

Tesis Doctoral

Alteraciones en el endotelio y la glía en el hipocampo del ratón transgénico PDAPP, modelo de la Enfermedad de Alzheimer. Interacción entre componentes de la unidad neurovascular

Pomilio, Carlos Javier

2018

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Pomilio, Carlos Javier. (2018). Alteraciones en el endotelio y la glía en el hipocampo del ratón transgénico PDAPP, modelo de la Enfermedad de Alzheimer. Interacción entre componentes de la unidad neurovascular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6517_Pomilio

Cita tipo Chicago:

Pomilio, Carlos Javier. "Alteraciones en el endotelio y la glía en el hipocampo del ratón transgénico PDAPP, modelo de la Enfermedad de Alzheimer. Interacción entre componentes de la unidad neurovascular". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2018. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6517_Pomilio

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Alteraciones en el endotelio y la glía en el
hipocampo del ratón transgénico PDAPP, modelo
de la Enfermedad de Alzheimer. Interacción entre
componentes de la unidad neurovascular.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área de Química Biológica.

Licenciado Carlos Javier Pomilio

Directora de Tesis: Dra. Flavia Eugenia Saravia

Director Asistente: Dr. Juan Beauquis

Consejero de Estudios: Dr. Eduardo Tomás Cánepa.

Lugar de trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME), y
Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad de Buenos Aires (UBA).

