2% de las personas menores de 65 años, más del 30-40% de la población mayor de 85 años presenta esta enfermedad en alguno de sus grados, ascendiendo al 63,9% en personas mayores de 90 años (Prince y col. 2013). Estos datos hacen que la EA sea un grave problema de salud pública que se agravará en el futuro debido al aumento progresivo de la esperanza de vida actual, al envejecimiento de la población y al elevado coste económico, sanitario y social que supone el cuidado de un enfermo de EA (Robinson y col. 2017). De hecho, la EA es actualmente el tercer problema de salud más grave en los países desarrollados (detrás de los accidentes cardiovasculares y el cáncer), lo que pone de manifiesto la necesidad urgente de una terapia eficaz con el fin de evitar que se convierta en el mayor problema de salud del mundo en los próximos años (Robinson y col. 2017).

Desde que se describieron por primera vez sus características clínicas y patológicas (Alzheimer, 1907) se han desvelado importantes avances científicos sobre los mecanismos moleculares que subyacen a esta enfermedad. En el pasado, la demencia tipo Alzheimer era difícil de diferenciar de otros tipos de demencia; actualmente, los avances en tecnología médica de imagen cerebral permiten explorar el cerebro de manera no invasiva mediante resonancia magnética (MRI) y tomografía de emisión positrónica (PET) (Hane y col. 2017b). Independientemente de estos avances, el diagnóstico de la EA a día de hoy se apoya principalmente en la historia clínica y en los exámenes neuropsicológicos los pacientes, tales como el MoCA ("*Montreal Cognitive Assessment*") o el MMSE ("*Mini-Mental Status Examination*") (Hane y col. 2017b; Kumar y Tsao, 2018). Aunque se aúnan esfuerzos para poder identificar los síntomas de iniciales de la enfermedad, desafortunadamente cuando la

EA se diferencia del resto de demencias, el proceso patológico está muy avanzado y es irreversible (Hane y col. 2017b; Kumar Tsao, 2018). A pesar de todos los avances conseguidos en los últimos años en la caracterización molecular de la EA, a día de hoy, se desconoce la causa o causas exactas que la originan. Además, la ausencia de buenos marcadores biológicos de la enfermedad hace que aún no dispongamos de un test pre-mortem para un diagnóstico concluyente y que sólo el análisis neuropatológico *postmortem* permita su diagnóstico definitivo. Tampoco existe ningún tratamiento farmacológico efectivo que cure la enfermedad, ni siquiera que modifique el curso de la misma; los fármacos disponibles actualmente (inhibidores de la acetil colinesterasa y antagonista parcial de los receptores NMDA) son exclusivamente de carácter sintomático y producen un beneficio clínico limitado (sobre todo en los primeros estadios de la enfermedad) (Hane y col. 2017b; Kumar y Tsao, 2018). La ausencia actual de terapias efectivas que modifiquen el curso natural de la EA junto con el rápido aumento de su prevalencia, hacen indispensable seguir investigando los agentes causales de la patología, sus mecanismos moleculares y celulares, y las posibles dianas terapéuticas que posibiliten el desarrollo de fármacos eficaces contra la misma (Hane y col. 2017b).

1.1. Tipos de Alzheimer

Se distinguen dos tipos de la EA, que se diferencian claramente en la edad de inicio, su incidencia y la principal causa que provoca su aparición, pero que comparten la misma sintomatología y lesiones histopatológicas (Gassen y Annaert, 2003; Gomez-Isla y col. 2008; Perl, 2010; Ballard y col. 2011; Bagyinszky y col. 2014).

1.1.1. Alzheimer Familiar (FAD, del inglés *Familial Alzheimer's Disease*)

Representa entre el 1-3% de los casos de Alzheimer y se manifiesta a edades tempranas, generalmente entre los 35 y 40 años de edad (Ringman y col. 2015), por lo que también se conoce como “Alzheimer presenil” o “de inicio temprano”. Se origina por mutaciones autosómicas dominantes (con un 100% de penetrancia) en los genes de la *proteína precursora amiloide* (APP) y las *presenilinas 1 y 2* (PS1 y PS2) (**Fig.A2**) (Bertram y col. 2010; O'Brien y Wong 2011; Karch y col. 2014; Calero y col. 2015; Herrup, 2015; Cristóvão y col. 2016; Drummond y Wisniewski, 2016; Cacace y col. 2016; Hane y col. 2017a; Robinson y col. 2017; Kumar y Tsao, 2018), localizados en los cromosomas 21, 14 y 1, respectivamente. Estas proteínas están implicadas en la producción del péptido beta-amiloide (Abeta), la primera es su precursora y las otras dos forman parte del complejo gamma-secretasa que interviene en el procesamiento de APP (ver Apartado 2.1). A día de hoy, se han descrito 52 mutaciones en APP, 241 en PS1 y sólo 45 en PS2, relacionadas con la enfermedad (<http://www.alzforum.org/mutations>).

Aunque las primeras mutaciones relacionadas con la EA se describieron en la proteína precursora amiloide (APP), sólo son responsables del 10% de los casos de FAD. La

implicación de este gen en la EA es tal, que su duplicación en los casos de trisomía del cromosoma 21 es suficiente para causar daños neurológicos responsables de los síntomas de demencia que pueden manifestar los individuos con Síndrome de Down a edades tempranas (Czech y col. 2000; Thinakaran y Koo, 2008; Wiseman y col. 2015). Sin embargo, las mutaciones en el gen de la presenilina 1 (PS1) son la causa más frecuente de Alzheimer familiar, con un 30-50% antes de los 55 años y un 70% del total de casos de FAD (Sherrington y col. 1995; Czech y col. 2000).

1.1.2. Alzheimer Esporádico

Esta variante representa la mayoría de los casos de EA (97-99%) y se le conoce también como Alzheimer “de inicio tardío”. Afecta al 3-4% de los adultos entre los 60 y 65 años, y su incidencia se duplica cada 5 años, aumentando exponencialmente con la edad y llegando a afectar a casi un 50% de la población a partir de los 85 años (Jahn, 2013; Prince y col. 2013). Sus causas son desconocidas hasta el momento y se le otorga un origen multifactorial. Además de la edad, que constituye el principal factor de riesgo de esta enfermedad (Ballard y col. 2011; Mattson y col. 2018), otros posibles factores que influyen en la aparición de la misma son los siguientes (Ballard y col. 2011; Scheltens y col. 2016; Zuroff y col. 2017; Robinson y col. 2017; Kumar y Tsao, 2018):

- **Factores Genéticos:** Se han identificado polimorfismos genéticos en más de 20 genes implicados en el inicio, progresión y severidad de la patología (**Fig.A2**) (Calero y col. 2015; Lambert y col. 2013; Bagyinszky y col. 2014; Giri y col. 2016; Rosenberg y col. 2016; Scheltens y col. 2016; Hansen y col. 2017). Los estudios GWAS (del inglés *Genome wide association studies*) han permitido identificar alelos asociados a la patología de Alzheimer (Robinson y col. 2017; Sancesario y Bernardini, 2018) y, curiosamente, la mayoría de ellos se expresan preferencialmente en células relacionadas con la respuesta inflamatoria en el SNC, la microglía (Hansen y col. 2017; Srinivasan y col. 2016), y los astrocitos. Los principales genes polimórficos que aumentan el riesgo de padecer la forma esporádica de la EA son los siguientes:

- APOE (“Apolipoprotein E”). Gen localizado en el cromosoma 19. Es una proteína polimórfica, predominantemente secretada por células gliales y que funciona como transportador de colesterol en el cerebro, principalmente en forma de HDL (Leyns y Holtzman, 2017; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). Además de ser un modulador primario del colesterol cerebral y, en general, de la homeostasis lipídica y proteica (Robinson y col. 2017). ApoE interviene en el metabolismo y el aclaramiento del péptido Abeta, actuando como una chaperona capaz de estabilizar los depósitos fibrilares y/o dificultar su eliminación (Kim y col. 2014; Kumar y Tsao, 2018; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). Además, ApoE parece intervenir en el proceso neuroinflamatorio (Tai y col. 2015) y en las alteraciones sinápticas asociadas a la patología de Alzheimer (Yu y col. 2014), e incluso en la patología tau y la neurodegeneración (Shi y col. 2017b).

ApoE presenta tres isoformas, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ (la más común) y $\epsilon 4$ (Strittmatter y col. 1993; Yu y col. 2014), con diferentes efectos en la homeostasis del Abeta (Robinson y col. 2017). Esta última representa, tras la edad, el principal factor de riesgo asociado al Alzheimer esporádico (Robinson y col. 2017; Kumar y Tsao, 2018); los individuos con una copia de este alelo incrementan su riesgo tres veces y 15 veces, los homocigotos (Eisenstein, 2011; Kumar y Tsao, 2018; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). Contrariamente, el alelo $\epsilon 2$ parece tener un papel protector contra el desarrollo de la EA (Corder y col. 1994; Selkoe, 2001).

- CLU (“clusterina”). Gen localizado en el cromosoma 8 y codifica para una región de la cadena beta de la proteína clusterina, conocida como Apolipoproteína J (Robinson y col. 2017). Su expresión está incrementada en ciertas regiones cerebrales de pacientes de EA (Calero y col. 2000; Lambert y col. 2009). Dicha proteína es secretada por los astrocitos y posee actividad chaperona que previene la oligomerización/fibrilización de Abeta, formando complejos insolubles que atraviesan la barrera hematoencefálica (BHE) (Boggs y col. 1996). Ciertas mutaciones en este gen parecen promover la agregación y formación de las placas amiloides (Bagyinszky y col. 2014).

- TREM2 (“triggering receptor expressed on myeloid cells 2”) (Sancesario y Bernardini, 2018). Es un receptor transmembrana de superficie celular perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas, expresado en el SNC específicamente por la microglía. Está implicado en la activación, fagocitosis, supervivencia y proliferación microglial (Hickman y El Khoury, 2014; Ulland y col. 2017; Hansen y col. 2017; Navarro y col. 2018). Distintas variantes de este gen, como R47H, aumentan el riesgo de desarrollar la EA entre dos y cuatro veces (Leyns y Holtzman, 2017; Hansen y col. 2017). En modelos animales de EA (como PS1/APP o 5xFAD), así como en muestras de pacientes con EA, se produce un incremento dependiente de la edad de microglía positiva para TREM2. Además, deficiencias en TREM2 reducen algunas de las alteraciones histopatológicas típicas de la EA (Jay y col. 2015) probablemente debido a una pérdida de función microglial (Leyns y Holtzman, 2017). TREM2 también se une a ApoE y Clusterina (ApoJ), factores de riesgo de la EA (Hansen y col. 2017). Sin embargo, existen numerosas controversias sobre cómo las distintas variantes de TREM2 confieren el riesgo de padecer EA.

- CR1 (“complement receptor type 1”) (Lambert y col. 2009). Proteína involucrada en la inmunidad innata (Robinson y col. 2017), cuyo gen se localiza en el cromosoma 1 y codifica para el receptor del complemento 1 (receptor de C3b) (Mosher y Wyss-Coray, 2014). Está ligado a la EA a través de la activación de la cascada del complemento, inducida por el Abeta fibrilar, en la que participan microglía y astrocitos.

- CD33 (“cluster of differentiation 33”). Es una proteína transmembrana relacionada con la inmunidad innata, pero cuya función en el cerebro todavía es desconocida. Parece inhibir la captación y el aclaramiento del Abeta mediante las células microgliales, lo que sugiere un posible papel en la patología Abeta (Robinson y col. 2017).

La lista de genes implicados en la EA es aún mayor (Calero y col. 2015; Sancesario y Bernardini, 2018): *α2-macroglobulina* (Flachsbart y col. 2010), *fosfolipasa A2* (PLA2; Cordeiro y col. 2010), *sortilina-1* (SORL1; Rogaeva y col. 2007; Robinson y col. 2017), *TREM24* (Guerreiro y col. 2013; Jonsson y col. 2013), *ADAM10* (Kim y col. 2009), *fosfolipasa D3* (PLD3; Cruchaga y col. 2014), etc. En general, todos estos genes están implicados en distintas vías relacionadas con la patología de la EA, tales como el procesamiento y el aclaramiento amiloideo, la respuesta inmune e inflamatoria (CR1, CD33, MS4A, ABCA7, EPHA1, CLU, HLA-DRB5/HLA-DRB1, INPP5D y MEF2C), el metabolismo del colesterol (APOE, SORL1, ABCA7 y CLU), la regulación de la endocitosis y del transporte vesicular (BIN1, CD2AP, PICALM, EPHA1, SORL1), y la función del citoesqueleto y del transporte axonal (NME8, CELF1 y CASS4), entre otras (Sancesario y Bernardini, 2018; Robinson y col. 2017; Leyns y Holtzman, 2017).

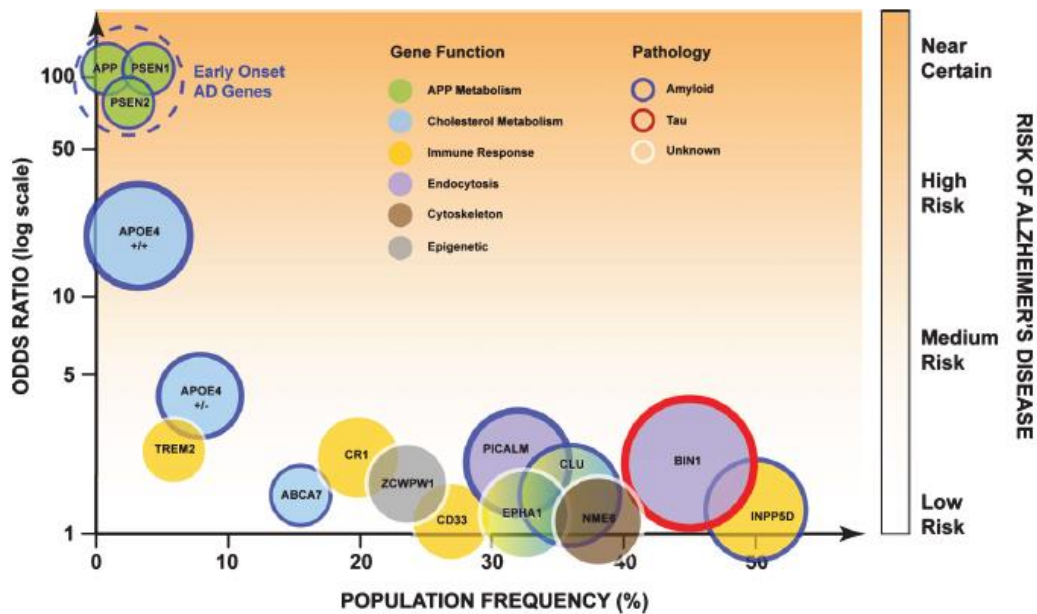


Figura A2. Factores de riesgo genéticos de la EA y sus funciones fisiológicas generales. Los genes de alto riesgo están asociados con el aumento de la severidad de la enfermedad y el inicio a edad temprana, y los factores genéticos de menor riesgo presentan un inicio más tardío y la severidad de la patología es menor. Imagen tomada de Robinson y col. 2017.

- **Factores Ambientales:** la obesidad, el estrés, la hipertensión, la inactividad física y mental, la depresión, las enfermedades vasculares, el tabaco, el traumatismo cerebral y la diabetes mellitus son factores de riesgo modificables que parecen contribuir al desarrollo de la EA esporádica (Luchsinger y Mayeux, 2004; Blennow y col. 2006; Scarmeas y col. 2009; Otaegui-Arazola y col. 2014; Scheltens y col. 2016; Kuruva y Reddy, 2017; Hane y col. 2017a; Robinson y col. 2017). Cada uno de ellos por sí solo no son suficientes para desencadenar la enfermedad, pero todos en conjunto, sí aumentan la predisposición para padecerla.

La diabetes mellitus se considera un factor de riesgo importante para desarrollar EA por varios motivos: la insulina modula la plasticidad sináptica, la memoria y el aprendizaje, y

regula el metabolismo de Abeta y de Tau (Zhu y col. 2005; Sato y Morishita, 2014), además en pacientes diabéticos son comunes los daños microvasculares (Domínguez y col. 2014). Evidencias recientes apoyan la implicación del sistema vascular cerebral en la EA (Karran y De Strooper, 2016); de hecho, los enfermos de Alzheimer tienen una red neurovascular y capilar mucho más reducidas y presentan una **angiopatía amiloide cerebral** o **CAA** ("cerebral amyloid angiopathy"), con depósitos de Abeta sobre los vasos sanguíneos cerebrales (Drummond y Wisniewski, 2016; Zuroff y col. 2017), lo que puede provocar obstrucción de los propios vasos sanguíneos, contribuyendo al declive cognitivo relacionado con la EA (Verkhatsky y col. 2010; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). Todo ello ha llevado a establecer la hipótesis vascular de la EA.

El género también se considera un factor de riesgo de la EA esporádica, no sólo por las diferencias biológicas entre hombres y mujeres, sino también por las ambientales, sociales y culturales entre ambos sexos (Nebel y col. 2018). En general, las mujeres tienen mayor riesgo que los hombres (Reiman y Caselli, 1999; Maccioni y col. 2001; Ampuero y col. 2008; Nebel y col. 2018), sobre todo las mujeres postmenopáusicas, posiblemente debido al papel neuroprotector que poseen los estrógenos, que se pierden en la menopausia (Maccioni y col. 2001). Además, las mujeres también tienen una mayor esperanza de vida (Riedel y col. 2016; Nebel y col. 2018).

Controlar los factores anteriormente expuestos, así como desarrollar actividades intelectuales y sociales, una actividad física regular y una dieta equilibrada pueden contribuir a reducir el riesgo de desarrollar la EA (Kocahan y Doğan, 2017; Robinson y col. 2017).

1.2. Rasgos neuropatológicos

El cerebro de los pacientes de Alzheimer se caracteriza por presentar unos rasgos anatómico-patológicos muy característicos (Perl, 2010; Claeysen y col. 2012; Scheltens y col. 2016). Las principales alteraciones macroscópicas son una importante atrofia cortical, adelgazamiento de las circunvoluciones y ensanchamiento de los surcos, engrosamiento de las meninges, agrandamiento de las cavidades ventriculares, disminución del bulbo olfatorio y pérdida de peso y volumen cerebral (**Fig.A3**). Por lo tanto, la atrofia cerebral se puede analizar mediante neuroimagen, para mejorar el diagnóstico precoz y ayudar a predecir el curso de la enfermedad (Nasrallah y Wolk, 2014; Eskildsen y col. 2015). Por otro lado, las principales alteraciones microscópicas características de la EA son (Gomez-Isla y col. 2008; Duyckaerts y col. 2009; Perl, 2010; Serrano-Pozo y col. 2011a; Karch y col. 2014):

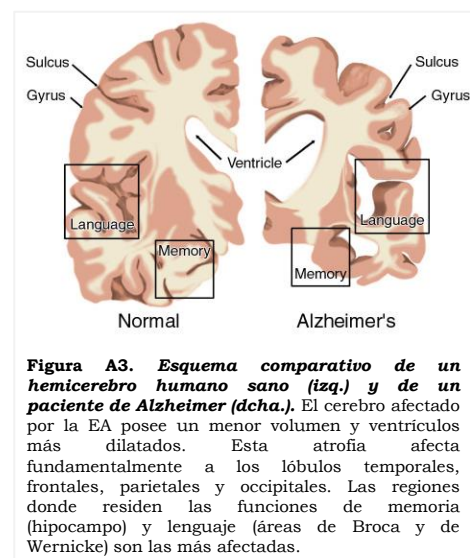


Figura A3. Esquema comparativo de un hemisferio humano sano (izq.) y de un paciente de Alzheimer (dcha.). El cerebro afectado por la EA posee un menor volumen y ventrículos más dilatados. Esta atrofia afecta fundamentalmente a los lóbulos temporales, frontales, parietales y occipitales. Las regiones donde residen las funciones de memoria (hipocampo) y lenguaje (áreas de Broca y de Wernicke) son las más afectadas.

1. Acumulación de proteínas agregadas en forma de placas seniles extracelulares, formadas por la proteína beta-amiloide (A β) (Apartado 2), y de ovillos neurofibrilares intracelulares (NFTs) formados por la proteína Tau hiperfosforilada (Apartado 3) (Kumar y Tsao, 2018). Estas dos alteraciones tisulares proteicas, descritas por Alois Alzheimer hace más de 100 años, siguen siendo, en la actualidad, las lesiones histopatológicas para el diagnóstico definitivo *postmortem* de la enfermedad.
2. Significativa pérdida sináptica y degeneración neuronal en áreas cerebrales selectivamente vulnerables, que en muchas ocasiones están implicadas en el procesamiento de la información y la adquisición de la memoria (Apartado 4) (Gomez-Isla y col. 1996).
3. Presencia de un proceso neuroinflamatorio importante, con activación glial (Heneka y col. 2015a), que se detallará más adelante (Apartado 5).

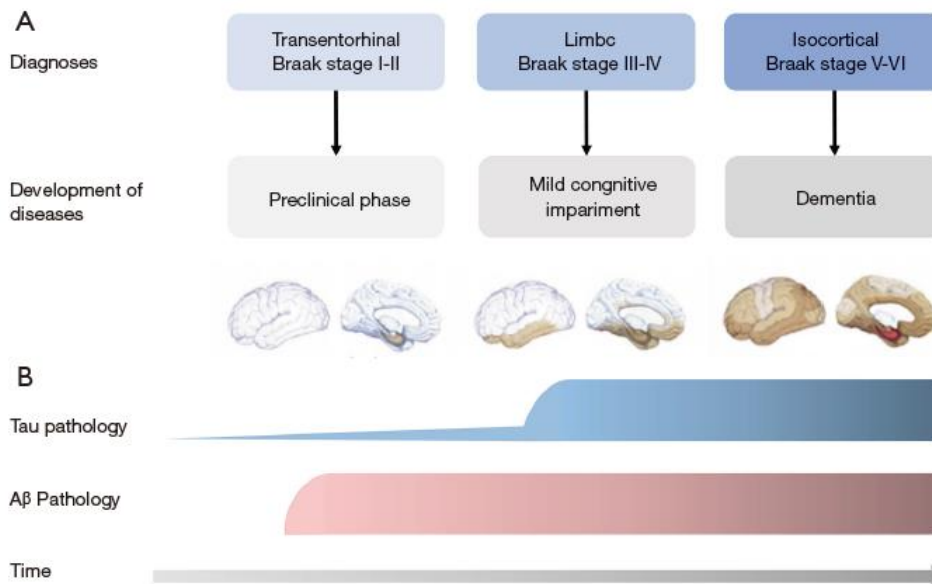


Figura A4. Cambios patológicos de tau y Abeta en la progresión de la Enfermedad de Alzheimer. Estadios de Braak I-VI. (A) La progresión de la agregación y deposición de tau correlaciona altamente con el desarrollo de la enfermedad. De acuerdo con la teoría de los estadios de Braak, la patología tau es la primera que se detecta en las regiones entorrinal y transentorrinal (Braak I y II); se observa después en el hipocampo (Braak III y IV) y, finalmente, se extiende a la corteza (Braak V y VI). **(B)** Mientras que la deposición de Abeta comienza de manera temprana en la EA, la patología tau parece ser anterior a la patología Abeta en el cerebro y se extiende a lo largo del curso de la enfermedad. Sus niveles están altamente relacionadas con el inicio de los síntomas. Imagen tomada de Gao y col. 2018.

Estas lesiones neuropatológicas se manifiestan principalmente en áreas cerebrales implicadas en los mecanismos de memoria y aprendizaje, y en los procesos cognitivos focales. Inicialmente aparecen en la corteza entorrinal, progresando hacia el hipocampo y afectando, finalmente, a las áreas neocorticales (**Fig.A4**; Braak y Braak, 1991; Gao y col. 2018). Las cortezas motora y sensorial no parecen alterarse y, si lo hacen, no es hasta estadios muy avanzados de la enfermedad.

Debido a esta complejidad y a la naturaleza multifactorial de la EA, actualmente muchos investigadores consideran que las características moleculares y celulares de la EA no deben contemplarse de manera aislada, sino más bien como manifestaciones interdependientes

(Hane y col. 2017a). Las actuales técnicas “ómicas” y de “big data”, junto con la potente capacidad computacional, van a permitir entender e integrar las interacciones entre todos estos factores que ocurren en los cerebros de pacientes de Alzheimer (Sancesario y Bernardini, 2018; Hane y col. 2017a).

2. ABETA Y PATOLOGÍA AMILOIDE

Una de las lesiones microscópicas más características del cerebro de pacientes de Alzheimer son las placas seniles: agregados proteicos localizados en el parénquima cerebral cuyo componente principal es el péptido beta-amiloide (Abeta). Este péptido contiene entre 39 y 43 aminoácidos y deriva del procesamiento proteolítico de la proteína precursora del péptido beta-amiloide (APP) (De Strooper, 2010; Hane y col. 2017a) (**Fig.A5**). El Abeta se genera de forma natural y circula a baja concentración tanto en plasma como en líquido cefalorraquídeo de individuos sanos. De hecho, existen depósitos de Abeta insoluble en el parénquima cerebral y en la pared de los vasos sanguíneos cerebrales (CAA) de personas sanas con edad avanzada (Selkoe, 2004; Gomez-Isla y col. 2008).

Se han realizado numerosas investigaciones para aclarar el papel fisiológico del péptido Abeta. Algunos trabajos sugieren que podría actuar en el mantenimiento de la tasa basal y en la regulación de la liberación de vesículas desde terminales presinápticos excitatorios (Abramov y col. 2009), así como regulador negativo postsináptico (Palop y Mucke, 2010). De hecho, concentraciones picomolares de Abeta mejoran la plasticidad sináptica y la memoria (Puzzo y col. 2008; Morley y col. 2010). Además, los monómeros de Abeta42 parecen ejercer un papel neuroprotector (Giuffrida y col. 2009). Estos datos en conjunto apuntan a una pérdida de función de Abeta como otra posible causa de la patología de la EA.

En condiciones fisiológicas, más del 90% de las especies de Abeta se encuentran en forma de Abeta40 (soluble), de 40 aminoácidos, con Val40 en su extremo C-terminal, y menos del 10% como Abeta42, con los aminoácidos adicionales Ile41 y Ala42, que le confieren mayor hidrofobicidad y capacidad de agregación (Wolfe y Guenette, 2007; Hiltunen y col. 2009; De Strooper, 2010; Zhang y col. 2011). Abeta42 es el componente mayoritario y más tóxico de las placas (Hane y col. 2017a; Kumar y Tsao, 2018); de hecho, en pacientes de EA, aumenta la relación Abeta42/Abeta40 (Ashe y Zahs, 2010; Hane y col. 2017a).

Aunque el mecanismo de formación de la placa no está completamente desvelado, se sabe que es limitante el aumento de Abeta (especialmente de Abeta42). Además, podrían participar los ADDLs (*Amiloide-beta Derived Diffusible Ligands*), las fibras de Abeta y algunos complejos como los formados por ApoE-Abeta (Thal y col. 2006). Por lo tanto, es fundamental conocer tanto los mecanismos de producción como de degradación y aclaramiento de las distintas isoformas de Abeta.

2.1. Proteínas implicadas en la síntesis de Abeta

2.1.1. Proteína Precursora Amiloide (APP)

APP es una glicoproteína integral de membrana de tipo I, muy conservada evolutivamente, con un largo ectodominio globular (N-terminal) en el espacio extracelular, un único segmento transmembrana y un pequeño dominio citosólico (C-terminal) (Gralle y Ferreira, 2007; Turner y col. 2003; Rajendran y Annaert, 2012; Nguyen, 2015). Su gen se localiza en el cromosoma 21 (Kumar y Tsao, 2018), y está constituido por 18 exones que dan lugar a 10 isoformas alternativas de entre 563 y 770 aminoácidos (Evin y Weidemann, 2002; Hane y col. 2017a), siendo las más frecuentes: APP695, APP751 y APP770 (Tanzi y col. 1988; Yamada y Nabeshima, 2000). La isoforma APP695 se expresa predominantemente en neuronas (Haass y col. 1991), por lo que es la que encontramos con mayor frecuencia en el sistema nervioso (Nalivaeva y Turner, 2013; Müller y col. 2017; Giri y col. 2016).

Además de ser la precursora del péptido Abeta, la proteína APP posee otras funciones fisiológicas menos conocidas (Müller y col. 2017; Hane y col. 2017a): participa en procesos de adhesión y señalización celular (Wolfe y Guenette, 2007), transporte de metales, unión a matriz extracelular, crecimiento de neuritas y del cono axónico neuronal, migración neuronal, homeostasis del calcio, potenciación a largo plazo (LTP) y señalización intracelular (Hoe y Rebeck, 2008; Hiltunen y col. 2009; Müller y col. 2017). Además, podría tener propiedades neuroprotectoras, antioxidantes y tróficas (Thinakaran y Koo, 2008; O'Brien y Wong, 2011; Rajendran y Annaert, 2012; Nguyen, 2015; Tatarnikova y col. 2015; Andreeva y col. 2017; Hane y col. 2017a).

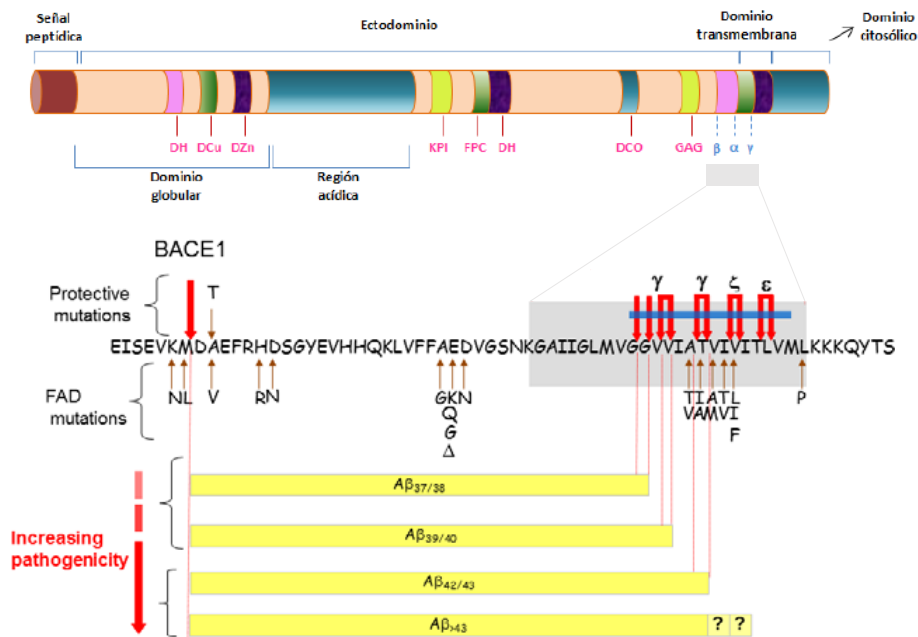


Figura A5. Representación esquemática de la estructura de la proteína APP. Presenta tres dominios principales: un dominio extracelular N-terminal, un dominio transmembrana y un dominio citosólico C-terminal. El dominio extracelular contiene a su vez una serie de dominios funcionales, como son: un dominio de unión a heparina (DH), un dominio de unión a cobre (DCu), un dominio de unión a zinc (DZn), una región ácida, un dominio inhibidor de proteasa tipo Kunitz (KPI, que no se encuentra en la isoforma APP695), un factor promotor de crecimiento (FPC), un segundo dominio de unión a heparina (DH), un dominio de unión a colágeno (DCO), un sitio de unión a glucosaminoglucanos (GAG) y el dominio beta-amiloide (Abeta), que presenta parte de su estructura en el dominio extracelular y parte transmembrana. En la imagen se detallan también los puntos de corte de las diferentes enzimas implicadas en el procesamiento de APP (α - β - y γ - secretasas), y sus posibles mutaciones protectoras o patogénicas. Adaptado de Evin y Weidmaan, 2002 y Karran y De Strooper, 2016.

Se han descrito 52 mutaciones en el gen APP relacionadas con las formas familiares de la EA (<http://www.alzforum.org/mutations>), que pueden aumentar la producción de Abeta42, disminuir Abeta40, aumentar la patogenicidad del Abeta, su capacidad de agregación y su formación fibrilar (Macleod y col. 2015; Musiek y Holtzman, 2015; Tatarnikova y col. 2015). Curiosamente, la mutación A673T en APP reduce la producción amiloidogénica de Abeta y su agregación, proporcionando protección contra el declive cognitivo asociado a la edad (**Fig.A5**) (Herrup, 2015; Karran y De Strooper, 2016; Selkoe y Hardy, 2016; Zuroff y col. 2017).

2.1.2. Procesamiento de APP

Durante su secreción e internalización a través de la vía secretora la proteína APP sufre diversas escisiones proteolíticas a través tanto de vías canónicas (rutas amiloidogénica y no amiloidogénica) como de vías no canónicas (Andrew y col. 2016), en las que están implicadas enzimas como las caspasas, meprina, δ -secretasa y η -secretasa. A continuación, se describen las 2 rutas clásicas para el procesamiento post-traducciona l de APP (Zhang y col. 2011; Rajendran y Annaert, 2012; Hane y col. 2017a; Kumar y Tsao, 2018) (**Fig.A6**):

2.1.2.1. *Ruta no amiloidogénica*

Se trata de la ruta principal en la mayoría de las células, que no genera péptido Abeta (de ahí su nombre), ya que la proteólisis tiene lugar en el interior de la región que da lugar a dicho péptido. Ocurre mayoritariamente en la membrana plasmática.

En primer lugar, se produce la fragmentación de APP entre los aminoácidos 16 y 17 por acción de la **α -secretasa**, enzima anclada a la membrana, perteneciente a la familia de las desintegrinas y metaloproteasas (ADAM), liberándose un fragmento soluble denominado sAPP α , al que se le atribuyen propiedades neurotróficas y neuroprotectoras (De Strooper, 2010; Jeong, 2017). Además, se genera un fragmento C-terminal (APP-CTF) de 83 aminoácidos, que permanece anclado a la membrana, al que se le conoce como C83. C83 es sustrato del complejo **γ -secretasa**, que lo excinde en el interior de la membrana, concretamente entre los aminoácidos 711 y 713, originando los péptidos P3 (Abeta 17-40 y Abeta 17-42, que son liberados al espacio extracelular o vesicular, y un dominio AICD (o p7; dominio intracelular de APP), que es citosólico, y podría tener un papel en la regulación de la transcripción génica (De Strooper, 2010; Zhang y col. 2011; O'Brien y Wong, 2011; Wilkins y Swerdlow, 2017).

2.1.2.2. *Ruta amiloidogénica*

Esta ruta alternativa de procesamiento de APP es minoritaria en la mayoría de las células, excepto en las neuronas, y produce péptidos de Abeta. La vía está activa de forma fisiológica durante el envejecimiento normal, aunque se potencia en la EA.

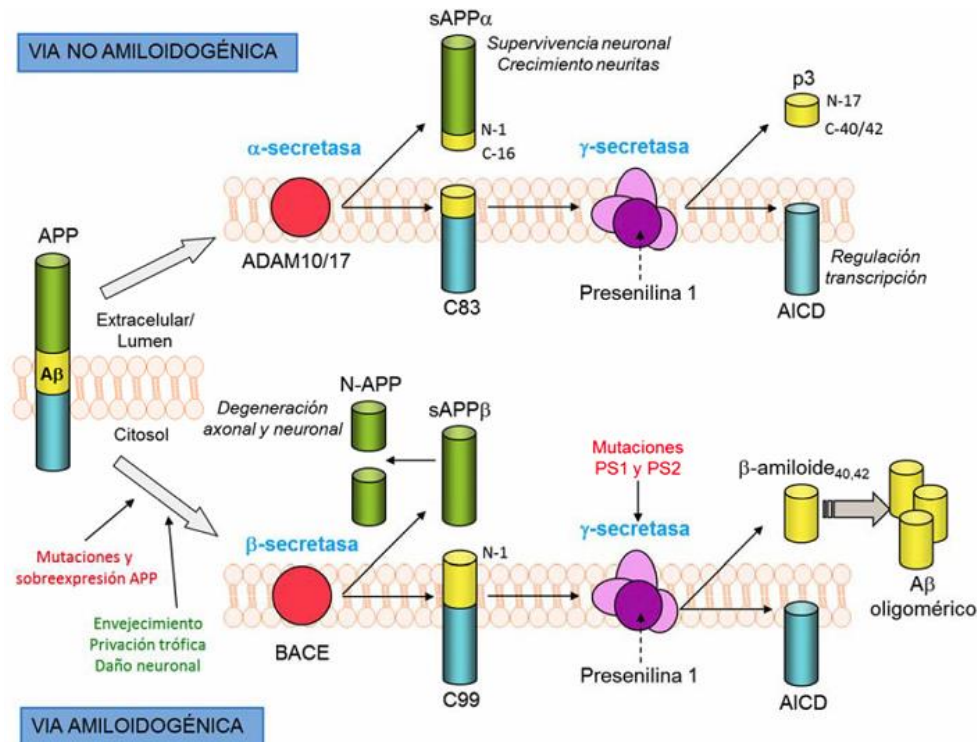


Figura A6. Procesamiento de la Proteína Precursora Amiloide (APP). Esquema explicativo de la ruta amiloidogénica y no amiloidogénica. En la vía no amiloidogénica, el metabolismo del APP se produce mediante la actividad secuencial de la α - (ADAM, del inglés *A desintegrin and metalloprotease*) y γ -secretasa, que generan sAPP α , p3 y AICD. En la vía amiloidogénica, el procesamiento del APP se lleva a cabo por la acción de la β -secretasa (BACE, del inglés *beta-site APPcleaving enzyme 1*), primero, y por la γ -secretasa, después, generándose los fragmentos sAPP β , Abeta y AICD. En definitiva, tras este procesamiento, se generan varios derivados del APP que realizan distintas funciones fisiológicas. En concreto, a través de la ruta amiloidogénica se genera el péptido Abeta, que se acumula en el medio extracelular y forma las placas seniles características de la EA. Modificado de Kim y Tsai, 2009.

La ruta comienza con la acción de la **β -secretasa**, atribuida a la enzima BACE-1 (*“beta-site APP cleaving enzyme 1”*), una aspartil proteasa transmembrana presente principalmente en endosomas y aparato de Golgi de las neuronas (Vassar y col. 2009). La β -secretasa excinde a APP entre Met671 y Asp672, liberando al espacio extracelular APP soluble beta (sAPP β), más pequeño que sAPP α pero que también posee funciones neuroprotectoras (Jeong, 2017), y un fragmento C-terminal (APP-CTF) de 99 aminoácidos, conocido como C99. C99, que permanece anclado a la membrana y contiene la secuencia intacta del Abeta, es procesado por el complejo **γ -secretasa** entre los aminoácidos 711 y 713, generando el péptido Abeta (de 39-43 aminoácidos) que se libera al medio extracelular, y un ectodominio intracelular AICD (Takami y col. 2009; Rajendran y Annaert, 2012; Selkoe, 2001; Selkoe, 2008; Wilkins y Swerdlow, 2017; Tomita, 2017), al que se le han atribuido tanto funciones neurotóxicas como funciones en el mantenimiento de la homeostasis del calcio (Jeong, 2017). El procesamiento proteolítico del sAPP β origina N-APP, que parece estar implicado en procesos de degeneración axonal y neuronal (Nikolaev y col. 2009; De Strooper, 2010; Jeong, 2017). Se considera que los oligómeros solubles de Abeta son los responsables iniciales de los procesos neurodegenerativos en la EA, que podrían actuar potenciando la actividad

neurotóxica de N-APP y AICD, y/o antagonizar las funciones protectoras de sAPP α , sAPP β y AICD (Jeong, 2017).

Se han propuesto a BACE-1 y al complejo γ -secretasa como posibles dianas terapéuticas en la EA, pero, a día de hoy, los ensayos clínicos realizados con inhibidores de estas enzimas no han llegado a término (De Strooper, 2010; Hunt y Turner, 2009; Wakabayashi y De Strooper, 2008; Parent y Thinakaran, 2010; Vetrivel y col. 2006; Li y col. 2009a). Actualmente se está usando un inhibidor de BACE-1 en fase 3 de estudio (“*elenbecestat*”), y sus resultados parecen eficaces cuando se aplica en los estadios iniciales de la patología (Panza y col. 2018).

2.1.3. Presenilinas: PS1 y PS2

Las presenilinas 1 y 2 (PS1 y PS2) son proteínas transmembrana con actividad proteasa (Czech y col. 2000), que constituyen el centro catalítico del complejo γ -secretasa. Dicho complejo está formado por la agrupación de 4 subunidades diferentes (Li y col. 2009a; De Strooper, 2010; O’Brien y Wong, 2011): un núcleo catalítico, formado por presenilina 1 (PS1) o presenilina 2 (PS2), y 3 proteínas accesorias: nicastrina (NCT), APH-1 y 2 (*pharynx-defective-1 and 2*) y el potenciador de presenilina (PEN2; *presenilin enhancer 2*), necesarias para la maduración, estabilidad y actividad de la enzima (De Strooper, 2003; Wolfe y Kopan, 2004; Takasugi y col. 2003; Edbauer y col. 2003; Andreeva y col. 2017). Las presenilinas se expresan predominantemente en neuronas, y también pueden encontrarse en astrocitos reactivos (Elder y col. 2010). PS1 y PS2 comparten más de un 65% de homología, siendo PS1 la que se expresa mayoritariamente.

Las presenilinas participan, además del procesamiento del APP y generación de Abeta (De Strooper, 2010), en el control de la apoptosis, la homeostasis del calcio, el crecimiento neurítico, la plasticidad sináptica, la intervención en las rutas autofagocíticas/lisosomales (Lee y col. 2010), la implicación en el tráfico de proteínas y en la señalización mediada por beta-catenina (De Strooper y col. 2012). Entre sus sustratos destacan Notch y APP (Cai y col. 2015).

A día de hoy, se han llegado a identificar 241 mutaciones patogénicas en el gen para PS1 (cromosoma 14) y 45 en PS2 (cromosoma 1), que producen FAD (<http://www.alzforum.org/mutations>). Todas implican una ganancia de función del complejo γ -secretasa que da lugar a un aumento en la producción de Abeta42 y una disminución de Abeta40.

2.2. **Degradación/eliminación de Abeta**

La acumulación defectuosa de Abeta, se debe a un desequilibrio entre su producción y los mecanismos de su eliminación (Evin y Weidemann, 2002; Thal y col. 2006; Duyckaerts y col. 2009; Hane y col. 2017a; Yi-Gang Chen, 2018). Existe un aumento en la producción de

Abeta en los pacientes de Alzheimer Familiar (FAD), pero no en los de Alzheimer Esporádico; una disminución de su degradación y de su aclaramiento puede explicar el aumento de la cantidad de Abeta en estos pacientes (Evin y Weidemann, 2002; Duyckaerts y col. 2009; Miners y col. 2014; Hane y col. 2017a).

Existen distintos mecanismos para degradar las distintas formas del péptido Abeta, mediante diferentes tipos de enzimas y proteasas (Mueller-Steiner y col. 2006; De Strooper, 2010; Sun y col. 2015; Andreeva y col. 2017; Ries y Sastre, 2016). En este sentido, la microglía y los astrocitos parecen jugar un papel importante (Ries y Sastre, 2016). A continuación, se enumeran las más relevantes:

- Metaloendopeptidasas: principalmente neprelisina (NEP) e IDE (enzima degradadora de insulina) implicadas en la degradación de Abeta monomérico (Ries y Sastre, 2016). Durante el envejecimiento, se produce una disminución de los niveles de neprilisina (Farris y col. 2007; Tarasoff-Conway y col. 2015), lo que podría ser responsable de un aumento de Abeta. También se han implicado a ECE-1 y ECE-2 (enzimas convertidoras de endotelina) en la degradación de Abeta (Eckman y col. 2001, 2003 y 2006; Pacheco-Quinto y Eckman, 2013), aunque su participación en humanos no está del todo claro.

- Metaloproteinasas de la matriz (MMPs), expresadas y secretadas principalmente por astrocitos, participan en la degradación extracelular de formas monoméricas y fibrilares de Abeta (Ries y Sastre, 2016). MMP-2, -3 y -9 tienen la capacidad de procesar agregados de Abeta fibrilar (Miners y col. 2008) y se expresan intensamente en los astrocitos cercanos a las placas amiloides (Acosta y col. 2017).

- Peptidasas lisosomales: catepsinas B y D. Son cistein-proteasas encargadas de degradar proteínas que han entrado en la vía endo-lisosomal (Mueller-Steiner y col. 2006; De Strooper, 2010). La catepsina B transforma grandes agregados de Abeta en especies más pequeñas, menos tóxicas y con mayor afinidad por IDE y NEP (Mueller-Steiner y col. 2006; De Strooper, 2010; Ries y Sastre, 2016).

Además, las células gliales, mediante la liberación de chaperonas extracelulares, también facilitan el aclaramiento de Abeta a través de la barrera hematoencefálica (Ries y Sastre, 2016). La mayoría de estas chaperonas se producen por los astrocitos, siendo las más relevantes la apolipoproteína E (ApoE), la Apolipoproteína J (ApoJ o Clusterina), la α 1-antichimiotripsina (ACT) y la α 2- macroglobulina (α 2-M).

También las células gliales participan de manera activa en la internalización de Abeta mediante mecanismos de pinocitosis, fagocitosis y/o endocitosis mediada por receptores (Lee y Landreth, 2010; Ries y Sastre, 2016), entre los que destacan los *scavenger receptors* (SR), *toll-like receptors* (TLR), RAGE, receptores Fc (FcRs), TREM2, LGI3, y receptores de lipoproteínas (LRP). Así, el Abeta se somete pues a varios sistemas de degradación intracelulares: autofagia (Nixon, 2007; Mizushima y Komatsu, 2011; Nixon y Yang, 2011;

Friedman y col. 2015), degradación endosomal/lisosomal y sistema ubiquitina-proteasoma (Zuroff y col. 2017).

Además, Abeta también puede ser dirigido a la circulación periférica a través de: (i) la *barrera hematoencefálica* tras su interacción con el receptor de LDL (LDLR); (ii) el *drenaje perivascular* (Weller y col. 2008); y/o (iii) el *sistema glinfático* (Nedergaard, 2013), gracias a las proyecciones o pies de los astrocitos sobre los vasos sanguíneos (Ries y Sastre, 2016; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018; Zenaro y col. 2017).

2.3. Agregación del péptido Abeta: oligomerización/fibrilación

El péptido Abeta es una proteína desordenada de pequeño tamaño (4 kDa), constituida por 39-43 aminoácidos (Macleod y col. 2015; Hane y col. 2017a). La isoforma de 42 aminoácidos (Abeta42) presenta una mayor hidrofobicidad y, por tanto, mayor capacidad de agregación (Wolfe y Guenette, 2007; Hiltunen y col. 2009; De Strooper, 2010; Zhang y col. 2011), por lo que es el componente mayoritario de las placas amiloides. A día de hoy, los mecanismos por los cuales se agregan las distintas formas de Abeta y el proceso de formación de las placas extracelulares no están claramente definidos, aunque se han propuesto diversos modelos que describen cómo los monómeros de Abeta tienden a agregarse generando formas intermedias oligoméricas solubles, de entre 8 KDa (dímeros) y 100 KDa (Shankar y col. 2008; Sakono y Zako, 2010), que posteriormente originan las fibras y las placas amiloides o seniles (**Fig.A7**) (Takahashi y col. 2017; Hane y col. 2017a; Kumar y Tsao, 2018).

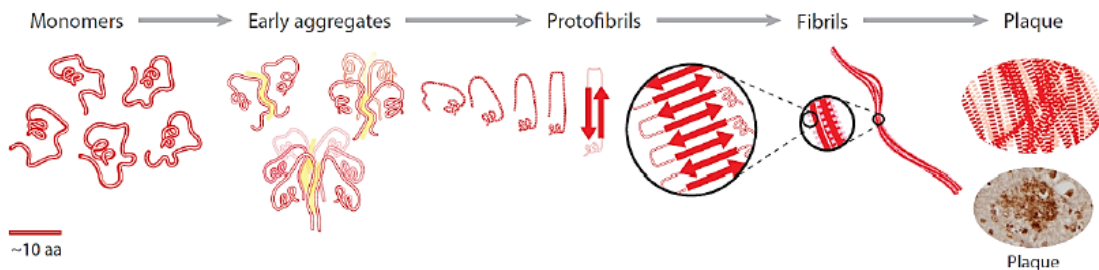


Figura A7. Resumen esquemático de la agregación del péptido Abeta. Autoensamblaje de Abeta: los monómeros de Abeta pueden agregarse formando dímeros y trimeros (agregados tempranos), protofibrillas y fibrillas (insolubles) que formarán, finalmente, las placas seniles. Imagen tomada de Graham et al. 2017.

A partir de Abeta monomérico, con estructura aleatoria, se producen de manera secuencial monómeros parcialmente plegados en forma de horquilla (Hilbich y col. 1991; Choi y Ganchi, 2018); seguido de la dimerización de dos monómeros (Hane y col. 2017a). Posteriormente, se forman oligómeros solubles, intermediarios metaestables indispensables para originar las fibras y, posteriormente, las placas (Mastrangelo y col. 2006). Numerosas investigaciones proponen la fibrilación como un ejemplo específico de reacciones de polimerización dependientes de nucleación (Roychaudhuri y col. 2009; Choi y Ganchi, 2018; Hane y col. 2017a). El término “oligómero” se define como una agrupación de proteínas solubles mal plegadas con tamaños de dímeros a protofibras (**Fig.A7**) (Choi y Ganchi, 2018).

Los oligómeros solubles intermediarios y las protofibras son las formas tóxicas del péptido Abeta (Mastrangelo y col. 2006; Choi y Ganchi, 2018).

Existen evidencias de que el péptido Abeta y algunos oligómeros pueden seguir otras vías de agregación y originar gran diversidad de estructuras y conformaciones moleculares con diferentes niveles de toxicidad (Hane y col. 2017a). También se contemplan las placas como entes dinámicos liberadores de las formas oligoméricas solubles tóxicas (Martins y col. 2008; Koffie y col. 2009). Las distintas estructuras con diferentes toxicidades podrían explicar la diversidad de las manifestaciones y síntomas de los pacientes de Alzheimer (Hane y col. 2017a).

2.3.1. Formas oligoméricas de Abeta

Como ya se ha mencionado anteriormente, se ha descrito la existencia de diferentes formas solubles de Abeta oligomérico, con capacidad de difundir por el parénquima cerebral y provocar un efecto tóxico a nivel sináptico y neuronal (Haass y Selkoe, 2007; Viola y Klein, 2015; Choi y Ganchi, 2018). Los oligómeros de Abeta son partículas esféricas de 4-20 nm de diámetro con estructura micelar y un núcleo hidrofóbico (Huang y col. 2000). Se clasifican, de forma general, en oligómeros de bajo peso molecular (LMW) (~2-8 monómeros) y de alto peso molecular (HMW) (~20-40 monómeros) (Huang y col. 2000; Hane y col. 2017a), que generan ensamblajes de mayor peso molecular que incluyen:

- Ligandos difusibles derivados de Abeta o “ADDLs” (*Abeta-derived diffusible ligands*), que son hexámeros, octámeros y dodecámeros (Lambert y col. 1998), cuyos niveles se correlacionan bien con los fallos cognitivos en la EA.
- Estructuras anulares, sólo distinguibles mediante microscopía electrónica de alta resolución (Lambert y col. 1998).
- Protofibrillas (“PFs”), formas intermedias que pueden polimerizarse para formar fibras o despolimerizarse a oligómeros más pequeños (Walsh y col. 1997).
- Otros: paranúcleos, Abeta*56 (Lesné y col. 2006), amiloesferoides (Noguchi y col. 2009), globulómeros, protofibras curvilíneas, oligómeros prefibrilares, oligómeros fibrilares y protofibras anulares (Chang y col. 2014; Roychaudhuri y col. 2009; Hane y col. 2017a).

Todos estos oligómeros solubles son estructuras no fibrilares, hidrosolubles y con propiedades neurotóxicas (Lambert y col. 1998). Es más, numerosos trabajos han demostrado que el tamaño de los agregados del Abeta es un determinante crítico de su toxicidad (Ladiwala y col. 2012), así, por ejemplo, los trímeros tienen una toxicidad tres veces mayor que los monómeros, mientras que los tetrámeros tienen una toxicidad 13 veces mayor (Hane y col. 2017a).

Entre los distintos mecanismos deletéreos, los oligómeros parecen inhibir el mantenimiento de la LTP en el hipocampo interfiriendo en la señalización de los receptores NMDA o AMPA (Haass y Selkoe, 2007; Viola y Klein, 2015; Hane y col. 2017a). Además, alteran la

membrana neuronal y glial, lo que origina la alteración de las vías de señalización, formación de canales iónicos, aumento de la permeabilidad, perturbación de la homeostasis del calcio, estrés oxidativo, provocar cascadas inflamatorias, disfunciones mitocondriales y modificación de la estructura del ADN (Haass y Selkoe, 2007; Viola y Klein, 2015; Hane y col. 2017a).

2.3.2. Tipos de depósitos extracelulares de Abeta

Las placas amiloides o seniles son agregados proteicos insolubles que se depositan extracelularmente, tanto en el parénquima cerebral como en la pared de los vasos sanguíneos cerebrales (Kumar y Tsao, 2018). Su componente principal son los péptidos de Abeta insolubles (Glenner y Wong, 1984; Masters y col. 1985), aunque también pueden contener proteoglicanos, moléculas inflamatorias, proteasas, iones metálicos, ApoE, proteínas antioxidantes, colinesterasas y restos de neuronas y células gliales (Atwood y col. 2002). Las placas seniles se clasifican en dos grandes grupos según su morfología, composición, y presencia o ausencia de distrofias neuríticas asociadas (**Fig.A8**) (Thal y col. 2006, 2008; Duyckaerts y col. 2009; D'Andrea y Nagele, 2010; Castellani y col. 2010; Perl 2010; Serrano-Pozo y col. 2011; Selkoe, 2001; Perl, 2010):

- **Placas neuríticas:** depósitos extracelulares de Abeta de aspecto filamentoso, llamadas así porque suelen aparecer íntimamente asociadas a neuritas distróficas (inmunopositivas para Tau, APP, Ubiquitina o ChAT), y a células microgliales reactivas, mientras que la astrogliá se localiza en la periferia (Dickson, 1997; Duyckaerts y col. 2009; Bouvier y col. 2016). Se subdividen en dos tipos, atendiendo a la morfología que presenten (Selkoe, 2001; Fiala, 2007; Perl, 2010):

- Placas clásicas: caracterizadas por un núcleo amiloide denso, redondo y compacto, formado por Abeta fibrilar y células microgliales, rodeado por un halo difuso que contiene distintas especies solubles de Abeta. Estas placas se asocian normalmente a los vasos sanguíneos.
- Placas Primitivas: de forma esférica, sin núcleo compacto central, y con inmunotinción homogénea, suelen aparecer en las zonas cercanas a los axones y a las sinapsis.

- **Placas difusas:** también llamadas “pre-amiloides”, son depósitos extracelulares no fibrilares (no congofílicos) de Abeta. Poseen una estructura amorfa o difusa, con límites poco definidos y sin núcleo compacto apreciable. Apenas poseen células microgliales, astrocitos o neuritas distróficas (Selkoe, 2001) y su composición principal es Abeta42 (Perl, 2010). Pueden existir en personas sanas sin síntoma de demencia.

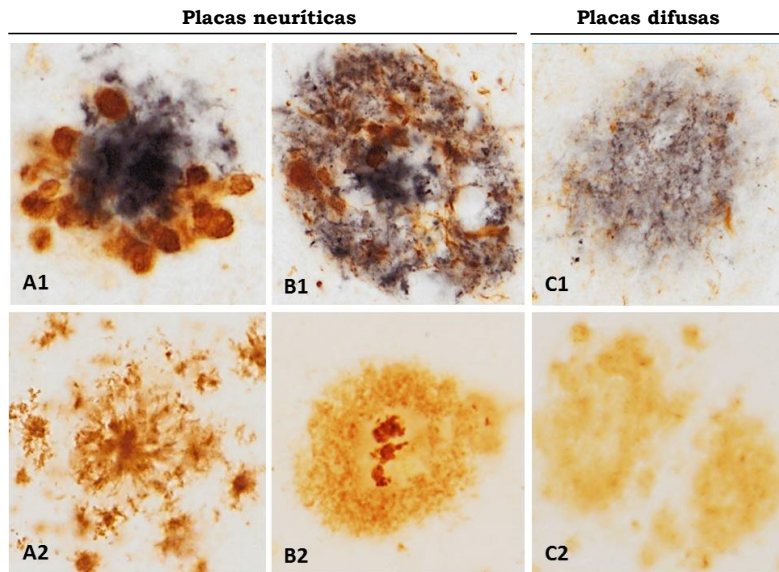


Figura A8. Diferentes tipos de placas. Las placas neuríticas pueden ser de tipo fibrilar (o placas primitivas) (A1 y A2), o clásicas (B1 y B2) con núcleo denso compuesto principalmente por Abeta42 (B2) y un halo difuso. Las placas difusas (C) no provocan distrofias neuríticas (C1) y presentan una morfología indefinida (C2). Inmunohistoquímica doble para Abeta (azul) y fosfo-tau (marrón) (A1-C1) e inmunotinción simple para Abeta42 (A2-C2). Imágenes cedidas por el grupo de la Dra. Antonia Gutiérrez.

En contra de lo defendido en la *hipótesis de la cascada amiloide* (Hardy y Allsop, 1991; Hardy y Higgins, 1992) y a pesar de que históricamente la enfermedad de Alzheimer se ha caracterizado por la acumulación de depósitos extracelulares de Abeta, sirviendo como diagnóstico *postmortem*, actualmente está establecido que estas placas no son el principal agente causal de las alteraciones sinápticas, la neurodegeneración y la respuesta inflamatoria que ocurren en la EA, ya que no existe correlación entre el número de placas de Abeta (“carga Abeta”) y la severidad de la patología (Mucke y col. 2000; Giannakopoulos y col. 2003; Ingelsson y col. 2004; Hane y col. 2017a). Sin embargo, la deposición de amiloide sí ha mostrado correlacionar con la probabilidad de una progresión del deterioro cognitivo leve (MCI) hacia la EA (Hane y col. 2017a). Por lo tanto, el deterioro cognitivo puede atribuirse a diferentes estructuras moleculares que conforman la placa y, por este motivo, es relevante tener en cuenta la existencia de las formas solubles y difusibles de Abeta en el parénquima cerebral (Martins y col. 2008; Hane y col. 2017a), que provocan una respuesta inflamatoria, pérdida sináptica y fallos cognitivos ya en las fases tempranas de la EA (Haass y Selkoe, 2007; Benilova y col. 2012; Viola y Klein, 2015; Hane y col. 2017a).

2.3.3. Abeta intracelular

El péptido Abeta, además de aparecer en forma de placas y de oligómeros solubles extracelulares puede acumularse en el interior neuronal, distribuyéndose en el citosol y en diferentes compartimentos subcelulares (mitocondria, lisosomas y retículo endoplasmático) (Sun y col. 2015), pudiendo causar disfuncionalidad en los mismos (Kuruva y Reddy, 2017). La presencia de Abeta intraneuronal puede ser debida a fallos en su liberación tras su síntesis (Takahashi y col. 2017), o a la reinternalización del Abeta extracelular a través de receptores específicos, como la subunidad $\alpha 7$ del receptor nicotínico ($\alpha 7$ nAChR; Wang y col.

2000), el receptor LDL de APOE (Zerbinatti y col. 2006) o los receptores NMDA (Bi y col. 2002).

La acumulación de Abeta intracelular parece ser un acontecimiento temprano en la EA (Bayer y Wirths, 2010), ya que ocurre en las células piramidales del hipocampo y la corteza entorrinal de pacientes con defectos cognitivos leves y sus niveles descienden con la formación de las placas (LaFerla y col. 2007). Abeta dentro de la neurona podría afectar a la función mitocondrial y al proteasoma, provocar una disfunción sináptica, potenciar la hiperfosforilación de Tau (LaFerla y col. 2007), y provocar déficits en la LTP (Billings y col. 2005) e incluso muerte neuronal (Li y col. 2009b; Bayer y Wirths, 2010).

3. PROTEÍNA TAU Y PATOLOGÍA NEUROFIBRILAR

3.1. Estructura y Función de Tau

Tau es una proteína soluble que pertenece a la familia de las proteínas asociadas a microtúbulos (“MAPs”, *Microtubule associated proteins*) que se expresa predominantemente en neuronas (Hane y col. 2017a; Chen YG, 2018). Está codificada por el gen *MAPT*, que contiene 16 exones y está localizado en el cromosoma 17 (Neve y col. 1986; Gao y col. 2018). Mediante splicing alternativo se pueden generar 6 isoformas con tamaños entre 352-441 aminoácidos (Wang y col. 2013; Morishima-Kawashima e Ihara, 2002; Duyckaerts y col. 2009; Iqbal y col. 2015; Holtzman y col. 2016; Hane y col. 2017a). Cada isoforma se caracteriza por la presencia o ausencia de fragmentos (**N**) de 29 ó 58 aminoácidos en el extremo N-terminal, y de una secuencia de 31-32 aminoácidos que se repite 3 ó 4 veces en el extremo C-terminal (**R**), que constituye el “dominio de unión a microtúbulos” (**Fig.A9**) (Gao y col. 2018). Así pues, las isoformas de Tau pueden ser: 0N3R, 0N4R, 1N3R, 1N4R, 2N3R o 2N4R, siendo esta última la isoforma de mayor longitud con 441 aminoácidos (**Fig.A9**) (Boutajangout y Wisniewski, 2014; Kimura y col. 2014). En el cerebro humano normal, hay cantidades similares de tau 3R y 4R, aunque esta relación normalmente cambia en las enfermedades neurodegenerativas (Gao y col. 2018).

La principal función de Tau es estabilizar y regular la estructura y dinámica de los microtúbulos (MTs) neuronales y favorecer su polimerización (Scholz y Mandelkow, 2014; Gao y col. 2018), participando en la estabilidad y formación del citoesqueleto (Hane y col. 2017a; Kumar y Tsao, 2018; Chen, 2018). Además, se han atribuido a Tau distintas funciones en procesos de señalización y de organización del citoesqueleto, siendo fundamental en el transporte axonal y en la regulación sináptica (Spires-Jones e Hyman, 2014; Gao y col. 2018). Recientemente se ha implicado a tau en nuevas funciones: mantenimiento de la integridad del ADN, regulación de la actividad neuronal, neurogénesis, exportación de hierro y LTD (Gao y col. 2018).

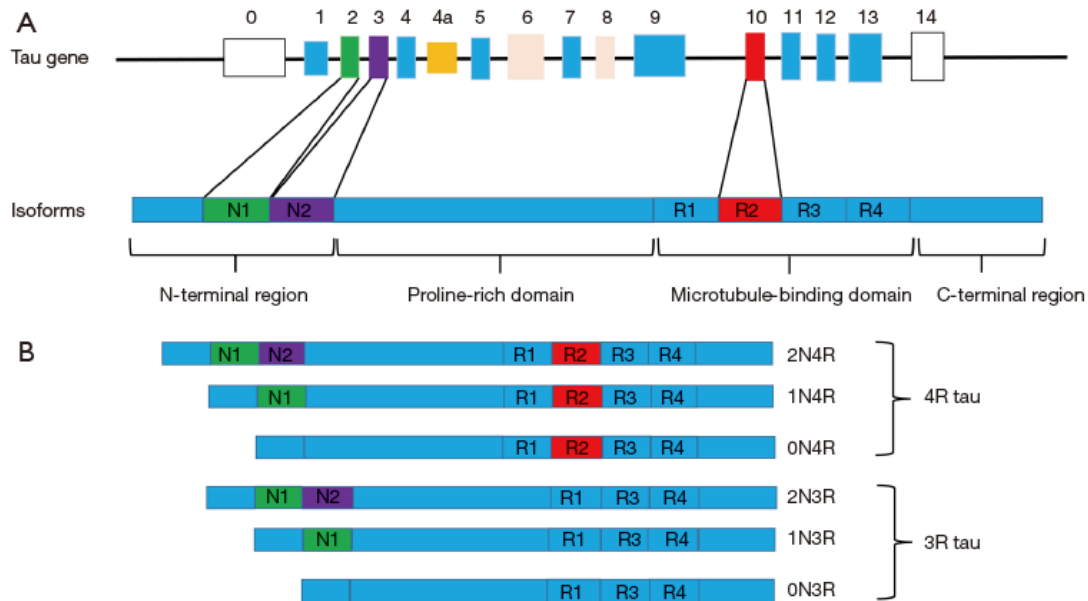


Figura A9. Esquema del gen MAPT y de las diferentes isoformas de Tau. (A) El gen MAPT tiene 16 exones (E). N1 y N2 están codificados por los exones E2 (verde) y E3 (morado), respectivamente. La repetición R2 está codificada por el exón E10 (rojo). Los exones E1, E4, E5, E7, E9, E11, E12 y E13 constituyen el componente básico de la proteína tau. E0 y E14 son no codificantes (blanco). E4a (amarillo) se transcribe sólo en tejido periférico. E6 y E8 no se expresan en el cerebro humano (rosa). La isoforma de tau está compuesta por 4 áreas; una región N-terminal, un dominio rico en prolina, un MBD y una región C-terminal. (B) Hay 6 isoformas principales de tau que se expresan en el cerebro humano, y que se generan mediante splicing alternativo de los exones E2, E3 y E10. Imagen tomada de Gao y col. 2018.

3.2. Fosforilación de Tau

Tau posee 80 residuos de serina o treonina y 5 de tirosina susceptibles de ser fosforilados, la mayoría localizados alrededor del dominio de unión a microtúbulos. En el cerebro sano, existe un equilibrio entre fosforilaciones y desfosforilaciones de tau, necesario para sus funciones fisiológicas (Gao y col. 2018). Sin embargo, su hiperfosforilación anómala produce modificaciones estructurales que dificultan su unión a microtúbulos y, con ello, el ensamblaje de los mismos, produciéndose agregados intracelulares que interrumpen el transporte axonal y provocan, en última instancia, disfunción neuronal (Scholz y Mandelkow, 2014; Gao y col. 2018).

El estado de fosforilación de cualquier proteína depende de la actividad de las enzimas quinasas y fosfatasa que actúan sobre ella (**Fig.A10**) (Chen, 2018; Gao y col. 2018). Existen más de 20 quinasas, entre las que destaca GSK-3beta (*glycogen synthase kinase 3*) y Cdk5 (*Cyclin dependent kinase 5*) (Kimura y col. 2014; Maccioni y col. 2001; Blennow y col. 2006; Ballatore y col. 2007; Kolarova y col. 2012; Gendreau y Hall, 2013), y varias fosfatasa, principalmente PP2A y PP1 (Liu y Götz, 2013; Gao y col. 2018), implicadas en el estado de fosforilación de Tau. Además, altos niveles de Abeta y/o el estrés oxidativo, puede provocar una desregulación en la actividad de las quinasas de Tau (Moore y col. 2015). Tau puede sufrir además otras modificaciones postraduccionales, como glicosilación, acetilación,

ubiquitinación, etc., que afectan a su estado de agregación (Iqbal y Grundke-Iqbal, 2008; Wang y col. 2013; Gao y col. 2018).

3.3. Ovillos neurofibrilares de Tau

Los ovillos neurofibrilares, marcas histopatológicas típica de la EA, son agregados intracelulares, formados por filamentos helicoidales, cuyo componente mayoritario es la proteína Tau hiperfosforilada (Spillantini y Goedert, 2013; Kumar y Tsao, 2018). Su densidad se correlaciona directamente con la severidad y progresión de la patología de Alzheimer (Iqbal y col. 2015; Hane y col. 2017a).

Cuando Tau se hiperfosforila (**Fig.A10**), se disocia de los microtúbulos y pasa de tener una localización principalmente axonal, a situarse en el soma y en las dendritas. Posteriormente, se autoagrega formando pares de filamentos helicoidales (PHF), que, a su vez, constituyen las unidades estructurales de los conocidos como ovillos neurofibrilares intracelulares (NFTs o *Tangles*) característicos de la EA (Spillantini y Goedert, 2013; Morishima-Kawashima e Ihara, 2002; Maccioni y col. 2001; Blennow y col. 2006; Ballatore y col. 2007; Gendron y Petrucelli, 2009; Gao y col. 2018; Hane y col. 2017a). Estos agregados de tau hiperfosforilado pueden acumularse en el soma neuronal y en los procesos neuríticos en forma de filamentos de neuropilo o NTs (*neuropil threads*) y como neuritas distróficas rodeando el núcleo amiloide de las placas neuríticas (Braak y col. 1986; Grundke-Iqbal y col. 1987).

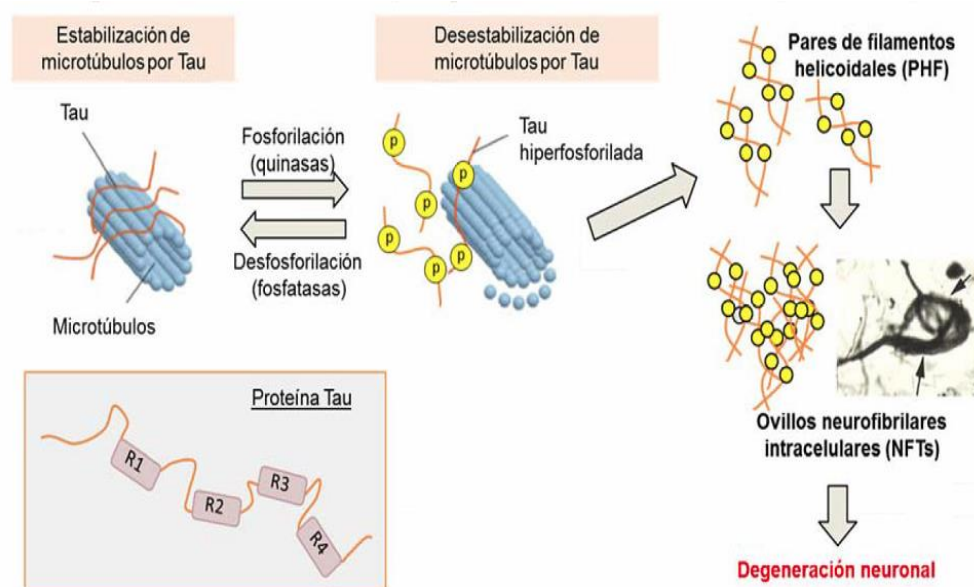


Figura A10. Formación de ovillos neurofibrilares. La proteína Tau, en condiciones normales, está unida a microtúbulos y los estabiliza. Al hiperfosforilarse, se separa de los microtúbulos y los desestabiliza. Esta Tau hiperfosforilada se agrega formando pares de filamentos helicoidales (PHF) que, finalmente, generan NFTs, implicados en la degeneración neuronal. En el recuadro de la izquierda se muestra la estructura de la proteína Tau con 4 repeticiones de motivo de unión a tubulina (4R-Tau). Modificado de Querfurth y LaFerla, 2010.

Existen distintas enfermedades que presentan agregados intracelulares anormales de Tau hiperfosforilada, como la EA, conocidas como “**taupatías**” (Lee y col. 2001; Leyns y Holtzman, 2017), que se pueden diferenciar según la composición y morfología de los filamentos y la distribución de éstos dentro del cerebro. Por ejemplo, la parálisis supranuclear progresiva (PSP), enfermedad frontotemporal (enfermedad de Pick; PiD) y parkinsonismo relacionado con el cromosoma 17 (FTDP-17), entre otros (Hane y col. 2017a; Gao y col. 2018; Leyns y Holtzman, 2017). Se han descrito en torno a 40 mutaciones de Tau ligadas a la demencia frontotemporal, mientras que ninguna se ha asociado al Alzheimer Familiar (FAD).

Los enfermos de Alzheimer presentan un patrón típico de distribución de las lesiones neurofibrilares a lo largo de la enfermedad, pudiéndose distinguir seis estadios o etapas: **estadios de Braak (Fig.A4)** (Braak y Braak, 1991; Braak y col. 2006; Kumar y Tsao, 2018; Gao y col. 2018). De manera resumida, la patología tau comienza en el locus coeruleus y la corteza entorrinal (Braak I-II) y avanza hacia el hipocampo y la corteza asociativa (Braak III-IV), afectando en estadios avanzados a las áreas sensoriales primarias (Braak V-VI) (Spires-Jones y Hyman, 2014; Hane y col. 2017a), siguiendo un patrón diferente al Abeta. Los síntomas de la EA generalmente aparecen cuando los agregados de tau y los depósitos de Abeta se encuentran en la neocorteza (Hane y col. 2017a).

4. PATOLOGÍA NEURÍTICA, PÉRDIDA NEURONAL Y SINÁPTICA

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por una extensa pérdida de sinapsis y neuronas (Forner y col. 2017; Hane y col. 2017a), que afectan a regiones cerebrales relacionadas con funciones de aprendizaje y memoria, y dando lugar, así, al declive cognitivo que caracteriza la progresión de esta enfermedad (Duyckaerts y col. 2009).

4.1. Disminución de la densidad sináptica

Estudios histológicos y bioquímicos han demostrado una pérdida de un 25-35% de sinapsis en la corteza entorrinal e hipocampo de pacientes en fase intermedia o moderada de la enfermedad (Gómez-Isla y col. 1996; Price y col. 2001; Overk y Masliah, 2014), siendo dicho hallazgo el que mejor correlaciona con los déficits cognitivos asociados a la patología (Scheff y Price, 2003; Scheff y col. 2007; Arendt, 2009; Bayer y Wirths, 2010; Palop y Mucke, 2010; Forner y col. 2017; Chen, 2018). Es decir, existen alteraciones a nivel sináptico, que preceden a la muerte neuronal y que correlacionan con las deficiencias cognitivas de los pacientes (Tampellini y Gouras, 2010; Kumar y Tsao, 2018).

Actualmente, numerosos estudios tratan de esclarecer las relaciones moleculares entre Abeta, tau y las alteraciones sinápticas (Forner y col. 2017). Aunque Abeta participa de manera fisiológica en el desarrollo de las sinapsis, niveles elevados de este péptido disminuyen la excitabilidad neuronal, provocando la internalización de receptores AMPA, lo

que facilita la LTD e inhibe la LTP. Esto genera depresión sináptica y una pérdida de sinapsis electrofisiológicamente activas (Shankar y col. 2007; Small, 2008; Viola y Klein, 2015; Chen, 2018), lo que parece ser responsable de las alteraciones cognitivas en la EA (Jeong, 2017; Forner y col. 2017). Por su parte, tau, además de regular procesos importantes en la función sináptica, se encarga de estabilizar los microtúbulos y regular el transporte axonal. Se han descrito numerosos mecanismos a través de los cuales tau regula la función sináptica y cómo los cambios patológicos de tau produce la alteración de los mismos (Forner y col. 2017): sobreactivación o internalización de los receptores NMDA en la terminal postsináptica (Spires-Jones y Hyman, 2014), afectando a la LTP; alteración del tráfico de mitocondrias y receptores hacia las sinapsis; alteración de la señalización de calcio; entre otros. Parece que las formas solubles de Abeta y/o tau, pero no las fibrilares y/o agregadas (insolubles), son las causantes de los fallos sinápticos mediado por estas proteínas (Crimins y col. 2013; McDonald y col. 2012; Perez-Nievas y col. 2013; Spires-Jones e Hyman, 2014; Hane y col. 2017a; Gao y col. 2018; Forner y col. 2017).

4.2. Pérdida neuronal

En la EA se produce una selectiva degeneración neuronal que afecta a regiones y tipos celulares concretos de manera progresiva (Duyckaerts y col. 2009; Jeong, 2017), fundamentalmente a la región CA1 del hipocampo (Price y col. 2001; Hof y col. 2003) y a la capa II de la corteza entorrinal (CE) (Gómez-Isla y col. 1996; Price y col. 2001), pero también al bulbo y al núcleo olfatorio anterior (ter Laak y col. 1994), a la amígdala (Vereecken y col. 1994), al núcleo basal de Meynert (grupo colinérgico que inerva el hipocampo, la amígdala y la neocorteza) (Vogels y col. 1990; Jeong, 2017), a la parte medial de la sustancia negra, a la parte rostral del locus coeruleus (grupo noradrenérgico que conecta con la corteza entorrinal y el hipocampo) (Busch y col. 1997) y al núcleo del rafe serotoninérgico (Aletrino y col. 1992; Mufson y col. 2003; Heneka y O'Banion, 2007; Duyckaerts y col. 2009; Castellani y col. 2010). En los mecanismos de muerte neuronal están implicados tanto Abeta como Tau (Duyckaerts y col. 2009; Spires-Jones y Hyman, 2014), así como las especies reactivas de oxígeno, las alteraciones mitocondriales, la sobreactivación de receptores de glutamato y el incremento en la concentración citoplasmática de iones calcio (Jeong, 2017).

4.3. Patología neurítica

Las neuritas distróficas asociadas a las placas seniles aparecen de manera temprana en la EA y preceden a la pérdida sináptica y a la muerte neuronal, por lo que contribuye de manera significativa a la patología en los estadios preclínicos (Masliah y col. 1991; Dickson y col. 1999; Bell y Hardingham, 2011; Torres y col. 2012; Sanchez-Varo y col. 2012). Son prolongaciones neuronales engrosadas producidas por alteraciones del citoesqueleto y que contienen numerosas vesículas donde se acumula APP, BACE1 y γ -secretasa, especies solubles y tóxicas de Tau hiperfosforilado, etc (Nixon y Yang, 2011; Sanchez-Varo y col.

2012; Torres y col. 2012). En la EA, las distrofias son abundantes en los sistemas fibrosos del hipocampo, la región CA1 y la corteza entorrinal (Sanchez-Varo y col. 2012).

5. ACTIVACIÓN GLIAL Y RESPUESTA NEUROINFLAMATORIA

La inflamación es un proceso normal en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, e implica una participación activa del sistema inmune innato del SNC, coordinado principalmente por la microglía y la astrogliá (Hane y col. 2017a; Labzin y col. 2017; Latta y col. 2014; Heneka y col. 2014, 2015a, 2015b; Heppner y col. 2015; Liu y col. 2014), pero también por células endoteliales, dendríticas y células del sistema inmune adaptativo. Estas células gliales, en respuesta al antígeno, liberan una serie de mediadores moleculares inflamatorios (González y col. 2014; Dá Mesquita y col. 2016; Liu y col. 2014), con diversas propiedades proinflamatorias, fagocíticas, citotóxicas y reguladoras de linfocitos T (Ubogu y col. 2006), con el objetivo de revertir el daño y recuperar las condiciones normales y fisiológicas en el parénquima nervioso.

Sin embargo, la presencia continuada del agente desencadenante de esta respuesta inmunológica, como por ejemplo los depósitos de Abeta (Butovsky y col. 2005; Sastre y col. 2006), puede provocar un proceso neuroinflamatorio sobreactivado crónico, que crea un ambiente en el que el estrés oxidativo, la muerte celular, la infiltración de leucocitos a través de la barrera hematoencefálica y la degeneración tisular se van agravando progresivamente (Mrak y Griffin, 2005; Sochocka y col. 2016; Schwartz y Deczkowska, 2016). En consecuencia, acaba contribuyendo a la disfunción y/o muerte neuronal, desempeñando así un papel importante en varios tipos de procesos o patologías neurodegenerativos, como la EA (Heneka y O'Banion, 2007; Perry y col. 2010; Heneka y col. 2015b; Heppner y col. 2015; Mena y García de Yebenes, 2008; Ubogu y col. 2006), lo que indica que la neuroinflamación es otro componente patológico temprano y continuo en la patología del Alzheimer (Nuzzo y col. 2014; Hane y col. 2017a; Chen, 2018; Zhang y Jiang, 2015; Gutierrez y Vitorica, 2018).

Estudios genéticos realizados en miles de pacientes (GWAS), avalan un papel importante de la neuroinflamación en la patogénesis del Alzheimer, ya que se han identificado numerosos polimorfismos en genes involucrados en la respuesta inmune cerebral asociados a la forma esporádica de la enfermedad, como TREM2, TYROBP, CD33, CR1, CLU, ABCA7, HLA-DRB5/HLA-DRB1, MS4A y EPHA1 (Dansokho y Heneka, 2018; Karch y col. 2014; Korvatska y col. 2015; Colonna y Wang, 2016; Villegas-Llerena y col. 2016; Huang y col. 2017; Sims y col. 2017; Lambert y col. 2013), muchos de ellos altamente expresados en la microglía y/o los astrocitos. Sin embargo, el papel que desempeña la activación microglial y astrogliá en el desarrollo de la patología todavía no ha sido caracterizado de manera completa.

Existen numerosos estudios que tratan de esclarecer la contribución de la neuroinflamación en la patogénesis de la EA (ver revisión Heneka y col. 2015a). Tanto microglía como astrocitos adquieren un fenotipo activo en presencia de Abeta y/o tau hiperfosforilado, lo

que desencadena una respuesta inflamatoria en el cerebro de pacientes de Alzheimer y de modelos murinos de la enfermedad. Definir los perfiles funcionales (neuroprotector, neurotóxico y/o degenerativo) de estos tipos celulares con el progreso de la enfermedad podría ayudar a desarrollar estrategias terapéuticas más eficientes y seguras (Dansokho y Heneka, 2018).

5.1. Componentes celulares del sistema inmune del SNC

5.1.1. MICROGLÍA

Son las células mieloides residentes (fagocitos mononucleares), componentes principales de la respuesta inmune cerebral (Ubogu y col. 2006; Chen YG, 2018; Gutierrez y Vitorica, 2018; Hansen y col. 2017). Se originan en el saco vitelino a partir de células progenitoras eritropoyéticas y migran al cerebro, donde se propagan, extienden y ramifican a través del parénquima cerebral (Ginhoux y col. 2013; Hansen y col. 2017; Nimmerjahn y col. 2005; Fuhrmann y col. 2010). Constituyen un 5-10% del total de las células del SNC adulto (Zhang y Jiang, 2015) y presentan una distribución regional con mayor densidad en la sustancia blanca que en la gris (Mittelbronn y col. 2001).

5.1.1.1. *Funciones fisiológicas de la microglía*

En condiciones fisiológicas, la microglía está implicada en numerosas funciones, tales como la neurogénesis adulta, la supervivencia, proliferación y/o diferenciación neuronal, la correcta organización de las complejas redes neuronales (Colonna y Butovsky, 2017), la inducción de la muerte celular programada y la fagocitosis de células muertas (Schafer y Stevens, 2015). Además, se consideran los “macrófagos del cerebro” (Ginhoux y col. 2010; Hansen y col. 2017) y, por tanto, se encargan de la destrucción de patógenos invasores y de promover la reparación y la homeostasis tisular (Colonna y Butovsky, 2017; Zhang y Jiang, 2015). También participan, junto con los astrocitos, en la remodelación de las sinapsis (Hong y col. 2016; Hansen y col. 2017; Colonna y Butovsky, 2017) y, con ello, en la plasticidad sináptica (Wu y col. 2015; Hansen y col. 2017; Colonna y Butovsky, 2017).

En condiciones normales, la microglía se encuentra inspeccionando continuamente el entorno (Nimmerjahn y col. 2005; Fuhrmann y col. 2010), a través de sus prolongaciones altamente dinámicas y contactando con neuronas, astrocitos y vasos sanguíneos (Colonna y Butovsky, 2017). Cuando detecta una alteración, daño o estímulo inflamatorio, la célula microglial adquiere un estado activado con morfología más ameboide, con el fin de neutralizar al agente causante del daño (Saresella y col. 2016; Colonna y Butovsky, 2017). Como consecuencia, se activan numerosas vías de señalización que producen la liberación de mediadores inflamatorios y activan al resto de células implicadas en la respuesta inmune (Gomez-Nicola y Perry, 2015). Clásicamente, se ha clasificado a la microglía activa en dos fenotipos funcionales extremos, atendiendo a sus funciones, a la señal de activación que reciban y a las citoquinas liberadas (Varnum e Ikezu, 2012; Cherry y col. 2014; Latta y col.

2014; Tang y Le, 2015; Colonna y Butovsky, 2017): fenotipo clásico (M1), que generan una respuesta proinflamatoria y citotóxica, y fenotipo alternativo (M2), responsable de una respuesta pro-supervivencia, regeneradora y antiinflamatoria (Mosher y Wyss-Coray, 2014; Li y col. 2014; Cai y col. 2015; Leyns y Holtzman, 2017; Chen, 2018). Esta clasificación de la microglía ha sido de gran ayuda para conceptualizar sus actividades *in vitro*, pero está siendo actualmente revisada (Ransohoff, 2016; Masgrau y col. 2017), ya que las células microgliales raramente muestran una polarización hacia uno de los fenotipos, sino que normalmente coexisten varios tipos en una patología (Colonna y Butovsky, 2017; Leyns y Holtzman, 2017).

El efecto del envejecimiento sobre la microglía origina una respuesta hiperreactiva (Gomez-Nicola y Perry, 2015), caracterizada por cambios morfológicos y moleculares y una disfunción progresiva de sus funciones (Baron y col. 2014; Mosher y Wyss-Coray, 2014; Streit y col. 2014; Colonna y Butovsky, 2017; Salter y Stevens, 2017).

5.1.1.2. Papel de la microglía en la patología de la EA

La implicación de la microglía en el desarrollo de la patología de Alzheimer parece ser dual y bastante compleja (Zhang y Jiang, 2015), pudiendo desempeñar una función perjudicial o protectora pero insuficiente (Gutierrez y Vitorica, 2018; Navarro y col. 2018). Estudios recientes de GWAS han identificado numerosos polimorfismos en proteínas asociadas con la función microglial considerados factores de riesgo de la EA (Dansokho y Heneka, 2018; Gutierrez y Vitorica, 2018; Navarro y col. 2018). Destacan, en este sentido, varias mutaciones con pérdida de función en TREM2 (Guerreiro y col. 2013; Hickman y El Khoury, 2014; Lue y col. 2014; Jonsson y col. 2013) y mutaciones en el receptor de superficie CD33 (Griciuc y col. 2013; Bradshaw y col. 2013; Heppner y col. 2015), ambos implicados en la activación y/o internalización microglial del péptido Abeta (Guerreiro y col. 2013; Lue y col. 2014; Bradshaw y col. 2013; Cruchaga y col. 2013; Griciuc y col. 2013; Hickman y El Khoury, 2014; Yeh y col. 2017).

Los depósitos amiloides están rodeados por las prolongaciones microgliales (Malm y col. 2005; Meyer-Luehmann y col. 2008), lo que podría constituir una barrera física protectora frente a la toxicidad de la placa, promoviendo su compactación y aislamiento, y evitando su expansión y toxicidad (Yuan y col. 2016; Hansen y col. 2017). Es más, la fagocitosis activa de Abeta oligomérico por la microglía (Frautschy y col. 1992; Mandrekar y col. 2009) junto con la actividad proteolítica de las enzimas que secreta (Yang y col. 2011), reducen en conjunto la polimerización del Abeta y, a su vez, impiden el crecimiento de la placa (Simard y col. 2006; Bolmont y col. 2008; Serrano-Pozo y col. 2013a). Pero, además, este proceso forma parte de la reacción inflamatoria que ocurre en la EA, caracterizada por la activación microglial que se inicia alrededor de las placas y que se expande con el avance de la patología por todo el parénquima cerebral (Jimenez y col. 2008, 2011). Por tanto, aunque la activación microglial podría ayudar a restringir la patología Abeta a edades tempranas, en

los estadios avanzados de la enfermedad, la microglía podría perder eficacia o incluso volverse perjudicial, contribuyendo así a la progresión de la patología (Gutierrez y Vitorica, 2018).

Aunque la microglía activa se ha clasificado tradicionalmente en los fenotipos M1 y M2, funcionalmente opuestos (Colonna y Butovsky, 2017; Leyns y Holtzman, 2017; Chen, 2018), en los últimos años, se han identificado mediante estudios a nivel transcripcional el perfil genético microglial concreto en distintos modelos de enfermedades neurodegenerativas (Srinivasan y col. 2016; Mathys y col. 2017; Krasemann y col. 2017; Friedman y col. 2018; Chiu y col. 2013; Brown y George-Hyslop, 2017). Así, se ha caracterizado el fenotipo de la microglía asociada a placas en diferentes modelos amiloidogénicos de la EA (Keren-Shaul y col. 2017; Krasemann y col. 2017; Mrdjen y col. 2018; Ofengeim y col. 2017), en modelos de taupatías (Friedman y col. 2018; Leyns y Holtzman, 2017), y en otras enfermedades neurodegenerativas, como la esclerosis lateral amiotrófica (Spiller y col. 2018) y la esclerosis múltiple (Krasemann y col. 2017), así como en el envejecimiento (Mrdjen y col. 2018; Olah y col. 2018). Estos estudios concluyen que la activación microglial, ante diversos daños y/o patologías conlleva la disminución de la expresión de genes “homeostáticos” (CX3CR1, P2RY12, P2RY13, TMEM119, y CD33; Butovsky y col. 2014) y la activación del programa genético **DAM** (“*disease-associated microglia*”) (Keren-Shaul y col. 2017) asociado a la inducción de diversos genes como CSF1, CLEC7A e IGF-1, genes asociados con el riesgo de desarrollar Alzheimer, como TREM2, APOE, TYROPB (Lambert y col. 2013), y relacionados con rutas implicadas en fagocitosis/degradación lisosomal, respuesta inmune y endocitosis (**Fig.A11**) (Brown y George-Hyslop, 2017). Sin embargo, los mecanismos que regulan el cambio de fenotipo microglial de homeostático a DAM todavía no se conocen con detalle. Si se sabe que es un proceso secuencial de dos pasos, que está mediado por la señalización TREM2-APOE (Krasemann y col. 2017; Keren-Shaul y col. 2017; Hickman y El Khoury, 2014; Ulland y col. 2017).

No obstante, se necesitan más estudios para entender la expresión de este perfil genético “DAM” y determinar sus efectos en la progresión de las diferentes patologías. La existencia de múltiples estados de activación microglial en las enfermedades neurodegenerativas, podría explicar los diversos papeles de la microglía en el desarrollo y progresión de la patología del Alzheimer (Hansen y col. 2017). De hecho, puede que no haya microglía “buena” o “mala”, sino simplemente funciones microgliales disfuncionales (Brown y George-Hyslop, 2017). En este sentido, se ha descrito en el envejecimiento la presencia de células de *microglía senescente* caracterizadas por una morfología distrófica y la incapacidad de realizar correctamente sus funciones (Streit y Xue, 2009). Apoyan esta idea distintos artículos que postulan que la función y supervivencia microglial parecen estar comprometidas en la EA (Konno y col. 2014; Tada y col. 2016). Además, en nuestro laboratorio hemos identificado un proceso de degeneración microglial en el hipocampo de pacientes de Alzheimer, mediado por la acumulación de formas tóxicas de tau fosforilado

(Sanchez-Mejias y col. 2016). Esta respuesta microglial es distinta del fenotipo hiperreactivo citotóxico mediado por Abeta y por otras formas de Tau, y podría estar asociada con el desarrollo de la EA (Navarro y col. 2018; Gutierrez y Vitorica, 2018; Sanchez-Mejias y col. 2016; Hansen y col. 2017; Romero-Molina y col, 2018).

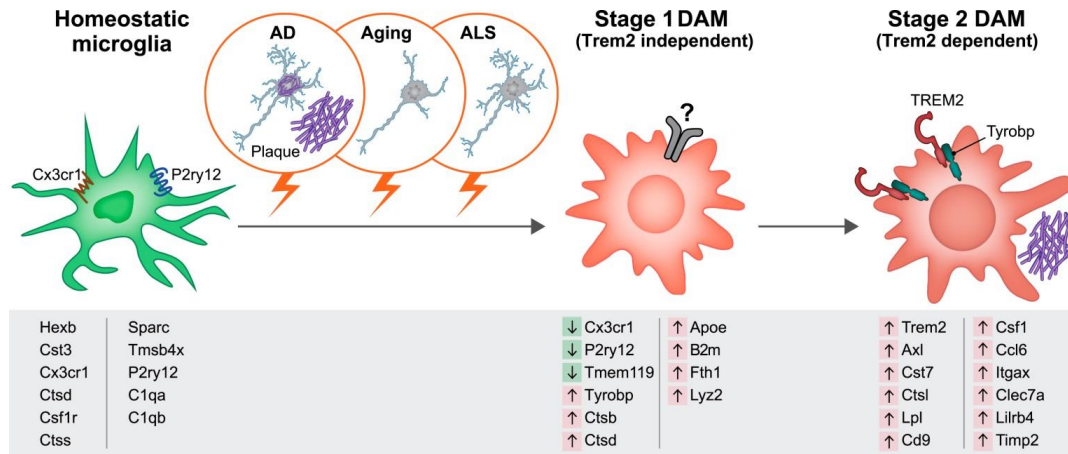


Figura A.11. Esquema de los mecanismos secuenciales de activación de la microglía DAM. La microglía homeostática cambia al estado DAM mediante dos mecanismos secuenciales, observado en la EA, ELA así como en el envejecimiento. El primero de ellos es independiente de TREM2 e involucra la activación de genes como TYROBP y APOE, así como la desactivación de genes homeostáticos («Stage 1 DAM»). El segundo mecanismo de activación es dependiente de TREM2 e implica la activación de genes necesarios para la fagocitosis y metabolismo lipídico, es decir, intervienen en la defensa contra Abeta («Stage 2 DAM»). Los genes clave involucrados en cada estado se muestran debajo de cada condición. Las flechas indican el aumento (rojo) o la disminución (verde) de la expresión de los genes de cada estado específico. Tomada de Keren-Shaul y col. 2017.

En definitiva, queda por dilucidar si la microglía juega un papel beneficioso, perjudicial o insuficiente a lo largo de la patología de Alzheimer, teniendo en cuenta que su papel muy probablemente sea dependiente del contexto patológico en que se encuentre (Colonna y Butovsky, 2017).

5.1.2. ASTROCITOS

Los astrocitos son las células gliales más abundantes del SNC (~35%) y participan, junto con la microglía, en la respuesta neuroinflamatoria. Al igual que las neuronas y los oligodendrocitos, los astrocitos derivan del neuroectodermo (Zhang y Jiang, 2015). Aunque morfológicamente son muy heterogéneos, se caracterizan por presentar una estructura estrellada con múltiples prolongaciones que conectan con vasos sanguíneos, neuronas, oligodendrocitos, microglía y otros astrocitos. La proteína GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*), componente principal de la red de filamentos intermedios del citoesqueleto, es el marcador más usado para identificar astrocitos de manera específica. Otras proteínas abundantemente expresadas en los astrocitos son vimentina (Vim), aldehído deshidrogenasa (ALDH) y glutamina sintetasa (GS) (Sofroniew y Vinters, 2010; Verkhratsky y col. 2014; Phillips y col. 2014; Heppner y col. 2015).

Tradicionalmente, la astrogliá se ha clasificado en dos tipos principales (Zhang y Jiang, 2015; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018; Cai y col. 2017; Verkhratsky y Butt, 2007; Barres, 2008) (**Fig.A12**). Por un lado, los **astrocitos protoplasmáticos** son característicos de la sustancia gris y con poca reactividad para GFAP en condiciones normales. Presentan ramificaciones finas y abundantes, que contactan con neuronas y vasos sanguíneos, formando los denominados “pies perivascularés”. Por otro lado, los **astrocitos fibrosos**, típicos de la sustancia blanca, son inmunoreactivos para GFAP, poseen menos ramificaciones, pero con prolongaciones más largas, y conectan con los oligodendrocitos y los nódulos de Ranvier (Zhang y Jiang, 2015; Cai y col. 2017; Verkhratsky y Butt, 2007), encontrándose a lo largo de los axones mielinizados. Sin embargo, la heterogeneidad morfológica, funcional y molecular de los astrocitos es mucho más compleja que esta simple clasificación (Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018; John Lin y col. 2017; Sosunov y col. 2014; Chai y col. 2017). De hecho, se han descrito hasta 5 tipos de astrocitos diferentes en función de su morfología, localización y perfil proteico (Chai y col. 2017; Haim y Rowitch 2017; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018).

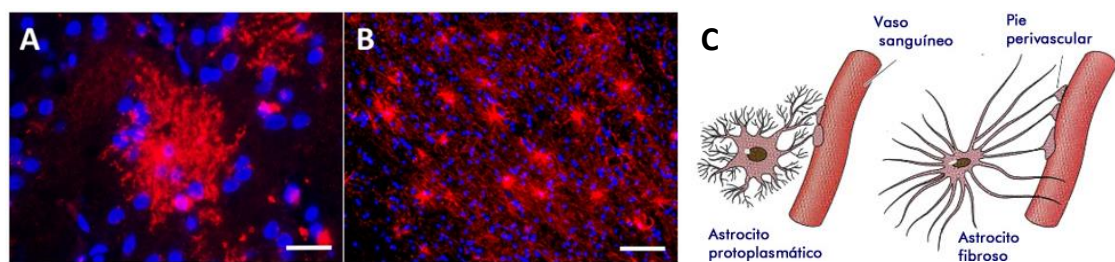


Figura A.12. Perfiles morfológicos de los astrocitos en condiciones normales. (A) Astrocitos protoplasmático en la capa II de la neocórtex occipital con su típica apariencia frondosa/globosa, mostrada mediante inmunohistoquímica con marcaje para el transportador de glutamato GLT-1/EAAT2. (B) Astrocitos fibrosos en la materia blanca del lóbulo temporal, que son ricos en la proteína GFAP (inmunohistoquímica). Imagen modificada de Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018. (C) Representación esquemática de la morfología de ambos tipos astrocíticos: protoplasmáticos (globosos, con muchas ramificaciones en sus procesos) y fibrosos (con procesos más alargados).

5.1.2.1. Funciones fisiológicas de los astrocitos

Los astrocitos desarrollan múltiples y variadas funciones fundamentales para el correcto mantenimiento y la homeostasis general del SNC (Sofroniew y Vinters, 2010; Clarke y Barres, 2013; Liddeloy y Barres, 2017; Zhang y Jiang, 2015; Ubogu y col. 2006; Liu y col. 2014; Acosta y col. 2017; Garwood y col. 2017; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018; Verkhratsky y col. 2010), a través de múltiples mecanismos (Colonna y Butovsky, 2017). Los astrocitos suministran a las neuronas antioxidantes (Pertusa y col. 2007), factores tróficos (VEGF, GDNF, bFGF) (Minter y col. 2016), y otros muchos elementos fundamentales para su soporte metabólico. Además, eliminan residuos y toxinas del líquido cefalorraquídeo, liberan factores quimiotáxicos, mantienen el equilibrio hidro-salino del parénquima cerebral y participan en la reparación y el proceso de cicatrización del SNC tras daños traumáticos (Liu y col. 2014).

Los pies astrocitarios, junto con células del endotelio capilar y pericitos vasculares, rodean el 90% de la membrana basal de los vasos sanguíneos cerebrales, participando en la formación y mantenimiento de la barrera hematoencefálica (Sofroniew y Vinters, 2010; Medeiros y LaFerla, 2013; Verkhratsky y col. 2014; Heppner y col. 2015; Haim y Rowitch, 2017; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018; Barres, 2008). De esta manera, los astrocitos proporcionan soporte bioquímico a las células endoteliales (Liu y col. 2014), regulan el paso selectivo de sustancias al SNC (Ota y col. 2013) y contribuyen activamente a la captación de glucosa sanguínea, para dar soporte energético a las neuronas, a través del lactato (Verkhratsky y col. 2010). Igualmente, los astrocitos controlan el flujo de agua entre el cerebro y la circulación sanguínea a través de canales acuosos, conocidos como acuaporinas, especialmente AQP1 y AQP4 (Verkhratsky y col. 2010; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). Recientemente se han relacionado también con el “*drenaje glinfático*” (Nedergaard, 2013), a través del cual se produce el aclaramiento paravascular de solutos tóxicos (Ries y Sastre, 2016; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018; Zenaro y col. 2017).

Por otro lado, participan también en la regulación de funciones neuronales y sinápticas (Araque y col. 2014). La comunicación entre astrocitos y neuronas (Barres, 2008) tiene una gran importancia funcional en las sinapsis tripartitas (Covelo y Araque, 2018; Verkhratsky y col. 2010); de hecho, un solo astrocito puede contactar con cientos de sinapsis (Yamazaki y Kanekiyo, 2017), y esta íntima relación les permite coordinar múltiples redes neuronales (Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018; Clarke y Barres, 2013; Barres, 2008). Se sabe que las neuronas y su actividad también regulan el transcriptoma de los astrocitos (Hasel y col. 2017). Por tanto, y de manera general, la función cerebral es dependiente de la actividad coordinada de las redes astrocitos-neuronas (Covelo y Araque, 2018). Los astrocitos también ejercen papeles importantes en el mantenimiento y desarrollo de las sinapsis, controlando la formación, maduración, función y eliminación de las mismas (Clarke y Barres, 2013; Barres, 2008), ya que participan, junto con la microglía, en el “*pruning*” de sinapsis y axones innecesarios, (Clarke y Barres, 2013; Barres, 2008), sustentando el refinamiento de los circuitos neuronales. Por todo ello, participan en procesos de sinaptogénesis y plasticidad sináptica (Vasile y col. 2017), estando pues implicados en mecanismos de aprendizaje y memoria (Chung y col. 2013; Verkhratsky y col. 2010).

Cualquier insulto agudo o crónico en el SNC origina una activación y un cambio importante en la morfología de los astrocitos (Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018; Verkhratsky y col. 2010), conocida como “*astrogliosis*”, que se caracteriza por distintos cambios moleculares, celulares y funcionales (Sofroniew y Vinters, 2010). Entre ellos, destaca el aumento de las proteínas GFAP y Vim, implicadas en el acortamiento y engrosamiento de las prolongaciones y el aumento del tamaño del soma (Chen, 2018; Verkhratsky y col. 2010; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018) que sufre el astrocito al activarse. Esta activación astrocítica puede ejercer un efecto tanto beneficioso como perjudicial para las células de su entorno (Sofroniew y Vinters, 2010; Liu y col. 2014; Garwood y col. 2017; Leyns y Holtzman, 2017;

Zamanian y col. 2012; Liddelov y col. 2017). Actualmente, existen numerosos estudios que intentan averiguar el papel de la astrogliosis en el desarrollo de las distintas enfermedades neurodegenerativas (Zamanian y col. 2012; Liddelov y col. 2017; Zhang y Jiang, 2015; John Lin y col. 2017). Además, la deficiencia o alteración de cualquiera de las funciones de los astrocitos podría desencadenar o empeorar la disfunción neuronal en distintos procesos neurodegenerativos (Zhang y Jiang, 2015).

5.1.2.2. Papel de los astrocitos en la patología de la EA

En los cerebros de pacientes de Alzheimer, los astrocitos, al igual que la microglía, experimentan cambios morfológicos y funcionales. Tanto en cerebros *postmortem* de enfermos de Alzheimer como en los de ratones transgénicos modelos de la enfermedad, se produce una reactividad astrocitaria generalizada (Verkhatsky y col. 2010; Fu y Jhamandas, 2014; Verkhatsky y col. 2010), caracterizada por el aumento en la expresión de las proteínas GFAP, Vim o ALDH1L1. Dicha activación astrogliosa o “astrogliosis” se produce en los primeros estadios de la enfermedad y progresa significativamente a medida que lo hace la patología amiloidea y de tau (Verkhatsky y col. 2010; Carter y col. 2012; Rodríguez-Arellano y col. 2016; Garwood y col. 2016; Heneka y col. 2014, 2015a, 2015b). Los astrocitos reactivos participan en los eventos inflamatorios e inmunológicos asociados a la EA, secretando diversas citoquinas inflamatorias, como TNF α , IL1 β , IL6, IL8, IL10, TGF β , IFN γ e IFN β (Morales y col. 2014; Zhang y Jiang, 2015).

La localización de astrocitos reactivos alrededor de las placas amiloides sugiere que los depósitos y los oligómeros de Abeta desencadenan una marcada activación astrogliosa (Zhang y col. 2010; Carrero y col. 2012; Medeiros y LaFerla, 2013; Morales y col. 2014; Zhang y Jiang, 2015). Además, los factores proinflamatorios liberados por la microglía y los astrocitos, así como el estrés crónico, podrían inducir la producción de Abeta por los astrocitos, lo que supondría una fuente importante de Abeta durante la neuroinflamación en la EA (Zhang y Jiang, 2015; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018; Acosta y col. 2017; Verkhatsky y col. 2010). En sentido opuesto, los astrocitos reactivos podrían tener un papel protector ya que forman una barrera física alrededor de las placas que limita su crecimiento y protege a las neuronas cercanas de las especies oligoméricas de Abeta (Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). También parecen intervenir en procesos de captación, aclaramiento y degradación de Abeta (Verkhatsky y col. 2010; Zhang y Jiang, 2015), además de que los astrocitos reactivos pueden expresar enzimas degradadoras de Abeta, como ECE2, IDE, NEP y las metaloproteinasas MMP-2, -3, -6 y -9 (Ries y Sastre, 2016; Miners y col. 2008; Zhang y Jiang, 2015; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018; Verkhatsky y col. 2010; Acosta y col. 2017), aunque se ha descrito una disminución de estos mecanismos a lo largo de la progresión de la EA (Farris y col. 2007; Tarasoff-Conway y col. 2015), lo que implicaría una exacerbación de la patología.

Por otro lado, el cambio morfológico asociado a la activación astrogliar afecta a los pies de los astrocitos, lo que puede producir alteraciones en la unidad neurovascular (Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018) y, con ello, en la integridad de la BHE (Liu y col. 2014), provocando las alteraciones cerebrovasculares típicas de la EA (Avila-Muñoz y Arias, 2014; Acosta y col. 2017; Verkhratsky y col. 2010). Como consecuencia, se acentúa la deposición de Abeta, contribuyendo a la *angiopatía amiloide cerebral*, y se altera el aclaramiento de este péptido a través de la BHE (Ries y Sastre, 2016; Kress y col. 2014; Hubbard y col. 2018; Cai y col. 2017), originando un bucle de retroalimentación positiva que agrava el proceso. Por tanto, es importante tener en cuenta esta posible transformación perjudicial de los astrocitos, en la que adquieren la capacidad para generar Abeta y la pierden para eliminarlo (Zhang y Jiang, 2015). La atrofia/disfunción astrocitaria implicaría la reducción del soporte homeostático astrogliar, con graves consecuencias en la supervivencia neuronal y en la actividad funcional de las sinapsis (Coleman y col. 2004; Rodríguez-Arellano y col. 2016). De hecho, existen evidencias de que la activación astrocitaria altera la función normal de los astrocitos como moduladores de la transmisión sináptica neuronal (Verkhratsky y col. 2010; Acosta y col. 2017; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018), lo que podría estar directamente relacionado con los fallos en el aprendizaje y la memoria de los pacientes de EA (Tian y col. 2013).

En definitiva, existe un debate sobre si los astrocitos ejercen un papel neurotóxico o neuroprotector en la patología de la EA (Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018), por lo que resulta imprescindible caracterizar su función y su potencial patológico o neuroprotector. Los resultados, a día de hoy, parecen indicar que los astrocitos poseen un papel neuroprotector en los inicios de la patología, que podría disminuir con la progresión de la enfermedad, probablemente debido a una pérdida de sus funciones normales o a una ganancia de función tóxica, o a ambas (Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). Por tanto, el término “reactivo” resulta insuficiente para definir el estado y función de los en la EA. Así pues, y de forma similar a la microglía, se ha propuesto que los astrocitos podrían adoptar gran variedad de fenotipos funcionales dependiendo del contexto patológico en el que se encuentren (Zamanian y col. 2012; Liddelow y Barres, 2017).

Actualmente, se están realizando numerosos estudios transcriptómicos con el fin de caracterizar los perfiles de expresión de los astrocitos en el cerebro de pacientes de EA y de modelos murinos de la enfermedad. Así, se han identificado dos fenotipos diferentes de reactividad astrogliar, según el estímulo que lo genere: la neuroinflamación parece inducir un fenotipo A1, mientras que daños por isquemia producen un fenotipo A2 (Simpson y col. 2011; Zamanian y col. 2012; Liddelow y col. 2017). Los astrocitos A1 se caracterizan por un perfil inflamatorio y perjudicial, al perder su capacidad de promover la supervivencia y crecimiento neuronal, la sinaptogénesis y la fagocitosis; aumentan la expresión de genes que provocan destrucción sináptica, como los genes de la cascada del complemento, y también son altamente tóxicos para las neuronas, aunque el mecanismo exacto de toxicidad todavía no se conoce (Liddelow y col. 2017; Zamanian y col. 2012). La adquisición del

posible fenotipo A1 depende, en cierta medida, de la interacción con la microglía y se modula por la presencia del alelo $\epsilon 4$ del ApoE, al menos en modelos animales (Liddel y Barres, 2017; Shi y col. 2017b). Se han encontrado astrocitos A1 en ratones transgénicos de tau que expresan la isoforma ApoE $\epsilon 4$ (Shi y col. 2017b) y en el SNC de pacientes con diversas enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la EA (Liddel y col. 2017). Por el contrario, los astrocitos A2 se caracterizan por un aumento en la expresión de factores neurotróficos, que promueven la supervivencia y crecimiento neuronal, y trombospondinas, que favorecen la reparación de sinapsis. Sin embargo, esta división en dos fenotipos contrapuestos es muy probablemente una simplificación y no representa fielmente la realidad (Masgrau y col. 2017; John Lin y col. 2017; Sosunov y col. 2014; Chai y col. 2017), por lo que, actualmente, se propone que los astrocitos pueden presentar fenotipos muy diferentes en función de la región en la que se encuentran y/o del estímulo que reciban. Todos estos estudios, en conjunto, parecen apoyar la idea de que la reacción astrocítica en la EA implica una ganancia de función neurotóxica y una pérdida de su función neuroprotectora (Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018).

5.2. Mediadores de la respuesta inflamatoria

Se han descrito diversas citoquinas (interleuquinas y quimioquinas) mediadoras de la respuesta inflamatoria en la EA, tanto de naturaleza pro-inflamatoria, como TNF α , FASL, CH3L1, INF γ , IL1 β , IL6 e IL12a, como anti-inflamatoria entre las que se incluyen IL13, IGF1, TGF β , IL10, IL4, (Heneka y O'Banion, 2007; Colton y col. 2006; Hane y col. 2017a; Leyns y Holtzman, 2017; Zhang y Jiang, 2015). Algunos ejemplos de quimioquinas y sus receptores, con implicaciones importantes en la EA, son CCL2/CCR2, CXCL10/CXCR3, CX3CL1/CX3CR1, CXCL12/CXCR4, CXCL3/CXCR1, RANTES y CCL5 / CCR1, CCR2 y CCR5 (Ubogu y col. 2006; Liu y col. 2014; Hane y col. 2017a; Colonna y Butovsky, 2017). La producción de quimioquinas por astrocitos y microglía en respuesta a citoquinas proinflamatorias del SNC, podría desencadenar la migración de leucocitos inflamatorios desde el espacio perivascular hacia el parénquima cerebral (Ubogu y col. 2006). Por ejemplo, las quimioquinas CCL2 y CXCL10 son producidas por los astrocitos alrededor de las lesiones y podrían mandar la señal a los receptores CCR2 o CXCR3 de los leucocitos, respectivamente.

Por último, cabe destacar la participación del sistema del complemento, componente del sistema inmune innato, que facilita la eliminación de patógenos mediante fagocitosis de los antígenos opsonizados o de las células dañadas o apoptóticas, produciendo directamente la muerte o lisis celular (Hansen y col. 2017; Rajendran y Paolicelli, 2018; Clarke y Barres, 2013; Leyns y Holtzman, 2017). La señalización del complemento induce la liberación de citoquinas proinflamatorias, como IL1 β , TNF α , IL6 e IL18 (Leyns y Holtzman, 2017). La activación de dicha cascada se inicia al activarse el ensamblaje de la convertasa C3 por

algún factor soluble, lo que produce C3a y C3b con diversas funciones de señalización (Leyns y Holtzman, 2017).

Muchos trabajos implican al sistema del complemento en la mediación del “pruning” sináptico mediado por microglía y astrocitos (Leyns y Holtzman, 2017; Hansen y col. 2017; Clarke y Barres, 2013), ya que las proteínas C1q y C3 son necesarias en la fagocitosis microglial de sinapsis que parece ser dependiente de Abeta (Hong y col. 2016). C1q se expresa en el cerebro adulto y aumenta con el envejecimiento y en ratones modelo de la EA, especialmente en el hipocampo, al igual que ocurre con C3 (Hansen y col. 2017; Rajendran y Paolicelli, 2018). En el cerebro de pacientes de Alzheimer, C1q interacciona con las placas de Abeta y/o los ovillos neurofibrilares de tau, pudiendo desencadenar la activación de la vía clásica del complemento (Afagh y col. 1996; Leyns y Holtzman, 2017; Hansen y col. 2017). Además, el Abeta oligomérico soluble induce la deposición de C1q, siendo necesaria para los efectos tóxicos de estos oligómeros sobre las sinapsis y sobre la LTP en el hipocampo (Hong y col. 2016). Otros estudios relacionan una mayor acumulación de C1q en el hipocampo, con la presencia del alelo $\epsilon 4$ de ApoE (Chung y col. 2016). Por otro lado, la activación del complemento parece exacerbar la patología tau en modelos de la EA, lo que podría estar mediado por la proteína C3 o C5b-9, aunque el mecanismo todavía no está claro (Hansen y col. 2017; Colonna y Butovsky, 2017). A pesar de todos estos hallazgos, el papel de la cascada del complemento todavía no se conoce completamente (Rajendran y Paolicelli, 2018), por lo que se requieren más estudios para esclarecer su participación en enfermedades neurodegenerativas, y en concreto, en la EA.

Todos los mediadores inflamatorios y sus receptores podrían ser potenciales dianas farmacológicas en enfermedades que cursan con neuroinflamación, como la EA. Por lo tanto, resulta imprescindible desvelar los mecanismos exactos de neuroinflamación en las distintas enfermedades neurodegenerativas (Leyns y Holtzman, 2017).

B. MATERIALES Y MÉTODOS

1. SUJETOS DE ESTUDIO

1.1. Animales de experimentación

En el presente trabajo, los animales de experimentación empleados fueron ratones, de entre 2 y 18 meses de edad, de las líneas transgénicas que se enumeran a continuación. Como controles, se han utilizado sus correspondientes ratones no transgénicos (wildtype, WT), con mismo fondo genético (C57BL/6) y edad.

- APP/PS1 (PS1 Δ exón9xAPPs): Ratones doble transgénicos PS1_{dE9}/APPs. Estos ratones sobreexpresan el gen APP en su isoforma 695 con la mutación *Swedish* (K594M/M596L) descrita en casos de Alzheimer Familiar, y el gen PS1, que presenta una delección del exón 9 (PS1_{dE9}), bajo el control del promotor PrP. Estos animales, con fondo genético C57BL/6, proceden de Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine) (Jankowsky y col. 2004).
- APP: Ratones simple transgénicos APP_{SL}, con fondo genético C57BL/6, que sobreexpresan el APP751 humano con las mutaciones *Swedish* (KM670/671NL) y *London* (V717I) descritas en casos de Alzheimer Familiar, bajo control del promotor Thy-1, específico de células principales. Estos ratones proceden de Sanofi-Aventis (Paris, Francia).
- ThyTAU: Ratones Thy-Tau22, que expresan la forma humana de Tau de 4 repeticiones, con las mutaciones G272V y P301S, bajo el control del promotor Thy1.2 (Schindowski y col. 2006). Estos animales fueron suministrados por Sanofi-Aventis (Paris, Francia).
- TAU P301S (Line PS19): Ratones que expresan la forma humana de Tau de 4 repeticiones y un inserto N-terminal (4R/1N), con la mutación P301S, bajo el control del promotor de la proteína priónica (Prnp). Proceden de Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine) (Yoshiyama y col. 2007).

Los animales se crían y mantienen, hasta su uso, en el estabulario del Centro de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla. Se controla la temperatura media a 21°C y se mantiene un fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 de oscuridad. Todos los animales, durante la permanencia en el estabulario, disponen de libre acceso al agua y a una dieta estándar.

Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (Dolethal®, 60 mg/Kg) y se perfundieron transcárdialmente con tampón fosfato salino PBS [NaH₂PO₄ 0.1M (Merck) + NaHPO₄ 0.1M (Merck) + NaCl 0.132M (Panreac), pH 7.4], durante 5 min a un flujo continuo de 10 ml/minuto, utilizando una bomba de perfusión (DINKO Mod. D-25V). Seguidamente, los animales se decapitaron, extrayéndose el cerebro. Estos se dividieron en dos hemisferios; uno para la posterior extracción de las regiones cerebrales de interés (corteza y/o hipocampo) para realización de estudios bioquímicos y moleculares, los cuales se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80°C hasta su uso. Estas muestras congeladas se utilizarían, posteriormente, para la extracción de proteínas totales y/o ARN (ver apartado 10), o para el aislamiento de fracciones solubles (S1) (ver apartado 5). El otro hemisferio, para realizar estudios inmunohistoquímicos, se fijan durante tres días a 4°C

por inmersión en solución fijadora PLP [paraformaldehído 4% (Merk), L-Lisina 75 mM (Merk) y meta-peryodato sódico 10mM (Merk)] en tampón fosfato (PB) 0.1 M pH 7,4, cambiando la solución fijadora cada 24 horas. Tras la fijación, los cerebros se sumergen en una solución crioprotectora de sacarosa (Appllichem) al 30% con azida sódica 0.02% (Panreac), hasta que se hundan completamente, lo que significa que todo el tejido se ha impregnado en sacarosa, para crioprotegerlo. Finalmente, los cerebros se congelan de manera gradual, para evitar rotura celular, y se mantienen a -80°C hasta su posterior procesamiento. Para el aislamiento de astrocitos (ver apartado 4) se usan las cortezas e hipocampos (sin separar) de forma directa, en fresco, tras su extracción del animal perfundido. Para la extracción de neurosinaptosomas (ver apartado 9.1), no es necesario la perfusión del animal. En cada diseño experimental, las muestras de diferentes genotipos y edades fueron procesadas de forma simultánea.

Todos los experimentos se han realizado de acuerdo con las directrices del Parlamento Europeo y del Consejo (Directiva 2010/63/UE), siguiendo la normativa española (Real Decreto 53/2013), para la protección de animales utilizados en experimentación. Además, los experimentos fueron aprobados por el Comité Ético de Uso de Animales para la Investigación de la Universidad de Sevilla. El número de animales empleados, así como el estrés y sufrimiento de éstos durante la manipulación y experimentación, fueron reducidos al máximo, de acuerdo a la regla de las 3R (reemplazar, reducir y refinar).

1.2. Muestras humanas *postmortem*

Las muestras de tejido utilizadas en este trabajo proceden de necropsias tomadas de individuos control y pacientes en diferentes estadios de la enfermedad de Alzheimer. La clasificación de estos pacientes se ha llevado a cabo de acuerdo a la patología de tau presente en el tejido cerebral, según los estadios de Braak (Braak y Braak, 1991). Las muestras controles proceden de individuos sin ninguna enfermedad psiquiátrica/neurológica conocida y en las que no se observaron lesiones ni síntomas neurológicos tras realizar el examen neuropatológico.

Las muestras fueron cedidas por el Dr. Alberto Rábano Gutiérrez Arroyo, director del Banco de Tejido para Investigación Neurológica (BTIN) de Madrid, perteneciente a la Fundación CIEN del Instituto de Salud Carlos III; por el Dr. Isidro Ferrer, del Instituto de Neuropatología y coordinador del Banco de Tejidos Neurológicos del Servicio de Anatomía Patológica, perteneciente al IDIBELL-Hospital Universitario de Bellvitge, de Barcelona; y por el Banco de Tejidos Neurológicos BioBanc del Hospital clínico-IDIBAPS, en Barcelona; siguiendo las normas generales de la legislación española y del comité ético local. Este proyecto ha sido aprobado por el Portal de Ética de la Investigación Biomédica de Andalucía (PEIBA) de la Consejería de Salud, así como por los propios Comités Éticos de los respectivos Bancos de Tejidos y el Comité Ético de Investigación de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena-Virgen del Rocío.

En la **Tabla B1** se detallan las medias de edad y sexo de cada uno de los grupos estudiados (basados en el estadio de Braak), así como el intervalo de tiempo *postmortem* transcurrido hasta la toma de la muestra. El tejido, una vez extraído, se mantiene a -80°C hasta su uso, para evitar la degradación de proteínas y ARN. Las muestras de la necropsia se dividen aún congeladas en secciones de 70-90 mg para la extracción de proteínas, ARN o fracción soluble (S1) (Apartados 5 y 10).

Estadio Braak	Género		Edad (años)	Tiempo Postmortem (h)
	Masculino (%)	Femenino (%)		
Braak 0 (n=6)	66,67	33,33	51 ± 6,2	5,8 ± 2,1
Braak II (n=17)	52,94	47,06	46,53 ± 9,9	9,4 ± 5,0
Braak III-IV (n=12)	63,64	36,36	82,5 ± 8,1	6,1 ± 5,3
Braak V-VI (n=17)	57,14	42,86	75,3 ± 14,6	8,0 ± 3,2

Tabla B1. Datos referentes a las muestras humanas analizados en el presente estudio. Los individuos se clasifican según el estadio Braak y se especifican los porcentajes de individuos de cada sexo y los datos medios \pm desviación estándar de la edad y el tiempo *postmortem* transcurrido desde la muerte hasta la toma de muestra.

2. CULTIVOS DE LÍNEAS CELULARES

En todos los casos, las células se incubaron a 37°C , en una atmósfera humidificada con un 5% de CO_2 , y su manipulación se llevó a cabo bajo condiciones de esterilidad, utilizando una campana de flujo laminar y material estéril. Las células se subcultivaban 2-3 veces en semana, manteniendo una confluencia adecuada al crecimiento celular de cada línea. Para ello, mediante un rascador (*scraper*) o mediante el uso de Trypsin 0,25%-EDTA 1 mM (Biowest) se recogen las células del frasco de cultivo y se resuspenden en medio de cultivo correspondiente, haciendo diluciones 1:2, 1:5 ó 1:10 antes de sembrar en un frasco nuevo. El número de células y soporte utilizado en cada ensayo van a depender de las condiciones experimentales empleadas.

2.1. Línea microglial BV2

Esta línea deriva de la microglía neonatal murina raf/myc-inmortalizada y es la línea microglial más utilizada como sustitución de la microglía primaria en estudios de neurodegeneración. Estas células son mantenidas de forma rutinaria en medio DMEM-F12 w/o L-glutamine (Biowest) suplementado con glutamina 2 mM (Biowest), suero fetal bovino inactivado 10% (SFB; Biowest), 100 U/ml de penicilina (Biowest) y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycin (Biowest).

2.2. Línea microglial N13

Esta línea deriva de células primarias murinas inmortalizadas mediante el uso de retrovirus oncogénicos. Estas células inmortalizadas, tras su estimulación con LPS, producen un repertorio de citoquinas similar a la microglía primaria (Righi y col. 1989). Esta línea microglial se mantiene en medio RPMI1640 w/o L-glutamine (Biowest) suplementado con glutamina 2 mM, SFB 10%, 100 U/ml de penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycin.

2.3. Línea neuronal N2a

Las células neuronales de la línea N2a utilizadas en este trabajo, que provienen de neuroblastomas de ratón, fueron generosamente donadas por el Dr. Gopal Thinakaran (University of Chicago; USA). El mantenimiento de estas células se hace, rutinariamente, en medio DMEM High Glucose w/L-glutamine (Biowest) (50%) y OPTIMEM 1 (Gibco) (50%), suplementado con L-glutamina 2 mM, SFB 10%, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina.

2.4. Línea astroglial WJE

La línea celular WJE son células inmortalizadas de astrocitos murinos que expresan el alelo $\epsilon 3$ (WJE- $\epsilon 3$) de la apolipoproteína E humana (*knock-in*). El mantenimiento de estas células se lleva a cabo en medio de cultivo DMEM/F-12 w/o L-Glutamine, suplementado con SFB 10%, piruvato de sodio 1% (Biowest), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina y Geneticina 200 µg/ml (G418; Biowest).

3. CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS

3.1. Cultivo mixto de microglía y astrocitos

Estos cultivos primarios se realizan según se describe en Jimenez y col. 2008. Estas células se obtienen a partir de corteza e hipocampo de ratones C57BL/6 neonatales (P1-P3). Tras la decapitación de la crías, se extrae el cerebro y se retiran las meninges, se separan cortezas e hipocampos del resto del cerebro y se mantienen en PBS (Biowest) frío con antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina). El tejido procedente del hipocampo y la corteza se homogeniza suavemente con tijeras de cirugía en Tripsina-EDTA 1x en PBS (Biowest) (500µl para dos cerebros), se incuba a 37°C durante 5 min y se repite el proceso hasta que el tejido quede completamente homogeneizado. Posteriormente, se le añade medio completo con SFB, para inhibir la tripsina, y la suspensión de células obtenida se filtra mediante un filtro de nylon con diámetro de poro de 40 µm (Fisher Scientific). Las células se siembran en placas de 24 pocillos, a una densidad de 500.000 células por pocillo (área por pocillo: 1.77cm²; Nunc). Se mantienen en medio completo, compuesto por DMEM-F12, suplementado con SFB 10%, aminoácidos no esenciales 1x (Biowest), 10 µg/ml de gentamicina (Biowest), 2mM de L-Glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. A los 2 días, se retira la mitad del medio y reponemos con medio nuevo. Cada 4 días, se renueva todo el medio. Las placas de cultivo utilizadas son tratadas previamente con poli-D-lisina (Sigma) a 100 µg/ml, durante 2 horas (mínimo) a 37°C, y posteriormente se lavan con agua destilada para retirar restos de poli-D-lisina.

3.1.1. Aislamiento de microglía y astrocitos

El proceso de aislamiento se realiza entre los 20 y 25 días del cultivo mixto. Se recoge el medio del cultivo que se encuentra condicionado por los factores liberados por las células

(medio condicionado) y se reserva para volver a añadir al final. Se lava la placa con PBS estéril para retirar cualquier resto de suero y se añade medio de aislamiento, compuesto por DMEM-F12 y Trypsin 0,25%-EDTA 1 mM (3:1). Se incuba la placa durante 10-45 min a 37°C, tiempo en el que los astrocitos se levantan del cultivo, y la microglía queda pegada a la superficie de la placa. Una vez que se hayan levantado todos los astrocitos, se añade medio de cultivo completo para inactivar la tripsina y se recoge el sobrenadante, donde se encuentran los astrocitos. Por un lado tendremos la placa, en la que sólo queda la MICROGLÍA, que se lava con PBS y posteriormente se le añade el medio condicionado retirado previamente, mezclado con nuevo medio de cultivo en proporción 1:1. Y, por otro lado, los astrocitos, que se centrifugan a 800xg durante 5 min, se resuspenden en medio completo y se cultivan como cultivo primario de ASTROCITOS en placas de 24 pocillos, previamente tratada con poli-D-lisina.

3.2. Cultivo de neuronas

Estos cultivos primarios se realizan según se describe en García-Junco-Clemente y col. 2010. Estas células se obtienen a partir del hipocampo de fetos de ratones C57BL/6, cuando la madre se encuentra en el día 17 de gestación (T17). Tras la extracción de las crías y su decapitación, se extrae el cerebro, se retiran las meninges y se separa el hipocampo del resto del cerebro y se mantiene en medio de disociación frío: HBSS (Biowest), Glucosa 10mM (Sigma) y HEPES 10mM (Sigma). Una vez extraídos todos los hipocampos, se incuban durante 3 min, a 37°C y agitación suave, con una solución de papaína 41 U/ml (Worthington) con L-cisteína 0.06% (p/v) (Sigma) en medio de disociación. Posteriormente, se lava 3 veces con Inhibidor de Tripsina 1mg/ml (Sigma) en medio de disociación, y se incuba con dicho inhibidor durante 4 min, a 37°C y agitación suave. A continuación, se disgrega mecánicamente el tejido en presencia de medio de plaqueo: DMEM-F12, suplementado con glutamina 2mM, piruvato de sodio 1%, glucosa 20mM y suero de caballo inactivado 10% (HS; Biowest). Finalmente, se siembran las células en placas de 24 pocillos, previamente tratadas con poli-D-lisina, a una densidad de 50.000-80.000 células por pocillo, dependiendo del tipo de ensayo. Dos horas después, se cambia el medio por medio de neuronas: Neurobasal (Gibco), B27 2% (Gibco), Glutamax 2mM (Gibco), 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina. Cada 2-3 días, se cambia parte del medio, retirando 1/10 y añadiendo 1/4 de medio de neuronas nuevo, a cada pocillo.

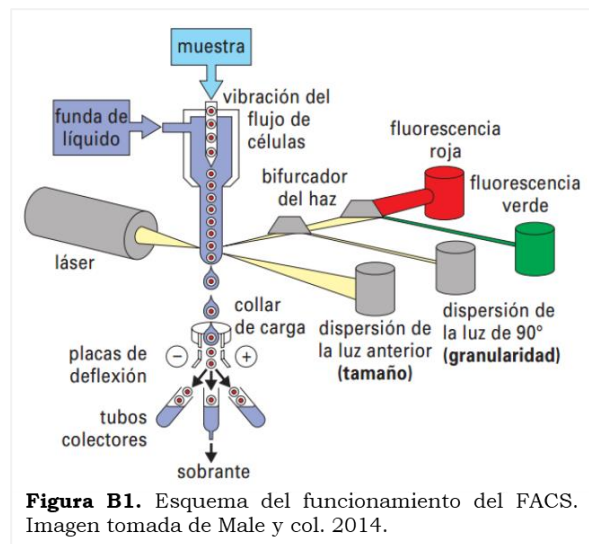
4. AISLAMIENTO DE ASTROCITOS DEL TEJIDO CEREBRAL DE RATONES MODELO DE LA EA

El método utilizado para aislar astrocitos del resto de células presentes en la corteza cerebral y el hipocampo de ratones modelos de la EA, es una modificación del protocolo descrito por Orre y col. (2014a,b).

4.1. Homogeneización del tejido y gradiente de percoll

En primer lugar, se perfunden y sacrifican los ratones, siguiendo el protocolo detallado en el Apartado 1.1. Para realizar este aislamiento se extrae el cerebro y se aíslan corteza e hipocampo conjuntamente. A continuación, se realiza una digestión mecánica con micropipeta, seguida de una digestión química con papaína 8 U/ml, en presencia de DNaseI 400 U/ml (Roche), en un tampón Krebs-Ringer tamponado con PIPES: EDTA 0.6mM (Applichem), L-Cisteína 3mM, Glucosa 0.45%, NaCl 0.12M (Scharlau), KCl 5mM (Panreac), NaOH 40mM (Acros Organics) y PIPES 6mg/ml (Sigma), a pH=7.4. Con esta solución, se incuba el tejido a 37°C durante 30 min, con agitación suave (400 rpm). Tras ese tiempo, se inactiva la papaína con una solución de BSA 0,5% (Sigma) en DMEM-F12, incubándolo de nuevo a 37°C, durante 15 min en agitación suave (400 rpm). Posteriormente, se termina de disgregar el tejido con ayuda de una micropipeta, hasta obtener una suspensión de células, que se filtra con filtro de nylon con diámetro de poro de 100µm (Fisher Scientific) para eliminar fragmentos de tejido no disgregado.

Una vez obtenida dicha suspensión de células, se lava y resuspende finalmente en la solución de BSA (0,5%, en DMEM-F12), y se deposita cuidadosamente sobre Percoll (Sigma) al 90%, preparado en HBSS 1x, para generar un gradiente. A continuación, mediante centrifugación (200xg, 15 min, sin freno), la suspensión celular se separa en 3 fases, de manera que en la fase acuosa superior quedarán los restos celulares, en la fase intermedia se generará una fase de mielina y células, y en el resto del percoll quedarán las demás células en suspensión. Por tanto, retiramos la fase superior para descartar todos los *debris*, y mezclamos la fase intermedia con la inferior, que lavamos de nuevo con la solución de BSA (0,5%, en DMEM-F12) y centrifugamos (200xg, 15 min, sin freno), para obtener, finalmente, el pellet de células. En este pellet tendremos todos los tipos celulares presentes en la corteza e hipocampo del ratón utilizado, por lo que tenemos que aislar específicamente los astrocitos, separándolos de microglía, neuronas y demás células del SNC, como se detalla a continuación.



4.2. Separación Celular – *Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS)*

4.2.1. Fundamento

La *citometría de flujo* es una técnica de análisis celular multiparamétrico cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células) alineadas e individualmente a través de un capilar, por delante de un haz de luz láser focalizado. De este modo, es posible medir y cuantificar simultáneamente múltiples características físicas y

químicas de una sola célula, que produce una señal de forma individual al interferir con dicha fuente de luz (Barrera-Ramirez y col. 2004). Cuando el haz incide sobre una célula, se genera una luz dispersada policromática, generada por los diferentes fluorocromos, que suelen estar unidos a un anticuerpo específico para antígenos de las células que queremos detectar. Dicha luz generada es detectada a través de los detectores de gran sensibilidad del propio citómetro, generando gran cantidad de información sobre cada célula individual. Así pues, la luz dispersada hacia delante y lateralmente provee información sobre el tamaño y la complejidad/granularidad de la célula, respectivamente, pero también podemos obtener información de las características antigénicas (inmunofenotipo) de las células, e incluso de diferentes procesos o funciones celulares (ciclo celular, proliferación, apoptosis, fagocitosis, etc.), específico en cada célula en la suspensión total de células.

Algunos citómetros de flujo poseen, además, una función denominada "clasificación de células activada por fluorescencia" o **FACS** (del inglés, *Fluorescence-activated Cell Sorting*). Esta técnica permite clasificar y separar las células con alta pureza, en función del tipo de marcaje fluorescente que presenten, permitiendo su aislamiento de manera específica y su posterior uso en experimentos funcionales. Así pues, mientras las células individualizadas están cayendo, pasan entre dos placas cargadas que establecen un campo eléctrico entre ellas, proporcionando una carga determinada a las gotas en función de los parámetros medidos. La trayectoria de caída de las gotas cargadas se desvía hacia la placa que tenga polaridad opuesta, de modo que pueden separarse diferentes poblaciones de células (**Fig.B1**; Male y col. 2014), según su marcaje específico con los anticuerpos y fluoróforos utilizados.

En este trabajo de Tesis Doctoral se han utilizado los citómetros de flujo analizadores BD FACS Canto II y BD LRS II Fortessa (Becton Dickinson) y el Separador Celular *FACS* Aria Fusion (Becton Dickinson), del Servicio de Citometría de Flujo y Separación Celular, del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS).

4.2.2. Procedimiento

Para poder aislar los astrocitos de manera específica, se realiza un marcaje de la última suspensión de células obtenida, con diferentes anticuerpos, durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad, en un volumen de 100 μ l de PBS. Se utilizaron también los isotipos correspondientes como control negativo para descartar las uniones inespecíficas de los anticuerpos. Los anticuerpos usados, marcados con diferentes fluoróforos, han sido los siguientes:

- **Anti-ACSA2-APC** (clon IH3-18A3; Miltenyi Biotec): este anticuerpo se une a la proteína de superficie ACSA2 (del inglés *astrocyte cell surface antigen 2*) específica de astrocitos. ACSA2 permite una purificación de astrocitos viables de una manera altamente efectiva, sensible y específica (Kantzer y col. 2017). Viene marcado con el fluorocromo APC (*Allophycocyanin*: $\lambda_{ex}=650\text{nm}$ / $\lambda_{em}=660\text{nm}$), y la concentración de anticuerpo usada fue de 1:10 (v/v).

- **Anti-CD45-PE** (clon HI30; Immunostep): este anticuerpo se une a la proteína de superficie CD45, específica de microglía. Viene ligado al fluorocromo PE (*R-phycoerythrin*: $\lambda_{\text{ex}}=496 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}}=578\text{nm}$), y la concentración de anticuerpo usada fue de 3:100 (v/v).
- **Anti-CD11b-CF-Blue** (clon M1/70; Immunostep): este anticuerpo se une a la proteína de superficie CD11b, específica de microglía. Viene ligado al fluorocromo CF-Blue ($\lambda_{\text{ex}}=401 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}}=452 \text{ nm}$), y la concentración de anticuerpo usada fue de 5:100 (v/v).

Una vez marcadas las células con estos anticuerpos, se lavan y se hacen pasar por el Separador Celular FACS Aria Fusion, detectando las diferentes poblaciones según la expresión de cada marcador (ver **Fig.D4.1**, en Resultados).

En primer lugar, realizamos una primera selección de células individuales (población P1), mediante la representación de SSC (Side Scatter) frente a FSC (Forward Scatter), que nos proporciona información sobre la complejidad y el tamaño celular, respectivamente, por lo que nos permite descartar todos los debris, restos celulares y restos de mielina. Seguidamente, descartamos los dobletes y seleccionamos las células que se encuentran de manera individualizada (población P2), aquellas que muestran una relación lineal en la representación FSC-H vs. FSC-A. En tercer lugar, mediante los inmunomarcajes fluorescentes, podemos observar dos poblaciones claramente definidas, donde la población CD45⁺/CD11b⁺ corresponde a las células microgliales. A partir de la población CD45⁻/CD11b⁻ (células no microgliales), seleccionamos aquellas células claramente ACSA2^{high}, correspondiente a las células astrogliales. En definitiva, podemos aislar 3 poblaciones celulares diferentes: astrocitos (CD45⁻/CD11b⁻/ACSA2^{high}), microglía (CD45⁺/CD11b⁺) y otros tipos celulares del SNC (CD45⁻/CD11b⁻/ACSA2⁻). Así pues, se separaron y aislaron estas tres poblaciones, y se procesaron: extracción de ARN, retrotranscripción y estudio de marcadores específicos de cada población celular mediante qPCR (protocolos detallados en Apartados 10.1, 14 y 15, respectivamente), para comprobar el correcto aislamiento específico de estos tipos celulares.

En definitiva, este protocolo específico nos proporciona una selección y aislamiento eficaz y seguro de la población de astrocitos. Así pues, se aisló la población de astrocitos (CD45⁻/CD11b⁻/ACSA2^{high}) a partir de corteza e hipocampo de distintos modelos murinos de la EA a distintas edades, para un estudio transcriptómico completo de este tipo celular frente a las diferentes patologías (ver Apartado 17). Como control se usó la población de astrocitos aislados de animales WT con mismo fondo genético y mismas edades.

5. AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS SOLUBLES (S1)

Otra técnica empleada para la obtención de proteínas es la que se lleva a cabo en medio acuoso en ausencia de detergentes. Este método nos permite separar la fracción soluble de proteínas extracelulares y citosólicas del tejido procesado, mediante ultracentrifugación diferencial.

Para la obtención de la fracción soluble S1, hemos utilizado el tejido de hipocampo de las muestras humanas, y de corteza de los animales transgénicos. En primer lugar, disgregamos el tejido en tampón isotónico tris-salino [NaCl 140mM en Tris-HCl 20mM (AppliChem), pH 7.4], al que añadimos un cocktail de inhibidores de proteasas (Roche) y fosfatasas (Sigma). La disgregación se lleva a cabo usando las tijeras apropiadas hasta que el tejido queda totalmente fraccionado. Seguidamente, pasamos la suspensión de tejido resultante a un homogenizador Dounce´s (Wheaton) y lo sometemos a 15 pases con el pistilo de menor diámetro (paso de luz: 0.089-0.14 mm) y 15 pases con el de mayor diámetro (paso de luz: 0.025-0.076 mm). El homogenado obtenido se centrifuga a 100.000 xg durante 1 hora a 4°C (Optima Max, Beckman Coulter). El sobrenadante que obtenemos de esta ultracentrifugación es lo que consideramos fracción proteica soluble o S1 y el precipitado serán los restos de membranas, agregados proteicos y proteínas insolubles (P1). La fracción S1 se cuantifica mediante el método de Lowry (ver Apartado 11) y ambas fracciones (S1 y P1) se guardan por separado a -80°C hasta su uso.

6. OBTENCIÓN DE ABETA MONO Y OLIGOMÉRICO

Para la preparación de monómeros y oligómeros de Abeta, seguimos un procedimiento muy similar al usado por Ojha y col. (2011). Partimos de un vial con 0.5 mg del péptido Abeta42 (AnaSpec), que se disuelve en 100µl de HFIP (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol; Sigma) y se incuba a 4°C durante una hora con agitación suave. A continuación, se separan 5 alícuotas de 20µl y se evapora el HFIP en un concentrador de vacío (Jouan RC10.22; Thermo Fisher Scientific) durante 20 minutos aproximadamente. Cada una de estas alícuotas se pueden utilizar para la formación de monómeros u oligómeros de Abeta. Para ello, se disuelve el pellet de una de las alícuotas en 4.43µl de DMSO y lo mantenemos 15 minutos a temperatura ambiente, obteniendo así el Abeta monomérico en una concentración de 5mM. Posteriormente, añadimos tampón fosfato salino (PBS) hasta un volumen de 223.5µl, para conseguir una concentración final de 100µM de Abeta (0.45 µg/µl). De esta manera, obtenemos directamente el Abeta monomérico o, si lo incubamos a 4°C en agitación suave durante aproximadamente 24 horas, obtendremos Abeta oligomérico. Ambos los utilizaremos posteriormente en este trabajo para los ensayos de fagocitosis en astrocitos primarios *in vitro*.

7. ENSAYO DE ESTIMULACIÓN DE CULTIVOS CELULARES

Para llevar a cabo el estudio de la estimulación de células microgliales y/o astrogliales, frente al tratamiento con diferentes fracciones solubles (S1) (Apartado 5) o neurosinaptosomas (NS) (ver Apartado 9.1), utilizamos tanto las líneas celulares como los cultivos primarios. En el caso de las líneas (N13, BV2 y WJE), se siembran 45.000 células por pocillo y, en el caso de cultivos primarios, se sembraron, en el inicio del cultivo, unas 500.000 células por pocillo. Todos los cultivos, independientemente del tipo celular, se

realizan en placas de 24 pocillos. Tras el mantenimiento y crecimiento de estos cultivos, llevamos a cabo el tratamiento de los mismos. Para ello, se añaden 10µg proteína de las fracciones S1 por cada 100µl de medio (1:10), ó 3µl de NS en 1ml de medio (3:1000), que dejaremos durante 3-6 horas de tratamiento. En cada caso, el mantenimiento y tratamiento se realiza en el medio concreto de cada tipo celular (detallado en Apartados 2 y 3). Tras dicho tratamiento, se retira el medio y se recogen las células añadiéndoles el reactivo Tripure® (Roche), para posteriormente llevar a cabo la extracción de ARN y proteínas, siguiendo el protocolo descrito en el Apartado 10. Una vez obtenido el ADNc (Apartado 14), se miden mediante qPCR (Apartado 15) todos aquellos marcadores de interés, para estudiar la respuesta de las células ante los distintos tratamientos agudos.

8. ENSAYO DE TOXICIDAD EN CULTIVOS CELULARES, MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

En este caso, para llevar a cabo el estudio de la toxicidad de los tratamientos con las diferentes fracciones solubles (S1) o neurosinaptosomas (NS), también utilizamos tanto las líneas celulares como los cultivos primarios (microglía, astrocitos). Estos tratamientos se realizan en presencia de los medios correspondientes a cada tipo celular (Apartados 2 y 3), en placas de 24 pocillos y en ausencia de SFB, para que éste no pueda interferir en la supervivencia celular. Se utiliza la misma concentración que los tratamientos de estimulación (Apartado 7): 10µg/100µl para los S1 (1:10) y 3µl/1ml para los NS (3:1000); y utilizamos estaurosporina (Sigma) a una concentración de 1.2 µg/ml, como control positivo, ya que es capaz de inducir la apoptosis celular. Tras 12 horas de tratamiento, se recogen todas las células (en suspensión y pegadas a la superficie de la placa) y se determina la viabilidad de estas células mediante el kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Immunostep) y el citómetro de flujo BD FACS Canto II (ver Apartado 4.2.1). Finalmente, los resultados se analizaron con el software FACSDiva™ (BD Bioscience).

Este kit se basa en un doble marcaje con Anexina V, conjugada con FITC (*fluoresceína-5-isotiocianato*), y que tiene gran afinidad por la fosfatidilserina que queda expuesta hacia el exterior de las células durante el proceso de apoptosis; y con yoduro de propidio (PI), que permite conocer la integridad de la membrana plasmática. Debido a que esta integridad se ha perdido en las células que se encuentran tanto en necrosis como en apoptosis tardía, el PI puede acceder al núcleo celular y unirse al ADN. Por lo tanto, el marcaje simultáneo con PI y Anexina V permite discriminar y cuantificar las células viables (AnexinaV⁻/PI⁻), las células en apoptosis temprana (AnexinaV⁺/PI⁻), las células en apoptosis tardía (AnexinaV⁺/PI⁺) y las células necróticas (AnexinaV⁻/PI⁺).

9. ENSAYO DE FAGOCITOSIS DE NEUROSINAPTOSOMAS

9.1. Aislamiento de neurosinaptosomas (NS)

Los neurosinaptosomas (NS) son terminales aislados, que se individualizan de los terminales axonales cuando el tejido se homogeniza. Estos NS mantienen las características pre- y postsinápticas, por lo que son muy útiles en multitud de estudios, como en ensayos de la transmisión sináptica (Westmark y col. 2011). Para la obtención de dichos NS se ha seguido una adaptación al protocolo de Puighermanal y col. 2016, que describe un método para preparar neurosinaptosomas estriatales, con elementos pre y postsinápticos, a partir de ratones adultos. En este trabajo, hemos aislado neurosinaptosomas de ratones sin patología (WT), con patología Abeta (APP) y con patología Tau (TAU P301S), para utilizarlos como modelos *in vitro* de las distrofias ricas en Abeta o Tau hiperfosforilado que podemos encontrar en los modelos utilizados, así como en los pacientes de Alzheimer.

Así pues, tras sacrificar al animal mediante dislocación cervical, se extrae el cerebro y se disecciona la corteza. Por cada hemicorteza, se añade 1ml de Tampón de Neurosinaptosomas: CaCl₂ 2.5mM (Sigma), NaCl 124mM, KCl 3.2mM, KH₂PO₄ 1.06mM (Merck), NaHCO₃ 26mM (Merck), MgCl₂ 1.3mM (Sigma), D(+)Glucosa 10mM y Hepes 20mM, pH=7.4. Se homogeneiza el tejido, sometiéndolo a 10 pases con un homogeneizador Dounce's con el pistilo de menor diámetro (paso de luz: 0.089-0.14 mm) y, posteriormente, otros 10 pases con el de mayor diámetro (paso de luz: 0.025-0.076 mm). El homogenado obtenido se filtra de forma secuencial a través de 3 filtros de Nylon con un tamaño de poro de 100µm (Millipore) y, después, una membrana de filtro Mitex de un tamaño de poro de 10µm (Millipore). Seguidamente, se centrifuga durante un minuto a 4.000xg y el sobrenadante se somete a otra centrifugación: 14.000xg, durante 4 min. El pellet total obtenido de las dos hemicortezas se resuspende en un volumen final de 300µl con Tampón de Neurosinaptosomas y se mantienen a 4°C durante todo el proceso y hasta su posterior uso (no más de 24 horas).

9.2. Carga/marcaje de los neurosinaptosomas con fluorescencia

Por un lado, para el análisis de la fagocitosis/captación de los NS por parte de las distintas células (astrocitos o microglía), la mitad de los NS aislados (150µl) se cargaron con TAMRA (5(6)-Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester; Sigma). Este compuesto es un éster apolar que forma conjugados fluorescentes verdes ($\lambda_{ex}=492\text{nm}$; $\lambda_{em}=517\text{nm}$) cuando se desacetila. Así pues, esta molécula apolar es capaz de atravesar las membranas lipídicas de los neurosinaptosomas y se integra en su interior, donde es procesado por esterasas que lo convierten en una molécula polar. De esta manera ya no puede atravesar de nuevo la membrana lipídica para salir y, por tanto, nos permite marcar y detectar los propios NS y, con ello, aquellas células que hayan fagocitado esos NS mediante fluorescencia.

Por otro lado, para el análisis de la degradación o procesamiento de estos NS en el interior de las células, la otra mitad de los NS aislados (150µl) se marcan con pHRodo (pHrodo™ Red succinimidyl (NHS) ester; Thermo Fisher Scientific). Este compuesto es usado para el

marcaje de proteínas o grupos aminos en la superficie de partículas, para estudios de fagocitosis, endocitosis e internalización, entre otros. Así pues, el pHRodó se une a las proteínas que se encuentran en las membranas de los NS, lo que nos permite marcarlos con dicho fluoróforo. Este marcador es muy sensible al pH de su entorno local, de manera que su fluorescencia roja ($\lambda_{\text{ex}}=560\text{nm}$; $\lambda_{\text{em}}=585\text{nm}$) aumenta ante un medio ácido, siendo difícil de detectar en medios básicos y neutros. Es decir, esta fluorescencia no es detectada hasta que las células han fagocitado los NS y son introducidos en sus sistemas de degradación, como los lisosomas. Dichos lisosomas presentan un pH ácido en su interior que, junto a la acción de numerosas enzimas, permiten el procesamiento y degradación del material fagocitado. El pHRodó en ese ambiente ácido presenta una alta fluorescencia, que se va perdiendo con el tiempo, debido a la degradación del material fagocitado que, en este caso, son los neurosinaptosomas marcados con dicho fluoróforo. Así, podremos detectar y analizar el procesamiento de los NS fagocitados por parte de los astrocitos, mediante la disminución de fluorescencia de pHRodó a lo largo del tiempo.

Estos marcajes se realizaron con una concentración de TAMRA de $5\mu\text{M}$ (en presencia de tampón para neurosinaptosomas $\text{pH}=7.4$), o de pHRodó de $0.3\mu\text{M}$ (en presencia de un tampón $\text{pH}=9$), durante 2 horas a temperatura ambiente, en oscuridad y con agitación suave. Es importante tener en cuenta que los NS que vayan a ser marcados con pHRodó, deben estar en un tampón adecuado (durante todo el proceso), cuyo pH sea básico, en el que su fluorescencia es muy baja y que permita la unión entre pHRodó y los grupos aminos, para lo que utilizamos un tampón $\text{pH}=9$: Na_2CO_3 (Panreac) 100mM . Finalmente, tras la incubación, se lavan los NS, para eliminar el exceso de TAMRA o pHRodó, y se resuspenden en el mismo volumen final con el tampón adecuado ($150\mu\text{l}$).

9.3. Ensayo de fagocitosis y degradación de NS

Para estudiar la capacidad de fagocitosis de NS procedentes de distintos modelos murinos, por parte de los astrocitos o microglía, realizamos un tratamiento de estas células primarias en placas de 24 pocillos con $3\mu\text{l}$ de NS por cada ml de medio (3:1000), a diferentes tiempos. Por un lado, para la captación/ingesta de neurosinaptosomas, se tratan las células con los NS cargados con TAMRA, y el tratamiento se realiza durante 30, 60, 90, 180, 360 y 720 min, con el fin de estudiar la cinética de captación o internalización de neurosinaptosomas. Por otro lado, para estudiar el procesamiento o degradación de estos NS por parte de las células, éstas se tratan con los NS marcados con pHRodó durante 6 horas y, posteriormente, se realiza un aclaramiento de NS, retirándolos del medio, y analizamos el procesamiento de los NS fagocitados, a partir de ese momento (0 horas), y durante 12, 24, 48 y 72 horas. Tras el tratamiento a cada tiempo distinto, se recogen las células y se lavan con PBS. Finalmente, el análisis se realiza mediante citometría de flujo (LRS II Fortessa) (ver Apartado 4.2.1), detectando y cuantificando la fluorescencia del TAMRA o del pHRodó, en cada caso. En el caso del procesamiento/degradación de NS, también se analizó mediante

extracción de proteínas y WB (ver Apartados 10.2 y 12), para lo que se usaron NS sin marcaje fluorescente.

10. AISLAMIENTO DE ARN Y PROTEÍNAS

El método empleado para la extracción de ARN y proteínas se basa en la diferente solubilidad de las distintas biomoléculas (ARN, ADN, proteínas y lípidos) en disolventes orgánicos (fenol y cloroformo). El proceso se lleva a cabo usando el reactivo Tripure® (Roche), que contiene tiocianato de guanidina, un agente caotrópico que rompe las membranas y desnatura las proteínas, incluyendo proteasas, ADNasas y ARNasas. Estas últimas son muy resistentes a la mayoría de agentes físicos, y su desnaturalización es fundamental para evitar la degradación del ARN.

Para obtener una extracción de ARN lo más adecuada posible, hemos de conseguir minimizar la actividad ribonucleasa en los estadios iniciales de la extracción. Para ello, es importante que tanto reactivos como material de trabajo estén libres de ARNasas, por lo que rutinariamente optamos por tratar el agua con dietilpirocarbonato (DEPC; Sigma) a una concentración del 0.1% (p/v) (Fedorcsak y Ehrenberg, 1966), durante 12 horas; tras este periodo se elimina el DEPC en exceso por tratamiento térmico, ya que éste puede alterar el ARN por carboximetilación. Todos los reactivos y material fungible de origen comercial utilizados durante este proceso se adquieren libres de ARNasas. En lo que respecta al material físico no fungible (como pinzas o tijeras), lo autoclavamos antes de utilizarlo.

En el caso de los tejidos, se comienza con la homogenización de la muestra con un dispersador (Polytron; Heidoph), durante 15 segundos a la máxima potencia. El proceso comienza añadiendo 1ml del reactivo Tripure por cada 50-100 mg de tejido, o 0.5ml de Tripure por cada 10^6 células de cultivo o aisladas, aproximadamente. A continuación, en ambos casos, el homogenizado se deja incubar 10 min a temperatura ambiente, para permitir una disociación completa de los complejos núcleo-proteicos. Posteriormente, se añade cloroformo (Sigma) (0.2ml por ml inicial de Tripure añadido), se agita fuertemente y de nuevo se deja incubar a temperatura ambiente durante 5 min. A continuación, se centrifuga a 12000xg a 4°C durante 15 min, obteniéndose una solución trifásica: la fase superior acuosa corresponde al ARN, mientras que las proteínas, lípidos y ADN se encuentran en la interfase y fase inferior orgánica. Por tanto, a partir de esta solución trifásica, podemos aislar tanto el ARN (10.1) como las proteínas (10.2), las cuales se encuentran desnaturalizadas, por lo que solamente pueden utilizarse para estudios en WB.

10.1. Aislamiento de ARN

Para aislar el ARN, se extrae la fase superior acuosa cuidadosamente y se le añade isopropanol (Sigma) (0.5ml por ml inicial de Tripure añadido) y 0.5µl glicógeno (Thermo Scientific), que ayudará a la precipitación del ARN, incubándolo a -20°C durante toda la noche. Al día siguiente, se incuba a temperatura ambiente durante 10 min, y se centrifuga a

12.000xg, durante 15min a 4°C. El pellet de ARN obtenido se lava con Etanol (Scharlau) preparado al 75% (v/v) con agua tratada con DEPC (1ml por cada ml de tripure). Seguidamente, se vuelve a centrifugar a 12.000xg, durante 15 min a 4°C y, por último, el pellet obtenido se deja secar y se resuspende en agua tratada con DEPC (libre de ARNasas).

Este ARN purificado se cuantifica en un espectrofotómetro (NanoDrop; Thermo Scientific), aprovechando la capacidad de las bases nitrogenadas de absorber a una longitud de onda de 260nm. Además, es conveniente determinar la razón de absorbancia a 260nm/280nm (longitud de onda a la que absorben los aminoácidos aromáticos), lo que nos permite conocer el nivel de contaminación de proteínas presentes en la muestra de ARN purificado. Una razón de 2.1 indica que la muestra de ARN no presenta prácticamente contaminación con proteínas.

Una vez se ha purificado, cuantificado y comprobado su integridad (ver siguiente Apartado: 10.1.1), el ARN es almacenado a -80°C hasta su posterior utilización.

10.1.1. Comprobación de la integridad del ARN purificado

Para comprobar la integridad del ARN purificado utilizamos Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies) como soporte electroforético y Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) como instrumento de detección y análisis. Este sistema permite llevar a cabo una electroforesis en gel mediante el uso de un chip, sobre el cual se carga la matriz del gel, el fluoróforo que permitirá llevar a cabo la visualización del ARN y la muestra correspondiente. Tras la electroforesis, el sistema de análisis recoge la fluorescencia emitida por la muestra, previamente estimulada con láser, creando un electroferograma (fluorescencia/tiempo). El electroferograma permite conocer la calidad del ARN proporcionando el RIN (Número de Integridad del ARN; del inglés *RNA Integrity Number*), mediante el uso de un software específico. El RIN establece una clasificación numérica de la calidad del ARN que comprende valores del 1 al 10, siendo 1 el RIN de un ARN totalmente degradado y 10 el RIN de un ARN perfectamente conservado.

10.2. **Aislamiento de proteínas totales**

A partir de la solución trifásica anterior, utilizamos la fase intermedia y la fase orgánica inferior para extraer proteínas totales. En primer lugar, se lleva a cabo la precipitación del ADN genómico, para evitar la contaminación por parte del mismo de la muestra de proteínas. Para ello, se añade etanol al 100%, (0.3 ml por cada ml inicial de Tripure) y se invierte el tubo varias veces para mezclarlo. Después, se incuba la muestra durante 2-3 min a temperatura ambiente, para permitir que el ADN precipite. Se centrifuga a 2.000xg durante 5 min a 4°C y se recupera el sobrenadante (donde están las proteínas) en un tubo nuevo. A continuación, las proteínas se precipitan con isopropanol, usando 1.5 ml de isopropanol por cada ml de reactivo Tripure añadido en la homogenización, se agita invirtiendo el tubo varias veces, se deja 10-15 min a temperatura ambiente y se centrifuga

10 min a 12.000xg a 4°C. El precipitado se lava con guanidina (Sigma) 0.3 M en 95% (v/v) de etanol (2ml por cada ml de Tripure), se agita fuertemente y se deja 20 min a temperatura ambiente, para después centrifugar a 7.500xg durante 5 min a 4°C. Este proceso se repite dos veces más y luego se realiza un último lavado similar con 2ml de etanol absoluto por ml de Tripure utilizado, para eliminar los restos de guanidina. Finalmente, se deja secar el precipitado bajo una lámpara, unos 10 min hasta que se evapore todo el alcohol.

Para solubilizar las proteínas, el precipitado se resuspende en urea 8M (Applichem) y SDS 4% (Applichem), tamponado con 40mM Tris-HCl pH=7.5. Para ello, se adiciona 0.5 ml de este tampón por cada ml inicial de Tripure utilizado y se deja incubando toda la noche en agitación a temperatura ambiente, tras lo cual se procede a su cuantificación por el método de Lowry (Apartado 11). Las proteínas solubilizadas y cuantificadas se congelan en diferentes alícuotas a -40°C hasta su uso.

11. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: MÉTODO DE LOWRY

La determinación de la concentración de proteínas se realiza utilizando el método de Lowry (Lowry y col. 1951). La curva patrón se construye usando albúmina de suero bovina (BSA; Sigma) con un rango de sensibilidad de 10-100 µg, y la absorbancia se determina a 750 nm. A la hora de determinar la concentración de proteínas presente en un solubilizado con SDS 4%-UREA 8M, procedemos a añadir a la curva patrón el mismo porcentaje de urea y SDS que presentan las diluciones de las muestras a las que se le va a medir la absorbancia (normalmente 1:10). Por otra parte, para determinar la concentración de proteínas presentes en algunas muestras más limitantes o donde el volumen de muestra obtenido es pequeño, se utiliza una variante denominada **micro-lowry** (modificación de Fryer y col. 1986), para su uso en placas de poliestireno cristalino con 96 pocillos. En este caso, la curva patrón se hace en un rango de 1 a 10 µg, y la muestra se diluye entre 10 y 40 veces en un volumen final de 100 µl. A cada reacción, se le añaden 25 µl de la mezcla cobre-tartrato, en una razón 1:1:100 de CuSO₄ al 5% (Panreac), NaKTartrato al 10% (Sigma) y Na₂CO₃ al 10% (Panreac) en NaOH 0.5N. Con esta solución se incuba a temperatura ambiente durante 10 min. A continuación, añadimos el reactivo de Folin&Ciocalteu (Sigma) diluido en agua (1:1), e incubamos de nuevo a temperatura ambiente, durante 20 min. Finalmente, se procede a la lectura de la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 595nm y la realización de la curva patrón para el cálculo de la concentración de proteínas en cada una de las muestras.

12. WESTERN BLOT (WB)

12.1. Fundamento

Esta técnica permite la detección y cuantificación de proteínas específicas presentes en las proteínas totales extraídas. Los geles de poli(acrilamida) constituyen el soporte de elección a la hora de llevar a cabo la separación de las proteínas presentes en una muestra en función

de su movilidad electroforética, lo que depende de su tamaño. Entre las diversas técnicas de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), probablemente la más usada es aquella que se lleva a cabo en condiciones desnaturalizantes según el método de Laemmli (Laemmli, 1970). Esta electroforesis tiene lugar en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS; Panreac), que se caracteriza por su capacidad para dispersar agregados proteicos, así como para desnaturalizar las proteínas. Por otra parte, la presencia de este detergente, tanto en los geles como en los tampones de electroforesis y transferencia, nos garantiza que las proteínas separadas durante este proceso se encuentren en todo momento desnaturalizadas y cargadas negativamente, lo que nos permite diferenciarlas exclusivamente en función de su tamaño.

La poliacrilamida se forma a partir de la copolimerización entre los reactivos acrilamida (Serva) y bis-acrilamida (N,N'-metilén-bis-acrilamida; Sigma), en presencia de PSA (persulfato de amonio; Sigma), que actúa como catalizador de la polimerización, y TEMED (Tetrametiletilendiamina; Sigma) que inicia la reacción. En estos geles, podemos variar el diámetro de poro fácilmente cambiando las concentraciones de acrilamida y bis-acrilamida, lo que nos permite resolver proteínas de diferentes tamaños. En este trabajo, los geles preparados han variado entre 10, 12, 14 o 16% de acrilamida.

12.2. Procedimiento

Para llevar a cabo la electroforesis, las proteínas deben estar preparadas con un tampón específico, llamado tampón de carga: SDS 2.3%, beta-mercaptoetanol (Sigma) 10%, glicerol (Sigma) 20% y azul de bromofenol (Sigma) 0.005%, en tampón 10 mM Tris-HCl a pH 6.8.

Para la preparación del gel, usamos el sistema Mini Protean 3 (Bio-Rad), que nos permite preparar nuestros geles a la concentración deseada, combinando los reactivos descritos anteriormente, y con el número de pocillos que sean necesarios, según las condiciones de cada experimento (normalmente 15 pocillos). La electroforesis se lleva a cabo en tampón 25 mM Tris-HCl a pH 8.4 con Glicina 0.19 M (Applichem) y SDS 0.1% (p/v), sometiéndola a un voltaje constante de 90V. En el caso de proteínas de muy bajo peso molecular, hemos optado por utilizar geles de poliacrilamida junto con un tampón de electroforesis que contiene tricina 100mM (Applichem) pH 8.45, lo que permite una mejor separación de las moléculas de pequeño tamaño, como por ejemplo el péptido Abeta (4.5 KDa). Para ello, empleamos geles de corrido con acrilamida al 16%, y también modificamos el pH del gel de empaque hasta pH 8.45. La tricina tiene un pKa de 8.15 y la glicina de 9.6, por lo que, en las condiciones de experimentación descritas, la tricina se encuentra predominantemente en forma aniónica y migra mucho más rápido de lo que lo haría la glicina en el gel de empaque. En consecuencia, las proteínas con un peso molecular más bajo se empaquetan y migran mejor durante la electroforesis.

Una vez finalizada la electroforesis, transferimos las proteínas retenidas en el gel de poliacrilamida a una membrana. Esta membrana puede ser de nitrocelulosa (Hybond-C extra, Amersham) o de PVDF (Inmobilon-P, Millipore), ambas con 0.45 micras de diámetro de poro. El sistema de soporte utilizado nos permite realizar la transferencia sumergida en el tampón de transferencia [glicina 190mM, metanol 20% (v/v) (Scharlau), SDS 0.005%, en 25mM Tris-HCL, pH 8.4], a 310 mA constantes durante 60-120 min. Al terminar la transferencia, teñimos la membrana con solución de Rojo Ponceau's (Sigma), preparado al 0.1% en ácido acético 5% (Panreac) en agua, para poder observar las proteínas transferidas. Después, la lavamos con TPBS [Tween-20 (Sigma) 0.1% (v/v) en PBS] y pasamos a bloquearla con leche desnatada (Bio-Rad) al 5% en TPBS, durante 30-60min a temperatura ambiente. En el caso de usar una membrana de PVDF, es necesario activarla sumergiendola en metanol antes de usarla para la transferencia y hervirla en PBS durante 5 min antes de bloquearla. Tras el bloqueo, se incuba la membrana con el anticuerpo primario correspondiente en leche al 1% en TPBS, durante toda la noche a 4°C. La concentración y características más relevantes de cada anticuerpo empleado se detallan en la **Tabla B2**. Al día siguiente, retiramos el exceso de anticuerpo con tres lavados de 5 min de TPBS e incubamos la membrana con el anticuerpo secundario correspondiente (Cell Signalling), durante una hora a temperatura ambiente. Estos se encuentran unidos a peroxidasa de rábano (HRP) y también se detallan en la **Tabla B2**. Tras dicha hora de incubación, volvemos a lavar con TPBS para retirar el exceso de anticuerpo secundario. Finalmente, para visualizar las proteínas marcadas, usamos el reactivo Pierce ECL 2 Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) que contiene el sustrato de la peroxidasa y, mediante el sistema de captación IQ LAS 4000 MINI GOLD, recogemos la señal quimioluminiscente producida, que será proporcional a la cantidad de proteína específica de la muestra. Por último, la intensidad de las bandas se cuantifica utilizando el software PCBAS v2.0.

13. DOT BLOT

Esta técnica permite la detección de conformaciones proteicas, sin necesidad de separar las proteínas por su tamaño, y en condiciones no desnaturizantes, de manera que se mantenga la integridad estructural de las mismas. Por tanto, para esta técnica, las proteínas se encuentran en un tampón isotónico no desnaturizante. Se coloca una gota de esta solución proteica, con el volumen y concentración adecuados, sobre una membrana de nitrocelulosa y su absorción hace que las proteínas interaccionen y se adhieran a ella. Se deja secar para asegurar su adhesión a la membrana, y se trata dicha membrana con el mismo procedimiento que se ha descrito para el WB (Apartado 12.2): bloqueo con leche durante 30-60 min a temperatura ambiente; incubación con el anticuerpo primario correspondiente, a 4°C durante toda la noche; incubación con el anticuerpo secundario correspondiente, a temperatura ambiente durante 1 hora; y, finalmente, revelado de la señal quimioluminiscente. Los anticuerpos utilizados se detallan también en la **Tabla B2**.

ANTICUERPO (clon/ nomenclatura)	PROTEÍNA / ANTÍGENO DIANA	ESPECIE HUÉSPED	DILUCIÓN TRABAJO	TAMAÑO BANDA	PROVEEDOR
Anticuerpos primarios					
82E1	Abeta	Ratón	1/6000	4,5 KDa (1-mer)	IBL
6E10	Abeta	Ratón	1/6000	4,5 Kda (1-mer)	Palex
OC	Abeta (Formas fibrilares)	Conejo	1/5000	86 kDa	Merck-Millipore
TAU46	Tau (total)	Ratón	1/1000	79 Kda	Cell Signalling
TAU12	Tau (total)	Ratón	1/1000	79 Kda	Merck-Millipore
AT8	Fosfo-tau (Ser199/202-Thr205)	Ratón	1/1000	79 Kda	Thermo Scientific
AT100	Fosfo-tau (Thr212-Ser214)	Ratón	1/1000	79 Kda	Innogenetics
AT180	Fosfo-tau (Thr231)	Ratón	1/1000	79 Kda	Thermo Scientific
PSD95	Proteína de Densidad Postsináptica	Conejo	1/1000	95 Kda	Cell Signalling
SINAPTOFISINA	Proteína de Densidad Presináptica	Conejo	1/1000	38 Kda	Synaptic Systems
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial	Ratón	1/5000* 1/20000*	~50 Kda	Sigma-Aldrich
bActina	Housekeeping protein	Ratón	1/10000	42 Kda	Sigma-Aldrich
GAPDH	Housekeeping protein	Conejo	1/1000	37 kda	Cell Signalling
Anticuerpos secundarios					
Anti-IgG conejo	Secundario (HRP)	Caballo	1/10000	-	Cell Signalling
Anti-IgG ratón	Secundario (HRP)	Cabra	1/10000	-	Cell Signalling

Tabla B.2. Relación de anticuerpos empleados para las técnicas de Western Blot y Dot Blot. Se detallan las características más relevantes de cada uno de ellos. *Dilución de anticuerpo usada para proteínas de ratones transgénicos; ** Dilución de anticuerpo usada para proteínas de muestras humanas.

14. RETROTRANSCRIPCIÓN

La retrotranscripción es el proceso por el cual obtenemos ADN complementario (ADNc) a partir de ARN mensajero (ARNm), gracias a la enzima transcriptasa inversa. El ADNc es una biomolécula mucho más estable que el ARN, por lo que nos permite un manejo más cómodo y seguro de la muestra. Este ADNc se consigue a partir de un molde de ARN en presencia de un cebador, mediante la actividad de la enzima transcriptasa inversa, que sintetiza una hebra de ADN complementaria y genera un híbrido ARN-ADN, el cual, por degradación del ARN, quedará como ADN monocatenario.

Para la reacción de retrotranscripción, partimos del RNA resuspendido en agua con DEPC (ver Apartado 10.1) y utilizamos el kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” (Applied Biosystem), que contiene los siguientes reactivos: mezcla de cebadores aleatorios (10X), mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTP) (25X), enzima transcriptasa inversa (50 U/μl) y tampón de retrotranscripción (10X), que asegura unas condiciones óptimas para el

funcionamiento de la enzima. La combinación de los reactivos del kit da lugar a una mezcla de reacción que se mezcla con nuestra muestra de ARNm en proporción 1:1, de manera que cada reactivo queda a una concentración final 1X y la enzima retrotranscriptasa a 2.5 U/ μ l. Por último, en un termociclador (MasterCycler Gradient, Eppendorf), se incuba durante 10 min a 25°C, para permitir la hibridación de los cebadores con sus secuencias complementarias, seguido de 2 horas a 37°C, para que tenga lugar la reacción de retrotranscripción y, en definitiva, sintetice el ADNc a partir del ARNm. Dicho ADNc obtenido se conserva a -20°C hasta su utilización.

Con el fin de comprobar que la cantidad de ADNc obtenida tras la reacción de retrotranscripción es la misma en todas las muestras, se lleva a cabo la amplificación de uno o varios genes *housekeeper* (ej. GAPDH, 18S, beta-Actina) y se comparan los niveles de este gen en todas las muestras.

15. qPCR EN TIEMPO REAL

15.1. Fundamento

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica muy utilizada en biología molecular debido a sus numerosas aplicaciones y a su gran sensibilidad. Se denomina RT-PCR cuando se parte de ADNc, obtenido a partir de ARNm mediante retrotranscripción (Apartado 14). A diferencia de otras técnicas convencionales de PCR, en estas PCR cuantitativas (qPCR) a tiempo real, el análisis de las muestras amplificadas se produce durante la misma reacción, monitorizando una señal fluorescente asociada al producto de PCR. En este sentido, la RT-qPCR es una técnica útil para la cuantificación de cantidades muy pequeñas de ARN. Para ello, se utilizan termocicladores que son capaces de amplificar y detectar la fluorescencia simultáneamente, como el termociclador de tiempo-real ABI-Prism 7900 (Applied Biosystems), utilizado en el presente trabajo. Este sistema combina un termociclador, un detector de fluorescencia y un software específico de amplificación.

El método utilizado para cuantificar la expresión de ARNm en este trabajo consiste en el uso de sondas de hidrólisis o sondas *Taqman*, que son sondas de hibridación específicas, es decir, permiten la detección exclusiva de secuencias específicas. Se tratan de oligonucleótidos de 20-24 bases de longitud, que se unen complementariamente a una secuencia interna dentro del fragmento de ADN a amplificar. Estas sondas están marcadas en el extremo 5' con un fluoróforo donador (*reporter*), como FAM, y en el extremo 3' con un aceptor o sustancia absorbente (*quencher*), que absorbe la fluorescencia liberada por el donador, normalmente TAMRA. De esta forma, el espectro de emisión del primero ha de solapar con el espectro de absorción del segundo. Mientras que la sonda está intacta, no se detecta fluorescencia ya que la energía se transfiere vía FRET (*Fluorescent Resonance Energy Transfer*) del fluoróforo de baja longitud de onda en un extremo (*reporter*) al fluoróforo de alta longitud en el otro extremo (*quencher*), apantallando la fluorescencia de baja longitud de

onda. Durante la fase de elongación, la sonda que ha hibridado con su secuencia complementaria va a estar unida a una cadena simple de ADN, y flanqueada por cebadores específicos de la secuencia estudio. Cuando la Taq-polimerasa alcanza la sonda, su actividad exonucleasa 5'-3' libera al fluoróforo donador, que comienza a emitir fluorescencia al estar separado del *quencher*. Esta fluorescencia es captada por el detector y su intensidad es proporcional a la presencia de secuencias diana en la muestra analizada.

Las reacciones de RT-PCR a tiempo real se caracterizan por el momento en el proceso de amplificación en el que la señal fluorescente se registra como estadísticamente significativa, distinguiéndose del ruido de fondo o fluorescencia *background*. A mayor número de copias iniciales, antes se detectará un aumento significativo en la fluorescencia (Ginzinger, 2002; Bustin, 2000, 2002). Este punto se define como ciclo *threshold* (C_t) y siempre ocurre durante la fase exponencial de amplificación. De esta forma la cuantificación no se afecta porque alguno de los componentes de la reacción se vuelva limitante, y los replicados muestran resultados uniformes y reproducibles. La señal registrada se normaliza con la fluorescencia de referencia o calibradores para permitir correcciones en las fluctuaciones de fluorescencia provocadas por cambios en la concentración o el volumen, y se obtiene un valor de C_t para cada muestra. Para la cuantificación de los niveles de ADNc, se ha utilizado el método de comparación de C_t (Ramos y col. 2006), usando un *housekeeper* (GAPDH, normalmente), como gen de referencia. Los valores de C_t fueron calculados con el software proporcionado por Applied Biosystems (SDS 1.7). Según este método, la cantidad de ADNc (unidades de expresión de la diana estudiada), normalizada con el housekeeper viene dada por la siguiente ecuación (Livak y Schmittgen, 2001): $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

15.2. Procedimiento

Se utilizaron sondas Taqman suministradas por Applied Biosystems, que ya han pasado previamente controles de calidad, garantizando la especificidad por la secuencia diana y la eficiencia de amplificación. Para llevar a cabo la RT-PCR utilizando estas sondas, preparamos la mezcla de reacción de la siguiente manera: 10 μ l de Taqman Gene Expression Master Mix (Applied Biosystem) (2X), 1 μ l de Taqman® Gene Expression Assay (Applied Biosystem) (20X), 8 μ l de agua milliQ y 1 μ l de ADNc. El vial comercial TaqMan® Gene Expresión Assay (20X) ("Sonda Taqman"), contiene los cebadores específicos del gen que se pretende cuantificar y una sonda Taqman MGB, marcada con FAM™ en el extremo 5' y el *quencher* en el 3'. La concentración dentro del vial es de 18 μ M para cada primer y 5 μ M para la sonda.

Una vez preparada esta mezcla de reacción en cada pocillo ($V=20\ \mu$ l), en placas de 96 pocillos, realizamos la amplificación en el ABI PRISM Sequence Detection Systems 7900, siguiendo el programa detallado en la Tabla B3, y el análisis de los resultados se realiza con el programa ABI Prism 7900 SDS Software. Las sondas Taqman utilizadas para cuantificar

la expresión de ARNm de los diferentes marcadores analizados en este trabajo se encuentran detalladas en la Tabla B4.

Tiempo y Temperatura			
Pasos iniciales		Desnaturalización	Hibridación/Elongación
Mantener	Mantener	40 Ciclos	
Activación de la Taq 2min - 50°C	Desnaturalización 10min - 95°C	15s - 95°C	1min - 60°C

Tabla B3. Programa predeterminado de amplificación para RT-PCR. En esta tabla se recogen las condiciones necesarias para realizar una PCR a tiempo real siguiendo el protocolo de Applied Biosystems.

Sonda Taqman (ratón)	Referencia	Sonda Taqman (ratón)	Referencia
GAPDH	Mm99999915_g1	IL6	Mm00446190_m1
18S	Mm03928990_g1	CCL2	Mm00441242_m1
GFAP	Mm01253033_m1	CD45	Mm01293577_m1
VIM	Mm01333430_m1	CLEC7a	Mm01183349_m1
TNFa	Mm00443258_m1	IBA1	Mm00479862_g1
iNOS	Mm00440485_m1	AQP4	Mm00802131_m1
IL1b	Mm00434228_m1	ALDH1L1	Mm03048957_m1

Tabla B4. Relación de sondas Taqman utilizadas para RT-PCR. Se indican las sondas Taqman (Applied Biosystems) utilizadas en el análisis de expresión de ARNm de ratón mediante RT-PCR.

16. MICROFLUIDIC CARDS

Para la medición simultánea de la expresión de varios genes de interés específicos de astrocitos en muestras histológicas de cerebro humano *post-mortem* se usaron las TaqMan® Array Cards, de Thermo Fisher Scientific. Se tratan de *microfluidic cards* prediseñadas de 384 pocillos, también llamadas *TLDA*s (*Taqman Array Microfluidic Cards*), que permiten realizar RT-PCR de varias sondas simultáneamente, seleccionadas previamente, para una o varias muestras a la vez. En este trabajo, se han utilizado dos formatos diferentes de estas placas o *microfluidic cards*.

En primer lugar, se usaron las *TaqMan™ Array Human Endogenous Control Panel*, que son *microfluidic cards* comercialmente prediseñadas para medir la expresión de 16 controles o *housekeepers* (**Tabla B5**), por triplicado, en 8 muestras (1 muestra por puerto de carga). Este formato nos sirve para poder realizar las pruebas necesarias con la finalidad de escoger los mejores genes controles en nuestras muestras, además de la concentración de ADNc más adecuada. En segundo lugar, se utilizaron *Custom TaqMan® Array Cards*, diseñadas con 32 genes específicos de astrocitos, previamente seleccionados, de interés en este trabajo (**Tabla B5**). Estos genes se miden por triplicado para cada muestra, y 4 de ellos son genes control o *housekeepers*, elegidos previamente. Este formato se caracteriza por tener 8

puertos de carga, donde se deposita la muestra (2 puertos de carga/muestra: 4 muestras/placa) (**Fig.B2**). El volumen de muestra para cada puerto de carga es de 100µl, que se prepara con 50µl de mastermix comercial TaqMan® (Thermo Scientific) y 50µl de ADNc. El ADNc utilizado proviene de las muestras humanas, siguiendo el protocolo descrito en los Apartados 10.1 y 14, y la concentración de ADNc utilizada puede oscilar entre 0,3 y 10 ng/µl, dependiendo del nivel de expresión de los genes diana.

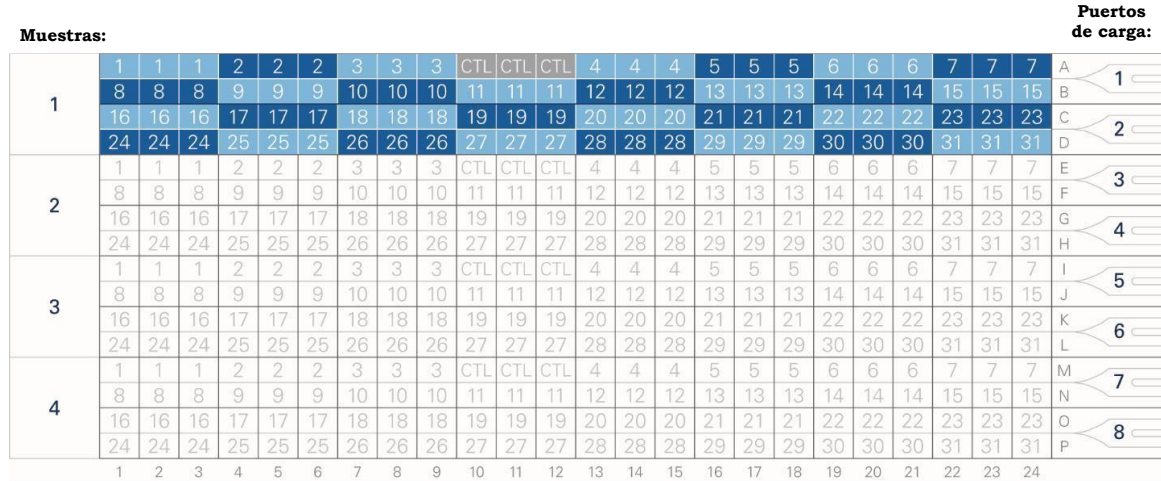


Figura B2. Esquema de una TaqMan® Array Card (Formato 32). Se trata de una placa con 384 pocillos prediseñada para medir la expresión de 32 genes, en 4 muestras diferentes. Cada muestra se carga en dos puertos de carga consecutivos (100µl/puerto de carga).

TaqMan™ Array Human Endogenous Control Panel		Custom TaqMan® Array Cards - ASTROCITOS			
Sonda	Referencia	Sonda	Referencia	Sonda	Referencia
18S	Hs99999901_s1	18S	Hs99999901_s1	APOE	Hs00171168_m1
ACTB	Hs99999903_m1	GAPDH	Hs02786624_g1	CLU	Hs00156548_m1
B2M	Hs99999907_m1	HPRT1	Hs99999909_m1	ABCA1	Hs01059137_m1
GAPDH	Hs99999905_m1	UBC	Hs00824723_m1	FGFR2	Hs01552918_m1
GUSB	Hs99999908_m1	GFAP	Hs00909233_m1	THBS3	Hs00938506_g1
HMBS	Hs00609297_m1	VIM	Hs00958111_m1	SPARCL1	Hs00949886_m1
HPRT1	Hs99999909_m1	S100b	Hs00902901_m1	GPC1	Hs00892476_m1
IPO8	Hs00183533_m1	AQP4	Hs00242342_m1	GPC4	Hs00155059_m1
PGK1	Hs99999906_m1	ALDH111	Hs01003842_m1	GPC6	Hs00170677_m1
POLR2A	Hs00172187_m1	CXCL10	Hs00171042_m1	C1S	Hs00156159_m1
PPIA	Hs99999904_m1	IL6	Hs00174131_m1	C1R	Hs00354278_m1
RPLP0	Hs99999902_m1	CCL2	Hs00234140_m1	C3	Hs00163811_m1
TBP	Hs99999910_m1	CXCL2	Hs00601975_m1	C4(a-b)	Hs00246758_m1
TFRC	Hs99999911_m1				
UBC	Hs00824723_m1				
YWHAZ	Hs00237047_m1				

Tabla B5. Relación de sondas humanas en las TaqMan® Array Cards utilizadas: TaqMan™ Array Human Endogenous Control Panel, con 16 genes housekeeper, y Custom TaqMan® Array Cards, con 26 genes específicos de Astrocitos.

Una vez preparadas las muestras necesarias, cada una de ellas se cargó en dos puertos de carga consecutivos, como se representa en la **Fig.B2**. Seguidamente, se centrifugó la placa de forma vertical en una centrífuga Sorvall ST40R (Thermo Scientific), a 1.200rpm durante 2min, para que toda la muestra se distribuya de manera homogénea en todos los pocillos, de manera que quedará 1µl de muestra por pocillo. A continuación, sellamos la placa y cortamos los puertos de carga. Finalmente, introducimos la placa en el equipo de RT-PCR Applied Biosystems® ViiA™7 (Applied Biosystems), y con el software ViiA7 RUO, seleccionamos el programa de amplificación (**Tabla B3**) y medimos el nivel de expresión de los distintos genes, de la misma manera que las qPCR convencionales (Apartado 15). Finalmente, mediante el programa SPSS (IBM SPSS statistics 24) analizamos estadísticamente los resultados obtenidos.

17. ESTUDIO TRANSCRIPTÓMICO (ARRAYS)

Para el estudio transcriptómico de los astrocitos frente a la patología Abeta o Tau, se utilizaron arrays de hibridación de Affymetrix (ThermoScientific), en el Servicio de Genómica y Secuenciación, del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS). Estos sistemas permiten detectar transcritos (ARNm) de genes codificantes, expresados por las células a analizar, para el estudio de su papel o participación en diversas funciones celulares y, en definitiva, en la patología de Alzheimer. Esta metodología permite, de una manera rápida y simple, el análisis de una extensa cobertura de genes a lo largo de todo el transcriptoma, lo que genera un rendimiento y una confianza de datos muy elevada, junto con un software de análisis de datos flexible.

Por un lado, se realizó un tratamiento de estimulación durante 4 horas, de la línea celular WJE, con distintas fracciones solubles (S1), que contienen Abeta y/o Tau hiperfosforilado solubles (protocolo descrito en el Apartado 7). Por otro lado, se aislaron astrocitos del cerebro de distintos modelos de la EA, con patología Abeta o Tau (protocolo descrito en el Apartado 4). En ambos casos, tras recoger las células, se extrajo su ARN, se cuantificó y se comprobó su integridad (RIN) (Apartado 10). Este ARN fue utilizado para el análisis transcriptómico mediante los array correspondientes de Affymetrix (ThermoScientific), como se detalla a continuación.

Para las células WJE estimuladas, dicho ARN se amplificó y marcó usando el kit GeneChip® WT PLUS Reagent Kit (ThermoScientific). La amplificación se llevó a cabo con 100 ng de RNA total, que fue cargado siguiendo los procedimientos descritos por el fabricante, en el manual del usuario (WT PLUS Reagent Kit User Manual). El ADNc amplificado se cuantificó, fragmentó y marcó para la hibridación en el **GeneChip® MoGene Array** (ThermoScientific), usando 5.5 µg del producto ADNc de cadena simple y siguiendo los protocolos descritos en el manual del usuario. Por otro lado, para los astrocitos aislados y debido a la baja concentración de ARN obtenido en estas muestras, éste se amplificó y marcó usando el kit GeneChip® WT PICO Reagent Kit (ThermoScientific). La amplificación se llevó a cabo con 5

ng de RNA total, que fue cargado siguiendo los procedimientos descritos por el fabricante, en el manual del usuario (WT Pico Reagent Kit User Guide). El ADNc amplificado se cuantificó, fragmentó y marcó para la hibridación en el **Clariom™ S Pico Assay mouse** (ThermoScientific), siguiendo los protocolos descritos en el manual del usuario. Por último, en ambos casos, el lavado, marcaje (GeneChip® Fluidics Station 450; ThermoScientific) y escaneo (GeneChip® Scanner 3000; ThermoScientific) se llevaron a cabo siguiendo también los protocolos descritos en el manual del usuario correspondiente. Finalmente, los datos se normalizaron usando el método RMA (*Robust Multi-Array*), y el análisis de expresión diferencial y de enriquecimiento en rutas se realizó usando el software TAC (*Transcriptome Analysis Console*; Affymetrix, ThermoScientific), el programa estadístico “R” y el sistema GSEA, mediante “gene ontology” (GO), entre otros.

18. INMUNOHISTOQUÍMICA

En colaboración con el laboratorio de la Dra. Antonia Gutierrez (Universidad de Málaga), se han realizado estudios mediante inmunohistoquímica del tejido hipocampal de distintos modelos de la EA, y de muestras *postmortem* de pacientes de Alzheimer. Las técnicas inmunohistoquímicas permiten detectar la presencia de moléculas de interés en el tejido de estudio gracias a la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo. Sin embargo, en la mayoría de los casos es necesario amplificar la señal para poder visualizarla fácilmente. En este trabajo, las secciones de cerebro de los diferentes animales o de las muestras *postmortem* de pacientes de Alzheimer, de diferentes edades o estadios Braak respectivamente, fueron siempre procesadas en paralelo, empleando las mismas soluciones en todas ellas para así minimizar las condiciones de variabilidad en el inmunomarcaje.

En primer lugar, con ayuda de un micrótopo de congelación (Leica, CM-1325), los cerebros fueron cortados en secciones coronales de 30-40 µm de grosor siguiendo el eje rostro-caudal. Estas secciones se recogieron de manera seriada en placas multipocillo (6-7 series por placa) que contenían PBS (0.1M) y 0,02% de azida sódica, para evitar el crecimiento de hongos, y se almacenaron a 4°C. La delimitación anatómica de la formación hipocampal se realizó siguiendo el atlas de Franklin y Paxinos para cerebro de ratón (Franklin y Paxinos, 2008) y un atlas de cerebro humano para las muestras *postmortem* de pacientes (Jürgen y col. 2008).

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

- Tratamiento con calor (anticuerpos para Abeta42, ALDH1L1, APP, AQP4, EAAT2): tras lavar las secciones con PBS (x3) para eliminar los restos de azida, se incubó el tejido en tampón citrato sódico (50mM, pH=6; Panreac), a 80°C durante 30 minutos. A continuación, se deja enfriar las secciones durante 10 minutos, se realizan 3 lavados en PBS y se procede con el protocolo general.

- Tratamiento con ácido fórmico (anticuerpos para beta-amiloide): tras lavar las secciones con PBS (x3) para eliminar los restos de azida, se incuba el tejido en ácido fórmico (Panreac) al 85% durante 5 minutos. A continuación, se realizan 3 lavados en PBS y se procede con el protocolo general.

En caso de utilizar el método de la peroxidasa para el revelado de la inmunorreacción (inmunoperoxidasa), como paso previo a la incubación en el anticuerpo primario, las secciones eran tratadas para evitar tinción de fondo no deseada. En primer lugar, se lava el tejido en PBS (x3) para eliminar los restos de azida sódica, se inactiva la peroxidasa endógena con una solución de H₂O₂ (Panreac) al 3% y metanol al 10% en PBS durante 20 minutos. Posteriormente, se vuelve a lavar con PBS (x3) y se bloquea la avidina, la biotina y las proteínas de unión a biotina que se encuentran en el tejido de manera endógena, mediante el kit de bloqueo de avidina-biotina (Vector Labs) durante 30 minutos en cada solución, con un paso intermedio de lavado en PBS. Seguidamente, se lava de nuevo con PBS y se incuba con el anticuerpo primario (ver apartado siguiente).