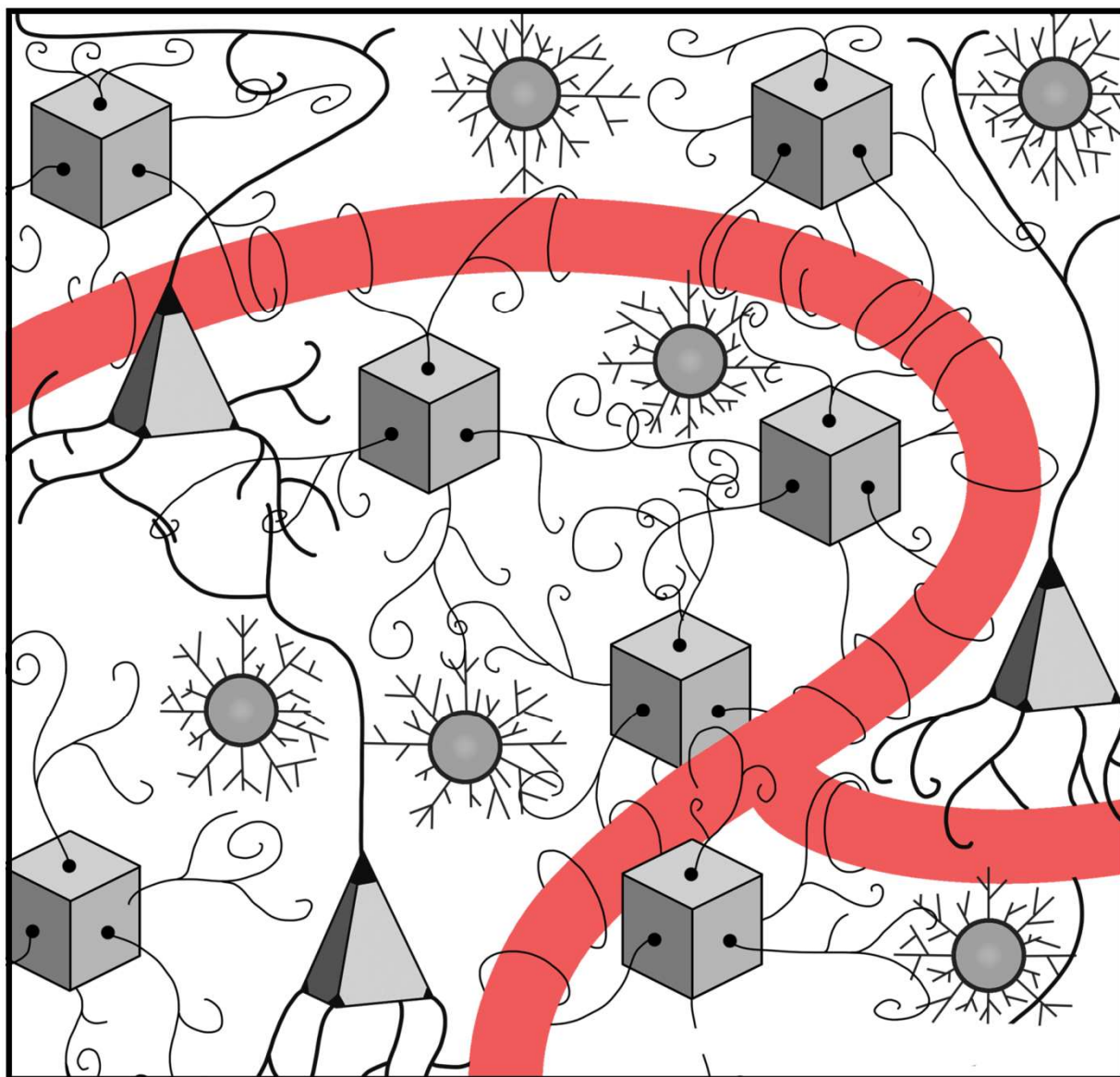
Buenos Aires, 2018

Alteraciones en el endotelio y la glía en el hipocampo del ratón PDAPP-J20, modelo de la Enfermedad de Alzheimer.

Interacción entre componentes de la unidad neurovascular.

Tesis Doctoral

Lic. Carlos J. Pomilio



Laboratorio de Neurobiología del Envejecimiento

Dra. Flavia E. Saravia
Directora

Dr. Juan Beauquis
Co-director

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

(Diciembre de 2018)

“Yo soy yo y mi circunstancia (...)”

- José Ortega y Gasset

Esta frase del filósofo español se aplica a muchas cosas. Se aplica a las neuronas, muchas de cuyas propiedades están definidas no por sus características intrínsecas sino por su interacción con otros tipos celulares. **Se aplica, también, a esta Tesis.**

Tuve la maravillosa oportunidad de realizar este trabajo (y mi Tesis de Licenciatura) en el Laboratorio de Neurobiología del Envejecimiento, bajo la dirección de Flavia. Es un orgullo para mí formar parte de un grupo que realmente funciona como una Unidad Neurovascular, que se sostiene gracias a las interacciones de todos sus miembros. Esta Tesis es, sin lugar a dudas, una propiedad emergente del trabajo de todos y cada uno de los que día a día compartieron conmigo mesadas y escritorios. A ellos, en primer lugar, les dedico este trabajo.

Empezando por Flavia, que sin lugar a dudas es como un astrocito protoplásmico. Con su enorme capacidad de mantener contacto día a día con el trabajo de cada uno, se encarga de mantener la homeostasis del laboratorio. Con paciencia y dedicación ha estado aportando a mi formación durante más de 7 años, confió en mí cuando solo sabía unas pocas cosas y tenía muchas ganas de aprender. También me enseñó de primera mano que para hacer ciencia hace falta tiempo, insumos y equipamiento, pero sobre todo **gente que ame lo que hace**. Por su constante apoyo e inspiración para seguir creciendo, su nombre en la portada de esta Tesis lejos de ser una mera formalidad es la manifestación de que elegí (y seguiría eligiendo) trabajar con ella.

En estos 7 años de trabajo conté con el apoyo constante de Juan. Como co-director, ha tenido la capacidad de marcarme errores y hacer sugerencias, buscando siempre la forma de no perder su lugar como compañero de aventuras. Sesiones interminables de vuelo científico (entusiasmándonos con experimentos que quién sabe si algún día podremos realizar), experiencias compartidas o simplemente palabras de apoyo en el momento necesario son todos elementos que hacen que el trabajo cotidiano tenga sin dudas un mejor sabor.

Durante todos estos años, casi todas las mañanas me levanto para ir al mismo lugar, hacer más o menos las mismas cosas y ver a la misma gente. Y sin embargo, cada día me levanto con las mismas ganas que el primer día. Y Angie es en gran parte responsable de esto. Casi inmediatamente se convirtió en una mucho más que una compañera de trabajo: es una gran amiga. Su apoyo constante, sus consejos, las miradas cómplices y las interminables charlas sobre la vida y la ciencia son, para mí, reactivos indispensables sin los cuales ningún experimento de esta Tesis hubiera salido bien.