Nota: todos los pasos de incubación y lavado de la técnica inmunohistoquímica se realizaron con agitación constante (agitador de rotación circular Nahita 685 y asimétrico tridimensional Heidolph Polymax 1040). Además, todos los pasos de lavado fueron de 10 minutos cada uno.

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

18.1. **Marcaje inmunohistoquímico simple para microscopía óptica convencional**

En función del marcador a estudiar, se incuban las secciones a 22°C en agitación continua en uno de los anticuerpos primarios (**Tabla B6**) usando como diluyente PBS con 0,2% Tritón X-100 (Sigma-Aldrich) y 0,1% azida sódica. En aquellos casos en los que el anticuerpo estaba desarrollado en ratón, se realizó un paso previo de bloqueo con PBS, 0,2% de Tritón X-100 y BSA al 5% durante 30 minutos, con el objeto de minimizar reacciones inespecíficas. Tras la incubación con el anticuerpo primario, se realizan 3 lavados con PBS y se incuba el tejido, a temperatura ambiente, durante 70 minutos con el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente (**Tabla B6**), diluido en la misma solución que para el anticuerpo primario. Posteriormente, se vuelven a realizar 3 lavados con PBS y se incuba con una solución de estreptavidina (ExtrAvidin®; Sigma-Aldrich) durante 90 min. Esta solución se encuentra conjugada a la peroxidasa de rábano y se emplea a una dilución de 1/2000 diluida en PBS y 0,2% Tritón X-100. Finalmente, se realizan 3 nuevos lavados con PBS.

ANTICUERPO (clon/ nomenclatura)	PROTEÍNA / ANTÍGENO DIANA	ESPECIE HUÉSPED	DILUCIÓN TRABAJO	PROVEEDOR
Anticuerpos primarios				
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial	Pollo Conejo	1/2000 1/10000	Chemicon Dako
BLBP	<i>Brain-lipid binding protein</i>	Conejo	1/2000	Abcam
AQP4	Acuoporina 4	Conejo	1/1000	Sigma-Aldrich
EAAT2	Transportador de Glutamato 2	Conejo	1/10000	Abcam
IBA1	<i>Ionized calcium binding adapter molecule</i>	Conejo	1/1000	Wako
4G8	Abeta	Ratón	1/2000	Covance
MAP2	Proteína asociada a microtúbulos	Conejo	1/1000	Millipore
NeuN	Núcleo neuronas maduras	Ratón	1/1000	Chemicon
SINAPTOFISINA	Proteína de Densidad Presináptica	Conejo	1/500	Synaptic Systems
		Conejo	1/1000	Abcam
PSD95	Proteína de densidad postsináptica	Ratón	1/100	Millipore
APP	Proteína Precursora Abeta	Conejo	1/10000	Sigma-Aldrich
AT8	Fosfo-tau (Ser199/202-Thr205)	Ratón	1/1000	Thermo Scientific
Abeta42	Abeta42	Conejo	1/5000	Abcam
OC	Abeta oligomérico	Conejo	1/5000	Millipore
LC3B	<i>Light chain 3 ("b")</i>	Conejo	1/1000	Cell Signalling
Anticuerpos secundarios: inmunohistoquímica e inmunocitoquímica				
Anti-IgG Pollo	Secundario (M.O. campo claro)	Caballo	1/500	Vector Lab.
Anti-IgG Conejo	Secundario (M.O. campo claro)	Cabra	1/500	Vector Lab.
Anti-IgG Ratón	Secundario (Inmunofluorescencia)	Burro	1/500	NanoProbes
		Burro	1/1000	Molecular Probes
Anti-IgG Conejo	Secundario (Inmunofluorescencia)	Burro	1/500	NanoProbes
		Cabra	1/1000	Molecular Probes
Anticuerpos secundarios: inmunmarcaje para MET				
Anti-IgG Conejo	Secundario	Cabra	1/100	NanoProbes
Anti-IgG Cabra	Secundario	Conejo	1/100	NanoProbes
Anti-IgG Ratón	Secundario	Cabra	1/100	NanoProbes
Anti-IgG Cobaya	Secundario	Cabra	1/100	NanoProbes

Tabla B6. Relación de anticuerpos empleados en los estudios de inmunocitoquímica e inmunohistoquímica, para microscopía confocal y MET. Se especifica la especie del huésped en el que se han obtenido dichos anticuerpos, la dilución de uso y la casa comercial o proveedor, de cada uno de ellos.

Para visualizar la reacción de la peroxidasa, se incuban las secciones en una solución de revelado: 3-3´diaminobencidina tetrahidro-clorhídrico (DAB; Sigma-Aldrich) al 0,05% en tampón Tris clorhídrico 50 mM (Sigma-Aldrich), 0,03% de níquel sulfato amónico (Farmitalia Carlo Erba) y H₂O₂ 0,01% en PBS. La reacción proporciona un precipitado insoluble de color azul oscuro. Seguidamente, se montan las secciones sobre portaobjetos previamente gelatinizados y se dejan secar durante una noche. Y, por último, se procede a la deshidratación y montaje del cubreobjetos con DPX (Sigma-Aldrich).

18.2. **Marcaje inmunofluorescente múltiple para microscopía confocal**

Mediante microscopía confocal es posible realizar estudios de colocalización de distintos marcadores empleando diversas combinaciones de anticuerpos primarios. Los diferentes marcajes se ponen de manifiesto con anticuerpos secundarios y/o estreptavidinas acopladas a diferentes fluorocromos. Para ello, se realiza un protocolo similar al descrito anteriormente (Apartado 18.1), hasta la incubación del anticuerpo primario. Tras ello, se realizan 3 lavados con PBS y se incuba con el segundo anticuerpo primario durante el tiempo correspondiente. Seguidamente, si queremos realizar una inmunohistoquímica triple, se vuelve a lavar con PBS (x3) y se procederá a volver a incubar con un tercer anticuerpo primario durante el tiempo correspondiente.

Posteriormente, se realizan 3 lavados con PBS y se incuba con el primer anticuerpo secundario acoplado a un fluorocromo (ej. Alexa 488) durante 1 hora. Tras ello, 3 nuevos lavados con PBS y una nueva incubación con el segundo anticuerpo secundario (ej. Alexa 546) durante 1 hora. Lo mismo para un tercer anticuerpo secundario, en caso de querer una inmunohistoquímica triple, con la diferencia de que este último se usa biotinilado. Los anticuerpos secundarios utilizados se resumen también en la **Tabla B6**. Seguidamente, se realizan 3 lavados con PBS y se incuba con la estreptavidina fluorescente (Alexa 405, 1:1000; Molecular Probes) durante 1 hora. Finalmente, se realizan los 3 últimos lavados con PBS y se montan las secciones en portaobjetos gelatinizados.

En el caso de tejido de animales viejos, debido a la acumulación de gránulos de lipofuscina autofluorescentes, es necesario realizar un proceso de eliminación de autofluorescencia. Para ello, se sumergen los portaobjetos con las secciones en alcohol de 70° durante 5 minutos, a continuación, se añade la solución comercial *Autofluorescence Eliminator Reagent* (Millipore) durante 5 minutos y, por último, se realizan lavados con etanol de 70° para eliminar el exceso de producto. Por último, tras los últimos 3 lavados con PBS, se realiza el montaje con DABCO (Sigma-Aldrich) en los portaobjetos gelatinizados.

18.3. **Tinciones histológicas: Tioflavina S (ThioS)**

La Tioflavina S (ThioS) es una fluoresceína verde que se une de manera específica a los agregados fibrilares de beta-amiloide que tienen conformación de hoja plegada β , así como a los ovillos neurofibrilares. El protocolo empleado para llevar a cabo esta tinción fue el

siguiente (Bussière y col. 2004): se realizan 3 lavados del tejido en PBS y un lavado con agua destilada para, posteriormente, incubarlo durante 10 minutos, en oscuridad, en la solución de Tioflavina S (Sigma-Aldrich) 0.02% (p/v) en etanol 50%. A continuación, se realizan dos lavados en etanol al 50% y dos lavados con agua destilada, de 5 minutos cada lavado. A continuación, se montan las secciones sobre portaobjetos previamente gelatinizados y se deja secar unos minutos. Finalmente, se monta el cubreobjetos con DABCO y se conservan las muestras en oscuridad a 4 C.

18.4. **Obtención y procesamiento de imágenes de microscopía  ptica**

18.4.1. Imágenes de microscopía óptica de campo claro

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

18.4.2. Imágenes de microscopía de fluorescencia

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

Finalmente, las imágenes digitales fueron procesadas con el programa informático Adobe PhotoShop CS2, modificándose el tamaño y el brillo/contraste de la imagen completa en las ocasiones que se consideró necesario.

19. INMUNOFLUORESCENCIA PARA CÉLULAS DE CULTIVO

Las técnicas inmunocitoquímicas también permiten detectar la presencia de moléculas de interés en las células de estudio, gracias a la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo. En este trabajo, se han realizado estudios de visualización, colocalización y contaje de células, tanto en astrocitos como en neuronas primarias en cultivo. Estas células, ante diferentes tratamientos, fueron siempre procesadas en paralelo, empleando las mismas soluciones en todas ellas, para así minimizar las condiciones de variabilidad en el inmunomarcaje. Además, cabe destacar que, en todos los casos, se realizaron controles negativos para demostrar la especificidad de los anticuerpos empleados, realizándose de

manera paralela y omitiendo la incubación con los anticuerpos primarios. En ningún caso, los controles negativos presentaron inmunotinción, por lo que no existen uniones inespecíficas de los anticuerpos secundarios en las muestras estudiadas. A continuación, se describe el protocolo utilizado para la inmunotinción de las células de cultivo, usando marcajes múltiples, con anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromos y mediante microscopía confocal.

19.1. **Marcaje inmunofluorescente múltiple para células de cultivo**

Tanto los astrocitos primarios como las neuronas primarias, tras los tratamientos oportunos, fueron fijados con paraformaldehído (PFA) 4% (Scharlau), durante 20 min a temperatura ambiente. Tras ello, se realizaron 3 lavados con PBS y se mantuvieron a 4°C, en presencia de PBS + azida sódica 0.02%, hasta su posterior uso. Todos los lavados se realizan durante 10 minutos cada uno, mediante agitación suave. Sin embargo, las diferentes incubaciones (permeabilización, bloqueo y anticuerpos) se realizan en estático.

En primer lugar, para eliminar los restos de azida sódica, se realizan 3 lavados con PBS y, seguidamente, se lleva a cabo la permeabilización de las membranas celulares, para que los anticuerpos puedan acceder al interior celular. Esta permeabilización se realiza incubando las células, durante 1 hora a temperatura ambiente, con PBT [0.1% Tritón X-100 (v/v), en PBS]. Posteriormente, se realiza una incubación con la solución de bloqueo (5% BSA en PBT), durante 1-3 horas, a temperatura ambiente. Tras este bloqueo, procedemos a la incubación con los anticuerpos primarios, que se realizará en presencia de BSA 1% en PBT, con la concentración adecuada de anticuerpo primario (**Tabla B6**), durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizan 3 lavados con PBT y se procede a la incubación con los anticuerpos secundarios (**Tabla B6**), en presencia también de BSA 1% en PBT, durante 1 hora a temperatura ambiente. A partir de este momento, todos los pasos se realizan en oscuridad, ya que los anticuerpos secundarios llevan acoplados los fluorocromos. Después, se realizan 3 lavados con PBT y, en los casos en que se requiera visualizar los núcleos celulares, se realiza una tinción con el fluorocromo azul DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorhídrico), incubándolo a una concentración 1/2000 (0.05µg/ml) en PBS, durante 5 min a temperatura ambiente. Este fluorocromo se une de manera específica al ADN en aquellas regiones ricas en A-T. Finalmente, se realiza un lavado de 5 min con PBS y otro con H₂O milliQ, para eliminar las posibles sales que puedan quedar. Por último, se procede a realizar el montaje en un portaobjetos con el medio de montaje *Dako Fluorescent Mounting Medium* (Dako), y se mantienen estas muestras a 4°C, en oscuridad.

19.2. **Obtención y procesamiento de imágenes mediante Microscopía Confocal**

Las imágenes de fluorescencia mediante microscopía confocal fueron obtenidas con un microscopio confocal ZEISS LSM 710, del Servicio de Microscopía del Centro de Investigación Tecnológica e Innovación (CITIUS), de la Universidad de Sevilla. Se trata de un

microscopio óptico confocal que tiene acoplado un láser como fuente de iluminación, así como un sistema electrónico que permite la obtención de imágenes digitales. Se utilizó el software ZEN 2011 para la adquisición de imágenes. Por último, las imágenes digitales fueron procesadas mediante el programa informático ImageJ o FIJI, modificándose el tamaño y el brillo/contraste de la imagen completa en las ocasiones que se consideró necesario.

19.2.1. Cuantificación de neuronas

Para experimentos de toxicidad neuronal se realizan tratamientos de 24-48 horas sobre cultivos primarios de neuronas (Apartado 3.2), tras lo cual realizamos una inmunocitoquímica (ver Apartado 19), utilizando los anticuerpos MAP2 y NeuN (**Tabla B6**), ambas son proteínas específicas de neuronas. MAP2 es una proteína de citoesqueleto, que nos permite visualizar la neurona completa, con todas sus ramificaciones (neuropilo). NeuN es una proteína nuclear, y nos permite reconocer el núcleo neuronal. Con este marcaje somos capaces de visualizar específicamente las neuronas del cultivo que hemos tratado y cuantificarlas, para finalmente comparar el número de neuronas existente en cada condición, y estudiar el efecto tóxico o protector de cada uno de los tratamientos realizados.

Así pues, para la cuantificación del número de neuronas se utilizó la herramienta “Cell Counter” de ImageJ, en el que contamos las neuronas NeuN⁺/MAP2⁺. Por otro lado, para la cuantificación del neuropilo se realizaron 3 pasos consecutivos en ImageJ, para cada imagen: binarizar, eskeletonizar y medir el área MAP2⁺ ocupada por las ramificaciones de las neuronas, respecto al área total de la imagen.

19.2.2. Cuantificación de sinapsis

Para los experimentos sobre la integridad sináptica, se realizan tratamientos durante 5 horas sobre cultivos primarios de neuronas (Apartado 3.2), tras lo cual realizamos una inmunocitoquímica (ver Apartado 19), donde utilizamos los anticuerpos SINAPTOSIFINA y PSD95 (**Tabla B6**), que son proteínas pre y post-sinápticas, respectivamente. Así pues, aquellos puntos en que colocalizan ambos marcadores nos muestran las sinapsis, permitiéndonos su cuantificación. Para ello, se utilizaron dos plugins en ImageJ: “NeuronJ” y “SynaptCountJ”, éste último cedido amablemente por la Dra. Gadea Mata (Mata y col. 2016). En primer lugar, mediante “NeuronJ”, se trazan las diferentes ramas de las neuronas (dendritas) para dibujar la estructura completa de la neurona (**Fig.B3(A)**). A continuación, en el plugin “SynaptCountJ”, se utilizan las imágenes en los dos canales (rojo y verde) y el trazado anterior, para obtener la imagen común de los marcadores SINAPTOSIFINA (rojo), PSD95 (verde) y dendritas (azul) (**Fig.B3(B)**). Finalmente, se establece el *threshold* para todos los canales, que será constante para todas las imágenes analizadas, y se cuantifica el número de puntos en los que colocalizan los 3 canales, obteniendo un valor de densidad de sinapsis (número de sinapsis por cada 100µm de dendritas neuronales) (**Fig.B3(C)**).

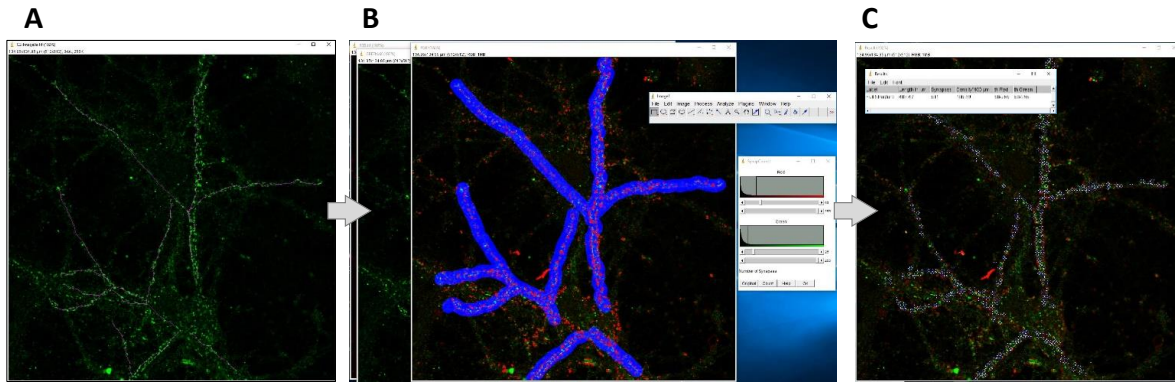


Figura B3. Esquema de los pasos a seguir para la cuantificación de sinapsis, mediante los plugins “NeuronJ” y “SynaptCountJ” en ImageJ. (A) Trazado de la estructura de la neurona (dendritas), mediante NeuronJ. **(B)** Imagen común de los canales rojo (Sinaptofisina), verde (PSD95) y azul (dendritas), y la selección del “threshold” para cada uno de los canales. **(C)** Resultados de la cuantificación del número de sinapsis (puntos de colocalización entre los 3 canales). B y C se realizan mediante el plugin “SynaptCountJ”, cedido amablemente por la Dra. Gadea Mata (Mata y col. 2016).

20. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET)

Para complementar los resultados obtenidos en el bloque 3 de Resultados, se han obtenido imágenes mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), en colaboración con el laboratorio de la Dra. Antonia Gutierrez (Universidad de Málaga).

20.1. Procesamiento de células en cultivo para MET

Tanto los astrocitos primarios tratados con neurosinaptosomas, como los propios neurosinaptosomas aislados (Apartado 9.1), son fijados con la solución de fijación [PFA 4% (Merck) + glutaraldehído 2.5% (Electron Microscopy Science)], durante 20 min a temperatura ambiente. Tras ello, se realizan 3 lavados con PBS y se mantienen a 4°C, en presencia de PBS + 0.02% azida sódica, hasta su posterior uso, como se describe a continuación. Todos los lavados se realizan durante 10 minutos cada uno, si no se indica lo contrario.

Así pues, con el fin de eliminar los restos de glutaraldehído y azida sódica, se realizan 3 lavados, y se procede a post-fijar las células con la solución de tetróxido de osmio 1% (Electron Microscopic Sciences) en tampón fosfato PB [NaH_2PO_4 0.1M + NaHPO_4 0.1M, pH 7.4], a 4°C durante 20 min y en oscuridad. A continuación, se realizan 3 lavados con PB y se tiñen las células con azul de toluidina [azul de toluidina 0.5% (p/v) (Farmitalia Carlo Erba) + $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0.5% (p/v) (Panreac)] durante 1 minuto, para poder visualizar y seleccionar, así, la zona del cultivo de mayor interés.

Cabe mencionar que el **azul de toluidina**, $(\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{ClN}_3\text{S})_2\text{ZnCl}_2$, también conocido como cloruro de tlonio, es un colorante de carácter básico ampliamente usado en histología, ya que tiñe la heterocromatina y la sustancia de Nissl de color azul. Este colorante presenta una propiedad conocida como *metacromasia* que permite que tenga color azul (colorante ortocromático), pero cuando se expone a estructuras ricas en grupos aniónicos es capaz de

virar hacia un color violeta-rojo (colorante metacromático). El azul de toluidina es el colorante empleado para teñir los cortes semifinos (secciones de 1µm de grosor aproximadamente) obtenidos por ultramicrotomía y que se encuentran incluidos en resina. El colorante se une a los ácidos nucleicos y a todas las proteínas, tiñéndose todo el tejido de color azul con los núcleos celulares marcados de un color azul más intenso. A pesar de que todas las estructuras resultan teñidas, es posible visualizar los detalles estructurales gracias a la delgadez de la sección.

A continuación, tras la tinción con azul de toluidina, las células se lavan nuevamente con PB, para eliminar el exceso de colorante y se procede a la deshidratación e inclusión en resina según el protocolo siguiente:

- Etanol 30°, 15 min
- Etanol 50°, 15 min
- Etanol 70° + Uranilo 1% (Idistec), 15 min
- Etanol 90°, 15 min
- Etanol 100°, 2 x 10 min
- Infiltración del cultivo en una mezcla de etanol 100° y resina (1:1), durante 1 hora
- Infiltración del cultivo en resina pura (*Durcupan*; Sigma-Aldrich), durante 1 hora, a temperatura ambiente.
- Inclusión en resina a 57°C, durante 72 horas, para permitir la correcta polimerización de la resina.

20.2. Montaje y tallado de las células incluidas en resina

Transcurridas las 72 horas para la polimerización de la resina, se desmolda la lámina de resina con las células en cultivo o los neurosinaptosomas incluidos y se selecciona y corta la zona de interés. Se pega con pegamento de secado rápido a un bloque de resina polimerizada, dejando secar a temperatura ambiente antes de pasar a realizar el tallado del bloque.

Una vez tenemos el bloque de resina con la muestra de células bien pegada, se monta todo en el soporte del ultramicrotomo en el cual vamos a realizar el tallado. Para ello usamos una cuchilla muy afilada y vamos retirando poco a poco distintas porciones tanto de resina como de tejido superfluo. El objetivo final de este procedimiento es obtener un bloque de resina en el cual tengamos una pirámide de base trapezoidal cuya cara superior sea toda la región de interés para nuestro estudio. El tamaño de la superficie de la muestra dependerá del tipo de corte que se vaya a realizar que, para microscopía electrónica, son ultrafinos (0,5 mm², aproximadamente).

20.3. Ultramicrotomía

Las muestras incluidas en resina, y preparadas tal y como se ha detallado anteriormente, han de ser cortadas para obtener los cortes semifinos y ultrafinos mediante el uso de un ultramicrotomo (Modelo Ultracut E, Reichert-Jung). Se realizan, en primer lugar, cortes semifinos (1 μm de grosor), que se tiñen con el colorante azul de toluidina para su observación al microscopio óptico. Con ello, lo que perseguimos es la determinación del área final de interés que vamos a volver a tallar antes de realizar los cortes ultrafinos.

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

20.4. Protocolo general de la técnica de inmuno-oro para MET (inmunomarcaje)

La técnica inmuno-oro para MET se trata de una técnica de inmunomarcaje con oro coloidal para microscopía electrónica. En primer lugar, se realizan 3 lavados con PBS. Solo en aquellos casos en que sea necesario para el anticuerpo primario, para aumentar o mejorar la exposición del antígeno a detectar (por ejemplo, anticuerpos para Abeta42, ALDH1L1, APP, AQP4, EAAT2), se realizó un pretratamiento con un tampón citrato sódico 50 mM (Panreac) pH=6, a 80°C durante 30 min, tras el cual se dejan enfriar las secciones (10 min) y se vuelven a realizar los 3 lavados con PBS. A continuación, se incuban las secciones en una solución de glicina 50 mM en PBS durante 5 min, a temperatura ambiente y con agitación, para romper los grupos aldehídos del fijador y facilitar la penetración del anticuerpo en el tejido. Seguidamente, se lava de nuevo 3 veces con PBS y, para aumentar la penetración del anticuerpo, se realiza un proceso de congelación/descongelación mediante el que se permeabilizan las membranas celulares, pero sin alterar la morfología de la célula a nivel ultraestructural. Para ello, se introducen las secciones en solución de crioprotección al 100%, durante 20 min a temperatura ambiente y, después, se mantienen en la misma solución crioprotectora durante 20 min a -80°C. Tras atemperar las secciones, se colocan ahora en soluciones de crioprotección [ázida sódica 0.02% (p/v) (Panreac), glicerol 10% (v/v) (Panreac), sacarosa 25% (p/v), en PB] diluidas en PBS de concentraciones decrecientes y a temperatura ambiente: al 100%, 70%, 50% y 30%, consecutivamente (10 min en cada una de ellas). Finalmente, se lava de nuevo con PBS.

Posteriormente, se pasan las secciones a la solución de bloqueo 1 [BSA 1% (p/v), azida sódica 0.1%, en PBS] y se mantienen durante 30 min a temperatura ambiente. Tras ello, se procede a la incubación con el anticuerpo primario (utilizando como diluyente la Solución de Bloqueo 1) durante 48 horas (**Tabla B6**). Por último, se lavan las secciones con PBS (x3) y se pasan a la solución de bloqueo 2 [BSA 0.8% (p/v), gelatina de pescado 0,1%, en PBS], durante 30 min. Se colocan las secciones en el anticuerpo secundario (**Tabla B6**) conjugado

con partículas de oro de 1,4 nm (Nanogold), a una dilución 1:100 (v/v) en solución de bloqueo 1 y se incuban durante una noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se lavan con la solución de bloqueo 2 (3x5min) y, seguidamente, con PBS (3x5min). Se post-fijan las secciones con glutaraldehído (2%) en PBS, durante 10 min, tras lo cual se lavan con agua destilada (2x3min), seguido de 3 lavados con citrato sódico 20mM, pH 7,0 (3x5min).

A continuación, se prepara el kit HQ Silver™ (intensificador de la señal) (Nanoprobes) usando cantidades iguales de cada uno de los tres componentes, añadiendo en último lugar la solución activadora, y se revela durante un tiempo variable entre 5-10 min. Este kit se vuelve inestable con la temperatura y precipita, por ello en función de la temperatura de la sala, el tiempo de revelado oscilará entre 5-10 min, pero en ningún caso se dejará más de 11 min. Posteriormente, se lava con agua destilada (2x3min) y con PB, durante 10min.

Después, se procede a realizar el virado al oro (*gold toning*), que es el proceso por el cual partículas de oro sustituyen a las partículas de plata manteniendo así la amplificación de la señal, pero evitando su eliminación por el tratamiento posterior con tetróxido de osmio, ya que el oro no se altera con este reactivo. Para ello, se incuba primero en una solución de cloruro de oro 0,05% en agua destilada, en condiciones de oscuridad, a 4°C durante 10 min, seguido de una incubación en tiosulfato sódico 0,3% en agua destilada, en las mismas condiciones de luz y temperatura (x2). Después, se lavan en PB (x3) y se tratan con la solución de tetróxido de osmio, a 4°C y oscuridad, durante 20 min. Finalmente, se continúa con el protocolo indicado en el Apartado 20.2.

20.5. Observación y obtención de las imágenes

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

21. MICROSCOPIA MULTIFOTÓN “IN VIVO”

21.1. Fundamento

La microscopía multifotón, o de doble fotón, es una potente herramienta que presenta múltiples ventajas respecto a otras técnicas de fluorescencia, particularmente sobre muestras cerebrales *in vivo* (Bacsikai y Hyman, 2002; Mostany y col. 2015): permite la obtención de imágenes durante un tiempo prolongado porque produce menor fototoxicidad; también permite una mayor profundidad de visualización del tejido cerebral, gracias a la alta penetración del haz de fotones; y, por último, todo ello conlleva una enorme resolución espacial, permitiendo la discriminación de células individuales e incluso de estructuras subcelulares. Así pues, la inmunofluorescencia *in vivo* puede extenderse a numerosos

epítomos accesibles en el cerebro, permitiendo la obtención de imágenes de diversas estructuras microscópicas y, con ello, el estudio tanto estructural como de procesos dinámicos en biología celular. Estas ventajas hacen, en conjunto, que esta técnica sea ideal para la visualización del tejido cerebral *in vivo* de manera crónica, lo que permite caracterizar la evolución de la patología en el cerebro de ratones modelos de la EA. Además, esta técnica permite desarrollar nuevas técnicas ópticas de alta resolución y aproximaciones no invasivas, así como la utilización de vectores virales, para la visualización de la anatomía, fisiología y activación glial, para poder estudiar su evolución temporal en esta patología.

Por tanto, se trata de una técnica novedosa y desafiante, que requiere el desarrollo de múltiples habilidades (Mostany y col. 2015): marcaje fluorescente de tejido, células y/o estructuras celulares, preparación quirúrgica para conseguir acceso óptico al cerebro de los ratones, y adquisición y procesamiento de imágenes. En resumen, con todas estas herramientas, el trabajo *in vivo* de esta Tesis Doctoral se ha basado en realizar inyecciones intracraneales de los vectores virales a nivel cortical, tres semanas antes de su visualización, para permitir su correcta expresión; la cirugía y colocación de una ventana craneal, que nos permite la visualización del tejido cortical y de la expresión del virus y, finalmente, la obtención de imágenes mediante un microscopio multifotón de fluorescencia *in vivo*. De esta manera, los experimentos se basaron en obtener imágenes *in vivo* de las mitocondrias de los astrocitos en estado basal, aplicar posteriormente Abeta soluble sobre la corteza cerebral expuesta (retirar ventana craneal, incubar con un medio condicionados con o sin Abeta soluble durante 1 hora y volver a colocar una nueva ventana craneal) y, finalmente, obtener nuevas imágenes posteriores al tratamiento. Así pues, con los vectores virales utilizados, podemos estudiar el estrés oxidativo y los cambios de niveles de calcio que se producen en las mitocondrias de los astrocitos en presencia o no de Abeta soluble. Cabe destacar que los medios condicionados utilizados, provienen de cultivos celulares de neuronas primarias, a partir de ratones APP/PS1 o WT, por lo que tenemos medios condicionados con y sin Abeta soluble, respectivamente. Esta aproximación experimental se ha llevado a cabo en el laboratorio del Dr. Brian Bacskai, durante una estancia predoctoral en el Massachusetts General Hospital (Harvard Medical School, EEUU).

21.2. **Marcaje fluorescente: inyecciones intracorticales**

Para la obtención de imágenes *in vivo*, los grupos celulares específicos se marcan con proteínas fluorescentes a través de distintos métodos genéticos. De hecho, existen gran variedad de marcajes fluorescentes para visualizar la estructura de neuronas y células gliales en el cerebro. Una de las técnicas más usadas son los métodos de transfección, mediante vectores virales, que permiten una gran variedad de abordajes experimentales y resulta de gran interés para desarrollar modelos muy específicos, de una manera relativamente fácil y rápida. A este respecto, los mejores resultados se han obtenido mediante la aplicación de vectores virales asociados a adenovirus (AAVs).

Para ello, en este trabajo, hemos utilizado determinados AAVs para el marcaje de las mitocondrias de los astrocitos presentes en la corteza cerebral de ratones WT (C57BL/6). Estos adenovirus, previamente sintetizados por el grupo del Dr. Bacsikai, fueron inyectados intracorticalmente, siguiendo el protocolo detallado a continuación. Cabe destacar que todo el procedimiento debe realizarse en condiciones de esterilidad, por lo que se realizó en un ambiente estéril y todas las herramientas utilizadas fueron esterilizadas con etanol 70% y a una temperatura de 200°C.

En primer lugar, se anestesian los ratones usando un sistema isoflurano/oxígeno, y se mantienen anestesiados durante todo el procedimiento. Se fija correctamente el ratón en un estereotáxico y se coloca sobre una manta calefactora, para mantener la temperatura corporal correcta del animal. Seguidamente, se le inyecta 0.1 ml de lidocaína (2%; VWR, Willard, OH) subcutáneamente (anestesia local), y se procede a limpiar la zona superior de la cabeza con betadine e isopropanol, para después, realizar la incisión a lo largo de la línea media (1-2 cm). Se elimina el periostio y se localiza Bregma y Lambda (**Figura B4**). Se limpia el cráneo y se mantiene húmedo en todo momento, con pequeñas esponjas estériles humedecidas con PBS estéril.

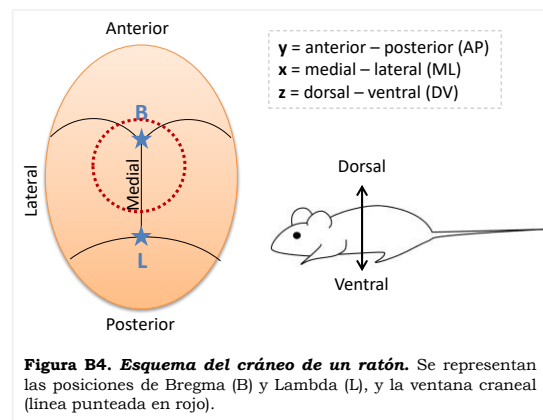


Figura B4. Esquema del cráneo de un ratón. Se representan las posiciones de Bregma (B) y Lambda (L), y la ventana craneal (línea punteada en rojo).

Posteriormente, se coloca la jeringa Hamilton en la estructura del inyector y se mueve hasta situar su punta justo sobre Bregma. Usando estas coordenadas, movemos dicha Hamilton, desde la posición de Bregma, hacia una posición AP= -1.5, ML= ± 1 (ambos lados de la línea media) y marcamos las posiciones, para realizar los pequeños orificios con ayuda de un pequeño taladro (VWR; Willard, OH). Una vez realizamos los orificios, ya podemos acceder a la corteza cerebral. Para ello, cargamos la Hamilton con el virus a inyectar y la introducimos en cada uno de los orificios, bajando hasta una posición DV= -0.8, dentro de la corteza cerebral. Una vez introducida la punta de la Hamilton, procedemos a inyectar el virus: volumen final de 3 μ l (en cada hemisferio), a una velocidad de 150-200 nl/min. Una vez hemos finalizado de inyectar el virus en ambas hemicortezas, procedemos a suturar la incisión, colocar crema antibiótica sobre ella, inyectar subcutáneamente 0.05 mg/Kg de burprenorfina (0.1 mL de 0.0125mg/mL en PBS) y retirar al ratón del estereotáxico y del sistema de anestesia. Le dejamos recuperarse sobre una manta calefactora a 37°C, con tilenol (analgésico) diluido en agua y comida (líquida y sólida).

En concreto, en este trabajo, se han usado adenovirus para el marcaje de astrocitos (bajo el promotor *GFAP*), en los que se ha estudiado los cambios en el estrés oxidativo (*roGFP*) y el aumento de calcio (*YC3.6*) en el interior de las mitocondrias (*2mt*) de dichas células, para lo que se han usado los siguientes vectores virales: AAV.GFAP.2mt.YC3.6 (biosensor de calcio)

y AAV.GFAP.mt.roGFP (biosensor de estrés oxidativo) (**Fig.B5**). Para poder cuantificar los cambios de estrés oxidativo (roGFP), se utilizan dos longitudes de onda de excitación (800nm y 900nm) (Esposito y col. 2017), y se detecta, en cada caso, la fluorescencia verde emitida. En el caso de los niveles de calcio (YC3.6), se utiliza una misma longitud de onda de excitación (860nm), pero se detecta la fluorescencia emitida en dos longitudes de onda diferentes (Miyawaki y col. 1997): cian (CFP) y amarilla (YFP). En ambos casos, la cuantificación es ratiométrica, y nos permite cuantificar aumento o disminución de estos parámetros sobre el estado basal.

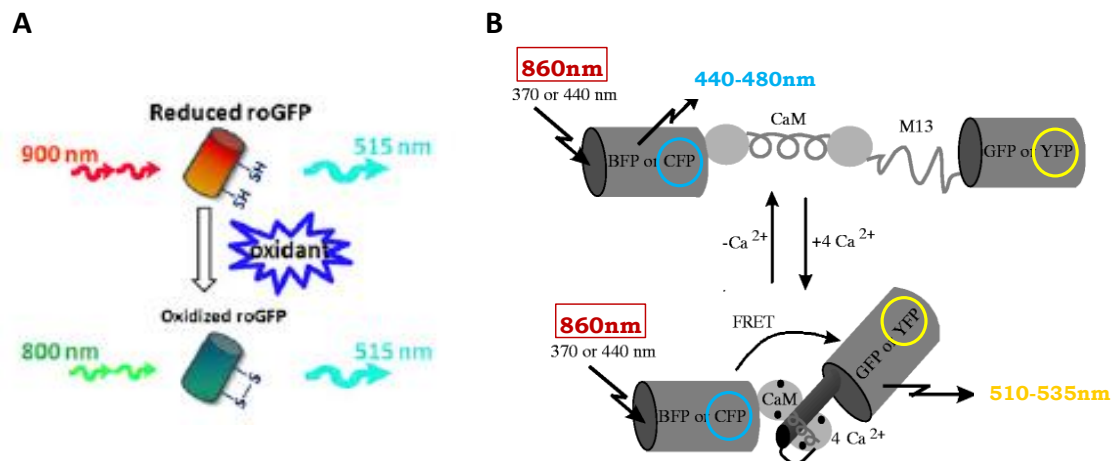


Figura B5. Estructura de los biosensores de estrés oxidativo roGFP (A) y de calcio YC3.6 (B). (A) Representación de la forma reducida y oxidada del biosensor roGFP, mediante excitación multifotón. El ratio de la fluorescencia de emisión tras ser excitado a 800nm y 900nm se usa como valor del estado de oxidación del roGFP y, por tanto, del estrés oxidativo. Imagen tomada de Xie y col. 2013. (B) Dominios que lo constituyen (CFP: proteína fluorescente cian; CaM: calmodulina; M13: *the calmodulin-binding domain of myosin light chain kinase*; YFP: proteína fluorescente amarilla). Se muestra el cambio de conformación que sufre este biosensor en presencia de altas cantidades de calcio, y las longitudes de onda de excitación y de emisión correspondientes. Imagen modificada de Miyawaki y col. 1997.

Por un lado, el biosensor de estrés oxidativo **roGFP**, es una modificación de la proteína GFP, en el que se han introducido cisteínas en sitios concretos, de manera que se convierte en un sensor muy sensible a los cambios de estrés oxidativo del entorno en que se encuentre (Lukyanov y Belousov, 2014). De esta manera, el biosensor roGFP tiene dos picos de excitación que corresponden a la forma protonada (-SH) y a la forma aniónica (puente S-S) de las cisteínas introducidas (**Fig.B5(A)**; Xie y col. 2013a). Así pues, la oxidación del roGFP resulta en cambios en el estado de protonación del cromóforo, aumentando la excitación de la forma protonada (400nm, o 800nm en el caso del multifotón) y disminuyendo la excitación de la forma aniónica (475nm, o 900nm en el caso del multifotón). Por lo tanto, se trata de un biosensor muy sensible a pequeños cambios en los estados de oxidación GSH/GSSG del entorno, y el “ratio 800/900” nos proporciona información sobre el aumento o disminución del estrés oxidativo del entorno en que se encuentre este biosensor.

Por otro lado, el indicador de calcio **YC3.6** tiene una estructura compuesta por los siguientes dominios (**Fig.B5(B)**; Miyawaki y col. 1997): la proteína fluorescente cian (CFP), calmodulina (proteína de unión a calcio), M13 (*the calmodulin-binding domain of myosin light chain kinase 2*) y la proteína fluorescente amarilla (YFP). En presencia de altas cantidades de calcio, éste se une a la calmodulina, que se activa y puede unirse a M13, produciéndose

un cambio de conformación de este biosensor. Esto permite que ambas proteínas fluorescentes, CFP y YFP, interaccionen de una manera mucho más cercana, de manera que puede ocurrir una transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET), lo que resulta en una menor emisión del CFP y una mayor emisión del YFP. Por lo tanto, cambios en el “ratio YFP/CFP” nos indican variaciones en los niveles de calcio del entorno en que se encuentra este biosensor.

21.3. Preparación quirúrgica: ventana craneal

Para conseguir tener acceso óptico al cerebro y poder obtener imágenes de las células o estructuras marcadas, existen dos preparaciones quirúrgicas diferentes: ventana craneal cubierta de vidrio o cráneo delgado. Con cualquiera de estos métodos, se puede lograr suficiente resolución espacial para poder incluso detectar espinas dendríticas individuales o botones axonales. En este trabajo, se han realizado ventanas craneales, siguiendo el protocolo que se describe a continuación. Al igual que ocurría con las inyecciones intracraneales, todo el procedimiento debe realizarse en condiciones de esterilidad, por lo que se realizó en un ambiente estéril y todas las herramientas utilizadas fueron esterilizadas con etanol 70% y a una temperatura elevada de 200°C.

En primer lugar, se procede de la misma manera que el procedimiento para las inyecciones intracraneales, explicado anteriormente (Apartado 21.2), hasta que tenemos el cráneo visible y limpio. Posteriormente, observando en todo momento a través de un microscopio, se marca el perímetro circular que vamos a taladrar, como se muestra en la **Fig.B3**, con un diámetro de unos 5 mm, por encima tanto de Bregma como de Lambda. Se comienza a taladrar el cráneo suavemente y de forma circular, con mucho cuidado, sin dañar el cerebro, hasta que se separe totalmente del resto de cráneo. Se levanta el fragmento circular de cráneo con mucho cuidado, manteniendo húmedo con PBS estéril en todo momento y cortando la hemorragia con las pequeñas esponjas estériles humedecidas en PBS en caso de sangrado. Mientras taladramos, hay que tener cuidado que el cráneo y el cerebro no se calienten demasiado, porque puede provocar inflamación. A continuación, con pinzas ultrafinas, eliminamos dura muy cuidadosamente, y mantenemos el cerebro húmedo en todo momento.

Cuando el tejido ha dejado de sangrar, colocamos la ventana craneal, que se trata de un pequeño cubreobjetos circular de vidrio de 8mm de diámetro (Warner Instrument; Holliston, MA), previamente esterilizado con etanol 70% y a 200°C. Para ello, el cerebro debe estar húmedo con PBS, sin burbujas, y el cráneo alrededor debe estar seco, para permitir una buena fijación con la mezcla acrílica. Una vez colocado el cubreobjetos de vidrio, se fija al cráneo mediante una mezcla acrílica, compuesta por unos 150 mg de cemento dental y 2-3 gotas de pegamento (Krazy Glue™), que se aplica alrededor del cubreobjetos circular y sobre la superficie del cráneo, para asegurarnos que la ventana craneal queda perfectamente

fijada al cráneo del animal. Finalmente, ya podemos proceder directamente a observar y adquirir imágenes mediante el microscopio multifotón.

21.4. Adquisición y procesamiento de imágenes

La adquisición de imágenes, en estereotáxico y previa anestesia con isoflurano, se ha llevado a cabo mediante un microscopio multifotón de fluorescencia *in vivo* OLYMPUS, y con el software OLYMPUS FLUOVIEW Ver.4.2 (FV0-AS 4.2).

Antes de comenzar a adquirir imágenes, inyectamos unos 0.3 ml de *dextran red* (Dextran fluorescein 70.000MW; Invitrogen) mediante inyección intravenosa, para poder visualizar fácilmente los vasos sanguíneos cerebrales y poder localizar las zonas de toma de imágenes, con el fin de volver a localizar las mismas poblaciones de astrocitos tras el tratamiento con Abeta. También es importante seleccionar y colocar los filtros adecuados para nuestros fluoróforos que, en nuestro caso, fueron el filtro “MRV GR/XR” para el roGFP, y el filtro “MRCYR/XR”, para el YC3.6.

En primer lugar, debemos limpiar bien la ventana craneal, aplicar un gel acuoso sobre ella y colocar el objetivo directamente sobre dicho gel. Mediante epifluorescencia, localizamos las zonas de inyección y expresión del adenovirus, y enfocamos adecuadamente. Posteriormente, establecemos las condiciones adecuadas en el software: modo de adquisición (4.0 $\mu\text{s}/\text{pixel}$), tamaño de imagen (512x512), zoom a utilizar, longitud de onda del láser (excitación) y poder del láser (no más del 30%, ya que puede ser dañino para el cerebro), rango del eje Z a medir (*Z-stack*) y detectores a utilizar (azul/cian, verde/amarillo y/o rojo, que va a depender del filtro colocado). Finalmente, procedemos a la adquisición de imágenes, en completa oscuridad.

Para el AAV.GFAP.2mt.YC3.6 (biosensor de calcio), utilizamos una longitud de onda del láser de excitación de 860nm, y detectamos la emisión de fluorescencia cian ($\lambda_{em}= 460-500\text{nm}$) y amarilla ($\lambda_{em}= 520-560\text{nm}$), correspondientes a los fluoróforos CFP y YFP, respectivamente. Para el AAV.GFAP.mt.roGFP (biosensor de estrés oxidativo), realizamos dos imágenes: en una de ellas, utilizamos una longitud de onda del láser de excitación de 800nm y, en la otra, de 900nm; en ambos casos, detectamos la emisión de fluorescencia verde ($\lambda_{em}= 495-540\text{nm}$). Para ello, es de suma importancia que el ratón se encuentre perfectamente fijado en el estereotáxico, de manera que no se produzca ningún ligero movimiento, debido a la respiración, y así poder, posteriormente, alinear perfectamente ambas imágenes (800nm y 900nm) y calcular su ratio. Por último, para la visualización de los vasos sanguíneos, en cualquiera de los casos mencionados, detectamos siempre la fluorescencia roja ($\lambda_{em}= 575-630\text{nm}$).

Por último, para el procesamiento y análisis de todas estas imágenes, se ha utilizado el programa ImageJ y varios scripts desarrollados en MATLAB, gracias a la alta tecnología de

la que disponen en el laboratorio del Dr. Bacskai. Así pues, se han calculado los ratios correspondientes a cada uno de los biosensores (ratio 800/900 ó ratio YFP/CFP), de cada una de las mitocondrias de los astrocitos visualizados, antes y después del tratamiento, obteniéndose histogramas representativos, que nos muestran los cambios en los niveles de calcio o en el estrés oxidativo de dichas mitocondrias.

22. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos llevados a cabo en este trabajo han sido repetidos un mínimo de 3 veces. El método de análisis estadístico varía según las muestras empleadas. El análisis estadístico se ha desarrollado con los programas Statgraphics v3.1, GraphPad Prism 5 y SPSS. Los análisis estadísticos de correlaciones entre variables se realizaron mediante el coeficiente de correlación de Pearson (para datos cuya distribución sigue la normalidad) o Spearman (datos que no siguen una distribución normal) seguidos por un análisis de regresión lineal.

En el estudio de las muestras humanas, los datos no siguen una distribución normal, por tanto, empleamos pruebas no paramétricas: *Kruskal-Wallis* para comparaciones múltiples o *Mann-Whitney* en comparaciones independientes entre dos grupos. Para aquellas muestras que se ajustan a una distribución normal, comparamos los datos mediante el test ANOVA (*one-way analysis of variance*), seguido del test de comparación múltiple *Tukey*, si comparamos varios grupos entre sí, o mediante el test “t de Student”, si se trata de dos poblaciones independientes. En aquellos datos que siguen una distribución normal, los resultados mostrados reflejan el valor medio de los experimentos realizados respecto al grupo control, representándose la media del grupo \pm la desviación estándar (SD). Los datos que no siguen una distribución normal han sido representados utilizando un diagrama de caja (*Box and whisker plot*) que refleja la mediana, el valor mínimo y el valor máximo de los datos representados. Con estas representaciones, podemos conocer la distribución que siguen los datos dentro de cada grupo.

En cualquier caso, consideramos la existencia de diferencias estadísticamente significativas cuando obtenemos un valor $p < 0,05$, mostrando el nivel de significación de la siguiente manera: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) o $p < 0,0001$ (****).

C. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

La enfermedad de Alzheimer, con más de 70 millones de afectados a nivel mundial (OMS 2017; Prince y col. 2016) y sin tratamientos farmacológicos efectivos, constituye en la actualidad uno de los problemas socio-sanitarios y económicos más importantes de nuestra época. La ausencia de terapias efectivas que modifiquen el curso natural de la enfermedad se debe, en parte, a la falta de buenos modelos animales y al desconocimiento de los complejos mecanismos patogénicos. La reproducción en modelos animales de las alteraciones proteicas típicas de la EA (acumulación de Abeta y formas fosforiladas de tau), ha sido poco útil para comprender el proceso neurodegenerativo en pacientes. Es más, las contradicciones entre los modelos y las muestras de pacientes explican el escaso éxito en la traslación de resultados al desarrollo de terapias eficaces en la clínica humana. Todo esto pone de manifiesto que existen otros mecanismos patogénicos sin resolver y, con ello, la necesidad de entender mejor los mecanismos de la enfermedad y de disponer de modelos animales que mimeticen mejor la patología de los pacientes. En este sentido, en los últimos años la respuesta neuroinflamatoria asociada a la patología de Alzheimer se ha propuesto como un proceso clave y complejo que podría aportar nuevas oportunidades terapéuticas para esta enfermedad.

El grupo de investigación en que se ha realizado esta tesis doctoral estudia desde hace años los mecanismos moleculares implicados en la EA, con objeto de identificar biomarcadores y dianas terapéuticas de interés. Uno de los principales objetivos actuales del grupo es descifrar el papel de la respuesta neuroinflamatoria, mediada por la microglia y los astrocitos. Entender la variedad de fenotipos que pueden adoptar las células gliales en función del estímulo patogénico y sus posibles alteraciones con la evolución de la patología resulta absolutamente necesario antes de poder abordar cualquier nueva estrategia terapéutica.

En la última década, se ha estudiado ampliamente el papel de la microglia en la progresión de enfermedades neurodegenerativas como la EA. El estudio de modelos transgénicos productores de Abeta, como el doble transgénico PS1_{M146}/APP_{751SL} caracterizado por nuestro grupo, desvelan que la microglia muestra una fuerte activación alrededor de las placas (Heneka y col. 2013, 2015a) que progresa con el avance de la patología amiloide (Drummond y Wisniewski, 2017). Así pues, nuestro grupo de investigación ha descrito una importante activación microglial tipo “M2” alrededor de las placas de Abeta desde edades tempranas, mientras que, a edades avanzadas, se produce también una activación microglial con fenotipo clásico “M1” en las regiones interplaca, expandiéndose por todo el parénquima, debido al aumento de oligómeros solubles de Abeta (Jimenez y col. 2008, 2011; Moreno-González y col. 2009).

Más recientemente nuestro grupo ha descrito que, a diferencia de lo que ocurre en los modelos transgénicos amiloidogénicos, en el hipocampo de los pacientes de Alzheimer existe una activación microglial muy limitada (exclusivamente rodeando las placas amiloides) y, lo

que es más importante, hay un proceso de degeneración microglial, con un patrón regional definido (giro dentado>CA3>CA1) (Sanchez-Mejias y col. 2016). Esta degeneración microglial se caracteriza por la presencia de microglía patológica con prolongaciones fragmentadas y distróficas y reducción del dominio microglial. Paralelamente, hay una disminución del número total de células microgliales, y, consecuentemente, de la protección inmunológica del hipocampo. Dicha degeneración microglial está mediada por formas tóxicas de tau (fosfo-tau), ausente en los modelos amiloidogénicos y se reproduce en el modelo animal ThyTau (Navarro y col. 2018; Gutierrez y Vitorica, 2018; Sanchez-Mejias y col. 2016; Hansen y col. 2017, Romero-Molina y col. 2018).

Además de la intervención de la microglia en la evolución de la patología de Alzheimer, la contribución de los astrocitos parece ser crucial (Heneka y col. 2015a; Heppner y col. 2015). En este sentido, se ha descrito que la progresión de la patología va acompañada de una activación astrogliar, caracterizada por la hipertrofia de las prolongaciones y la sobreexpresión de la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) (Osborn y col. 2016; Verkhratsky y col. 2016; Liddelw y Barres, 2017; Chen, 2018; Verkhratsky y col. 2010; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). Sin embargo, aún se desconoce si esta reactividad astrogliar es causa o consecuencia de la patología. A pesar de recientes resultados que apoyan la diversidad molecular y funcional de los astrocitos en el cerebro adulto (Haim y Rowitch, 2017; John Lin y col. 2017), se desconoce el mecanismo y la función de la activación astrogliar en condiciones patológicas. Tradicionalmente se le ha atribuido un carácter tóxico a la activación astrogliar en la EA; sin embargo, en la actualidad, está cobrando fuerza la hipótesis de una pérdida de la función protectora de los astrocitos con la evolución de la patología (Masgrau y col. 2017). Los astrocitos activos podrían participar en la patología de la EA mediante ganancia o pérdida de función, o incluso podrían tener funciones diversas en función del estado de la patología y de su localización. En este sentido, y de forma similar a la microglía, se ha propuesto que los astrocitos podrían adoptar diversos fenotipos funcionales dependiendo del contexto patológico (Zamanian y col. 2012; Liddelw y Barres, 2017). Por ello, resulta imprescindible caracterizar su función y su potencial patológico o neuroprotector con la evolución de la patología de Alzheimer.

El péptido Abeta parece ser uno de los desencadenantes de la activación astrogliar (Medeiros y LaFerla, 2013; Ugbode y col. 2017), aunque se desconoce el mecanismo de activación y su función. Por un lado, se ha demostrado que los astrocitos activos participan de manera más eficiente que la microglía en la fagocitosis de Abeta de las placas (Nielsen y col. 2010). Pero, por otro lado, secretan moléculas proinflamatorias en respuesta a los depósitos amiloides, causando así un efecto citotóxico perjudicial (Wyss-Coray y col. 2003; Heneka y col. 2005a; Medeiros y LaFerla, 2013; Xiao y col. 2014). También se ha asociado la astrogliosis reactiva a los ovillos intracitoplasmáticos de proteína Tau (Overmyer y col. 1999) e, incluso, se ha sugerido que la astrogliosis está más directamente asociada a tau que a Abeta (Serrano-Pozo y col. 2011b). No obstante, y a diferencia de lo que ocurre con la microglia, los astrocitos no

parecen sufrir procesos de degeneración en etapas avanzadas de la EA (Sanchez-Mejias y col. 2016). La modulación de la respuesta inflamatoria hacia un efecto neuroprotector en lugar de citotóxico podría constituir una buena diana terapéutica, por lo que la caracterización de la respuesta astrogliar durante la patología de la EA resulta necesaria. Es imprescindible, para ello, conocer los diferentes fenotipos funcionales que adquieren los astrocitos, así como la ganancia o pérdida de función en respuesta al péptido Abeta y/o a las formas fosforiladas de tau.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, nuestra **hipótesis de trabajo** propone que la progresión de la patología en la enfermedad de Alzheimer está asociada a una disfunción de las células gliales. En este sentido, es clave definir los perfiles funcionales (neuroprotector, neurotóxico y/o degenerativo) de la astrogliar durante el progreso de la enfermedad. Por tanto, el **objetivo principal** de esta Tesis es caracterizar la heterogeneidad morfológica y funcional de la astrogliar reactiva en el cerebro tanto de modelos transgénicos de EA, como de pacientes *postmortem*, y determinar su relación con la progresión de la patología. Para ello consideramos los siguientes objetivos específicos:

Objetivo 1. Estudiar la reactividad astrogliar asociada a Abeta y/o a las formas fosforiladas de tau. En primer lugar, realizamos una caracterización preliminar de la reactividad astrogliar en modelos animales productores de Abeta, de tau fosforilado, y en muestras *postmortem* de pacientes de Alzheimer.

Objetivo 2. Estudiar la respuesta *in vitro* de los astrocitos mediada por las formas solubles de Abeta y/o Tau fosforilado. Así pues, estudiamos la respuesta sobre un cultivo de astrocitos primarios de las formas solubles de Abeta y tau fosforilado, comparándolo con la respuesta de la microglía a ambas, y estudiando su efecto sobre la viabilidad neuronal y la integridad sináptica, considerados en última instancia como los responsables del déficit cognitivo de la patología de Alzheimer.

Objetivo 3. Estudiar el papel de los astrocitos en la fagocitosis de distrofias neuríticas procedentes de modelos de Abeta y Tau fosforilado. Se estudia la capacidad de los astrocitos de captar y procesar neurosinaptomas (distrofias neuríticas) con patología Abeta y Tau, comparando ambos. Además caracterizamos el estado de los astrocitos frente a los diferentes neurosinaptomas y la repercusión de su fagocitosis sobre otros tipos celulares, como la microglía o las neuronas.

Objetivo 4. Caracterizar el fenotipo de los astrocitos a nivel transcriptómico en modelos animales productores de Abeta y de fosfo-tau a distintas edades. Además, en colaboración con el laboratorio del Dr. Bacskaï, durante una estancia predoctoral en el Massachusetts General Hospital (Harvard Medical School, EEUU), también se aborda un estudio *in vivo* del efecto del Abeta soluble sobre los niveles de calcio y el estrés oxidativo en las mitocondrias de los astrocitos corticales. Por último, se comparan los resultados transcriptómicos de los

astrocitos en los distintos modelos murinos con las muestras humanas *postmortem* de pacientes de Alzheimer.

D. RESULTADOS

1. REACTIVIDAD ASTROGLIAL EN MODELOS ANIMALES Y EN PACIENTES DE ALZHEIMER

Existen numerosos estudios sobre el papel de la microglía en la progresión de la enfermedad de Alzheimer. Resultados recientes revelan que en cerebros de enfermos de Alzheimer coexisten una ligera activación microglial, mediada principalmente por Abeta (Jimenez y col. 2008, 2011), con una degeneración selectiva de células microgliales, mediada por fosfo-tau soluble (Sanchez-Mejias y col. 2016, Navarro y col. 2018), y sugieren que una respuesta neuroprotectora defectuosa o reducida de la microglía, podría estar asociada con el desarrollo de la patología (Navarro y col. 2018; Gutierrez y Vitorica, 2018; Hansen y col. 2017). Basándonos en estos antecedentes, en el presente trabajo estudiamos la respuesta de los astrocitos ante los eventos patológicos típicos de la EA (Abeta y fosfo-tau) y realizamos su caracterización molecular en distintos modelos animales de la enfermedad y en pacientes de Alzheimer.

1.1. Reactividad astrogial en distintos modelos de la EA

Tras comprobar que en el hipocampo de ratones APP aumentan los niveles de Abeta con la edad (**Fig.D1.1(A)**), y en el de ratones TAU P301S, las formas fosforiladas de tau (AT8) pero no tau total (TAU46) (**Fig.D1.1(B)**), analizamos en las mismas muestras los marcadores GFAP y Vimentina, específicos de reactividad astrocitaria. En ambos modelos, se produce un incremento significativo de GFAP, tanto a nivel de ARNm como de proteínas, que es más acusado en el modelo TAU (**Fig.D1.2(A)**). De manera similar se eleva la expresión de Vimentina (**Fig.D1.2(B)**).

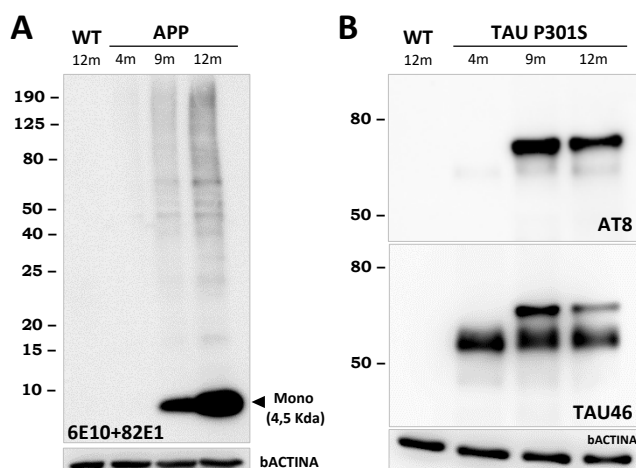


Fig.D1.1. Aumento de la patología Abeta o fosfo-tau en el hipocampo de modelos APP y TAU P301S, con la edad. Imágenes representativas del análisis mediante western blot de la cantidad de Abeta (anticuerpos 6E10 y 82E1) en el hipocampo de animales amiloidogénicos APP (**A**), y de la cantidad de fosfo-tau (AT8) y tau total (TAU46), en el hipocampo de animales TAU P301S (**B**). Se observa que ambas formas patológicas de dichas proteínas aumentan con la edad.

Paralelamente realizamos estudios inmunohistoquímicos con GFAP. Nuestros resultados muestran que en el hipocampo de ratones P301S aumenta el marcaje con GFAP a los 9 meses de edad, cuando la patología Tau se manifiesta, principalmente en la región CA1, pero también en el giro dentado (DG) (**Fig.D1.3**). Estos astrocitos muestran los cambios morfológicos característicos de la reactividad astrocitaria, con acortamiento de las prolongaciones y engrosamiento del soma.

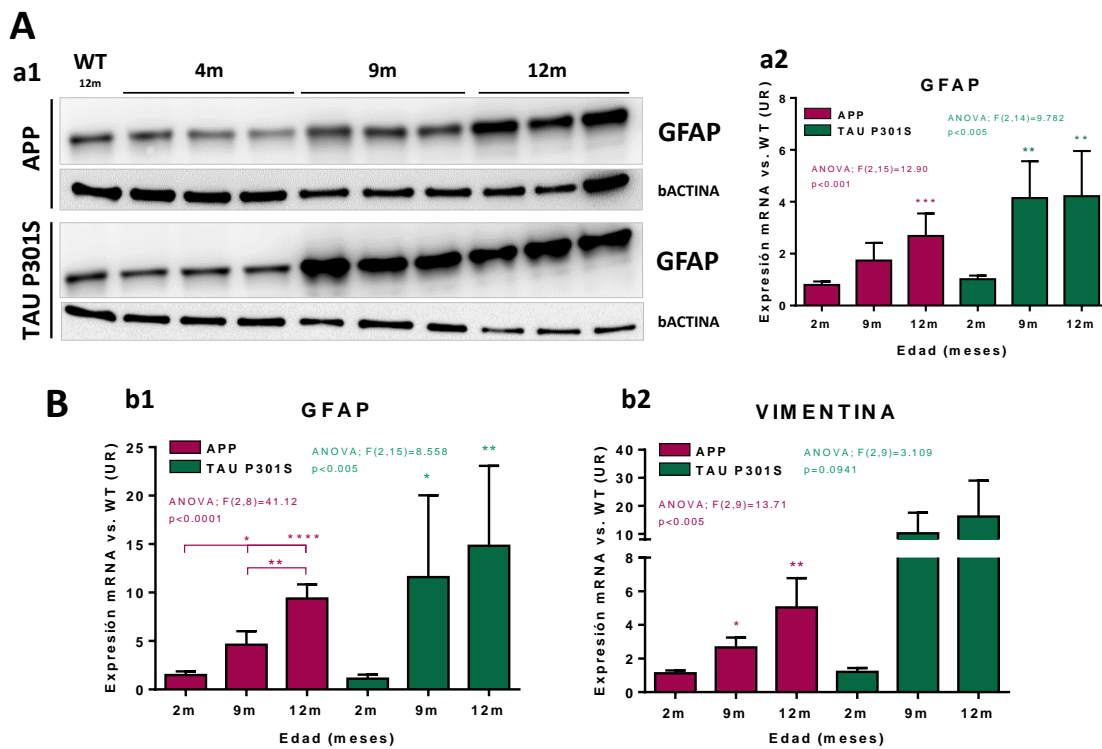


Fig.D1.2. La reactividad astrogliar aumenta en el hipocampo de modelos APP y TAU P301S. (A) Análisis (a1) y cuantificación (a2), mediante western blot del nivel proteico de GFAP, en el hipocampo de animales amiloidogénicos APP y de animales TAU P301S, a distintas edades (n=6/edad). (B) Cuantificación del nivel de expresión de los marcadores de astrogliosis GFAP (b1) y Vimentina (b2), mediante RT-PCR. Tanto a nivel proteico como de expresión, existe un aumento significativo de estos marcadores de reactividad astrogliar en los ratones APP y TAU P301S; similar al aumento en los niveles de Abeta o fosfo-tau correspondientes. La significancia se analizó mediante un test ANOVA, seguido del test de Tuckey, donde *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

En los ratones amiloidogénicos APP/PS1 también se produce un aumento gradual de la reactividad astrogliar con la patología amiloidea (Fig.D1.4, Gomez-Arboledas y col. 2017). La astrogliosis es más patente en las zonas cercanas a las placas de Abeta, donde los astrocitos muestran un fenotipo reactivo con morfología hipertrófica y procesos dirigidos hacia las placas. Debido a que la mayoría de los astrocitos del hipocampo expresan GFAP, utilizamos además un marcador específico de astrogliar reactiva, BLBP (Gotz y col. 2015). Nuestros resultados muestran una perfecta correlación entre la reactividad astrogliar BLBP-positiva y la carga amiloidea OC-positiva, principalmente en la región CA1 y en el DG (Fig.D1.4(b3)). Además, mediante microscopía confocal con doble marcaje, comprobamos que existe una relación íntima entre los astrocitos reactivos (marcados con GFAP, AQP4 y EAAT2) y las fibras amiloides (marcadas con ThioS) que constituyen los depósitos de Abeta (Fig.D1.4(C)).

Por tanto, estos resultados demuestran, en conjunto, que en el hipocampo de animales transgénicos modelos de la EA, existe un proceso de activación astrogliar asociado a las proteínas patológicas Abeta y tau fosforilado.

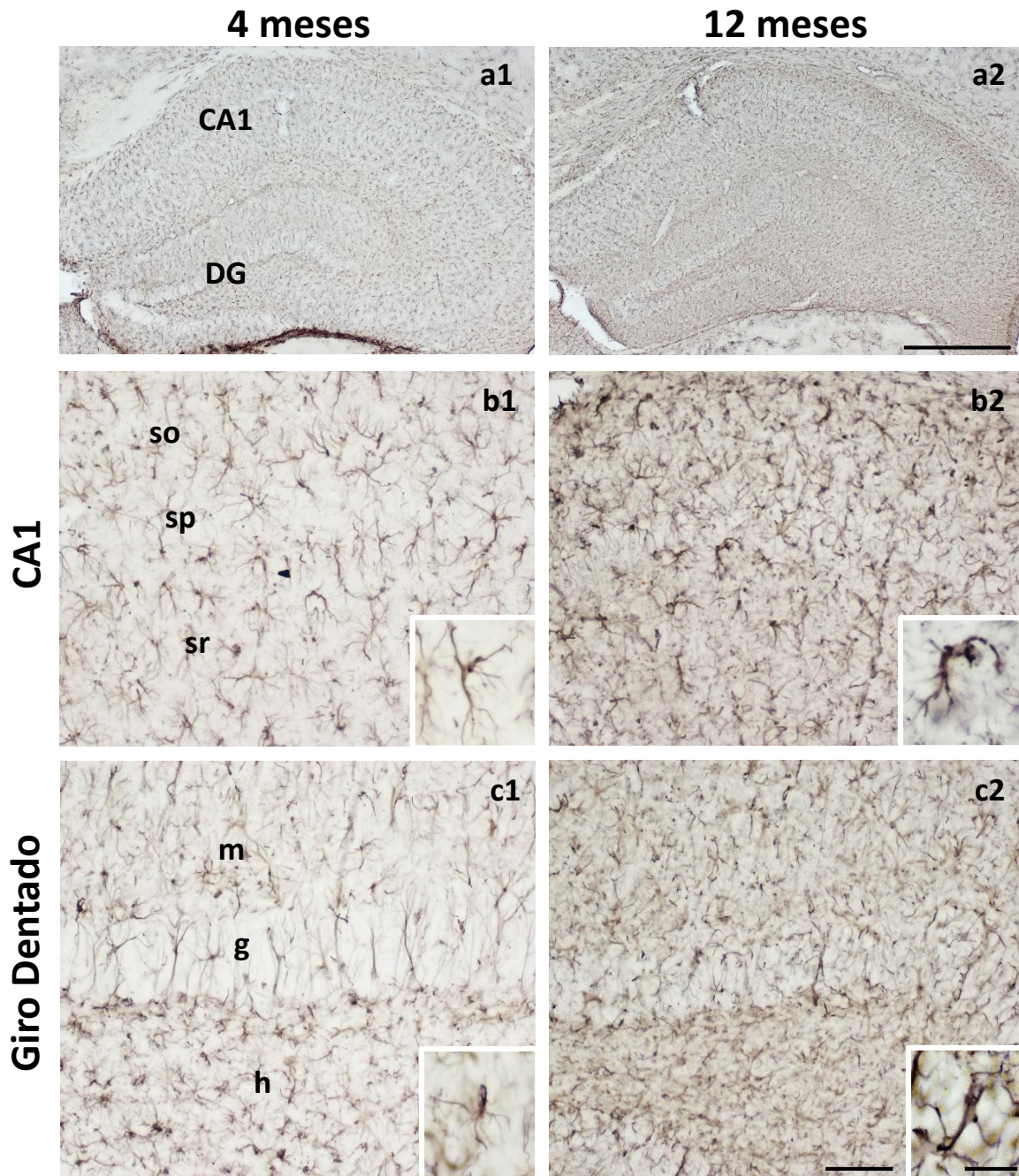


Fig.D1.3. Reactividad astrogliar en el hipocampo de ratones TAU P301S. Inmunomarcaje para GFAP en el hipocampo (a1-2) de ratones TAU P301S, a 4 y 12 meses de edad; donde se observa un aumento de la reactividad astrogliar con la edad, sobretodo en la región CA1 (b1-2), pero también en el Giro Dentado (c1-2). Los recuadros insertados en b1-2 y c1-2 muestran detalles de astrocitos GFAP positivos, con un mayor aumento, donde se observa el cambio morfológico de los astrocitos reactivos a 12 meses, respecto a 4 meses. DG: giro dentado; CA1: región CA1 del hipocampo; so: stratum oriens; sp: stratum piramidale; sr: stratum radiatum; m: capa molecular; g: capa granular; h: hilo del giro. Barras de escala: a1-2: 500 μ m, b1-2 y c1-2: 50 μ m; insertos: 20 μ m. Imágenes cedidas por el grupo de la Dra. Antonia Gutiérrez.

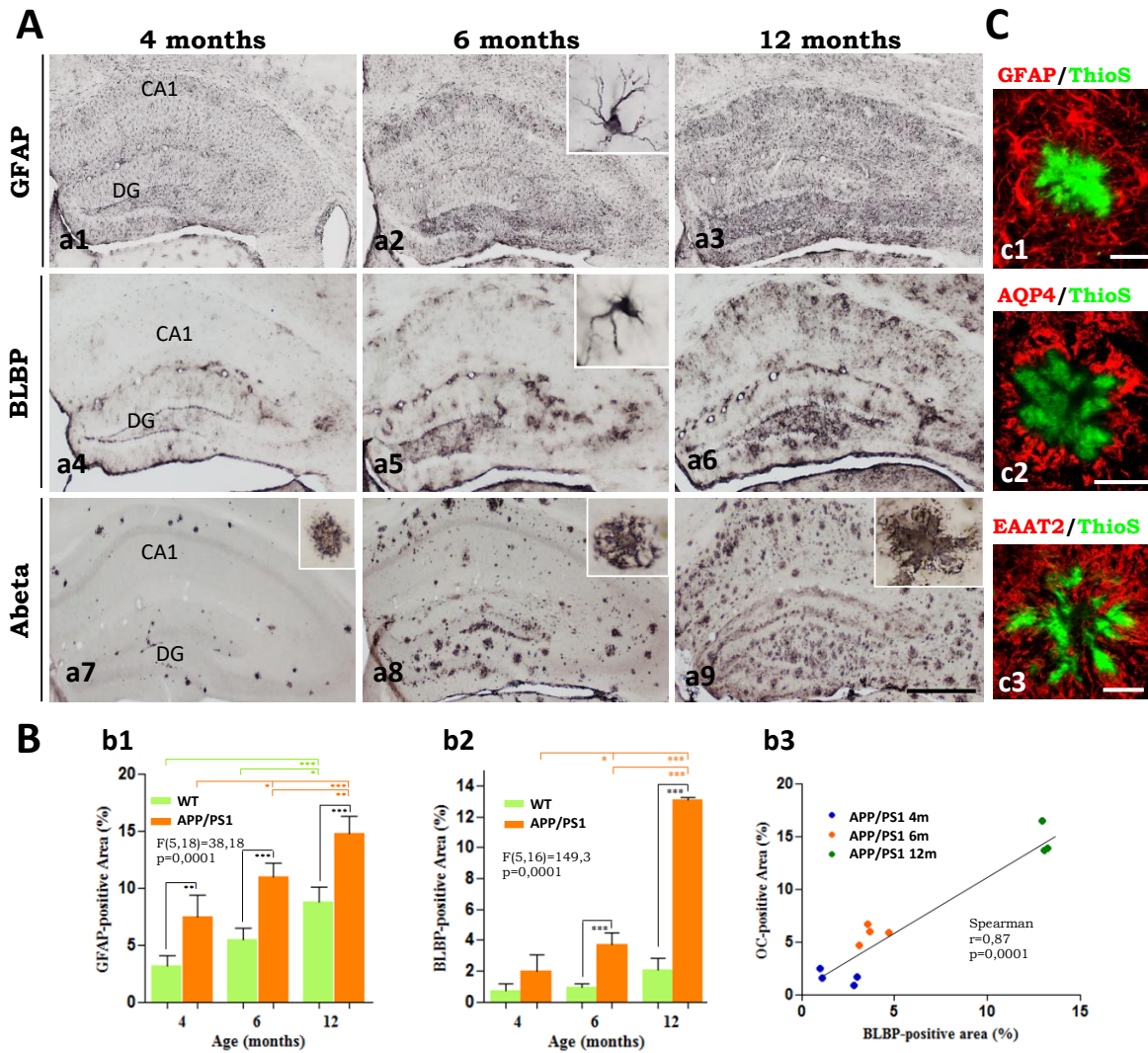


Fig.D1.4. La reactividad astrogliar progresa en paralelo a la patología amiloide en el hipocampo de ratones APP/PS1. (A) Inmunomarcaje para GFAP (a1-a3), BLBP (a4-a6) y OC (a7-a9) en el hipocampo de ratones APP/PS1 a 4, 6 y 12 meses de edad (n=4/edad). Los recuadros insertados en a2 y a5 muestran detalles de astrocitos GFAP y BLBP positivos, respectivamente, con un mayor aumento; y los insertados en a7-9 muestran detalles de placas OC positivas, con mayor aumento. El número y tamaño de las placas (marcados con el anticuerpo OC) aumentan gradualmente con la edad, al igual que la reactividad astrogliar (marcados con los anticuerpos GFAP y BLBP). (B) Análisis cuantitativo de las áreas GFAP-positivas (b1) y BLBP-positivas (b2) en la región CA1, que demuestra un aumento con la edad de la reactividad astrogliar, que es significativamente mayor en los ratones transgénicos comparados con los WT. El área BLBP-positiva muestra una buena correlación con la carga amiloide OC-positiva (b3). La significancia, obtenida mediante el test de comparación de Tukey, se muestra así: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,0001. (C) La íntima relación entre los procesos astrocíticos y las fibras amiloides se pueden observar mediante microscopía confocal con doble marcaje para GFAP-TioflavinaS (c1), AQP4-TioflavinaS (c2) o EAAT2-TioflavinaS (c3). DG: giro dentado; CA1: región CA1 del hipocampo. Barras de escala: a1-a9: 500 μm, c1-c3: 20 μm. (Gomez-Arboledas y col. 2017).

1.2. Reactividad astrogliar en muestras *postmortem* de pacientes de Alzheimer

Como paso previo, en muestras de hipocampo humano, cuantificamos los niveles de Abeta y de formas fosforiladas de tau y corroboramos que ambas proteínas aumentan significativamente en pacientes de Alzheimer (Braak V-VI) respecto a individuos en estadio Braak II (Fig.D1.5).

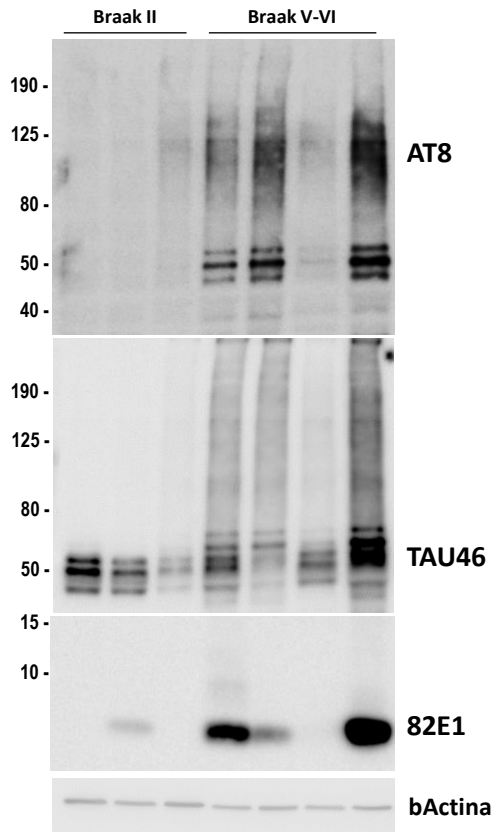


Fig.D1.5. Aumento de Abeta y fosfo-tau en el hipocampo de pacientes de Alzheimer. Análisis mediante western blot de la cantidad de fosfo-tau (AT8), tau total (TAU46) y Abeta monomérico (82E1), en el hipocampo de muestras postmortem de individuos clasificados según los estadios Braak. Se observa que las formas fosforiladas de tau y el Abeta monomérico aumentan en pacientes con Alzheimer (Braak V-VI).

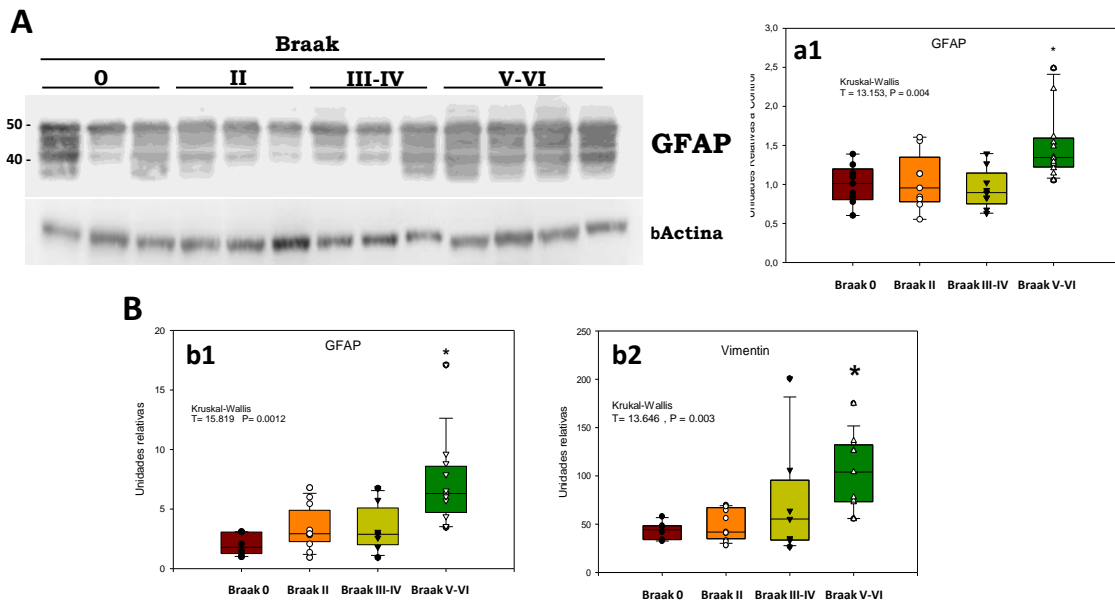


Fig.D1.6. La reactividad astrogliar aumenta en el hipocampo de pacientes de Alzheimer. Análisis **(A)** y cuantificación **(a1)** del nivel proteico de GFAP, mediante western blot, en el hipocampo de muestras postmortem de pacientes de Alzheimer (Braak V-VI, n=12), comparadas con controles (Braak 0, n=6) o estadios anteriores de patología tau (Braak II y Braak III-IV, n=9). **(B)** Cuantificación del nivel de expresión de GFAP **(b1)** y Vimentina **(b2)**, mediante RT-PCR, de las mismas muestras (Braak 0, n=6; II, n=13; III-IV, n=9; V-VI, n=18). Ambas medidas muestran un aumento significativo de los marcadores astrocíticos GFAP y Vimentina en pacientes de Alzheimer (Braak V-VI). La estadística se analizó mediante el test de Kruskal-Wallis, seguido de un test de Dunn. (Gomez-Arboledas y col. 2017).

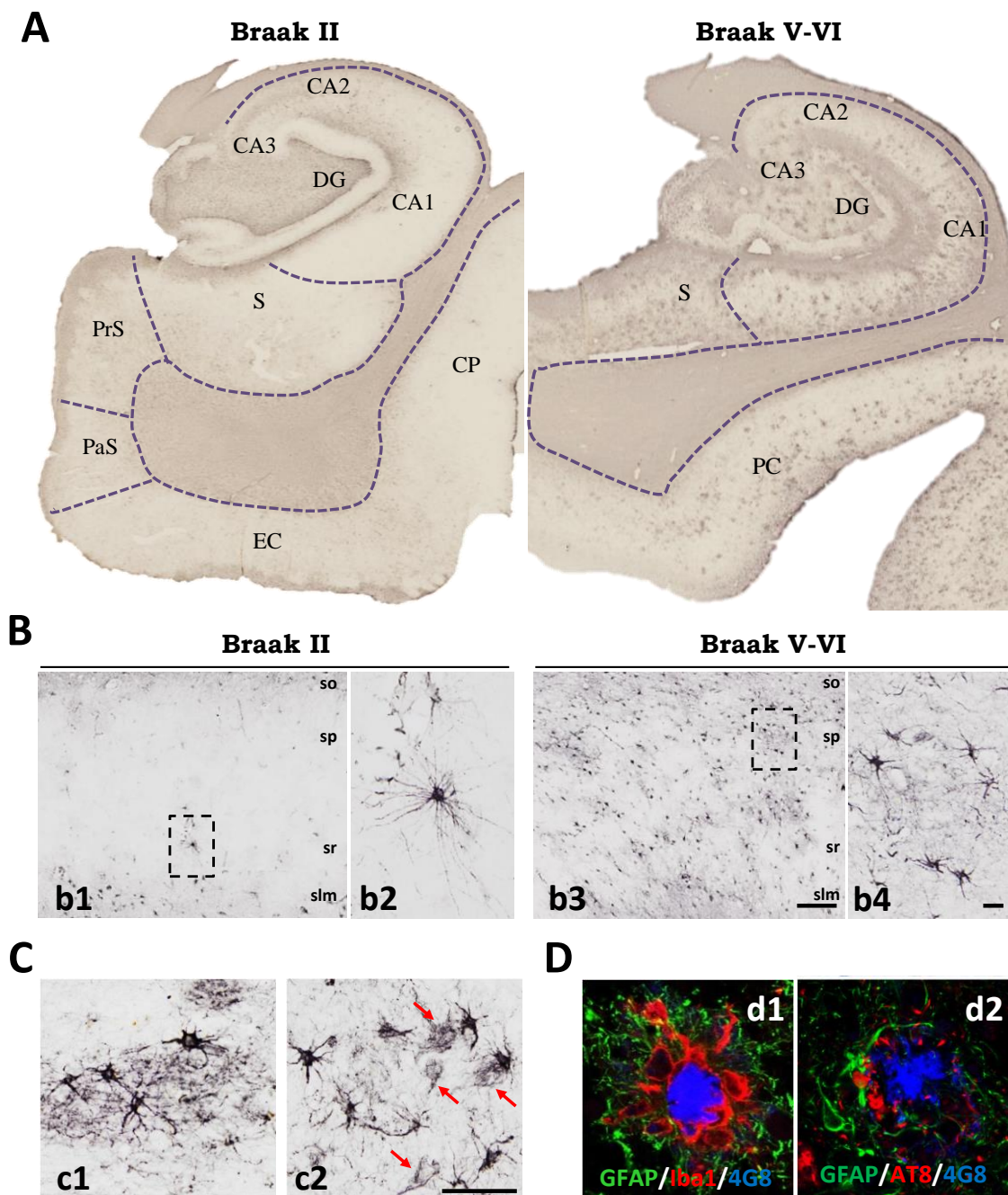


Fig.D1.7. Reactividad astrogliar en el hipocampo de pacientes de Alzheimer. (A) Inmunohistoquímica simple para el marcador astrogliar GFAP, que muestra un aumento generalizado de la densidad de células astrocitarias en el hipocampo de muestras humanas de pacientes de Alzheimer (Braak V-VI), comparados con los casos de estadios iniciales (Braak II). (B) Inmunohistoquímica simple para GFAP, de la región CA1 del hipocampo, donde se observa dicho notable incremento en la inmunorreactividad para GFAP (b3), asociada a los depósitos extracelulares de Abeta (b4). (C) Inmunohistoquímica simple para GFAP, donde se aprecia cómo las prolongaciones astrocitarias cicatrizan las lesiones producidas por Abeta (c1) y fosfo-tau (c2; las flechas rojas indican ovillos neurofibrilares o NFTs envueltos por procesos astrocitarios). (D) Inmunohistoquímicas triples mediante microscopía confocal, que muestran la relación de los astrocitos con las placas de Abeta: se observa (d1) la disposición de los astrocitos (GFAP positivos, verde) alrededor de las placas de Abeta (4G8, azul), junto con la microglía (Iba1 positivas, rojo); y (d2) la asociación, con detalle, de astrocitos (GFAP-positivos, verde) con depósitos extracelulares neuríticos de Abeta (4G8, azul), rodeado de distrofias AT8-positivas (rojo). CA: asta de Amón; GD: giro dentado; S: subículo; PrS: presubículo; PaS: parasubículo; EC: corteza entorrinal; CP: corteza perirrinal; so: stratum oriens; sp: stratum piramidale; sr: stratum radiatum; slm: stratum lacunosum-moleculare. Barra de escala: A: 2 mm; b1,b3: 500 μ m; b2,b4: 50 μ m; c1-2,d1-2: 50 μ m. Imágenes cedidas por el grupo de la Dra. Antonia Gutiérrez.

Seguidamente pasamos a estudiar la respuesta astrogliar en las mismas muestras. Nuestros resultados muestran que, en el hipocampo de pacientes de Alzheimer (Braak V-VI), se produce un aumento significativo en los niveles de ARNm y de proteínas de los marcadores de activación astrocítica GFAP y Vimentina, con respecto a los demás estadios (**Fig.D1.6**). Además, mediante estudios inmunohistoquímicos con GFAP visualizamos un aumento importante de astrocitos reactivos en el hipocampo de muestras Braak V-VI, respecto a Braak II, sobre todo en la región CA1 (**Fig.D1.7**). A mayor aumento, observamos astrocitos quiescentes con largas ramificaciones en muestras sin patología (Braak II), mientras que en muestras Braak V-VI los astrocitos presentan morfología típica de un fenotipo reactivo, con engrosamiento del cuerpo celular y retracción de las prolongaciones [**Fig.D1.7(b2 y b4, respectivamente)**], al igual que en los modelos murinos previamente analizados.

En la **Fig.D1.7(C)** se ilustra cómo estos astrocitos reactivos se concentran alrededor de los depósitos de Abeta y en torno a ovillos neurofibrilares. Además, los que rodean las placas de Abeta, están íntimamente relacionados con la microglía (Iba1 positivas) e incluso con las distrofias neuríticas asociadas a las placas (AT8 positivas) (**Fig.D-1.7(D)**), como hemos descrito en modelos animales amiloidogénicos de la EA (Gomez-Arboledas y col. 2017).

Por tanto, en el hipocampo de pacientes de Alzheimer existe una clara astrogliosis que progresa con la patología asociada a las placas de Abeta, y a los ovillos neurofibrilares y/o formas fosforiladas de tau. Estas observaciones sugieren un papel importante de los astrocitos en la patología del Alzheimer, que seguidamente tratamos de caracterizar.

2. RESPUESTA ASTROGLIAL “IN VITRO”: RESPUESTA INFLAMATORIA Y FUNCIÓN DE NEUROPROTECCIÓN

Basado en lo descrito en el apartado anterior, nuestro siguiente objetivo es caracterizar *in vitro* la respuesta de los astrocitos en presencia de formas solubles de Abeta y/o fosfo-tau, y compararla con la ejercida por las mismas formas sobre la microglía.

2.1. Caracterización de las fracciones solubles S1 aisladas de la corteza cerebral de ratones transgénicos y de muestras *postmortem* de pacientes de Alzheimer

Para los mencionados ensayos *in vitro*, utilizamos las fracciones solubles S1 aisladas de la corteza de distintos modelos murinos de la enfermedad (APP/PS1 y ThyTAU) y de muestras *postmortem* de pacientes de Alzheimer (ver Apartado 5, de Materiales y Métodos). En primer lugar, comprobamos que en las fracciones S1 del modelo APP/PS1 se produce un aumento gradual de Abeta soluble oligomérico (OC) con la edad, que alcanza el máximo a los 18 meses, por lo que elegimos dichas fracciones para los tratamientos *in vitro* posteriores (**Fig.D2.1(A)**). Paralelamente, en las fracciones S1 del modelo ThyTAU se produce un aumento gradual de formas fosforiladas solubles de tau (AT8, (**Fig.D2.1(B)**); para los

experimentos *in vitro* usamos las fracciones S1 de los animales de 12 meses, por ser las que acumulan la mayor cantidad de fosfo-tau soluble.

Seguidamente, caracterizamos las fracciones S1 procedentes de muestras humanas *postmortem*. Nuestros resultados muestran que dichas fracciones contienen Abeta oligomérico soluble (OC positivo), aunque sus niveles no aumentan significativamente en muestras de pacientes Braak V-VI al compararlos con estadios previos de Braak; sin embargo, en dichas muestras sí es significativo el aumento de Abeta total soluble cuantificado por ELISA (**Fig.D2.2**). Referente a Tau ocurre lo contrario: no varían los niveles de tau total en las fracciones S1 de individuos Braak V-VI, pero sí aumentan significativamente las formas fosforiladas (reconocidas por AT8 y AT100) de tau soluble. Cabe puntualizar que las cantidades de estas proteínas en las fracciones S1 de pacientes Braak V-VI esporádicos son considerablemente menores que en las procedentes de los modelos murinos, ya que estos modelos sobreexpresan dichas proteínas mutadas.

A continuación, utilizamos estas fracciones solubles para analizar *in vitro* la respuesta de los astrocitos frente a Abeta y/o fosfo-tau solubles, en experimentos de estimulación, toxicidad y funcionalidad, entre otros.

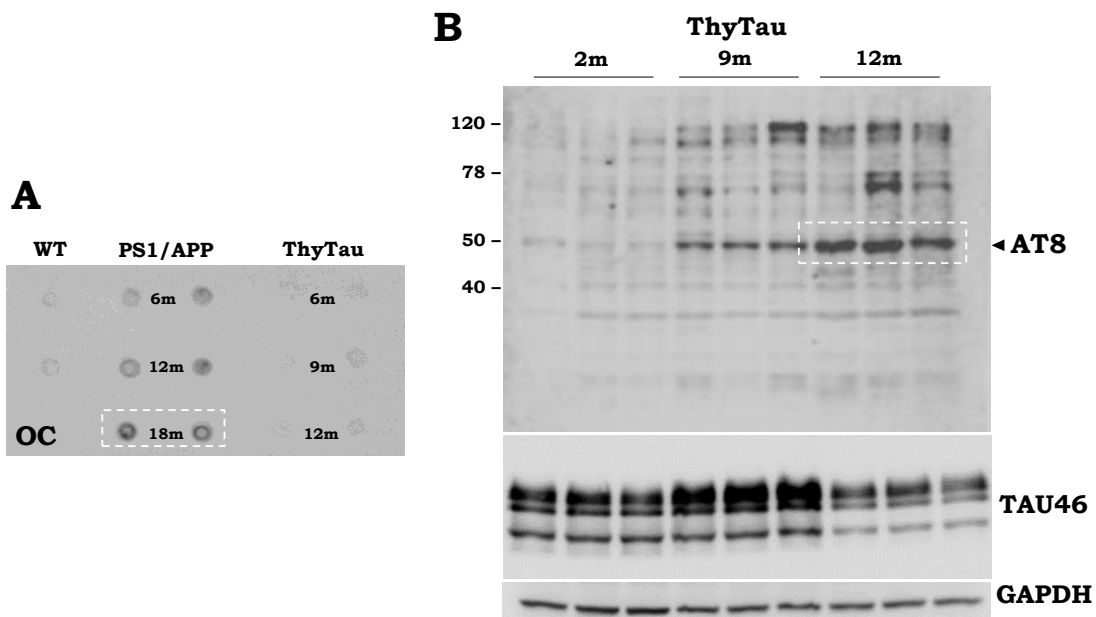


Fig.D2.1. Caracterización de las fracciones solubles S1 de modelos murinos de la EA, utilizados en los ensayos *in vitro*. (A) Análisis, mediante dotblot, de las formas solubles oligoméricas de Abeta (anticuerpo OC), en las fracciones solubles de ratones WT, APP/PS1 y ThyTAU, a distintas edades. Se observa que la fracción soluble de ratones APP/PS1 de 18 meses contienen la mayor cantidad de Abeta oligomérico soluble. (B) Análisis, mediante western blot, de las formas fosforiladas de tau (AT8) y la cantidad de tau total (TAU46), en las fracciones solubles de ratones ThyTAU de distintas edades. Se observa que la fracción soluble de ratones ThyTAU de 12 meses contienen la mayor cantidad de fosfo-tau soluble (AT8). (Sánchez-Mejías y col. 2016).

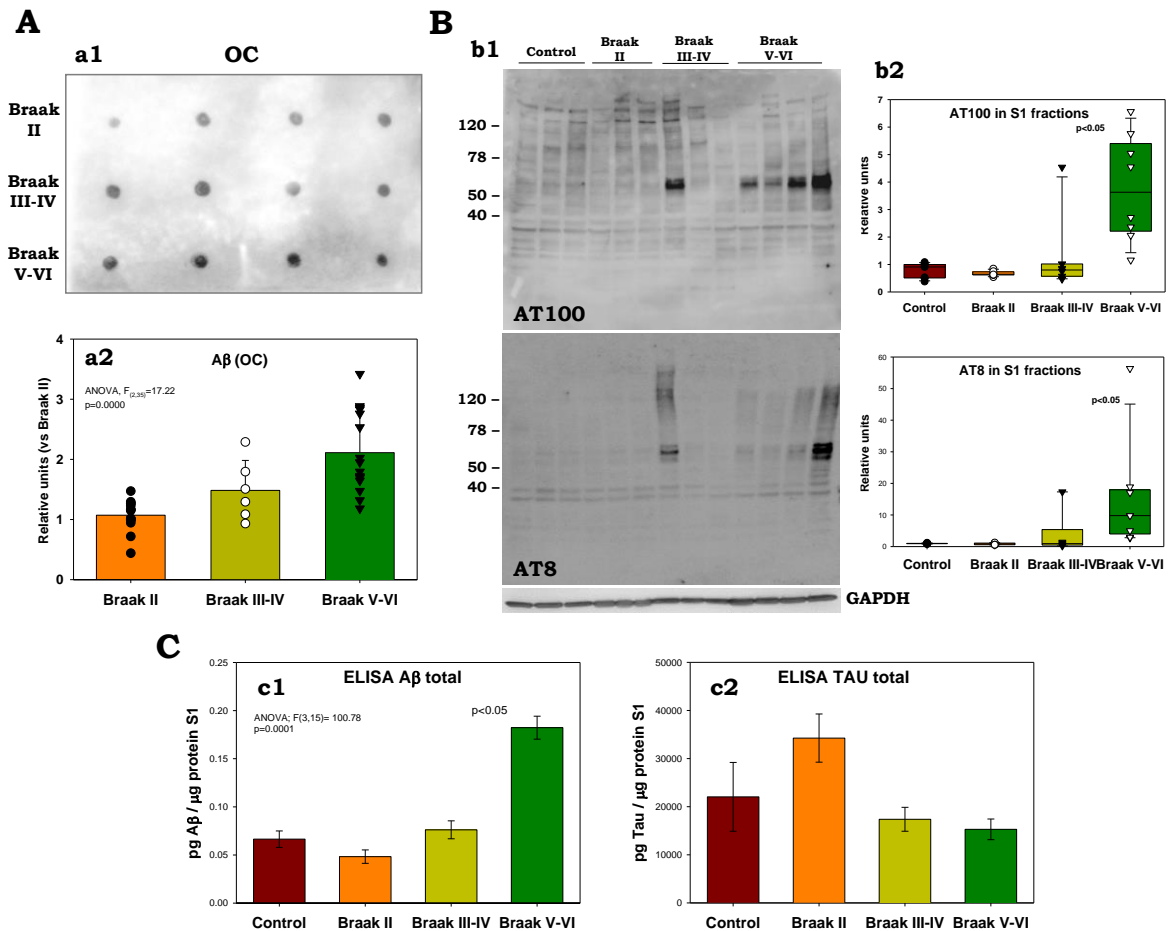


Fig.D2.2. Caracterización de las fracciones solubles S1, de muestras humanas postmortem, utilizados en los ensayos in vitro. (A) Análisis, mediante dotblot (a1), y cuantificación (a2) de las formas solubles oligoméricas de Abeta (anticuerpo OC), en las fracciones solubles de muestras humanas postmortem, clasificadas en función de los estadios de Braak. (B) Análisis, mediante western blot (b1), y cuantificación (b2) de las formas fosforiladas de tau (anticuerpos AT100 y AT8), en estas fracciones solubles. (C) Cuantificación, mediante ELISA, del Abeta total y del Tau total, en las fracciones solubles de dichas muestras. Se observa un aumento significativo tanto de Abeta total soluble, que no se observa significativamente en Abeta oligomérico, como de formas fosforiladas solubles de tau en las fracciones S1 de Braak V-VI, aunque la cantidad de Tau total no aumenta. (Sánchez-Mejías y col. 2016).