Algunas células de esta Unidad Neurovascular se diferenciaron más recientemente, pero son casi tan importantes como el resto. Jessi, en gran parte, me enseñó a enseñar. Jugamos juntos a hacer ciencia, y me permitió tener el honor de enseñarle algunas de las cosas que ahora hace con maestría. Ir junto a ella trabajando cercanamente, como astrocito y célula endotelial, para sumergirnos en el fascinante mundo de la vasculatura cerebral, es uno de los placeres de trabajar en equipo. Y Amal, siempre tan dispuesto a trabajar en equipo, es la mano detrás de muchas de las cosas que salen bien. Siempre presente para ayudar, su interés por compartir su trabajo y ser parte del de todos los demás es contagioso.

Los límites que definen a un equipo a veces son difusos y arbitrarios. Sería injusto de mi parte no cruzar la puerta del laboratorio y recorrer unos pocos metros para agradecerle a Mónica Kotler y su grupo, que con tanta buena onda y respeto mutuo se sumaron a muchísimas aventuras científicas que les hemos propuesto. A Roxy y Sole, con quienes iniciar una charla sobre ciencia u otro tema implica sumergirse en un mundo tan divertido que es difícil querer salir. A Edu Cánepa por sus consejos y por estar siempre presente durante mi doctorado, como consejero de estudios; y también a su grupo por la ayuda en numerosos experimentos.

Pero como un astrocito con sus múltiples dominios, nosotros tenemos un dominio aparte en el IByME. Allí, Mónica Frungieri y “Las chicas de Moni” (Euge, Sole y Juja) se han convertido en más que nuestros vecinas: son verdaderas “roommates” de laboratorio, con quienes compartimos almuerzos, charlas, reactivos y protocolos. Sobre todo, quiero agradecerle a Euge, siempre tan dispuesta a ayudarnos con una humildad y dedicación que pocas personas podrían tener.

Como un larguísimo axón, el nuestro cruza la frontera y llega hasta San Antonio, (Texas) donde Verónica Galván me abrió las puertas de su laboratorio, y apostó sus recursos por este becario tercermundista, dándome acceso a tecnologías e insumos que no podría haber tenido aquí. Gracias a ella por su confianza y su buena onda.

Así como un cerebro no puede ser entendido fuera del contexto del organismo completo, las circunstancias que definen a esta Tesis no son solamente científicas. El amor de tanta gente ha sido un combustible esencial –como la sangre que bombea el corazón– para que esta Tesis se cristalice.

A toda mi familia, que es una gran fuente de cariño y un sostén esencial para todo lo que hago. Sobre todo, a mi mamá y mi papá, que siempre confiaron en mí y fueron los primeros en apoyarme en absolutamente todas mis circunstancias de la vida, aún cuando cueste entenderlas. Ellos, junto a mis hermanos, me enseñaron que a veces es más importante decir primero “Acá estoy” y después preguntar qué está pasando. Toda mi familia fue la que me acompañó durante el camino para llegar finalmente a poder hacer mi doctorado, y empezar a volar solo. Por ello merecen mucho más que una simple dedicatoria.

A Victor, cuya compañía a mi lado nació casi al mismo tiempo que el doctorado. En estos 5 años tuvo que sufrir mi ansiedad cuando se acercaban fechas importantes, mi entusiasmo cuando planeaba nuevos trabajos y mi decepción cuando un experimento no salía. Siempre me hizo sentir acompañado y querido, receptor de una gran paciencia que a veces dudo merecer. En esta última parte, su amor me acompañó prácticamente todos los días, y su compañía es como el lactato que toda neurona necesita para decir “Ok, este organismo está funcionando”. Su apoyo constante y su compañía merecen no solamente esta dedicatoria, sino todo mi amor.

Mis amigos (tanto los que forman parte de este Sistema Nervioso como los de la periferia) son un estímulo tónico (y a veces fásico) para seguir haciendo las cosas que hago. A Alejo, el primer amigo con quien pude realmente tener reflexiones sobre la ciencia cuando éramos chicos, y sin embargo jamás imaginamos que eso nos iba a llevar a compartir juntos un camino que duraría tantos años, acompañándonos con cariño mutuo en los buenos y malos momentos. A Ailin y Carito, regalos inigualables que me dejó mi paso por la facultad. A Olivia y Chimón, que realmente hacen un esfuerzo gigante por entender lo que digo cuando me entusiasmo y hablo de ciencia; un esfuerzo que solo puede justificarse por el gran cariño que representan tantos años de amistad.

Finalmente, quiero agradecer a la Universidad de Buenos Aires y a la universidad pública en general, que siendo un simple joven de clase media me permitió acceder a una formación de primera clase. A toda la gente del Departamento de Química Biológica y del IByME por abrirme las puertas al mundo de la investigación. Al CONICET, la UBA y el programa BecAR por haberme apoyado en mis emprendimientos profesionales.