2.2. Las formas solubles de Abeta y/o tau fosforilado no producen toxicidad en la población astrogliar

Estudios previos de nuestro grupo de investigación han demostrado que las formas solubles de tau fosforilado presentes en las fracciones S1 de ratones ThyTAU de 12 meses o de individuos Braak V-VI son tóxicas para la microglía (Sanchez-Mejias y col. 2016). Contrariamente, las fracciones S1 de animales viejos APP/PS1 producen activación microglial mediada por Abeta oligomérico soluble, pero no degeneración (Jimenez y col. 2008, 2011).

Basándonos en estos antecedentes, en el presente trabajo estudiamos el efecto de estas fracciones solubles sobre los astrocitos. En primer lugar, realizamos ensayos de toxicidad. Para ello, tratamos los astrocitos durante toda la noche en ausencia de suero con las distintas fracciones solubles S1, tras lo que cuantificamos mediante citometría de flujo el

porcentaje de células viables, apoptóticas y necróticas (ver Apartado 7, de Materiales y Métodos). Como se observa en la **Fig. D2.3**, ni el Abeta oligomérico ni las formas fosforiladas de tau solubles son tóxicas para los astrocitos.

Por tanto, las formas de fosfo-tau tóxicas para la microglía no lo son para los astrocitos, lo que nos permite descartar un proceso de degeneración astrocitaria mediado por las proteínas patológicas solubles presentes en el cerebro de pacientes de Alzheimer.

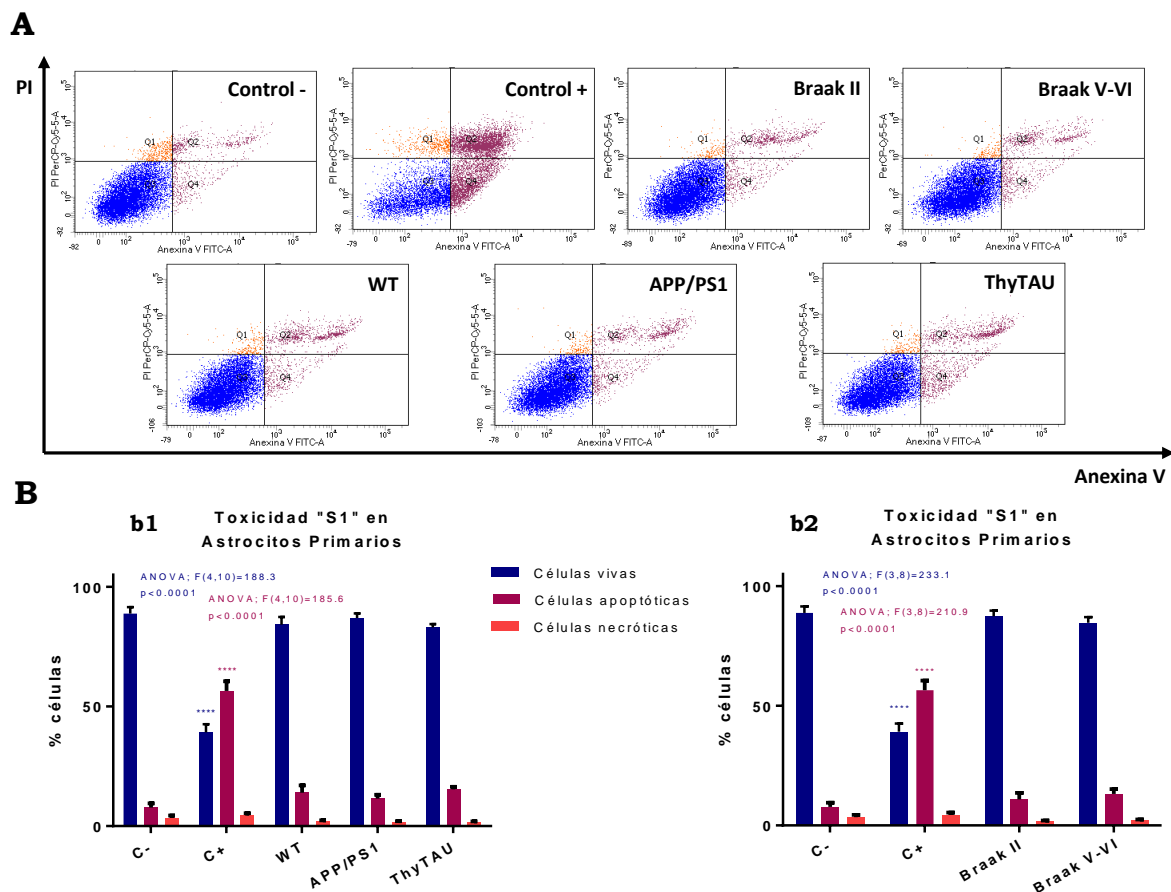


Fig.D2.3. Ensayos de toxicidad de las distintas fracciones solubles S1 en astrocitos primarios in vitro. (A) Imágenes representativas del análisis, mediante citometría de flujo, de las células viables (azul; AnnexinaV⁺/PI⁻), células necróticas (naranja; AnnexinaV⁺/PI⁺) y células apoptóticas (rojo): células en apoptosis temprana (AnnexinaV⁺/PI⁻) y en apoptosis tardía (AnnexinaV⁺/PI⁺). **(B)** Cuantificación y representación gráfica del porcentaje de astrocitos viables, apoptóticos y necróticos ante el tratamiento con las distintas fracciones solubles S1 procedentes de modelos murinos (b1; WT, APP/PS1 de 18 meses o ThyTAU de 12 meses), o de muestras humanas (b2; Braak II y Braak V-VI). Se usó la *estaurosporina* como control positivo de apoptosis. Ni el Abeta oligomérico soluble ni las formas fosforiladas de tau, presentes en las distintas fracciones solubles S1, son tóxicos para los astrocitos. La estadística se analizó mediante el test ANOVA, seguido de un test de Tukey (****p<0.001; n=3).

2.3. Caracterización transcriptómica de los astrocitos, ante un tratamiento agudo con formas solubles de Abeta y/o tau fosforilado

Una vez que comprobamos que los astrocitos resisten al efecto tóxico de las formas solubles de Abeta oligomérico y de fosfo-tau, estudiamos el fenotipo que adquieren en respuesta a dichas proteínas. Para ello, tratamos la línea astrocitaria WJE con distintas fracciones solubles S1 durante 5 horas y realizamos, posteriormente, su caracterización

transcriptómica. Tras extraer el ARN de dichas células obtenemos unos valores de RIN elevados (9.94 ± 0.13), indicativos de que el ARN está prácticamente intacto y resulta idóneo para el posterior estudio transcriptómico mediante arrays de hibridación (ver Apartado 16, de Materiales y Métodos). Las muestras se analizan por triplicado para cada condición: control (astrocitos sin estimular), TAU (estimuladas con S1 de ratones ThyTAU de 12 meses), ABETA (estimuladas con S1 de ratones PS1/APP de 18 meses), Braak II y Braak V-VI (estimuladas con S1 de individuos Braak II y Braak V-VI, respectivamente) y, finalmente, realizamos el estudio bioinformático de los resultados obtenidos.

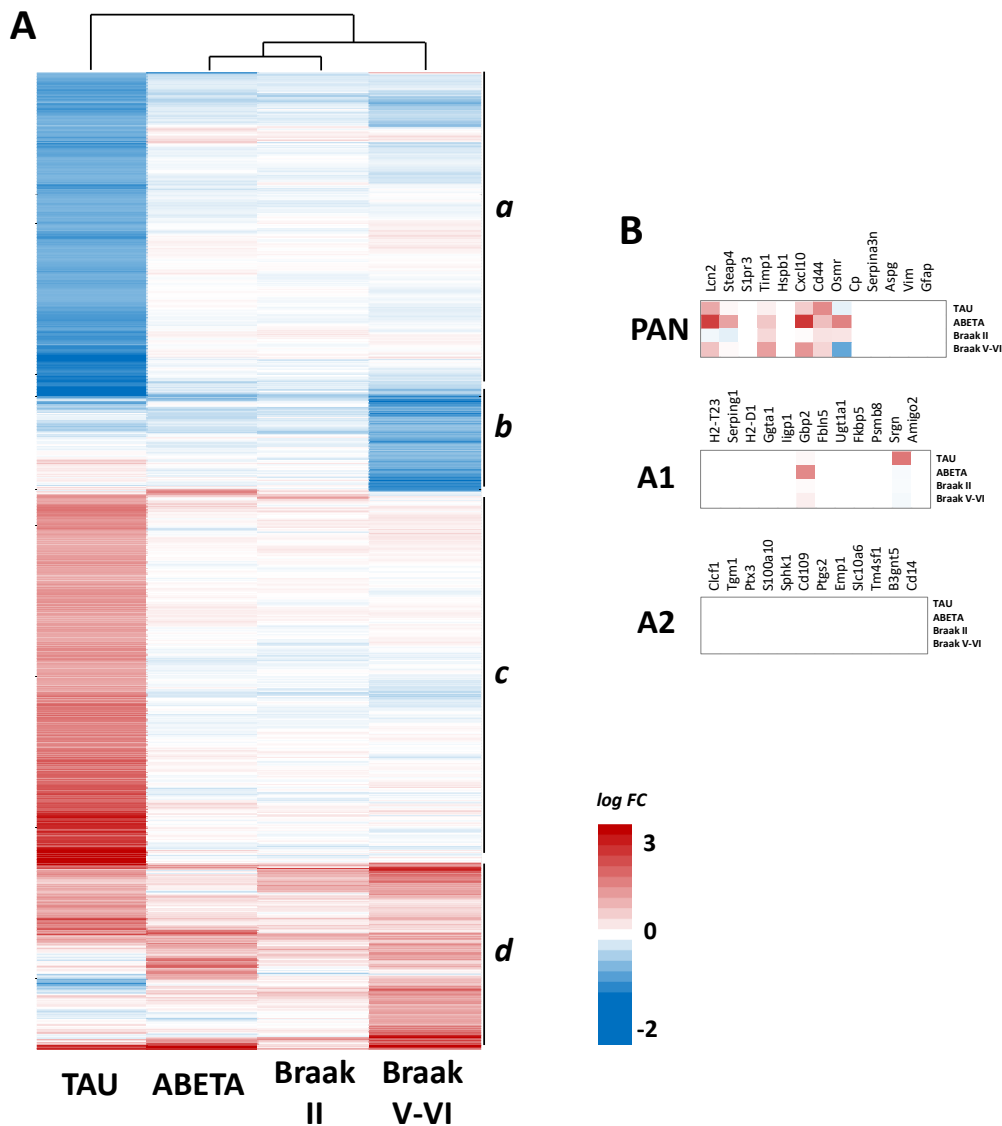


Fig.D2.4. Caracterización transcriptómica de los astrocitos WJE estimulados con las fracciones solubles S1, que contienen Abeta oligomérico y/o fosfo-tau solubles. Ensayo de estimulación de astrocitos WJE *in vitro* con la fracción soluble S1 de ratones ThyTAU (TAU); de ratones APP/PS1 (ABETA) y de muestras humanas *postmortem* clasificadas, según los estadios de Braak, como Braak II y Braak V-VI (n=3); y su análisis transcriptómico mediante array. (A) Análisis y representación, mediante *heatmap*, de genes diferencialmente expresados en cada condición con respecto al control (sin estimular), utilizando el criterio $\log FC < -1$ y > 1 , y un $FDR < 0,05$; en azul se representan los genes cuya expresión disminuye y en rojo los que aumentan. (B) Análisis y representación de los genes característicos de los fenotipos “PAN”, “A1” y “A2” (Liddelw y col. 2017), cuyo color también representa los valores de $\log FC$, para cada gen.

En primer lugar, efectuamos un análisis de expresión diferencial usando la condición “control” como referencia. Los genes se clasifican como diferencialmente expresados (DE) o no, de acuerdo con el siguiente criterio: FDR (*False Discovery Rate*, un *p-value* ajustado) < 0.05, que tolera un 5% de falsos positivos; y $\log FC > 1$ o < -1 , que incluye los genes que tienen el doble o la mitad de expresión en la muestra, en relación con el control. Utilizando esta metodología generamos un *heatmap*, como el que se ilustra en la (**Fig.D2.4(A)**). En él observamos que la condición con S1 de individuos Braak II, carentes de Abeta y fosfo-tau soluble, genera un patrón muy similar al de la condición control, como cabría esperar. Además, los astrocitos WJE estimulados con formas fosforiladas de tau solubles (TAU) presentan un perfil de expresión general muy diferente al resto de condiciones.

Al analizar para cada condición los genes característicos de los astrocitos, se observa un aumento de expresión de algunos genes típicos de una respuesta “PAN” (**Fig.D2.4(B)**). Sin embargo, no podemos asignar un fenotipo neurotóxico (A1) ni neuroprotector (A2) a las formas solubles de Abeta y/o fosfo-tau, al menos como respuesta aguda. Sería necesario estudiar el efecto a más largo plazo para discernir si estas proteínas son capaces de producir una polarización a los fenotipos A1 y A2 descritos por Liddelow y col. (2017).

En el *heatmap* generado (**Fig.D2.4(A)**), la agrupación por similitud de estos genes (*clustering*) muestra 4 grupos claramente diferenciados: (a) genes cuya expresión disminuye principalmente tras el tratamiento con S1 de ThyTau (“TAU”) (429 genes), (b) genes cuya expresión disminuye principalmente tras el tratamiento con S1 de Braak V-VI (Abeta + tau solubles) (123 genes), (c) genes cuya expresión aumenta principalmente tras el tratamiento con S1 de ThyTau (“TAU”) (494 genes), y (d) genes cuya expresión aumenta tras el tratamiento con APP/PS1 (“ABETA”) y Braak V-VI, e incluso ThyTAU (248 genes). Posteriormente estudiamos mediante la herramienta GSEA los principales procesos biológicos (GO: *gene ontology*) controlados por los genes diferencialmente expresados en cada una de estas condiciones, con el fin de esclarecer las alteraciones metabólicas y/o funcionales de los astrocitos *in vitro* ante las distintas fracciones solubles.

Empezamos analizando los procesos biológicos enriquecidos (up-regulados). Como se observa en las **Fig.D2.5, D2.6 y D2.7**, el tratamiento de los astrocitos con Abeta oligomérico soluble induce numerosos procesos biológicos relacionados con la activación de la respuesta inflamatoria y quimiotaxis celular, mientras que el tratamiento con fosfo-tau soluble (“TAU”) estimula los “procesos del sistema digestivo” (**Fig.D2.6**), y otros genes agrupados en el clúster “c”. Además, la vía de señalización mediada por quimioquinas también aumenta de manera no significativa, hecho que se refleja en el *heatmap* asociado (clúster “d”, **Fig.D2.6**). Por lo tanto, las formas solubles de Abeta y fosfo-tau parecen producir una distinta activación astrogliar, mediadora de la neuroinflamación que se produce en la EA.

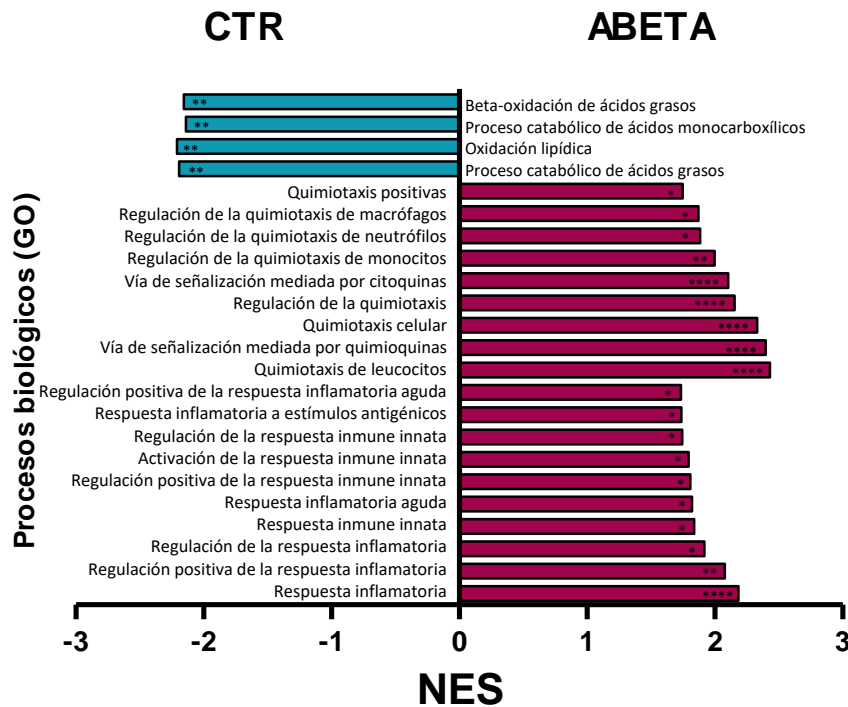


Fig.D2.5. Análisis, mediante GSEA, de procesos biológicos enriquecidos en los astrocitos WJE estimulados con la fracción soluble S1 de ratones PS1/APP. Gráfica representativa de los procesos biológicos (GO: gene ontology) que se encuentran enriquecidos en los astrocitos WJE tratados durante 5 horas con Abeta oligomérico soluble de la fracción S1 de PS1/APP, respecto a los astrocitos “control” (rojo), y viceversa (azul). NES: factor de enriquecimiento normalizado. FDR q-val (un valor de p-value ajustado) = 0,05 (*), 0,01 (**), 0,0001 (****).

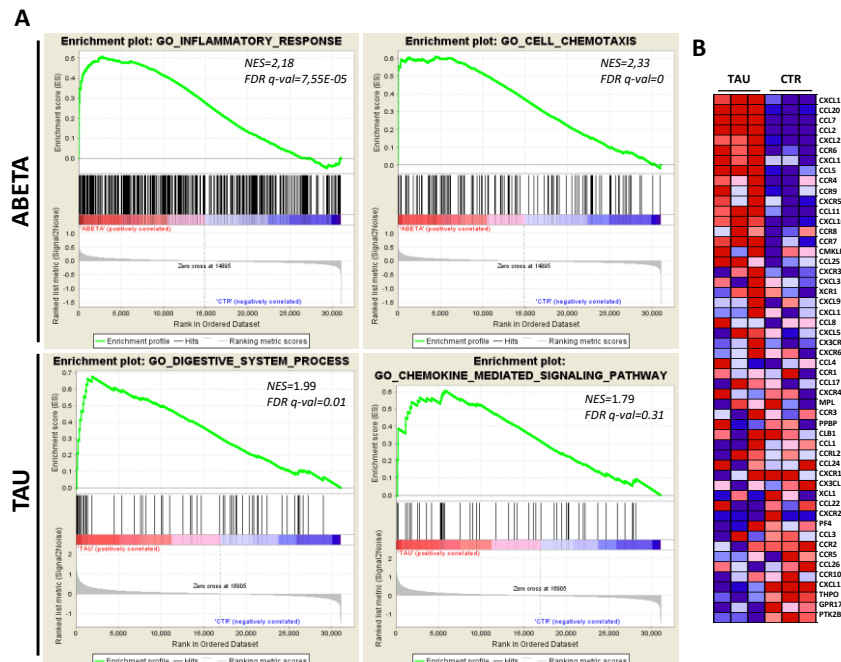


Fig.D2.6. Análisis de procesos biológicos enriquecidos en los astrocitos WJE tratados con Abeta o fosfo-tau solubles: procesos biológicos UP-regulados. (A) Representación gráfica de varios procesos biológicos enriquecidos en los astrocitos WJE tratados con las fracciones solubles S1 de ratones APP/PS1 (“ABETA”) y de ratones ThyTAU (“TAU”), respecto al control (sin tratamiento, “CTR”). Aunque esta última no presenta un valor significativo de FDR, en el (B) Heatmap de los genes implicados en la vía de señalización mediada por quimioquinas, en la condición “TAU” respecto al “CTR”, donde se observa que también se produce un aumento de la expresión de diversas quimioquinas, en los astrocitos WJE tratados con fosfo-tau soluble. NES: factor de enriquecimiento normalizado; FDR q-val: “false discovery rate” (un valor de p-value ajustado).

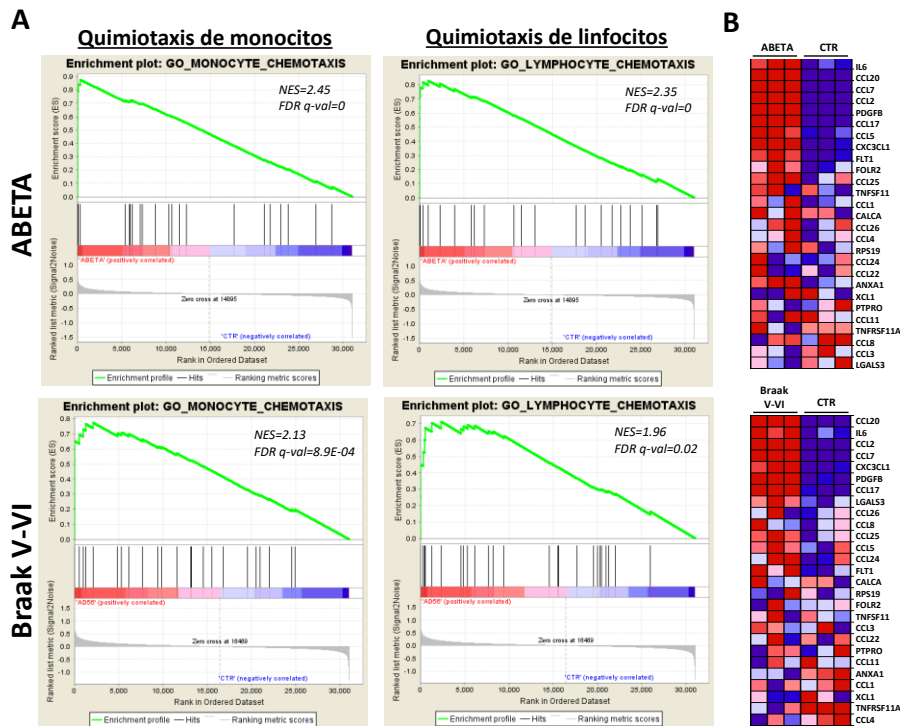


Fig.D2.7. Análisis de procesos biológicos comunes que se encuentran enriquecidos en los astrocitos WJE tratados con fracción S1 de APP/PS1 y de Braak V-VI: procesos biológicos UP-regulados. (A) Representación gráfica de varios procesos biológicos enriquecidos en los astrocitos WJE tratados con las fracciones solubles S1 de ratones APP/PS1 (“ABETA”) y de individuos Braak V-VI (“Braak V-VI”), respecto al control (sin tratamiento, “CTR”). En ambos procesos biológicos están implicados los mismos genes, que se muestran en el “heatmap” (B). NES: factor de enriquecimiento normalizado; FDR q-val: “false discovery rate” (un valor de p-value ajustado).

Por otro lado, los astrocitos tratados con la fracción S1 de individuos Braak V-VI, tienen enriquecidos los procesos biológicos asociados a la quimiotaxis de células inmunes (Fig.D2.7), al igual que los tratados con Abeta soluble. Los heatmaps asociados reflejan, además, una inducción de diversas quimioquinas, que podrían participar en la respuesta inflamatoria. Por lo tanto, las fracciones S1 de individuos Braak V-VI también son capaces de producir una activación astrogliar hacia una respuesta inmune, aunque se refleja en un menor número de procesos biológicos inducidos que la que producen directamente las fracciones de Abeta, probablemente debido a su menor contenido de esta proteína soluble.

Por último, analizamos los procesos biológicos down-regulados en los astrocitos tratados con S1 de animales ThyTau y de individuos Braak V-VI, correspondientes a los genes de los clústers “a” y “b”, respectivamente (Fig.D2.8). En ambos casos, están disminuidos numerosos procesos biológicos implicados en funciones pro-supervivencia de los astrocitos, como desarrollo, diferenciación, proliferación y morfogénesis. Además, altos niveles de fosfo-tau soluble (“TAU”) alteran numerosas funciones relacionadas con el correcto funcionamiento del ciclo celular, lo que podría provocar una reducción de su capacidad proliferativa. Por tanto, los astrocitos en presencia de formas fosforiladas de tau podrían sufrir una importante disfunción, que alteraría sus capacidades protectoras y pro-supervivencia. Cabe destacar que el Abeta soluble también es capaz de producir una

disminución de varios procesos biológicos relacionados con el metabolismo celular (Fig.D2.5), aunque en menor medida.

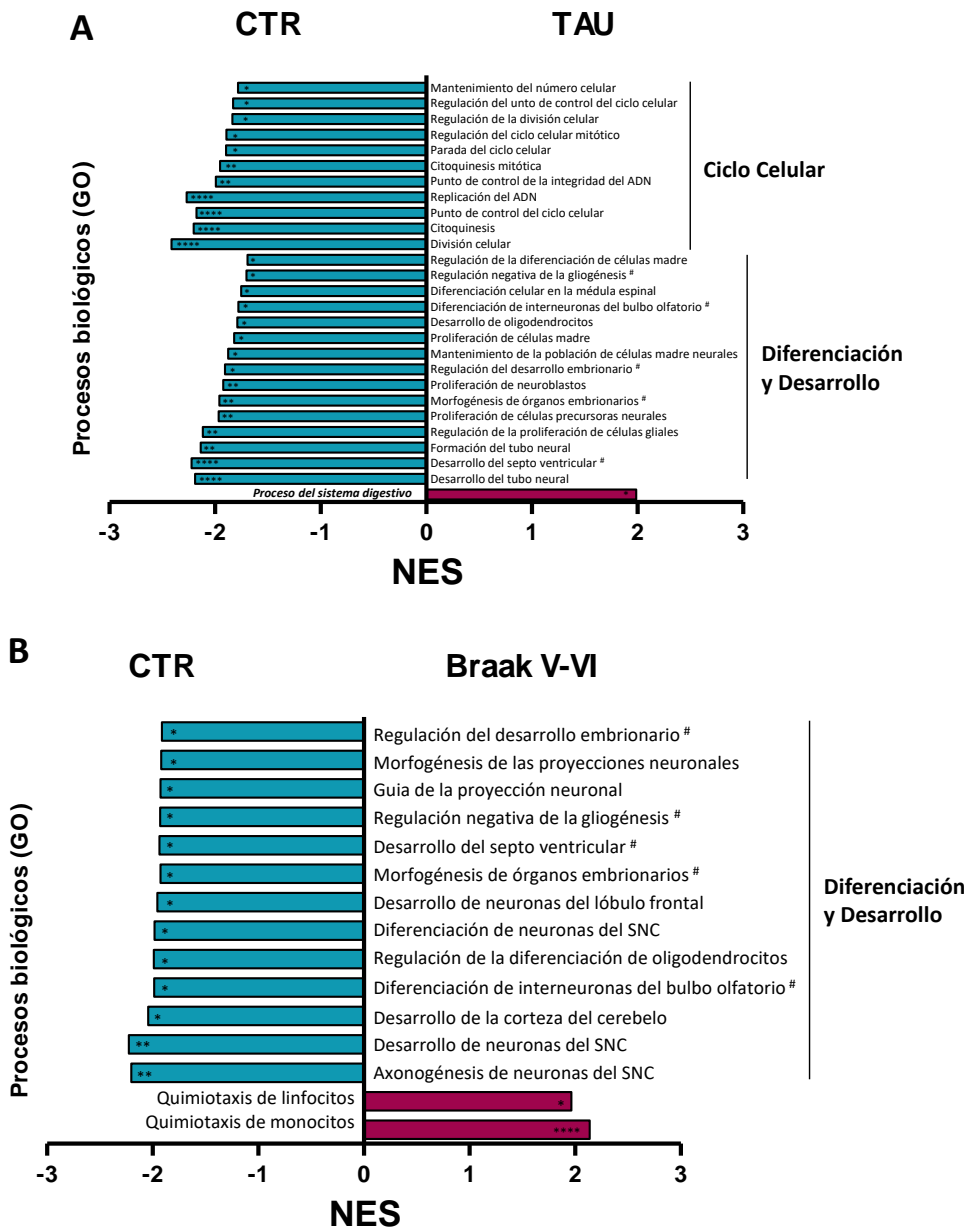


Fig.D2.8. Análisis, mediante GSEA, de procesos biológicos enriquecidos en los astrocitos WJE estimulados con la fracción soluble S1 de ratones ThyTAU o de muestras postmortem de pacientes de Alzheimer. Gráfica representativa de los procesos biológicos (GO: *gene ontology*) que se encuentran enriquecidos en los astrocitos WJE tratados durante 3 horas con (A) la fracción S1 de ThyTAU (“TAU”) o con (B) la fracción soluble S1 de muestras “Braak V-VI”, respecto a los astrocitos “control” (rojo), y viceversa (azul). NES: factor de enriquecimiento normalizado. “FDR *q-val*” (un valor de *p-value* ajustado) = 0,05 (*), 0,01 (**), 0,0001 (****). #Procesos biológicos comunes en TAU y en Braak V-VI.

En resumen, todos estos cambios parecen indicar que los astrocitos sufren alteraciones significativas que podrían tener importantes implicaciones en la patología del Alzheimer, tanto por activación de una respuesta neuroinflamatoria, como por pérdida de funciones protectoras/beneficiosas sobre el SNC. Queda por esclarecer qué ocurre realmente en un

sistema *in vivo*, cuál es el fenotipo real de los astrocitos tanto en modelos murinos de la enfermedad, como en pacientes de Alzheimer.

2.3.1. Activación de una respuesta inflamatoria astrogliar, en presencia de Abeta y/o fosfo-tau solubles

A continuación, con el fin de caracterizar la respuesta inflamatoria descrita anteriormente, realizamos ensayos de estimulación (3-4 horas) con las distintas fracciones solubles en diferentes líneas microgliales y en células astrogliales de la línea WJE. Tras el tratamiento y extracción de ARN, analizamos la expresión de diversos marcadores de respuesta clásica proinflamatoria (tipo M1): TNF α , iNOS, IL1 β e IL6.

En primer lugar, analizamos la activación de la línea microglial BV2 tratada con la fracción S1 de ratones APP/PS1 de 6 y 18 meses de edad (**Fig.D2.9(A)**). Nuestros resultados muestran que el tratamiento con las fracciones S1 de animales de 18 meses produce un aumento significativo de los marcadores TNF α , iNOS e IL1 β , mediado por Abeta oligomérico soluble. Sin embargo, el fosfo-tau que se acumula en las fracciones S1 de ratones ThyTAU a partir de 9 meses de edad, no produce aumento de TNF α ni de ningún otro marcador de respuesta M1 en la línea microglial BV2. Tampoco lo hace en la línea N13, ni en la microglía primaria (**Fig.D2.9(B)**).

Posteriormente, analizamos la respuesta de la línea astrogliar WJE. Nuestros datos demuestran que las fracciones S1 de ratones APP/PS1 de 18 meses originan un aumento significativo de los marcadores TNF α , iNOS e IL6 (**Fig.D2.9(C)**), indicativo de que los astrocitos se activan por Abeta oligomérico soluble de manera similar a la microglía. Además, las formas fosforiladas solubles de tau presentes en la fracción S1 de ratones ThyTAU de 12 meses produce una activación similar de los astrocitos con inducción de TNF α , iNOS e IL6 (**Fig.D2.9(D)**). Podemos concluir, pues, que los astrocitos generan una respuesta pro-inflamatoria tóxica en respuesta a las formas solubles tanto de Abeta como de fosfo-tau.

Por último, estudiamos el efecto de las fracciones S1 de humanos en estadios Braak II y V-VI, sobre cultivos primarios tanto de microglía como de astrocitos. El tratamiento durante 3 horas con las fracciones S1 de individuos Braak V-VI, aumenta significativamente los niveles de TNF α , iNOS e IL6 en ambas líneas celulares, si se comparan con los obtenidos con las fracciones S1 de Braak II. (**Fig.D2.10**). Por tanto, podemos concluir que los astrocitos tratados con las fracciones S1 de cerebros de EA sufren una importante respuesta proinflamatoria que podría ser citotóxica para el resto de las células del parénquima cerebral.

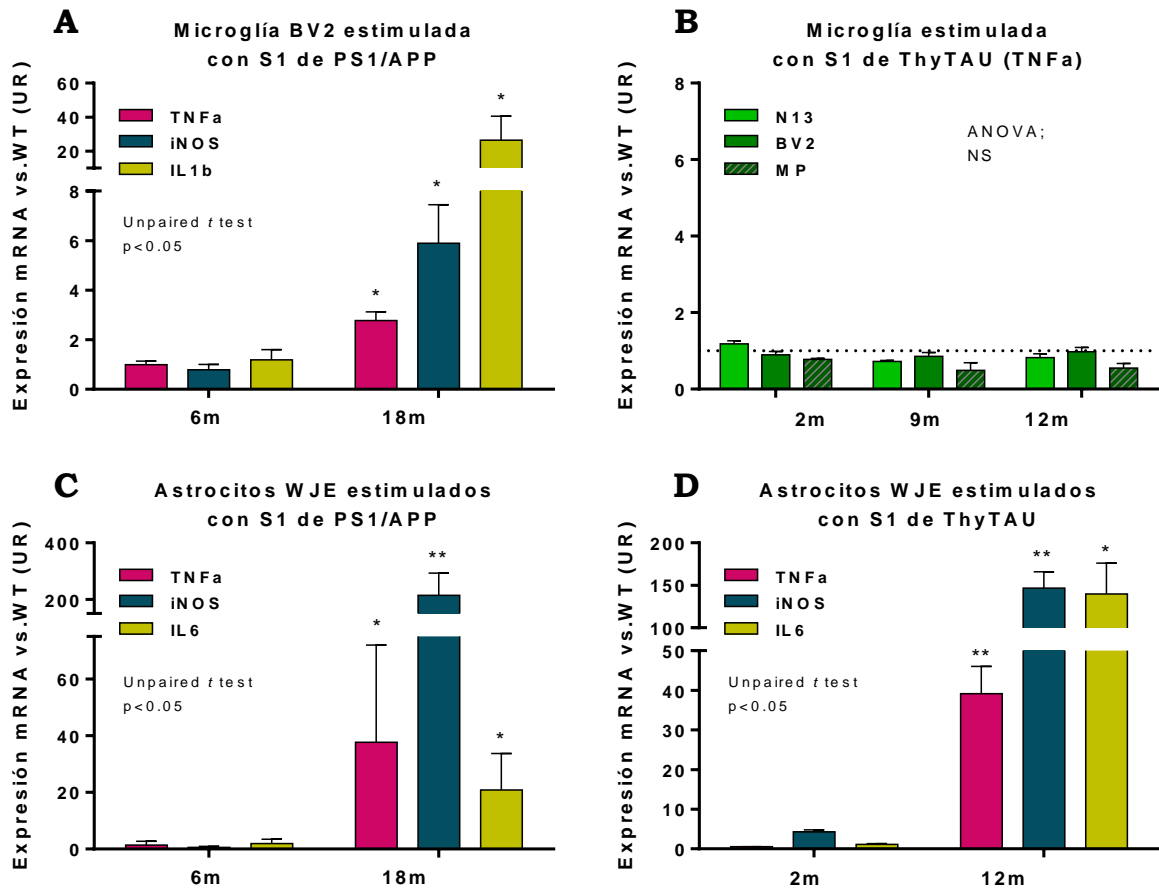


Fig.D2.9. Ensayos in vitro de estimulación de las distintas fracciones solubles S1 de ratones APP/PS1 y ThyTAU. Representaciones gráficas del nivel de expresión de varios marcadores de activación tanto de microglía como de astrocitos: TNF α , iNOS, IL1 β e IL6, medidos mediante RT-PCR, en células tratadas durante 3 horas con las distintas fracciones solubles. **(A)** Microglía BV2 tratada con S1 de animales PS1/APP (n=2-3). **(B)** Diferentes tipos de células microgliales (BV2, n=4-9; N13 y MP: microglía primaria, n=2-3) tratadas con S1 de animales ThyTAU. **(C)** Astrocitos WJE tratados con S1 de animales PS1/APP (n=4-5) y **(D)** de animales ThyTAU (n=2-3). La estadística se analizó mediante *t* de student (A) y el test ANOVA (B): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

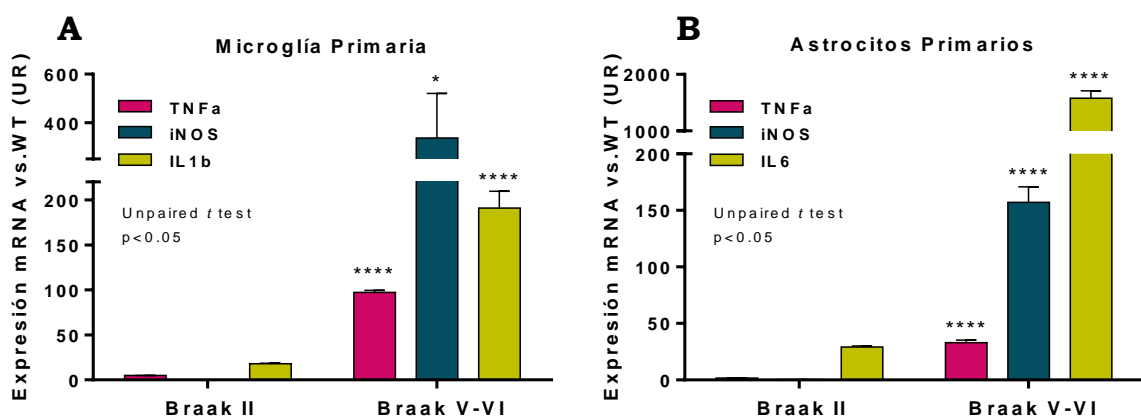


Fig.D2.10. Ensayos in vitro de estimulación de las distintas fracciones solubles S1 de muestras humanas postmortem. Representaciones gráficas del nivel de expresión de varios marcadores de activación tanto de microglía como de astrocitos: TNF α , iNOS, IL1 β e IL6, medidos mediante RT-PCR; en microglía primaria (n=3) **(A)** o en astrocitos primarios (n=4) **(B)**, tratados durante 3 horas con las fracciones solubles de muestras Braak II y Braak V-VI. Esta última fracción soluble contiene tanto Abeta oligomérico como formas fosforiladas de tau solubles, y produce una activación tanto de la microglía como de los astrocitos. La estadística se analizó mediante *t* de student: * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$.

2.4. Papel de los astrocitos en la supervivencia neuronal e integridad sináptica, en presencia de Abeta y/o fosfo-tau solubles

Como hemos demostrado previamente, los astrocitos tratados con formas fosforiladas de tau solubles pueden perder su capacidad protectora tras la disminución de numerosos genes implicados en procesos de diferenciación, proliferación, desarrollo, morfogénesis y supervivencia. Por ello, nos planteamos estudiar el efecto de los astrocitos estimulados con formas solubles de Abeta y/o fosfo-tau, sobre su capacidad de proteger a las neuronas o de mantener la integridad sináptica.

2.4.1. Efecto de los astrocitos sobre la supervivencia neuronal

Para realizar este estudio hacemos primero una puesta a punto del sistema. En primer lugar, estudiamos el efecto directo del tratamiento durante 24 horas con distintas fracciones S1 sobre cultivos de neuronas primarias (**Fig.D2.11**). Visualizamos y cuantificamos las neuronas mediante técnicas inmunocitoquímicas, usando los anticuerpos MAP2 y NeuN (ver Apartado B3.2, de Materiales y Métodos). El tratamiento de neuronas con un medio sin suero (sin B27) produce su muerte, por lo que este suplemento resulta imprescindible para su supervivencia. Sin embargo, las neuronas tratadas con un medio sin suero previamente condicionado por astrocitos durante 12 h (“condición control”) sobreviven, seguramente porque los astrocitos liberan diversos factores capaces de proteger y sustentar a las neuronas de la misma manera que cuando son mantenidas con medio completo (con B27).

Como se observa en la **Fig.D2.11**, el tratamiento de neuronas con S1 de animales APP/PS1 de 18 meses (que contiene Abeta oligomérico soluble), de ThyTAU de 9 meses (con fosfo-tau soluble) o de enfermos en estadio Braak V-VI (con ambas formas solubles), reduce de manera importante su número. Además, la fracción S1 de individuos Braak II, carente de Abeta y fosfo-tau, también reduce el número de neuronas, pero de manera menos significativa que las anteriores, efecto probablemente debido a que se trata de un tratamiento agudo sobre el cultivo neuronal.

A continuación, analizamos si los medios condicionados por astrocitos estimulados por las distintas fracciones S1 afectan a la toxicidad neuronal. Para ello, en primer lugar, tratamos los astrocitos primarios durante 12 horas con las fracciones S1 de ratones APP/PS1, ThyTAU y de muestras humanas Braak II y V-VI. Seguidamente, tratamos los cultivos de neuronas primarias durante 24 horas con los medios condicionados por astrocitos, y analizamos la supervivencia neuronal con los anticuerpos MAP2 y NeuN.

Nuestros resultados muestran que los medios condicionados por astrocitos en presencia de las fracciones S1 de animales APP/PS1 y de humanos (Braak II y Braak V-VI) protegen totalmente a las neuronas, cuyo número no varía tras el tratamiento (**FigD2.12**). Sin embargo, el tratamiento con la fracción S1 de ratones ThyTAU reduce significativamente el número de neuronas de 66 ± 2 a 42 ± 21.3 neuronas/campo ($n=26-28$), y las ramificaciones

de las neuronas (“neuropilo”) que han sobrevivido, que pasan de un área MAP2 positiva de $5.2 \pm 3 \%$ a $2.2 \pm 0.9 \%$ ($n=14-15$).

Teniendo en cuenta los resultados anteriores podemos concluir que, en las condiciones estudiadas, los astrocitos son capaces de proteger completamente a las neuronas *in vitro* frente a los estímulos tóxicos mediados por Abeta oligomérico soluble y por las fracciones S1 de pacientes de Alzheimer (Braak V-VI), y sólo parcialmente frente a la fracción soluble S1 de ratones ThyTAU. Sería necesario comprobar si los cambios transcriptómicos tras la activación astrogliar se reflejan en el medio condicionado, además de si el tiempo de tratamiento es suficiente.

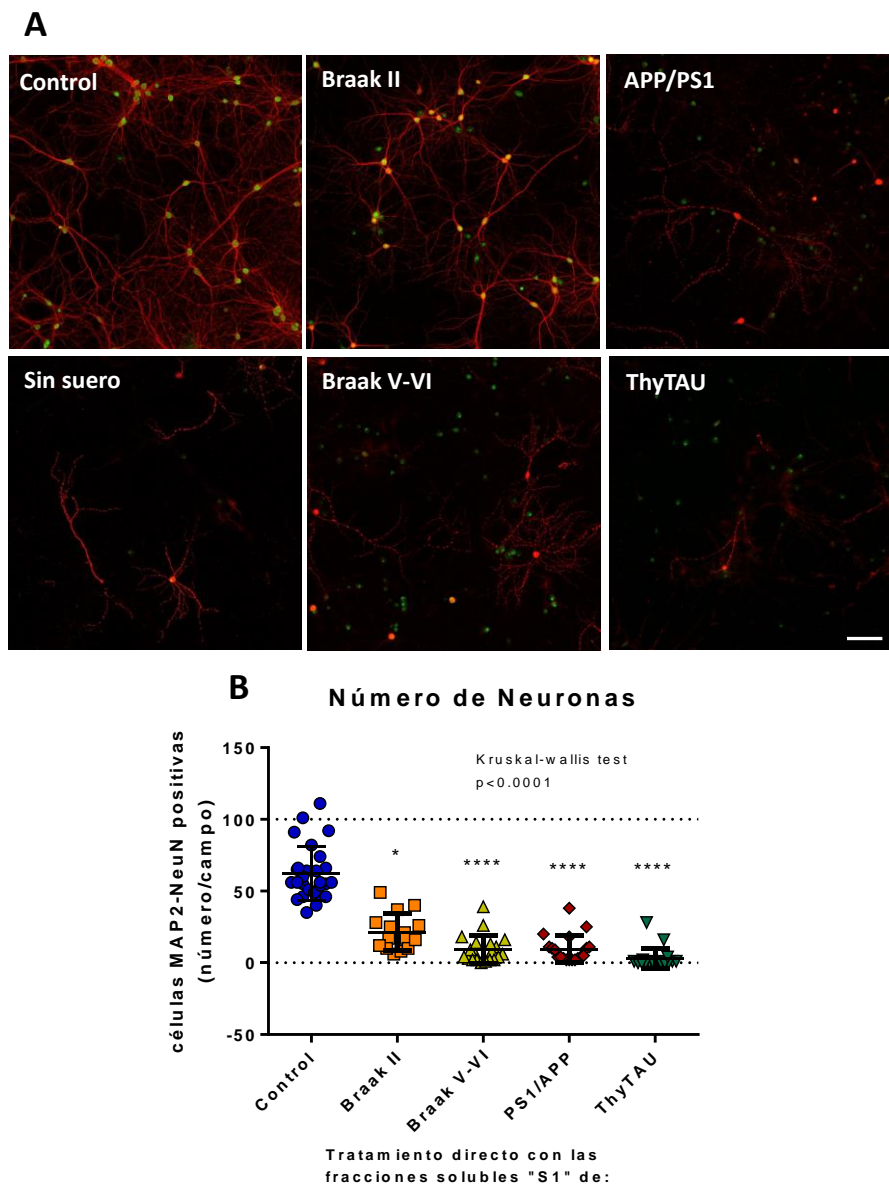


Fig.D2.11. Efecto directo de las fracciones solubles S1 de muestras postmortem de pacientes o de animales modelos de la EA, sobre neuronas primarias *in vitro*. (A) Imágenes representativas de las neuronas primarias, marcadas mediante inmunocitoquímica con los anticuerpos MAP2 (rojo) y NeuN (verde), tratadas con las distintas fracciones solubles S1, de muestras humanas (Braak II, $n=15$; y Braak V-VI, $n=20$) y de modelos murinos de la enfermedad: APP/PS1 ($n=19$) y ThyTAU ($n=18$). (B) Cuantificación y representación gráfica del número de neuronas MAP2⁺/NeuN⁺, comparado con el control ($n=27$). Barra de escala: 100 μ m. La estadística se analizó mediante el test de Kruskal-Wallis (* $p<0.05$, **** $p<0.0001$).

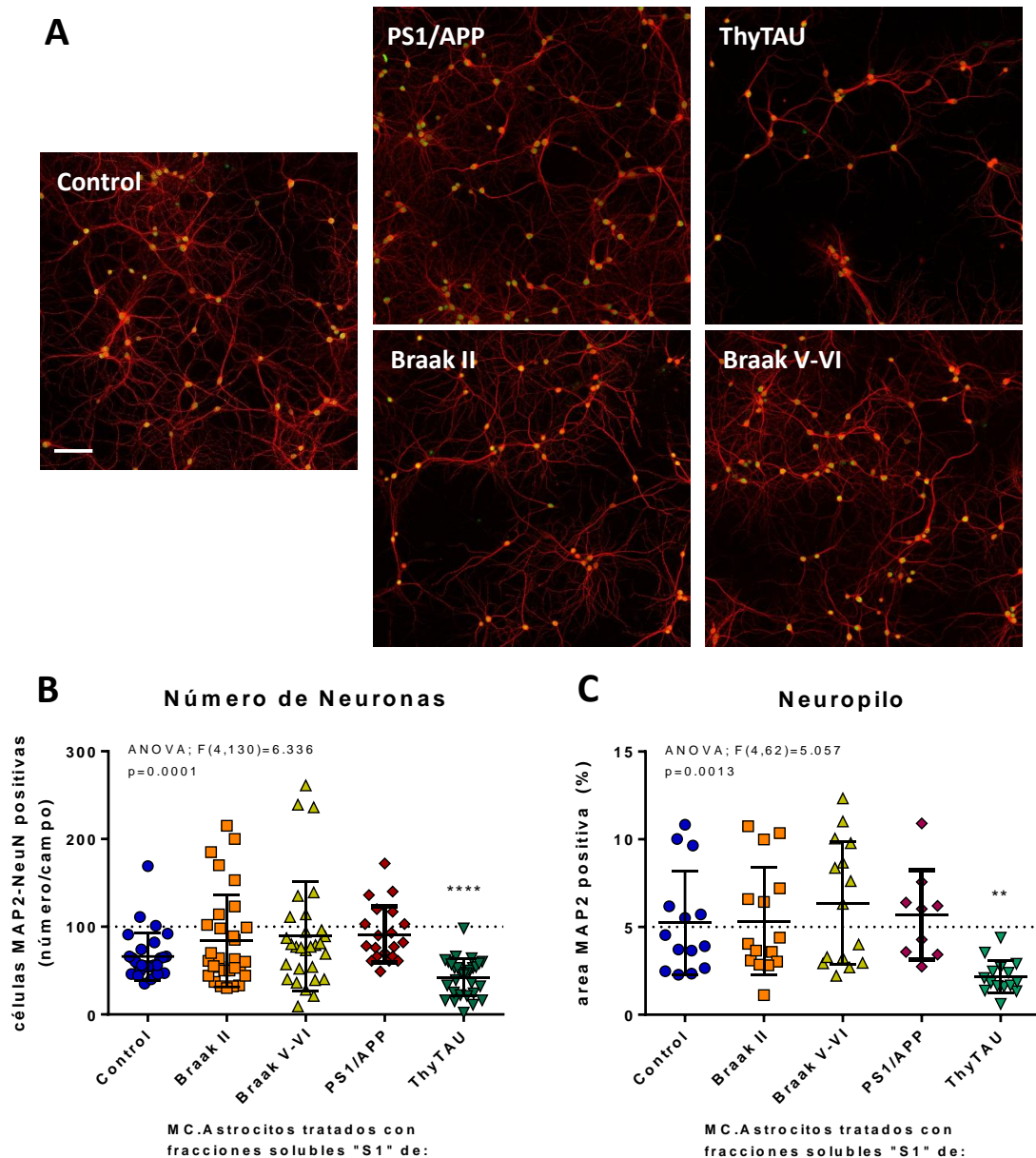


Fig.D2.12. Efecto de los medios condicionados por astrocitos, previamente tratados con las fracciones solubles S1 de muestras postmortem de pacientes o de animales modelos de la EA, sobre neuronas primarias in vitro. (A) Imágenes representativas de las neuronas primarias, marcadas mediante inmunocitoquímica con los anticuerpos MAP2 (rojo) y NeuN (verde), tratadas con los medios condicionados por astrocitos, tratados previamente con las distintas fracciones solubles S1, de muestras humanas (Braak II y Braak V-VI) y de modelos murinos de la enfermedad: APP/PS1 y ThyTAU. También se muestra la cuantificación y representación gráfica del número de neuronas MAP2⁺/NeuN⁺ (Control, n=26; II, n=84; V-VI, n=29; PS1/APP, n=20; ThyTAU, n=28) **(B)**, y del neuropilo, es decir, de las ramificaciones de dichas neuronas (Control, n=14; II, n=15; V-VI, n=15; PS1/APP, n=9; ThyTAU, n=15) **(C)**. Barra de escala: 100 μ m. La estadística se analizó mediante el test de ANOVA (** $p<0.01$, **** $p<0.0001$).

2.4.2. Efecto de los astrocitos sobre la integridad sináptica

Como ya se ha mencionado anteriormente, en la EA se alteran todos los mecanismos implicados en el funcionamiento de las sinapsis (Dudai y Morris, 2013; Chen, 2018; Jeong, 2017), probablemente debido a las formas solubles de Abeta oligomérico y/o fosfo-tau. Por ello, analizamos el papel de los astrocitos sobre el mantenimiento de las sinapsis en neuronas primarias en presencia de formas solubles de Abeta y/o fosfo-tau. Para abordar dicho estudio, realizamos los mismos tratamientos que en el apartado anterior (2.4.1) pero reduciendo el tiempo de tratamiento de las neuronas a 5 horas para evitar su muerte. Usamos los anticuerpos anti Sinaptofisina (rojo) y PSD95 (verde), proteínas pre y postsinápticas, respectivamente.

En los controles de este ensayo identificamos las conexiones sinápticas a lo largo de las dendritas mediante la colocación de la fluorescencia verde (PSD95) como la roja (sinaptofisina) (**Fig D2.13**) y las cuantificamos usando el plugin “SynapCountv1.2” (ver Materiales y Métodos, Apartado 19.2.2) (**Fig.D2.15**). Cuando las neuronas se tratan con un medio sin suero o sin B27, se produce una pérdida o descolocalización del marcaje sináptico, mientras que, si se tratan con un medio condicionado por astrocitos (sin suero ni B27), se revierte la alteración sináptica. Estos resultados indican que los astrocitos son capaces *per se* de proteger las sinapsis neuronales.

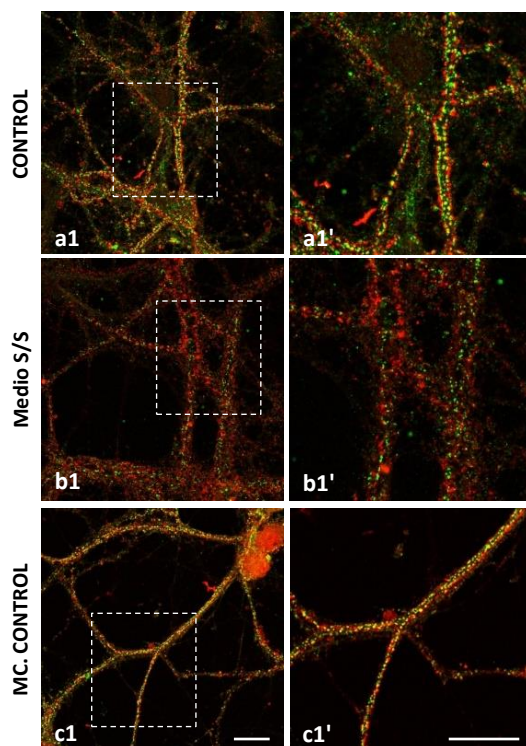


Fig.D2.13. Controles del estudio sináptico de neuronas primarias tratadas con fracciones solubles S1 y medios condicionados por astrocitos.

Imágenes representativas de las neuronas primarias, marcadas mediante inmunocitoquímica con los anticuerpos pre y post-sinápticos Sinaptofisina (rojo) y PSD95 (verde), respectivamente, en tres condiciones controles: (**a1**) neuronas sin tratamiento, (**b1**) neuronas con medio sin B27 (S/S), y (**c1**) neuronas con medio condicionado (MC.) por astrocitos primarios (sin tratamiento: “control”). *a1'*, *b1'* y *c1'* son imágenes con mayores aumentos de los recuadros en *a1*, *b1* y *c1*, respectivamente. Barras de escala: 20µm.

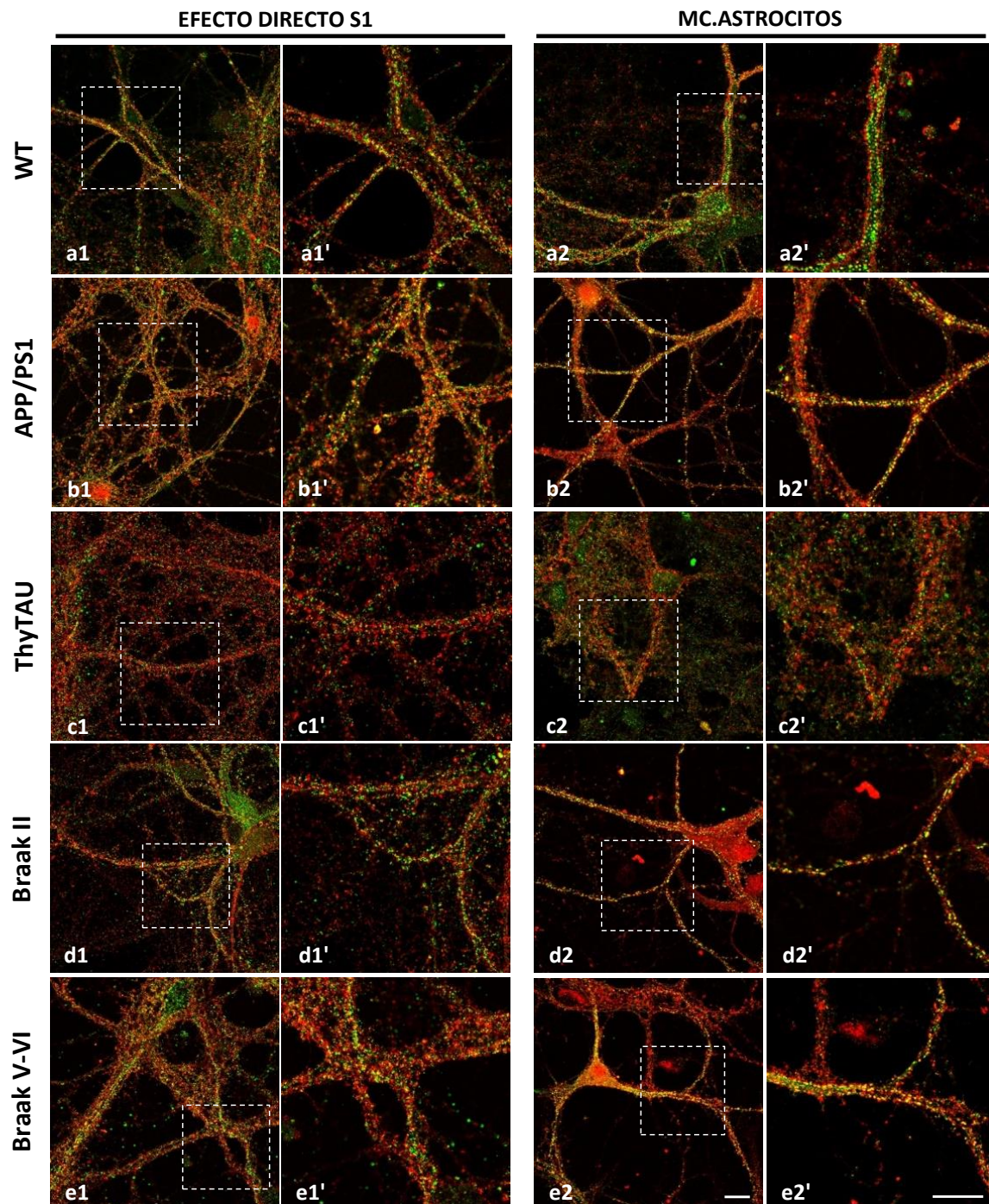


Fig.D2.14. Estudio sináptico de neuronas primarias tratadas con fracciones solubles S1 y con medios condicionados por astrocitos, previamente tratados con dichas fracciones solubles. Imágenes representativas de las neuronas primarias, marcadas mediante inmunocitoquímica con los anticuerpos pre y post-sinápticos: Sinaptofisina (rojo) y PSD95 (verde), respectivamente. Los tratamientos de las neuronas fueron directamente con las fracciones solubles S1 (*a1, b1, c1, d1, e1*) o con los medios condicionados por astrocitos, previamente tratados con dichas fracciones S1 (*a2, b2, c2, d2, e2*). Las fracciones S1 proceden de **(a)** ratones WT, **(b)** APP/PS1 de 18 meses y **(c)** ThyTAU de 12 meses, y de muestras humanas **(d)** Braak II y **(e)** Braak V-VI. *a-e1'* y *a-e2'* son imágenes con mayores aumentos de los recuadros en *a-e1* y *a-e2*, respectivamente. Barras de escala: 20 μ m.

A continuación, analizamos el efecto directo e indirecto (en presencia de medios condicionados por astrocitos “control”), de las fracciones S1 procedentes de modelos murinos (WT de 6 meses, APP/PS1 de 18 meses y ThyTAU de 12 meses), y de individuos Braak II y Braak V-VI (**Fig.D2.14**). Nuestros resultados (**Fig.D2.15**) muestran que las sinapsis no se afectan tras el tratamiento directo o indirecto con S1 de ratones WT, sin patología. Tras los tratamientos directos con S1 de humanos (Braak II y V-VI) y de animales APP/PS1, aunque hay gran variabilidad de respuesta, se observa cierta afectación de las sinapsis que, en cualquier caso, se revierte al utilizar los mismos medios condicionados por astrocitos. Sin embargo, cuando tratamos con la fracción S1 de ratones ThyTAU de 12 meses, se produce una disminución significativa del número de sinapsis, que no se revierte por la acción de los astrocitos. Es probable que las formas tóxicas fosforiladas de tau presentes en las fracciones S1 de ratones ThyTAU hagan que los astrocitos pierdan su capacidad para proteger las sinapsis. Estos resultados instan a realizar un análisis funcional más profundo para esclarecer el papel de los astrocitos en la patología sináptica de cerebros de Alzheimer.

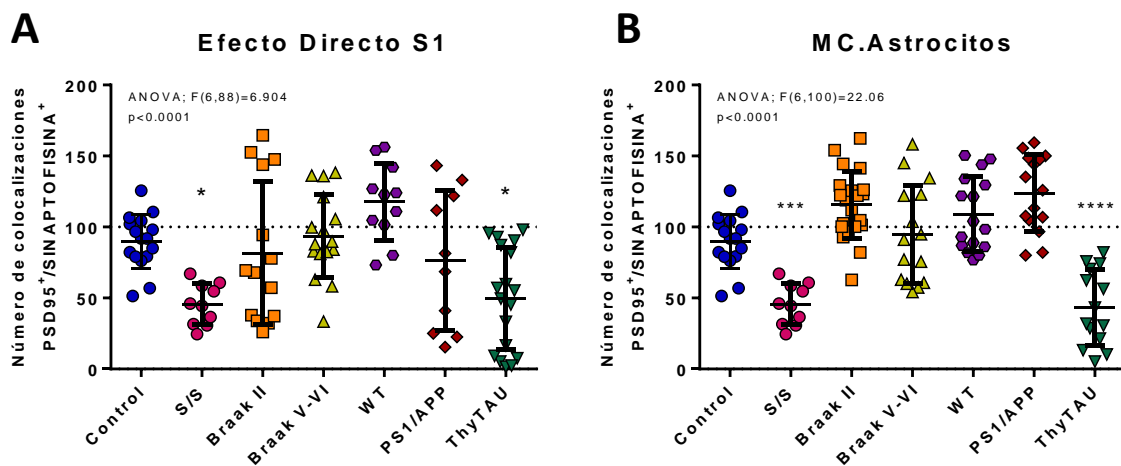


Fig.D2.15. Cuantificación del número de sinapsis en neuronas tratadas in vitro con fracciones solubles S1 o con medios condicionados por astrocitos, previamente tratados con dichas fracciones solubles. Cuantificación y representación gráfica del número de sinapsis (co-localizaciones PSD95⁺/SINAPTOFISINA⁺), en **(A)** neuronas tratadas directamente con las fracciones solubles S1 (Control, n=16; S/S, n=10; II, n=14; V-VI, n=15; WT, n=11; PS1/APP, n=10; ThyTAU, n=18) y en **(B)** neuronas tratadas con medios condicionados por astrocitos, previamente tratados con dichas fracciones solubles (Control, n=16; S/S, n=10; II, n=21; V-VI, n=15; WT, n=16; PS1/APP, n=15; ThyTAU, n=14). Dichas fracciones S1 proceden de ratones WT, APP/PS1 de 18 meses y ThyTAU de 12 meses, o de muestras humanas Braak II y Braak V-VI. Como controles se ha usado el medio condicionado por astrocitos sin tratamiento (“Control”) y un medio sin suero ni B27 (“S/S”). La estadística se analizó mediante el test ANOVA (*p<0.05, ****p<0.001, *****p<0.0001).

3. RESPUESTA ASTROGLIAL “IN VITRO”: FAGOCITOSIS DE DISTROFIAS NEURÍTICAS

Una característica propia de la EA es la aparición temprana de una patología neurítica en las zonas próximas a las placas de Abeta, que parece ser el sustrato morfológico de la disfunción sináptica y neuronal en los estadios preclínicos (Masliah y col. 1991; Dickson y col. 1999; Bell y Hardingham, 2011; Torres y col. 2012; Sánchez-Varo y col. 2012). Nuestro grupo de investigación ha caracterizado las distrofias neuríticas asociadas a los depósitos amiloides en el hipocampo de ratones PS1_{M146}/APP_{751SL}, las cuales contienen APP, formas hiperfosforiladas de tau y vesículas de tipo autofágico-lisosomal (Sánchez-Varo y col. 2012; Torres y col. 2012), igual que se ha descrito en humanos (Nixon, 2007; Nixon y Yang, 2011).

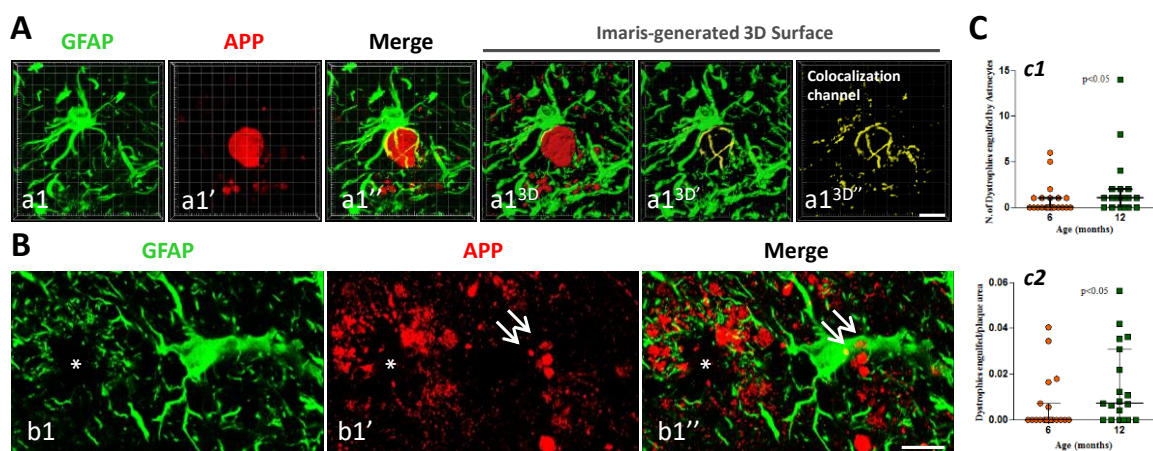


Fig.D3.1. Identificación estructural de los astrocitos reactivos asociados a placas, que envuelven y fagocitan neuritas distróficas axonales en el hipocampo de ratones APP/PS1. (A) Imágenes confocales de inmunofluorescencia doble GFAP/APP que muestra ejemplos representativos de astrocitos reactivos con sus procesos claramente envolviendo distrofias axonales APP-positivas (a1-a1''). Las reconstrucciones 3D correspondientes, generadas mediante Imaris, revelan la extensa superficie de aposición entre los procesos astrocíticos y las distrofias neuronales (a1^{3D}-a1'^{3D}). (B) Imágenes confocales de inmunofluorescencia doble GFAP/APP mostrando las distrofias APP-positivas (flechas) dentro de un astrocito reactivo en la cercanía de una placa de Abeta (*). (C) Análisis cuantitativo del número de neuritas distróficas fagocitadas por los procesos astrocíticos (c1) y en el número de distrofias fagocitadas por placa (c2), que demuestra que existe un aumento significativo de ambos a los 12 meses de edad, respecto a 6 meses (n=19-21 placas/edad). La estadística se analizó mediante el test de comparación Mann-Whitney U. Barras de escala: a1-a1'' : 10 mm; b1-b1'' : 10 mm. (Gomez-Arboledas y col. 2017).

A pesar de que los astrocitos reactivos están íntimamente asociados a las placas amiloides, no se conoce su relación con las distrofias neuríticas. Por ello, se estudió mediante análisis de imagen, la fagocitosis y procesamiento de las neuritas distróficas por los astrocitos de alrededor de las placas. Estos resultados, obtenidos por el grupo de la Dra. Antonia Gutierrez (Universidad de Málaga) muestran que, en el hipocampo de ratones APP/PS1, las neuritas distróficas aparecen envueltas por los procesos de los astrocitos y en contacto íntimo con su superficie o incluso dentro de ellos (**Fig.D3.1**), lo que refleja que los astrocitos fagocitan las distrofias localizadas alrededor de las placas amiloides (Gomez-Arboledas y col. 2017). Los análisis cuantitativos reflejan un aumento significativo tanto en el número de distrofias ingeridas por los procesos astrocíticos, como en las distrofias ingeridas por placa, a los 12 meses de edad respecto a los 6 meses. Se realizó, posteriormente, un análisis

ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) que muestra la existencia de neuritas distróficas dentro del citoplasma de astrocitos reactivos asociados a placas, así como numerosos filamentos intermedios y mitocondrias asociados a la membrana de los fagosomas (**Fig.D3.2**). Además, alrededor de las distrofias fagocitadas, las membranas de los astrocitos parecen interrumpidas o ausentes. Se observan también distrofias en un estado de degradación más avanzado. Estos resultados ilustran el proceso de fagocitosis de estructuras neuronales patológicas y su degradación, por parte de los astrocitos reactivos asociados a las placas amiloides. De manera similar, también se demostró la existencia de distrofias rodeadas de procesos astrocíticos e incluso dentro del citoplasma de astrocitos reactivos en muestras de pacientes Braak V-VI (Gomez-Arboledas y col. 2017).

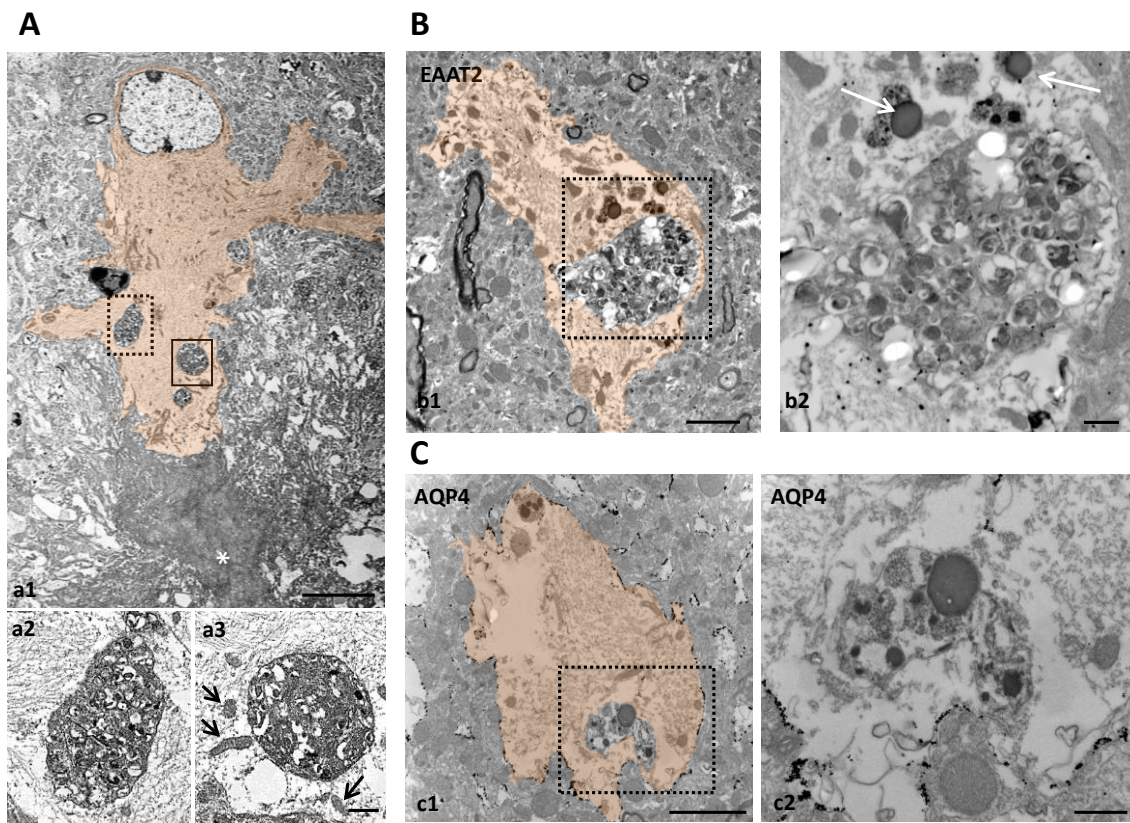


Fig.D3.2. Identificación estructural de las neuritas distróficas fagocitadas y degradadas por los astrocitos reactivos asociados a placas, en el hipocampo de ratones APP/PS1. (A) Imágenes mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) que muestran las neuritas distróficas en el interior de los astrocitos reactivos asociados a placas. Como se puede observar en la imagen ampliada a3, el citoplasma de un astrocyto fagocítico muestra muchos filamentos intermedios y algunas mitocondrias asociadas a la distrofia fagocitada. Imágenes mediante MET de secciones hipocampales marcadas con EAAT2 (B) o AQP4 (C), que muestran neuritas distróficas en diferentes estados de digestión. En algunos casos, la membrana de los astrocitos alrededor de las distrofias fagocitadas parecen interrumpidas o ausentes (b1, b2), mientras que otras distrofias parecen estar en un proceso de degradación más avanzado (c1, c2). a2, a3, b2 y c2 son vistas ampliadas de a1, b1 y c1, respectivamente. El citoplasma de los astrocitos se encuentra coloreado de naranja en las figuras a1, b1 y c1; las flechas negras indican mitocondrias (a3) y las flechas blancas indican lisosomas (b2). N, núcleo del astrocyto (a1). *, placa de Abeta (a1). Las distrofias fagocitadas por los astrocitos contienen típicamente numerosas vacuolas autofágicas. Barras de escala: a1: 5mm; a2-a3: 0,5mm; b1 y d1: 2 µm; b2 y d2: 0,5 µm. (Gomez-Arboledas y col. 2017).

Sin embargo, la proporción de neuritas distróficas ingeridas por los astrocitos es muy baja (aprox. 7%), lo que, junto con la acumulación de distrofias neuríticas que existe con el progreso de la patología, sugiere que la eficiencia de la fagocitosis de los astrocitos podría estar alterada o limitada. Por ello, planteamos comprobar si la actividad fagocítica de los astrocitos reactivos se altera por la presencia de terminales presinápticas aberrantes. Para abordar dicho estudio, procedemos en primer lugar al aislamiento bioquímico de estructuras pre- y postsinápticas, o “neurosinaptosomas” (NS) (Evans, 2015), útiles como modelo *in vitro* de distrofias neuronales.

3.1. Aislamiento y caracterización de neurosinaptosomas (NS)

En primer lugar, obtenemos “neurosinaptosomas” (NS) de la corteza cerebral de ratones adultos WT, APP y TAU P301S (Apartado 8.1 de Materiales y Métodos). Seguidamente, caracterizamos mediante western blot las proteínas sinaptofisina y PSD95, para asegurarnos que hemos aislado terminales pre y post-sinápticas, respectivamente. Como se observa en la **Fig.D3.3**, en todas las muestras aisladas coexisten ambas proteínas. También comprobamos que los neurosinaptosomas obtenidos de animales APP de 12 meses contienen Abeta, mientras que los procedentes de animales P301S de 12 meses contienen diferentes formas fosforiladas de la proteína tau, reconocidos por los anticuerpos AT8, AT100 y AT180, y que están ausentes en los neurosinaptosomas de animales P301S de 2 meses y WT.

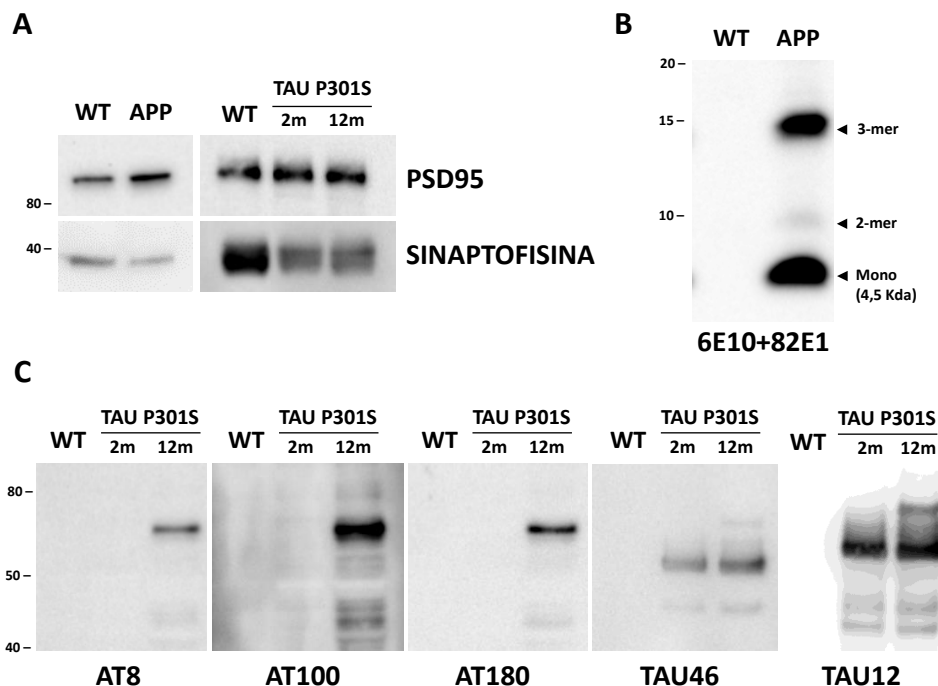


Fig.D3.3. Caracterización de los neurosinaptosomas aislados de ratones WT, APP y TAU P301S, mediante western blot. Determinación de marcadores pre y postsinápticos, utilizando los anticuerpos PSD95 y sinaptofisina, respectivamente (**A**); de Abeta (6E10+82E1) (**B**), o de tau fosforilado (AT8, AT100, AT180) y total (TAU46, TAU12) (**C**), en los neurosinaptosomas aislados de la corteza cerebral de ratones WT, APP y TAU P301S. En el caso de los NS de WT y APP, la edad de los ratones utilizados es de 12 meses y, en el caso de los TAU P301S, proceden de ratones jóvenes y viejos (2 y 12m).

Además, mediante microscopía electrónica de transmisión (ver Apartado 18, de Materiales y Métodos) visualizamos las terminales sinápticas que constituyen dichos neurosinaptosomas. Comprobamos, así, que los neurosinaptosomas de ratones APP presentan terminales sinápticas aberrantes, con un contenido heterogéneo de vacuolas autofágicas (**Fig.D3.4**), similares a las descritas previamente en el hipocampo de ratones APP/PS1 (**Fig.D3.2**).

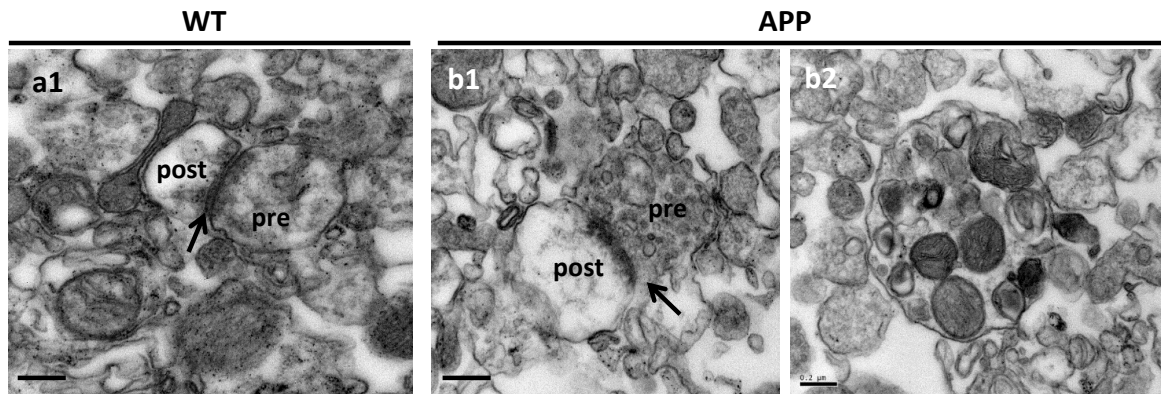


Fig.D3.4. Identificación de los neurosinaptosomas aislados de la corteza cerebral de ratones WT y APP, a edades avanzadas, mediante microscopía electrónica de transmisión. Se observan terminales sinápticas funcionales en los NS de ratones WT (**a1**), mientras que hay terminales sinápticas aberrantes (**b1**) y acumulación de vacuolas autofágicas (**b2**), en los NS de ratones APP. Las flechas en **a1** y **b1** indican la hendidura sináptica. pre, terminal presináptica; post, terminal postsináptica. Barras de escala: 0.2 μ m. Imágenes cedidas por el grupo de la Dra. Antonia Gutiérrez.

Por tanto, el aislamiento de neurosinaptosomas de la corteza cerebral de ratón proporciona un buen modelo de terminales sinápticas y distrofias neuronales, útiles para los posteriores estudios *in vitro*.

3.2. Cinéticas de fagocitosis y procesamiento de neurosinaptosomas por los astrocitos *in vitro*

Para realizar dichos estudios, procedemos a cargar los neurosinaptosomas (NS) con TAMRA o a marcarlos con pHRedo; ambas son moléculas fluorescentes útiles para ensayos *in vitro* de fagocitosis y degradación, respectivamente (ver Apartado 8, de Materiales y Métodos). Posteriormente, analizamos estos procesos mediante citometría de flujo, western blot, microscopía electrónica y microscopía confocal.

3.2.1. Captación/fagocitosis de neurosinaptosomas por astrocitos

Tras tratar los astrocitos primarios con NS cargados con TAMRA, analizamos a distintos tiempos por citometría de flujo el porcentaje de células TAMRA positivas, que corresponden a los astrocitos que han captado dichos neurosinaptosomas.

En la **Fig.D3.5(A)** se representa la cinética de fagocitosis de los NS por astrocitos primarios. Nuestros resultados revelan que, mientras dichas células captan NS de ratones WT y TAU P301S con alta eficiencia y con un tiempo medio de 78.8 ± 48.4 min (n=8) y 54.1 ± 43 min (n=6) respectivamente, la fagocitosis de NS de ratones APP es claramente más lenta, siendo su tiempo medio de 407.3 ± 75 min (n=3, $p < 0.05$) (**Fig.D3.5(B)**).

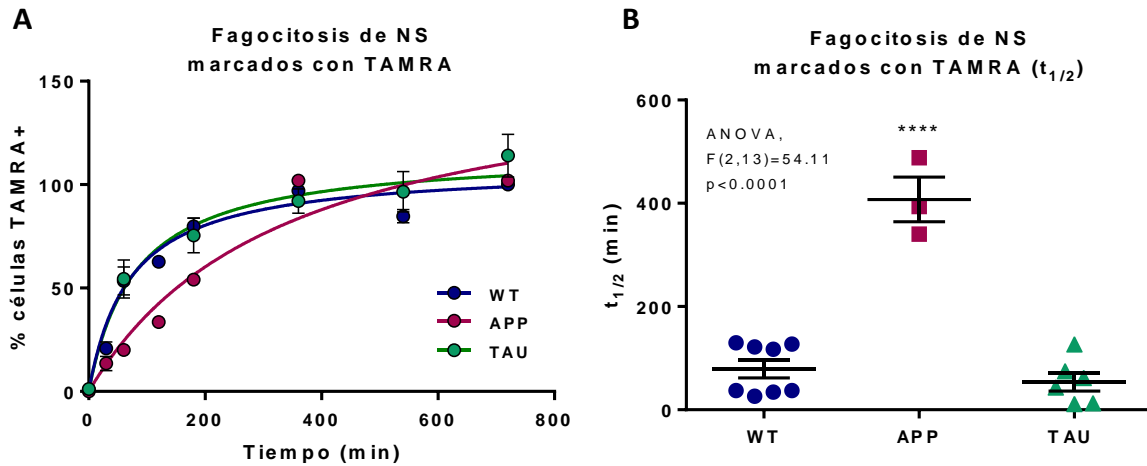


Fig. D3.5. Estudio por citometría de flujo de la fagocitosis de neurosinaptosomas por astrocitos primarios. (A) Cuantificación de células TAMRA positivas, que corresponde a los astrocitos que han ingerido los NS cargados con dicho marcador fluorescente, a distintos tiempos. (B) Representación del tiempo medio de fagocitosis por cada grupo de neurosinaptosomas. Los NS se aislaron de ratones WT (n=8), APP (n=3) y TAU P301S (n=6). La estadística se analizó mediante el test ANOVA, seguido de un test de Tukey (****p<0.0001).

3.2.2. Degradación/procesamiento de neurosinaptosomas por astrocitos

Una vez establecida la capacidad fagocítica de los astrocitos, procedemos a estudiar su capacidad de procesar y degradar los NS fagocitados. Para ello, tratamos los astrocitos primarios con los NS marcados con pHRodo durante 6 horas, cambiamos el medio, y analizamos la degradación de los sinaptosomas fagocitados a distintos tiempos (0, 12, 24, 48 y 72 horas).

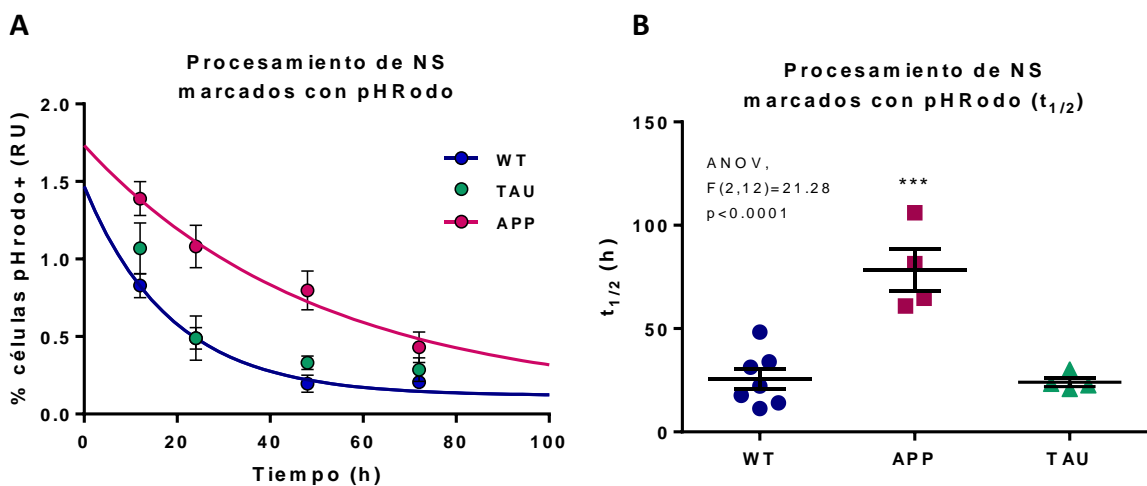


Fig.D3.6. Estudio por citometría de flujo de la degradación de neurosinaptosomas por astrocitos primarios. (A) Cuantificación de las células pHRodo positivas, que corresponden a los astrocitos que están procesando los NS fagocitados previamente. La disminución de la fluorescencia del pHRodo refleja el procesamiento y degradación de dichas estructuras. (B) Tiempo medio de degradación de neurosinaptosomas. Los astrocitos tardan más tiempo en procesar los NS con Abeta (de ratones APP, n=4), que los de ratones WT (n=7) o TAU P301S (n=4). La estadística se analizó mediante el test ANOVA, seguido de un test de Tukey (***p<0.001).

La cinética de degradación de los neurosinaptosomas fagocitados, la obtenemos tras cuantificar por citometría de flujo la pérdida de señal pHRodo tras incorporarse al lisosoma (**Fig.D3.6(A)**). Nuestros resultados muestran que los astrocitos son capaces de degradar los NS de ratones WT y TAU P301S con alta eficiencia, al igual que ocurría con la fagocitosis (TAMRA), siendo los tiempos medios de degradación de 25.5 ± 13 h y 24 ± 4 h ($n=7-4$), respectivamente. Sin embargo, la degradación de los NS ricos en Abeta (APP) requiere un tiempo significativamente superior, 78.3 ± 20.6 h ($n=4$, $p<0.05$) (**Fig.D3.6(B)**). Por lo tanto, los astrocitos, además de tener menor eficiencia de fagocitosis de NS con Abeta, también disminuyen la eficiencia del procesamiento de los mismos.

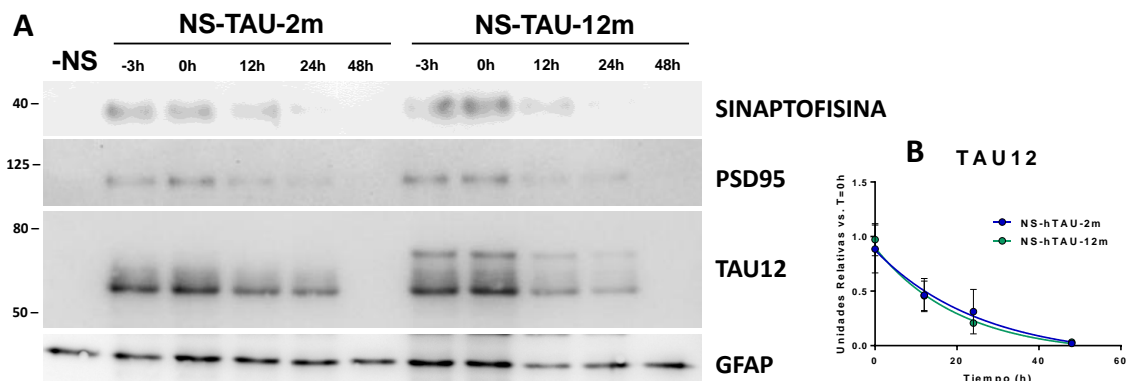


Fig.D3.7. Caracterización de la degradación de los NS de ratones TAU P301S, por parte de astrocitos primarios, mediante western blot. (A) Determinación de los marcadores pre y postsinápticos, mediante los anticuerpos sinaptofisina y PSD95, respectivamente; y del tau total, mediante el anticuerpo TAU12, de los astrocitos tratados con NS de ratones TAU P301S. **(B)** Cuantificación del tau total (TAU12), en el que se observa la disminución de éste a lo largo del tiempo, con la misma eficiencia en los NS de TAU P301S de 2 y 12 meses.

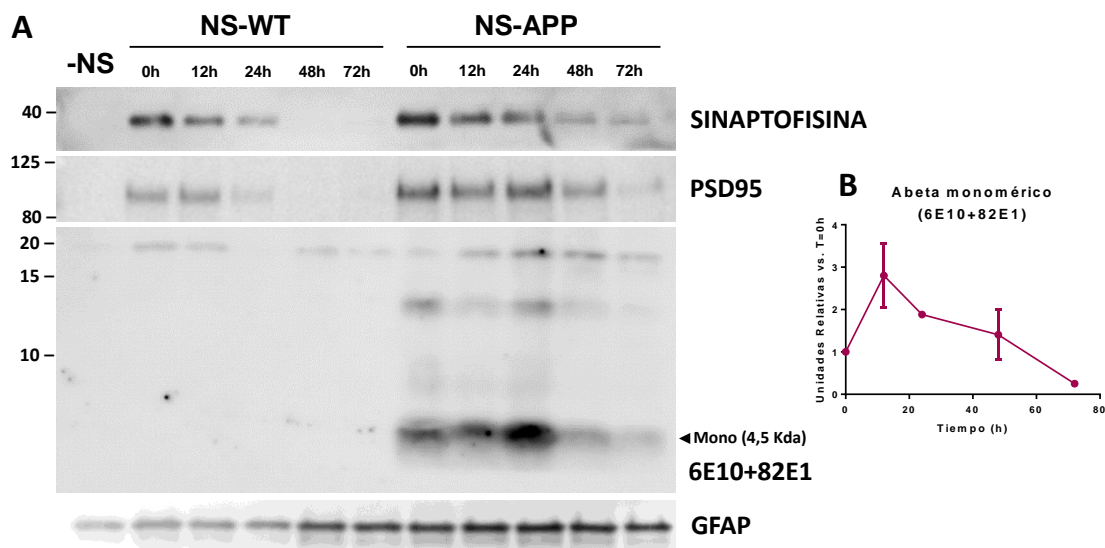


Fig.D3.8. Caracterización de la degradación de los NS de ratones APP y WT, por parte de astrocitos primarios, mediante western blot. (A) Determinación de los marcadores pre y postsinápticos, mediante los anticuerpos PSD95 y sinaptofisina, respectivamente; y del Abeta monomérico, mediante los anticuerpos 6E10 y 82E1, de los astrocitos tratados con NS de ratones APP frente a los de ratones WT (12 meses). **(B)** Cuantificación de la acumulación de Abeta monomérico a lo largo del tiempo.

Posteriormente, analizamos mediante western blot el contenido de neurosinaptosomas, Abeta y fosfo-tau en los astrocitos tras su fagocitosis (**Fig.D3.7 y D3.8**). Para ello, utilizamos NS de animales WT y APP de 12 meses y de animales P301S de 2 y 12 meses. Nuestros resultados en el modelo tau indican que la cinética de degradación de NS (cuantificada por los marcadores sinaptofisina y PSD95) no se afecta con la edad (**Fig.D3.9**), siendo los tiempos medios de degradación de 27 ± 6.8 h para NS de TAU P301S de 2 meses (n=4) y de 20.6 ± 5 h para los de 12 meses (n=4).

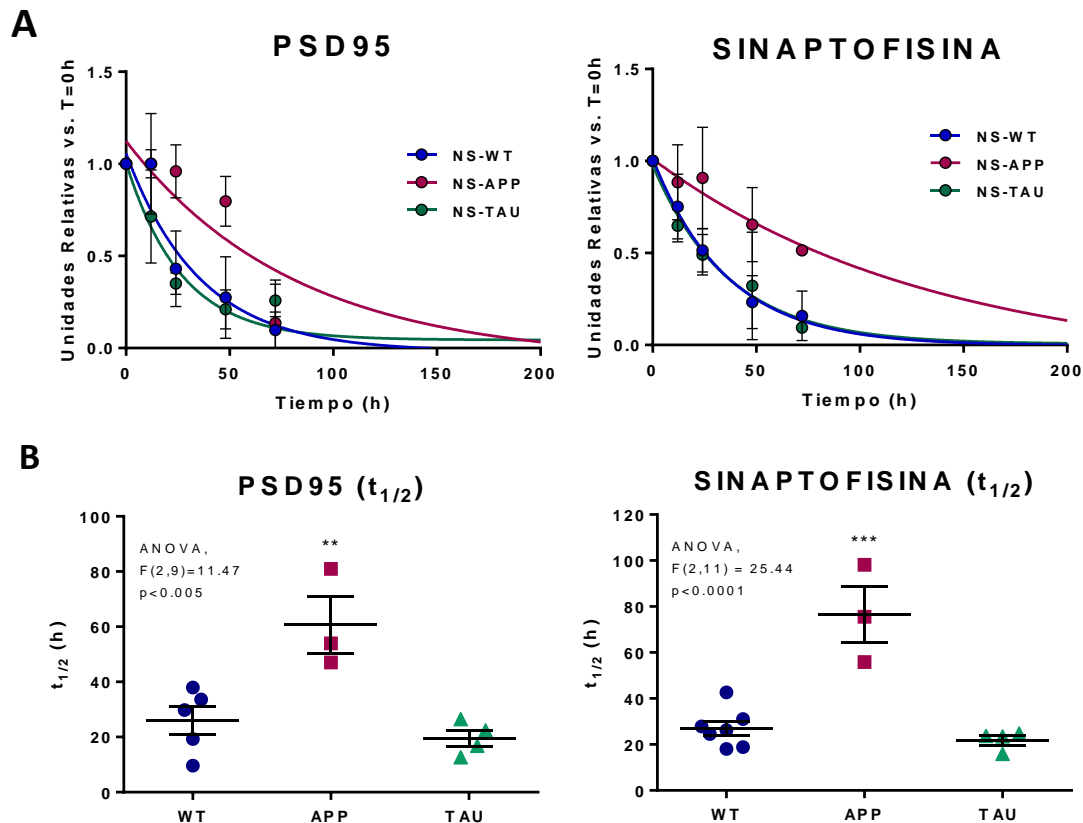


Fig.D3.9. Cuantificación de la degradación de neurosinaptosomas por parte de astrocitos primarios, mediante western blot. (A) Cuantificación y representación gráfica de la cinética de degradación de NS por los astrocitos primarios *in vitro*, mediante western blot de los marcadores pre y postsinápticos, PSD95 y sinaptofisina, respectivamente (WT, n=5-7; APP, n=3; TAU, n=4). **(B)** Representación gráfica del tiempo medio de degradación de cada uno de los NS, obtenido mediante las cinéticas anteriores. La estadística se analizó mediante el test ANOVA, seguido de un test de Tukey (** $p<0.01$; *** $p<0.001$).

Sin embargo, y de acuerdo con los resultados obtenidos previamente mediante citometría de flujo, la degradación de NS de APP de 12 meses es más lenta que la de WT y P301S de la misma edad (**Fig.D3.9**). Los tiempos medios de degradación obtenidos son similares a los calculados previamente: 25.8 ± 11.1 h (n=3) y 68.6 ± 19.6 h (n=5-7), para los NS de WT y de APP, respectivamente. Como consecuencia del enlentecimiento en el procesamiento de los NS procedentes de animales APP, el Abeta se acumula en los astrocitos durante casi 80 horas después de la fagocitosis de los NS que lo contienen (**Fig.D3.8(B)**).

Para tratar de esclarecer por qué los astrocitos tienen dificultad en procesar NS con Abeta, tratamos un cultivo de astrocitos primarios directamente con formas monoméricas u

oligoméricas de Abeta42 durante 6 horas, y caracterizamos su procesamiento mediante western blot con los anticuerpos 6E10 y 82E1. Nuestros resultados reflejan que los astrocitos degradan completamente el Abeta monomérico 24 horas después de su fagocitosis, pero no son tan eficientes procesando Abeta oligomérico que se acumula durante tiempos más largos (**Fig.D3.10**). Por lo tanto, el procesamiento de Abeta oligomérico fagocitado por los astrocitos es poco eficiente, lo que podría ser la causa del retraso en el procesamiento de los NS de animales APP.

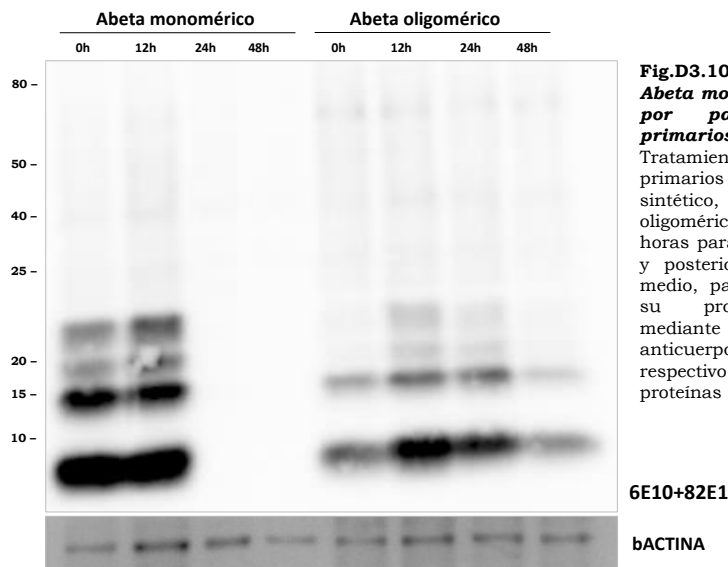


Fig.D3.10. Procesamiento de Abeta monomérico y oligomérico por parte de astrocitos primarios, tras su fagocitosis. Tratamiento de astrocitos primarios *in vitro* con Abeta42 sintético, en forma monomérica u oligomérica soluble, durante 6 horas para permitir su fagocitosis, y posteriormente se elimina del medio, para estudiar únicamente su procesamiento. Análisis mediante western blot, con los anticuerpos 6E10 y 82E1, y su respectivo control de carga de proteínas (beta-Actina).

3.2.3. Caracterización estructural de los astrocitos tras fagocitar neurosinaptosomas

Tras estudiar la fagocitosis y degradación de NS por los astrocitos mediante abordajes bioquímicos, pasamos a realizar un análisis estructural de ambos procesos. Las imágenes de MET (**Fig.D3.11**) muestran a los astrocitos sin tratamiento con un aspecto ultraestructural normal y sin inclusiones citoplasmáticas de carácter autofágico o fagocítico. Los astrocitos que fagocitan NS WT presentan en su interior algunas inclusiones citoplasmáticas electrodensas, compatibles con la acumulación de lisosomas en respuesta a un proceso fagocítico, encargadas de procesar y degradar las estructuras ingeridas. Por otra parte, los astrocitos que fagocitan NS de animales APP tienen en su citoplasma numerosas estructuras de carácter aparentemente patológico en las que se distinguen cuerpos vesiculares, estructuras multilamelares y estructuras multimembrana altamente electrodensas, lo que demuestra la naturaleza distrófica de los neurosinaptosomas de APP.

Tras realizar un inmunomarcaje-oro (Apartado B.18.5, de Materiales y Métodos) los estudios de microscopía electrónica (**Fig.D3.12**) revelan la presencia de Abeta42 en el interior de multitud de estructuras vesiculares, probablemente endosomas, junto a algunos lisosomas, lo que podría reflejar la formación de autofagosomas. Además, podemos observar estructuras ricas en Abeta rodeadas por algún tipo de membrana que parecen ilustrar el proceso endocítico de entrada al astrocito (**Fig.D3.12(D)**).

Además, realizamos un inmunomarcaje-oro con AT8 en los astrocitos que han fagocitado neurosinaptosomas de ratones TAU P301S, y comprobamos la presencia de fosfo-tau en el interior de estructuras vesiculares, seguramente endosomas, localizadas en el citoplasma de estos astrocitos (**Fig.D3.12(E)**). Sin embargo, dicho fosfo-tau parece estar en menor cantidad y en un estado más degradado que el Abeta, lo que refleja la mayor eficiencia de los astrocitos para degradar dichas formas de tau en comparación con la dificultad que hemos demostrado para procesar las formas fagocitadas de Abeta.

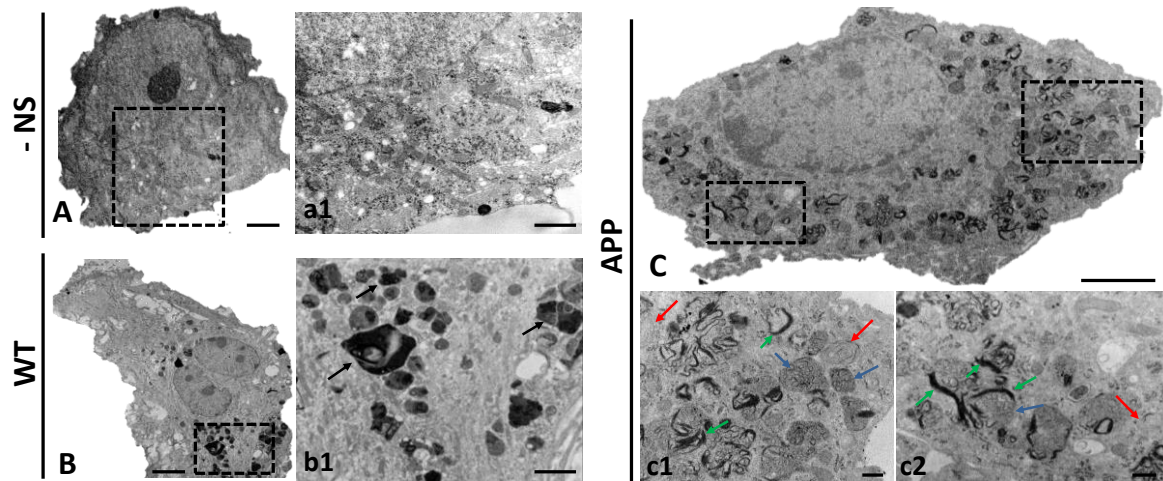


Fig.D3.11. Caracterización estructural de los astrocitos primarios tras fagocitar neurosinaptosomas de ratones WT o APP. Microscopía electrónica de transmisión de astrocitos primarios control (sin neurosinaptosomas) (**A** y detalle en *a1*), y de astrocitos tratados con neurosinaptosomas (NS) de animales WT (**B** y detalle en *b1*) o de animales APP (**C** y detalle en *c1*). Las células que no recibieron tratamiento presentan un aspecto ultraestructural normal (**A** y detalle en *a1*). Flechas negras: inclusiones citoplasmáticas de aspecto fagocítico; Flechas rojas: estructuras multilaminares; Flechas azules: cuerpos multivesiculares; Flechas verdes: estructuras multimembrana altamente electrodensas. Barras de escala: A, B y C: 5 μ m; a1-a2, a1 y a1: 2 μ m. Imágenes cedidas por el grupo de la Dra. Antonia Gutiérrez.

Por último, analizamos mediante inmunofluorescencia triple y microscopía confocal las formas fagocitadas por los astrocitos *in vitro* (**Fig.D3.13**). En los astrocitos tratados con NS sin patología (WT), existen estructuras inmunopositivas para sinaptofisina en su citoplasma, lo que ilustra la fagocitosis astrogliar de los neurosinaptosomas. Además, dichas estructuras se observan también en el interior de autofagosomas, ya que colocalizan con el marcador LC3B, lo que refleja el procesamiento de los NS ingeridos. Por otro lado los astrocitos tratados con NS de ratones APP y de ratones TAU P301S, contienen en su citoplasma marcaje inmunopositivo para Abeta42 y AT8, respectivamente, lo que demuestra que los astrocitos fagocitan NS, independientemente de su contenido. La diferencia radica en la localización intracelular de ambas proteínas, de manera que fosfo-tau (AT8) se localiza en autofagosomas (LC3B positivos), encargados de degradar los NS fagocitados de manera eficiente. Sin embargo, el Abeta, no se encuentra mayoritariamente en estructuras autofágicas, lo que refleja la dificultad de los astrocitos para procesar y degradar NS que contienen Abeta, y la acumulación anómala de dicho péptido en los astrocitos.

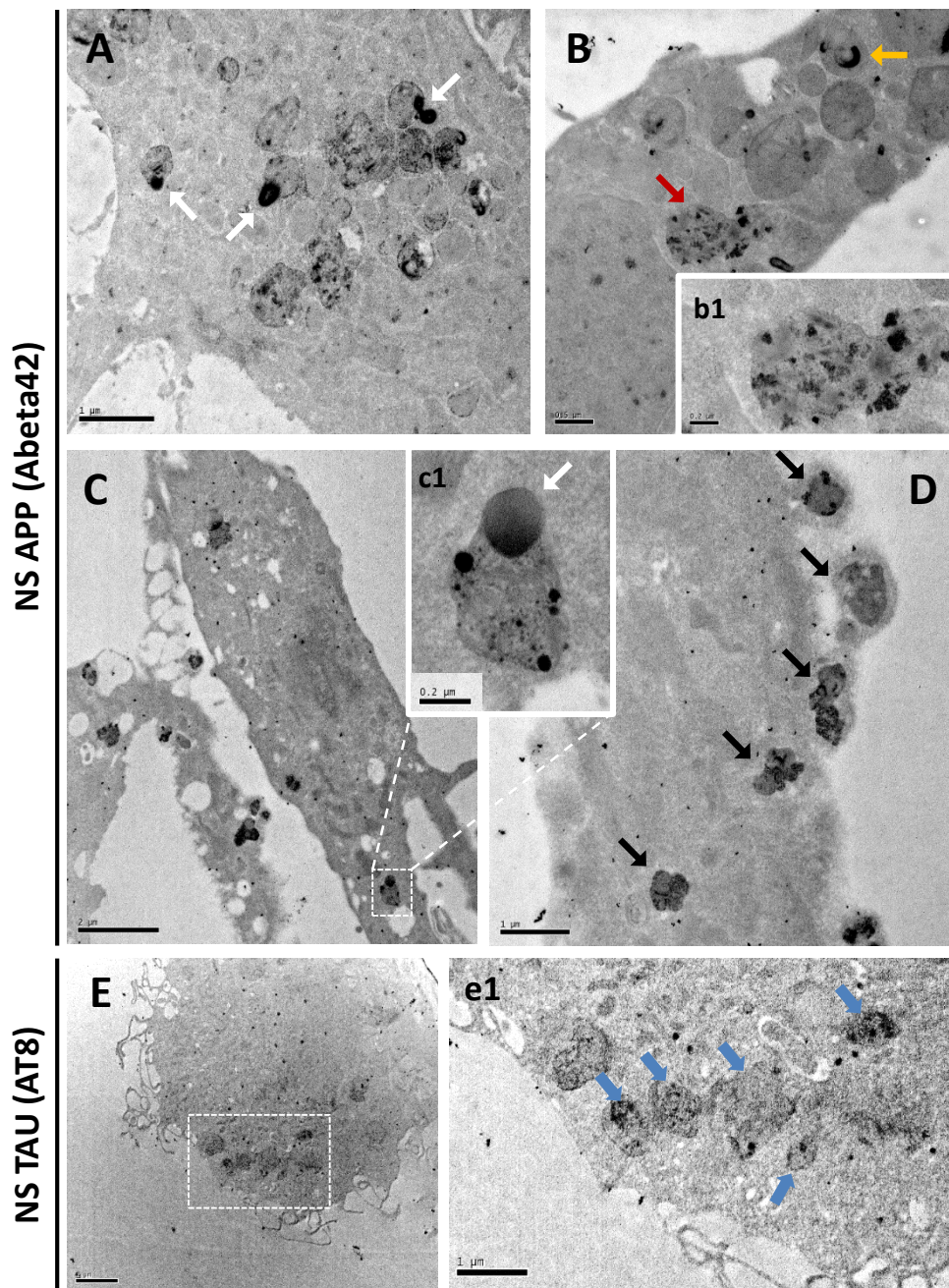


Fig.D3.12. Caracterización estructural de los astrocitos primarios tras fagocitar neurosinaptosomas de ratones APP o TAU, con inmunomarcaje-oro para Abeta42 o AT8, respectivamente. Microscopía electrónica de transmisión de astrocitos primarios tratados con neurosinaptosomas (NS) de animales APP (A-D) o TAU P301S (E), inmunomarcados con Abeta42 o AT8, respectivamente. Flechas blancas: estructuras electrodensas y vesiculares, junto a lisosomas, con Abeta; Flecha naranja: estructuras multilaminares con Abeta; Flechas negras: estructuras ricas en Abeta en un proceso de entrada al astrocito; Flechas azules: estructuras vesiculares con fosfo-tau (AT8). *b1*, *c1* y *e1* son imágenes aumentadas de A, B y E, respectivamente. Barras de escala: A, D y *e1*: 1µm, B: 0,5µm, C y E: 2µm, *b1* y *c1*: 0,2µm. Imágenes cedidas por el grupo de la Dra. Antonia Gutiérrez.

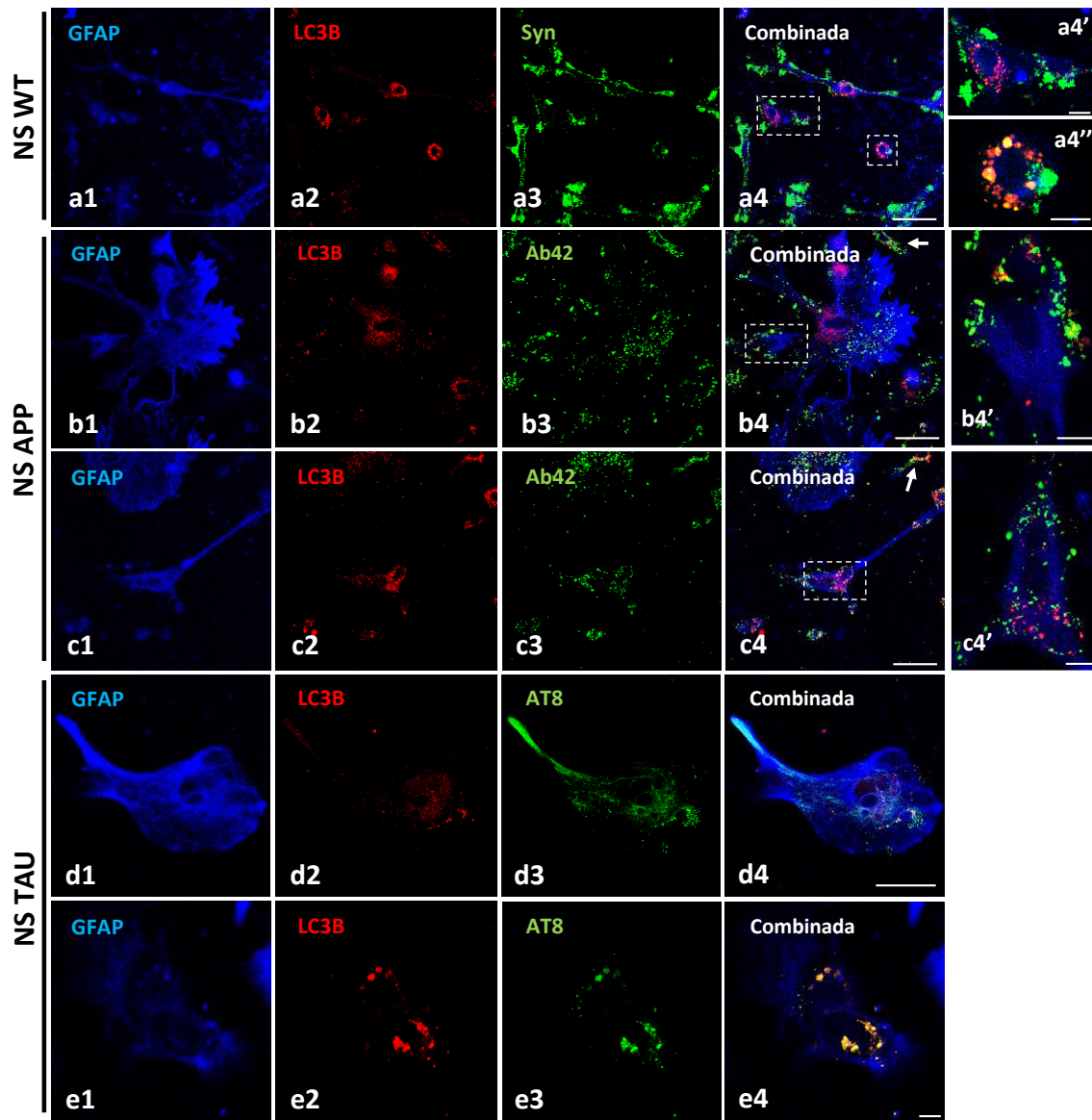


Fig.D3.13. Imágenes de inmunocitoquímica triple con microscopía confocal, de astrocitos primarios que han fagocitado neurosinaptosomas de animales WT, APP y TAU P301S. Inmunocitoquímica para los marcadores GFAP (azul), LC3B (rojo), y Sinaptofisina (Syn, verde; *a1-4*), Abeta42 (verde; *b1-4* y *c1-4*) o AT8 (verde; *d1-4* y *e1-4*). Astrocitos primarios que han fagocitado NS sin patología, de ratones WT (***a1-4***), NS con Abeta, de ratones APP (***b1-4***, ***c1-4***), o NS con fosfo-tau (AT8), de ratones TAU P301S (***d1-4***, ***e1-4***). *a4'-a4''*, *b4'* y *c4'* son imágenes aumentadas del recuadro señalado en las imágenes *a4*, *b4* y *c4*, respectivamente. Las flechas en *b4* y *c4* señalan células GFAP negativas, con acumulación de vesículas autofágicas LC3B positivas y de Abeta en su interior. Barras de escala: *a1-4*: 50 μ m, *b1-4*: 50 μ m, *c1-4*: 50 μ m, *d1-4*: 50 μ m, *e1-4*: 10 μ m, *a4'-a4''*: 10 μ m, *b4'*: 10 μ m, *c4'*: 10 μ m. Imágenes cedidas por el grupo de la Dra. Antonia Gutiérrez.

Por último, cabe señalar que en los estudios de inmunofluorescencia triple también hemos observado algunas células de pequeño tamaño GFAP negativas con numerosas vesículas autofágicas LC3B positivas, e incluso Abeta (**Fig.D3.13(*b4,c4*)**). Dichas células, por su tamaño y morfología aparente, podrían ser células microgliales que quedan en el cultivo de astrocitos, y que, como demostramos más adelante, también son capaces de ingerir NS (**Fig.D3.15(B)**).

Podemos pues concluir, que la fagocitosis de NS con Abeta oligomérico, además de ser más lenta que la fagocitosis de NS sin patología o con fosfo-tau, parece producir una alteración en la vía autofágica/lisosomal de los astrocitos que, en última instancia, podría explicar la reducción en el aclaramiento de distrofias neuríticas alrededor de los depósitos amiloides.

3.2.4. El Abeta soluble es el responsable del retraso en la cinética de fagocitosis de los neurosinaptosomas de animales APP

A continuación, nos planteamos comprobar si la alteración en la cinética de fagocitosis de NS de ratones APP estaba mediado por el Abeta acumulado en su interior. Para ello, realizamos un pretratamiento agudo de los astrocitos con la fracción S1 de ratones APP/PS1 (con Abeta oligomérico, **Fig.D2.1**) y, posteriormente, los tratamos con NS sin patología (WT) cargados con TAMRA. Los análisis de citometría de flujo revelan que los astrocitos pre-estimulados con Abeta soluble tienen el mismo retraso en la fagocitosis de NS WT que el que se producía en los NS provenientes de ratones APP (**Fig.D3.14**). Por tanto, podemos concluir que el Abeta produce un cambio específico en los astrocitos que altera su función fagocítica y que podría estar perturbando el aclaramiento de las distrofias neuronales localizadas alrededor de las placas amiloides.

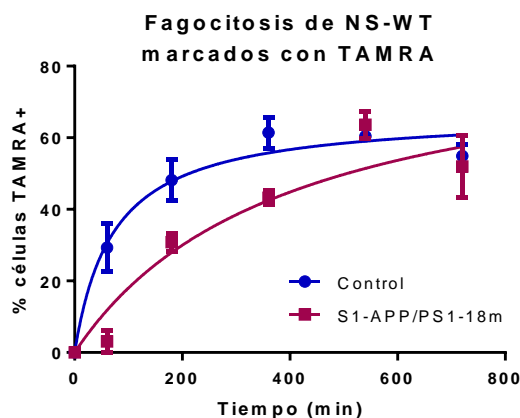


Fig.D3.14. Fagocitosis de neurosinaptosomas por astrocitos primarios pre-estimulados con Abeta oligomérico soluble. Pre-tratamiento de los astrocitos con la fracción S1 de ratones APP/PS1 de 18 meses, y medida de la cinética de fagocitosis de NS de ratones WT, cargados con TAMRA, por astrocitos primarios *in vitro* (n=3-4).

3.2.5. El retraso en la cinética de fagocitosis de neurosinaptosomas con Abeta es específico de astrocitos

Para comprobar si el Abeta dificulta la fagocitosis de NS en otros tipos celulares, realizamos experimentos similares en la línea astroglial WJE y en microglía primaria (**Fig.D3.15**). En la línea WJE se produce el mismo retraso en la captación de NS con Abeta que en los cultivos primarios de astrocitos. Sin embargo, la microglía primaria es capaz de fagocitar neurosinaptosomas de manera altamente eficiente, independientemente de la presencia de Abeta o fosfo-tau. Por tanto, podemos concluir que el retraso en la cinética de fagocitosis de estructuras sinápticas que contienen Abeta es una alteración que ocurre específicamente en células astrogliales.

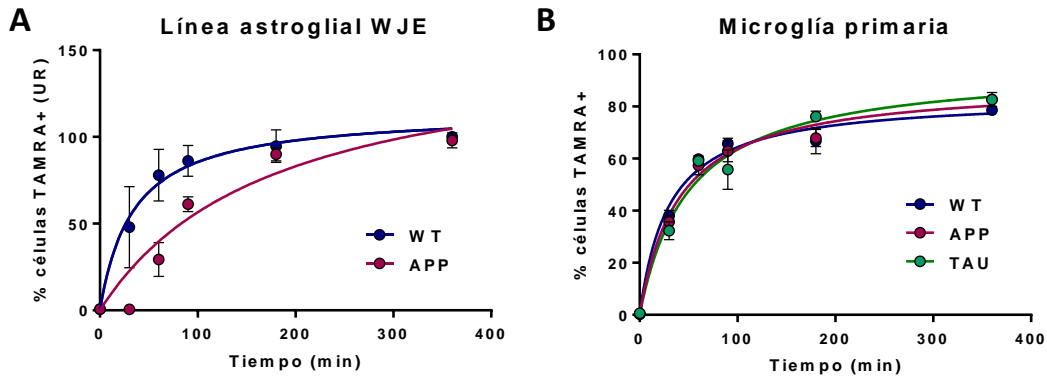


Fig.D3.15. Cinética de fagocitosis de neurosinaptosomas en la línea WJE y en microglía primaria. Cuantificación, mediante citometría de flujo, de células TAMRA positivas de la línea WJE (n=5) (A) o microgliales primarias (WT y APP, n=4; TAU, n=2) (B), respecto al tiempo.

3.3. Los neurosinaptosomas no son tóxicos para los astrocitos primarios

Para descartar que la alteración en la fagocitosis de NS con Abeta se deba a una disminución del número de astrocitos, estudiamos el posible efecto tóxico de los neurosinaptosomas sobre estas células. En la **Fig.D3.16** se demuestra que ninguno de los neurosinaptosomas utilizados produce la muerte de astrocitos, por lo que la disminución de la fagocitosis y procesamiento de NS con Abeta depende de los propios astrocitos, y no de un efecto tóxico sobre los mismos.

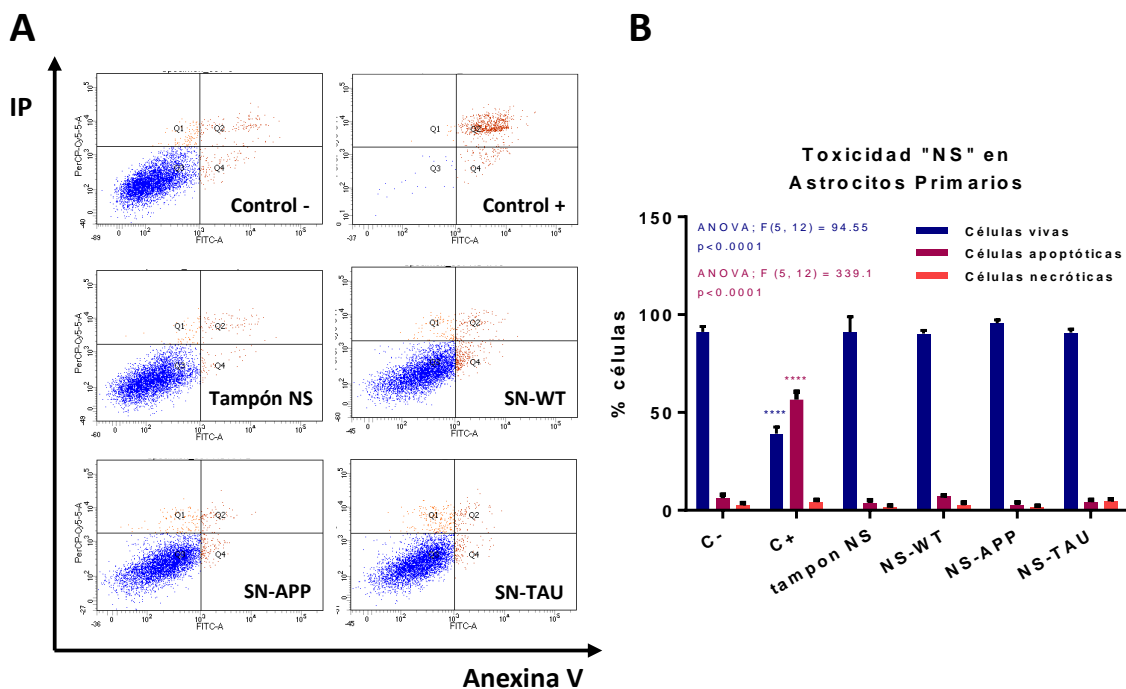


Fig.D3.16. Ensayo de toxicidad de neurosinaptosomas en astrocitos primarios in vitro. (A) Imágenes representativas del análisis por citometría de flujo de células viables (azul; AnnexinaV⁺/IP⁺), apoptóticas (rojo), en apoptosis temprana (AnnexinaV⁺/IP⁻) y en apoptosis tardía (AnnexinaV⁺/IP⁺); y células en necrosis (naranja; AnnexinaV⁻/IP⁺). (B) Cuantificación y representación gráfica del porcentaje de astrocitos viables, apoptóticos y necróticos, tras el tratamiento con neurosinaptosomas sin patología (WT), con Abeta (APP) o con fosfo-tau (TAU). Como control positivo usamos un tratamiento con *estaurosporina*, inductor de la apoptosis. Se observa que ninguno de los neurosinaptosomas es tóxico para la población astrogliar. La significancia se analiza mediante el test ANOVA, seguido del test de Tukey (****p<0.0001; n=3/condición).

3.4. Caracterización de la respuesta de los astrocitos tratados con neurosinaptosomas

Para ello, estimulamos los astrocitos primarios con los distintos NS durante 6 horas, y analizamos mediante RT-PCR la expresión de marcadores característicos de la respuesta proinflamatoria (IL6, CCL2 e iNOS) (ver Apartado 6 de Materiales y Métodos). Nuestros resultados muestran que los neurosinaptosomas de animales WT y TAU P301S producen una marcada activación astrocitaria, que es menor en el caso de los neurosinaptosomas con Abeta (APP), sólo ligeramente superior al control (sin estimular) (**Fig.D3.17**). Estos datos parecen indicar que el Abeta presente en los neurosinaptosomas de APP produce una alteración fenotípica en los astrocitos diferente a la activación clásica, pero que influye en su capacidad de fagocitosis y degradación. Sería necesaria una caracterización más exhaustiva de estos astrocitos para poder comprender el fenotipo que adquieren y las posibles causas de su alteración fagocítica y de degradación de NS.

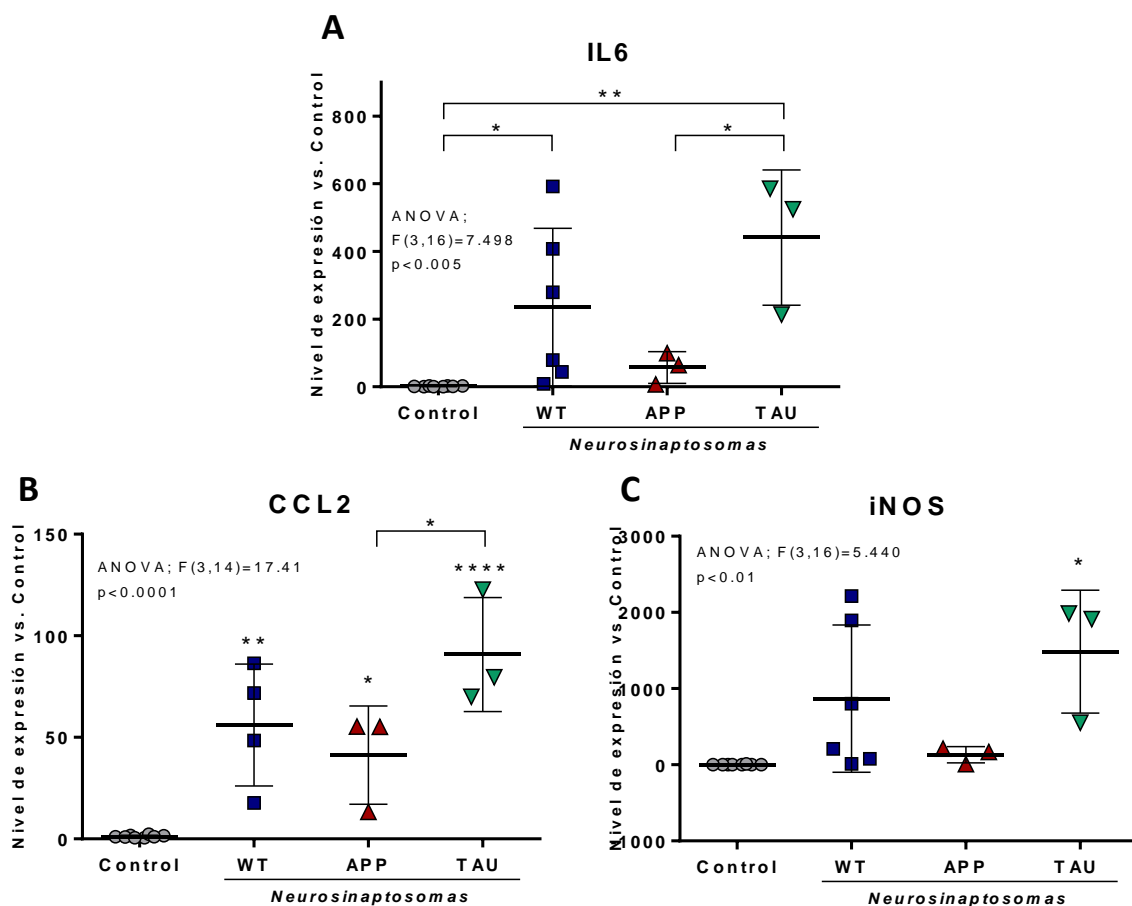


Fig.D3.17. Caracterización transcriptómica de la activación de astrocitos primarios tratados con los diferentes neurosinaptosomas in vitro. Representación gráfica de la expresión, medida por RT-PCR, de diferentes marcadores de activación de los astrocitos primarios tratados con neurosinaptosomas de ratones WT (n=6), APP (n=3) o TAU(n=3), respecto al control (sin tratamiento, n=8): **(A)** IL6, **(B)** CCL2 e **(C)** iNOS. La significancia se analiza mediante el test ANOVA, seguido del test de Tuckey (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, **** $p<0,0001$).

3.5. Efecto funcional de la respuesta de los astrocitos ante los diferentes neurosinaptosomas, sobre la activación microglial y/o la toxicidad neuronal

Seguidamente, realizamos ensayos funcionales tratando cultivos de microglía o de neuronas primarias con NS directamente y con medios condicionados por astrocitos previamente tratados con NS. Para obtener estos medios condicionados, tratamos los astrocitos primarios con los diferentes NS durante 24 horas. Los medios condicionados se centrifugan (14000xg) para eliminar los NS no fagocitados y se utilizan para los ensayos de toxicidad neuronal y de activación microglial.

En primer lugar, tratamos cultivos de neuronas primarias *in vitro* durante 48 horas y estudiamos la supervivencia neuronal mediante inmunocitoquímica con los anticuerpos MAP2 y NeuN (ver Apartado 19 y 19.2.1, de Materiales y Métodos). Nuestros resultados muestran que, únicamente el tratamiento con los NS que contienen Abeta (APP) produce muerte neuronal, reduciendo aproximadamente a la mitad el número de neuronas *in vitro* (**Fig.D3.18**). Sin embargo, este efecto no se observa al usar los medios condicionados por astrocitos tratados con dichos NS, lo que parece reflejar que los astrocitos, a pesar de acumular en su interior distrofias ricas en Abeta (por no procesarlas adecuadamente), podrían seguir ejerciendo un efecto neuroprotector y evitar el efecto tóxico de dichas estructuras sobre las neuronas. Las distrofias procedentes de ratones WT o TAU no son neurotóxicas, ni cuando se aplican sobre las neuronas de manera directa ni indirecta a través de los astrocitos.

Pasamos, a continuación, a estudiar la posible activación microglial por parte de los NS. Cuando tratamos la microglía primaria *in vitro* durante 3h con NS de animales WT o TAU P301S (con fosfo-tau) no se produce activación alguna. Sin embargo, tras el tratamiento con NS de animales APP (con Abeta) se produce activación microglial que se manifiesta por un aumento de expresión de TNF α , iNOS e IL1 β (**Fig.D3.19**). Si usamos los medios condicionados por astrocitos previamente tratados con neurosinaptosomas de APP no se manifiesta la misma activación microglial aguda. Además, en ninguno de los casos se modifica la expresión de los marcadores microgliales CD45 y CLEC7A, probablemente debido a que la inducción de estos genes específicos de activación microglial necesite tratamientos superiores a 3 horas. Por ello, sería interesante realizar un tratamiento crónico tanto con NS como con medios condicionados por astrocitos.

En definitiva, el procesamiento de las distrofias neuronales de ratones APP y del Abeta presente en ellas por parte de los astrocitos, podría resultar en una disminución del efecto neurotóxico y neuroinflamatorio producido por estas estructuras presentes en el cerebro de pacientes de Alzheimer.

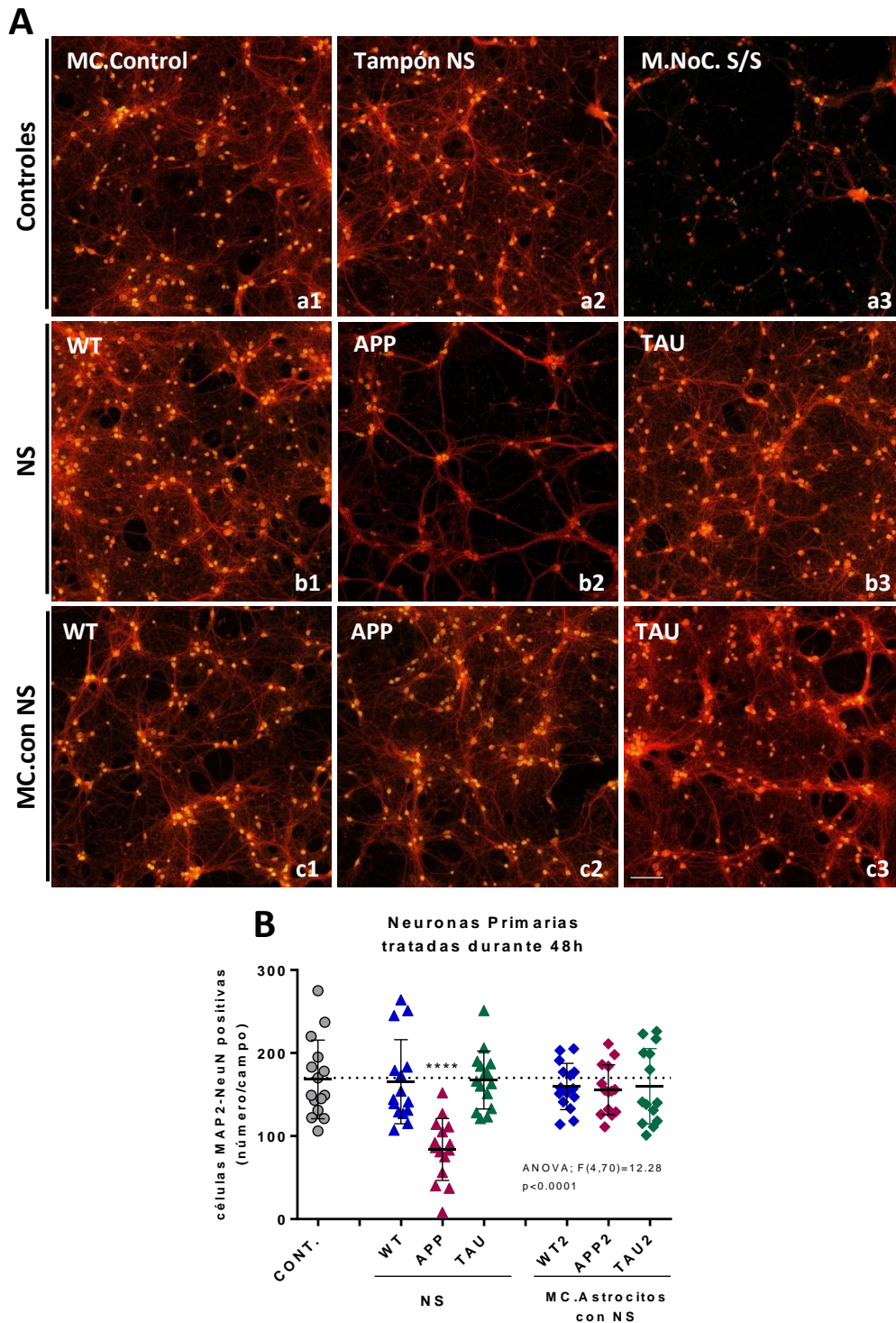


Fig.D3.18. Ensayo de toxicidad de neuronas primarias con neurosinaptosomas de ratones WT, APP y TAU, y con el medio condicionado por astrocitos, previamente tratados con dichos neurosinaptosomas. (A) Imágenes representativas de las neuronas primarias, marcadas mediante inmunocitoquímica con los anticuerpos MAP2 (rojo) y NeuN (verde), tratadas con los distintos neurosinaptosomas (NS) de ratones WT, APP y TAU P301S (*b1*, *b2* y *b3*, respectivamente); y con medios condicionados por astrocitos (MC) previamente tratados con dichos neurosinaptosomas (*c1*, *c2*, *c3*). Como control se han utilizado el tratamiento con medio condicionado por astrocitos sin tratamiento (*a1*), el tratamiento con el tampón en el que se encuentran los neurosinaptosomas (*a2*), y un control de muerte neuronal, en el que se han tratado las neuronas primarias con un medio sin suero (sin B27) (*a3*). (B) Cuantificación y representación gráfica del número de neuronas MAP2⁺/NeuN⁺. La significancia se analizó mediante el test ANOVA, seguido del test de Tukey (*****p*<0.0001; *n*=13-15). Barra de escala: 100 μ m.

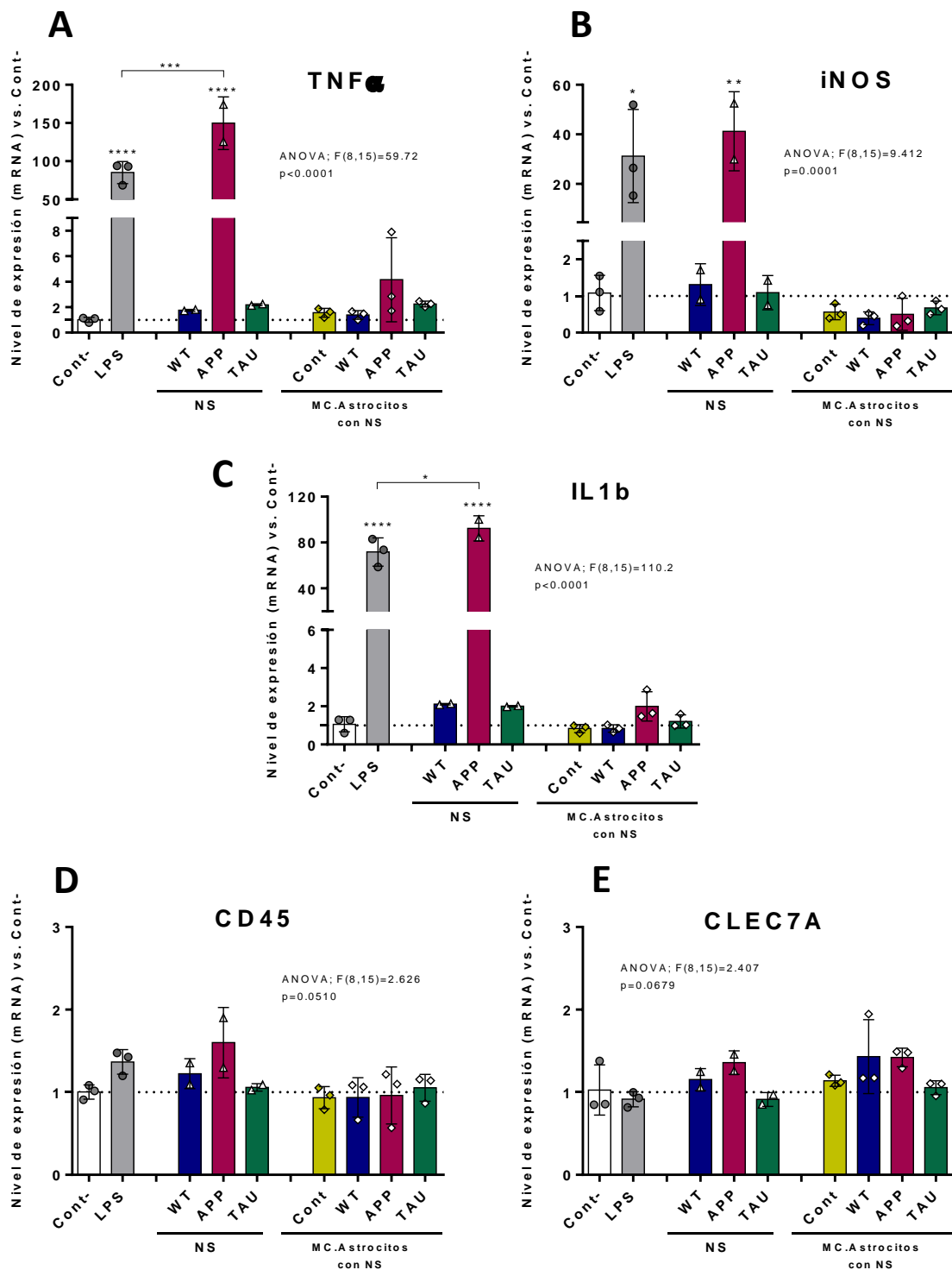


Fig.D3.19. Ensayo de estimulación de microglía primaria con neurosinaptosomas de ratones WT, APP y TAU, y con el medio condicionado por astrocitos, previamente tratados con dichos neurosinaptosomas. Representación gráfica del nivel de expresión, medido mediante RT-PCR, de diferentes marcadores de activación de la microglía, que ha sido tratada con NS de ratones WT, APP o TAU, y con medios condicionados por astrocitos previamente tratados con dichos NS, respecto al control negativo (sin tratamiento): **(A)** TNF α , **(B)** iNOS, **(C)** IL1 β , **(D)** CD45 y **(E)** CLEC7A. La significancia se analizó mediante el test ANOVA, seguido del test de Tuckey (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001; n=3).

4. CARACTERIZACIÓN DE LOS ASTROCITOS “IN VIVO”

Como ya hemos demostrado previamente, los astrocitos no presentan signos de degeneración en los pacientes de Alzheimer, sino un fenotipo reactivo caracterizado por el aumento en la expresión de proteínas como GFAP y Vimentina. La función de los astrocitos reactivos es, a día de hoy, desconocida y todavía no se sabe cómo contribuyen a la patología. Por ello, en este bloque de resultados, abordamos la caracterización y análisis del perfil transcriptómico de astrocitos aislados de modelos murinos y de muestras *postmortem* de pacientes de Alzheimer.

4.1. Caracterización transcriptómica de los astrocitos en distintos modelos de la EA

En este apartado caracterizamos, en ratones jóvenes y adultos, el perfil transcriptómico de los astrocitos en distintos modelos murinos: sin patología (WT), con placas de Abeta (APP) y con formas fosforiladas de tau (TAU P301S). Para ello, en primer lugar, pusimos a punto un método de aislamiento específico de astrocitos y, posteriormente, analizamos su perfil transcriptómico mediante arrays de hibridación.

4.1.1. Aislamiento de los astrocitos de la corteza cerebral e hipocampo de distintos modelos murinos de la EA

En primer lugar, realizamos un aislamiento selectivo de las células astrogiales, a partir de la corteza e hipocampo de ratón, mediante FACS (*Fluorescence-activated Cell Sorting*) (ver Apartado 4, de Materiales y Métodos), utilizando anticuerpos específicos unidos a diferentes fluoróforos. Elegimos los anticuerpos CD45 y CD11b para marcar específicamente las células microgliales, y el anticuerpo ACSA2, para el marcaje y aislamiento de los astrocitos (Fieldmann y col. 2014; Holt y Olsen, 2016; Kantzer y col. 2017).

Mediante citometría de flujo, seleccionamos primero la “población P1” y descartamos los restos celulares y de mielina (eventos en gris, **Fig.D4.1(A)**). Posteriormente, a partir de la población P1, seleccionamos las poblaciones celulares individuales (población P2) correspondientes a los eventos que representan la linealidad en la gráfica FSC-H/FSC-A. (**Fig.D4.1(B)**). Tras este procedimiento, marcamos con CD45 y CD11b, lo que nos permite diferenciar dos poblaciones claramente definidas (**Fig.D4.1(C)**): CD45^{high}/CD11b^{high}, correspondiente a las células microgliales (“MICRO”), y CD45⁻/CD11b⁻, donde se encuentran el resto de células. Por último, marcamos con ACSA2 las células CD45⁻/CD11b⁻ y las separamos según tengan alto marcaje (“HIGH”), intermedio (“MED”) o ausente (“NEG”) (**Fig.D4.1(D)**). Comprobamos, mediante RT-PCR, que la población CD45^{high}/CD11b^{high} es la única que expresa marcadores típicos de microglía y la CD45⁻/CD11b⁻/ACSA2^{high} la única que expresa marcadores específicos de astrocitos (**Fig.D4.1(E)**). Las poblaciones CD45⁻/CD11b⁻/ACSA2⁻ y CD45⁻/CD11b⁻/ACSA2^{med} no corresponden a células microgliales ni

astrogliales, por lo que podrían ser otros tipos de células del SNC como neuronas, oligodendrocitos, etc.

Por tanto, mediante este protocolo, somos capaces de aislar de manera específica y eficaz la población de astrocitos (CD45⁺/CD11b⁻/ACSA2^{high}) de la corteza e hipocampo de diferentes modelos murinos. Obtenemos astrocitos de edades tempranas (3 meses), adultas (12 meses, ratones WT) y posteriores a la aparición de la patología (12 meses en el modelo APP con patología Abeta y 9 meses en el modelo P301S con patología fosfo tau). Utilizamos 3-4 ratones para cada condición, de los que extraemos el ARN y realizamos su posterior análisis transcriptómico mediante array de hibridación (ver Apartados 9.1 y 16 de Materiales y Métodos).

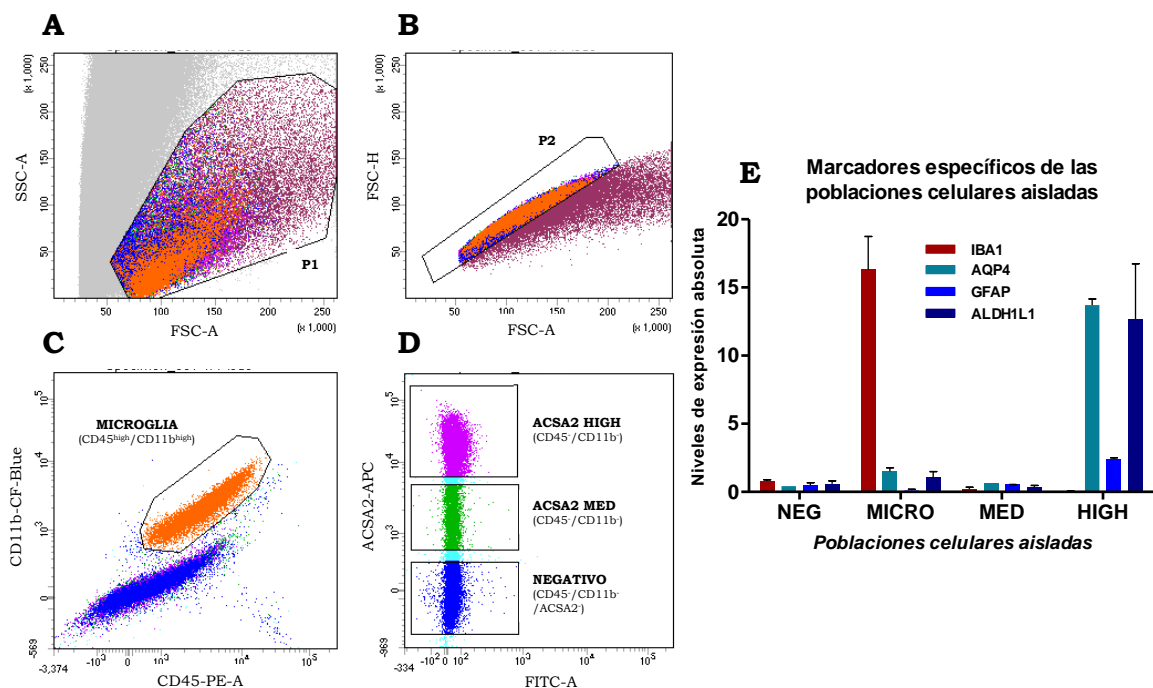


Fig.D4.1. Aislamiento específico de los astrocitos de la corteza cerebral e hipocampo de ratón. (A-D) Imágenes representativas del proceso de selección de las poblaciones de interés a través de citometría de flujo y separador celular. (A) En primer lugar representamos complejidad frente a tamaño celular (SSC/FSC), eliminamos debris, restos celulares y de mielina (gris) y seleccionamos la población de células (P1). (B): Posteriormente a partir de la población P1, seleccionamos las poblaciones celulares individuales (población P2) correspondientes a células individuales que representan la linealidad en la gráfica FSC-H/FSC-A. (C) Después separamos las células CD45⁺/CD11b⁻, que corresponden a las células de microglia ("MICRO"), del resto de células no microgliales (CD45⁺/CD11b⁺). (D) Marcamos con ACSA2 las células CD45⁺/CD11b⁻ y las separamos según tengan alto marcaje para ACSA2 ("HIGH"), intermedio ("MED") o ausente ("NEG"). (E) Representación gráfica de la expresión de los marcadores específicos de astrocitos AQP4, GFAP y ALDH1L1, y del marcador específico de microglía IBA1, para cada una de las poblaciones aisladas: "NEG", "MICRO", "MED" y "HIGH" (n=2-4).

4.1.2. Análisis transcriptómico de los astrocitos aislados de distintos modelos murinos de la EA

En primer lugar, tras caracterizar los genes expresados por los astrocitos de ratones jóvenes (3 meses) de los distintos modelos analizados, comprobamos mediante herramientas bioinformáticas, que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ellos (**Fig.D4.2(A)**), por lo que decidimos utilizarlos todos juntos como condición control ("jóvenes"). Seguidamente obtuvimos el *heatmap* que representa los genes diferencialmente

expresados en los astrocitos de ratones adultos WT (12 meses), APP (12 meses) y TAU P301S (9 meses), con respecto a los de ratones de 3 meses (**Fig.D4.2(B)**). En esta imagen podemos observar que los astrocitos de ratones TAU y APP envejecidos (9 y 12 meses, respectivamente) tienen un perfil transcriptómico bastante similar entre sí, y diferente del WT de 12 meses. En ambos modelos de patología está elevada la expresión de varios genes del sistema del complemento (C4a, C4b, C1s1 y C1ra) y de ciertas citoquinas (IL1b, IL1a, IL12a y Cxcl12), lo que puede indicar una activación de los astrocitos hacia un fenotipo neuroinflamatorio. Pero, además, también se observa una disminución en la expresión de diversos genes asociados con el metabolismo (Cpt1a, Glut1, ApoE, Ldlr, Hmgcr, Dhcr7, Dhcr24, Hif1a).

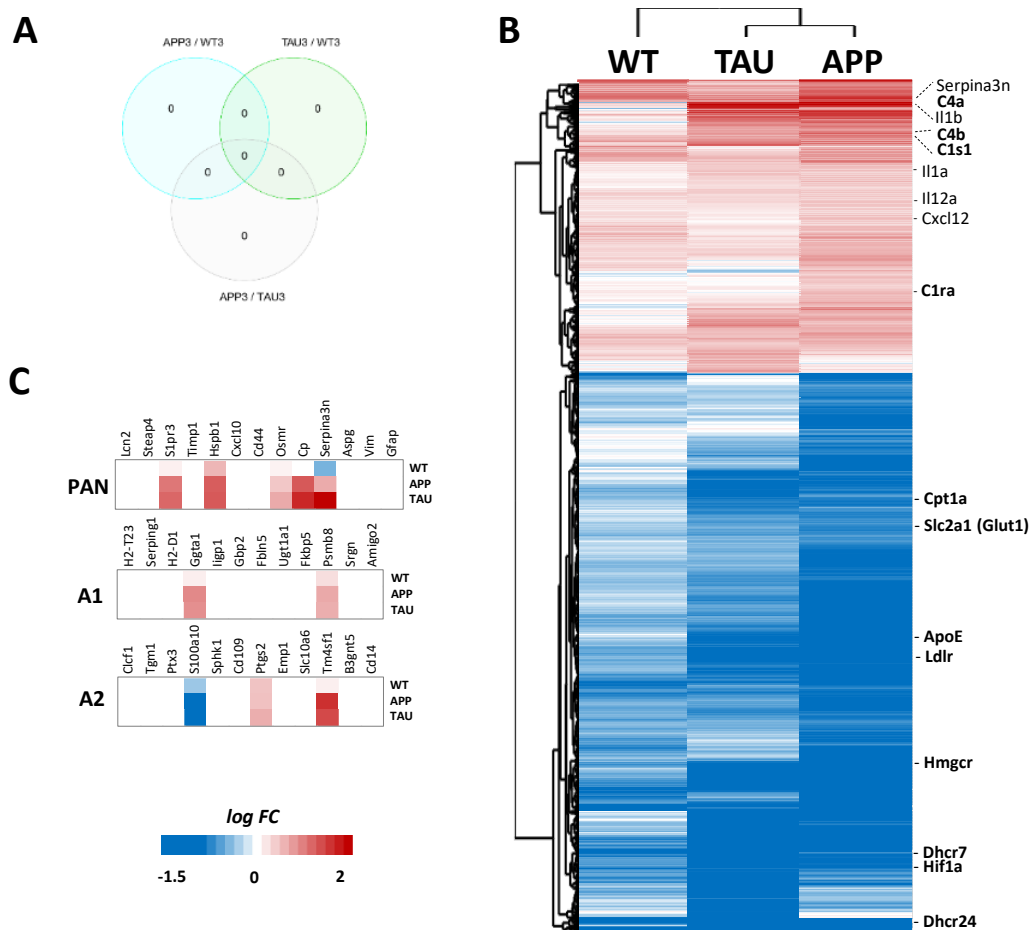


Fig.D4.2. Caracterización transcriptómica de los astrocitos aislados del cerebro de ratones transgénicos modelos de la EA. (A) Representación, mediante un diagrama de Venn, del número de genes diferencialmente expresados de los astrocitos de ratones de 3 meses, donde se observa que no existen diferencias entre ellos. (B) Análisis y representación, mediante *heatmap*, de los genes diferencialmente expresados en los astrocitos aislados de ratones adultos WT (12 meses), APP (12 meses) y TAU P301S (TAU, 9 meses), con respecto a los de 3 meses, con un $FDR < 0,05$ ($n=3-4$). El código de colores muestra el valor $logFC$. (C) Análisis y representación de los genes característicos de los fenotipos "PAN", "A1" y "A2" (Liddelow y col. 2017), cuyo color también representa los valores de $logFC$ para cada gen.

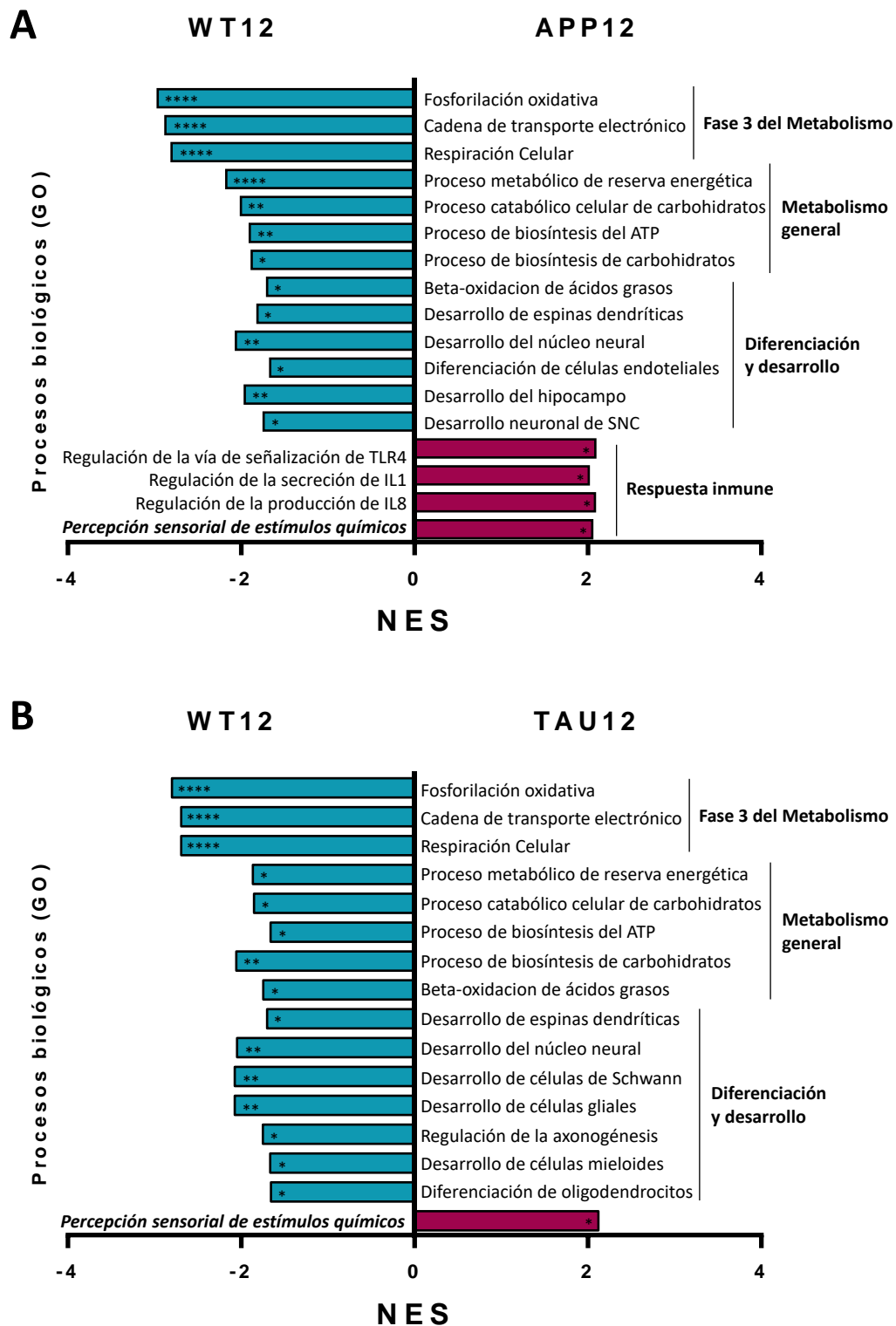


Fig.D4.3. Análisis, mediante GSEA, de procesos biológicos enriquecidos en los astrocitos aislados del cerebro de ratones transgénicos. Gráficas representativas de los procesos biológicos (GO: *gene ontology*) que se encuentran enriquecidos en los astrocitos de ratones APP de 12 meses (A) o TAU P301S de 9 meses (B), respecto a los aislados de WT de 12 meses (rojo), y viceversa (azul). NES: factor de enriquecimiento normalizado. “FDR q-val” (un valor de *p-value* ajustado) = 0,05 (*), 0,01 (**), 0,001 (***), 0,0001 (****).

En la **Fig.D4.2(C)**, se observa que estos astrocitos no muestran un fenotipo típico “A1” o “A2” (descrito por Liddelw y col. (2017); sin embargo, tienen aumentada la expresión de ciertos genes de respuesta “pan”, característicos de una respuesta general de los astrocitos a cualquier estímulo, lo que indica que están reactivos. Para caracterizar el estado de estos astrocitos, analizamos posteriormente mediante GSEA los genes up y down-regulados, y los procesos biológicos asociados a ellos. En la **Fig.D4.3**, se muestran los procesos biológicos más representativos que se encuentran enriquecidos en los astrocitos de ratones con patología Abeta (APP) o fosfo-tau (TAU P301S), comparados con aquellos aislados de ratones WT adultos.

Tanto en ratones APP como en ratones TAU P301S, encontramos un aumento en “percepción sensorial de estímulos químicos” (**Fig. D4.3**). Se trata de un proceso neurológico que podría indicar una respuesta de los astrocitos para sensar nutrientes y demás componentes del torrente sanguíneo, con el fin de mantener la homeostasis del SNC (<http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>). Además, en los astrocitos de ratones APP también se produce un enriquecimiento de procesos biológicos asociados a la activación inflamatoria. En los astrocitos de ratones TAU P301S no están enriquecidos estos procesos biológicos, aunque sí aumentan, al igual que en los astrocitos de ratones APP, varias citoquinas, receptores de citoquinas, moléculas de señalización de receptores TLR, la cascada del complemento, factores de regulación de la respuesta inflamatoria aguda y de presentación y procesamiento de antígenos (**Fig. D4.5**).

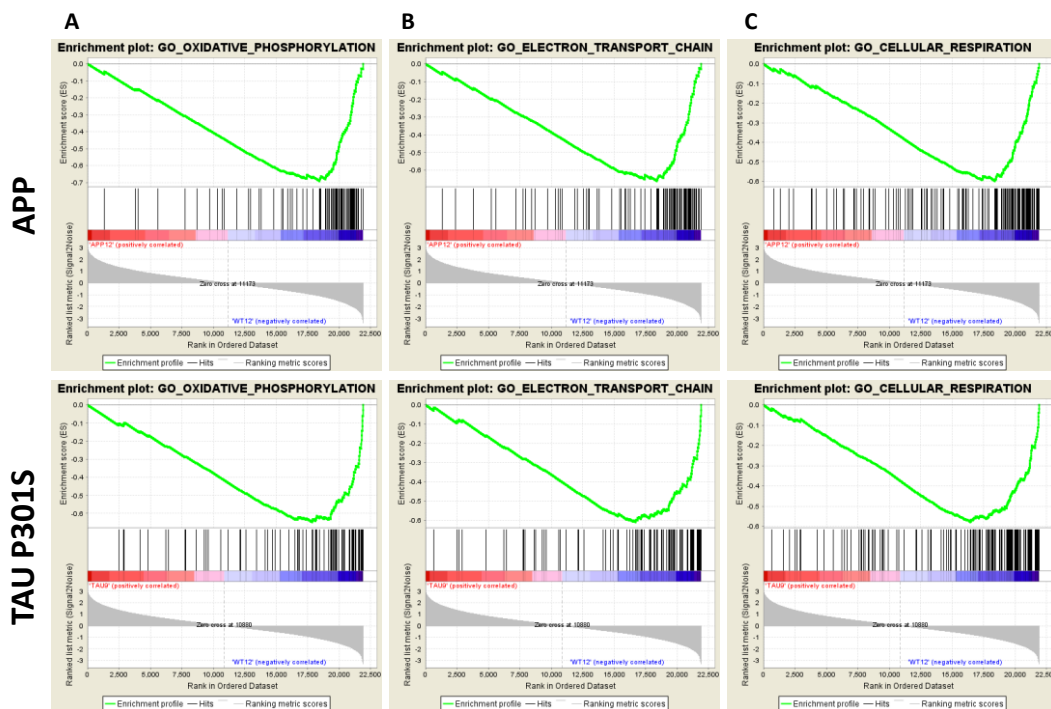


Fig.D4.4. Análisis, mediante GSEA, de procesos biológicos enriquecidos en los astrocitos aislados del cerebro de ratones transgénicos: fase 3 del metabolismo. Representación gráfica de varios procesos biológicos enriquecidos en los astrocitos aislados de ratones WT de 12 meses, respecto a los aislados de ratones APP (12 meses) y TAU P301S (9 meses), lo que significa que estas rutas se encuentran inhibidas o disminuidas en las células astrogiales de los modelos transgénicos analizados. Se muestran los siguientes procesos biológicos: **(A)** Fosforilación oxidativa, **(B)** Cadena de transporte electrónico, y **(C)** Respiración celular.

Además, existen muchos más genes cuya expresión está reducida en ratones APP y TAU P301S, lo que refleja una disminución de rutas o funciones importantes, como las implicadas en el metabolismo general de los astrocitos, o en el desarrollo y diferenciación de células, estructuras neuronales y regiones cerebrales en general (**Fig.D4.3**). Las rutas que se afectan con mayor significación estadística son las relacionadas con la fase 3 del metabolismo, como la fosforilación oxidativa, la cadena de transporte electrónico y la respiración celular (**Fig.D4.4**), además de algunos genes del ciclo de Krebs (**Fig.D4.5(B)**), lo que parece indicar una importante disfuncionalidad mitocondrial. También disminuye la expresión de numerosos genes implicados en otras rutas metabólicas importantes, como la glucólisis y gluconeogénesis, la beta-oxidación de ácidos grasos y la biosíntesis de colesterol (**Fig.D4.5**).

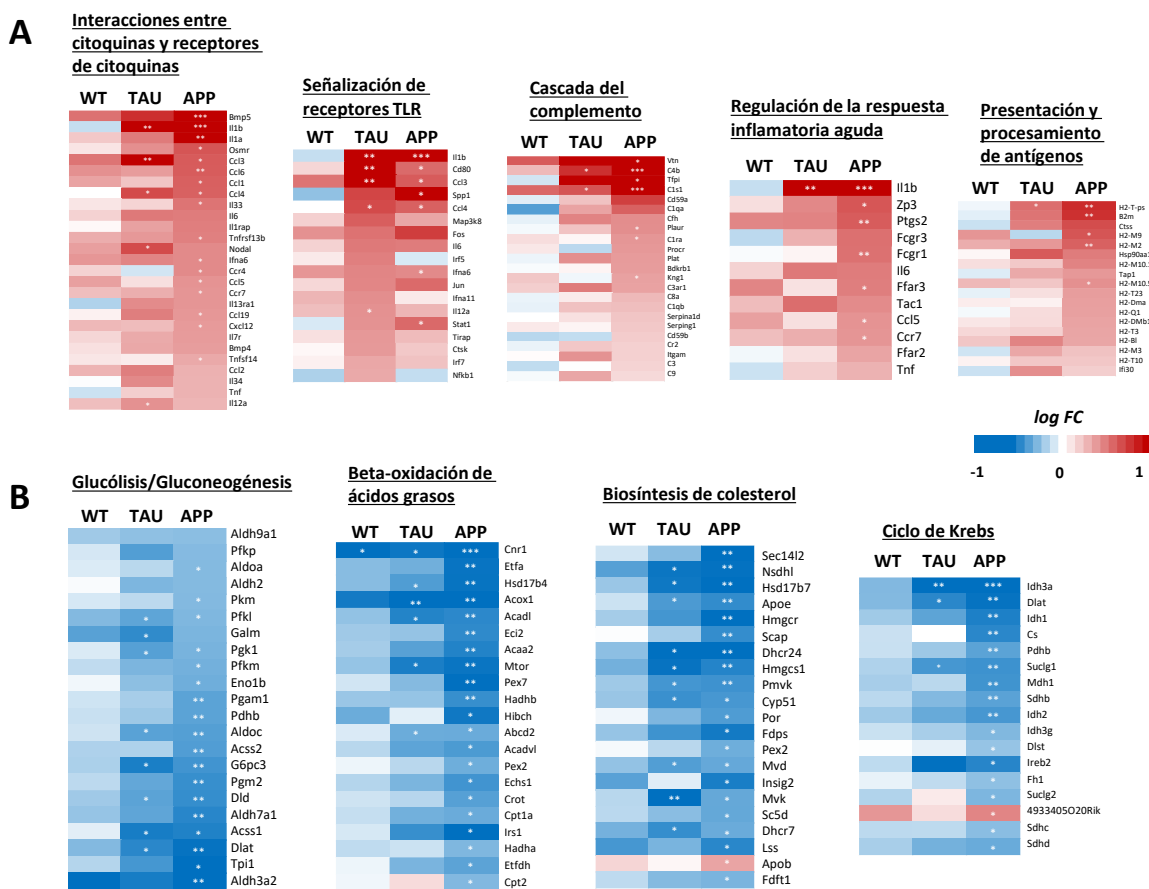


Fig.D4.5. Representación de genes diferencialmente expresados asociados a diferentes procesos biológicos, por astrocitos aislados de diferentes modelos murinos de la EA. Se muestra el *logFC*, en código de colores, de genes asociados a diversos procesos biológicos que se encuentran aumentados (**A**) o disminuidos (**B**), en los astrocitos aislados de animales de animales WT, APP y TAU P301S adultos, respecto a los animales jóvenes. “*FDR*” = 0,05 (*), 0,01 (**), 0,001 (***), 0,0001 (****).

Todos estos resultados parecen mostrar una ganancia de función tóxica, por activación de la respuesta inflamatoria, pero sobre todo una pérdida de función generalizada de los astrocitos, debida tanto a la patología Abeta como a la patología tau, lo que podría implicar una disminución de las capacidades protectoras de los astrocitos. Se requiere un análisis

más exhaustivo y funcional del estado de los astrocitos en ambos modelos, para esclarecer la implicación de estas células en el desarrollo de la EA.

4.2. Estudio de los niveles de calcio y de estrés oxidativo en las mitocondrias de los astrocitos tratados con Abeta soluble, mediante microscopía multifotón *in vivo*

Una de las alteraciones típicas de la patogénesis de la EA es la desregulación de la homeostasis del calcio y los niveles de estrés oxidativo en las neuronas. Sin embargo no se sabe si estos parámetros están alterados en los astrocitos. Para abordar esta cuestión utilizamos vectores virales que marcan las mitocondrias de los astrocitos (de ratones WT), con el fin de determinar los niveles de calcio y el estrés oxidativo de las mismas cuando son tratadas con Abeta soluble (ver Apartado 19, de Materiales y Métodos). Los experimentos se realizan usando la técnica de microscopía multifotón *in vivo* (Bacskai y Hyman, 2002), durante una estancia predoctoral en el laboratorio Dr. Bacskai, en el Massachusetts General Hospital (Harvard Medical School, EEUU).

4.2.1. Niveles de calcio en las mitocondrias de los astrocitos tratados con Abeta soluble

Para realizar dicho estudio, utilizamos el vector viral **AAV.GFAP.2mt.YC3.6**, cuyo biosensor (YC3.6) permite cuantificar ratiométricamente la variación de la concentración de calcio (ver Apartado 19 de Materiales y Métodos). Captamos imágenes en estado basal (reposo) y tras la incubación de la corteza cerebral con el medio condicionado de neuronas primarias de ratones WT y APP/PS1 durante 1 hora. Finalmente, cuantificamos el ratio de fluorescencia emitida de cada una de las mitocondrias de los astrocitos visualizados, usando los programas ImageJ y MATLAB. De esta manera, obtuvimos los histogramas de la **Fig.D4.6**, donde se representan el número de mitocondrias analizadas frente al ratio de fluorescencia emitida por cada mitocondria. Podemos observar que el tratamiento con medios condicionados con Abeta soluble produce un desplazamiento hacia la derecha del histograma, lo que indica que en las mitocondrias astrocitarias aumentan los niveles de calcio. Esto no se observa tras un tratamiento con un medio condicionado sin Abeta (WT).

4.2.2. Estrés oxidativo en las mitocondrias de los astrocitos tratados con Abeta soluble

Realizamos el mismo procedimiento que en el apartado anterior, pero utilizando **AAV.GFAP.mt.roGFP**, donde el roGFP es un biosensor de estrés oxidativo. Su cuantificación ratiométrica, permite calcular la variación del estrés oxidativo de cada mitocondria astrogliar en relación con el estado basal, en reposo (ratio~1). Los resultados obtenidos (**Fig.D4.7**) muestran un ligero desplazamiento hacia la derecha tras el tratamiento con el medio condicionado con Abeta, lo que indica que hay un aumento de estrés oxidativo en las mitocondrias de los astrocitos.

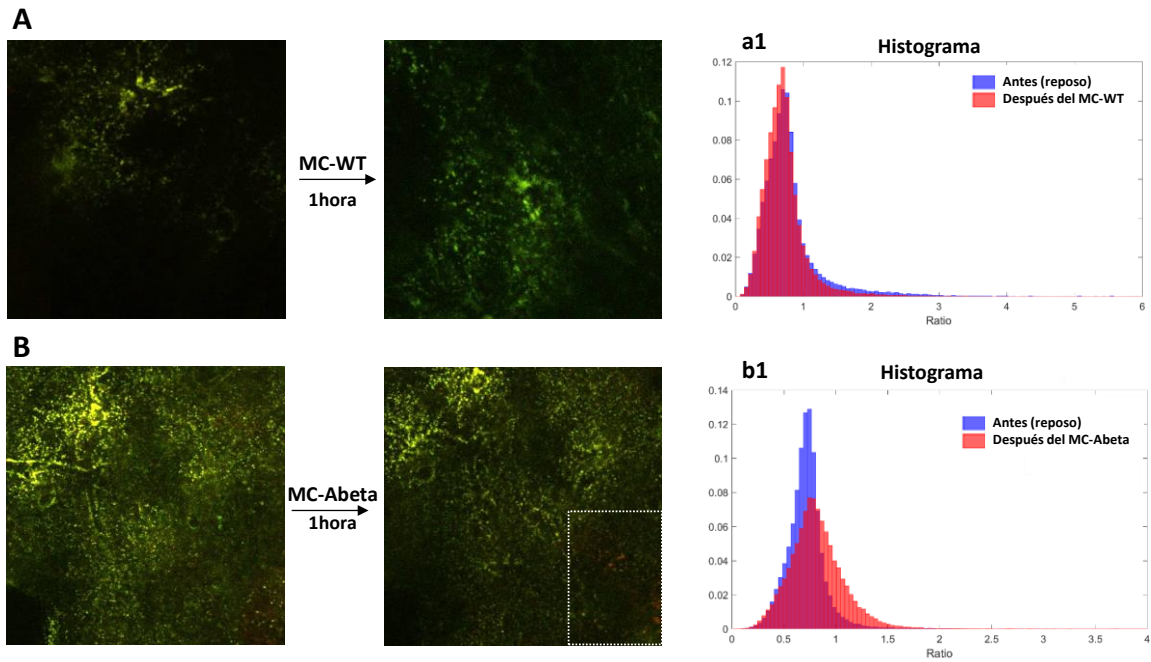


Fig.D4.6. Estudio del cambio en los niveles de calcio en las mitocondrias de los astrocitos corticales de un ratón WT, mediante microscopía multifotón *in vivo*. Imágenes de las mitocondrias de los astrocitos que expresan el vector viral AAV.GFAP.mt.YC3.6, antes y después del tratamiento con medio condicionado wildtype (MC-WT) **(A)** o con Abeta (MC-Abeta) **(B)**. *(a1, b1)* Los correspondientes histogramas obtenidos tras la cuantificación del “ratio YFP/CFP”, correspondiente al cambio en el estrés oxidativo, en cada una de las mitocondrias observadas en las imágenes.

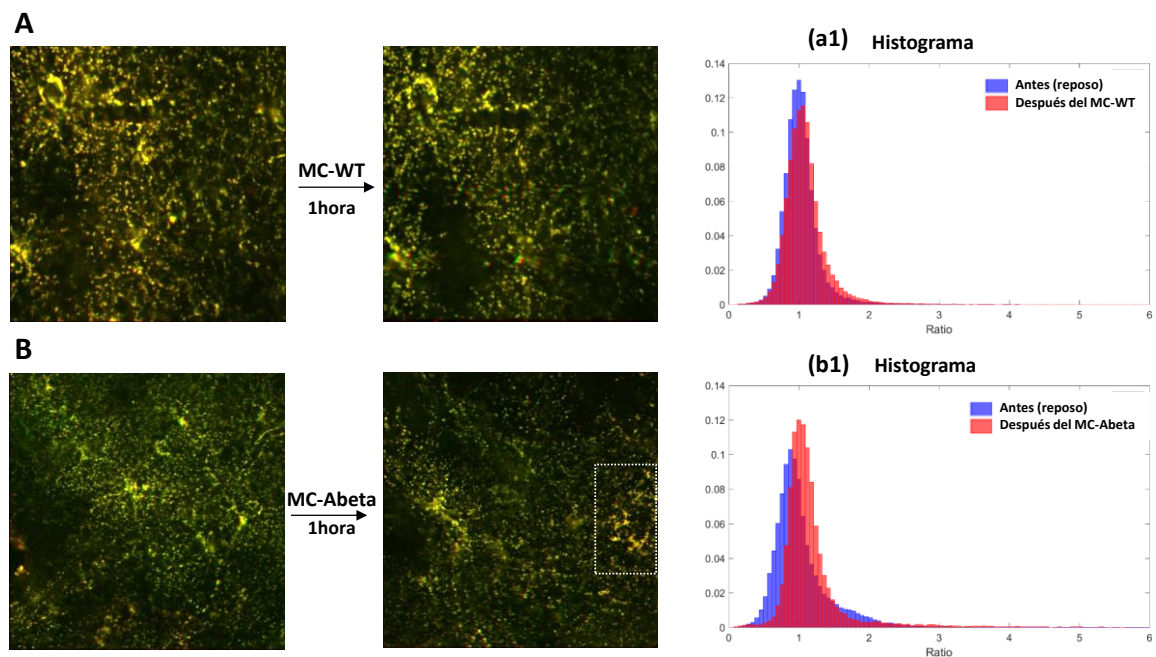


Fig.D4.7. Estudio del cambio del estrés oxidativo en las mitocondrias de los astrocitos corticales de un ratón WT, mediante microscopía multifotón *in vivo*. Imágenes de las mitocondrias de los astrocitos que expresan el vector viral AAV.GFAP.mt.roGFP / AAV.GFAP.mt.YC3,6, antes y después del tratamiento con medio condicionado wildtype (MC-WT) **(A)** o con Abeta (MC-Abeta) **(B)**. *(a1, b1)* Los correspondientes histogramas obtenidos tras la cuantificación del “ratio 800/900”, correspondiente al cambio en el estrés oxidativo en cada una de las mitocondrias observadas en las imágenes.

En resumen, cuando los astrocitos se tratan con medios condicionados con Abeta soluble se produce un aumento tanto de los niveles de calcio como de estrés oxidativo en el interior de sus mitocondrias. Sin embargo, se requieren más estudios para entender las consecuencias funcionales que esto conlleva sobre los astrocitos y sobre la patología del Alzheimer.

4.3. Caracterización transcriptómica de los astrocitos en muestras humanas *postmortem* de pacientes de Alzheimer

Para tener un estudio más amplio del perfil transcriptómico de los astrocitos en la patología de Alzheimer, sería muy interesante aislar estas células del hipocampo de pacientes, como se hizo con los modelos murinos de la enfermedad (Apartado 4.1). Sin embargo, el estado de las muestras disponibles, no nos permite aislar astrocitos, por lo que decidimos analizar la expresión de numerosos genes específicos de astrocitos con relevancia funcional. A partir de muestras congeladas de individuos clasificados según los estadios Braak, obtenemos ARNm y su ADNc (ver Apartado 1.2, de Materiales y Métodos). Posteriormente, cuantificamos la expresión de diversos genes, mediante qPCR y TaqMan® Array Cards (*microfluidic cards*; ver Apartado 15, de Materiales y Métodos).

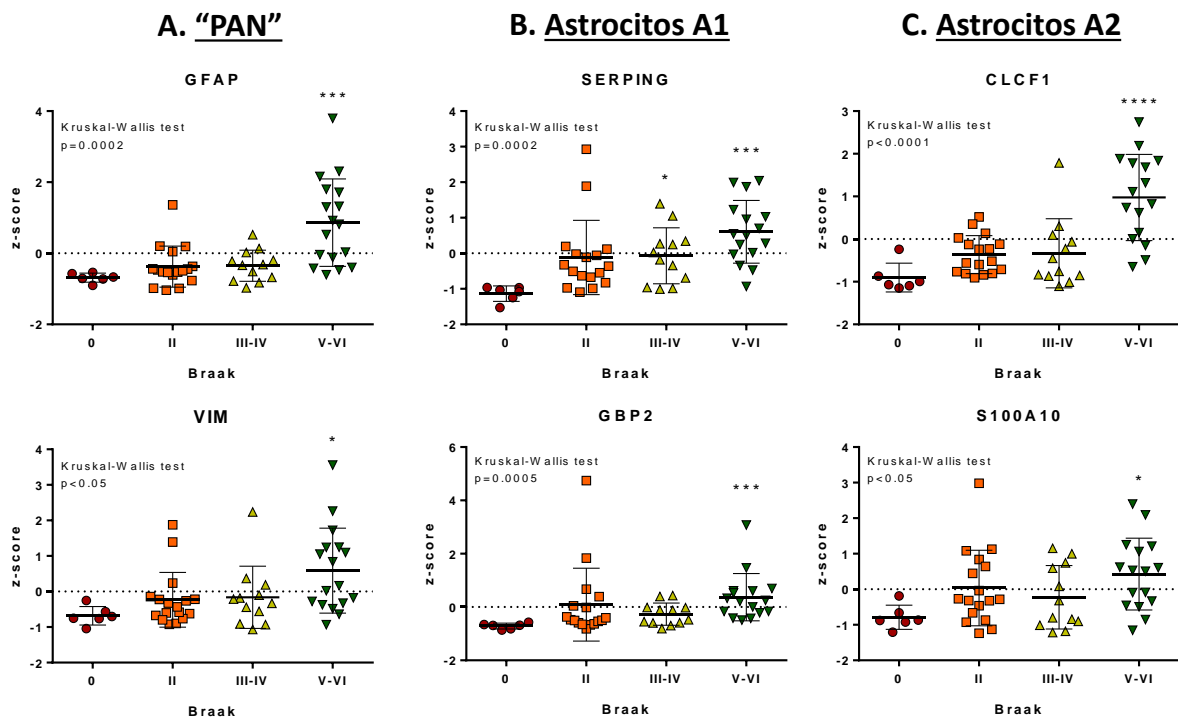


Fig.D4.8. Análisis de la expresión de varios marcadores de respuesta astroglial “pan”, A1 y A2, en muestras *postmortem* de individuos en diferentes estadios Braak. Representación de los valores de *z-score* calculados, para ciertos genes característicos de la respuesta (A) “pan” (GFAP y VIM), (B) “A1” (SERPING y GBP2) y (C) “A2” (CLCF1 y S100A10) (Liddelw y col. 2017), en el hipocampo de individuos Braak 0 (n=6), II (n=17), III-IV (n=12) y V-VI (n=16). La significancia se analizó mediante el test de Kruskal-Wallis, seguida de un test de Dunn (** $p < 0,01$).

En primer lugar, mediante qPCR analizamos varios genes característicos de los fenotipos “pan”, A1 y A2, determinados por Liddelow y col. 2017. Como se muestra en la **Fig.D4.8**, existe un aumento significativo de todos estos marcadores en las muestras Braak V-VI respecto a Braak 0, por lo que no parece existir un claro fenotipo astrogliar, sino una combinación de ellos. Aunque sería necesario analizar más marcadores característicos de estos tipos astrogliales, posteriormente decidimos analizar otros genes específicos de estas células y con relevancia funcional. Para ello, utilizamos las TaqMan® Array Cards (*microfluidic cards*; ver Apartado 15, de Materiales y Métodos).

Primero, elegimos varias sondas *housekeeper*, cuya expresión no varía en la patología de Alzheimer y que nos permiten una cuantificación real de la cantidad de ADNc de cada muestra. Para ello, utilizamos el *TaqMan™ Array Human Endogenous Control Panel* y las dos muestras humanas con menor (“A”) y mayor cantidad de ADNc (“CS”). De esta manera, cubrimos todo el rango de valores de C_T posibles. Además, para determinar la cantidad óptima de ADNc a usar, probamos 4 cantidades diferentes (50, 100, 500, 1000ng).

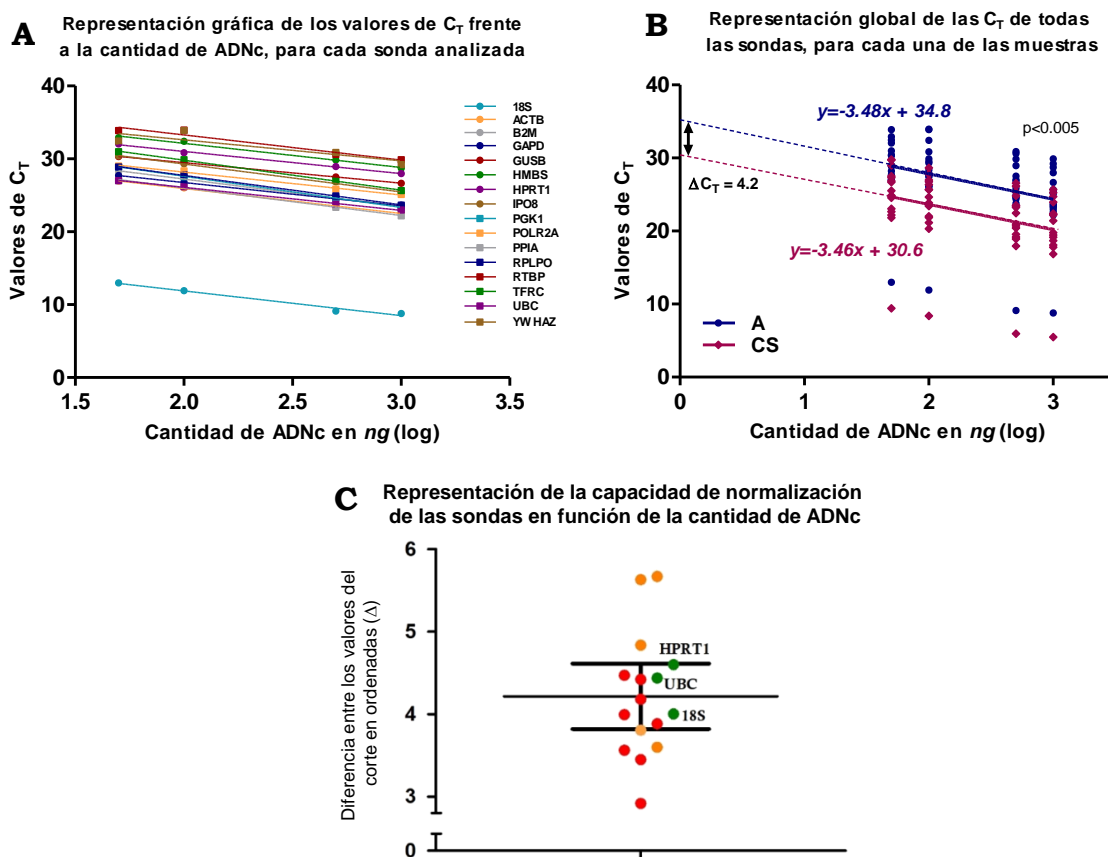


Fig.D4.9. Estudio de la eficiencia y capacidad de normalización de la cantidad de ADNc para cada sonda de control endógeno (microfluidic cards). (A) Representaciones lineales de los valores de C_T obtenidos para cada una de las sondas analizadas, en la muestra “A”; la muestra “CS” resultó en rectas similares (no mostrado). (B) Representación lineal de los valores de C_T globales de todas las sondas, para cada una de las muestras, para el cálculo de la diferencia en el número de ciclos (C_T) entre las dos muestras analizadas (“A” y “CS”). (C) Representación gráfica de la capacidad de normalización de todas las sondas, donde la media corresponde a la diferencia global calculada en (B): $\Delta=4,2$, con una variabilidad permitida de $\pm 0,4$. Rojo: sondas descartadas previamente (en A), debido a su baja eficiencia; naranja: sondas que se descartan por alejarse del valor medio de $\Delta C_T=4,2 \pm 0,4$; verde: las sondas seleccionadas por presentar una buena eficiencia y por ser capaces de normalizar correctamente la cantidad de ADNc de cada muestra ($\Delta C_T=4,2 \pm 0,4$).

La eficiencia de amplificación de cada sonda se calcula aplicando la siguiente fórmula: Eficiencia (%) = $[10^{(-1/m)} - 1] \times 100$; donde “m” es la pendiente de la relación lineal entre la C_T y la cantidad de ADNc (log) (**Fig.D4.9(A)**). Para que la eficiencia sea lo mayor posible (100%), las pendientes de dichas rectas deben ser de **-3.2** (Livak y Schmittgen, 2001; Schmittgen y Livak, 2008). De esta manera, seleccionamos todas las sondas con eficiencias entre 90 y 110%: 18S, ACTB, GAPD, HMBS, HPRT1, POLR2A, TBP y UBC.

Seguidamente, comprobamos si estas sondas son capaces de cuantificar correctamente el ADNc de partida. Para ello, aplicamos la ecuación de regresión lineal general para las muestras con niveles extremos de ADNc (“A” y “CS”), incluyendo todas las sondas, como se observa en la **Fig.D4.9(B)**. La diferencia general en los valores de ordenada en el origen ($\Delta C_T = 34.8 - 30.6 = 4.2$), corresponde a la diferencia de C_T entre las mismas (unos 4 ciclos de amplificación), y equivale a las diferencias en la cantidad de ADNc entre ambas. Aplicamos esta fórmula para cada una de las sondas individuales, lo que nos permite seleccionar las que más se ajustan al valor general ($\Delta C_T = 4.2$), que serán las mas apropiadas para normalizar la expresión génica de manera correcta (**Fig. D4.9(C)**). Aceptando una variabilidad de $\pm 0,4$, concluimos que las mejores sondas housekeepers para nuestras muestras son **18S, HPRT1 y UBC**. Además, también incluimos como control la sonda **GAPDH** porque lo exige el protocolo de las *microfluidic cards* utilizadas.