Todos ellos son parte de mi circunstancia. Yo soy yo más todos ellos.

A todos ellos, les dedico esta Tesis.

ÍNDICE

Resumen	Pág. 1
Abstract	Pág. 2
Publicaciones	Pág. 3
Abreviaturas	Pág. 4
Capítulo 1: Introducción	Pág. 5
1. El envejecimiento cerebral	Pág. 6
2. Enfermedades neurodegenerativas	Pág. 9
3. La enfermedad de Alzheimer	Pág. 11
4. Histopatología de la enfermedad de Alzheimer	Pág. 13
5. El Hipocampo y la enfermedad de Alzheimer	Pág. 18
6. La Unidad Neurovascular	Pág. 22
7. La neuroinflamación como contexto patológico	Pág. 28
8. La autofagia y sus alteraciones	Pág. 33
9. Modelos animales de la enfermedad de Alzheimer	Pág. 40
10. Tratamientos actuales y horizonte terapéutico	Pág. 45
Capítulo 2: Objetivos Generales	Pág. 49
Capítulo 3: Microglía	Pág. 52
1. Introducción	Pág. 53
2. Objetivos e hipótesis	Pág. 60
3. Resultados	Pág. 61
4. Discusión	Pág. 81
Capítulo 4: Astrogliá	Pág. 88
1. Introducción	Pág. 89
2. Objetivos e hipótesis	Pág. 98
3. Resultados	Pág. 99
4. Discusión	Pág. 110
Capítulo 5: Vasculatura Cerebral	Pág. 116
1. Introducción	Pág. 117
2. Objetivos e hipótesis	Pág. 127
3. Resultados	Pág. 128
4. Discusión	Pág. 143
Capítulo 6: Interacción Glía-Endotelio	Pág. 152
1. Introducción	Pág. 153
2. Objetivos e hipótesis	Pág. 160
3. Resultados	Pág. 161
4. Discusión	Pág. 170
Capítulo 7: Discusión	Pág. 176
1. Alcances y limitaciones del modelo experimental	Pág. 178
2. Activación glial y neuroinflamación	Pág. 182
3. Rol de la autofagia glial	Pág. 184
4. Alteraciones vasculares en la enfermedad de Alzheimer	Pág. 188
Capítulo 8: Materiales y Métodos	Pág. 192
1. Experimentos <i>in vivo</i>	Pág. 193
2. Experimentos <i>in vitro</i>	Pág. 207
3. Análisis estadístico	Pág. 213
Capítulo 9: Bibliografía	Pág. 215

Alteraciones en el endotelio y la glía en el hipocampo del ratón transgénico PDAPP, modelo de la Enfermedad de Alzheimer. Interacción entre componentes de la unidad neurovascular.

La Enfermedad de Alzheimer es la forma más frecuente de demencia en la adultez. Su prevalencia se encuentra en franco aumento a nivel mundial, y dada la ausencia de un tratamiento eficiente se proyecta como uno de los grandes desafíos en el campo de la salud con injerencia social y económica para las sociedades modernas. Se caracteriza por la presencia de depósitos extracelulares de péptidos amiloides en el parenquima cerebral y agregados intraneuronales de proteína Tau hiperfosforilada. Además, se hace evidente un cuadro de neuroinflamación crónica, disregulación de la autofagia neuronal y daño vascular. En este sentido, el estudio integrado de neuronas, células gliales y vasculares –constituyentes de la unidad neurovascular- ha cobrado relevancia en los últimos años. En esta Tesis se planteó como principal objetivo estudiar el rol de las células microgliales, astrogliales y endoteliales –así como la interacción entre ellas- durante la instalación del cuadro neuroinflamatorio en etapas tempranas de la patología. Asimismo, se evaluó en etapas avanzadas si el sistema degradativo por autofagia se encontraba afectado en estas células no-neuronales. Para ello se empleó la cepa de ratones transgénicos PDAPP-J20, modelo animal ampliamente validado en la bibliografía, y modelos *in vitro* de la patología empleando los tipos celulares mencionados.

En etapas tempranas de la enfermedad –antes de la presencia de depósitos amiloides- los ratones PDAPP-J20 presentan activación en la microglía y astroglia en el hipocampo. Sin embargo, la vasculatura no evidencia alteraciones ni en su morfología ni en su densidad. En etapas avanzadas, en cambio, la vasculatura cerebral presenta signos de atrofia y eventos detectables de daño vascular. Las células de la microglía y astroglia exhiben una evidente hipertrofia de su soma en la cercanía a placas amiloides, lo cual se asocia en parte a la acumulación de proteínas involucradas en el proceso de autofagia. En este sentido, en este trabajo de Tesis aporta evidencia original acerca del flujo autofagico en las células astrogliales en la cercanía de placas amiloides. Las células de la microglía, por su parte, presentan un impedimento en el flujo autofágico durante la estimulación crónica con péptidos amiloides fibrilizados y en el hipocampo de ratones PDAPP-J20.

Por otro lado, la comunicación entre células astrogliales y endoteliales se vió afectada por el proceso de envejecimiento en este modelo animal. Los estudios realizados en *sistemas in vitro* demostraron que las células endoteliales son capaces de responder directamente a péptidos amiloides, pero también indirectamente a través de factores solubles liberados por microglía y astroglia que actuarían a través del receptor de moléculas asociadas al daño RAGE. Finalmente, el análisis por espectrometría de masa de la fracción proteica obtenida a partir de una muestra enriquecida en microvasculatura cerebral evidenció que los sistemas de metabolismo de ARN (principalmente la traducción y el splicing) se encuentran especialmente alterados en células vasculares durante etapas avanzadas de la patología.

En su conjunto, estos resultados sugieren que hay claros indicios de instalación de un cuadro neuroinflamatorio en una etapa temprana de la patología, que contribuye a la progresiva disfunción de la Unidad Neurovascular. En etapas avanzadas, alteraciones en la autofagia astrogliar y microglial así como en los sistemas metabólicos básicos de las células endoteliales sugieren un cuadro de pérdida de homeostasis que probablemente promueva la exacerbación del proceso patológico.

Palabras Clave

Enfermedad de Alzheimer – Unidad Neurovascular – Autofagia – Glía – Neuroinflamación

Alterations in endothelial and glial cells on the hippocampus of PDAPP mice, transgenic model of Alzheimer's Disease. Interaction between components of the neurovascular unit.

Alzheimer's disease (AD) is the most frequent form of dementia in the elderly. Its prevalence is rising worldwide, and the absence of an effective treatment makes it an important economical and social challenge. It is characterized by the presence of extracellular aggregates of amyloid peptides and intracellular accumulation of hyperphosphorylated Tau. There is also an evident context of chronic neuroinflammation, dysregulation of neuronal autophagy and vascular damage. Considering all these hallmarks, there has been a marked interest in the integrated study of neurons, glial and endothelial cells, all of them components of the neurovascular unit. The aim of this Thesis was to study the role of astroglial, microglial and endothelial cells –and the interaction among these cells– during the potential neuroinflammatory context at the early stages of the disease. This Thesis is also focused on the possible alterations of the autophagy process in non-neuronal cells during advanced stages. To achieve these goals, PDAPP-J20 mice were studied as a validated animal model of Alzheimer's Disease, and *in vitro* models were used for evaluating potentially involved cellular and molecular pathways.

During early stages of the pathology –characterized by the absence of amyloid deposits– PDAPP-J20 mice exhibited morphological signs of astroglial and microglial activation in their hippocampus. However, no alterations were found neither in vascular morphology nor in vascular density. On the other hand, during advanced stages of the neurodegenerative process, hippocampal vasculature showed signs of atrophy and damage. Astroglial and microglial cells surrounding amyloid deposits showed morphological hypertrophied, which was associated with the accumulation of proteins involved in the autophagy process. Specifically, this Thesis contains one of the earliest reports indicating that astroglial cells are able to modulate autophagy in the context of amyloid pathology. Moreover, microglial cells showed an impaired autophagic flux during the chronic stimulation with amyloid fibrils in the hippocampus of PDAPP-J20 mice.

On the other hand, communication between glial and endothelial cells was affected during physiological aging in this animal model. Experiments using *in vitro* systems indicated that endothelial cells can be activated directly by amyloid peptides, but also indirectly by soluble factors released by microglial and astroglial cells. These factors acted through the activation of the receptor for damage-associated molecules, RAGE. Finally, mass spectrometry analysis was performed on the protein fraction obtained from brain samples enriched in cerebral microvasculature. This analysis indicated that RNA metabolism systems (mainly translation and splicing) were specifically altered in vascular cells during advanced stages of the disease.