Por último, comprobamos que utilizando 100ng de ADNc obtenemos valores de C_T dentro de un rango de detección adecuado, tanto para sondas con poca expresión, como para aquellas que se expresan mucho.

Es importante tener en cuenta que el ADNc que utilizamos proviene de un fragmento de hipocampo humano homogeneizado en el que se incluyen distintos tipos de células, por lo que es necesario seleccionar cuidadosamente los genes específicos de astrocitos. Para seleccionar los genes de interés, utilizamos el algoritmo “Tau” (Kryuchkova-mostacci y Robinson-Rechavi, 2017; Yanai y col. 2005) y el método “Weighted Correlation Network Analysis” (WGCNA) que permiten identificar grupos o “clústers” de genes específicos para cada tipo de célula del SNC, asignándole a cada grupo un valor entre 0 y 1. Con este método, obtuvimos una lista de genes en la que cada uno tiene asignado un único valor “Tau” (τ) indicativo de su especificidad hacia un tipo celular. El cálculo de τ se realiza mediante la siguiente ecuación:

$$\tau = \frac{\sum_{i=1}^n (1 - \hat{x}_i)}{n - 1}; \quad \hat{x}_i = \frac{x_i}{\max(x_i)}$$

donde “ x_i ” es la expresión del gen en la población celular “i”, y “n” es el número de poblaciones celulares estudiadas. Para los astrocitos, decidimos seleccionar los genes cuyo valor “ τ ” es superior a 0.8, lo que significa que su expresión en el SNC proviene de estas células con una probabilidad superior al 80%. Para el análisis transcriptómico seleccionamos los genes que, además de ser específicos de astrocitos, pudieran tener

funciones relevantes en la astrogliosis y en la progresión de la patología del Alzheimer (Fig.D4.10).

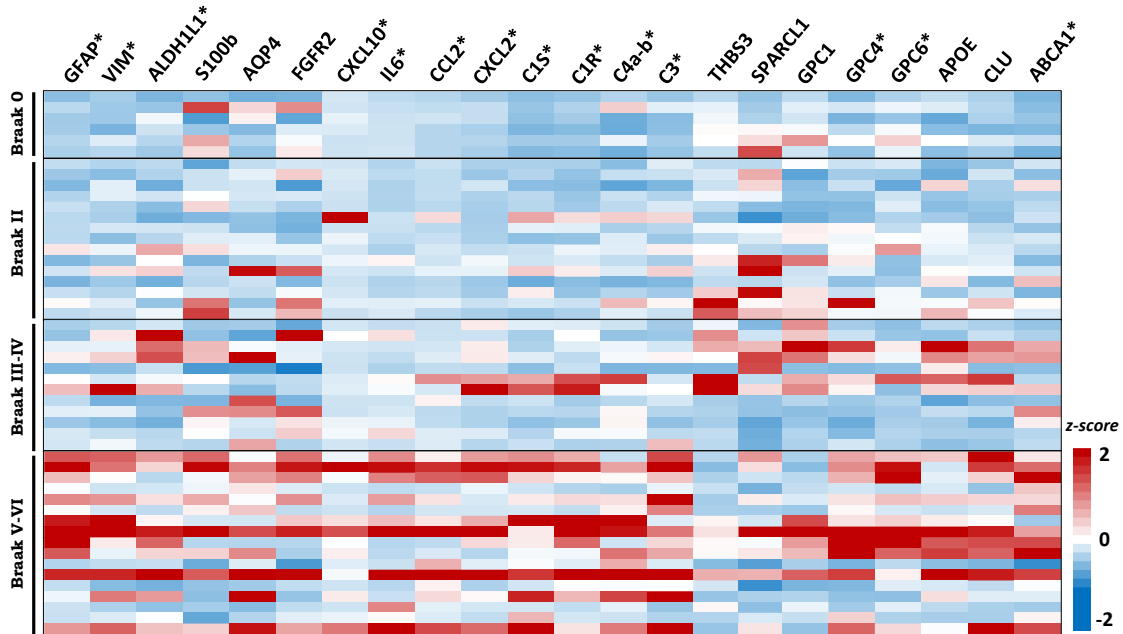


Fig.D4.10. Análisis transcriptómico de los astrocitos, en muestras postmortem de pacientes de Alzheimer. Valores de *z-score*, calculados a partir del nivel de expresión de cada marcador (columnas), para cada una de las muestras analizadas, clasificadas según los estadios de Braak (filas): 0 (n=6), II (n=17), III-IV (n=12) y V-VI (n=16). La significancia se analizó mediante el test de Kruskal-Wallis (* $p < 0,05$).

Tras medir la expresión individual de los genes seleccionados en los distintos estadios de Braak, calculamos el nivel de expresión normalizado (“*z-score*”), respecto a la media de los individuos Braak II, y lo representamos mediante un *heatmap* (Fig.D4.10). Como se observa en la figura, existen variaciones estadísticamente significativas en los genes característicos de “astrogliosis”, como GFAP, VIM y ALDH1L1, pero no de S100b ni AQP4. Además, mediante un estudio de correlaciones (Spearman; resultados no mostrados), hemos observado que los tres primeros genes correlacionan perfectamente, pero no los dos últimos, lo que podría reflejar la existencia de dos poblaciones diferentes de astrocitos, que sería interesante comprobar.

Los genes asociados a la respuesta inmune y a la neuroinflamación (CXCL10, IL6, CCL2 y CXCL2) presentan variaciones estadísticamente significativas, con un aumento en los individuos Braak V-VI, excepto FGFR2. Aunque la mayoría de estos genes no son específicos de la población astrogliar, aumenta mucho su expresión en estas células al activarse ante un daño (Ubogu y col. 2006). Además de las citoquinas y quimioquinas, la presentación de antígenos y la vía del complemento también tienen un papel importante en la respuesta inmune. De hecho, en la Fig.D4.10, se refleja un aumento significativo en varios genes de la cascada del complemento (C1S, C1R, C3 y C4a-b) en estadio Braak V-VI respecto a estadios Braak inferiores. De todos estos factores del complemento up-regulados, la proteína C3 es la única que no muestra una buena correlación con los marcadores astrocíticos GFAP, VIM y ALDH1L1, ya que también es producida por la microglía.

Referente a los genes implicados en la formación de sinapsis (THBS3, SPARCL1, GPC1, GPC4 y GPC6), solo existen variaciones significativas en GPC4, GPC6 y EPHB4. Existe también un aumento generalizado de la expresión de varios genes implicados en el transporte de lípidos y en el aclaramiento de Abeta (APOE, CLU y ABCA1), aunque el aumento sólo es significativo para este último.

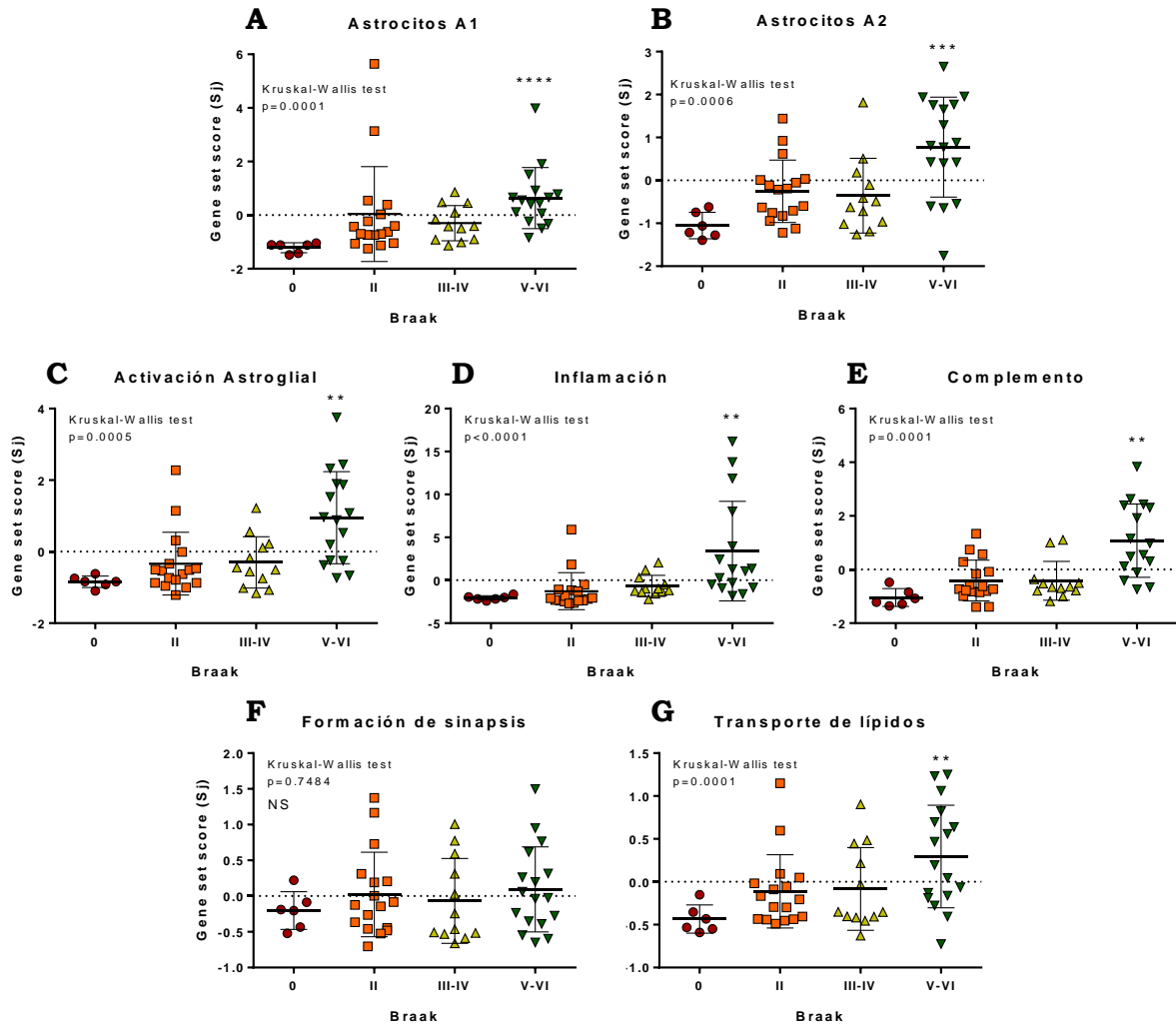


Fig.D4.11. Análisis de los “gene set score” en muestras postmortem de individuos en diferentes estadios Braak. Representación de los valores de *gene set score* calculados, para los genes incluidos en “A1” (A; SERPING1 y GBP2), “A2” (B; CLCF1 y S100A10), “Activación Astroglial” (C; GFAP, VIM, ALCH1L1), “Inflamación” (D; FGFR2, CXCL10, IL6, CCL2, CXCL2), “Complemento” (E; C1S, C1R, C3, C4a-b), “Formación de sinapsis” (F; THBS3, SPARCL1, GPC1, GPC4, GPC6) y “Transporte de lípidos” (G; APOE, CLU, ABCA1), en el hipocampo de individuos Braak 0 (n=6), II (n=17), III-IV (n=12) y V-VI (n=16). La significancia se analizó mediante el test de Kruskal-Wallis, seguida de un test de Dunn (** $p < 0,01$).

Seguidamente, decidimos agrupar los diferentes genes por categorías y calcular sus **Gene Set Score** (S_j) (Friedman y col. 2018). S_j se calcula para cada muestra “j”, utilizando el valor “ e_{ij} ”, que es el nivel de expresión normalizado (z-score) del gen “i” en la muestra “j”. En primer lugar, calculamos la matriz central de la expresión génica “ c_{ij} ” con la fórmula siguiente: $c_{ij} = e_{ij} - \frac{1}{n_s} \sum_j e_{ij}$; donde “ n_s ” es el número de muestras. “ c_{ij} ” corresponde al nivel de expresión del gen “i” en la muestra “j”, relativo al nivel de expresión medio en todas las

muestras. El *gene set score* para la muestra “j” (S_j) se define como la media de la matriz “ c_{ij} ”:
 $S_j = \frac{1}{n_g} \sum_i e_{ij}$; donde “ n_g ” es el número de genes en el conjunto de datos.

Así pues, calculamos los *gene set score* para cada grupo de genes definido anteriormente, obteniendo los resultados que se ilustran en la **Fig.D4.11**. En ella se observa un aumento significativo en los genes de astrocitos A1 y A2, de activación astrogliar, de respuesta inmune, de la vía del complemento y en los relacionados con el transporte de lípidos. Contrariamente, no existen variaciones significativas en la formación de sinapsis.

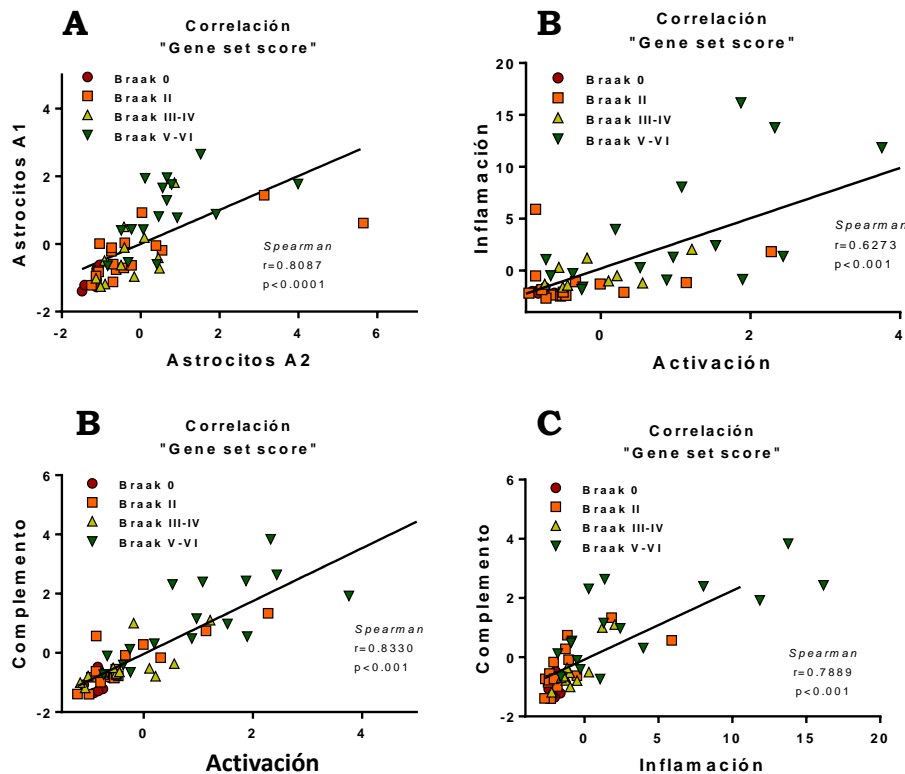


Fig.D4.12. Análisis de correlación de los “gene set score” en muestras postmortem de individuos en diferentes estadios Braak. Representaciones de correlación de los valores de “gene set score” entre: “Inflamación” y “Activación” (A), “Complemento” y “Activación” (B), y “Complemento” e “Inmune” (C), en el hipocampo de individuos Braak 0 (n=6), II (n=17), III-IV (n=12) y V-VI (n=16). La significancia se analizó mediante correlación de Spearman.

Por último, observamos una perfecta correlación entre la activación astrogliar, los genes del complemento y la respuesta inmune (**Fig.D4.12**), que son los tres grupos de genes que más aumentan en los pacientes de Alzheimer. Sorprendentemente, los genes característicos de astrocitos A1 y A2 sólo muestran una perfecta correlación entre ellos (**Fig.D4.12(A)**), pero no con respecto al resto de *gene set score* obtenidos (datos no mostrado).

Concluimos, pues, que en el cerebro de pacientes de Alzheimer (Braak V-VI) se produce una astrogliosis, acompañada de la activación de una respuesta inmune con liberación de citoquinas y de factores de la vía del complemento. Estos resultados sugieren que los astrocitos reactivos parecen intervenir de manera importante, junto con la microglía, en la neuroinflamación asociada a la progresión de la EA.

D. DISCUSIÓN

1. REACTIVIDAD ASTROGLIAL EN MODELOS ANIMALES Y EN PACIENTES DE ALZHEIMER

Junto con las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares, la neuroinflamación, mediada por una marcada reactividad microglial y astrogial, es una de las características típicas de los pacientes de Alzheimer (Heneka y col. 2015; Hansen y col. 2017; Leyns y Holtzman, 2017). Sin embargo, no se sabe si tiene un papel beneficioso o perjudicial en la progresión de la patología (Sastre y col. 2006; Wyss-Coray, 2006; Heneka y O'Banion, 2007; Reinisch y col. 2014; Heneka y col. 2015; Zhang y Jiang, 2015; Regen y col. 2017; Sofroniew y Vinters, 2010). Por lo tanto, es necesario definir los perfiles funcionales (neuroprotector, neurotóxico y/o degenerativo) de las células gliales durante el progreso de la EA, lo que podría ayudar a desarrollar estrategias terapéuticas más eficientes y seguras (Dansokho y Heneka, 2018).

La implicación de la microglía en la neuroinflamación asociada a la EA ha recibido especial atención en los últimos años por ser los elementos mediadores de la inmunidad innata cerebral (Ginhoux y col. 2010; Hansen y col. 2017; Colonna y Butovsky, 2017; Zhang y Jiang, 2018; Gutierrez y Vitorica, 2018; Hong y col. 2016; Wu y col. 2015). Aunque su papel en esta enfermedad no está completamente esclarecido, la visión más generalizada es la de una microglía activa de carácter citotóxico, productora de factores proinflamatorios (Heneka y col. 2015). Otros estudios apuntan a un mal funcionamiento de la respuesta microglial con el desarrollo de la patología de Alzheimer (Korvatska y col. 2015; Wang y col. 2015; Yuan y col. 2016) e incluso describen una microglía en estado distrófico (Baron y col. 2014; Mosher y Wyss-Coray, 2014; Streit y col. 2014; Colonna y Butovsky, 2017; Salter y Stevens, 2017). En nuestro laboratorio, hemos caracterizado la respuesta microglial, tanto en modelos animales como en muestras humanas de Alzheimer. Nuestros resultados demuestran que en el modelo amiloidogénico PS1_{M146}/APP_{751SL} la microglía se activa desde edades tempranas alrededor de las placas de Abeta y, con el progreso de la patología, la activación se expande por todo el parénquima cerebral debido a las formas solubles de Abeta oligomérico (Jimenez y col. 2008, 2011). Recientemente, hemos descrito también que en el modelo de patología TAU P301S se produce activación microglial (Romero-Molina y col. 2018). Sin embargo, en el hipocampo de pacientes de Alzheimer nuestros estudios han demostrado que la activación microglial es muy limitada (exclusivamente rodeando las placas amiloides) y que, además, se produce un proceso de degeneración microglial mediado por las formas solubles de tau fosforilado (Sanchez-Mejias y col. 2016). Las repercusiones de esta limitada activación y de la degeneración microglial sobre la evolución de la patología de Alzheimer no se conocen aún.

Por otro lado, apenas se ha contemplado el papel de los astrocitos en la EA, aunque podrían ejercer funciones cruciales en su desarrollo. Estas células desempeñan funciones múltiples e indispensables para el correcto mantenimiento del SNC (Sofroniew y Vinters, 2010; Clarke y Barres, 2013; Liddel y Barres, 2017; Zhang y Jiang, 2018; Liu y col. 2014; Acosta y col.

2017; Garwood y col. 2017) y, si se alteran, podrían mediar la disfunción neuronal típica de la EA y otros procesos neurodegenerativos (Zhang y Jiang, 2018). Ante cualquier insulto agudo o crónico en el SNC, los astrocitos pueden sufrir un proceso de “astrogliosis” caracterizada por diversos cambios morfológicos, moleculares, celulares y funcionales, con el fin de recuperar el tejido dañado (Sofroniew y Vinters, 2010; Osborn y col. 2016; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018; Verkhratsky y col. 2010). La reactividad astrogliar implica un aumento en la producción de GFAP y Vimentina (Vim), necesarios para el drástico cambio de conformación que sufre el astrocito al activarse, con un acortamiento y engrosamiento de las prolongaciones y un aumento del tamaño del soma (Chen, 2018; Verkhratsky y col. 2010; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). En el presente trabajo, hemos demostrado a nivel molecular e inmunohistoquímico que, tanto en modelos animales con patología amiloidea y tau, como en pacientes de Alzheimer, se produce una importante activación astrogliar que se caracteriza por un aumento de la expresión de GFAP y Vimentina, un incremento del área ocupada por los astrocitos y por una hipertrofia celular (Jimenez y col. 2008, 2011; Baglietto-Vargas y col. 2010; Sanchez-Varo y col. 2012; Torres y col. 2012; Trujillo-Estrada y col. 2013, 2014; Sanchez-Mejias y col. 2016; Liddelow y Barres, 2017) Además, profundizando en el modelo APP/PS1 hemos observado que, paralelo al aumento de la patología amiloide y rodeando las placas seniles, existe un aumento significativo en la expresión de BLBP (del inglés, *Brain lipid-binding protein*), marca molecular específica de astrocitos reactivos (Robel y col. 2011; Gómez-Arboledas y col. 2018).

En concordancia con nuestros resultados, numerosos autores han descrito en tejidos *postmortem* de EA (Simpson y col. 2010; Serrano-Pozo y col. 2013b) y en ratones transgénicos modelos de la enfermedad (Yeh y col. 2011; Kamphuis y col. 2015; Laurent y col. 2017), un proceso de reactividad astrocitaria que progresa con la patología amiloidea y tau, y que incluso se ha considerado como un rasgo propio de la EA (Fu y Jhamandas, 2014; Verkhratsky y col. 2010; Carter y col. 2012; Rodríguez-Arellano y col. 2016; Garwood y col. 2016; Phillips y col. 2014; Heppner y col. 2015; Heneka y col. 2014, 2015a, 2015b). La localización de los astrocitos reactivos alrededor de las placas amiloides fue referida por primera vez por Alois Alzheimer (Alzheimer, 1910). También se ha descrito una asociación espacial entre los ovillos neurofibrilares y los astrocitos reactivos (Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018), e incluso se ha propuesto que los astrocitos podrían ser mediadores de la formación de dichos ovillos neurofibrilares intracelulares (Liu y col. 2014).

Sin embargo, al igual que ocurre con la microglía, no se sabe aún si la reactividad astrogliar ejerce un papel neurotóxico o neuroprotector en la patología de la EA. Estudios preclínicos en modelos transgénicos han demostrado resultados contradictorios (Mucke y col. 2000; Furman y col. 2012; Fernandez y col. 2012; Tan y col. 2002; Green y LaFerla, 2008; Kraft y col. 2013). Se ha propuesto una gran diversidad morfológica, funcional y molecular de los astrocitos, dependiendo del contexto patológico en el que se encuentren (Zamanian y col. 2012; Liddelow y col. 2017; John Lin y col. 2017; Sosunov y col. 2014; Chai y col. 2017). Es

más, los astrocitos de las distintas regiones cerebrales tienen diferentes perfiles de expresión génica que, además, cambian con la edad (Boisvert y col. 2018). Por ello, en el presente trabajo, pretendemos caracterizar los cambios funcionales y transcriptómicos que sufren los astrocitos en presencia de Abeta y/o tau, así como establecer su posible repercusión en la patología de Alzheimer.

2. RESPUESTA ASTROGLIAL “IN VITRO” A LAS FORMAS SOLUBLES DE ABETA Y/O FOSFO-TAU: Activación de una respuesta pro-inflamatoria y disminución de la función neuroprotectora

Como hemos comentado previamente, en cerebros de pacientes de Alzheimer, se produce un proceso de degeneración microglial caracterizado por la disminución del número total de células microgliales, y presencia de una microglía patológica con prolongaciones fragmentadas y distróficas, lo que origina la reducción del dominio microglial y, por tanto, de la protección inmunológica del hipocampo (Sanchez-Mejias y col. 2016; Baron y col. 2014; Mosher y Wyss-Coray, 2014; Streit y col. 2014; Colonna y Butovsky, 2017; Salter y Stevens, 2017). Además, en nuestro laboratorio hemos demostrado que las formas de fosfo-tau solubles procedentes de hipocampos de pacientes Braak V-VI y de ratones ThyTAU (pero no las formas oligoméricas de Abeta) son las responsables de dicho efecto (Sanchez-Mejias y col. 2016). Por ello, decidimos analizar la toxicidad *in vitro* de las formas solubles de fosfo-tau y de Abeta oligomérico sobre cultivos astrogliales, y demostramos que ninguna de las dos proteínas son tóxicas para los mismos. Además, tampoco observamos ningún signo de degeneración de los astrocitos en el hipocampo de los modelos transgénicos APP/PS1 y TAU P301S, ni en el de pacientes de Alzheimer. Por lo tanto, los astrocitos sólo responden a las patologías amiloidea y fosfo-tau, típicas de la EA, activándose pero no degenerando.

Se ha descrito que los astrocitos reaccionan a cualquier insulto del SNC generando respuestas inmunes (Jensen y col. 2013), que implican cambios moleculares y funcionales (Sofroniew, 2009). En este sentido, nuestros resultados procedentes del análisis transcriptómico de las células WJE tratadas con las fracciones solubles de ratones PS1/APP, ThyTAU y de pacientes en estadio Braak V-VI, reflejan que los astrocitos responden a dichos estímulos activándose y reclutando células implicadas en la respuesta inmune del SNC asociada a la EA. Así, ante los tres tratamientos, los astrocitos aumentan la expresión de numerosas moléculas que reflejan la puesta en marcha de una típica respuesta inflamatoria y quimiotáctica, entre las que se incluyen la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), diversas especies reactivas de oxígeno, y citoquinas proinflamatorias, como TNF α , IL1 β e IL6 (Zhang y Jiang, 2015; Ubogu y col. 2006; Heneka y O'Banion, 2007; Simic y col. 2000; Litvinchuk y col. 2018). Para contrastar nuestros resultados transcriptómicos, hemos comprobado mediante RT-PCR que, las formas solubles tanto de Abeta oligomérico como de fosfo-tau, activan los astrocitos *in vitro* hacia un fenotipo pro-inflamatorio, con aumento de expresión de TNF α , iNOS e IL6. Además,

apoyando nuestros datos, diversos autores han descrito que los oligómeros de Abeta desencadenan una marcada astrogliosis (Zhang y col. 2010), caracterizada por la activación transcripcional de NF- κ beta (Akama y col. 1998; Carrero y col. 2012; Medeiros y LaFerla, 2013; Morales y col. 2014; Zhang y Jiang, 2015). Otros estudios proponen que, en la patología de Alzheimer, la astrogliosis está más asociada a los ovillos neurofibrilares que al péptido Abeta (Acosta y col. 2017). En este sentido, se ha demostrado que las formas patológicas de tau inducen una respuesta neuroinflamatoria, mediada por la activación de la microglía y los astrocitos (Laurent y col. 2018), lo que justifica el aumento en la liberación de diversas quimioquinas en diferentes modelos que sobreexpresan tau (Whang y col. 2010; Garwood y col. 2010).

Por otro lado, la pérdida de las funciones normales de los astrocitos parecen desempeñar un papel importante en las alteraciones neurológicas relacionadas con el envejecimiento (Rodríguez-Arellano y col. 2016; Alarcón-Aguilar y col. 2014; Jiang y Cadenas, 2014). En este sentido, los análisis transcriptómicos de las células WJE tratadas con fracciones solubles de animales ThyTAU y de individuos Braak V-VI, reflejan una disminución de diversos genes implicados en procesos de desarrollo, diferenciación, proliferación y morfogénesis, lo que parece indicar una reducción en la capacidad protectora de los astrocitos sobre otras células del SNC. Además, estos resultados sugieren una posible disfunción astrogliosa mediada por las formas fosforiladas de tau, que podría estar implicada en el desarrollo de la patología de Alzheimer. Es más, algunos estudios recientes han demostrado que los astrocitos pueden acumular Tau, volverse patológicos y generar una “*astrogliopatía Tau*”, similar a la descrita en el envejecimiento (Leyns y Holtzman, 2017) y en la EA (Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018).

Nuestros resultados muestran además, que la fracción soluble de ratones ThyTAU, que contienen mayores cantidades de fosfo-tau soluble que las de individuos Braak V-VI, produce también numerosas alteraciones en el ciclo celular, lo que podría reflejar estrés celular e implicar una reducción de la capacidad proliferativa de estas células. La parada del ciclo celular es una respuesta típica de células expuestas a estrés oxidativo y con daños en el ADN (Baus y col. 2003; Oyama y col. 2011), así como de células senescentes en general (Hayflick y Moorhead, 1961). Se ha descrito que los astrocitos senescentes *in vitro* disminuyen la expresión de genes relacionados con la división celular y el desarrollo y diferenciación del SNC (Crowe y col. 2016). Además, en respuesta al estrés, los astrocitos sufren una compleja respuesta caracterizada por diversas adaptaciones para mantener la supervivencia, remodelación celular, disfunción metabólica, secreción de moléculas tóxicas y, en última instancia, parada del ciclo celular (Childs y col. 2016). Es posible que las formas solubles de tau fosforilado desencadenen una respuesta similar, ya que se han descrito muchas de estas características en el cerebro de pacientes y de modelos transgénicos de Alzheimer (Arendt y col. 1996; Frost y col. 2016), así como en astrocitos aislados mediante microdissección láser del cerebro de pacientes de Alzheimer (Simpson y

col. 2011). Estos resultados refuerzan la hipótesis de que la **disfunción astrogliol**, o incluso un proceso de senescencia, podría contribuir a la progresión de la EA (Lööv y col. 2015; Masgrau y col. 2017; Acosta y col. 2017; Bernhardt, 2007; Lian y col. 2015; Macauley y col. 2011; Yamanaka y col. 2008). Por tanto, se podrían desarrollar nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a la recuperación funcional de la astrogliol para la EA y otras enfermedades neurodegenerativas (Khakh y col. 2017; Masgrau y col. 2017).

Hasta ahora hemos descrito que los astrocitos, en respuesta a las formas solubles de Abeta oligomérico y fosfo-tau se activan, y además, parecen sufrir cierta disfuncionalidad mediada por fosfo-tau soluble. Las citoquinas y especies reactivas liberados tras la activación de la respuesta inflamatoria pueden mediar, a su vez, una exacerbación de la neuroinflamación y de la neurodegeneración que se producen en la EA (Zhang y col. 2010; Scuderi y col. 2011; Johnstone y col. 1999; Tuppo y Arias, 2005; Liu y col. 2014; Morales y col. 2014). Aunque la activación de los astrocitos se ha asociado clásicamente con una ganancia de función neurotóxica, actualmente se relaciona también con una posible pérdida de las funciones neuroprotectoras (Masgrau y col. 2017; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018, Zhang y Jiang, 2015), o incluso con ambas a la vez, como parecen demostrar nuestros resultados. En este trabajo, nos hemos cuestionado si, en presencia de Abeta o fosfo-tau solubles, los astrocitos mantienen sus funciones neuroprotectoras o, por el contrario, potencian la disfunción neuronal y las alteraciones sinápticas (Forner y col. 2017; Hane y col. 2017a; Price y col. 2001), típicas de la EA (Sofroniew y Vinters, 2010; Leyns y Holtzman, 2017; Zhang y Jiang, 2015; Chen, 2018; Jeong, 2017). Para responder a esta cuestión, estudiamos la capacidad de los astrocitos para proteger a las neuronas y mantener la integridad sináptica frente a los estímulos tóxicos desencadenados por las formas solubles de Abeta y/o fosfo-tau.

Es conocido que los astrocitos *per se* tienen la capacidad de mantener tanto la supervivencia neuronal como su integridad sináptica (este trabajo; Meyer-Franke y col. 1995; Pfrieger y Barres, 1997; Aguirre-Rueda y col. 2015), ya que proporcionan los nutrientes, antioxidantes y factores tróficos necesarios para ello (Pertusa y col. 2007; Minter y col. 2016; Colonna y Butovsky, 2017; Araque y col. 2014; Vasile y col. 2017). Además, liberan señales de comunicación directa con las neuronas indispensables para la formación, maduración, función y eliminación de sinapsis (Clarke y Barres, 2013; Barres, 2008).

Existen estudios recientes que sugieren que las formas solubles de Tau y Abeta, y no sus formas fibrilares y/o agregadas, son las causantes de las alteraciones sinápticas (Crimins y col. 2013; Forner y col. 2017) y de la pérdida neuronal típicas de la EA. De acuerdo con ellos, en este trabajo demostramos que tanto el Abeta como las formas fosforiladas de tau solubles tienen un claro efecto neurotóxico, pues reducen drásticamente el número de neuronas *in vitro*. Otro estudio ha demostrado que el Abeta42 disminuye la viabilidad de neuronas primarias en cultivo (Aguirre-Rueda y col. 2015). Es conocido que los astrocitos tienen funciones nutricionales y de apoyo a las neuronas, pero también pueden protegerlas

del estrés oxidativo y la inflamación (Skaper, 2007; Wyss-Coray, 2006) presentes en el cerebro de pacientes de Alzheimer (Cole y col. 2004). Sin embargo, ciertos estados de activación de los astrocitos podría mermar el efecto protector, o incluso desencadenar un efecto perjudicial (Griffin y col. 1998). En este sentido, nuestros resultados muestran que los astrocitos son capaces de proteger completamente a las neuronas de la toxicidad del Abeta oligomérico, pero sólo parcialmente del efecto tóxico del fosfo-tau soluble. Confirmando nuestros datos, Aguirre-Rueda y col. (2015) han mostrado que los astrocitos protegen a las neuronas de la toxicidad mediada por Abeta42, aumentando la viabilidad neuronal y la biogénesis mitocondrial, así como proporcionando mayor protección contra el estrés oxidativo (Lööv y col. 2012). Sin embargo, en las taupatías, el plegamiento anómalo de tau en las neuronas es suficiente para inducir cambios morfológicos en los astrocitos que alteran su papel fisiológico (Laurent y col. 2018). De hecho, en los ratones P301S se produce un déficit en las funciones neuroprotectoras de los astrocitos, que probablemente esté implicado en la pérdida de neuronas corticales descrita en dicho modelo (Sidoryk-Wegrzynowicz y col. 2017).

Se sabe que, en la EA, la muerte neuronal está precedida por una disfunción y pérdida masiva de sinapsis (Selkoe, 2002; Spires-Jones y col. 2007; Koffie y col. 2011; Mallucci, 2009), que ocurre en las fases preclínicas (Masliah y col. 1991; Sze y col. 1997), y que correlaciona fuertemente con el déficit cognitivo que sufren los pacientes (Terry y col. 1991). En este sentido es importante destacar, que la reducción de las vesículas sinápticas, junto con la disminución de los componentes moleculares de compartimentos pre- y post-sinápticos (Arendt, 2009), se relaciona con los primeros síntomas clínicos de demencia (Masliah y col. 2001; Chang y col. 2013). Existen distintos estudios que sugieren que las formas solubles de Tau y Abeta son las causantes de la pérdida sináptica típica de la EA (Crimins y col. 2013; Forner y col. 2017). Así, en el modelo de patología tau PS19 (P301S) se produce a los 9 meses de edad una reducción de sinapsis en el área CA3 del hipocampo, junto a una gliosis reactiva, pérdida neuronal y déficits cognitivos (Yoshiyama y col. 2007, Litvinchuk y col. 2018). Otros autores demuestran que en pacientes y en modelos transgénicos de Alzheimer, el Abeta oligomérico provoca una reducción de espinas dendríticas y de sinapsis electrofisiológicamente activas (Shankar y col. 2007; Jeong, 2017), por lo que participa en la pérdida y disfunción sináptica en general, tanto *in vivo* como *in vitro* (Shankar y col. 2007; Shankar y Walsh, 2009; Viola y Klein, 2015). Todavía no está completamente esclarecido cómo Abeta y tau afectan a la integridad sináptica y a los déficits cognitivos característicos de la patología (Forner y col. 2017; Gao y col. 2018), aunque se han sugerido relaciones complejas entre ambas proteínas como las responsables de las alteraciones sinápticas de la EA (Muratore y col. 2014; Kitazawa y col. 2011; Ittner y col. 2010; Roberson y col. 2011). En este trabajo, demostramos que las fracciones solubles ricas en fosfo-tau provocan una deslocalización de marcadores sinápticos en las neuronas en cultivo, lo que refleja una disminución del número de sinapsis. Sin embargo, las fracciones

solubles de ratones APP/PS1 de 18 meses afectan de manera variable al número de sinapsis por neurona, hecho que probablemente sea debido a que las fracciones usadas en los experimentos posean distinta cantidad de Abeta oligomérico.

Como ya hemos mencionado anteriormente, los astrocitos ejercen papeles importantes en el mantenimiento y desarrollo de las sinapsis (Vasile y col. 2017). De hecho, la presencia directa de astrocitos o de su medio condicionado en cultivos neuronales favorece la sinaptogénesis y el mantenimiento, regulación y reforzamiento de las sinapsis (este trabajo; Pfrieger y Barres, 1997; Ullian y col. 2001). En este sentido, se ha descrito que los medios condicionados por astrocitos contienen señales como trombospondinas y glipicanos, que podrían regular diferentes aspectos de la sinaptogénesis (Ullian y col. 2004), e incluso podrían estar implicadas en la formación de sinapsis inhibitorias GABAérgicas (Elmariah y col. 2005a, 2005b). Sin embargo, todavía no se conoce con exactitud la posible implicación de los astrocitos en la pérdida sináptica mediada por Abeta y/o fosfo-tau. Nuestros resultados demuestran que los astrocitos en presencia de Abeta soluble siguen manteniendo su capacidad neuroprotectora. Por lo tanto, la respuesta inflamatoria de los astrocitos en respuesta a Abeta soluble, previamente descrita en este trabajo, no ejerce ningún efecto perjudicial sobre las sinapsis, ni tampoco se produce una disminución de capacidad neuroprotectora astrogliar. Sin embargo, las formas fosforiladas solubles de tau provocan un cambio significativo en los astrocitos, impidiendo que mantengan las sinapsis y las protejan del efecto tóxico del fosfo-tau. Estos resultados concuerdan perfectamente con la disminución de las capacidades neuroprotectoras o la disfuncionalidad astrogliar que reflejan nuestros análisis transcriptómicos de los astrocitos en respuesta a fosfo-tau soluble. En otras palabras, las formas fosforiladas de tau soluble producen una disminución significativa del número de sinapsis *in vitro*, que los astrocitos son incapaces de revertir, probablemente por la disfuncionalidad provocada por el propio fosfo-tau. En este sentido, existen muchas evidencias que indican que la activación astrogliar puede alterar su función moduladora de la transmisión sináptica neuronal (Verkhatsky y col. 2010), afectando tanto a la excitotoxicidad mediada por glutamato, como a la desregulación de las sinapsis inhibitorias mediadas por GABA (Acosta y col. 2017; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). Es más, estudios *in vitro* con astrocitos envejecidos demuestran una pérdida de sus propiedades funcionales y neuroprotectoras (Pertusa y col. 2007) y una alteración en la transmisión sináptica en co-cultivos con neuronas (Kawano y col. 2012).

En resumen, mientras que los astrocitos tratados con Abeta y/o fosfo-tau solubles no adquieren un claro fenotipo neurotóxico A1, expresan numerosos transcritos asociados con la neuroinflamación y la neurodegeneración. Además, en presencia de las formas fosforiladas solubles de tau, disminuyen su capacidad para mantener la supervivencia neuronal y la integridad sináptica *in vitro*. Por tanto, según nuestros datos, los astrocitos sufren, por un lado, una activación inflamatoria y quimiotáctica, pero sobretodo una pérdida de función neuroprotectora, provocada por la proteína tau fosforilada soluble,

contribuyendo así a la pérdida sináptica y neuronal característica de la EA. De manera más general, tanto la pérdida de las funciones fisiológicas de los astrocitos, como la ganancia de una función neuroinflamatoria perjudicial, podrían tener consecuencias deletéreas sobre las sinapsis y las neuronas en el SNC durante el envejecimiento en general, y en las distintas enfermedades neurodegenerativas. Sería necesario realizar análisis funcionales más profundos que nos permitan precisar los mecanismos mediados por los astrocitos disfuncionales en la alteración sináptica y la muerte neuronal producidas en la EA. Además, también habría que contemplar la interacción de los astrocitos con la microglía, ya que, de manera general, la función cerebral global resulta de la actividad coordinada de las redes microglía-astroglía (Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018) y astrocitos-neuronas (Covelo y Araque, 2018). En este sentido, se ha demostrado que la actividad neuronal también parece regular el transcriptoma de los astrocitos, pudiendo así determinar la cooperación metabólica entre ambos (Hasel y col. 2017). Es sabido que el correcto funcionamiento del SNC resulta de una coordinada y correcta relación entre estos tres tipos celulares (Rajendran y Paolicelli, 2018).

3. ALTERACIÓN DE LA FAGOCITOSIS DE DISTROFIAS NEURÍTICAS RICAS EN ABETA, POR LOS ASTROCITOS REACTIVOS “IN VITRO”

Otra característica de la EA es la aparición temprana de patología neurítica en las zonas próximas a las placas de Abeta. Como ya hemos mencionado, las placas neuríticas presentes tanto en modelos amiloidogénicos como en pacientes de Alzheimer, se encuentran rodeadas por células microgliales y astrogliales (Malm y col. 2005; Meyer-Luehmann y col. 2008; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018; Alzheimer, 1910; Chen, 2018; Liu y col. 2014). En este contexto, los astrocitos y la microglía podrían participar en la generación y progresión de dichas distrofias o, por el contrario, formar una barrera física para limitar su crecimiento y proteger las células del entorno (Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). Nuestros resultados referentes a este respecto demuestran, mediante diferentes aproximaciones experimentales, que los astrocitos reactivos que rodean las placas amiloides tienen capacidad fagocítica y son capaces de ingerir y degradar las estructuras neuronales distróficas que se acumulan alrededor de las placas neuríticas (Gómez-Arboledas y col. 2018). Es más, hemos comprobado que el número de procesos astrocíticos reactivos correlaciona con el de neuritas distróficas alrededor de las placas amiloides, más que con el tamaño de las placas. Estos resultados concuerdan con los descritos previamente en cerebros de pacientes de Alzheimer (Serrano-Pozo y col. 2013a).

Las imágenes de microscopía óptica y electrónica que se presentan en este trabajo, gracias a la colaboración con la Dra. Antonia Gutierrez (Universidad de Málaga), ilustran que las distrofias neuríticas se digieren tras ser ingeridas por los astrocitos, ya que aparecen asociadas a compartimentos lisosomales. Apoyando nuestros resultados, distintos autores han descrito que los astrocitos intervienen en la captación, aclaramiento y degradación de

Abeta (Osborn y col. 2016; Xiao y col. 2014; Jones y col. 2013; Tansey y Cammer, 1998; Wyss-Coray y col. 2003; Verkhratsky y col. 2010; Zhang y Jiang, 2015). También se encargan de eliminar células apoptóticas tras una lesión cerebral (Lööv y col. 2012), restos neuronales tras un proceso de isquemia cerebral transitoria (Morizawa y col. 2017), y de mielina tras un daño tisular (Ponath y col. 2017), protegiendo así a las neuronas sanas y al resto de células del parénquima cerebral. Los astrocitos también fagocitan sinapsis, interviniendo así en el refinamiento de los circuitos neuronales (Leyns y Holtzman, 2017; Hansen y col. 2017; Clarke y Barres, 2013; Barres, 2008; Colonna y Butovsky, 2017) que ocurre de manera normal en el desarrollo (Chung y col. 2015) y en el SNC adulto (Chung y col. 2013). Incluso son capaces de degradar mitocondrias (transmitofagia) de axones celulares ganglionares de la retina (Davis y col. 2014).

La fagocitosis de distrofias presinápticas/axonales podría constituir una función protectora de los astrocitos, en un intento por controlar la producción de Abeta y/o prevenir la respuesta neuroinflamatoria. Por tanto, las alteraciones en dicho proceso implican una disminución del papel protector de los astrocitos, que podría influir en la progresión de la EA. En este trabajo, hemos analizado la fagocitosis y degradación de estas distrofias neuríticas por parte de los astrocitos *in vitro* con el fin de aclarar sus posibles implicaciones funcionales en la patología de Alzheimer.

Apoyando los artículos que demuestran que las células astrogliales son altamente fagocíticas en cultivo (Roldán y col. 1997; Tansey y Cammer, 1998; Nielsen y col. 2010), nuestros resultados demuestran que los astrocitos primarios son capaces de fagocitar y degradar de manera altamente eficiente las terminales presinápticas o “neurosinaptosomas” (NS) aislados de ratones sin patología (WT) o que contienen formas fosforiladas de tau (TAU P301S). Sin embargo, cuando dichas estructuras contienen Abeta (de ratones APP), los astrocitos disminuyen su eficiencia tanto de fagocitosis como de degradación, por lo que las distrofias y el Abeta que contienen se mantienen más tiempo acumulados en su interior. Nosotros pensamos que el propio Abeta presente en las neuritas distróficas es probablemente el principal responsable de la disminución en la capacidad fagocítica de los astrocitos, ya que hemos comprobado experimentalmente que un tratamiento previo de neurosinaptosomas sin patología (WT) con Abeta oligomérico soluble, produce igualmente una disminución en la eficiencia de fagocitosis. Además, en este sentido se ha descrito que el Abeta42 puede inducir disfunción de los procesos de autofagia y de degradación lisosomal (Ling y col. 2009; Ling y Salvaterra, 2011).

A pesar de que se considera que la microglía es la principal célula con funciones fagocíticas en el SNC, algunos autores han mostrado mayor eficiencia en la captación de Abeta por los astrocitos que por la microglía (Nielsen y col. 2010; Söllvander y col. 2016). En relación con la fagocitosis de neuritas distróficas, se ha demostrado en un modelo APP/PS1 que la microglía activa también es capaz de fagocitar elementos sinápticos distróficos (Bisht y col.

2016). En este sentido, nuestros resultados corroboran que la microglía en cultivo, al igual que los astrocitos, fagocita de manera altamente eficiente estas estructuras distróficas. Sin embargo, y contrario a lo que ocurre en las células astrogiales, no hemos observado disminución de la capacidad fagocítica microglial de distrofias ricas en Abeta.

Numerosos estudios muestran que tanto neuronas como astrocitos y microglía son capaces de fagocitar Abeta (Mohamed y Posse de Chaves, 2011; Cheung y col. 2014; Zandl-Lang y col. 2018). Los astrocitos, con el fin de limitar el avance de la patología amiloide, son capaces de aclarar distintas formas del péptido Abeta tanto *in vitro* como *in vivo* (este trabajo; Gómez-Arboledas y col. 2018; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018; Nagele y col. 2003; Wyss-Coray y col. 2003; Osborn y col. 2016) a través de distintos mecanismos: i) mediante su fagocitosis y degradación lisosomal (Lee y Landreth, 2010; Ries y Sastre, 2016; Xiao y col. 2014; Garwood y col. 2016; Verkhratsky y col. 2010), ii) mediante la liberación de enzimas degradadoras de Abeta (Ries y Sastre, 2016; Miners y col. 2008; Verkhratsky y col. 2010; Mohajeri y col. 2002; Apelt y col. 2003; Acosta y col. 2017; Yin y col. 2006), iii) mediante su participación en el “sistema glinfático” (Nedergaard, 2013) a través de la AQP4 localizada en su membrana (Ilf y col. 2012; Ries y Sastre, 2016; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018; Zenaro y col. 2017). La astroglia expresa una amplia variedad de receptores fagocíticos capaces de reconocer al péptido amiloide, como CD36, CD47, LRP1 (del inglés “low density lipoprotein receptor-related protein”) SCARB1, RAGE (del inglés *receptor for advanced glycation end products*), TLRs, receptores de acetilcolina, scavenger receptors, etc (Sokolowski y col. 2011; Jones y col. 2013; Li y col. 2014; Villarreal y col. 2014; Batarseh y col. 2016; Jones y col. 2013; González-Reyes y col. 2017). La elevada expresión astrocitaria de ApoE también está relacionada con la captación e internalización de Abeta, ya que ambos parecen competir por las mismas vías de internalización (Nielsen y col. 2010; Mulder y col. 2014; Osborn y col. 2016). Sin embargo, se ha sugerido que todos estos procesos podrían estar alterados en la patogénesis de la EA (Wyss-Coray y col. 2003; Guénette, 2003).

La implicación de la vía lisosomal en la degradación intracelular de Abeta se ha demostrado en el modelo amiloidogénico PS1/APP tras estimular la biogénesis de los lisosomas con el factor de transcripción EB, y comprobar que se reduce la carga amiloide (Xiao y col. 2014). En este sentido, nuestros resultados muestran que las formas monoméricas de Abeta son fácilmente procesadas por los astrocitos tras su fagocitosis; sin embargo, las formas oligoméricas se acumulan durante más tiempo en su interior, lo que parece indicar que estas formas del péptido están alterando de alguna manera los sistemas de degradación. Aunque se sabe que los astrocitos son capaces de captar Abeta y degradarlo de manera eficiente en los lisosomas (Shaffer y col. 1995; Wyss-Coray y col. 2003; Nielsen y col. 2009), se ha comprobado recientemente que la acumulación intracelular prolongada de protofibrillas de Abeta en los astrocitos produce disfunción de su sistema endocítico-lisosomal (Söllvander y col. 2016). Apoyando estos resultados, otros autores han demostrado que los astrocitos de ratones PS1_{M146V} tienen un tráfico vesicular alterado

(Stenovec y col. 2016). Además, la acumulación extracelular de Abeta se ha asociado a una disminución de los mecanismos de eliminación o degradación de dicho péptido (Son y col. 2016). Curiosamente, en este sentido, se ha demostrado que el ácido acetil salicílico induce la biogénesis de lisosomas en un modelo murino de EA, y aumenta la captación y la degradación de Abeta en astrocitos *in vitro*, por lo que disminuye el contenido total de Abeta (Chandra y col. 2018). Por lo tanto, estimular la biogénesis de lisosomas y su acidificación podría ser una estrategia para potenciar la degradación lisosomal tanto de Abeta como de las distrofias neuríticas ingeridas por los astrocitos.

Nuestros resultados a este respecto demuestran, mediante inmunocitoquímica y microscopía electrónica, que los astrocitos internalizan el Abeta o el fosfo-tau presentes en los neurosinaptosomas, ya que ambas proteínas se localizan en el interior de estructuras vesiculares, que parecen ser endosomas o lisosomas, encargadas de digerir el material fagocitado. En concreto, el fosfo-tau aparece en las imágenes en un proceso de degradación más avanzado que el Abeta. Sin embargo, en los astrocitos que fagocitan distrofias neuronales ricas en Abeta, existen numerosas inclusiones citoplasmáticas de carácter aparentemente patológico, que son muy diferentes a las inclusiones de aspecto fagocítico (ej. estructuras lisosomales) que aperecen cuando fagocitan neurosinaptosomas sin Abeta. Además, el Abeta se localiza en el interior de multitud de estructuras electrodensas y vesiculares, pero no colocalizan con las estructuras LC3B positivas (autofagosomas), lo que indica que esta proteína podría almacenarse, además, en otros compartimentos o estructuras vesiculares diferentes. Algunos autores postulan que la principal causa por la que los astrocitos pierden capacidad para digerir el material fagocitado son los anillos de actina que aparecen alrededor de los fagosomas, ya que parecen impedir físicamente la fusión de los fagolisosomas (Lööv y col. 2015). En este sentido, nuestras imágenes de microscopía electrónica en animales APP/PS1 muestran numerosas neuritas distróficas fagocitadas rodeadas totalmente de filamentos gliales (filamentos intermedios) (Gómez-Arboledas y col. 2018) que, junto a las inclusiones citoplasmáticas también observadas, podrían explicar la reducida capacidad astrogliar para la fusión de los lisosomas y, en última instancia, para la degradación del propio Abeta oligomérico y de las distrofias internalizadas ricas en Abeta. Es más, la entrada masiva de Abeta u otras proteínas en los lisosomas podría exceder su capacidad de degradación y causar la desregulación de su actividad (Gwon y col. 2018; Ling y col. 2009; Song y col. 2011). Aunque no se conoce el mecanismo exacto, el Abeta puede ocasionar la ruptura de lisosomas y la liberación de su contenido, que se acumularía en otros compartimentos celulares como mitocondrias, cuerpos multivesiculares e incluso en el citoplasma (Friedrich y col. 2010; Umeda y col. 2011; Gwon y col. 2018; Kandimalla y col. 2009). Es más, las alteraciones en el flujo autofágico originadas, entre otros factores, por la acumulación de Abeta en los lisosomas, parecen ser mediadoras del daño neuronal típico de la EA (Pickford y col. 2008; Caccamo y col. 2017). Se ha propuesto que la acumulación de Abeta en el interior celular podría

favorecer la formación de semillas amiloides y participar, así, en su agregación y neurotoxicidad asociadas (Hu y col. 2009; Poduslo y col. 2012). Por tanto, el hecho de que los astrocitos tengan dificultad para degradar las formas oligoméricas de Abeta podría ser un determinante de su toxicidad.

En resumen, la fagocitosis de NS que contienen Abeta, además de ser más lenta que la fagocitosis de NS sin patología o con fosfo-tau, se produce de una manera aberrante, lo que implica la generación de numerosas estructuras vesiculares y la acumulación mantenida de Abeta en el interior de los astrocitos. Esta alteración en la vía autofagocítica/lisosomal de los astrocitos podría provocarles mayores daños a nivel molecular y/o funcional. Aunque la fagocitosis y procesamiento de Abeta por los astrocitos podría representar un intento para proteger al entorno del efecto tóxico de este péptido, las alteraciones en estos procesos podrían explicar la reducción en el aclaramiento tanto de Abeta como de las distrofias neuríticas que se encuentran alrededor de las placas. Nuestros resultados en el modelo amiloidogénico APP/PS1 muestran que, a pesar de que contienen numerosas placas amiloides y distrofias neuríticas, los astrocitos reactivos sólo internalizan alrededor de un 7% de las neuritas distróficas existentes y, posteriormente, no realizan una degradación eficiente de las mismas (Gómez-Arboledas y col. 2018), lo que refleja una importante pérdida en la capacidad de los astrocitos para internalizar y eliminar estructuras aberrantes con patología amiloide. Además, estos datos apoyan la hipótesis de que la **disfunción astrogial** en condiciones patológicas podría contribuir a la progresión de la EA y otras enfermedades neurodegenerativas (Lööv y col. 2015; Masgrau y col. 2017; Acosta y col. 2017). Aunque faltan muchas incógnitas por resolver sobre el papel de los astrocitos en la progresión de la patología de Alzheimer, su disfunción podría implicar una disminución del soporte homeostático astrogial, con graves consecuencias para el rendimiento y la supervivencia de las neuronas, así como para la actividad funcional de las sinapsis (Coleman y col. 2004; Rodríguez-Arellano y col. 2016).

Por tanto, nos propusimos estudiar las repercusiones de la alteración fagocítica de los astrocitos mediada por el péptido beta-amiloide, sobre la respuesta inflamatoria de los mismos. Como ya hemos discutido previamente, los astrocitos sufren un proceso de activación o astrogliosis ante cualquier insulto agudo o crónico en el SNC (Sofroniew y Vinters, 2010; Osborn y col. 2016; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018; Verkhratsky y col. 2010), contribuyendo así a la neuroinflamación (Leyns y Holtzman, 2017). Tanto las formas solubles de Abeta oligomérico como de tau fosforilado provocan una activación inflamatoria en los astrocitos, caracterizada por el aumento de $TNF\alpha$, $IL1\beta$, $IL6$, $iNOS$ y $CCL2$, entre otros (este trabajo; Zhang y col. 2010; Zhang y Jiang, 2015; Ubogu y col. 2006; Heneka y O'Banion, 2007; Simic y col. 2000; Litvinchuk y col. 2018; Carrero y col. 2012; Medeiros y LaFerla, 2013; Morales y col. 2014; Laurent y col. 2018). Nuestros datos muestran que los neurosinaptosomas de ratones WT o TAU P301S también provocan una marcada activación astrogial, pero, sorprendentemente, no lo hacen los neurosinaptosomas de ratones APP,

ricos en Abeta. Estos resultados parecen indicar que los astrocitos con distrofias neuríticas ricas en Abeta, sufren cambios a nivel transcripcional y/o funcional independientes de la activación pro-inflamatoria. Dada la gran diversidad funcional y molecular de los astrocitos (Zamanian y col. 2012; Liddelov y col. 2017; John Lin y col. 2017; Sosunov y col. 2014; Chai y col. 2017), es probable que los que poseen actividad fagocítica sean un subtipo de la población total. Recientemente, se han descrito hasta 5 subpoblaciones astrogliales, de las cuales la tipo C está enriquecida en genes relacionados con la actividad sináptica, y las B y C muestran numerosos genes asociados a procesos fagocíticos (John Lin y col. 2017). No se conoce la contribución concreta de cada subtipo astrogliar en la EA. Se ha demostrado que otras células fagocíticas como los macrófagos, readaptan su metabolismo para poder llevar a cabo sus funciones, por ejemplo, activan la captación de glucosa y la glucólisis aeróbica, la liberación de lactato, e inhiben la fosforilación oxidativa y la oxidación de ácidos grasos (Morioka y col. 2018). Por ello, sería interesante realizar un análisis del estado metabólico y posible disfuncionalidad de los astrocitos tras la fagocitosis de las distrofias neuríticas que contienen Abeta.

Por último, también hemos estudiado en este trabajo si la respuesta astrogliar tras la fagocitosis de las diferentes distrofias neuronales, tiene efectos sobre la microglía y las neuronas *in vitro*. Recientemente se ha descrito que la alteración en la comunicación cruzada entre astrogliar y microglía parece participar en la progresión de la EA (Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). Diversos estudios relacionan la activación microglial con la potenciación de la respuesta neurotóxica astrogliar, ya que señales secretadas por la microglía activa (IL1 β , TNF α y C1q) pueden co-activar a los astrocitos y transformar su fenotipo neuroprotector (A2) a neurotóxico (A1) (Liddelov y Barres, 2017; Shi y col. 2017b), potenciando, en última instancia, la disfunción y muerte neuronal (Leyns y Holtzman, 2017). También, y de manera inversa, puede ocurrir que los astrocitos reactivos modulen el fenotipo microglial (Colonna y Butovsky, 2017), como se ha descrito en algunos modelos de amiloidosis o de taupatías (Colonna y Butovsky, 2017; Rajendran y Paolicelli, 2018). Por ello, también hemos estudiado en este trabajo si la respuesta astrogliar tras la fagocitosis de las diferentes distrofias neuronales, tiene efectos sobre la microglía y las neuronas *in vitro*. Para ello, y en primer lugar analizamos si estos astrocitos modulan la activación de la microglía. Nuestros resultados al respecto revelan que los cultivos de microglía primaria sólo se activan en respuesta a los neurosinaptosomas ricos en Abeta, pero no con los procedentes de animales WT o TAU P301S (con fosfo-tau). Sin embargo, cuando usamos los medios condicionados por astrocitos previamente tratados con neurosinaptosomas, no se produce en ningún caso activación microglial, al menos tras un tratamiento agudo. Por lo tanto, la respuesta astrogliar a las distrofias neuronales no parece modular la microglía a corto plazo. Serían necesarios ensayos crónicos para comprobar qué ocurre a largo plazo.

En resumen, las distrofias ricas en Abeta contribuyen a la neuroinflamación mediante activación microglial, mientras que las terminales presinápticas sin patología o con fosfo-tau

median la activación astrogliar asociada a la EA. Hasta donde conocemos, estos son los primeros resultados sobre la relación de los astrocitos con distrofias neuronales y microglía, por lo que sería interesante profundizar en la relación recíproca entre ambos tipos celulares y su implicación en la progresión de la EA (Rajendran y Paolicelli, 2018).

Respecto a la toxicidad neuronal, nuestros resultados previamente descritos demuestran que tanto las formas solubles de Abeta oligomérico como de tau fosforilado son tóxicas para las neuronas, y que dicho efecto se revierte por la mediación de los astrocitos en el caso de la toxicidad mediada por Abeta, pero no en la desencadenada por fosfo-tau soluble. En este sentido, al utilizar los neurosinaptosomas, observamos que sólo aquellos con Abeta resultan tóxicos para las neuronas primarias en cultivo. Sin embargo, cuando estudiamos el efecto indirecto de los astrocitos con dichos neurosinaptosomas, no se observa efecto tóxico alguno, por lo que concluimos que los astrocitos tras fagocitar neurosinaptosomas siguen siendo capaces de mantener la supervivencia neuronal (Meyer-Franke y col. 1995; Pfrieger y Barres, 1997). En definitiva, estos resultados parecen indicar que los astrocitos, a pesar de tener dificultades para fagocitar y degradar las distrofias neuríticas con Abeta, no pierden su capacidad de proteger al entorno celular del efecto inflamatorio y citotóxico de dichas estructuras aberrantes, ni adquieren un fenotipo neurotóxico que provoque muerte neuronal.

Podemos resumir las principales conclusiones de este apartado: i) parece, pues, que el Abeta es el responsable de la disminución de la capacidad de fagocitosis y degradación de distrofias neuronales por los astrocitos, y de la activación proinflamatoria de la microglía y la toxicidad neuronal causadas por dichas distrofias; ii) los astrocitos, independientemente de su respuesta ante los neurosinaptosomas, mantienen sus funciones protectoras y beneficiosas y no ejercen efectos negativos sobre la microglía y las neuronas; y iii) las distrofias ricas en Abeta localizadas alrededor de las placas de Abeta, junto con los circuitos astrogliales, microgliales y neuronales, tienen importantes implicaciones en el aprendizaje, la memoria (Chung y col. 2013; Verkhratsky y col. 2010) y, probablemente, en la patología de Alzheimer.

Por último, cabe destacar que este es el primer estudio que describe el aclaramiento fagocítico de las neuritas distróficas mediado por los astrocitos reactivos que rodean las placas amiloides, tanto *in vitro* como en el modelo APP/PS1 y en pacientes de Alzheimer. A pesar de los numerosos estudios existentes en relación con la actividad fagocítica de los astrocitos, no existen trabajos previos en los que se reporte la internalización y degradación de las neuritas distróficas características de la EA. Aún así, son necesarios más estudios para entender mejor las consecuencias fisiológicas (beneficiosas o perjudiciales) de la fagocitosis anómala de Abeta y distrofias neuríticas por parte de los astrocitos reactivos. Nuestros datos apoyan la idea de que esta capacidad fagocítica puede verse afectada durante la progresión de la patología, y, por tanto, podemos proponer la disfunción

fagocítica y de los sistemas de degradación de los astrocitos como un mecanismo patológico que influye en la progresión de la enfermedad. El aumento o la restauración de su capacidad fagocítica podrían constituir una novedosa terapia para el tratamiento de la EA.

4. CARACTERIZACIÓN “IN VIVO” DE LOS ASTROCITOS EN LA EA

A pesar de que en el cerebro de pacientes de Alzheimer y de modelos murinos de la enfermedad se produce una activación astrogliar generalizada (este trabajo; Verkhratsky y col. 2010; Rodríguez-Arellano y col. 2016; Garwood y col. 2016; Heppner y col. 2015; Heneka y col. 2014, 2015a, 2015b), no se conoce en detalle el estado y función de los astrocitos activos en la progresión de la patología. La astrogliá reactiva podría mediar funciones neuroprotectoras tras la liberación de factores neurotróficos o, por el contrario, secretar citoquinas proinflamatorias y contribuir a una respuesta inflamatoria de carácter citotóxico (Avila-Muñoz y Arias, 2014; Verkhratsky y col. 2014; Heppner y col. 2015; Heneka y col. 2015; Bagyinszky y col. 2017; Liddelow y col. 2017). Como reflejan nuestros resultados obtenidos con cultivos de astrocitos, su activación pro-inflamatoria y/o, sobretudo, la deficiencia de sus funciones neuroprotectoras parecen mediar la disfunción neuronal y sináptica típicas de la patología de Alzheimer.

Por tanto, para establecer los perfiles funcionales y moleculares de los astrocitos, y su repercusión en la patología de la EA, en este trabajo hemos caracterizado los perfiles transcriptómicos de los astrocitos reactivos *in vivo* procedentes de distintos modelos murinos de la enfermedad, así como de muestras *postmortem* de pacientes de Alzheimer.

4.1. Caracterización transcriptómica de los astrocitos en distintos modelos de la EA

Diversos grupos investigadores han realizado estudios transcriptómicos de uno o varios tipos celulares cerebrales para entender su función en diversas enfermedades neurodegenerativas (Rossner y col. 2006; Lovatt y col. 2007; Cahoy y col. 2008; Doyle y col. 2008; Wylie y col. 2010; Bracko y col. 2012; Lerch y col. 2012; Beutner y col. 2013; Chiu y col. 2013; Orre y col. 2014a, 2014b; Zhang y col. 2014). Respecto a la población astrogliar, recientemente se han descrito dos fenotipos funcionales, denominados A1 y A2, basados en la clasificación de los fenotipos microgliales M1/M2; a A1 se le atribuyen propiedades inflamatorias y citotóxicas, mientras que A2 es de carácter neuroprotector (Simpson y col. 2011; Zamanian y col. 2012; Liddelow y col. 2017; Liddelow y Barres, 2017). Esta clasificación se estableció después de analizar el perfil transcriptómico de astrocitos tras una inyección de LPS (A1), que mimetiza la infección bacteriana, y tras una isquemia cerebral (MCAO, del inglés “Middle Cerebral Artery Occlusion”) (A2) (Zamanian y col. 2012; Liddelow y col. 2017). Nuestros resultados a este respecto revelan que los astrocitos aislados del cerebro de los modelos amiloidogénico, APP, y de taupatía, TAU P301S, no se asemejan a ninguno de estos dos fenotipos, es decir no adquieren un claro perfil ni neurotóxico ni

neuroprotector. Sin embargo, sí están reactivos con ambas patologías, ya que muestran aumento de diversos genes característicos de la respuesta “pan” astrogial (Liddelw y col. 2017; Liddelw and Barres 2017). Estos resultados en principio, no concuerdan con la presencia de astrocitos A1 descrita en la EA y otras enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica y la esclerosis múltiple (Liddelw y col. 2017; Shi y col. 2017b). Para explicar esta posible discrepancia hay que tener en cuenta que, en este trabajo, hemos analizado conjuntamente los astrocitos aislados del hipocampo y de la corteza cerebral de los ratones usados como modelos de patología Abeta y tau, por lo que podríamos estar perdiendo información de los astrocitos en cada región celular independientemente. En este sentido, se ha descrito en animales viejos que los astrocitos del hipocampo y del estriado sobreexpresan mayor número de genes reactivos tipo A1 que los astrocitos corticales, lo que es lógico porque ambas son las regiones más vulnerables al declive cognitivo (Clarke y col. 2018; Saxena y Caroni, 2011; Burke y Barnes, 2006). En cambio, los astrocitos corticales aislados de un modelo amiloidogénico (APP_{swe}/PS1_{dE9}) parecen tener mayor similitud con el perfil transcriptómico de astrocitos A2 que con el de astrocitos A1. Además es llamativo que estos astrocitos corticales tienen un mayor número de genes down-regulados que sobreexpresados (Orre y col. 2014b), al igual que ocurre con los genes de los astrocitos en nuestros modelos animales APP y TAU P301S.

Sin embargo, la simple división en dos fenotipos astrogiales contrapuestos, probablemente no englobe la diversidad real de los posibles fenotipos astrogiales (Masgrau y col. 2017). Recientemente se ha descrito gran heterogeneidad morfológica, funcional y molecular de los astrocitos en función de su localización cerebral y su expresión proteica (John Lin y col. 2017; Chai y col. 2017; Haim y Rowitch, 2017; Sosunov y col. 2014), cuyos perfiles cambian también con la edad (Boisvert y col. 2018). El estudio e interpretación de la diversidad molecular y funcional de los astrocitos en condiciones normales y/o patológicas representa uno de los principales retos de la investigación actual sobre el SNC (Haim y Rowitch, 2017).

Nuestros resultados sobre el perfil transcriptómico de los astrocitos de animales amiloidogénicos APP, y TAU P301S muestran la activación de una respuesta pro-inflamatoria, al igual que la que se produce en cultivos de astrocitos primarios tras el tratamiento agudo con Abeta oligomérico y/o fosfo-tau soluble. Por tanto, los astrocitos reaccionan tanto a la acumulación de Abeta como de tau hiperfosforilado, con una respuesta inmune o neuroinflamatoria, que conlleva la liberación de citoquinas (Jensen y col. 2013; Farina y col. 2007), y que forma parte del espectro de cambios característicos de la astrogliosis (Sofroniew, 2009). Además, la activación del complemento observada puede llevar también a albergar otras funciones celulares incluyendo la propia liberación de citoquinas proinflamatorias (Leyns y Holtzman, 2017). En concordancia con estos resultados, los astrocitos aislados por Orre y col. (2014a), a partir del modelo APP_{swe}/PS1_{dE9}, también mostraron un aumento significativo de numerosos genes relacionados con la

respuesta inflamatoria en general, como la señalización de receptores TLRs, cascada del complemento y la activación de la coagulación. En concreto, la implicación de la activación de la cascada del complemento por los astrocitos en la EA se discutirá más adelante (Apartado D4.4).

En ambos modelos, también observamos el enriquecimiento de la “percepción sensorial de estímulos químicos” (<http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>). Los astrocitos son capaces de detectar y responder a cambios en los niveles del parénquima cerebral de sustratos metabólicos (O_2 y glucosa), productos de desecho metabólico (CO_2) e, incluso, hormonas metabólicas involucradas en el control del equilibrio energético (Marina y col. 2017; Angelova y col. 2015; Howarth y col. 2017). En la EA, se producen anomalías astrocíticas en la unidad neurovascular que causan alteraciones en la integridad de la BHE (Liu y col. 2014; Verkhratsky y col. 2010; Kalaria, 2000), además de deposición de Abeta sobre la vasculatura cerebral (*angiopatía amiloide cerebral* o CAA) y, con todo ello, alteraciones en el mantenimiento de la homeostasis cerebral (Ries y Sastre, 2016; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). De hecho, la disminución en la perfusión sanguínea y la hipoxia parecen aumentar el riesgo de padecer EA (Vermeer y col. 2003). Por lo tanto, el enriquecimiento de dicho proceso biológico en los astrocitos de ratones APP y TAU P301S, podría indicar un intento por tratar de sentir los nutrientes y demás componentes que provienen del torrente sanguíneo, para el mantenimiento de la homeostasis del SNC, tratando de garantizar la funcionalidad y viabilidad neuronal (Kisler y col. 2017; González-Reyes y col. 2017; Fu y Jhamandas, 2014; Verkhratsky y col. 2010; Marina y col. 2017).

No obstante, existe una gran cantidad de genes down-regulados en los astrocitos aislados de ambos modelos, la mayoría de ellos implicados en el metabolismo energético celular. Los astrocitos son importantes en el metabolismo energético cerebral, para el apoyo energético de las neuronas y otras células del SNC (Kisler y col. 2017; González-Reyes y col. 2017; Fu y Jhamandas, 2014; Verkhratsky y col. 2010; Marina y col. 2017), ya que son capaces de captar la glucosa, metabolizarla a lactato durante la glucólisis aeróbica (Zhang y col. 2014; Vaishnavi y col. 2010) y distribuirlo a las neuronas para satisfacer sus demandas metabólicas (Kumar y Morrison, 2018; Jiang y col. 2013; Cloughesy y col. 2014). De hecho, los astrocitos muestran altas velocidades glucolíticas, tanto *in vitro* como *in vivo* (Lebon y col. 2002; Itoh y col. 2003; Bouzier-Sore y Pellerin, 2013). Por lo tanto, una alteración de su capacidad glucolítica y metabólica, en general, podría influir en las funciones neuronales (Allaman y col. 2010) y potenciar los daños asociados a los déficits cognitivos de la EA. De hecho, se sabe que defectos en el metabolismo general correlacionan con la progresión de la EA (Konttinen y col. 2018), así como en otras patologías, como la esquizofrenia y los trastornos bipolares (Jouroukhin y col. 2018; Zhang y col. 2015; Dean y col. 2016; Callaly y col. 2015). En concreto, se ha observado que los astrocitos de ratones transgénicos modelos de EA sufren una reducción de su capacidad glucolítica en respuesta a Abeta, debida en parte a la reducción del transportador de glucosa *Glut1* y de los transportadores de lactato

(*Mct1* y *Mct2*) (González-Reyes y col. 2017; Acosta y col. 2017), produciéndose así deficiencias de aprendizaje y memoria (Lu y col. 2015). En nuestros resultados, los astrocitos aislados de ratones con patología Abeta o tau también muestran una disminución de la expresión del receptor *Glut1* (o *Slc2a1*). Es más, la disminución crónica en la captación de glucosa podría ser la responsable de la consecuente disminución de la producción de lactato, pero también de la glucólisis y la fosforilación oxidativa (Jouroukhin y col. 2018).

Aunque el principal consumo de energía astrogial ocurre a través de la glicólisis, el 20% de la energía se produce por la oxidación de ácidos grasos o FAO (del inglés, “fatty acid oxidation”) (Konttinen y col. 2018). En este sentido, la glucólisis está alterada (Bigl y col. 2003), pero también la oxidación de ácidos grasos se encuentra reducida en el cerebro de pacientes de Alzheimer (Ciavardelli y col. 2016) y en astrocitos de ratones amiloidogénicos APP/PS1, lo que parece producir daños en la neurogénesis y la diferenciación neuronal en el hipocampo (Konttinen y col. 2018). La expresión del gen que codifica para la enzima *Cpt1A* (del inglés, “carnitine palmitoyltransferase 1A”), enzima limitante que cataliza la transferencia de ácidos grasos al interior de la mitocondria (Blazquez y col. 1999; Jernberg y col. 2017), se encuentra disminuida en los astrocitos de ratones APP y TAU P301S analizados en este trabajo. La inhibición de la FAO aumenta el estrés oxidativo e induce la acumulación de Abeta *in vitro* e *in vivo* (Shi y col. 2016). De manera similar, la potenciación de la FAO se ha relacionado con mejoras en la memoria (Gibbs y col. 2009) y un aumento en la neurogénesis (Stoll y col. 2015).

Además, también hemos observado una disminución significativa en la expresión de muchos genes implicados en la síntesis de colesterol (como *Hmgcr*, *Dhcr7*, *Dhcr24*, *ApoE*, *Ldlr*), en los astrocitos de ambos modelos transgénicos estudiados. Otros autores también han observado esta disminución en astrocitos aislados durante el envejecimiento, con una reducción significativa en la expresión de la enzima limitante *Hmgcr* (Boisvert y col. 2018), o aislados del modelo amiloidogénico APP_{swe}/PS1_{dE9} (*ApoE* y *Ldlr*) (Orre y col. 2014a). Los astrocitos son la principal fuente de síntesis de lípidos en el cerebro y le proporciona colesterol a las neuronas, que es esencial para la formación de dendritas neuronales, la formación de vesículas sinápticas y, con ello, la función presináptica durante el desarrollo (Mauch y col. 2001). Por lo tanto, una deficiencia en la producción de colesterol causada por los astrocitos podría inhibir la liberación de neurotransmisores y la disminución de las funciones sinápticas (Mauch y col. 2001; Deijk y col. 2017).

Además de estos aspectos metabólicos, los procesos biológicos que disminuyen más significativamente en los astrocitos de ratones APP y TAU P301S son aquellos implicados en la fase 3 del metabolismo, lo que parece indicar una disminución del correcto funcionamiento mitocondrial. Es más, la oxidación defectuosa de ácidos grasos y la alteración mitocondrial correlacionan con la neurodegeneración en el hipocampo y los déficits de memoria en pacientes de Alzheimer (Konttinen y col. 2018). También se ha

observado que el alelo $\epsilon 2$ de ApoE, cuyo efecto neuroprotector está ampliamente descrito (Wu y Zhao, 2016), potencia la actividad glucolítica y la respiración mitocondrial, mientras que el alelo $\epsilon 4$ ejerce el efecto contrario (Wu y col. 2018). En concreto, los depósitos extracelulares de Abeta42 pueden causar estrés oxidativo, inflamación y disfunción mitocondrial (Lin y Beal, 2006; Trushina y McMurray, 2007; Vallés y col. 2008), ya que el Abeta42 entra en la mitocondria, causando un aumento de ROS, la interrupción de la cadena de transporte electrónico y el bloqueo de la producción de ATP (Vallés y col. 2010; Reddy y Beal, 2008).

La hipoxia provoca un cambio metabólico celular hacia la glucólisis, además de ser un fuerte inductor de la mitofagia (Zhang y col. 2008). Se ha sugerido que los astrocitos tienen una *vía de señalización sensible a hipoxia*, que lleva a la inhibición de la respiración mitocondrial, aumento de la producción de radicales libre y reclutamiento de Ca^{2+} desde los almacenamientos intracelulares, entre otros (Marina y col. 2017). Sin embargo, en los ratones APP y TAU P301S no parece que se produzca una respuesta a hipoxia en los astrocitos, ya que no aumenta el metabolismo de la glucosa, sino todo lo contrario. Es más, estos astrocitos muestran una disminución en la expresión de *Hif-1*, el cual regula la expresión de NIX (un regulador de la mitofagia programada) en varios tipos celulares cancerígenos, macrófagos asociados a tumores y células endoteliales (Sowter y col. 2001; Ney, 2015).

Además, algunas células fagocíticas, como los macrófagos tipo M1 (O'Neill y Pearce, 2016) o incluso las células cancerígenas (Domenech y col. 2015), sufren una diferenciación hacia un programa genético glucolítico, con disminución simultánea de genes relacionados con la fosforilación oxidativa, la FAO y la síntesis de colesterol, para llevar a cabo procesos de eferocitosis (fagocitosis de células apoptóticas) (Morioka y col. 2018) o mitofagia (degradación de mitocondrias) (Esteban-Martínez y col. 2017), entre otros. Los macrófagos M2, por el contrario, dependen principalmente de la fosforilación oxidativa (Rodríguez-Prados y col. 2010; Izquierdo y col. 2015; Jha y col. 2015). Sin embargo, aunque los astrocitos de nuestros modelos transgénicos comparten muchas de estas alteraciones metabólicas, no muestran un aumento del metabolismo glucídico, por lo que no sufren esta característica reprogramación metabólica.

Por otro lado, los macrófagos, en condiciones de hipercolesterolemia, sufren una disminución en numerosas rutas metabólicas, como la biosíntesis de colesterol (sobre todo el gen de la enzima *Dchr24*; Spann y col. 2012), la respiración mitocondrial, la vía de las pentosas fosfato y la respuesta al estrés oxidativo, contribuyendo también a sus respuestas inflamatorias (Baardman y col. 2018). Es más, estos macrófagos, aunque todavía producían considerables cantidades de citoquinas inflamatorias, lo hacían en menor cantidad que los macrófagos "normales" bajo su activación con LPS (Baardman y col. 2018). Esta respuesta sí es muy similar a la observada en los astrocitos aislados de nuestros modelos

transgénicos, por lo que sería interesante dilucidar cuál es la causa y consecuencias de esta respuesta astrogliar ante la patología de Alzheimer.

En definitiva, los astrocitos parecen sufrir más un proceso de hipometabolismo o disfunción metabólica, que un cambio fenotípico concreto. El declive general de la capacidad homeostática durante el envejecimiento correlaciona con los mecanismos moleculares de estrés oxidativo, inflamatorio y metabólico, que preceden a la proteinopatía en fases tempranas de la EA (Galimberti y Scarpini, 2011). De hecho, en las regiones más susceptibles, como el hipocampo y el estriado, las neuronas parecen ser más sensibles a las alteraciones metabólicas, así como al estrés oxidativo, a la agregación proteica, a la inestabilidad mitocondrial y a la desregulación de la homeostasis iónica (Saxena y Caroni, 2011; Mattson y Magnus, 2006). En definitiva, las alteraciones en el metabolismo energético de las células astrogliales podrían ser la base de diversas enfermedades neurodegenerativas, trastornos psiquiátricos y neuropatías periféricas (Kumar y Morrison, 2018).

Además de las alteraciones metabólicas mencionadas, en este trabajo también hemos observado que disminuye la expresión de muchos genes implicados en funciones de desarrollo y diferenciación de varios tipos celulares, estructuras neuronales (como espinas dendríticas y axones) y regiones cerebrales, en general. De hecho, aunque los astrocitos tienen un papel esencial para la funcionalidad cerebral, su capacidad neuroprotectora disminuye durante el envejecimiento, jugando papeles críticos en las alteraciones neurológicas relacionadas con el envejecimiento (Rodríguez-Arellano y col. 2016; Alarcón-Aguilar y col. 2014; Jiang y Cadenas, 2014). En el modelo amiloidogénico APP_{swe}/PS1_{dE9}, el fenotipo reactivo “crónico” de los astrocitos también coincide con una reducción de la expresión de genes relacionados con sus funciones fundamentales, como la biosíntesis de colesterol, el soporte neuronal, la regulación del desarrollo y la diferenciación neuronal, y la transmisión sináptica o del impulso nervioso, (Orre y col. 2014a). Además, esta disfunción astrogliar puede no estar restringida únicamente a los astrocitos reactivos que rodean las placas de Abeta, sino que existen evidencias de una disfunción astrogliar en astrocitos GFAP-positivos aislados de tejido humano de pacientes de Alzheimer (Simpson y col. 2011). Los astrocitos de nuestros modelos, tanto amiloidogénico (APP) como de acumulación de formas fosforiladas de tau (TAU P301S), recapitulan los mismos resultados, es decir, un aumento de la respuesta inflamatoria, pero, sobretodo, una disfunción astrogliar, con disminución de sus funciones metabólicas y neuroprotectoras.

Todo esto nos lleva a plantearnos si los astrocitos se encuentran realmente disfuncionales en los modelos transgénicos de la EA, como ya habíamos discutido previamente (Apartado D2). De hecho, el envejecimiento es un proceso biológico que se encuentra altamente asociado a la **disfunción astrogliar**, produciendo cambios asociados a la homeostasis redox y a la respuesta inflamatoria, entre otros (Jiang y Cadenas, 2014; Miller y O'Callaghan, 2005; Niccoli y Partridge, 2012; Heneka y col. 2014; Kohman and Rhodes, 2012). Por lo

tanto, la disfunción de los astrocitos en condiciones patológicas podría significar una disminución del soporte homeostático astrogliar, teniendo graves consecuencias para la actividad y supervivencia de las neuronas, así como para la funcionalidad de las sinapsis (Coleman y col. 2004; Rodríguez-Arellano y col. 2016), lo que podría contribuir a la progresión de la EA y otras enfermedades neurodegenerativas (Bernhardi, 2007; Lööv y col. 2015; Masgrau y col. 2017; Acosta y col. 2017). Así pues, los astrocitos juegan un papel crítico en la salud cerebral y en las enfermedades neurodegenerativas, como la EA (Sekar y col. 2015; Liddel y col. 2017; Shi y col. 2017b), la demencia (Hallmann y col. 2017) y la esclerosis lateral amiotrófica (Nagai y col. 2007; Di Giorgio y col. 2008), ya que los astrocitos disfuncionales pueden desencadenar neurodegeneración (Lian y col. 2015; Macauley y col. 2011; Yamanaka y col. 2008). En este sentido, Bernhardi (2007) propone la “hipótesis de desregulación glial”, en el que postula que la inflamación y el estrés celular asociado con el envejecimiento son eventos clave en el desarrollo de la EA, a través de la inducción de una disfunción glial.

Es más, una característica clave de la biología del envejecimiento, es la **senescencia celular**, que se caracteriza por una parada irreversible del ciclo celular y un fenotipo secretorio distintivo (Hayflick y Moorhead, 1961; Coppé y col. 2008), que contribuye a varias enfermedades asociadas con el envejecimiento (Childs y col. 2016; Jeon y col. 2017; Chinta y col. 2018). En concreto, se ha relacionado la senescencia astrogliar con las enfermedades neurodegenerativas (Bhat y col. 2012; Chinta y col. 2013; Tan y col. 2014; Luo y col. 2010). Es más, en un modelo murino con patología tau, se ha observado que los astrocitos y la microglía sufren este proceso, participando así en el aumento de tau hiperfosforilado y NFTs, en la neurodegeneración y en la pérdida cognitiva (Bussian y col. 2018). Por ejemplo, se ha observado una fuerte relación entre la presencia de ovillos neurofibrilares y la senescencia celular mediante la alteración del estado bioenergético, en el cerebro de pacientes de Alzheimer (Musi y col. 2018). La contribución mecanística de las células senescentes a la fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas es una cuestión común en los últimos años (Bhat y col. 2012; Tan y col. 2014; Luo y col. 2010; Flanary y col. 2007; Salminen y col. 2011; Streit y col. 2009).

El SNC está particularmente expuesto a altos niveles de estrés oxidativo, al cual los astrocitos son sensibles y que puede inducir en ellos el *fenotipo característico de la senescencia*: cambios en la morfología celular, aumento del perfil inflamatorio (Coppé y col. 2008; Crowe y col. 2016; Bussian y col. 2018) y disminución generalizada de genes relacionados con la división celular y la diferenciación y desarrollo neuronal y glial, principalmente (Crowe y col. 2016; Bitto y col. 2010; Bhat y col. 2012; Aravinthan y col. 2014). Además, la respuesta inflamatoria podría inducir la oxidación de ARN (Görg y col. 2008), potenciando así la senescencia celular (Nunomura y col. 2009). La disfunción mitocondrial, por ejemplo, es indispensable en la senescencia celular (Correia-Melo y col. 2016; Hutter y col. 2004). Por tanto, esta compleja respuesta al estrés induce una parada

del ciclo celular, adaptaciones al mantenimiento de la supervivencia, remodelación celular, disfunción metabólica y alteración del tejido debido a la secreción de moléculas tóxicas (Childs y col. 2016). Muchas de estas características se han descrito en el cerebro de pacientes de Alzheimer y en modelos transgénicos (Arendt y col. 1996; Frost y col. 2016), así como en astrocitos aislados mediante microdissección láser del cerebro de pacientes de Alzheimer (Simpson y col. 2011). De hecho, todos estos cambios coinciden con los observados en los astrocitos aislados de ratones APP y TAU P301S, lo que indicaría que los astrocitos en ambos modelos transgénicos de la EA podrían encontrarse en un estado senescente, causado por la acumulación prolongada de Abeta o de tau hiperfosforilado, respectivamente.

Es decir, estos hallazgos sugieren que la senescencia podría estar contribuyendo a la patología del Alzheimer, ya que se ha observado una relación entre la acumulación de células senescentes y la pérdida neuronal (Bussian y col. 2018). Por todo ello, es muy probable que la intervención o tratamiento de la acumulación de células senescentes podría reducir la gravedad de las enfermedades neurodegenerativas. En este sentido, se ha observado que el aclaramiento genético (Baker y col. 2011) o farmacológico (Zhu y col. 2015) de células senescentes disminuye numerosos signos de patología asociada con el envejecimiento (Baker y col. 2011, 2016; Kirkland y col. 2017), incluso con la patología tau en modelos murinos de la EA (Bussian y col. 2018). Por lo tanto, los astrocitos senescentes podrían ser una buena diana terapéutica para el tratamiento de las patologías neurodegenerativas, como la EA.

En resumen, estos resultados y otros estudios, en general, parecen apoyar la idea de que la astrogliosis en la EA implica una ganancia de función inflamatoria neurotóxica y una disminución de las capacidades beneficiosas y neuroprotectoras de los astrocitos en la EA (Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018), debida al Abeta y/o al fosfo-tau característicos de esta enfermedad. En resumen, todo esto apoyaría la hipótesis de que la disfunción o pérdida de función astrogliar en condiciones patológicas, o incluso un proceso de senescencia, podría contribuir a la progresión de la EA y otras enfermedades neurodegenerativas (Lööv y col. 2015; Masgrau y col. 2017; Acosta y col. 2017; Bernhardt, 2007; Lian y col. 2015; Macauley y col. 2011; Yamanaka y col. 2008). Por todo ello, las terapias deberían estar dirigidas a la recuperación funcional de la astrogliar (Khakh y col. 2017; Masgrau y col. 2017). En última instancia, nos planteamos continuar caracterizando las alteraciones de los astrocitos aislados de distintos modelos de la EA, mediante estudios metabólicos y funcionales, analizando la captación de glucosa, la producción de lactato, la respiración mitocondrial, el estrés oxidativo, marcadores de senescencia, capacidad neuroprotectora, etc.

4.2. Aumento en los niveles de calcio y el estrés oxidativo en las mitocondrias de los astrocitos, debido al Abeta soluble

Se ha propuesto que la desregulación del calcio es uno de los eventos tempranos en la EA y participa en la pérdida sináptica (Khachaturian, 1994; Chakroborty y Stutzmann, 2011), resultando en alteración de la plasticidad y degeneración neuronal (Mattson, 2007). De hecho, niveles elevados de calcio están funcionalmente relacionados con las principales características y factores de riesgo de la EA (Stutzmann, 2007). Además, se ha descrito que el estrés oxidativo es una característica común asociada con la exitotoxicidad y la inflamación y, por tanto, otra de las características de las enfermedades neurodegenerativas como la EA (Miller y O'Callaghan, 2005; Ye y col. 2015; Webster y col. 2015). Las mitocondrias se consideran las principales responsables de la sobreproducción de ROS y, con ello, del estrés oxidativo (Bernhardi y col. 2015), lo que puede llevar a un grave daño oxidativo y a la muerte neuronal (Brennan y col. 2009; Suh y col. 2008a,b). Por tanto, la alteración de la función mitocondrial y de la capacidad antioxidante de los astrocitos, en el envejecimiento, podría contribuir al estrés metabólico y oxidativo que ocurre en el cerebro envejecido (Saxena y Caroni, 2011; Mattson y Magnus, 2006), ya que varios de estos cambios y daños oxidativos resultan en una pérdida de función celular (Lovell y col. 2001; Halliwell, 2006). Así, las células gliales promueven activamente la disfunción neuronal y la neurodegeneración (Bernhardi, 2007) a través de mecanismos de estrés oxidativo (Bernhardi y col. 2015).

En concreto, se ha relacionado la toxicidad del péptido Abeta con aumentos localizados de los niveles de calcio en muchos modelos amiloidogénicos, sobretudo en las neuronas, causando destrucción de mitocondrias y pérdida de espinas dendríticas (Zempel y col. 2010). Además, también se han identificado neuronas susceptibles en animales amiloidogénicos, donde el estrés oxidativo es más acusado en las neuritas cercanas a las placas de Abeta, provocando en última instancia la muerte celular (Xie y col. 2013a). Es más, las placas de Abeta provocan graves anomalías estructurales y funcionales de las mitocondrias neuronales, como alteraciones en su potencial de membrana y aparición de mitocondrias distróficas y fragmentadas (Xie y col. 2013b). Por tanto, existen numerosos estudios sobre el aumento de calcio y estrés oxidativo en las neuronas, que tratan de entender su implicación en la patología de la EA. Sin embargo, todavía no se conoce cómo pueden influir estos parámetros o sus modificaciones en los astrocitos, y su repercusión en la progresión de la enfermedad.

En este trabajo, mediante microscopía multifotón *in vivo*, hemos observado que los astrocitos sufren un aumento de calcio y estrés oxidativo a nivel mitocondrial, en respuesta al Abeta soluble, lo que apoyaría los datos transcriptómicos sobre la existencia de una disfunción mitocondrial causada por Abeta (ratones APP), pero también por fosfo-tau (ratones TAU P301S). Por ello, sería necesario analizar también estos parámetros ante un tratamiento con fosfo-tau soluble. Todo esto, en última instancia, podría contribuir a la disfunción astrogliar generalizada y, con ello, a la progresión de la patología de Alzheimer, como ya hemos discutido previamente

En relación con estos resultados, se ha descrito que los posibles mecanismos por los cuales los astrocitos sufren estrés oxidativo a causa del Abeta son: (i) aumento del flujo de calcio procedente del espacio extracelular, que origina cambios en la función mitocondrial, posiblemente por la inserción de Abeta en la membrana astrocitaria formando poros; (ii) la unión del Abeta al receptor RAGE, que produce la activación de la NADPH oxidasa (NOX) en el astrocito, aumentando la producción de ROS, o (iii) la activación de la cascada de ERK1/2 y la fosforilación de la PPA2 citosólica, llevando a una disfunción mitocondrial y producción de ROS (González-Reyes y col. 2017). Así mismo, se ha demostrado que la incubación prolongada de astrocitos con Abeta reduce la expresión del principal mecanismo de liberación de glutatión (Ye y col. 2015). Es decir, en respuesta al Abeta, parece que el astrocito sufre un desequilibrio entre su defensa antioxidante y la sobreproducción de ROS (Chun y Lee, 2018), afectando así a las neuronas vecinas.

Además, la actividad catalítica de la enzima glutamina sintetasa (GS) es sensible a la oxidación y puede estar alterada en la EA (Acosta y col. 2017; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). Es más, el estrés oxidativo puede producir la inhibición de la actividad del transportador astroglial EAAT2 (del inglés, “excitatory amino-acid transporter 2”) (Tian y col. 2010). En ambos casos se induciría la liberación extracelular de glutamato por parte de los astrocitos (Lauderback y col. 2001). La hiperactividad de los receptores de glutamato explicaría la observación de una sobrecarga de calcio (Kuchibhotla y col. 2008) y neuronas hiperactivas (Busche y col. 2008, 2012) en la proximidad de las placas de Abeta, causando toxicidad mitocondrial (Mahad y col. 2008; Kawamata y Manfredi, 2010), y provocando el inicio de la apoptosis (Mattson y Chan, 2003), contribuyendo así a la disfunción neuronal asociada a la EA.

Por todos estos motivos, un mejor entendimiento de los mecanismos celulares y moleculares que promueven o previenen las alteraciones en la homeostasis celular del calcio o en los niveles de estrés oxidativo, podría llevar a nuevas aproximaciones terapéuticas en alteraciones neurológicas, como el Alzheimer o el Parkinson (Mattson, 2007).

4.3. Caracterización transcriptómica de los astrocitos en muestras humanas *postmortem* de pacientes de Alzheimer

Por último, se analizó el nivel de expresión de diversos genes específicos de células astrogiales, en muestras *postmortem* de individuos clasificados según los estadios de Braak, para dilucidar la respuesta o estado de los astrocitos en la patología real de la EA. De esta manera, en primer lugar, observamos que se produce un aumento significativo de genes implicados en la reactividad astrogial, como GFAP, VIM y ALDH1L1, en pacientes Braak V-VI respecto a Braak II. Como ya hemos descrito previamente, dicha activación astrogial o astrogliosis puede observarse desde los primeros estadios de la enfermedad y progresa significativamente a medida que lo hace la patología amiloidea y de tau (Verkhatsky y col.

2010; Carter y col. 2012; Rodríguez-Arellano y col. 2016; Garwood y col. 2016; Phillips y col. 2014; Heneka y col. 2014; Heppner y col. 2015; Heneka y col. 2015a, 2015b).

Sin embargo, no se observaron aumentos significativos en la expresión de los marcadores específicos astrogiales S100b y AQP4. La proteína S100b ejerce diversas funciones intracelulares y extracelulares (Donato, 2003), por lo que esta variabilidad de funciones podría ser el motivo por el que no observamos cambios en su expresión. Por ejemplo, podría actuar como una citoquina cuya expresión aumenta en respuesta a determinados estímulos, y puede activar la sobreproducción de ROS y citoquinas proinflamatorias, provocando daños y eventos característicos del envejecimiento (Donato y col. 2009). En cuanto a la AQP4, la acuaporina mayoritaria en el SNC (Hubbard y col. 2018), se localiza específicamente en los pies perivasculares de los astrocitos que forman parte de la BHE. Tiene un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis cerebral (Ilf y col. 2012), participando activamente en el sistema glinfático (Ilf y Nedergaard, 2013; Jessen y col. 2015; Hubbard y col. 2018), por lo que también tiene un papel importante en la EA (Yang y col. 2016). Además, la desregulación de esta proteína integral de membrana en condiciones patológicas podría tener consecuencias negativas (Hubbard y col. 2018). En la EA, se ha observado una disminución de la inmunorreactividad perivascular de la AQP4 y una pérdida de su expresión, tanto en el envejecimiento (Kress y col. 2014) como en modelos murinos de la EA (Hubbard y col. 2018; Wilcock y col. 2009). Aunque no se han encontrado diferencias en los niveles proteicos en pacientes de EA (Pérez y col. 2007), sí hay una mayor inmunoreactividad asociada con las placas amiloides y la CAA (Hoshi y col. 2012), lo que sugiere la posibilidad de una redistribución de la AQP4 en los astrocitos. Esto se ha asociado con una pérdida de localización perivascular de AQP4, asociada a la *angiopatía amiloide cerebral* (Wilcock y col. 2009; Zeppenfeld y col. 2017), que correlaciona de manera inversa con un aumento en la carga Abeta y un estado Braak superior (Zeppenfeld y col. 2017). En definitiva, los procesos de activación de los astrocitos en diversas enfermedades neurodegenerativas pueden dar lugar a una deslocalización de la acuaporina (Hubbard y col. 2018). La falta de variaciones significativas en el nivel de expresión de la AQP4 en nuestras muestras humanas, posiblemente se deba a la heterogeneidad de astrocitos y a la mencionada redistribución de la AQP4 en la población astrogial presente en dichas muestras.

Por otro lado, como también habíamos descrito previamente, los astrocitos reactivos participan en los eventos inflamatorios e inmunológicos del SNC (Leyns y Holtzman, 2017) debido a su capacidad para secretar y responder a una gran cantidad de citoquinas inflamatorias (Zhang y Jiang, 2015; Morales y col., 2014). Los astrocitos son la fuente principal de varias citoquinas y quimioquinas, como IL6, CCL2, CXCL10 y CXCL2 (Ubogu y col. 2006), características de una respuesta inflamatoria. De hecho, hemos observado un aumento significativo en el nivel de expresión de estas citoquinas, que, además, correlacionan con los genes de activación astrogial (GFAP, VIM y ALDH1L1).

Sorprendentemente, los genes involucrados en la cascada del complemento (C1S, C1R, C3 y C4a-b) también se encuentran altamente expresadas en las muestras Braak V-VI, al igual que habíamos observado en los modelos murinos APP y TAU P301S. Es más, correlacionan perfectamente con los genes implicados en activación astrogliar y en la respuesta inmune. Con todo esto en conjunto, los astrocitos deben estar involucrados en la neuroinflamación asociada a la EA y podrían tener una repercusión importante en la progresión de la patología. En concreto, la implicación de la activación de la cascada del complemento por los astrocitos en la EA se discutirá más adelante (Apartado D4.4).

En definitiva, todo esto indica que, en el cerebro de pacientes de Alzheimer, se produce una astrogliosis generalizada con una activación de la respuesta inmune, caracterizada por el aumento de expresión de citoquinas y factores de la vía del complemento, al igual que muestran los astrocitos con un perfil neurotóxico A1 (Liddelow y col. 2017; Clarke y col. 2018; Zamanian y col. 2012). Por ello, analizamos también la expresión de varios genes característicos de los fenotipos A1 y A2, pero finalmente no observamos un claro fenotipo astrogliar, como observamos previamente en los modelos murinos APP y TAU P301S. A nivel de células individuales, los astrocitos en el envejecimiento pueden expresar una combinación de genes A1 y A2, aunque, en general, hay más astrocitos que expresan sólo el gen C3 (A1) (Clarke y col. 2018). Por lo tanto, en el cerebro de nuestras muestras Braak V-VI también podrían co-existir ambos perfiles astrogliar.

Por otro lado, dado los importantes papeles de los astrocitos en la regulación de las sinapsis en el cerebro, las alteraciones en la interacción astrocitos-sinapsis y la reorganización de las redes neuronales están involucradas en numerosos trastornos neurológicos y patologías neurodegenerativas (Hu y col. 2004; Rossini y Dal Forno, 2004; Cavazos y Cross, 2006; Perez-Cruz y col. 2011; Blanco-Suárez y col. 2017; Allen y Eroglu, 2017). En este sentido, las señales derivadas de astrocitos son necesarias para la formación, maduración funcional y refinamiento de las sinapsis y los circuitos neuronales en el SNC (Allen and Eroglu, 2017; Ullian et. al. 2001), como trombospondinas (codificadas por los genes THBS), hevína (SPARCL1) y glipicanos (GPC4 y 6) (Risher y Eroglu, 2012; Christopherson y col. 2005; Kucukdereli y col. 2011; Allen y col. 2012; Singh y col. 2016; Boisvert y col. 2018). Así pues, para comprobar si existe también una ganancia o pérdida de estas funciones de los astrocitos, determinamos el nivel de expresión de los genes THBS3, SPARCL1, GPC1, GPC4 y GPC6. La mayoría de estos genes no mostraron un cambio significativo en los individuos analizados, excepto un aumento en la expresión de GPC4 y GPC6, lo que podría indicar un intento de los astrocitos por tratar de seguir generando nuevas sinapsis funcionales. Aunque sería necesario un estudio más exhaustivo, los astrocitos en la EA no parecen tener alterada su función en el mantenimiento y formación de sinapsis, ya que no existe un aumento ni disminución significativa en el “gene set score” de dichos genes. De hecho, se ha observado que la mayoría de genes que codifican para estos factores secretados por los astrocitos no cambian de manera significativa entre los astrocitos adultos y envejecidos

(Boisvert y col. 2018). Sin embargo, sí se han relacionado estos factores con otras enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, mutaciones en GPC6 han sido descritas en el trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH) (Lesch y col. 2008) y en la neurosis (Calboli y col. 2010), desórdenes que se caracterizan por disfunción sináptica. Además, la alteración en la morfología de espinas dendríticas y la reducida densidad sináptica en las personas con síndrome de Down se ha relacionado con una disminución en la expresión de trombospondinas en los astrocitos (García y col. 2010). Es más, la expresión de la trombospondina TSP-1 se encuentra significativamente disminuida en poblaciones neuronales vulnerables en el cerebro de pacientes de Alzheimer (Buee y col. 1992). Por último, cabe destacar que experimentos *in vitro* con astrocitos y neuronas de diferentes regiones cerebrales mostraron diferentes capacidades sinaptogénicas de los astrocitos, las cuales correlacionaban con sus diferentes niveles de factores sinaptogénicos secretados (hevína, SPARC, Gpc4 y Gpc6) (Buosi y col. 2018). Por lo tanto, los resultados observados en este trabajo pueden deberse a la heterogeneidad funcional y regional de los astrocitos que puede existir en las muestras humanas, y que presentan diferentes capacidades y respuestas sinaptogénicas.

Por último, en los astrocitos de cerebro de ratón adulto, los genes relacionados con la síntesis y transporte de colesterol se encuentran alterados (Boisvert y col. 2018). En este trabajo, hemos observado que existe un ligero aumento del “gene set score” de transporte de lípidos, en el que se incluyen los genes APOE, CLU y ABCA1, ya que estas proteínas son sintetizadas por los astrocitos en el cerebro y están involucradas en el mantenimiento de la homeostasis lipídica (Bertrand et. al. 1995). Además, también están relacionadas con el aclaramiento y deposición de Abeta. ApoE y clusterina (CLU, o ApoJ) son las apolipoproteínas, producidas por los astrocitos, más importantes en el cerebro (Fagan y col. 1999) y podrían tener funciones complementarias en la homeostasis lipídica durante la degeneración del SNC y el remodelamiento sináptico (Bertrand y col. 1995). Tanto la clusterina (Lampert-Etchells y col. 1991; May y col. 1990), como el ApoE (Poirier y col. 1991; Poirier y col. 1993) se encuentran sobreexpresados en respuesta a daño neuronal.

En concreto, los efectos de ApoE en la EA o en la CAA están probablemente mediados por su papel como chaperona de Abeta, influyendo en su aclaramiento y fibrillogénesis (Holtzman, 2001), así como en su captación e internalización, ya que ambos parecen competir por las mismas vías de internalización en astrocitos (Nielsen y col. 2010; Mulder y col. 2014; Osborn y col. 2016). De hecho, ratones amiloidogénicos carentes de ApoE (ApoE^{-/-}) no presentan casi deposición de Abeta fibrilar, placas neuríticas o CAA, y aquellos ratones amiloidogénicos ApoE^{+/-} presentaban menos del 50% de patología amiloide respecto a los ratones ApoE^{+/+} (Bales y col. 1999; Bales y col. 1997; Holtzman y col. 2000a, 2000b). Así pues, alteraciones en los niveles de ApoE en el SNC tienen efectos importantes en la patología del Alzheimer. En cuanto a la clusterina, su expresión y nivel proteico se encuentran aumentados en numerosas regiones cerebrales en los pacientes de Alzheimer

(Nuutinen y col. 2009; Danik y col. 1991; May y col. 1990; May y Finch, 1992), como en el hipocampo (Bertrand y col. 1995; May y col. 1990). Además, se ha observado que forma parte constitutivamente de las placas seniles (Choi-Miura y col. 1992) ya que se une a Abeta y puede regular su solubilidad (Wisniewski y col. 1993) y retrasar su agregación (Oda y col. 1994). En humanos, su expresión podría estar up-regulada en un intento por bloquear la deposición de Abeta (Schmechel y col. 1993). Por último, ABCA1 es un transportador necesario para la regulación de los niveles extracelulares de lípidos en el SNC (Wahrle y col. 2004), participando en el transporte de colesterol y fosfolípidos en plasma (Schmitz y Langmann, 2001; Wang y Tall, 2003). Además, también actúa junto a ApoE y participa en la fagocitosis por parte de los astrocitos reactivos (Boisvert y col. 2018; Morizawa y col. 2017). Por tanto, la modulación de los niveles o de la función de Abca1 probablemente influya directamente en las interacciones ApoE-Abeta a lo largo de la deposición de Abeta, con consecuencias negativas en el cerebro (Wahrle et. Al. 2004). Así mismo, estudios recientes también sugieren que Abca1 puede influir en la producción de Abeta celular (Fukumoto y col. 2002; Koldamova y col. 2003; Sun y col. 2003). En definitiva, el aumento en la expresión generalizada de genes involucrados en el transporte de lípidos e implicados en la agregación y aclaramiento del Abeta, podría tener una importante repercusión en la patología de Alzheimer.

Por todo ello, parece que los astrocitos en la EA no presentan disminución de sus funciones en la formación y mantenimiento de las sinapsis, ni en el transporte de lípidos y colesterol, aunque sí está clara su reactividad y participación en la respuesta inmune y la neuroinflamación asociadas a la patología. Sería necesario el análisis de más marcadores astrogliales para discernir su posible disfuncionalidad metabólica y/o funcional en el cerebro de pacientes de Alzheimer, como hemos observado en ratones modelo de la enfermedad. En este sentido, cabe destacar que, debido a la heterogeneidad celular presente en las muestras *postmortem* humanas, no es posible medir genes implicados en el metabolismo celular, ya que no podríamos descartar las alteraciones concretas de los astrocitos del resto de células del SNC. Por lo tanto, planteamos utilizar nuevas aproximaciones experimentales que nos permiten continuar caracterizando el perfil o estado astrogliar en las muestras de individuos Braak V-I, a nivel transcripómico, proteico e inmunohistoquímico, tratando de visualizar los cambios observados, como el aumento de proteínas del complemento, entre otros.

4.4. Comparación de la respuesta astrogliar en modelos transgénicos y en pacientes de Alzheimer

De manera resumida, las características comunes que hemos observado tanto en modelos transgénicos como en muestras *postmortem* de pacientes de Alzheimer, son la existencia de una astrogliosis generalizada, activación de la respuesta inflamatoria y la activación de la cascada del complemento. Sin embargo, no hemos podido comprobar si, en las muestras

humanas, los astrocitos también sufren un proceso de disfuncionalidad o senescencia, ya que no podemos aislar los astrocitos específicamente de dichas muestras para estudiar su metabolismo energético y sus funciones de neuroprotección, diferenciación y/o prosupervivencia. Serán necesarias futuras aproximaciones experimentales, para abarcar esta importante cuestión.

En primer lugar, como ya hemos discutido previamente, está ampliamente descrito la existencia de una **astrogliosis** que progresa paralelamente con la patología Abeta y tau, tanto en modelos animales como en pacientes de Alzheimer (este trabajo; Verkhratsky y col. 2010; Carter y col. 2012; Rodríguez-Arellano y col. 2016; Garwood y col. 2016; Phillips y col. 2014; Heneka y col. 2014; Heppner y col. 2015; Heneka y col. 2015a, 2015b). De hecho, también existen numerosos estudios que muestran que la microgliosis y la astrogliosis, junto a la **neuroinflamación** asociada, son características comunes en muchas enfermedades neurodegenerativas (Hansen y col. 2017). Así pues, los astrocitos, al igual que la microglía, cuando se activan pueden secretar citoquinas proinflamatorias y especies reactivas (este trabajo; Heneka y col. 2005; Farina y col. 2007; Medeiros y LaFerla, 2013; Rodríguez-Arellano y col. 2016; Haim y Rowitch, 2017; Leyns y Holtzman, 2017; Zhang y Jiang, 2015; Liu y col. 2014), produciendo una exacerbación de la neuroinflamación y la neurodegeneración que se producen en la EA.

Por otro lado, lo que resulta más interesante es el aumento significativo de la expresión de determinadas proteínas de la **cascada del complemento** (C4a, C4b, C3, C1s y C1r) por parte de los astrocitos, observado tanto en el hipocampo de modelos transgénicos con patología Abeta o fosfo-tau, como en pacientes de Alzheimer. Numerosos estudios *in vitro* han indicado que los astrocitos (humanos y murinos) pueden sintetizar una variedad de factores del complemento (Barnum y col. 1993; Barnum, 1995; Gasque y col. 1993; Walker y McGeer, 1993; Haga y col. 1996), como C2, C3, C4, C5, C7 y C8, muchas de las proteínas inhibitorias del complemento, reguladores de su activación y ciertos receptores (Gasque y col. 1995, 1996). Además, los astrocitos primarios humanos adultos secretan C1r y C1s al medio de cultivo, aunque no secretan niveles detectables de C1q (Verhuis y col. 1999). Cabe destacar que, aunque no hemos observado un claro fenotipo astroglial tipo A1 o A2 en nuestros modelos transgénicos ni en individuos Braak V-VI, es cierto que los astrocitos A1 muestran una expresión fuertemente inducida de proteínas del complemento C1r, C1s, C3 y C4 (Zamanian y col. 2012; Cahoy y col. 2008).

Existen numerosas evidencias que implican a la vía del complemento como un importante colaborador en la patología de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas (Lian y col. 2016; Liddelow y col. 2017; Clarke y col. 2018; Hong y col. 2016; Nguyen y col. 2002; Wyss-Coray y col. 2002; Veerhuis y col. 2011). En concordancia con nuestros resultados, otros autores también han observado un aumento de C3, C4b y otros componentes de la cascada clásica del complemento en los astrocitos reactivos, durante el envejecimiento

(Boisvert y col. 2018; Clarke y col. 2018; Stevens y col. 2007), pero sobretodo en modelos amiloidogénicos y en muestras *postmortem* de pacientes de Alzheimer (Lian y col. 2016; Liddelow y col. 2017). Es más, se han observado altos niveles de varios factores de la cascada del complemento, como C1q, C4b, C3d, C3b y C5b-C9, en exosomas derivados de astrocitos, aislados de muestras de plasma de pacientes de Alzheimer (Goeztl y col. 2018). También se han detectado niveles elevados de varios componentes del complemento en el líquido cefalorraquídeo de individuos presintomáticos que portan mutaciones de Alzheimer familiar (FAD) (Ringman y col. 2012). Incluso, varios agentes que interaccionan con la cascada del complemento podrían ser genes susceptibles en la EA, entre los que se incluyen la Clusterina (inhibidor del complemento) y el receptor CR1 (Jun y col. 2010, Chibnik y col. 2011, Degn y col. 2011), o incluso las diferentes isoformas de ApoE, afectando a la capacidad fagocítica de los astrocitos (Chung y col. 2016).

Por tanto, la activación masiva y temprana de la cascada clásica del complemento, junto con la gliosis y la neuroinflamación, es una característica esencial de la EA y de las principales enfermedades neurodegenerativas (Pasinetti y col. 1992; Shen y col. 1997; Nguyen y col. 2002; Wyss-Coray y col. 2002; Veerhuis y col. 2011). Las placas amiloides fibrilares (Afagh y col. 1996; Cummings y col. 1996) u otras proteínas mal plegadas o agregadas en otras demencias (Rostango y col. 2002), podrían contribuir a la activación del complemento y, así, a la progresión de la enfermedad. Es más, las placas seniles y los ovillos neurofibrilares se han encontrado marcados con componentes del sistema del complemento y productos de su activación, así como otras estructuras asociadas a la neurodegeneración (Eikelenboom y col. 1989; McGeer y col. 1989; Veerhuis y col. 1996; Webster y col. 1997; Eikelenboom y Stam, 1982; Ishii y Haga, 1984). Además, también se ha observado que citoquinas como IL6, IFN γ , TNF α e IL1 α estimulan la expresión de C1s, C1r, C4 y/o C3 en astrocitos en cultivo (Walker y col. 1998; Verhuis y col. 1999; Gasque y col. 1993; Barnum y col. 1993; Barnum, 1995), por lo que la neuroinflamación asociada a la EA también contribuye a la activación astrogliar de la cascada del complemento. En cuanto a la patología tau, en modelos transgénicos (P301S) y pacientes de taupatías, se ha observado una activación de C3 en los astrocitos GFAP-positivos, y su receptor C3aR, el cual regula la reactividad microglial y astrogliar y la producción de citoquinas proinflamatorias (Litvinchuk y col. 2018). Además, la activación del complemento parece exacerbar la patología tau en modelos de la EA, lo que podría estar mediado por la proteína C3 o C5b-9, aunque el mecanismo todavía no está claro (Hansen y col. 2017; Colonna y Butovsky, 2017). De hecho, la delección de C3ar1 resultó en una recuperación casi completa de la patología tau, además de mejorar los déficits sinápticos y la función cognitiva, a través de la regulación de la respuesta inflamatoria y la activación de células inmunes (Litvinchuk y col. 2018).

Por otro lado, en cuanto a la patología Abeta, se ha observado un aumento de C3 en los astrocitos de ratones APP, mientras que el fragmento de escisión de C3 está asociado a las placas (Zhou y col. 2008). Es más, además de colocalizar con las placas amiloides fibrilares,

algunas proteínas del complemento (como C1q, C4, C3) también colocalizan con la angiopatía vascular amiloide en la corteza cerebral y en el hipocampo de pacientes de EA (Eikelenboom y Stam, 1984; Stoltzner y col. 2000; Strohmeyer y col. 2000). Por ejemplo, en un modelo murino de angiopatía cerebral amiloide, se han observado un aumento de C1q, C3 y C4 en áreas con depósitos amiloides fibrilares (Fan y col. 2007). El péptido o las fibras de Abeta *in vitro* activan tanto la vía clásica del complemento mediante la unión directa a C1q como la vía alternativa mediante interacciones con C3 (Jiang y col. 1994; Rogers y col. 1992; Velazquez y col. 1997; Rogers y col. 1992; Bradt y col. 1998). Lo que es más importante es que este péptido, aunque por sí mismo no parece estimular la síntesis de C1r y C1s por parte de los astrocitos (Verhuis y col. 1999), cuando se encuentra unido a C1q puede también interactuar con C1r y C1s para formar una macromolécula C1 funcional (Kilchherr y col. 1982). De hecho, el alcance de la activación de C1 depende del grado de agregación de los péptidos beta-amiloides (Jiang y col. 1994; Snyder y col. 1994). Por tanto, existe la hipótesis de que el Abeta fibrilar *in vivo* activa la cascada del complemento y contribuye a la inflamación local, particularmente mediante el reclutamiento de células gliales en el interior de la placa, resultando finalmente en neurotoxicidad y demencia (Eikelenboom y Veerhuis, 1996; Cooper y col. 2000; Tenner, 2001). Por ejemplo, estudios recientes han demostrado que la deficiencia de C3 en modelos amiloidogénicos de Alzheimer, conlleva numerosas mejoras en la patología, a pesar de presentar más placas de Abeta (Shi y col. 2017a), lo que sugiere un papel tóxico e importante de esta proteína en la patología del Alzheimer.

A pesar de todos estos hallazgos, el papel de la cascada del complemento en la EA todavía no se conoce (Rajendran y Paolicelli, 2018), por lo que se requieren más estudios para esclarecer su participación en las enfermedades neurodegenerativas en general. En este sentido, la función de las proteínas del complemento en el cerebro parece ser análoga a su función en el sistema inmune: el aclaramiento del material celular que ha sido marcado para su eliminación, como células apoptóticas (Stephan y col. 2012) y sinapsis (Stevens y col. 2007), pero también en otras numerosas funciones no inmunes durante el periodo embrionario y postnatal, como neurogénesis, migración y supervivencia neuronal (Benard y col. 2008; Shinjyo y col. 2009; Rutkowski y col. 2010; Benoit y Tenner, 2011). Por tanto, muchos trabajos proponen un papel para el sistema del complemento en la mediación del refinamiento sináptico mediado por astrocitos y microglía que, de manera coordinada, participan en el “pruning” de sinapsis y axones innecesarios, así como en la eliminación de células apoptóticas (Leyns y Holtzman, 2017; Hansen y col. 2017; Clarke y Barres, 2013; Barres, 2008; Colonna y Butovsky, 2017; Rajendran y Paolicelli, 2018; Hong y col. 2016; Vasek y col. 2016). Dicho “pruning” sináptico consiste en el saneamiento y la remodelación de las sinapsis, fagocitando aquellas no funcionales o dañadas, y ocurre de manera fisiológica durante el desarrollo cerebral postnatal (Gomez-Nicola y Perry, 2015; Chung y col. 2015) pero también en el cerebro adulto, en la remodelación adaptativa de los circuitos

neuronales (Clarke y Barres, 2013; Chung y col. 2013). Por ejemplo, C3 y C4b están involucradas en esta eliminación o “pruning” sináptico (Sekar y col. 2016). En las enfermedades neurodegenerativas, el aumento de estas proteínas aparece antes de los signos de la pérdida neuronal, lo que sugiere una reactivación de mecanismos de eliminación sináptica mediada por el complemento, que lleva a la progresión de la enfermedad (Stephan y col. 2012). Así pues, las proteínas del complemento participan en la destrucción sináptica y resultan altamente tóxicas para las neuronas, aunque su mecanismo exacto de toxicidad todavía no se conoce (Liddelow y col. 2017; Zamanian y col. 2012). Por ello, los astrocitos reactivos A1 que expresan dichas proteínas del complemento llevarían a cabo la pérdida sináptica que se ha observado en el hipocampo durante el envejecimiento (Shi y col. 2015) y en la EA.

Esta eliminación sináptica se induce por el marcaje con C1q de las sinapsis para su eliminación (Stevens y col. 2007) y el reclutamiento de C3, que lleva a la fagocitosis de dichas sinapsis por parte de la microglía (Schafer y col. 2012), las principales células del SNC que expresan receptores para el complemento (Stevens y col. 2007; Schafer y col. 2012). Así pues, los astrocitos pueden regular indirectamente la eliminación de sinapsis mediante la secreción de TGF β , que induce la expresión de C1q en las neuronas, marcando sus sinapsis para su fagocitosis microglial (Bialas y Stevens, 2013; Schafer y col., 2012; Colonna y Butovsky, 2017). Por tanto, C1q y C3 son necesarias en la fagocitosis microglial de sinapsis e, incluso, esta fagocitosis parece ser dependiente de Abeta (Hong y col. 2016). En concreto, la activación de la cascada del complemento lleva al ensamblaje de la convertasa C3, resultando en los productos C3a y C3b, que pueden ejercer diversas funciones de señalización a través de sus receptores C3aR y CR3, respectivamente (Leyns y Holtzman, 2017; Stephan y col. 2012). Los astrocitos pueden liberar la fracción C3 del complemento en respuesta al Abeta oligomérico, y ésta puede activar a la microglía a través de su receptor C3R (Litvinchuk y col. 2018), promoviendo así la pérdida sináptica (Hong y col. 2016) y el déficit cognitivo asociado a la edad en modelos amiloidogénicos (Shi y col. 2015, 2017a), por lo que pueden contribuir así al estado patológico en la EA (Liddelow y col. 2017). Además, la expresión de C3 y del receptor C3aR1 correlacionan positivamente con el déficit cognitivo y los estadios de Braak, y la delección de dicho receptor en ratones transgénicos resultó en la reversión de la patología tau y la atenuación de la neuroinflamación, los déficits sinápticos y la neurodegeneración (Litvinchuk y col. 2018). Por tanto, parece existir una comunicación cruzada entre las neuronas y la respuesta inmune mediada por C3-C3aR que influye en la función del sistema y la patología amiloide (Lian y col. 2016; Lian y col. 2015), lo que implica a estas proteínas con un papel importante en la EA a través de complicadas interacciones neuronas-astrocitos-microglía (Litvinchuk y col. 2018). En definitiva, un mejor entendimiento de los papeles de las proteínas del complemento en el SNC tienen la posibilidad de ampliar nuestro entendimiento del desarrollo y progresión de las enfermedades neurodegenerativas, en

concreto la EA, así como facilitar nuevas estrategias terapéuticas para interferir con el curso patológico común a todas las enfermedades. Lo que parece claro es que los astrocitos y la microglía parecen cooperar para mediar la neurotoxicidad dependiente del sistema del complemento (Hansen y col. 2017) en las patologías neurodegenerativas.

Todo esto sugiere que existe una comunicación cruzada entre entre células astrogliales y microgliales, que podría ser bidireccional (Liddelow y col. 2017; Schafer y col. 2012) y que es esencial para el correcto funcionamiento de las redes neuronales y el SNC, en general. La alteración de esta red de conexiones gliales o la potenciación de la activación de ambos tipos celulares podrían participar en la progresión de la EA. En este sentido, es interesante destacar que señales secretadas por la microglía activa (como IL1 β , TNF α y C1q) pueden co-activar a los astrocitos, transformando su fenotipo de un estado neuroprotector (A2) a un estado neurotóxico (A1) (Liddelow y Barres 2017; Shi y col. 2017b), provocando finalmente una disfunción y muerte neuronal (Leyns y Holtzman, 2017). Estos estudios subrayan la diversidad de consecuencias que las citoquinas derivadas de la microglía pueden tener en la expresión genética y la función de los astrocitos que puede, en última instancia, tener un impacto importante en la integridad neuronal (Liddelow y col. 2017; Zamanian y col. 2012; Leyns y Holtzman, 2017). Pero, además, también puede ocurrir de manera inversa, es decir, que los astrocitos reactivos puedan modular la respuesta o fenotipo microglial, ya que también envían múltiples señales a la microglía (Colonna y Butovsky, 2017; Davalos y col. 2005). De hecho, los astrocitos parecen influir en el grado de reactividad microglial en modelos de amiloidosis o de taupatías, de una manera dependiente de la isoforma de ApoE (Colonna y Butovsky, 2017; Rajendran y Paolicelli, 2018). Incluso, los astrocitos pueden atenuar la respuesta inflamatoria de la microglía mediante la liberación de GABA, limitando así la activación microglial (Lee y col. 2011). Factores liberados por los astrocitos reactivos también pueden tener un efecto inhibitorio en la fagocitosis microglial (DeWitt y col. 1998). Por ejemplo, el TGF β secretado por neuronas hipocámpales y astrocitos puede regular la activación de células microgliales, atenuando la liberación de citoquinas inflamatorias y especies reactivas (Mittaud y col. 2002; Herrera-Molina y Bernhardt, 2005; Herrera-Molina y col. 2012), protegiendo a las células neuronales *in vivo* (Hu y col. 1995; Lieb y col. 2003; Herrera-Molina y Bernhardt, 2005) y fomentando la fagocitosis y degradación de Abeta mediada por microglía (Wyss-Coray y col. 2001).

Debido a la existencia de esta clara conexión microglía-astroglía, conocer los mecanismos y papeles de ambos tipos celulares nos permitiría, a su vez, descifrar más detalles sobre la activación astrocitaria y su participación en la patología del Alzheimer. En definitiva, son necesarios futuros estudios sobre ambos tipos celulares, para definir la relación recíproca entre ellos y su implicación en la progresión de la EA (Rajendran y Paolicelli, 2018). Por ejemplo, uno de los siguientes pasos a seguir para tratar de entender el efecto neurotóxico o neuroprotector de los astrocitos, ante la patología Abeta y/o tau, es utilizar también cultivos microgliales. Así podríamos estudiar el efecto de la microglía sobre el fenotipo astrogliar y

viceversa, además de sus efectos sobre las neuronas, que son las últimas afectadas que llevan a los déficits cognitivos de la EA. Además, estos estudios permitirán buscar dianas farmacológicas que puedan inhibir el efecto tóxico o potenciar el efecto neuroprotector de los astrocitos sobre la microglía y/o las neuronas. En este sentido, un estudio reciente ha demostrado, en un modelo murino de la enfermedad de Parkinson, que la reversión de la activación microglial [con ello, la liberación de TNF α , IL1 α y C1q (Liddelow y col. 2017)], evita la activación de los astrocitos al fenotipo neurotóxico A1, lo que previene, a su vez, la muerte de neuronas dopaminérgicas (Yun y col. 2018). Además, se ha descrito que ratones *Csf1r*^{-/-}, carentes de microglía, no adquieren reactividad astrocitaria A1 tras la inyección de LPS (Liddelow y col. 2017).

En definitiva, es muy probable que los astrocitos reactivos y la microglía activa no participen de manera aislada, sino que actúan de una manera conjunta y coordinada, al igual que las redes astrocitos-neuronas (Covelo y Araque, 2018; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018), lo que es fundamental en la patología de la EA. Por lo tanto, la conexión microglía-astroglía-neuronas y sus interacciones son importantes en el correcto funcionamiento del SNC (Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018; Rajendran and Paolicelli, 2018), por lo que tienen importantes implicaciones en el aprendizaje, la memoria y los estados cognitivos (Chung y col. 2013; Verkhatsky y col. 2010). Por ello, resulta imprescindible conocer las relaciones entre todos estos tipos celulares y su repercusión en la patología de Alzheimer.

**F. CONCLUSIONES/
CONCLUSIONS**

F1. CONCLUSIONES

1. Tanto en el hipocampo de modelos transgénicos de la EA como en el de pacientes de Alzheimer, se produce una activación astrogliar generalizada, que progresa significativamente con la patología amiloidea y de tau. Sin embargo, en ningún caso disminuye el número total de astrocitos, ni aparecen en los mismos signos de degeneración morfológica, al contrario de lo que le ocurre a la microglia en el hipocampo de pacientes y del modelo animal ThyTau.
2. Las formas solubles de Abeta oligomérico y/o de tau hiperfosforilado producen *in vitro* una activación astrogliar proinflamatoria. Además, las formas solubles de tau fosforilado provocan una aparente disfunción astrogliar que implica la pérdida de sus capacidades neuroprotectoras sobre la integridad sináptica y la supervivencia neuronal.
3. Los astrocitos reactivos que rodean las placas amiloides tienen la capacidad de ingerir y degradar las estructuras neuronales distróficas acumuladas alrededor de las placas. Sin embargo, tienen alterado el sistema autofágico/lisosomal, probablemente debido a las formas oligoméricas de Abeta, lo que disminuye su eficiencia de fagocitosis y degradación. Aunque esto podría provocar mayores daños a nivel molecular y/o funcional de las células astrogliales, su respuesta no parece afectar directamente a la activación microglial o a la supervivencia neuronal.
4. Los astrocitos aislados de los modelos transgénicos APP y TAU P301S muestran una activación inflamatoria y, sobre todo, una disminución del metabolismo energético y de sus funciones beneficiosas sobre el desarrollo, diferenciación y supervivencia de otras células del SNC. En concreto, estos astrocitos tienen alteraciones a nivel mitocondrial y, en consecuencia, aumento del estrés oxidativo y del calcio intramitocondrial, entre otros.
5. En el hipocampo de muestras *postmortem* de pacientes de Alzheimer también se produce una astrogliosis generalizada de carácter inflamatorio que, además, se acompaña de un aumento en la expresión de varias proteínas de la cascada del complemento, coincidiendo con la respuesta observada en los astrocitos de los modelos transgénicos estudiados. El aumento de proteínas del complemento podría implicar una reactivación de los mecanismos de destrucción sináptica y toxicidad neuronal, contribuyendo a la progresión de la EA.
6. En resumen, los resultados de este trabajo sugieren que la astrogliosis que se produce en la EA, mediada por Abeta y/o fosfo-tau, implica una ganancia de función neuroinflamatoria y, sobre todo, una disfunción o senescencia astrogliar, que implica la pérdida de las capacidades beneficiosas y neuroprotectoras de los astrocitos. Por tanto, estos astrocitos activos podrían potenciar la patología de Alzheimer, por lo que su recuperación funcional podría constituir una posible estrategia terapéutica para la EA.

F2. CONCLUSIONS

1. In the hippocampus of transgenic AD mouse models and *postmortem* tissue of Alzheimer's patients, there is a generalized astrogliosis which progresses significantly with amyloid and tau pathologies. However, there is no reduction in the total number of astrocytes and no degenerative morphological signs, in contrast with microglia in the hippocampus of patients and ThyTau model.
2. Soluble forms of oligomeric Abeta and/or phosphorylated tau cause an inflammatory activation of astrocytes *in vitro*. Moreover, this phospho-tau also causes an apparent astroglial dysfunction, which implies the loss of protective functions related to neuronal survival and synapsis integrity.
3. Reactive astrocytes surrounding Abeta plaques are able to phagocyte and degradate neuritic dystrophies associated with amyloid deposition. Nevertheless, they have an alteration at an autophagic/lisosomal level due probably to oligomeric Abeta, causing a decrease in the efficiency of phagocytosis and degradation. Although this could cause greater damage in a molecular and/or functional level of astrocytes, it doesn't affect microglial activation or neuronal survival directly.
4. Isolated astrocytes from APP and TAU P301S transgenic mice show an inflammatory activation and, most of all, a decrease in their metabolism and in their beneficial functions over development, differentiation and survival of other cells in the CNS. In particular, they exhibit mitochondrial alterations and, consequently, an increase in intramitochondrial oxidative stress and calcium levels.
5. In the hippocampus of Alzheimer's patients, there is also a generalized inflammatory astrogliosis, accompanied by the increase of several classical complement pathway proteins, as we previously observed in astrocytes isolated from transgenic mouse models. This increase in complement proteins could implicate a reactivation of synaptic destruction and neuronal toxicity mechanisms, thus, contributing to the progression of AD.
6. In short, the results of this work suggest that astroglial reactivity in AD, mediated by Abeta and/or phospho-tau, implies a gain of neuroinflammatory function and mainly an astroglial dysfunction or senescence, with a loss of the beneficial and neuroprotective functions of astrocytes. Therefore, these active astrocytes could potentiate Alzheimer's pathology and, thus, the functional recovery of astroglia could become a novel therapeutic strategy for AD.

G. SUMMARY

1. Introduction

Alzheimer's Disease (AD) is a progressive and irreversible neurodegenerative disease, characterized by cognitive decline and behavioral alterations (Van Strien *et al.* 2009; Hane *et al.* 2017b; Kumar *et al.* 2018). AD is the first cause of dementia, with an incidence of over 70 million people affected worldwide (OMS 2017; Prince *et al.* 2016), which turns it into a serious public health issue (Robinson *et al.* 2017). Despite the progress achieved during the last decades, the cause or causes of this disease yet remain unclear, and till this moment there is no effective pharmacological therapy to treat or palliate the disease (Hane *et al.* 2017b; Kumar *et al.* 2018).

A low percentage of AD cases are caused by genetic mutations which can affect the amyloid precursor protein (APP), presenilin 1 (PS1) and/or presenilin 2 (PS2). This variant is known as Familial AD (www.alzforum.org), and it follows an autosomal dominant inheritance pattern. Anyhow, most cases have a multifactorial origin, and are classified as Sporadic AD, with multiple risk factors associated to its onset and progression (Ballard *et al.* 2011; Mattson *et al.* 2018; Robinson *et al.* 2017; Kumar *et al.* 2018). Both forms share symptomatology and histopathological lesions (Gomez-Isla *et al.* 2008; Perl, 2010; Ballard *et al.* 2011; Bagyinszky *et al.* 2014), since both show the characteristic anatomopathological features of the disease (Perl, 2010; Claeysen *et al.* 2012; Scheltens *et al.* 2016). The most relevant microscopical alterations observed in AD patients are (Duyckaerts *et al.* 2009; Perl, 2010; Serrano-Pozo *et al.* 2011a; Karch *et al.* 2014; Kumar *et al.* 2018): (i) Accumulation of extracellular senile plaques (Glenner *et al.* 1984; Masters *et al.* 1985; Kumar *et al.* 2018) and soluble forms (Martins *et al.* 2008; Hane *et al.* 2017a) of beta-amyloid protein (A β), as well as intracellular hyperphosphorylated Tau neurofibrillary tangles (Spillantini *et al.* 2013; Kumar *et al.* 2018), (ii) significant synaptic loss and neuronal degeneration (Forner *et al.* 2017; Hane *et al.* 2017a), and (iii) a neuroinflammatory process accompanied by microglial and astrocytic activation. In addition, there are neuritic dystrophies associated with amyloid plaques, which contribute significantly to the pathology in preclinical stages of AD (Bell *et al.* 2011; Torres *et al.* 2012; Sanchez-Varo *et al.* 2012).

In particular, neuroinflammation is an early pathological component associated to the progression of AD (Hane *et al.* 2017a; Chen, 2018; Zhang *et al.* 2015; Gutierrez *et al.* 2018), and it is mediated mainly by microglial cells and astrocytes (Labzin *et al.* 2017; Heneka *et al.* 2014, 2015a, 2015b; Heppner *et al.* 2015; Liu *et al.* 2014). In the presence of A β and/or hyperphosphorylated Tau, glial cells acquire an active phenotype, triggering an inflammatory response which can evolve into a chronic overactivated neuroinflammatory response, contributing to neuronal dysfunction and/or cell death. (Heneka *et al.* 2007; Perry *et al.* 2010; Heppner *et al.* 2015; Mena *et al.* 2018)

Yebeles, 2008). However, the role of reactive glia in the pathological progression of AD is still to discover.

The role of microglia has been widely studied in the last decade. On one hand, in amyloidogenic mouse model, microglia exert a strong activation surrounding Abeta plaques (Heneka et al. 2013, 2015), which increases with the abeta pathology, (Drummond y Wisniewski, 2017). This activation spreads throughout the parenchyma due to the progressive increase of oligomeric soluble Abeta forms (Jimenez y col. 2008, 2011; Moreno-González y col. 2009). Recently, our group has described, in human AD hippocampus, the existence of a microglial degenerative process mediated by toxic soluble phospho-tau species (Navarro y col. 2018; Gutierrez y Vitorica, 2018; Sanchez-Mejias y col. 2016; Hansen y col. 2017; Romero-Molina y col. 2018). Astrocytic contribution could be crucial in the appearance and progress of AD (Heneka y col. 2015; Heppner y col. 2015), given the astrocyte activation or “astrogliosis” observed in patients (Osborn y col. 2016; Verkhratsky y col. 2016; Chen, 2018; Verkhratsky y col. 2010), although it is not clear if this response is a cause or a consequence of the pathology. In addition, we have to take into consideration the molecular and functional diversity of the astrocyte population in the adult brain (Haim y Rowitch, 2017; John Lin y col. 2017). It has been proposed that, similarly to microglia, astrocytes can adopt different functional phenotype depending on the pathological context (Zamanian y col. 2012; Liddelow y Barres, 2017).

Therefore, our hypothesis suggests that the pathological progression of AD is temporally associated with a glial dysfunction, which is why defining the functional profile (neuroprotective, neurotoxic and/or degenerative) of astrocyte during the disease progression is crucial. In short, our main objective is to characterize the morphological and functional heterogeneity of reactive astrocytes in the brain of both, transgenic mouse models and human AD cases. For these reasons, our specific aims are: (1) proving the existence of a general astroglial reactivity in models and human samples; (2) analyzing the *in vitro* response of astrocytes to soluble forms of Abeta and phospho-tau; (3) studying the role of astrocytes when exposed to dystrophic neurites from Abeta and Tau mice models; and (4) transcriptomic characterization of the astrocyte phenotype in brain tissue from mice models and *postmortem* AD patients.

2. Methods

In order to achieve the proposed objectives, the experimental procedures are based on transgenic mouse models and *postmortem* tissue from Alzheimer’s patients. On one hand, the transgenic mice used in this work are the amyloidogenic models, APP (APP^{SL}) and APP/PS1 (PS1 Δ exon9xAPPs), and tauopathies models, ThyTAU (Thy-Tau22) and TAU P301S (Line PS19), using wildtype (WT) mice with same genetic background (C57BL/6) and age. On the other hand, human samples are classified depending on the tau pathology present in the brain tissue, according to Braak stages (Braak y Braak, 1991). In addition, we have also

used *in vitro* models: microglial (BV2 and N13), astroglial (WJE) and neuronal (N2a) cell lines and primary cultures from WT mice. Depending on the object of the study, the brain tissue or treated cells were subjected to biochemical and biomolecular studies (total RNA and protein extraction, isolation of soluble fractions S1 or neurosynaptosomes) or immunohistochemical studies (optical and/or confocal microscopy). In each experimental procedure, samples from different genotypes and ages were processed simultaneously.

On one hand, we extract total RNA and proteins from the homogenized hippocampus in order to study genetic expression by quantitative PCR (qPCR) and specific proteins by western blot. In human *postmortem* tissue, we also used the *microfluidic cards* (*TaqMan® Array Cards*; Thermo Fisher Scientific), for the analysis of several genes at the same time. On the other hand, we also extract S1 fractions from the cortex of adult APP/PS1 and ThyTAU mice, as well as Alzheimer's patient *postmortem* tissues, in order to have soluble Abeta and/or phospho-tau. These soluble fractions are used for diverse *in vitro* assays, such as cell cultures stimulation (acute treatments) by PCR or micro-arrays analysis, and toxicity assays (chronic treatments) by flow cytometry or immunocytochemistry.

We have biochemically isolated the synaptic and axonal terminals from the cortex of transgenic mouse models (adaptation from Puighermanal y col. 2016), which have been characterized and used as an *in vitro* model of neuritic dystrophies (neurosynaptosomes, NS). In this way, we perform phagocytosis and degradation assays of these structures, labelled with TAMRA or pHRodo respectively, by primary astrocytes *in vitro*. The analysis is carried out by flow cytometry and western blot. These results are supported by immunocytochemical techniques and transmission electronic microscopy (TEM), in collaboration with Dra. Antonia Gutierrez's group (Universidad de Málaga).

Furthermore, astroglial cells have been specifically isolated from the cortex and hippocampus of transgenic mouse models (APP and TAU P301S) at different ages (pre and post-pathology), with *Fluorescence-activated Cell Sorting* (FACS) (adaptation from Orre y col. 2014a, 2014b) and the specific astroglial antibody ACSA2 (Kantzer y col. 2017). Next, we extract RNA and perform micro-arrays (Affymetrix, ThermoScientific) in order to analyze their transcriptome.

Finally, we have used *in vivo* multiphoton microscopy to test the mitochondrial alterations in astrocytes in AD. To this effect, we perform intracranial injections of specific adenovirus in order to test variations in calcium levels (biosensor YC.3.6) or oxidative stress (roGFP), specifically in mitochondria of cortical astrocytes from WT mouse, treated with soluble Abeta. This novel technique has been used in Dr. Bacskai's lab, thanks to a fellowship at the Massachusetts General Hospital (MGH, Harvard Medical School; EEUU).

All experiments have been repeated at least 3 times and analyzed statistically, according to the required test in each case, by Statgraphics v3.1, GraphPad Prism 5 and SPSS. We consider statistically significant differences with $p < 0.05$.

3. Results and Discussion

First of all, we have confirmed molecularly and immunohistochemically the existence of a generalized astrogliosis in the hippocampus of transgenic mouse models (Jimenez y col. 2008; Moreno-Gonzalez y col. 2009; Kamphuis y col. 2015; Laurent y col. 2017) and *postmortem* tissue of Alzheimer's patients (Simpson y col. 2010; Serrano-Pozo y col. 2013b), which progresses significantly with amyloid and tau pathologies (Verkhatsky y col. 2010; Carter y col. 2012; Rodríguez-Arellano y col. 2016; Garwood y col. 2016; Phillips y col. 2014). Although this astrogliosis has been widely observed, much is still to know to describe the astrocytic molecular profile and its influence in neurodegenerative diseases. For this reason, we have tried to characterize the functional and transcriptomic changes that astrocytes suffer with Abeta and/or tau pathology, and its impact in the progression of the disease.

Firstly, we analyze the responses *in vitro* of primary astrocytes treated with soluble forms of Abeta and/or phosphorylated tau. We observe that astrocytes are resistant to Abeta or phospho-tau toxic effect (this work, Sánchez-Mejías y col. 2016). Moreover, they show a pro-inflammatory response because of the acute treatment, releasing pro-inflammatory factors and cytokines (Zhang y Jiang, 2015; Ubogu y col. 2006; Heneka y O'Banion, 2007; Litvinchuk y col. 2018), which is part of the spectrum of molecular and functional changes that occur in astrogliosis (Sofroniew, 2009). Hence, they could be participating in the immune response of the central nervous system (CNS) (Jensen y col. 2013; Farina y col. 2007). Furthermore, soluble forms of phosphorylated tau cause a decrease in the expression of many genes implicated in development, differentiation, proliferation and morphogenesis processes, and in the cellular cycle. This could indicate a cellular stress, astroglial dysfunction or, even, a senescence process (Crowe y col. 2016), triggering or worsening the neuronal dysfunction (Zhang y Jiang, 2015). Due to our *in vitro* observations, in which astrocytes are not able to completely protect neurons and synapses from soluble phospho-tau toxic effect, we could suggest that soluble phospho-tau could be reducing the neuroprotective and pro-survival potential of astrocytes. This functional impairment would influence the neuronal dysfunction and the alterations in the synaptic integrity and functionality (Forner y col. 2017; Hane y col. 2017a; Gómez-Isla y col. 1996; Price y col. 2001). Most of these features have been described in the brain of Alzheimer's patients (Simpson y col. 2011) and transgenic models (Arendt y col. 1996; Frost y col. 2016).

Secondly, because of the spatial proximity of reactive astrocytes (Malm y col. 2005; Meyer-Luehmann y col. 2008; Chen, 2018; Liu y col. 2014) and neuritic dystrophies (Sánchez-Varo y col. 2012; Torres y col. 2012; Nixon, 2007; Nixon y Yang, 2011) surrounding amyloid

plaques, we also study the astrocytic role in the clearance of this abnormal synaptic terminals. Hence, we determine that astrocytes are capable of surrounding, internalizing and degrading those neuritic dystrophies in the hippocampus of APP/PS1 mice and Alzheimer's patients (Gómez-Arboledas y col. 2017). However, when the neuritic dystrophies or NS include Abeta (APP mice), the phagocytosis and degradation efficiency *in vitro* is reduced. In fact, oligomeric Abeta could be responsible of phagocytosis alteration, with also damage in autophagic pathway and lysosomal degradation (Ling y Salvaterra, 2011; Söllvander y col. 2016; Son y col. 2016; Gwon y col. 2018; Song y col. 2011), causing the NS and Abeta to accumulate inside the astrocytes for a longer period of time. Interestingly, these accumulated Abeta are not observed inside autophagosomic structures (LC3B positive), in contrast to NS from WT or TAU P301S (with phospho-tau) mice. In the end, all these modifications could cause major damage of astroglial cells at molecular and/or functional levels. However, even after phagocytosing Abeta-containing NS, astrocytes are still able to support neuronal survival (Meyer-Franke y col. 1995; Pfrieger y Barres, 1997) and modulate inflammatory microglial activation.

Additionally, we specifically isolate astroglial cells from the brain tissue of adult transgenic mice, with Abeta or phospho-tau pathology (APP and TAU P301S), in order to study its transcriptional profile by micro-arrays. In this way, we observe that astrocytes in both mouse models show a pro-inflammatory activation (Jensen y col. 2013; Farina y col. 2007; Sofroniew, 2009; Orre y col. 2014a), as we also observed previously *in vitro* (acute treatment), together with an increase in the expression of complement pathway proteins. This shows the astrocytic participation in the immune response in AD (Leyns y Holtzman, 2017). But, interestingly, these astrocytes could also suffer a dysfunctionality or senescence process, characterized by the decrease of many genes implicated in energetic metabolism and differentiation and development functions of the CNS. In particular, the most significant decreased biological processes in APP and P301S astrocytes are those implicated in third stage of metabolism. This observation could indicate a reduction in correct mitochondrial function. Specifically, mitochondrial alterations have been shown in cortical astrocytes treated with soluble Abeta, by *in vivo* multiphoton microscopy, since there is an increase in calcium levels and oxidative stress. Actually, extracellular amyloid plaques could cause oxidative stress, inflammation and mitochondrial dysfunction (Lin y Beal, 2006; Trushina y McMurray, 2007; Vallés y col. 2008), by Abeta 42 entrance, resulting in an increase of reactive oxygen species (ROS), the disruption of the electron transport chain and the blockage of ATP production (Vallés y col. 2010; Reddy y Beal, 2008). It could be necessary to also test these mitochondrial alterations in an acute treatment with soluble phospho-tau.

In short, dysfunctional astrocytes could potentiate the damage associated with the cognitive deficits in AD (Orre y col. 2014a) and trigger neurodegeneration (Lian y col. 2015; Macauley y col. 2011; Yamanaka y col. 2008). Moreover, astroglial senescence has been related to neurodegenerative diseases (Bhat y col. 2012; Chinta y col. 2013; Tan y col. 2014). All that

would support the hypothesis that the dysfunction or functional loss of astrocytes in pathological conditions or, even, a senescence process, could contribute to the progression of AD and other neurodegenerative diseases (Lööv y col. 2015; Acosta y col. 2017; Bernhardt, 2007; Lian y col. 2015; Konttinen y col. 2018). For this reason, therapies should be targeted to the functional recovery of astroglia (Khakh y col. 2017; Masgrau y col. 2017).

Finally, in order to transcriptomically compare the activation state of astrocytes in *postmortem* tissue of different Alzheimer's patients (Braak V-VI), we determine the expression levels of specific genes with functional relevance by *microfluidic cards*. Hence, we have tested that there is a generalized astrogliosis (Verkhatsky y col. 2010; Carter y col. 2012; Rodríguez-Arellano y col. 2016; Garwood y col. 2016), together with an increase in the expression of pro-inflammatory factors (Morales y col. 2014; Ubogu y col. 2006; Farina y col. 2007; Medeiros y LaFerla, 2013; Rodríguez-Arellano y col. 2016) and complement proteins (Boisvert y col. 2018; Litvinchuk y col. 2018; Zhou y col. 2008; Gasque y col. 1993; Barnum, 1995), the same as in mouse models of AD (previously described). The early and massive activation of the classical complement pathway, together with the gliosis and inflammatory response, is a key feature in AD and other neurodegenerative diseases (Nguyen y col. 2002; Wyss-Coray y col. 2002; Veerhuis y col. 2011), causing an aggravation of neuroinflammation and neurodegeneration (Morales y col. 2014). It remains to determine if astrocytes undergo a dysfunctionality or senescence in the brain of Alzheimer's patients, which would worsen the development of the pathology. Although we haven't observed a decrease in some genes related to cholesterol transport, it is not excluded that they can undergo other important metabolic alterations. However, it would be necessary to test more astroglial markers and use future experimental procedures in order to discern their possible dysfunctionality or senescence in the brain of Alzheimer's patients. In addition, it would be interesting to study the relationships between astrocytes, microglia and neurons, which is fundamental in the Alzheimer's pathology (Covelo y Araque, 2018; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018; Rajendran y Paolicelli, 2018).

In summary, we have described that reactive astrocytes participate in the inflammatory response caused by soluble oligomeric Abeta and phospho-tau. But, more importantly, the extended exposure to these proteins could cause an astroglial dysfunction, which would affect neurons and, ultimately, influence the progression of Alzheimer's pathology. Several studies generally support the idea that astroglial reaction or astrogliosis in AD involve a gain of inflammatory function and a decrease in beneficial and neuroprotective functions of astrocytes in AD (Masgrau y col. 2017; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018), due to the accumulation of Abeta and/or phospho-tau. Thus, astrocytes could contribute to the progression of the Alzheimer's pathology. That's why, the control of inflammatory activation or functional recovery of astroglia could constitute new therapeutic strategies for AD.

4. Conclusions

1. In the hippocampus of transgenic mouse models of AD and *postmortem* tissue of Alzheimer's patients, there is a generalized astrogliosis which progresses significantly with amyloid and tau pathologies.
2. Soluble forms of oligomeric Abeta and/or phosphorylated tau cause an inflammatory activation of astrocytes *in vitro*. Moreover, this phospho-tau also causes an apparent astroglial dysfunction, which implies the loss of neuroprotective functions.
3. Reactive astrocytes undergo a decrease in the efficiency of phagocytosis and degradation of neuritic dystrophies with Abeta, due probably to oligomeric Abeta. Although this could cause greater damage in a molecular and/or functional level of astrocytes, it doesn't affect microglial activation or neuronal survival directly.
4. Isolated astrocytes from transgenic mice that accumulate Abeta or phospho-tau show an inflammatory activation, together with a decrease in energetic metabolism, mainly at a mitochondrial level, affecting their beneficial functions in the SNC.
5. In the hippocampus of Alzheimer's patients, there is also a generalized astrogliosis with inflammatory and classical complement pathway activation, which could be involved in the synaptic and neuronal loss.
6. In short, astroglial reactivity in AD could implicate a gain of neuroinflammatory function and an astroglial dysfunction or senescence, with a loss of beneficial and neuroprotective functions of astrocytes. Thus, the functional recovery of astroglia could become a novel therapeutic strategy for AD.

H. BIBLIOGRAFÍA

- Abramov E, Dolev I, Fogel H, Ciccotosto GD, Ruff E, Slutsky I.** (2009) Amyloid- β as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses. *Nat Neurosci.* 12(12):1567-1576
- Acosta C, Anderson HD, Anderson CM.** (2017) Astrocyte dysfunction in Alzheimer disease. *J Neurosci Res.* 95(12):2430-47
- Afagh A, Cummings BJ, Cribbs DH, Cotman CW, Tenner AJ.** (1996) Localization and cell association of C1q in Alzheimer's disease brain. *Exp Neurol.* 138:22-32
- Aguirre-Rueda D, Guerra-Ojeda S, Aldasoro M, Iradi A, Obrador E, et al.** (2015) Astrocytes protect neurons from A β 1-42 peptide-induced neurotoxicity increasing TFAM and PGC-1 and decreasing PPAR- γ and SIRT-1. *Int J Med Sci.* 12(1):48-56
- Akama KT, Albanese C, Pestell RG, Van Eldik LJ.** (1998) Amyloid beta-peptide stimulates nitric oxide production in astrocytes through an NFkappaB-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(10):5795-800
- Alarcón-Aguilar A, Luna-López A, Ventura-Gallegos JL, Lazzarini R, Galván-Arzate S, et al.** (2014) Primary cultured astrocytes from old rats are capable to activate the Nrf2 response against MPP⁺ toxicity after tBHQ pretreatment. *Neurobiol Aging* 35(8):1901-12
- Aletrino MA, Vogels OJ, Van Domburg PH, Ten Donkelaar HJ.** (1992) Cell loss in the nucleus raphes dorsalis in Alzheimers disease. *Neurobiol Aging* 13:461-468
- Allaman I, Gavillet M, Belanger M, Laroche T, Viertl D, et al.** (2010) Amyloid-beta aggregates cause alterations of astrocytic metabolic phenotype: Impact on neuronal viability. *The Journal of Neuroscience* 30(9):3326-3338
- Allen NJ, Bennett ML, Foo LC, Wang GX, Chakraborty C, et al.** (2012) Astrocyte glypicans 4 and 6 promote formation of excitatory synapses via GluA1 AMPA receptors. *Nature* 486(7403):410-4
- Allen NJ, Eroglu C.** (2017) Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions. *Neuron* 96(3):697-708
- Alzheimer A.** (1907) Über eine eigenartige Erlanliung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitzchrift Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin*, 64:146-148
- Alzheimer A.** (1910) Beiträge zur Kenntnis der pathologischen Neuroglia und ihrer Beziehungen zu den Abbauvorgängen im Nervengewebe. In: Nissl F, Alzheimer A, eds. *Histologische und Histopathologische Arbeiten über die Grosshirnrinde mit besonderer Berücksichtigung der pathologischen Anatomie der Geisteskrankheiten* Jena: Verlag von Gustav Fischer 1910:401-562

- Ampuero I, Ros R, Royuela A, Abraira V, del Ser T, et al.** (2008) Risk factors for dementia of Alzheimer type and aging-associated cognitive decline in a Spanish population based sample, and in brains with pathology confirmed Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 14:179-91
- Andreeva TV, Lukiw WJ, Rogaev EI.** (2017) Biological basis for amyloidogenesis in Alzheimer's disease. *Biochem* 82:122-139
- Andrew RJ, Kellett KAB, Thinakaran G, Hooper NM.** (2016) A Greek tragedy: The growing complexity of Alzheimer amyloid precursor protein proteolysis. *J Biol Chem* 291:19235-19244
- Angelova PR, Kasymov V, Christie I, Sheikhabaehi S, Turovsky E, et al.** (2015). Functional Oxygen Sensitivity of Astrocytes. *Journal of Neuroscience* 35:10460-10473
- Apelt J, Ach K, Schliebs R.** (2003) Aging-related downregulation of neprilysin, a putative β -amyloiddegrading enzyme, in transgenic Tg2576 Alzheimer-like mouse brain is accompanied by an astroglial upregulation in the vicinity of β -amyloid plaques. *Neurosci Lett* 339:183-186
- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Oliet SH, Robitaille R, Volterra A.** (2014) Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron* 81(4):728-39
- Aravinthan A, Shannon N, Heaney J, Hoare M, Marshall A, Alexander GJ.** (2014) The senescent hepatocyte gene signature in chronic liver disease. *Exp Gerontol.* 60:37-45
- Arendt T, Rodel L, Gartner U, Holzer M.** (1996) Expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 7(18):3047-3049
- Arendt T.** (2009) Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 118:167-79
- Ashe KH, Zahs KR.** (2010) Probing the biology of Alzheimer's disease in mice. *Neuron* 66:631-645
- Atwood CS, Martins RN, Smith MA, Perry G.** (2002) Senile plaque composition and posttranslational modification of amyloid- β peptide and associated proteins. *Peptides* 23:1343-1350
- Avila-Muñoz E, Arias C.** (2014) When astrocytes become harmful: Functional and inflammatory responses that contribute to Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev.* 18:29-40
- Baardman J, Verberk SGS, Prange KHM, van Weeghel M, van der Velden S, et al.** (2018) A Defective Pentose Phosphate Pathway Reduces Inflammatory Macrophage Responses during Hypercholesterolemia. *Cell Rep.* 25(8):2044-2052.e5
- Bacsikai BJ, Hyman BT.** (2002) Alzheimer's disease: what multiphoton microscopy teaches us. *Neuroscientist.* 8(5):386-90

- Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, et al.** (2010) Calretinin interneurons are early targets of extracellular amyloid- β pathology in PS1/A β PP Alzheimer mice hippocampus. *J Alzheimer's Dis* 21:119–132
- Bagyinszky E, Giau V Van, Shim K, Suk K, An SSA, Kim S.** (2017) Role of inflammatory molecules in the Alzheimer's disease progression and diagnosis. *J Neurol Sci* 376:242–254
- Bagyinszky E, Youn YC, An SS, Kim S.** (2014) The genetics of Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging.* 9:535-51
- Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Childs BG, et al.** (2011) Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 479(7372):232-6
- Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, Kirkland JL, van Deursen JM.** (2016) Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 479(7372):232-6
- Bales KR, Verina T, Cummins DJ, Du Y, Dodel RC, et al.** (1999) Apolipoprotein E is essential for amyloid deposition in the APP(V717F) transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(26):15233-8
- Bales KR, Verina T, Dodel RC, Du Y, Altstiel L, et al.** (1997) Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition. *Nat Genet.* 17(3):263-4
- Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E.** (2011) Alzheimer's disease. *Lancet* 377(9770):1019-1031
- Ballatore C, Lee VM-Y, Trojanowski JQ.** (2007) Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci.* 8:663-72
- Barnum SR, Jones JL, Benveniste EN.** (1993) Interleukin-1 and tumor necrosis factor-mediated regulation of C3 gene expression in human astrogloma cells. *Glia* 7(3):225-36
- Barnum SR.** (1995) Complement biosynthesis in the central nervous system. *Crit Rev Oral Biol Med.* 6(2):132-46
- Baron R, Babcock AA, Nemirovsky A, Finsen B, Monsonego A.** (2014) Accelerated microglial pathology is associated with Ab plaques in mouse models of Alzheimer's disease. *Aging Cell* 13:584-595
- Barrera-Ramirez LM, Drago-Serrano ME, Pérez-Ramos J, Sainz-Espuñes TR, Zamora AC, et al.** (2004) Citometría de flujo: Vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Rev Inst Nal Enf Resp Méx.* 17(1):42-55
- Barres BA.** (2008) The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* 60(3):430-40

- Batarseh YS, Duong QV, Mousa YM, Al Rihani SB, Elfakhri K, Kaddoumi A.** (2016) Amyloid- β and astrocytes interplay in amyloid- β related disorders. *Int J Mol Sci* 17:1–19
- Baus F, Gire V, Fisher D, Piette J, and Dulić V.** (2003) Permanent cell cycle exit in G2 phase after DNA damage in normal human fibroblasts. *EMBO J.* 22(15):3992–4002
- Bayer TA, Wirths O.** (2010) Intracellular accumulation of amyloid-Beta - a predictor for synaptic dysfunction and neuron loss in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* 2:8
- Be'linger M, Allaman I, Magistretti PJ** (2011) Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab* 14:724–738
- Bell KFS, Hardingham GE.** (2011) The influence of synaptic activity on neuronal health. *Curr Opin Neurobiol* 21:299–305
- Benard M, Raoult E, Vaudry D, Leprince J, Falluel-Morel A, et al.** (2008) Role of complement anaphylatoxin receptors (C3aR, C5aR) in the development of the rat cerebellum. *Mol. Immunol.* 45:3767–74
- Benilova I, Karran E, De Strooper B.** (2012) The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat Neurosci.* 15(3):349–357
- Benoit ME, Tenner AJ.** (2011) Complement protein C1q-mediated neuroprotection is correlated with regulation of neuronal gene and microRNA expression. *J Neurosci* 31(9):3459–69
- Bertram L, Lill CM, Tanzi RE.** (2010) The genetics of alzheimer disease: Back to the future. *Neuron* 68:270–281
- Bertrand P, Poirier J, Oda T, Finch CE, Pasinetti GM.** (1995) Association of apolipoprotein E genotype with brain levels of apolipoprotein E and apolipoprotein J (clusterin) in Alzheimer disease. *Brain Res Mol Brain Res.* 33(1):174–8
- Beutner C, Linnartz-Gerlach B, Schmidt SV, Beyer M, Mallmann MR, et al.** (2013) Unique transcriptome signature of mouse microglia. *Glia* 61:1429–1442
- Bhat R, Crowe EP, Bitto A, Moh M, Katsetos CD, et al.** (2012) Astrocyte senescence as a component of Alzheimer's disease. *PLoS One* 7(9):e45069
- Bi X, Gall CM, Zhou J, Lynch G.** (2002) Uptake and pathogenic effects of amyloid β peptide 1–42 are enhanced by integrin antagonists and blocked by NMDA receptor antagonists. *Neuroscience* 112:827–840
- Bialas AR, Stevens B** (2013) TGF- β signaling regulates neuronal C1q expression and developmental synaptic refinement. *Nat Neurosci.* 16(12):1773–82

- Bigl M, Apelt J, Eschrich K, Schliebs R.** (2003) Cortical glucose metabolism is altered in aged transgenic Tg2576 mice that demonstrate Alzheimer plaque pathology. *Journal of Neural Transmission* 110(1):77–94
- Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM.** (2005) Intraneuronal Aβ causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* 45(5):675-688
- Bisht K, Sharma KP, Lecours C, Sanchez MG, El Hajj H, et al.** (2016) Dark microglia: a new phenotype predominantly associated with pathological states. *GLIA* 64:826–839
- Bitto A, Sell C, Crowe E, Lorenzini A, Malaguti M, Hrelia S, Torres C.** (2010) Stress-induced senescence in human and rodent astrocytes. *Exp Cell Res.* 316(17):2961-8
- Blanco-Suárez E, Caldwell AL, Allen NJ.** (2017) Role of astrocyte-synapse interactions in CNS disorders. *J Physiol.* 595(6):1903-1916
- Blázquez C, Sánchez C, Daza A, Galve-Roperh I, Guzmán M.** (1999) The stimulation of ketogenesis by cannabinoids in cultured astrocytes defines carnitine palmitoyltransferase I as a new ceramide-activated enzyme. *J Neurochem.* 72(4):1759-68
- Blennow K, Leon MJ De, Zetterberg H.** (2006) Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 368:387-403
- Boggs LN, Fuson KS, Baez M, Churgay L, McClure D, et al.** (1996) Clusterin (Apo J) protects against in vitro amyloid-beta (1-40) neurotoxicity. *J Neurochem.* 67(3):1324-1327
- Boisvert MM, Erikson GA, Shokhirev MN, Allen NJ.** (2018) The Aging Astrocyte Transcriptome from Multiple Regions of the Mouse Brain. *Cell Rep.* 22(1):269–85
- Bolmont T, Haiss F, Eicke D, Radde R, Mathis C, et al.** (2008) Dynamics of the microglial/amyloid interaction indicate a role in plaque maintenance. *J Neurosci.* 28(16):4283-4292
- Boutajangout A, Wisniewski T.** (2014) Tau-based therapeutic approaches for Alzheimer's disease - a mini-review. *Gerontology* 60:381-5
- Bouvier DS, Jones EV, Quesseveur G, Davoli MA, A. Ferreira T, et al.** (2016) High Resolution Dissection of Reactive Glial Nets in Alzheimer's disease. *Sci Rep* 6:24544
- Bouzier-Sore AK, Pellerin L** (2013) Unraveling the complex metabolic nature of astrocytes. *Front Cell Neurosci* 7:179
- Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmar H, Tredici K.** (2006) Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol* 112:389-404

- Braak H, Braak E** (1991) Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. *Brain Pathol* 1:213-216
- Braak H, Braak E, Grundke-Iqbal I, Iqbal K.** (1986) Occurrence of neuropil threads in the senile human brain and in Alzheimer's disease: A third location of paired helical filaments outside of neurofibrillary tangles and neuritic plaques. *Neurosci Lett* 65:351-355
- Bracko O, Singer T, Aigner S, Knobloch M, Winner B, et al.** (2012) Gene expression profiling of neural stem cells and their neuronal progeny reveals IGF2 as a regulator of adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci.* 32:3376–3387
- Bradshaw EM, Chibnik LB, Keenan BT, Ottoboni L, Raj T, et al.** (2013) CD33 Alzheimer's disease locus: altered monocyte function and amyloid biology. *Nat Neurosci.* 16:848–850
- Bradt BM, Kolb WP, Cooper NR.** (1998) Complement-dependent proinflammatory properties of the Alzheimer's disease β -peptide. *J Exp Med.* 188(3):431-8
- Brennan AM, Suh SW, Won SJ, Narasimhan P, Kauppinen TM, et al.** (2009) NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nat Neurosci.* 12(7):857-63
- Brown GC, St George-Hyslop PH.** (2017) Deciphering microglial diversity in Alzheimer's disease. *Science* 356(6343):1123-1124
- Buée L, Hof PR, Roberts DD, Delacourte A, Morrison JH, Fillit HM.** (1992) Immunohistochemical identification of thrombospondin in normal human brain and in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 141(4):783-8
- Buosi AS, Matias I, Araujo APB, Batista C, Gomes FCA.** (2018) Heterogeneity in Synaptogenic Profile of Astrocytes from Different Brain Regions. *Mol Neurobiol.* 55(1):751-762
- Burke SN, Barnes CA** (2006) Neural plasticity in the ageing brain. *Nat Rev Neurosci* 7:30–40
- Busch C, Bohl J, Ohm TG.** (1997) Spatial, temporal and numeric analysis of Alzheimer changes in the nucleus coeruleus. *Neurobiol Aging* 18:401-416
- Busche MA, Chen X, Henning HA, Reichwald J, Staufenbiel M, et al.** (2012) Critical role of soluble amyloid-b for early hippocampal hyperactivity in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(22):8740-5
- Busche MA, Eichhoff G, Adelsberger H, Abramowski D, Wiederhold KH, et al.** (2008) Clusters of hyperactive neurons near amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science* 321(5896):1686-9

- Bussian TJ, Aziz A, Meyer CF, Swenson BL, van Deursen JM, Baker DJ.** (2018) Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature* 562(7728):578-582
- Bussi re T, Bard F, Barbour R, Grajeda H, Guido T, et al.** (2004) Morphological characterization of Thioflavin-S-positive amyloid plaques in transgenic Alzheimer mice and effect of passive Abeta immunotherapy on their clearance. *Am J Pathol* 165:987-995
- Bustin SA.** (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 25(2):169-93
- Bustin SA.** (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol.* 29(1):23-39
- Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS, Cialic R, Lanser AJ, et al.** (2014) Identification of a Unique TGF- β -Dependent Molecular and Functional Signature in Microglia. *Nat. Neurosci.* 17(1):131-43
- Butovsky O, Talpalar AE, Ben-Yaakov K, Schwartz M.** (2005) Activation of microglia by aggregated β -amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN-gamma and IL-4 render them protective. *Mol Cell Neurosci.* 29(3):381-93
- Cacace R, Sleegers K, Van Broeckhoven C.** (2016) Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimer's Dement* 12:733-748
- Caccamo A, Ferreira E, Branca C, Oddo S.** (2017) p62 improves AD-like pathology by increasing autophagy. *Mol Psychiatry* 22(6):865-873
- Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, et al.** (2008) A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci.* 28:264 -278
- Cai Y, An SSA, Kim S.** (2015) Mutations in presenilin 2 and its implications in Alzheimer's disease and other dementia-associated disorders. *Clin Interv Aging* 10:1163-1172
- Cai Z, Wan CQ, Liu Z.** (2017) Astrocyte and Alzheimer's disease. *J Neurol.* 264(10):2068-2074
- Calboli FC, Tozzi F, Galwey NW, Antoniadis A, Mooser V, et al.** (2010) A genome-wide association study of neuroticism in a population-based sample. *PLoS ONE* 5(7):e11504
- Calero M, Gómez-Ramos A, Calero O, Soriano E, Avila J, Medina M.** (2015) Additional mechanisms conferring genetic susceptibility to Alzheimer's disease. *Front Cell Neurosci* 9:1-9

- Calero M, Rostagno A, Matsubara E, Zlokovic B, Frangione B, Ghiso J.** (2000) Apolipoprotein J (clusterin) and Alzheimer's disease. *Microsc Res Tech* 50:305-15
- Callaly E, Walder K, Morris G, Maes M, Debnath M, Berk M.** (2015) Mitochondrial dysfunction in the pathophysiology of bipolar disorder: effects of pharmacotherapy. *Mini Rev Med Chem.* 15(5):355-65
- Carrero I, Gonzalo MR, Martin B, Sanz-Anquela JM, Arévalo-Serrano J, Gonzalo-Ruiz A.** (2012) Oligomers of beta-amyloid protein (A β 1-42) induce the activation of cyclooxygenase-2 in astrocytes via an interaction with interleukin-1beta, tumour necrosis factor-alpha, and a nuclear factor kappa-B mechanism in the rat brain. *Exp Neurol* 236:215-227
- Carter SF, Scholl M, Almkvist O, Wall A, Engler H, et al.** (2012) Evidence for Astrocytosis in Prodromal Alzheimer Disease Provided by 11C-Deuterium-L-Deprenyl: A Multitracer PET Paradigm Combining 11CPittsburgh Compound B and 18F-FDG. *J Nucl Med* 53:37-46
- Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA.** (2010) Alzheimer disease. *Dis Mon.* Sep;56(9):484-546
- Cavazos, JE, Cross DJ.** (2006) The role of synaptic reorganization in mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav.* 8(3):483-93
- Chai H, Diaz-Castro B, Shigetomi E, Monte E, Ochteau JC, et al.** (2017) Neural circuit-specialized astrocytes: transcriptomic, proteomic, morphological, and functional evidence. *Neuron* 95:531.e9-549.e9
- Chakroborty S, Stutzmann GE** (2011) Early calcium dysregulation in Alzheimer's disease: setting the stage for synaptic dysfunction. *Sci China Life Sci* 54:752-762
- Chandra S, Jana M, Pahan K.** (2018) Aspirin Induces Lysosomal Biogenesis and Attenuates Amyloid Plaque Pathology in a Mouse Model of Alzheimer's Disease via PPAR α . *J Neurosci.* 38(30):6682-6699
- Chang RYK, Nouwens AS, Dodd PR, Etheridge N.** (2013) The synaptic proteome in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 9:499-511
- Chang YJ, Chen YR.** (2014) The coexistence of an equal amount of Alzheimer's amyloid- β 40 and 42 forms structurally stable and toxic oligomers through a distinct pathway. *FEBS J* 281(11):2674-87
- Chen YG.** (2018) Research Progress in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Chin Med J (Engl)* 5;131(13):1618-1624
- Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK.** (2014) Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation.* 11:98

- Cheung C, Goh YT, Zhang J, Wu C, Guccione E.** (2014) Modeling cerebrovascular pathophysiology in amyloid- β metabolism using neural-crest-derived smooth muscle cells. *Cell Rep.* 9(1):391-401
- Chibnik LB, Shulman JM, Leurgans SE, Schneider JA, Wilson RS, et al.** (2011) CR1 is associated with amyloid plaque burden and age-related cognitive decline. *Ann Neurol.* 69(3):560-9
- Childs BG, Baker DJ, Wijshake T, Conover CA, Campisi J, van Deursen JM.** (2016) Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. *Science* 354(6311):472-477
- Chinta SJ, Lieu CA, Demaria M, Laberge RM, Campisi J, Andersen JK.** (2013) Environmental stress, ageing and glial cell senescence: a novel mechanistic link to Parkinson's disease? *J Intern Med.* 273(5):429-36
- Chinta SJ, Woods G, Demaria M, Rane A, Zou Y, et al.** (2018) Cellular senescence is induced by the environmental neurotoxin paraquat and contributes to neuropathology linked to Parkinson's disease. *Cell Rep.* 22(4):930-940
- Chiu IM, Morimoto ET, Goodarzi H, Liao JT, O'Keeffe S, et al.** (2013) A neurodegeneration-specific gene-expression signature of acutely isolated microglia from an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Cell Rep.* 4(2):385-401
- Choi ML, Gandhi S.** (2018) Crucial role of protein oligomerization in the pathogenesis of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *FEBS J.* 285(19):3631-3644
- Choi-Miura NH, Ihara Y, Fukuchi K, Takeda M, Nakano Y, et al.** (1992) SP-40,40 is a constituent of Alzheimer's amyloid. *Acta Neuropathol.* 83(3):260-4
- Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CC, Mallowney CE, Hell JW, et al.** (2005) Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* 120(3):421-33
- Chun H, Lee CJ.** (2018) Reactive astrocytes in Alzheimer's disease: A double-edged sword. *Neurosci Res.* 126:44-52
- Chung WS, Allen NJ, Eroglu C.** (2015) Astrocytes control synapse formation, function, and elimination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7(9):a020370
- Chung WS, Verghese PB, Chakraborty C, Joung J, Hyman BT, et al.** (2016) Novel allele-dependent role for APOE in controlling the rate of synapse pruning by astrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 113(36):10186-91

- Ciavardelli D, Piras F, Consalvo A, Ross C, Zucchelli M, et al.** (2016) Medium-chain plasma acylcarnitines, ketone levels, cognition, and gray matter volumes in healthy elderly, mildly cognitively impaired, or Alzheimer's disease subjects. *Neurobiol Aging* 43:1-12
- Claeysen S, Cochet M, Donneger R, Dumuis A, Blockaert J, Giannoni P.** (2012) Alzheimer culprits: cellular crossroads and interplay. *Cell Signal* 24(9):1831-1840
- Clarke LE, Barres BA** (2013) Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nat Rev Neurosci* 14:311-21
- Clarke LE, Liddelow SA, Chakraborty C, Münch AE, Heiman M, Barres BA.** (2018) Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 115(8):E1896-E1905
- Cloughesy TF, Cavenee WK, Mischel PS.** (2014) Glioblastoma: from molecular pathology to targeted treatment. *Annu Rev Pathol* 9:1-25
- Coleman P, Federoff H, Kurlan R.** (2004) A focus on the synapse for neuroprotection in Alzheimer disease and other dementias. *Neurology* 63:1155-62
- Colonna M, Butovsky O.** (2017) Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu Rev Immunol.* 35:441-468
- Colonna M, Wang Y.** (2016) TREM2 variants: new keys to decipher Alzheimer disease pathogenesis. *Nat Rev Neurosci* 17:201-207
- Colton CA, Mott RT, Sharpe H, Xu Q, Van Nostrand WE, Vitek MP.** (2006). Expression profiles for macrophage alternative activation genes in AD and in mouse models of AD. *J Neuroinflammation* 3(27):1-12
- Cooper NR, Kalaria RN, McGeer PL, Rogers J.** (2000) Key issues in Alzheimer's disease inflammation. *Neurobiol Aging* 21(3):451-453
- Coppé JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Muñoz DP, et al.** (2008) Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* 6(12):2853-68
- Cordeiro Q, Noguti R, Bottino CMC, Vallada H.** (2010) Study of association between genetic polymorphisms of phospholipase A2 enzymes and Alzheimer's disease. *Arq Neuropsiquiatr* 68:189-193
- Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, et al.** (1994) Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet* 7:180-4

- Correia-Melo C, Marques FD, Anderson R, Hewitt G, Hewitt R, et al.** (2016) Mitochondria are required for proageing features of the senescent phenotype. *EMBO Journal* 35(7):724–742
- Covelo A, Araque A.** (2018) Stimulating Astrocytes to Remember. *Cell*. 174(1):12-13
- Crimins JL, Pooler A, Polydoro M, Luebke JI, Spires-Jones TL.** (2013) The intersection of amyloid β and tau in glutamatergic synaptic dysfunction and collapse in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev.* 12:757-63
- Cristóvão JS, Santos R, Gomes CM.** (2016) Metals and Neuronal Metal Binding Proteins Implicated in Alzheimer's Disease. *Oxid Med Cell Longev* 2016:9812178
- Crowe EP, Tuzer F, Gregory BD, Donahue G, Gosai SJ, et al.** (2016) Changes in the Transcriptome of Human Astrocytes Accompanying Oxidative Stress-Induced Senescence. *Front Aging Neurosci.* 8:208
- Cruchaga C, Karch CM, Jin SC, Benitez BA, Cai Y, et al.** (2014) Rare coding variants in the phospholipase D3 gene confer risk for Alzheimer's disease. *Nature* 505:550-4
- Cruchaga C, Kauwe JSK, Harari O, Jin SC, Cai Y, et al.** (2013) GWAS of cerebrospinal fluid tau levels identifies risk variants for alzheimer's disease. *Neuron* 78:256–268
- Cummings BJ, Head E, Afagh AJ, Milgram NW, Cotman CW.** (1996) Beta-amyloid accumulation correlates with cognitive dysfunction in the aged canine. *Neurobiol Learn Mem.* 66(1):11-23
- Czech C, Tremp G, Pradier L.** (2000) Presenilins and Alzheimer's disease: biological functions and pathogenic mechanisms. *Prog Neurobiol.* 60(4):363-84
- D'Andrea MR, Nagele RG.** (2010) Morphologically distinct types of amyloid plaques point the way to a better understanding of Alzheimer's disease pathogenesis. *Biotech Histochem* 85:133-147
- Dá Mesquita S, Ferreira AC, Sousa JC, Correia-Neves M, Sousa N, Marques F.** (2016) Insights on the pathophysiology of Alzheimer's disease: The crosstalk between amyloid pathology, neuroinflammation and the peripheral immune system. *Neurosci Biobehav Rev* 68:547–562
- Daneman R, Zhou L, Agalliu D, Cahoy JD, Kaushal A, Barres BA** (2010) The mouse blood-brain barrier transcriptome: a new resource for understanding the development and function of brain endothelial cells. *PLoS One* 5:e13741
- Danik M, Chabot JG, Mercier C, Benabid AL, Chauvin C, et al.** (1991) Human gliomas and epileptic foci express high levels of a mRNA related to rat testicular sulfated glycoprotein 2, a purported marker of cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(19):8577-81

- Dansokho C, Heneka MT.** (2018) Neuroinflammatory responses in Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)* 125(5):771-779
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, et al.** (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci.* 8(6):752-8
- Davis CHO, Kim KY, Bushong EA, Mills EA, Boassa D, Shih T. Marsh-Armstrong N.** (2014). Transcellular degradation of axonal mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(26):9633–9638
- De Strooper B, Iwatsubo T, Wolfe MS.** (2012) Presenilins and γ -secretase: structure, function, and role in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a006304
- De Strooper B.** (2003) Aph-1, Pen-2, and nicastrin with presenilin generate an active γ -secretase complex. *Neuron* 38:9–12
- De Strooper B.** (2010) Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process. *Physiol Rev* 90:465–494
- Dean B, Thomas N, Scarr E, Udawela M.** (2016) Evidence for impaired glucose metabolism in the striatum, obtained postmortem, from some subjects with schizophrenia. *Transl Psychiatry* 6:e949
- Degn SE, Jensenius JC, Thiel S.** (2011) Disease-causing mutations in genes of the complement system. *Am J Hum Genet.* 88(6):689-705
- DeWitt DA, Perry G, Cohen M, Doller C, Silver J.** (1998) Astrocytes regulate microglial phagocytosis of senile plaque cores of Alzheimer's disease. *Exp Neurol.* 149(2):329-40
- Di Giorgio FP, Boulting GL, Bobrowicz S, Eggan KC** (2008) Human embryonic stem cell-derived motor neurons are sensitive to the toxic effect of glial cells carrying an ALS causing mutation. *Cell Stem Cell* 3:637–648
- Dickson DW.** (1997) The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:321–39
- Dickson TC, King CE, McCormack GH, Vickers JC.** (1999) Neurochemical diversity of dystrophic neurites in the early and late stages of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 156:100–110
- Domenech E, Maestre C, Esteban-Martinez L, Partida D, Pascual R, et al.** (2015) AMPK and PFKFB3 mediate glycolysis and survival in response to mitophagy during mitotic arrest. *Nat Cell Biol* 17:1304–1316
- Domínguez RO, Pagano MA, Marschoff ER, González SE, Repetto MG, Serra JA.** (2014) Alzheimer disease and cognitive impairment associated with diabetes mellitus type 2: associations and a hypothesis. *Neurologia* 29(9):567-72

- Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, et al.** (2009) S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta* 1793(6):1008-22
- Donato R.** (2003) Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech.* 60(6):540-51
- Doyle JP, Dougherty JD, Heiman M, Schmidt EF, Stevens TR, et al.** (2008) Application of a translational profiling approach for the comparative analysis of CNS cell types. *Cell* 135:749–762
- Drummond E, Wisniewski T.** (2016) Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol* 133:155–175
- Drummond E, Wisniewski T.** (2017) The use of localized proteomics to identify the drivers of Alzheimer's disease pathogenesis. *Neural Regen Res* 12:912–913
- Dudai Y, Morris RG.** (2013) Memorable trends. *Neuron* 80(3):742-50
- Dugas JC, Tai YC, Speed TP, Ngai J, Barres BA** (2006) Functional genomic analysis of oligodendrocyte differentiation. *J Neurosci* 26:10967–10983
- Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC.** (2009) Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* 118:5–36
- Eckman EA, Adams SK, Troendle FJ, Stodola BA, Kahn MA, et al.** (2006) Regulation of steady-state β -amyloid levels in the brain by neprilysin and endothelin-converting enzyme but not angiotensin-converting enzyme. *J Biol Chem.* 281:30471–30478
- Eckman EA, Reed DK, Eckman CB** (2001) Degradation of the Alzheimer's amyloid β peptide by endothelin-converting enzyme. *J Biol Chem.* 276:24540–24548
- Eckman EA, Watson M, Marlow L, Sambamurti K, Eckman CB** (2003) Alzheimer's disease β -amyloid peptide is increased in mice deficient in endothelin-converting enzyme. *J Biol Chem.* 278:2081–2084
- Edbauer D, Winkler E, Regula JT, Pesold B, Steiner H, Haass C.** (2003) Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol.* 5(5):486-8
- Eikelenboom P, Hack CE, Rozemuller JM, Stam FC.** (1989) Complement activation in amyloid plaques in Alzheimer's dementia. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 56(4):259-62
- Eikelenboom P, Stam FC** (1982) Immunoglobulins and complement factors in senile plaques. *Acta Neuropathol.* 57:239–242
- Eikelenboom P, Veerhuis R.** (1996) The role of complement and activated microglia in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 17(5):673-80

- Eisenstein M.** (2011) Genetics: finding risk factors. *Nature* 475:S20-22
- Elder GA, Gama Sosa MA, De Gasperi R, Dickstein DL, Hof PR.** (2010). Presenilin transgenic mice as models of Alzheimer's disease. *Brain Struct Funct.* 214:127-143
- Elmariah SB, Hughes EG, Oh EJ, Balice-Gordon RJ.** (2005a) Neurotrophin signaling among neurons and glia during formation of tripartite synapses. *Neuron Glia Biol.* 1(4):1-11
- Elmariah SB, Oh EJ, Hughes EG, Balice-Gordon RJ.** (2005b) Astrocytes regulate inhibitory synapse formation via Trk-mediated modulation of postsynaptic GABAA receptors. *J. Neurosci.* 25:3638–3650
- Escribese MM, Casas M, Corbi AL** (2012) Influence of low oxygen tensions on macrophage polarization. *Immunobiology* 217:1233–1240
- Eskildsen SF, Coupé P, Fonov VS, Pruessner JC, Collins DL.** (2015) Structural imaging biomarkers of Alzheimer's disease: Predicting disease progression. *Neurobiol Aging* 36 Suppl 1:S23-31
- Esposito S, Masala A, Sanna S, Rassu M, Pimxayvong V, et al.** (2017) Redox-sensitive GFP to monitor oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Rev Neurosci.* 28(2):133-144
- Esteban-Martínez L, Sierra-Filardi E, McGreal RS, Salazar-Roa M, Mariño G, et al.** (2017) Programmed mitophagy is essential for the glycolytic switch during cell differentiation. *EMBO J* 36(12):1688-1706
- Evans GJ.** (2015) The Synaptosome as a Model System for Studying Synaptic Physiology. *Cold Spring Harb Protoc.* 2015(5):421-424
- Evin G, Weidemann A.** (2002) Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease A β amyloid peptides. *Peptides* 23:1285-1297
- Fagan AM, Holtzman DM, Munson G, Mathur T, Schneider D, et al.** (1999) Unique lipoproteins secreted by primary astrocytes from wild type, apoE (-/-), and human apoE transgenic mice. *J Biol Chem.* 274(42):30001-7
- Fan R, DeFilippis K, Van Nostrand WE.** (2007) Induction of complement proteins in a mouse model for cerebral microvascular A beta deposition. *J Neuroinflammation* 4:22
- Farina C, Aloisi F, Meinl E.** (2007) Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* 28(3):138-45
- Farris W, Schütz SG, Cirrito JR, Shankar GM, Sun X, et al.** (2007) Loss of neprilysin function promotes amyloid plaque formation and causes cerebral amyloid angiopathy. *Am J Pathol.* 171(1):241-251

- Fedorcsák I, Ehrenberg L.** (1966) Effects of diethyl pyrocarbonate and methyl methanesulfonate on nucleic acids and nucleases. *Acta Chem Scand.* 20(1):107-12
- Feldmann M, Pathipati P, Sheldon R, Jiang X, Ferriero D.** (2014) Isolating astrocytes and neurons sequentially from postnatal murine brains with a magnetic cell separation technique. *J Biol Methods.* 1(2)
- Fernandez AM, Jimenez S, Mecha M, Dávila D, Guaza C, et al.** (2012) Regulation of the phosphatase calcineurin by insulin-like growth factor I unveils a key role of astrocytes in Alzheimer's pathology. *Mol Psychiatry* 17:705-18
- Fiala J.** (2007) Mechanisms of amyloid plaque pathogenesis. *Acta Neuropathol.* 114:551-571
- Flachsbart F, Caliebe A, Nothnagel M, Kleindorp R, Nikolaus S, et al.** (2010) Depletion of potential A2M risk haplotype for Alzheimer's disease in lon lived individuals. *Eur J Hum Genet* 18:59-61
- Flanary BE, Sammons NW, Nguyen C, Walker D, Streit WJ.** (2007) Evidence that aging and amyloid promote microglial cell senescence. *Rejuvenation Res.* 10(1):61-74
- Forner S, Baglietto-Vargas D, Martini AC, Trujillo-Estrada L, LaFerla FM.** (2017) Synaptic Impairment in Alzheimer's Disease: A Dysregulated Symphony. *Trends Neurosci.* 40(6):347-357
- Franklin KBJ, Paxinos G.** (2008) Paxinos and Franklin's The mouse brain in stereotaxic coordinates.
- Frautschy SA, Cole GM, Baird A.** (1992) Phagocytosis and deposition of vascular β -amyloid in rat brains injected with Alzheimer β -amyloid. *Am J Pathol.* 140(6):1389-1399
- Friedman BA, Srinivasan K, Ayalon G, Meilandt WJ, Lin H, et al.** (2018) Diverse Brain Myeloid Expression Profiles Reveal Distinct Microglial Activation States and Aspects of Alzheimer's Disease Not Evident in Mouse Models. *Cell Rep.* 22(3):832-847
- Friedman LG, Qureshi YH, Yu WH.** (2015) Promoting autophagic clearance: viable therapeutic targets in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* 12:94-108
- Friedrich RP, Tepper K, Rönicke R, Soom M, Westermann M, et al.** (2010) Mechanism of amyloid plaque formation suggests an intracellular basis of Abeta pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(5):1942-7
- Frost B, Bardai FH, Feany MB.** (2016) Lamin dysfunction mediates neurodegeneration in Tauopathies. *Current Biology* 26(1):129-136
- Fryer HJ, Davis GE, Manthorpe M, Varon S.** (1986) Lowry protein assay using an automatic microtiter plate spectrophotometer. *Anal Biochem.* 153(2):262-6

- Fu W, Jhamandas JH.** (2014) Role of astrocytic glycolytic metabolism in Alzheimer's disease pathogenesis. *Biogerontology* 15(6):579-586
- Fuhrmann M, Bittner T, Jung CK, Burgold S, Page RM, et al.** (2010) Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci.* 13(4):411-3.
- Fukumoto H, Deng A, Irizarry MC, Fitzgerald ML, Rebeck GW.** (2004) Induction of the cholesterol transporter ABCA1 in central nervous system cells by liver X receptor agonists increases secreted Abeta levels. *J Biol Chem.* 277(50):48508-13
- Furman JL, Sama DM, Gant JC, Beckett TL, Murphy MP, et al.** (2012) Targeting astrocytes ameliorates neurologic changes in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 32:16129-40
- Galimberti D, Scarpini E.** (2011) Inflammation and oxidative damage in Alzheimer's disease: friend or foe? *Front Biosci (Schol Ed)* 3:252-66
- Gao YL, Wang N, Sun FR, Cao XP, Zhang W, Yu JT.** (2018) Tau in neurodegenerative disease. *Ann Transl Med.* 6(10):175
- Garcia O, Torres M, Helguera P, Coskun P, Busciglio J.** (2010) A role for thrombospondin-1 deficits in astrocyte-mediated spine and synaptic pathology in Down's syndrome. *PLoS One* 5(12):e14200
- García-Junco-Clemente P, Cantero G, Gómez-Sánchez L, Linares-Clemente P, Martínez-López JA, et al.** (2010) Cysteine string protein-alpha prevents activity-dependent degeneration in GABAergic synapses. *J Neurosci.* 30(21):7377-91
- Garwood C, Ratcliffe L, Simpson J, Heath P, InceP, Wharton S.** (2016) Astrocytes in Alzheimer's disease and other age-associated dementias; a supporting player with a central role. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 43(4):281-298
- Garwood CJ, Cooper JD, Hanger DP, Noble W.** (2010) Anti-inflammatory impact of minocycline in a mouse model of tauopathy. *Front Psychiatry* 1:136
- Garwood CJ, Ratcliffe LE, Simpson JE, Heath PR, Ince PG, Wharton SB.** (2017) Astrocytes in Alzheimer's disease and other age-associated dementias: a supporting player with a central role. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 43(4):281-98
- Gasque P, Chan P, Fontaine M, Ischenko A, Lamacz M, Götze O, Morgan BP.** (1995) Identification and characterization of the complement C5a anaphylatoxin receptor on human astrocytes. *J Immunol.* 155(10):4882-9

- Gasque P, Chan P, Mauger C, Schouft MT, Singhrao S, et al.** (1996) Identification and characterization of complement C3 receptors on human astrocytes. *J Immunol.* 156(6):2247-55
- Gasque P, Fontaine M, Morgan BP.** (1995) Complement expression in human brain. Biosynthesis of terminal pathway components and regulators in human glial cells and cell lines. *J Immunol.* 154(6):4726-4733
- Gasque P, Ischenko A, Legoedec J, Mauger C, Schouft MT, Fontaine M.** (1993) Expression of the complement classical pathway by human glioma in culture. A model for complement expression by nerve cells. *J Biol Chem.* 268(33):25068-74
- Gassen GV, Annaert W** (2003) Amyloid, Presenilins, and Alzheimer's Disease. *The Neuroscientist.* 9:117-126
- Gendreau KL, Hall GF.** (2013) Tangles, Toxicity, and Tau Secretion in AD - New Approaches to a Vexing Problem. *Front Neurol* 4:160
- Gendron TF, Petrucelli L.** (2009) The role of tau in neurodegeneration. *Mol Neurodegener* 4:13
- Giannakopoulos P, Herrmann FR, Bussi re T, Bouras C, Kovari E, et al.** (2003) Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology* 13;60(9):1495-500
- Gibbs ME, Gibbs Z, Hertz L.** (2009) Rescue of Abeta(1-42)-induced memory impairment in day-old chick by facilitation of astrocytic oxidative metabolism: implications for Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 109 Suppl 1:230-6
- Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, et al.** (2010) Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330:841-845
- Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T.** (2013) Origin and differentiation of microglia. *Front Cell Neurosci.* 7:45
- Ginzinger DG.** (2002) Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol.* 30(6):503-12
- Giri M, Zhang M, L  Y.** (2016) Genes associated with Alzheimer's disease: An overview and current status. *Clin Interv Aging* 11:665-681
- Giuffrida ML, Caraci F, Pignataro B, Cataldo S, De Bona P, et al.** (2009) Beta-amyloid monomers are neuroprotective. *J Neurosci.* 29(34):10582-10587
- Glenner GG, Wong CW.** (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 120:885-890

- Goetzl EJ, Schwartz JB, Abner EL, Jicha GA, Kapogiannis D.** (2018) High complement levels in astrocyte-derived exosomes of Alzheimer disease. *Ann Neurol.* 83(3):544-552
- Gomez-Arboledas A, Davila JC, Sanchez-Mejias E, Navarro V, Nuñez-Diaz C, et al.** (2017) Phagocytic clearance of presynaptic dystrophies by reactive astrocytes in Alzheimer's disease. *Glia* 66(3):637-653
- Gomez-Isla T, Price JL, McKeel DW Jr, Morris JC, Growdon JH, Hyman BT.** (1996). Profound loss of layer II entorhinal corte xeurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 16(14):4491-4500
- Gomez-Isla T, Spires T, De Calignon A, Hyman BT.** (2008) Neuropathology of Alzheimer's disease. *Handb Clin Neurol.* 89:233-243
- Gomez-Nicola D, Perry VH.** (2015) Microglial dynamics and role in the healthy and diseased brain: a paradigm of functional plasticity. *Neuroscientist* 21(2):169-184
- González H, Elgueta D, Montoya A, Pacheco R.** (2014) Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *J Neuroimmunol* 274:1-13
- González-Reyes RE, Nava-Mesa MO, Vargas-Sánchez K, Ariza-Salamanca D, Mora-Muñoz L.** (2017) Involvement of Astrocytes in Alzheimer's Disease from a Neuroinflammatory and Oxidative Stress Perspective. *Front Mol Neurosci.* 10:427
- Görg B, Qvartskhava N, Keitel V, Bidmon HJ, Selbach O, et al.** (2008) Ammonia induces RNA oxidation in cultured astrocytes and brain in vivo. *Hepatology* 48(2):567-79
- Gotz M, Sirko S, Beckers J, Irmeler M.** (2015) Reactive astrocytes as neural stem or progenitor cells: In vivo lineage, in vitro potential, and Genome-wide expression analysis. *Glia* 63(8),1452-1468
- Graham WV, Bonito-Oliva A, Sakmar TP.** (2017) Update on Alzheimer's Disease Therapy and Prevention Strategies. *Annu Rev Med* 68:413-430
- Gralle M, Ferreira ST.** (2007) Structure and functions of the human amyloid precursor protein: the whole is more than the sum of its parts. *Prog Neurobiol.* 82(1):11-32
- Green KN, LaFerla FM.** (2008) Linking calcium to Abeta and Alzheimer's disease. *Neuron* 59:190-4
- Griciuc A, Serrano-Pozo A, Parrado AR, Lesinski AN, Asselin CN, et al.** (2013) Alzheimer's disease risk gene cd33 inhibits microglial uptake of amyloid beta. *Neuron* 78:631-643

- Griffin WS, Sheng JG, Royston MC, et al.** (1998) Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression. *Brain Pathol.* 8:65-72
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung Y-C, Quinlan M, Wisniewski H, Binder L.** (1987) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1:202
- Guénette SY.** (2003) Astrocytes: a cellular player in Ab clearance and degradation. *TRENDS in Molecular Medicine* Vol.9 No.7
- Guerreiro R, Wojtas A, Bras J, Carrasquillo M, Rogaeva E, et al.** (2013) TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 268:117-127
- Gutierrez A, Vitorica J.** (2018) Toward a New Concept of Alzheimer's Disease Models: A Perspective from Neuroinflammation. *J Alzheimers Dis.* 64(s1):S329-S338
- Gwon Y, Kam TI, Kim SH, Song S, Park H, et al.** (2018) TOM1 Regulates Neuronal Accumulation of Amyloid- β Oligomers by Fc γ RIIb2 Variant in Alzheimer's Disease. *J Neurosci.* 38(42):9001-9018
- Haass C, Hung AY, Selkoe DJ** (1991) Processing of β -amyloid precursor protein in microglia and astrocytes favors an internal localization over constitutive secretion. *The Journal of Neuroscience* 11:3783-3793
- Haass C, Selkoe DJ.** (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:101-112
- Haga S, Aizawa T, Ishii T, Ikeda K.** (1996) Complement gene expression in mouse microglia and astrocytes in culture: comparisons with mouse peritoneal macrophages. *Neurosci Lett.* 216(3):191-4
- Haim L Ben, Rowitch D.** (2017) Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nat Rev Neurosci* 18:31-41
- Halliwell B.** (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem.* 97:1634-1658
- Hallmann AL, Araúzo-Bravo MJ, Mavrommatis L, Ehrlich M, Röpke A, et al.** (2017) Astrocyte pathology in a human neural stem cell model of frontotemporal dementia caused by mutant TAU protein. *Sci Rep.* 7:42991
- Hampel B, Fortschegger K, Ressler S, Chang MW, Unterluggauer H, et al.** (2006) Increased expression of extracellular proteins as a hallmark of human endothelial cell in vitro senescence. *Exp Gerontol.* 41(5):474-81

- Hane F.T., Leea B.Y. and Leonenko Z.** (2017a) Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 1. Pathology. *Journal of Alzheimer's Disease* 57:1–28
- Hane FT, Robinson M, Lee BY, Bai O, Leonenko Z, Albert MS.** (2017) Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 3: Diagnosis and Treatment. *J Alzheimers Dis.* 57(3):645-665
- Hansen DV, Hanson JE, Sheng M.** (2018) Microglia in Alzheimer's disease. *J Cell Biol.* 5;217(2):459-472
- Hardy J, Allsop D.** (1991) Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 12:383-388
- Hardy JA, Higgins GA.** (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256:184-5
- Hasel P, Dando O, Jiwaji Z, Baxter P, Todd AC, et al.** (2017) Neurons and neuronal activity control gene expression in astrocytes to regulate their development and metabolism. *Nat Commun.* 8:15132
- Hayflick L, Moorhead PS.** (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25:585–621
- Heneka MT, Carson MJ, Khoury J El, Landreth GE, Brosseron F, et al.** (2015a) Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 14:388-405
- Heneka MT, Golenbock DT, Latz E.** (2015b) Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat Immunol* 16:229-236
- Heneka MT, Kummer MP, Latz E.** (2014) Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat Rev Immunol* 14(7):463-77
- Heneka MT, Kummer MP, Stutz A, Delekate A, Schwartz S, et al.** (2013) NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature* 493(7434):674-8
- Heneka MT, O'Banion MK.** (2007) Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol* 184:69–91
- Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B.** (2015) Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci* 16:358-372
- Herrera-Molina R, Flores B, Orellana JA, von Bernhardi R.** (2012) Modulation of interferon- γ -induced glial cell activation by transforming growth factor β 1: a role for STAT1 and MAPK pathways. *J Neurochem.* 123(1):113-23

- Herrup K.** (2015) The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nat Neurosci* 18:794–799
- Hickman SE, El Khoury J.** (2014) TREM2 and the neuroimmunology of Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol.* 88(4):495-8
- Hilbich C, Kisters-Woike B, Reed J, Masters CL, Beyreuther K.** (1991) Aggregation and secondary structure of synthetic amyloid- β A4 peptides of Alzheimer's disease. *J Mol Biol* 218:149–163
- Hiltunen M, van Groen T, Jolkkonen J.** (2009) Functional roles of amyloid- β protein precursor and amyloid- β peptides: evidence from experimental studies. *J Alzheimers Dis* 18:401-412
- Hoe H-S, Rebeck GW.** (2008) Functional interactions of APP with the apoE receptor family. *J Neurochem* 106:2263-71
- Hof PR, Bussière T, Gold G, Kövari E, Giannakopoulos P, et al.** (2003) Stereologic evidence for persistence of viable neurons in layer II of the entorhinal cortex and the CA1 field in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:55-67
- Holt LM, Olsen ML.** (2016) Novel Applications of Magnetic Cell Sorting to Analyze Cell-Type Specific Gene and Protein Expression in the Central Nervous System. *PLoS One* 11(2):e0150290
- Holtzman DM, Bales KR, Tenkova T, Fagan AM, Parsadanian M, et al.** (2000a) Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(6):2892-7
- Holtzman DM, Carrillo MC, Hendrix JA, Bain LJ, Catafau AM, et al.** (2016) Tau: From research to clinical development. *Alzheimers Dement* 12:1033–1039
- Holtzman DM, Fagan AM, Mackey B, Tenkova T, Sartorius L, et al.** (2000b) Apolipoprotein E facilitates neuritic and cerebrovascular plaque formation in an Alzheimer's disease model. *Ann Neurol.* 47(6):739-47
- Holtzman DM.** (2001) Role of apoE/ β interactions in the pathogenesis of Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy. *J Mol Neurosci.* 17(2):147-55
- Hong S, Beja-Glasser VF, Nfonoyim BM, Frouin A, Li S, et al.** (2016) Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science* 352(6286):712-716
- Hoshi A, Yamamoto T, Shimizu K, Ugawa Y, Nishizawa M, et al.** (2012) Characteristics of aquaporin expression surrounding senile plaques and cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 71(8):750-9

- Howarth C, Sutherland B, Choi HB, Martin C, Lind B, et al.** (2017) A critical role for astrocytes in hypercapnic vasodilation in brain. *Journal of Neuroscience* 37:2403–2414
- Hu B, Liu C, Bramlett H, Sick TJ, Alonso OF, Chen S, Dietrich WD.** Changes in trkB-ERK1/2-CREB/Elk-1 pathways in hippocampal mossy fiber organization after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 24(8):934-43
- Hu S, Sheng WS, Peterson PK, Chao CC.** (1995) Cytokine modulation of murine microglial cell superoxide production. *Glia* 13(1):45-50
- Hu X, Crick SL, Bu G, Frieden C, Pappu RV, Lee JM.** (2009) Amyloid seeds formed by cellular uptake, concentration, and aggregation of the amyloid-beta peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(48):20324-9
- Huang K, Marcora E, Pimenova A, Di Narzo A, Kapoor M, et al.** (2017) A common haplotype lowers PU.1 expression in myeloid cells and delays onset of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci.* 20(8):1052-1061
- Huang THJ, Yang DS, Plaskos NP, Go S, Yip CM, et al.** (2000) Structural studies of soluble oligomers of the Alzheimer b-amyloid peptide. *J Mol Biol* 297:73–87
- Hubbard JA, Szu JI, Binder DK.** (2018) The role of aquaporin-4 in synaptic plasticity, memory and disease. *Brain Res Bull.* 136:118-129
- Hunt CE, Turner AJ.** (2009) Cell biology, regulation and inhibition of β -secretase (BACE-1). *FEBS J.* 276(7):1845-59
- Hutter E, Renner K, Pfister G, Stöckl P, Jansen-Dürr P, Gnaiger E.** (2004) Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts. *Biochem J.* 380(Pt 3):919-28
- Iilff JJ, Nedergaard M.** (2013) Is There a Cerebral Lymphatic System? *Stroke* 44:S93–S95
- Iilff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, et al.** (2012) A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow Through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid. *Sci Transl Med* 4:147ra111-147ra111
- Ingelsson M, Fukumoto H, Newell KL, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, et al.** (2004). Early Abeta accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology* 62(6):925-31
- Iqbal K, Grundke-Iqbal I.** (2008) Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention. *J Cell Mol Med.* 12(1):38-55
- Iqbal K, Liu F, Gong C-X.** (2015) Tau and neurodegenerative disease: the story so far. *Nat Rev Neurol* 12:1–14

- Ishii T, Haga S.** (1984) Immuno-electron microscopic localization of complements in amyloid fibrils of senile plaques. *Acta Neuropathol.* 63:296–300
- Itoh Y, Esaki T, Shimoji K, Cook M, Law MJ, et al.** (2003) Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:4879–4884
- Ittner LM, Ke YD, Delerue F, Bi M, Gladbach A, et al.** (2010) Dendritic function of tau mediates amyloid- β toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* 142:387–397
- Izquierdo E, Cuevas VD, Fernandez-Arroyo S, Riera-Borrull M, Orta-Zavalza E, et al.** (2015) Reshaping of human macrophage polarization through modulation of glucose catabolic pathways. *J Immunol* 195:2442–2451
- Jahn H.** (2013) Memory loss in Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci* 15:445-54
- Jankowsky JL, Fadale DJ, Anderson J, Xu GM, Gonzales V, et al.** (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.* 13:159–170
- Jay TR, Miller CM, Cheng PJ, Graham LC, Bemiller S, et al.** (2015) TREM2 deficiency eliminates TREM2+ inflammatory macrophages and ameliorates pathology in Alzheimer's disease mouse models. *J Exp Med* 212:287-295
- Jensen. Massie, A., and De Keyser, J.** (2013). Immune players in the CNS: the astrocyte. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 8:824–839
- Jeon OH, Kim C, Laberge RM, Demaria M, Rathod S, et al.** (2017) Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nat Med.* 23(6):775-781
- Jeong S.** (2017) Molecular and Cellular Basis of Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *Mol Cells* 40(9):613-620
- Jernberg JN, Bowman CE, Wolfgang MJ, Scafidi S.** (2017) Developmental regulation and localization of carnitine palmitoyltransferases (CPTs) in rat brain. *J Neurochem.* 142(3):407-419
- Jessen NA, Munk ASF, Lundgaard I, Nedergaard M.** (2015) The Glymphatic System: A Beginner's Guide. *Neurochem Res* 40:2583–2599
- Jha AK, Huang SC, Sergushichev A, Lampropoulou V, Ivanova Y, et al.** (2015) Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity* 42:419–430
- Jha MK, Morrison BM.** (2018) Glia-neuron energy metabolism in health and diseases: New insights into the role of nervous system metabolic transporters. *Exp Neurol.* 309:23-31

- Jiang H, Burdick D, Glabe CG, Cotman CW, Tenner AJ.** (1994) beta-Amyloid activates complement by binding to a specific region of the collagen-like domain of the C1q A chain. *J Immunol.* 152(10):5050-9
- Jiang L, Gulanski BI, De Feyter HM, Weinzimer SA, Pittman B, et al.** (2013) Increased brain uptake and oxidation of acetate in heavy drinkers. *J Clin Invest* 123(4):1605–1614
- Jiang T, Cadenas E.** (2014) Astrocytic metabolic and inflammatory changes as a function of age. *Aging Cell* 13(6):1059-67
- Jimenez S, Baglietto-Vargas D, Caballero C, Moreno-Gonzalez I, Torres M, et al.** (2008) Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic. *J Neurosci* 28:11650-11661
- Jimenez S, Torres M, Vizuite M, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mejias E, et al.** (2011) Age-dependent accumulation of soluble amyloid β ($A\beta$) oligomers reverses the neuroprotective effect of soluble amyloid precursor protein- α (sAPP α) by modulating phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt-GSK-3 β pathway in Alzheimer mouse model. *J Biol Chem* 286:18414–18425
- John Lin CC, Yu K, Hatcher A, Huang TW, Lee HK, et al.** (2017) Identification of diverse astrocyte populations and their malignant analogs. *Nat Neurosci.* 20(3):396-405.
- Johnstone M, Gearing AJ, Miller KM.** (1999) A central role for astrocytes in the inflammatory response to beta-amyloid; chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced. *J Neuroimmunol.* 93(1-2):182-193
- Jones RS, Minogue AM, Connor TJ, Lynch MA.** (2013) Amyloid- β -induced astrocytic phagocytosis is mediated by CD36, CD47 and RAGE. *J Neuroimmune Pharmacol* 8:301–311
- Jonsson T, Stefansson H, Steinberg S, Jonsdottir I, Jonsson PV, et al.** (2013) Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 368(2):107-116
- Jouroukhin Y, Kageyama Y, Misheneva V, Shevelkin A, Andrabi S, et al. (2018) DISC1 regulates lactate metabolism in astrocytes: implications for psychiatric disorders. *Transl Psychiatry* 8(1):76.
- Jun G, Naj AC, Beecham GW, Wang LS, Buross J, et al.** (2010) Meta-analysis confirms CR1, CLU, and PICALM as Alzheimer disease risk loci and reveals interactions with APOE genotypes. *Arch Neurol.* 67(12):1473-84
- Jürgen KM, George P, Voss VT.** (2008) Atlas of the Human Brain.
- Kalaria RN.** (2000) The role of cerebral ischemia in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21:321–330

- Kamphuis W, Kooijman L, Orre M, Stassen O, Pekny M, Hol EM.** (2015) GFAP and vimentin deficiency alters gene expression in astrocytes and microglia in wild-type mice and changes the transcriptional response of reactive glia in mouse model for Alzheimer's disease. *Glia* 63:1036–1056
- Kandimalla KK, Scott OG, Fulzele S, Davidson MW, Poduslo JF.** (2009) Mechanism of neuronal versus endothelial cell uptake of Alzheimer's disease amyloid beta protein. *PLoS One* 4(2):e4627
- Kantzer CG, Boutin C, Herzig ID, Wittwer C, Reiß S, et al.** (2017) Anti-ACSA-2 defines a novel monoclonal antibody for prospective isolation of living neonatal and adult astrocytes. *Glia* 65(6):990-1004
- Karch CM, Cruchaga C, Goate AM.** (2014) Alzheimer's disease genetics: From the bench to the clinic. *Neuron* 83:11–26
- Karran E, De Strooper B.** (2016) The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? *J Neurochem* 139 Suppl 2:237-252
- Kawamata H, Manfredi G.** (2010) Mitochondrial dysfunction and intracellular calcium dysregulation in ALS. *Mech Ageing Dev.* 131(7-8):517-26
- Kawano H, Katsurabayashi S, Kakazu Y, Yamashita Y, Kubo N, et al.** (2012) Long-term culture of astrocytes attenuates the readily releasable pool of synaptic vesicles. *PLoS One* 7(10):e48034
- Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, Matcovitch-Natan O, Dvir-Szternfeld R, et al.** (2017) A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell* 169(7):1276-1290.e17
- Khachaturian ZS** (1994) Calcium hypothesis of Alzheimer's disease and brain aging. *Ann N Y Acad Sci* 747:1-11
- Khakh BS, Beaumont V, Cachepe R, Munoz-Sanjuan I, Goldman SA, Grantyn R.** (2017) Unravelling and Exploiting Astrocyte Dysfunction in Huntington's Disease. *Trends Neurosci.* 40(7):422-437
- Kilchherr E, Fuchs H, Tschopp J, Engel J.** (1982) Dissociation of C1 and concentration dependence of its activation kinetics. *Mol Immunol.* 19(5):683-91
- Kim D, Tsai LH.** (2009) Bridging Physiology and Pathology in AD. *Cell* 137:997–1000
- Kim DH, Yeo SH, Park J-M, Choi JY, Lee T-H, et al.** (2014) Genetic markers for diagnosis and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Gene* 545:185-93

- Kim M, Suh J, Romano D, Truong MH, Mullin K, et al.** (2009) Potential late-onset Alzheimer's disease-associated mutations in the ADAM10 gene attenuate α -secretase activity. *Hum Mol Genet* 18:3987-96
- Kimura T, Ishiguro K, Hisanaga S.** (2014) Physiological and pathological phosphorylation of tau by Cdk5. *Front Mol Neurosci.* 7:65
- Kirkland JL, Tchkonja T, Zhu Y, Niedernhofer LJ, Robbins PD.** (2017) The Clinical Potential of Senolytic Drugs. *J Am Geriatr Soc.* 65(10):2297-2301
- Kisler K, Nelson AR, Montagne A, Zlokovic BV.** (2017) Cerebral blood flow regulation and neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci.* 18(7):419-434
- Kitazawa M, Cheng D, Tsukamoto MR, Koike MA, Wes PD, et al.** (2011) Blocking IL-1 signaling rescues cognition, attenuates tau pathology, and restores neuronal β -catenin pathway function in an Alzheimer's disease model. *J Immunol.* 187(12):6539-49
- Kocahan S, Doğan Z.** (2017) Mechanisms of Alzheimer's disease pathogenesis and prevention: The brain, neural pathology, Nmethyl-D-Aspartate receptors, tau protein and other risk factors. *Clin Psychopharmacol Neurosci* 15:1-8
- Koffie RM, Hyman BT, Spires-Jones TL.** (2011) Alzheimer's disease: synapses gone cold. *Mol. Neurodegener.* 6:63
- Koffie RM, Meyer-Luehmann M, Hashimoto T, Adams KW, Mielke ML, et al.** (2009) Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:4012-7
- Kohman RA, Rhodes JS.** (2012) Neurogenesis, inflammation and behavior. *Brain Behav Immun.* 27(1):22-32
- Kolarova M, García-Sierra F, Bartos A, Ricny J, Ripova D.** (2012) Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease. *Int J Alzheimers Dis.* 2012:731526
- Koldamova RP, Lefterov IM, Ikonovic MD, Skoko J, Lefterov PI, et al.** (2003) 22R-hydroxycholesterol and 9-cis-retinoic acid induce ATP-binding cassette transporter A1 expression and cholesterol efflux in brain cells and decrease amyloid beta secretion. *J Biol Chem.* 278(15):13244-56
- Konno T, Tada M, Tada M, Koyama A, Nozaki H, et al.** (2014) Haploinsufficiency of CSF-1R and clinicopathologic characterization in patients with HDLS. *Neurology* 82(2):139-48
- Konttinen H, Gureviciene I, Oksanen M, Grubman A, Loppi S, et al.** (2018) PPAR β / δ -agonist GW0742 ameliorates dysfunction in fatty acid oxidation in PSEN1 Δ E9 astrocytes. *Glia* 67(1):146-159

- Korvatska O, Leverenz JB, Jayadev S, McMillan P, Kurtz I, et al.** (2015) R47H Variant of TREM2 Associated with Alzheimer Disease in a Large Late-Onset Family. *JAMA Neurol* 72:920
- Kraft AW, Hu X, Yoon H, Yan P, Xiao Q, et al.** (2013) Attenuating astrocyte activation accelerates plaque pathogenesis in APP/PS1 mice. *FASEB J* 27:187–198
- Krasemann S, Madore C, Cialic R, Baufeld C, Calcagno N, et al.** (2017) The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Immunity* 47(3):566–581.e9
- Kress BT, Iliff JJ, Xia M, Wang M, Wei HS, Zeppenfeld D, et al.** (2014) Impairment of paravascular clearance pathways in the aging brain. *Ann. Neurol.* 76:845–861
- Kryuchkova-mostacci N, Robinson-Rechavi M.** (2017) A benchmark of gene expression tissue-specificity metrics. *Brief Bioinform.* 18(2):205–14
- Kuchibhotla KV, Goldman ST, Lattarulo CR, Wu HY, Hyman BT, Bacskai BJ.** (2008) Ab plaques lead to aberrant regulation of calcium homeostasis in vivo resulting in structural and functional disruption of neuronal networks. *Neuron* 59:214–225
- Kucukdereli H, Allen NJ, Lee AT, Feng A, Ozlu MI et al.** (2011) Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte secreted proteins Hevin and SPARC. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(32):E440-9
- Kumar A, Tsao JW.** (2018) Alzheimer Disease. Dec 18. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018 Jan-. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499922/>
- Kuruva CS, Reddy PH.** (2017) Amyloid beta modulators and neuroprotection in Alzheimer's disease: a critical appraisal. *Drug Discov Today* 22:223–233
- Labzin LI, Heneka MT, Latz E.** (2017) Innate Immunity and Neurodegeneration. *Annu Rev Med.* 69:437-449
- Ladiwala ARA, Litt J, Kane RS, Aucoin DS, Smith SO, et al.** (2012) Conformational Differences between Two Amyloid b Oligomers of Similar Size and Dissimilar Toxicity. *J Biol. Chem* 287(29):24765-24773
- Laemmli UK.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-5
- LaFerla FM, Green KN, Oddo S.** (2007) Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 8:499-509

- Lambert JC, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K, et al.** (2009) Genomewide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 41(10):1094-1099
- Lambert JC, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R, et al.** (2013) Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 45:1452-1458
- Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, et al.** (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci* 95:6448-6453
- Lampert-Etchells M, McNeill TH, Laping NJ, Zarow C, Finch CE, May PC.** (1991) Sulfated glycoprotein-2 is increased in rat hippocampus following entorhinal cortex lesioning. *Brain Res.* 563(1-2):101-6
- Latta CH, Brothers HM, Wilcock DM.** (2014) Neuroinflammation in Alzheimer's disease; A source of heterogeneity and target for personalized therapy. *Neuroscience* 302:103-11
- Lau P, Verrier JD, Nielsen JA, Johnson KR, Notterpek L, Hudson LD** (2008) Identification of dynamically regulated microRNA and mRNA networks in developing oligodendrocytes. *J Neurosci.* 28:11720-11730
- Lauderback CM, Hackett JM, Huang FF, Keller JN, Szweda LI, et al.** (2001) The glial glutamate transporter, GLT-1, is oxidatively modified by 4-hydroxy-2-nonenal in the Alzheimer's disease brain: the role of A β 1-42. *J Neurochem.* 78(2):413-6
- Laurent C, Buee L, Blum D.** (2018) Tau and neuroinflammation: What impact for Alzheimer's disease and Tauopathies? *Biomed J.* 41(1),21-33
- Laurent C, Dorothée G, Hunot S, Martin E, Monnet Y, et al.** (2017) Hippocampal T cell infiltration promotes neuroinflammation and cognitive decline in a mouse model of tauopathy. *Brain* 140(1):184-200
- Lebon V, Petersen KF, Cline GW, Shen J, Mason GF, et al.** (2002) Astroglial contribution to brain energy metabolism in humans revealed by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy: elucidation of the dominant pathway for neurotransmitter glutamate repletion and measurement of astrocytic oxidative metabolism. *J Neurosci.* 22:1523-1531
- Lee DCY, Landreth GE.** (2010). The role of microglia in amyloid clearance from AD brain. *J Neural Transm.* 117:949-960
- Lee JH, Yu WH, Kumar A, Lee S, Mohan PS, et al.** (2010) Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell* 141:1146-1158

- Lee M, Schwab C, McGeer PL.** (2011) Astrocytes are GABAergic cells that modulate microglial activity. *Glia* 59:152–65
- Lee VMY, Goedert M, Trojanowski Q.** (2001) Neurodegenerative tauopathies. *Ann Rev Neurosci.* 24:1121-1159
- Lerch JK, Kuo F, Motti D, Morris R, Bixby JL, Lemmon VP** (2012) Isoform diversity and regulation in peripheral and central neurons revealed through RNA-Seq. *PLoS One* 7:e30417
- Lesch KP, Timmesfeld N, Renner TJ, Halperin R, Röser C, et al.** (2008) Molecular genetics of adult ADHD: converging evidence from genome-wide association and extended pedigree linkage studies. *J Neural Transm.* 115(11):1573-85
- Lesné S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, et al.** (2006) A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440(7082):284-285
- Leyns CEG, Holtzman DM.** (2017) Glial contributions to neurodegeneration in tauopathies. *Mol Neurodegener.* 12(1):50
- Li H, Wolfe MS, Selkoe DJ.** (2009a) Toward structural elucidation of the gamma-secretase complex. *Structure* 17(3):326-334
- Li M, Chen L, Hon Seng Lee D, Yu LC, Zhang Y.** (2009b) The role of intracellular amyloid A β in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol.* 83:131-139
- Li Y, Tan M-S, Jiang T, Tan L.** (2014) Microglia in Alzheimer's disease. *Biomed Res Int* 2014:437483
- Lian H, Litvinchuk A, Chiang AC, Aithmitti N, Jankowsky JL, Zheng H.** (2016) Astrocyte-Microglia Cross Talk through Complement Activation Modulates Amyloid Pathology in Mouse Models of Alzheimer's Disease. *J Neurosci.* 36(2):577-89
- Lian H, Yang L, Cole A, Sun L, Chiang AC, et al.** (2015) NF κ B-activated astroglial release of complement C3 compromises neuronal morphology and function associated with Alzheimer's disease. *Neuron* 85(1):101-115
- Liddelow SA, Barres BA.** (2017) Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity* 46:957–967
- Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, et al.** (2017) Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541(7638):481-487
- Lieb K, Engels S, Fiebich BL.** (2003) Inhibition of LPS-induced iNOS and NO synthesis in primary rat microglial cells. *Neurochem Int.* 42(2):131-7
- Lin MT and Beal MF.** (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443:787-795

- Ling D, Salvaterra PM.** (2011) Brain aging and A β 1-42 neurotoxicity converge via deterioration in autophagy-lysosomal system: A conditional Drosophila model linking Alzheimer's neurodegeneration with aging. *Acta Neuropathol* 121:183–191
- Ling D, Song HJ, Garza D, Neufeld TP, Salvaterra PM.** (2009) Abeta42-induced neurodegeneration via an age-dependent autophagic-lysosomal injury in Drosophila. *PLoS One* 4:e4201
- Litvinchuk A, Wan YW, Swartzlander DB, Chen F, Cole A, et al.** (2018) Complement C3aR Inactivation Attenuates Tau Pathology and Reverses an Immune Network Deregulated in Tauopathy Models and Alzheimer's Disease. *Neuron* pii:S0896-6273(18)30939-5
- Liu C, Cui G, Zhu M, Kang X, Guo H.** (2014) Neuroinflammation in Alzheimer's disease: chemokines produced by astrocytes and chemokine receptors. *Int J Clin Exp Pathol.* 7(12):8342-55
- Liu C, Götz J.** (2013) How it all started: tau and protein phosphatase 2A. *J Alzheimers Dis.* 37(3):483-94
- Livak KJ, Schmittgen TD.** (2001) Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4):402-8
- Lööv C, Hillered L, Ebendal T, et al.** (2012) Engulfing astrocytes protect neurons from contact-induced apoptosis following injury. *PLoS One* 7(3):e33090
- Lööv C, Mitchell CH, Simonsson M, Erlandsson A.** (2015) Slow degradation in phagocytic astrocytes can be enhanced by lysosoma acidification. *Glia* 63:1997–2009
- Lovatt D, Sonnewald U, Waagepetersen HS, Schousboe A, He W, et al.** (2007) The transcriptome and metabolic gene signature of protoplasmic astrocytes in the adult murine cortex. *J Neurosci.* 27:12255–12266
- Lovell MA, Xie C, Markesbery WR.** (2001) Acrolein is increased in Alzheimer's disease brain and is toxic to primary hippocampal cultures. *Neurobiol Aging* 22(2):187-94
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193(1):265-75
- Lu W, Huang J, Sun S, Huang S, Gan S, et al.** (2015) Changes in lactate content and monocarboxylate transporter 2 expression in A β 25-35-treated rat model of Alzheimer's disease. *Neurol Sci.* 36(6):871–876.
- Luchsinger JA, Mayeux R.** (2004) Dietary factors and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 3(10):579-587
- Lue L-F, Schmitz C, Walker DG.** (2014) What happens to microglial TREM2 in Alzheimer's disease: Immunoregulatory turned into immunopathogenic? *Neuroscience* 302:138-50

- Lukyanov KA, Belousov VV.** (2014) Genetically encoded fluorescent redox sensors. *Biochim Biophys Acta* 1840(2):745-56
- Luo, X. G., Ding, J. Q. & Chen, S. D.** (2010) Microglia in the aging brain: relevance to neurodegeneration. *Mol Neurodegener.* 5:12
- Macauley SL, Pekny M, Sands MS.** (2011) The role of attenuated astrocyte activation in infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *J Neurosci.* 31(43):15575-85
- Maccioni RB, Muñoz JP, Barbeito L.** (2001) The Molecular Bases of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *Arch Med Res* 32:367-381
- Macleod R, Hillert E-K, Cameron RT, Baillie GS.** (2015) The role and therapeutic targeting of α -, β - and γ -secretase in Alzheimer's disease. *Futur Sci OA* 1:1-16
- Mahad D, Ziabreva I, Lassmann H, Turnbull D.** (2008) Mitochondrial defects in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 131(Pt 7):1722-35
- Male D, Brostoff J, Roth D, Roitt I.** (2014) *Celulas, tejidos y órganos del sistema inmunitario.* 8ª ed. Barcelona: Elsevier.
- Mallucci GR.** (2009) Prion neurodegeneration: starts and stops at the synapse. *Prion* 3:195-201
- Malm TM, Koistinaho M, Pärevalo M, Vatanen T, Ooka A, et al.** (2005) Bonemarrow-derived cells contribute to the recruitment of microglial cells in response to β -amyloid deposition in APP/PS1 double transgenic Alzheimer mice. *Neurobiol Dis* 18:134-142.
- Mandrekar S, Jiang Q, Lee CY, Koenigsknecht-Talboo J, Holtzman DM, Landreth GE.** (2009) Microglia mediate the clearance of soluble Abeta through fluid phase macropinocytosis. *J Neurosci.* 29(13):4252-4262
- Marina N, Turovsky E, Christie IN, Hosford PS, Hadjihambi A, et al.** (2017) Brain metabolic sensing and metabolic signaling at the level of an astrocyte. *Glia* 66(6):1185-1199
- Martins IC, Kuperstein I, Wilkinson H, Maes E, Vanbrabant M, et al.** (2008) Lipids revert inert Abeta amyloid fibrils to neurotoxic protofibrils that affect learning in mice. *EMBO J* 27:224-33
- Masgrau R, Guaza C, Ransohoff RM, Galea E.** (2017) Should We Stop Saying "Glia" and "Neuroinflammation"? *Trends Mol Med* 23(6):486-500
- Masliah E, Mallory M, Alford M, DeTeresa R, Hansen LA, et al.** (2001) Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology* 56:127-129

- Masliah E, Mallory M, Hansen L, Alford M, Albright T, et al.** (1991) Patterns of aberrant sprouting in Alzheimer's disease. *Neuron* 6:729–739
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K** (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *PNAS* 82:4245-4249
- Mastrangelo I.A, Ahmed M, Sato T, Liu W, Wang C, et al.** (2006) High-resolution Atomic Force Microscopy of Soluble Ab42 Oligomers. *J Mol Biol* 358:106–119
- Mata G, Cuesta G, Heras J, Morales M, Romero A, Rubio J.** (2016) SynapCountJ: A Validated Tool for Analyzing Synaptic Densities in Neurons. In: Fred A., Gamboa H. (eds) Biomedical Engineering Systems and Technologies. BIOSTEC 2016. Communications in Computer and Information Science, vol 690. Springer, Cham, pp 41-55.2017
- Mathys H, Adaikkan C, Gao F, Young JZ, Manet E, et al.** (2017) Temporal Tracking of Microglia Activation in Neurodegeneration at Single-Cell Resolution. *Cell Rep* 21(2):366-380
- Mattson MP** (2007) Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell* 6:337-350
- Mattson MP, Arumugam TV.** (2018) Hallmarks of Brain Aging: Adaptive and Pathological Modification by Metabolic States. *Cell Metab.* 27(6):1176-1199
- Mattson MP, Chan SL.** (2010) Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell Calcium* 34(4-5):385-97
- Mattson MP, Magnus T** (2006) Ageing and neuronal vulnerability. *Nat Rev Neurosci* 7:278–294
- Mauch DH, Nägler K, Schumacher S, Göritz C, Müller EC, et al.** (2001) CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* 294(5545):1354-7
- May PC, Finch CE.** (1992) Sulfated glycoprotein 2: new relationships of this multifunctional protein to neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 15(10):391-396
- May PC, Lampert-Etchells M, Johnson SA, Poirier J, Masters JN, Finch CE.** (1990) Dynamics of gene expression for a hippocampal glycoprotein elevated in Alzheimer's disease and in response to experimental lesions in rat. *Neuron* 5(6):831-9
- McDonald CR, Gharapetian L, McEvoy LK, Fennema-Notestine C, Hagler DJ Jr, et al.** (2012) Relationship between regional atrophy rates and cognitive decline in mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 33(2):242-53
- McGeer PL, Akiyama H, Itagaki S, McGeer EG.** (1989) Activation of the classical complement pathway in brain tissue of Alzheimer patients. *Neurosci Lett.* 107(1-3):341-6
- McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, et al.** (2011) The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National

Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement* 7:263-269

Medeiros R, LaFerla FM. (2013) Astrocytes: Conductors of the Alzheimer disease neuroinflammatory symphony. *Exp Neurol* 239:133-138

Mena MA, Garcia de Yebenes J. (2008). Glial cells as players in Parkinsonism: the "good," the "bad," and the "mysterious" glia. *The Neuroscientist* 14(6):544-560

Meyer-Franke A, Kaplan MR, Pfrieger FW, Barres BA. (1995) Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture. *Neuron* 15:805-819

Meyer-Luehmann M, Spires-Jones TL, Prada C, Garcia-Alloza M, de Calignon A, et al. (2008) Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 451(7179):720-4

Miller DB, O'Callaghan JP. (2005) Aging, stress and the hippocampus. *Ageing Res Rev.* 4(2):123-40

Miners JS, Palmer JC, Tayler H, Palmer LE, Ashby E, et al. (2014) A β degradation or cerebral perfusion? Divergent effects of multifunctional enzymes. *Front Aging Neurosci* 6:238

Miners JS, Verbeek MM, Rikkert MO, Kehoe PG, Love S. (2008) Immunocapture-based fluorometric assay for the measurement of neprilysin-specific enzyme activity in brain tissue homogenates and cerebrospinal fluid. *J Neurosci Methods* 167(2):229-36

Minter MR, Taylor JM, Crack PJ. (2016) The contribution of neuroinflammation to amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry.* 136(3):457-474

Mittaud P, Labourdette G, Zingg H, Guenot-Di Scala D. (2002) Neurons modulate oxytocin receptor expression in rat cultured astrocytes: involvement of TGF-beta and membrane components. *Glia* 37(2):169-77

Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ, Meyermann R. (2001) Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathol.* 101(3):249-55

Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, et al. (1997) Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388(6645):882-7

Mizushima N, Komatsu M. (2011) Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 147(4):728-741

- Mohajeri MH, Wollmer MA, Nitsch RM.** (2002) A β 42-induced increase in neprilysin is associated with prevention of amyloid plaque formation in vivo. *J Biol Chem* 277:35460–35465
- Mohamed A, Posse de Chaves E.** (2016) A β internalization by neurons and glia. *Int J Alzheimers Dis.* 2011:127984
- Moore S, Evans LD, Andersson T, Portelius E, Smith J, et al.** (2015) APP Metabolism Regulates Tau Proteostasis in Human Cerebral Cortex Neurons. *Cell Rep.* 11(5):689-696
- Morales I, Guzmán-Martínez L, Cerda-Troncoso C, Farías GA, Maccioni RB.** (2014) Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer’s disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. *Front Cell Neurosci* 8:112
- Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, et al.** (2009) Extracellular amyloid-beta and cytotoxic glial activation induce significant entorhinal neuron loss in young PS1M146L/APP751SL mice. *J Alzheimer’s Dis* 18:755-776
- Morioka S, Perry JSA, Raymond MH, Medina CB, Zhu Y, et al.** (2018) Efferocytosis induces a novel SLC program to promote glucose uptake and lactate release. *Nature* 563(7733):714-718
- Morishima-Kawashima M, Ihara Y.** (2002) Alzheimer’s disease: beta-Amyloid protein and tau. *J Neurosci Res* 70:392–401
- Morizawa YM, Hirayama Y, Ohno N, Shibata S, Shigetomi E, et al.** (2017) Reactive astrocytes function as phagocytes after brain ischemia via ABCA1-mediated pathway. *Nat Commun* 8:28
- Morley JE, Farr SA, Banks WA, Johnson SN, Yamada KA, Xu LA.** (2010) Physiological role for amyloid- β protein: enhancement of learning and memory. *J Alzheimers Dis.* 19(2):441-449
- Mosher KI, Wyss-Coray T.** (2014) Microglial dysfunction in brain aging and Alzheimer’s disease. *Biochem Pharmacol.* 88:594-604
- Mostany R, Miquelajauregui A, Shtrahman M, Portera-Cailliau C.** (2015) Two-photon excitation microscopy and its applications in neuroscience. *Methods Mol Biol.* 1251:25-42
- Mrak RE, Griffin ST.** (2005) Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiol Aging* 26(3):349-354
- Mrdjen, Dunja, Anto Pavlovic, Felix J.** (2018) High-Dimensional Single-Cell Mapping of Central Nervous System Immune Cells Reveals Distinct Myeloid Subsets in Health, Aging, and Disease. *Immunity* 48 (2):380-395.e6

- Mucke L, Masliah M, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, et al.** (2000) High-level neuronal expression of A β 1-42 in wildtype human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci.* 20(11):4050-4058
- Mueller-Stainer S, Zhou Y, Arai H, Roberson ED, Sun B, et al.** (2006) Anti-amyloidogenic and Neuroprotective Functions of Cathepsin B: Implications for Alzheimer's Disease. *Neuron* 51:703-714
- Mufson EJ, Ginsberg SD, Ikonovic MD, DeKosky ST.** (2003) Human cholinergic basal forebrain: chemoanatomy and neurologic dysfunction. *J Chem Neuroanat* 26:233-242
- Mulder SD, Nielsen HM, Blankenstein MA, Eikelenboom P, Veerhuis R.** (2014) Apolipoproteins E and J interfere with amyloid-beta uptake by primary human astrocytes and microglia in vitro. *Glia* 62:493-503
- Müller UC, Deller T, Korte M.** (2017) Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nat Rev Neurosci* 18:281-298
- Muratore CR, Rice HC, Srikanth P, Callahan DG, Shin T, et al.** (2014) The familial Alzheimer's disease APPV717I mutation alters APP processing and Tau expression in iPSC-derived neurons. *Hum Mol Genet.* 23(13):3523-36
- Musi N, Valentine JM, Sickora KR, Baeuerle E, Thompson CS, et al.** (2018) Tau protein aggregation is associated with cellular senescence in the brain. *Aging Cell* 17(6):e12840
- Musiek ES, Holtzman DM.** (2015) Three dimensions of the amyloid hypothesis: time, space and "wingmen". *Nat Neurosci* 18:800-806
- Nagai M, Re DB, Nagata T, Chalazonitis A, Jessell TM, et al.** (2007) Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci.* 10(5):615-22
- Nalivaeva NN, Turner AJ.** (2013) The amyloid precursor protein: a biochemical enigma in brain development, function and disease. *FEBS Lett* 587:2046-54
- Nasrallah IM, Wolk DA.** (2014) Multimodality Imaging of Alzheimer Disease and Other Neurodegenerative Dementias. *J Nucl Med* 55:2003-2011
- Navarro V, Sanchez-Mejias E, Jimenez S, Muñoz-Castro C, Sanchez-Varo R, et al.** (2018) Microglia in Alzheimer's Disease: Activated, Dysfunctional or Degenerative. *Front Aging Neurosci.* 10:140
- Nebel RA, Aggarwal NT, Barnes LL, Gallagher A, Goldstein JM, et al.** (2018) Understanding the impact of sex and gender in Alzheimer's disease: A call to action. *Alzheimers Dement* 14(9):1171-1183
- Nedergaard M.** (2013) Garbage truck of the brain. *Science* 340(6140):1529-1530

- Neugroschl J, Sano M.** (2010) Current treatment and recent clinical research in Alzheimer's disease. *Mt Siani J Med.* 77:3-16
- Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA.** (1986) Identification of Cdna clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res.* 387(3):271-280
- Ney PA** (2015) Mitochondrial autophagy: origins, significance, and role of BNIP3 and NIX. *Biochim Biophys Acta* 1853:2775–2783
- Nguyen KV.** (2015) The human β -amyloid precursor protein: Biomolecular and epigenetic aspects. *Biomol Concepts* 6:11–32
- Nguyen MD, Julien JP, Rivest S.** (2002) Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat Rev Neurosci.* 3:216–27
- Niccoli T, Partridge L.** (2012) Ageing as a risk factor for disease. *Curr Biol.* 22(17):R741-52
- Nielsen HM, Mulder SD, Beliën JA, Musters RJ, Eikelenboom P, Veerhuis R.** (2010) Astrocytic A beta 1-42 uptake is determined by A beta-aggregation state and the presence of amyloid-associated proteins. *Glia* 58(10):1235-46
- Nielsen HM, Veerhuis R, Holmqvist B, Janciauskiene S.** (2009) Binding and uptake of Abeta1-42 by primary human astrocytes in vitro. *Glia* 57(9):978-88
- Nikolaev A, McLaughlin T, O'Leary DDM, Tessier-Lavigne M.** (2009) APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature* 457:981–989
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F.** (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308(5726):1314-8
- Nixon RA, Yang DS.** (2011) Autophagy failure in Alzheimer's disease-locating the primary defect. *Neurobiol Dis.* 43(1):38-45
- Nixon RA.** (2007). Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *J Cell Sci.* 120:4081-4091
- Noguchi A, Matsumura S, Dezawa M, Tada M, Yanazawa M, et al.** (2009) Isolation and characterization of patient-derived, toxic, high mass amyloid- β protein assembly from Alzheimer disease brains. *J Biol Chem* 284:32895-32905
- Nunomura A, Hofer T, Moreira PI, Castellani RJ, Smith MA, Perry G.** (2009) RNA oxidation in Alzheimer disease and related neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol.* 118(1):151-66
- Nuutinen T, Suuronen T, Kauppinen A, Salminen A.** (2009) Clusterin: a forgotten player in Alzheimer's disease. *Brain Res Rev.* 61(2):89-104

- Nuzzo D, Picone P, Caruana L, Vasto S, Barera A, et al.** (2014) Inflammatory mediators as biomarkers in brain disorders. *Inflammation* 37:639-48.
- O'Brien RJ, Wong PC.** (2011) Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annu Rev Neurosci* 34:183-202
- O'Neill LA, Pearce EJ** (2016) Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. *J Exp Med* 213:15-23
- Oda T, Pasinetti GM, Osterburg HH, Anderson C, Johnson SA, Finch CE.** (1994) Purification and characterization of brain clusterin. *Biochem Biophys Res Commun.* 204(3):1131-6
- Ofengeim D, Mazzitelli S, Ito Y, DeWitt JP, Mifflin L, et al.** (2017) RIPK1 mediates a disease-associated microglial response in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 114(41):E8788-E8797
- Ojha J, Masilamoni G, Dunlap D, Udoff RA and Cashikar G.** (2011) Sequestration of Toxic Oligomers by HspB1 as a Cytoprotective Mechanism. *Mol Cell Biol.* 31(15):3146-57
- Olah M, Patrick E, Villani AC, Xu J, White CC, et al.** (2018) A transcriptomic atlas of aged human microglia. *Nat Commun.* 9(1):539
- Orre M, Kamphuis W, Osborn LM, Jansen AHP, Kooijman L, et al.** (2014a) Isolation of glia from Alzheimer's mice reveals inflammation and dysfunction. *Neurobiol Aging* 35(12):2746-2760
- Orre M, Kamphuis W, Osborn LM, Melief J, Kooijman L, et al.** (2014b) Acute isolation and transcriptome characterization of cortical astrocytes and microglia from young and aged mice. *Neurobiol Aging* 35(1):1-14
- Osborn LM, Kamphuis W, Wadman WJ, Hol EM.** (2016) Astrogliosis: An integral player in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 144:121-141
- Otaegui-Arrazola A, Amiano P, Elbusto A, Urdaneta E, Martínez-Lage P.** (2014) Diet, cognition, and Alzheimer's disease: food for thought. *Eur J Nutr* 53:1-23
- Overk CR, Masliah E.** (2014) Pathogenesis of synaptic degeneration in Alzheimer's disease and Lewy body disease. *Biochem Pharmacol.* 88(4):508-516
- Overmyer M, Helisalmi S, Soininen H, Laakso M, Riekkinen Sr P, Alafuzoff I.** (1999) Astrogliosis and the ApoE Genotype. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 10(4):252-257
- Oyama K, Takahashi K, and Sakurai K.** (2011) Hydrogen peroxide induces cell cycle arrest in cardiomyoblast H9c2 cells, which is related to hypertrophy. *Biol. Pharm. Bull.* 34:501-506

- Pacheco-Quinto J, Eckman EA.** (2013) Endothelinconverting enzymes degrade intracellular β -amyloid produced within the endosomal/lysosomal pathway and autophagosomes. *J Biol Chem* 288:5606-15
- Palop JJ, Mucke L.** (2010) Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat Neurosci* 13:812-818
- Panza F, Lozupone M, Solfrizzi V, Sardone R, Piccininni C, et al.** (2018) BACE inhibitors in clinical development for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother.* 18(11):847-857
- Parent AT, Thinakaran G.** (2010) Modeling presenilin-dependent familial Alzheimer's disease: emphasis on presenilin substrate-mediated signaling and synaptic function. *Int J Alzheimers Dis.* pii:825918
- Pasinetti GM, Johnson SA, Rozovsky I, Lampert-Etchells M, Morgan DG, et al.** (1992) Complement C1qB and C4 mRNAs responses to lesioning in rat brain. *Exp Neurol.* 118(2):117-25
- Pérez E, Barrachina M, Rodríguez A, Torrejón-Escribano B, Boada M, et al.** (2007) Aquaporin expression in the cerebral cortex is increased at early stages of Alzheimer disease. *Brain Res.* 1128(1):164-74
- Perez-Cruz C, Nolte MW, van Gaalen MM, Rustay NR, Termont A, Tanghe A, Kirchhoff F, Ebert U.** (2011) Reduced spine density in specific regions of CA1 pyramidal neurons in two transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 31(10):3926-34
- Perez-Nievas BG, Serrano-Pozo A.** (2018) Deciphering the Astrocyte Reaction in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci.* 10:114
- Perez-Nievas BG, Stein TD, Tai HC, Dols-Icardo O, Scotton TC, et al.** (2013) Dissecting phenotypic traits linked to human resilience to Alzheimer's pathology. *Brain* 136(Pt 8):2510-2526
- Perl DP.** (2010) Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med.* 77:32-42
- Perry VH, Nicoll JAR, Holmes C.** (2010) Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol.* 6:193-201
- Pertusa M, Garcia-Matas S, Rodriguez-Farre E, Sanfeliu C, Cristofol R.** (2007). Astrocytes aged in vitro show a decreased neuroprotective capacity. *J Neurochem.* 101(3):794-805.
- Pfriegeer FW, Barres BA.** (1997) Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. *Science* 277(5332):1684-7

- Phillips EC, Croft CL, Kurbatskaya K, O'Neill MJ, Hutton ML, et al.** (2014) Astrocytes and neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans* 42:1321-1325
- Pickford F, Masliah E, Britschgi M, Lucin K, Narasimhan R, et al.** (2008) The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *J Clin Invest.* 118(6):2190-9
- Poduslo JF, Howell KG, Olson NC, Ramirez-Alvarado M, Kandimalla KK.** (2012) Alzheimer's disease amyloid β -protein mutations and deletions that define neuronal binding/internalization as early stage nonfibrillar/fibrillar aggregates and late stage fibrils. *Biochemistry* 51(19):3993-4003
- Poirier J, Baccichet A, Dea D, Gauthier S.** (1993) Cholesterol synthesis and lipoprotein reuptake during synaptic remodelling in hippocampus in adult rats. *Neuroscience* 55(1):81-90
- Poirier J, Hess M, May PC, Finch CE.** (1991) Astrocytic apolipoprotein E mRNA and GFAP mRNA in hippocampus after entorhinal cortex lesioning. *Brain Res Mol Brain Res.* 11(2):97-106
- Ponath G, Ramanan S, Mubarak M, Housley W, Lee S, et al.** (2017) Myelin phagocytosis by astrocytes after myelin damage promotes lesion pathology. *Brain* 140:399–413
- Price JL, Ko a I, Wade MJ, Tsou SK, McKeel DW, Morris JC.** (2001) Neuron number in the entorhinal cortex and CA1 in preclinical Alzheimer disease. *Arch Neurol* 58:1395–1402
- Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP.** (2013) The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement.* 9(1):63-75
- Prince M, Comas-Herrera A, Knapp M, Guerchet M, Karagiannidou M.** (2016) World Alzheimer Report 2016, Improving healthcare for people living with dementia. (<https://www.alz.co.uk/research/world-report-2016>)
- Puighermanal E, Biever A, Valjent E.** (2016) Synaptoneurosome Preparation from C57BL/6 Striata. *BIO-PROTOCOL.* 2016;6(4):e1735
- Puzzo D, Privitera L, Leznik E, Fà M, Staniszewski A, et al.** (2008) Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci.* 28(53):14537-14545
- Querfurth HW, LaFerla FM.** (2010) Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 362(4):329-344
- Rajendran L, Annaert W.** (2012) Membrane Trafficking Pathways in Alzheimer's Disease. *Traffic* 13:759–770

- Rajendran L, Paolicelli RC.** (2018) Microglia-Mediated Synapse Loss in Alzheimer's Disease. *J Neurosci.* 38(12):2911-2919
- Ramos B, Baglietto-Vargas D, del Rio JC, Moreno-Gonzalez I, Santa-Maria C, et al.** (2006) Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1xAPP transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 27(11):1658-72
- Ransohoff RM.** (2016) A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat Neurosci.* 19:987–91
- Reddy PH and Beal MF.** (2008) Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends Mol. Med.* 14:45-53
- Regen F, Hellmann-Regen J, Costantini E, Reale M.** (2017) Neuroinflammation and Alzheimer's Disease: Implications for Microglial Activation. *Curr Alzheimer Res* 14:1–1
- Reiman EM, Caselli RJ** (1999) Alzheimer's disease. *Maturitas* 31:185-200
- Reinisch VM, Krause DL, Müller N.** (2014) Neuroinflammation in Alzheimer's disease. In *Neuroinflammation and Neurodegeneration*, Vol. 9781493910 of, pp.161–177
- Riedel BC, Thompson PM, Brinton RD.** (2016) Age, APOE and sex: Triad of risk of Alzheimer's disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* 160:134–147
- Ries M, Sastre M.** (2016) Mechanisms of A β Clearance and Degradation by Glial Cells. *Front Aging Neurosci.* 8:160
- Righi M, Mori L, De Libero G, Sironi M, Biondi A, et al.** (1989) Monokine production by microglial cell clones. *Eur J Immunol* 19:1443–1448
- Ringman JM, Liang L-J, Zhou Y, Vangala S, Teng E, et al.** (2015) Early behavioural changes in familial Alzheimer's disease in the Dominantly Inherited Alzheimer Network. *Brain* 138:1036-45
- Ringman JM, Schulman H, Becker C, Jones T, Bai Y, et al.** (2012) Proteomic changes in cerebrospinal fluid of presymptomatic and affected persons carrying familial Alzheimer disease mutations. *Arch Neurol.* 69(1):96–104
- Risher WC, Eroglu C.** (2012) Thrombospondins as key regulators of synaptogenesis in the central nervous system. *Matrix Biol.* 31(3):170-7
- Robel S, Berninger B, Gotz M.** (2011) The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis. *Nat Rev Neurosci* 12:88–104

- Roberson ED, Halabisky B, Yoo JW, Yao J, Chin J, et al.** (2011) Amyloid- β /Fyn-induced synaptic, network, and cognitive impairments depend on tau levels in multiple mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 31:700–711
- Robinson M, Lee BY, Hanes FT.** (2018) Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 2: Genetics and Epidemiology. *J Alzheimers Dis.* 61(1):459
- Rodríguez-Arellano JJ, Parpura V, Zorec R, Verkhratsky A.** (2016) Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience* 323:170–182
- Rodríguez-Prados JC, Traves PG, Cuenca J, Rico D, Aragonés J, et al.** (2010) Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation. *J Immunol* 185:605–614
- Rogaeva E, Meng Y, Lee JH, Gu Y, Kawarai T, et al.** (2007) The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet* 39:168–77
- Rogers J, Cooper NR, Webster S, Schultz J, McGeer PL, et al.** (1992) Complement activation by beta-amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(21):10016–20
- Roldán A, Gogg S, Ferrini M, Schillaci R, De Nicola AF.** (1997) Glucocorticoid regulation of in vitro astrocyte phagocytosis. *Biocell* 21:83–89
- Romero-Molina C, Navarro V, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Fernandez-Valenzuela JJ, et al.** (2018) Distinct Microglial Responses in Two Transgenic Murine Models of TAU Pathology. *Front Cell Neurosci.* 12:421
- Rosenberg RN, Lambracht-Washington D, Yu G, Xia W.** (2016) Genomics of Alzheimer Disease. *JAMA Neurol* 73:867
- Rossini PM, Dal Forno G.** (2004) Neuronal post-stroke plasticity in the adult. *Restor Neurol Neurosci.* 22(3-5):193–206
- Rossner MJ, Hirrlinger J, Wichert SP, Boehm C, Newrzella D, et al.** (2006) Global transcriptome analysis of genetically identified neurons in the adult cortex. *J Neurosci* 26:9956–9966
- Rostagno A, Revesz T, Lashley T, Tomidokoro Y, Magnotti L, et al.** (2002) Complement activation in chromosome 13 dementias. Similarities with Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 277(51):49782–90
- Roychaudhuri R, Yang M, Hoshi MM, Teplow DB.** (2009) Amyloid beta-protein assembly and Alzheimer disease. *J Biol Chem* 284:4749–4753
- Rutkowski MJ, Sughrue ME, Kane AJ, Ahn BJ, Fang S, Parsa AT.** (2010) The complement cascade as a mediator of tissue growth and regeneration. *Inflamm. Res.* 59:897–905

- Sakono M, Zako T.** (2010) Amyloid oligomers: Formation and toxicity of A β oligomers. *FEBS J* 277:1348–1358
- Salminen A, Ojala J, Kaarniranta K, Haapasalo A, Hiltunen M, Soininen H.** (2011) Astrocytes in the aging brain express characteristics of senescence-associated secretory phenotype. *Eur J Neurosci.* 34(1):3-11
- Salter MW, Stevens B.** (2017) Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat Med* 23:1018–1027
- Sancesario GM, Bernardini S.** (2018) Alzheimer's disease in the omics era. *Clin Biochem.* 59:9-16
- Sanchez-Mejias E, Navarro V, Jimenez S, Sanchez-Mico M, Sanchez-Varo R, et al.** (2016) Soluble phospho-tau from Alzheimer's disease hippocampus drives microglial degeneration. *Acta Neuropathol.* 132(6):897-916
- Sanchez-Varo R, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Baglietto-Vargas D, et al.** (2012) Abnormal accumulation of autophagic vesicles correlates with axonal and synaptic pathology in young Alzheimer's mice hippocampus. *Acta Neuropathol* 123:53–70
- Saresella M, La Rosa F, Piancone F, Zoppis M, Marventano I, et al.** (2016) The NLRP3 and NLRP1 inflammasomes are activated in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 11:23
- Sastre M, Galdiks N, Zimmer A, Hoehn M, Heiss WD, et al.** (2006) Locus coeruleus degeneration promotes Alzheimer pathogenesis in amyloid precursor protein 23 transgenic mice. *J Neurosci.* 26(5):1343-1354
- Sato N, Morishita R.** (2014) Brain alterations and clinical symptoms of dementia in diabetes: A β /tau-dependent and independent mechanisms. *Front Endocrinol.* 5:143
- Saxena S, Caroni P** (2011) Selective neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases: From stressor thresholds to degeneration. *Neuron* 71:35–48
- Scarmeas N, Luchsinger JA, Schupf N, Brickman AM, Cosentino S, et al.** (2009) Physical activity, diet, and risk of Alzheimer disease. *JAMA* 302:627-37
- Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, et al.** (2012) Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 74(4):691-705
- Schafer DP, Stevens B.** (2015) Microglia function in central nervous system development and plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7:a020545
- Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, DeKosky ST, Mufson EJ.** (2007) Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology* 68(18):1501-1508

- Scheff SW, Price DA.** (2003) Synaptic pathology in Alzheimer's disease: a review of ultrastructural studies. *Neurobiol Aging* 24(8):1029-1046
- Scheltens P, Blennow K, Breteler MMB, de Strooper B, Frisoni GB, et al.** (2016) Alzheimer's disease. *Lancet* 388:505-517
- Schindowski K, Bretteville A, Leroy K, Bégard S, Brion JP, et al.** (2006) Alzheimer disease-like tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated tau transgenic mouse without any motor deficits. *Am J Pathol.* 169(2):599-616
- Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, et al.** (1993) Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(20):9649-53
- Schmittgen TD, Livak KJ.** (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 3(6):1101-8
- Schmitz G, Langmann T.** (2001) Structure, function and regulation of the ABC1 gene product. *Curr Opin Lipidol.* 12(2):129-40
- Scholz T, Mandelkow E.** (2014) Transport and diffusion of Tau protein in neurons. *Cell Mol Life Sci.* 71:3139-3150
- Schwartz M, Deczkowska A.** (2016) Neurological Disease as a Failure of Brain-Immune Crosstalk: The Multiple Faces of Neuroinflammation. *Trends Immunol* 37:668-679
- Scuderi C, Esposito G, Blasio A, Valenza M, Arietti P, et al.** (2011) Palmitoylethanolamide counteracts reactive astrogliosis induced by β -amyloid peptide. *J Cell Mol Med.* 15:2664-2674
- Sekar A, Bialas AR, de Rivera H, Davis A, Hammond TR, et al.** (2016) Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature* 530(7589):177-83
- Sekar S, McDonald J, Cuyugan L, Aldrich J, Kurdoglu A, et al.** (2015) Alzheimer's disease is associated with altered expression of genes involved in immune response and mitochondrial processes in astrocytes. *Neurobiol Aging* 36(2):583-91
- Selkoe DJ, Hardy J.** (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* 8:1-14
- Selkoe DJ.** (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* 81(2):741-766
- Selkoe DJ.** (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298:789-91

- Selkoe DJ.** (2004) Cell biology of protein misfolding: The examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat Cell Biol.* 6(11):1054-1061
- Selkoe DJ.** (2008) Biochemistry and Molecular Biology of Amyloid β -Protein and the Mechanism of Alzheimer's Disease. *Handb Clin Neurol* 89:245–260
- Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT.** (2011a) Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1(1):a006189
- Serrano-Pozo A, Gómez-Isla T, Growdon JH, Frosch MP, Hyman BT.** (2013b) A phenotypic change but not proliferation underlies glial responses in Alzheimer disease. *Am J Pathol* 182:2332–2344
- Serrano-Pozo A, Mielke ML, Gómez-Isla T, Betensky RA, Growdon JH, et al.** (2011b) Reactive glia not only associates with plaques but also parallels tangles in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 179(3):1373–84
- Serrano-Pozo A, Muzikansky A, Gómez-Isla T, Growdon JH, Betensky R a, et al.** (2013a) Differential relationships of reactive astrocytes and microglia to fibrillar amyloid deposits in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 72:462–71
- Shaffer LM, Dority MD, Gupta-Bansal R, Frederickson RC, Younkin SG, Brunden KR.** (1995) Amyloid beta protein (A beta) removal by neuroglial cells in culture. *Neurobiol Aging* 16(5):737-45
- Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL.** (2007) Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci* 27:2866-75
- Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, et al.** (2008) Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med.* 14(8):837-842
- Shankar GM, Walsh DM.** (2009) Alzheimer's disease: synaptic dysfunction and A β . *Mol Neurodegener* 4:48
- Shen Y, Li R, McGeer EG, McGeer PL.** (1997) Neuronal expression of mRNAs for complement proteins of the classical pathway in Alzheimer brain. *Brain Res.* 769(2):391-5
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, et al.** (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375:754–760

- Shi Q, Chowdhury S, Ma R, Le KX, Hong S, et al.** (2017a) Complement C3 deficiency protects against neurodegeneration in aged plaque-rich APP/PS1 mice. *Sci Transl Med.* 9(392). pii: eaaf6295
- Shi Q, Colodner KJ, Matousek SB, Merry K, Hong S, et al.** (2015) Complement C3-Deficient Mice Fail to Display Age-Related Hippocampal Decline. *J Neurosci.* 35(38):13029-42
- Shi Y, Sun X, Sun Y, Hou L, Yao M, et al.** (2016) Elevation of cortical C26:0 due to the decline of peroxisomal β -oxidation potentiates amyloid β generation and spatial memory deficits via oxidative stress in diabetic rats. *Neuroscience* 315:125-35
- Shi Y, Yamada K, Liddelow SA, Smith ST, Zhao L, et al.** (2017b) ApoE4 markedly exacerbates tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of tauopathy. *Nature* 549(7673):523-527
- Shinjyo N, Stahlberg A, Dragunow M, Pekny M, Pekna M.** (2009) Complement-derived anaphylatoxin C3a regulates in vitro differentiation and migration of neural progenitor cells. *Stem Cells* 27:2824–32
- Sidoryk-Wegrzynowicz M, Gerber YN, Ries M, Sastre M, Tolkovsky AM, Spillantini MG.** (2017) Astrocytes in mouse models of tauopathies acquire early deficits and lose neurosupportive functions. *Acta Neuropathol Commun.* 5(1):89
- Simard AR, Soulet D, Gowing G, Julien JP, Rivest S.** (2006) Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron* 49(4):489-502
- Simic G, Lucassen PJ, Krsnik Z, Kostovic I, Windblad B, Bogdanovic N.** (2000) nNOS expression in reactive astrocytes correlates with increased cell death related DNA damage in the hippocampus and entorhinal cortex in Alzheimer's disease. *Exp Neurol.* 165(1):12-26
- Simpson JE, Ince PG, Lace G, Forster G, Shaw PJ, et al.** (2010). Astrocyte phenotype in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. *Neurobiol Aging* 31:578–590
- Sims R, van der Lee SJ, Naj AC, Bellenguez C, Badarinarayan N, et al.** (2017) Rare coding variants in PLCG2, ABI3, and TREM2 implicate microglial-mediated innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat Genet* 49:1373–1384
- Singh SK, Stogsdill JA, Pulimood NS, Dingsdale H, Kim YH, et al.** (2016) Astrocytes Assemble Thalamocortical Synapses by Bridging NRX1 α and NL1 via Hevin. *Cell* 164(1-2):183-196
- Skaper SD.** (2007) The brain as a target for inflammatory processes and neuroprotective strategies. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 122:23-34

- Small DH.** (2008) Network dysfunction in Alzheimer's disease: does synaptic scaling drive disease progression? *Trends in Molecular Medicine* 14(3):103-108
- Snyder SW, Wang GT, Barrett L, Lador US, Casuto D, et al.** (1994) Complement C1q does not bind to monomeric b-amyloid. *Exp Neurol.* 128(1):136-42
- Sochocka M, Diniz BS, Leszek J.** (2016) Inflammatory Response in the CNS: Friend or Foe? *Mol Neurobiol.* 54(10):8071-8089
- Sofroniew** (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* 32:638–647
- Sofroniew MV, Vinters HV.** (2010) Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119(1):7–35
- Sokolowski JD, Nobles SL, Heffron DS, Park D, Ravichandran KS, Mandell JW.** (2011) Brainspecific angiogenesis inhibitor-1 expression in astrocytes and neurons: Implications for its dual function as an apoptotic engulfment receptor. *Brain Behav Immun* 25:915–921
- Söllvander S, Nikitidou E, Brolin R, Söderberg L, Sehlin D, et al.** (2016) Accumulation of amyloid- β by astrocytes result in enlarged endosomes and microvesicleinduced apoptosis of neurons. *Mol Neurodegener* 11:38
- Son SM, Cha MY, Choi H, Kang S, Lee MS, et al.** (2016) Insulin-degrading enzyme secretion from astrocytes is mediated by an autophagy-based unconventional secretory pathway in Alzheimer disease. *Autophagy* 12:784–800
- Song MS, Baker GB, Todd KG, Kar S.** (2011) Inhibition of β -amyloid1-42 internalization attenuates neuronal death by stabilizing the endosomal-lysosomal system in rat cortical cultured neurons. *Neuroscience* 178:181-8
- Sörensen L, Ekstrand M, Silva JP, Lindqvist E, Xu B, et al.** (2001) Late-onset corticohippocampal neurodepletion attributable to catastrophic failure of oxidative phosphorylation in MILON mice. *J Neurosci.* 21(20):8082-90
- Sosunov AA, Wu X, Tsankova NM, Guilfoyle E, McKhann GM 2nd, Goldman JE.** (2014) Phenotypic heterogeneity and plasticity of isocortical and hippocampal astrocytes in the human brain. *J Neurosci.* 34(6):2285-98
- Sowter HM, Ratcliffe PJ, Watson P, Greenberg AH, Harris AL** (2001) HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res* 61:6669–6673
- Spann NJ, Garmire LX, McDonald JG, Myers DS, Milne SB, et al.** (2012) Regulated accumulation of desmosterol integrates macrophage lipid metabolism and inflammatory responses. *Cell* 151(1):138-52

- Spillantini MG, Goedert M.** (2013) Tau pathology and neurodegeneration. *Lancet Neurol.* 12(6):609-22
- Spiller KJ, Restrepo CR, Khan T, Dominique MA, Fang TC, et al.** (2018) Microglia-mediated recovery from ALS-relevant motor neuron degeneration in a mouse model of TDP-43 proteinopathy. *Nat Neurosci.* 21(3):329-340
- Spire-Jones TL, Hyman BT.** (2014) The intersection of amyloid- β and tau at synapses in Alzheimer's disease. *Neuron* 82(4):756-771
- Spire-Jones TL, Meyer-Luehmann M, Osetek JD, Jones PB, Stern EA, et al.** (2007) Impaired spine stability underlies plaque-related spine loss in an Alzheimer's disease mouse model. *Am. J. Pathol.* 171:1304-11
- Srinivasan K, Friedman BA, Larson JL, Lauffer BE, Goldstein LD, et al.** (2016) Untangling the brain's neuroinflammatory and neurodegenerative transcriptional responses. *Nat Commun.* 7:11295
- Stenovec M, Trkov S, Lasic E, Terzieva S, Kreft M, et al.** (2016) Expression of familial Alzheimer disease presenilin 1 gene attenuates vesicle traffic and reduces peptide secretion in cultured astrocytes devoid of pathologic tissue environment. *Glia* 64:317-329
- Stephan AH, Barres BA, Stevens B.** (2007) The complement system: an unexpected role in synaptic pruning during development and disease. *Annu Rev Neurosci.* 35:369-89
- Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, et al.** (2007) The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 131(6):1164-78
- Stoll EA, Makin R, Sweet IR, Trevelyan AJ, Miwa S, et al.** (2015) Neural Stem Cells in the Adult Subventricular Zone Oxidize Fatty Acids to Produce Energy and Support Neurogenic Activity. *Stem Cells* 33(7):2306-19
- Stoltzner SE, Grenfell TJ, Mori C, Wisniewski KE, Wisniewski TM, et al.** (2000) Temporal accrual of complement proteins in amyloid plaques in Down's syndrome with Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 156(2):489-99
- Streit WJ, Braak H, Xue QS, Bechmann I.** (2009) Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 118(4):475-85
- Streit WJ, Xue QS, Braak H, del Tredici K.** (2014) Presence of severe neuroinflammation does not intensify neurofibrillary degeneration in human brain. *Glia* 62:96-105
- Streit WJ, Xue QS.** (2009) Life and death of microglia. *J Neuroimmune Pharmacol* 4:371-379

- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, et al.** (1993) Apolipoprotein E: highavidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *PNAS* 90(5):1977-1981
- Strohmeier R, Shen Y, Rogers J** (2000) Detection of complement alternative pathway mRNA and proteins in the Alzheimer's disease brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 81(1-2):7-18
- Stutzmann GE** (2007) The pathogenesis of Alzheimer's disease is it a lifelong "calciumopathy"? *Neuroscientist* 13:546-559
- Suh SW, Hamby AM, Gum ET, Shin BS, Won SJ, et al.** (2008b) Sequential release of nitric oxide, zinc, and superoxide in hypoglycemic neuronal death. *J Cereb Blood Flow Metab.* 28(10):1697-706
- Suh SW, Shin BS, Ma H, Van Hoecke M, Brennan AM, et al.** (2008a) Glucose and NADPH oxidase drive neuronal superoxide formation in stroke. *Ann Neurol.* 64(6):654-63
- Sun X, Chen WD, Wang YD.** (2015) β -Amyloid: The key peptide in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Front Pharmacol* 6:221
- Sun Y, Yao J, Kim TW, Tall AR.** (2003) Expression of liver X receptor target genes decreases cellular amyloid beta peptide secretion. *J Biol Chem.* 278(30):27688-94
- Sze CI, Troncoso JC, Kawas C, Mouton P, Price DL, Martin LJ.** (1997) Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56:933-944
- Tada M, Konno T, Tada M, Tezuka T, Miura T, et al.** (2016) Characteristic microglial features in patients with hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids. *Ann Neurol.* 80(4):554-65
- Tai LM, Ghura S, Koster KP, Liakaite V, Maienschein-Cline M, et al.** (2015) APOE-modulated $A\beta$ -induced neuroinflammation in Alzheimer's disease: current landscape, novel data, and future perspective. *J Neurochem.* 133(4):465-488
- Takahashi RH, Nagao T, Gouras GK.** (2017) Plaque formation and the intraneuronal accumulation of β -amyloid in Alzheimer's disease. *Pathol Int* 67:185-193
- Takami M, Nagashima Y, Sano Y, Ishihara S, Morishima-Kawashima M, et al.** (2009) γ -Secretase: Successive Tripeptide and Tetrapeptide Release from the Transmembrane Domain of β -Carboxyl Terminal Fragment. *Journal of Neuroscience* 29:13042-13052
- Takasugi N, Tomita T, Hayashi I, Tsuruoka M, Niimura M, et al.** (2003) The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature* 422:438-441

- Tampellini D, Gouras GK.** (2010) Synapses, synaptic activity and intraneuronal A β in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci.* 2. pii:13
- Tan FC, Hutchison ER, Eitan E, Mattson MP.** (2014) Are there roles for brain cell senescence in aging and neurodegenerative disorders? *Biogerontology* 15(6):643–660
- Tan J, Town T, Crawford F, Mori T, DelleDonne A, et al.** (2002) Role of CD40 ligand in amyloidosis in transgenic Alzheimer's mice. *Nat Neurosci* 5:1288-93
- Tang Y, Le W.** (2015). Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol.* 136(6):E475-487
- Tansey FA, Cammer W.** (1998) Differential uptake of dextran beads by astrocytes, macrophages and oligodendrocytes in mixed glial-cell cultures from brains of neonatal rats. *Neurosci Lett* 248:159–162
- Tanzi RE, McClatchey AI, Lamperti ED, VillaKomaroff L, Gusella JF, Neve RL.** (1988) Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature* 331(6156):528-530
- Tarasoff-Conway JM, Carare RO, Osorio RS, Glodzik L, Butler T, et al.** (2015) Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* 11(8):457-70
- Tatarnikova OG, Orlov MA, Bobkova NV.** (2015) Beta-Amyloid and Tau-Protein: Structure, Interaction, and Prion-Like Properties. *Biochem* 80:1800–1819
- Tenner AJ.** (2001) Complement in Alzheimer's disease: opportunities for modulating protective and pathogenic events. *Neurobiol. Aging* 22(6):849-61
- ter Laak HJ, Renkawek K, van Workum FP.** (1994) The olfactory bulb in Alzheimer disease: a morphologic study of neuron loss, tangles, and senile plaques in relation to olfaction. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 8:38–48
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, et al.** (1991) Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann. Neurol.* 30:572–580
- Thal DR, Capetillo-Zarate E, Del Tredici K, Braak H.** (2006) The development of amyloid- β protein deposits in the aged brain. *Sci Aging Knowledge Environ.* 6:re1
- Thal DR, Griffin WST, Braak H.** (2008) Parenchymal and vascular A β -deposition and its effects on the degeneration of neurons and cognition in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* 12:1848-1862
- Thinakaran G, Koo EH.** (2008) Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem* 283:29615–29619

- Tian G, Kong Q, Lai L, Ray-Chaudhury A, Lin CL.** (2010) Increased expression of cholesterol 24S-hydroxylase results in disruption of glial glutamate transporter EAAT2 association with lipid rafts: a potential role in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 113(4):978-89
- Tian H, Davidowitz E, Lopez P, Emadi S, Moe J, Sierks M.** (2013) Trimeric tau is toxic to human neuronal cells at low nanomolar concentrations. *International Journal of Cell Biology. Int J Cell Biol.* 2013:260787
- Tomita T.** (2017) Aberrant proteolytic processing and therapeutic strategies in Alzheimer disease. *Adv Biol Regul.* 64:33-38
- Torres M, Jimenez S, Sanchez-Varo R, Navarro V, Trujillo-Estrada L, et al.** (2012) Defective lysosomal proteolysis and axonal transport are early pathogenic events that worsen with age leading to increased APP metabolism and synaptic Abeta in transgenic APP/PS1 hippocampus. *Mol Neurodegener* 7:59
- Trujillo-Estrada L, Dávila JC, Sánchez-Mejías E, Sánchez-Varo R, Gomez-Arboledas A, et al.** (2014) Early Neuronal Loss and Axonal/Presynaptic Damage is Associated with Accelerated Amyloid- β Accumulation in A β PP/PS1 Alzheimer's Disease Mice Subiculum. *J Alzheimers Dis* 42:521-541
- Trujillo-Estrada L, Jimenez S, De Castro V, Torres M, Baglietto-Vargas D, et al.** (2013) In vivo modification of Abeta plaque toxicity as a novel neuroprotective lithium-mediated therapy for Alzheimer's disease pathology. *Acta Neuropathol Commun* 1:73
- Trushina E and McMurray CT.** (2007) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Neuroscience* 145:1233-1248
- Tuppo EE, Arias HG.** (2005) The role of the inflammation in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 37(2):289-305
- Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC.** (2003) Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol.* 70(1):1-32
- Ubogu EE, Cossoy MB, Ransohoff RM.** (2006) The expression and function of chemokines involved in CNS inflammation. *Trends Pharmacol Sci.* 27(1):48-55
- Ugbode C, Hu Y, Whalley B, Peers C, Rattray M, Dallas ML.** (2017) Astrocytic transporters in Alzheimer's disease. *Biochem J* 474:333-355
- Ullian EM, Christopherson KS, Barres BA.** (2004) Role for glia in synaptogenesis. *Glia* 47(3):209-16

- Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA.** (2001) Control of synapse number by glia. *Science* 291(5504):657-61
- Umeda T, Tomiyama T, Sakama N, Tanaka S, Lambert MP, et al.** (2011) Intraneuronal amyloid β oligomers cause cell death via endoplasmic reticulum stress, endosomal/lysosomal leakage, and mitochondrial dysfunction in vivo. *J Neurosci Res.* 89(7):1031-42
- Vaishnavi SN, Vlassenko AG, Rundle MM, Snyder AZ, Mintun MA, Raichle ME.** (2010) Regional aerobic glycolysis in the human brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(41):17757–17762
- Vallés SL, Borrás C, Gambini J, Furriol J, Ortega A, et al.** (2008) Oestradiol or genistein rescues neurons from amyloid beta-induced cell death by inhibiting activation of p38. *Aging Cell* 7(1):112-8
- Valles SL, Dolz-Gaiton P, Gambini J, Borrás C, Lloret A, et al.** (2010) Estradiol or genistein prevent Alzheimer's disease-associated inflammation correlating with an increase PPAR gamma expression in cultured astrocytes. *Brain Res.* 1312:138-44
- van Deijk AF, Camargo N, Timmerman J, Heistek T, Brouwers JF, et al.** (2017) Astrocyte lipid metabolism is critical for synapse development and function in vivo. *Glia* 65(4):670-682
- van Strien NM, Cappaert NLM, Witter MP.** (2009) The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat Rev Neurosci* 10:272–82
- Varnum MM, Ikezu T.** (2012) The classification of microglial activation phenotypes on neurodegeneration and regeneration in Alzheimer's disease brain. *Arch Immunol Ther Exp.* 60:251-266
- Vasek MJ, Garber C, Dorsey D, Durrant DM, Bollman B, et al.** (2016) A complement-microglial axis drives synapse loss during virus-induced memory impairment. *Nature* 534(7608):538-43
- Vasile F, Dossi E, Rouach N.** (2017) Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Struct Funct.* 222(5):2017-2029
- Vassar R, Kovacs DM, Yan R, Wong PC.** (2009) The γ -Secretase Enzyme BACE in Health and Alzheimer's Disease: Regulation, Cell Biology, Function, and Therapeutic Potential. *J Neurosci* 29:12787–12794
- Veerhuis R, Janssen I, De Groot CJ, Van Muiswinkel FL, Hack CE, Eikelenboom P.** (1999) Cytokines associated with amyloid plaques in Alzheimer's disease brain stimulate

human glial and neuronal cell cultures to secrete early complement proteins, but not C1-inhibitor. *Exp Neurol*. 160(1):289-99

Veerhuis R, Janssen I, Hack CE, Eikelenboom P. (1996) Early complement components in Alzheimer's disease brains. *Acta Neuropathol*. 91(1):53-60

Veerhuis R, Nielsen HM, Tenner AJ. (2011) Complement in the brain. *Mol. Immunol*. 48(14):1592-603

Velazquez P, Cribbs DH, Poulos TL, Tenner AJ. (1997) Aspartate residue 7 in amyloid beta-protein is critical for classical complement pathway activation: implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *Nat Med*. 3(1):77-9

Vereecken THLG, Vogels OJM, Nieuwenhuys R. (1994) Neuron loss and shrinkage in the amygdala in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 15:45-54

Verkhatsky A, Butt A. (2007) *Glial Neurobiology A text book*. 1 ed. Chichester: John Wiley & Sons

Verkhatsky A, Olabarria M, Noristani HN, Yeh CY, Rodriguez JJ. (2010) Astrocytes in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* 7(4):399-412

Verkhatsky A, Parpura V, Pekna M, Pekny M, Sofroniew M. (2014) Glia in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Biochem Soc Trans* 42:1291-1301

Verkhatsky A, Zorec R, Rodriguez JJ, Parpura V. (2016) Astroglia dynamics in ageing and Alzheimer's disease. *Curr Opin Pharmacol* 26:74-79

Vermeer SE, Prins ND, den Heijer T, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM. (2003) Silent brain infarcts and the risk of dementia and cognitive decline. *N Engl J Med* 348:1215-1222

Vetrivel KS, Zhang Y, Xu Huaxi, Thinakaran G. (2006) Pathological and physiological functions of presenilins. *Mol Neurodegener*. 1:4

Villarreal A, Seoane R, Torres AG, Rosciszewski G, Angelo MF, et al. (2014) S100B protein activates a RAGE dependent autocrine loop in astrocytes: Implications for its role in the propagation of reactive gliosis. *J Neurochem* 131:190-205

Villegas-Llerena C, Phillips A, Reitboeck PG, Hardy J, Pocock JM. (2016) Microglial genes regulating neuroinflammation in the progression of Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol* 36:74-81

Viola KL, Klein WL. (2015) Amyloid β oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. *Acta Neuropathol* 129:183-206

- Vogels OJ, Broere CA, ter Laak HJ, ten Donkelaar HJ, Nieuwenhuys R, Schulte BP.** (1990) Cell loss and shrinkage in the nucleus basalis Meynert complex in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 11:3-13
- von Bernhardt R, Eugenín-von Bernhardt L, Eugenín J.** (2015) Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration. *Front Aging Neurosci.* 7:124
- von Bernhardt R.** (2016) Glial cell dysregulation: a new perspective on Alzheimer disease. *Neurotox Res.* 12(4):215-32
- Wahrle SE, Jiang H, Parsadanian M, Legleiter J, Han X, et al.** (2004) ABCA1 is required for normal central nervous system ApoE levels and for lipidation of astrocyte-secreted apoE. *J Biol Chem.* 279(39):40987-93
- Wakabayashi T, De Strooper B.** (2008) Presenilins: members of the gamma-secretase quartets, but part-time soloists too. *Physiology (Bethesda)* 23:194-204
- Walker DG, Kim SU, McGeer PL.** (1998) Expression of complement C4 and C9 genes by human astrocytes. *Brain Res.* 809(1):31-8
- Walker DG, McGeer PL.** (1993) Complement gene expression in neuroblastoma and astrocytoma cell lines of human origin. *Neurosci Lett.* 157(1):99-102
- Walsh DM, Lomakin A, Benedek GB, Maggio JE, Condon MM, Teplow DB.** (1997) Amyloid β -protein fibrillogenesis: Detection of a protofibrillar intermediate. *J Biol Chem* 272(35):22364-22374
- Wang DB, Dayton RD, Zweig RM, Klein RL.** (2010) Transcriptome analysis of a tau overexpression model in rats implicates an early pro-inflammatory response. *Exp Neurol.* 2010 Jul;224(1):197-206.
- Wang HY, Lee DH, D'Andrea MR, Peterson PA, Shank RP, Reitz AB.** (2000) B-amyloid (1-42) bind to $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem.* 275(8):5626-5632
- Wang JZ, Xia YY, Grundke-Iqbal I, Iqbal K.** (2013) Abnormal hyperphosphorylation of Tau: sites, regulation, and molecular mechanism of neurofibrillary degeneration. *J Alzheimers Dis.* 33:S123-S139
- Wang N, Tall AR.** (2003) Regulation and mechanisms of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular cholesterol efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23(7):1178-84
- Wang Y, Cella M, Mallinson K, Ulrich JD, Young KL, et al.** (2015) TREM2 Lipid Sensing Sustains the Microglial Response in an Alzheimer's Disease Model. *Cell* 160:1061-1071

- Webster S, Lue LF, Brachova L, Tenner AJ, McGeer PL, et al.** (1997) Molecular and cellular characterization of the membrane attack complex, C5b-9, in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 18(4):415-21
- Webster SJ, Bachstetter AD, Nelson PT, Schmitt FA, Van Eldik LJ.** (2014) Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Front Genet* 5:88
- Webster SJ, Van Eldik LJ, Watterson DM, Bachstetter AD.** (2015) Closed head injury in an age-related Alzheimer mouse model leads to an altered neuroinflammatory response and persistent cognitive impairment. *J Neurosci*. 35(16):6554-69
- Weller RO, Subash M, Preston SD, Mazanti I, Carare RO.** (2008) Perivascular drainage of amyloid- β Peptides from the brain and its failure in cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 18:253-266
- Westmark PR, Westmark CJ, Jeevananthan A, Malter JS.** (2011) Preparation of Synaptoneurosomes from Mouse Cortex using a Discontinuous Percoll-Sucrose Density Gradient. *J Vis Exp*. (55):1-9
- Wilcock DM, Vitek MP, Colton CA.** (2009) Vascular amyloid alters astrocytic water and potassium channels in mouse models and humans with Alzheimer's disease. *Neuroscience* 159:1055-1069
- Wilkins HM, Swerdlow RH.** (2017) Amyloid precursor protein processing and bioenergetics. *Brain Res Bull* 133:71-79
- Winblad B, Amouyel P, Andrieu S, Ballard C, Brayne C, et al.** (2016) Defeating Alzheimer's disease and other dementias: A priority for European science and society. *Lancet Neurol* 15:455-532
- Wiseman FK, Al-Janabi T, Hardy J, Karmiloff-Smith A, Nizetic D, et al.** (2015) A genetic cause of Alzheimer disease: mechanistic insights from Down syndrome. *Nat Rev Neurosci* 16:564-74
- Wisniewski T, Ghiso J, Frangione B.** (1997) Biology of A beta amyloid in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 4(5):313-28.
- Wisniewski T, Golabek A, Matsubara E, Ghiso J, Frangione B.** (1993) Apolipoprotein E: binding to soluble Alzheimer's beta-amyloid. *Biochem Biophys Res Commun*. 192(2):359-65
- Wolfe DM, Lee JH, Kumar A, Lee S, Orenstein SJ, Nixon RA.** (2013) Autophagy failure in Alzheimer's disease and the role of defective lysosomal acidification. *Eur J Neurosci*. 37(12):1949-61
- Wolfe MS, Guénette SY.** (2007) APP at a glance. *J Cell Sci*. 120(Pt 18):3-3157-3161

- Wolfe MS, Kopan R.** (2004) Intramembrane proteolysis: theme and variations. *Science* 305:1119–1123
- Wu L, Zhang X, Zhao L.** (2018) Human ApoE Isoforms Differentially Modulate Brain Glucose and Ketone Body Metabolism: Implications for Alzheimer's Disease Risk Reduction and Early Intervention. *J Neurosci.* 38(30):6665–6681
- Wu L, Zhao L.** (2016) ApoE2 and Alzheimer's disease: time to take a closer look. *Neural Regen Res.* 11(3):412–3
- Wu Y, Dissing-Olesen L, MacVicar BA, Stevens B.** (2015) Microglia: Dynamic Mediators of Synapse Development and Plasticity. *Trends Immunol* 36:605–613
- Wylie CJ, Hendricks TJ, Zhang B, Wang L, Lu P, et al.** (2010) Distinct transcriptomes define rostral and caudal serotonin neurons. *J Neurosci.* 30:670–684
- Wyss-Coray T, Lin C, Yan F, Yu GQ, Rohde M, et al.** (2001) TGF-beta1 promotes microglial amyloid-beta clearance and reduces plaque burden in transgenic mice. *Nat Med.* 7(5):612–8
- Wyss-Coray T, Loike JD, Brionne TC, Lu E, Anankov R, Yan F, Silverstein SC, Husemann J.** (2003) Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med* 9:453–457
- Wyss-Coray T, Mucke L.** (2002) Inflammation in neurodegenerative disease—a double-edged sword. *Neuron* 35:419–32
- Wyss-Coray T.** (2006) Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat Med* 12:1005–1015
- Xiao Q, Yan P, Ma X, Liu H, Perez R, et al.** (2014) Enhancing astrocytic lysosome biogenesis facilitates a β clearance and attenuates amyloid plaque pathogenesis. *J Neurosci* 34:9607–20
- Xie H, Guan J, Borrelli LA, Xu J, Serrano-Pozo A, Bacskai BJ.** (2013b) Mitochondrial alterations near amyloid plaques in an Alzheimer's disease mouse model. *J Neurosci.* (43):17042–51
- Xie H, Hou S, Jiang J, Sekutowicz M, Kelly J, Bacskai BJ.** (2013a) Rapid cell death is preceded by amyloid plaque-mediated oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(19):7904–9
- Yamada K, Nabeshima T.** (2000) Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of antidementia drugs. *Pharmacol Ther.* 88:93–113

- Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, et al.** (2008) Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci.* 11(3):251-3
- Yamazaki Y, Kanekiyo T.** (2017) Blood-Brain Barrier Dysfunction and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 18(9):1965
- Yanai I, Benjamin H, Shmoish M, Chalifa-Caspi V, Shklar M, et al.** (2005) Genome-wide midrange transcription profiles reveal expression level relationships in human tissue specification. *Bioinformatics* 21(5):650-9
- Yang C, Huang X, Huang X, Mai H, Li J, et al.** (2016) Aquaporin-4 and Alzheimer's Disease ed. G. Arendash. *J Alzheimer's Dis* 52:391-402
- Yang CN, Shiao YJ, Shie FS, Guo BS, Chen PH, et al.** (2011) Mechanism mediating oligomeric A β clearance by naïve primary microglia. *Neurobiol Dis.* 42(3):221-230
- Ye B, Shen H, Zhang J, Zhu YG, Ransom BR, et al.** (2015) Dual pathways mediate β -amyloid stimulated glutathione release from astrocytes. *Glia* 63(12):2208-19
- Yeh C, Vadhwana B, Verkhratsky A, Rodríguez JJ.** (2011) Early astrocytic atrophy in the entorhinal cortex of a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *ASN Neuro* 3:271-279
- Yeh FL, Hansen D V., Sheng M.** (2017) TREM2, Microglia, and Neurodegenerative Diseases. *Trends Mol Med* 23:512-533
- Yin K-J, Cirrito JR, Yan P, Hu X, Xiao Q, et al.** (2006) Matrix Metalloproteinases Expressed by Astrocytes Mediate Extracellular Amyloid-beta Peptide Catabolism. *J Neurosci.* 26:10939-10948
- Yoshiyama Y, Higuchi M, Zhang B, Huang SM, Iwata N, et al.** (2007) Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron* 53(3):337-51
- Yu JT, Tan L, Hardy J.** (2014) Apolipoprotein E in Alzheimer's disease: an update. *Annu Rev Neurosci.* 37:79-100
- Yuan P, Condello C, Keene CD, Wang Y, Bird TD, et al.** (2016) TREM2 Haplodeficiency in Mice and Humans Impairs the Microglia Barrier Function Leading to Decreased Amyloid Compaction and Severe Axonal Dystrophy. *Neuron* 90:724-739
- Yun SP, Kam TI, Panicker N, Kim S, Oh Y, et al.** (2018) Block of A1 astrocyte conversion by microglia is neuroprotective in models of Parkinson's disease. *Nat Med.* 24(7):931-938
- Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, et al.** (2012) Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci.* 32:6391-6410

- Zandl-Lang M, Fanaee-Danesh E, Sun Y, Albrecher NM, Gali CC, et al.** (2018) Regulatory effects of simvastatin and apoJ on APP processing and amyloid- β clearance in blood-brain barrier endothelial cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1863(1):40-60
- Zempel H, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow EM** (2010) Abeta oligomers cause localized Ca(2+) elevation, missorting of endogenous Tau into dendrites, Tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines. *J Neurosci.* 30:11938-11950
- Zenaro E, Piacentino G, Constantin G.** (2017) The blood-brain barrier in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 107:41-56
- Zeppenfeld DM, Simon M, Haswell JD, D'Abreo D, Murchison C, et al.** (2017) Association of perivascular localization of aquaporin-4 with cognition and Alzheimer disease in aging brains. *JAMA Neurol.* 74:91-99.
- Zerbinatti CV, Wahrle SE, Kim H, Cam JA, Bales K, et al.** (2006) Apolipoprotein E and low-density lipoprotein receptor-related protein facilitate intraneuronal A β 42 accumulation in amyloid model mice. *J Biol Chem.* 281(47):36180-86
- Zhang D, Hu X, Qian L, O'Callaghan JP, Hong JS** (2010). Astrogliosis in CNS pathologies: is there a role for microglia? *Mol. Neurobiol.* 41:232-241
- Zhang F, Jiang L.** (2015) Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 11:243-56
- Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Tan YS, Baek JH, et al.** (2008) Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem* 283:10892-10903
- Zhang XY, Chen DC, Tan YL, An HM, Zunta-Soares GB, et al.** (2015) Glucose disturbances in first-episode drug-naïve schizophrenia: Relationship to psychopathology. *Psychoneuroendocrinology* 62:376-80
- Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, et al.** (2014) An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci.* 34(36):11929-47
- Zhang Y, Thompson R, Zhang H, Xu H.** (2011) APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain* 4:3
- Zhou J, Fonseca MI, Pisalyaput K, Tenner AJ.** (2008) Complement C3 and C4 expression in C1q sufficient and deficient mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 106(5):2080-92