Taken together, these results provide evidence of the early initiation of the neuroinflammatory process by the activation of microglial and astroglial cells in the absence of amyloid deposits. During advanced stages of the pathological process, impaired glial autophagy and alterations of the basic metabolic systems of endothelial cells could be important actors at the loss-of-homeostasis scenario.

Keywords

Alzheimer's Disease – Neurovascular Unit – Autophagy – Glia – Neuroinflammation

Los artículos que se indican a continuación fueron publicados a partir de resultados presentados en esta Tesis, o bien de otros que exceden los objetivos de la misma pero que se han obtenidos en el marco del Doctorado, de actividades académicas o de colaboraciones con otros grupos de investigación.

- Beauquis J, Pavía P, **Pomilio C**, Vinuesa A, Podlutska N, Galván V, Saravia F (2013). *Environmental enrichment prevents astroglial pathological changes in the hippocampus of APP transgenic mice, model of Alzheimer's disease*. Experimental Neurology 239:28-37.
- Beauquis J, Vinuesa A, **Pomilio C**, Pavía P, Galván V, Saravia F. *Neuronal and glial alterations, increased anxiety and cognitive impairment before hippocampal amyloid deposition in PDAPP mice, model of Alzheimer's disease* (2014). Hippocampus 24:257-269
- Beauquis J, Vinuesa A, **Pomilio C**, Pavía P, Saravia F. *Alteraciones hipocámpales y cambios cognitivos preceden al depósito de placas amiloides en un modelo de la Enfermedad de Alzheimer* (2014). Revista Medicina 74(4):282-286
- Gorojod R, Alaimo A, Porte Alcón S, **Pomilio C**, Saravia F, Kotler M. *The autophagic-lysosomal pathway determines the fate of glial cells under manganese-induced oxidative stress conditions*. (2015) Free radical Biology and Medicine 87:237-251
- **Pomilio C**, Pavia P, Gorojod R, Vinuesa A, Alaimo A, Galván V, Kotler M, Beauquis J, Saravia F. *Glial alterations from early to late stages in a model of Alzheimer's Disease: evidence of autophagy involvement in A β internalization* (2016). Hippocampus 26(2): 194-210
- Vinuesa A, **Pomilio C**, Menafrá M, Bonaventura MM, Garay L, Mercogliano MF, Schillaci R, Lux Lantos V, Brites F, Beauquis J, Saravia F. *Juvenil exposure to a high fat diet promotes behavioral and limbic alterations in the absence of obesity*. (2016) Psychoneuroendocrinology 72:22-33.
- Scotti L, Di Pietro M, Pascuali N, Irusta G, de Zúñiga 1st, Gomez Peña M, **Pomilio C**, Saravia F, Tesone M, Abramovich D, Parborell F. *Sphingosine-1-phosphate restores endothelial barrier integrity in ovarian hyperstimulation syndrome*. Mol Hum Reprod (2016). Mol Hum Reprod 12:852-866
- **Pomilio C**, Miño M, Brignone N, García Facal G, Telesnicki M, Fass M, Filloy J, Cueto G, Fernandez MS, Perez A. *Análisis de las actividades de estadística descriptiva en libros de educación media: ¿qué se pretende que los estudiantes aprendan?* Educ Matem Pesq (2016) 18:1345-1364.
- Vinuesa A, Bentivegna M, Calfa G, Filipello F, **Pomilio C**, Bonaventura M, Lux V, Matzkin ME, Gregosa A, Presa J, Matteoli M, Beauquis J, Saravia F. *Early exposure to a high fat diet impacts on hippocampal plasticity. Implication of microglia-derived exosome-like extracellular vesicles*. Molecular Neurobiology (2018). En prensa.

Abreviaturas

A β = β -Amiloide (puede ser 1-40 o 1-42)

ApoE = Apolipoproteína E

APP = Proteína precursora de amiloide

BHE = Barrera hematoencefálica

DAM = Microglía asociada a daño

DAMPs = Patrones moleculares asociados a daño

EA = Enfermedad de Alzheimer

fA β = β -Amiloide fibrilar (puede ser 1-40 o 1-42)

GFAP = Proteína fibrilar ácida de la glía

mTOR = Mammalian Target of Rapamycin

PAMPs = Patrones moleculares asociados a patógenos

sA β = β -Amiloide soluble (puede ser 1-40 o 1-42)

SNC = Sistema nervioso central

UNV = Unidad neurovascular

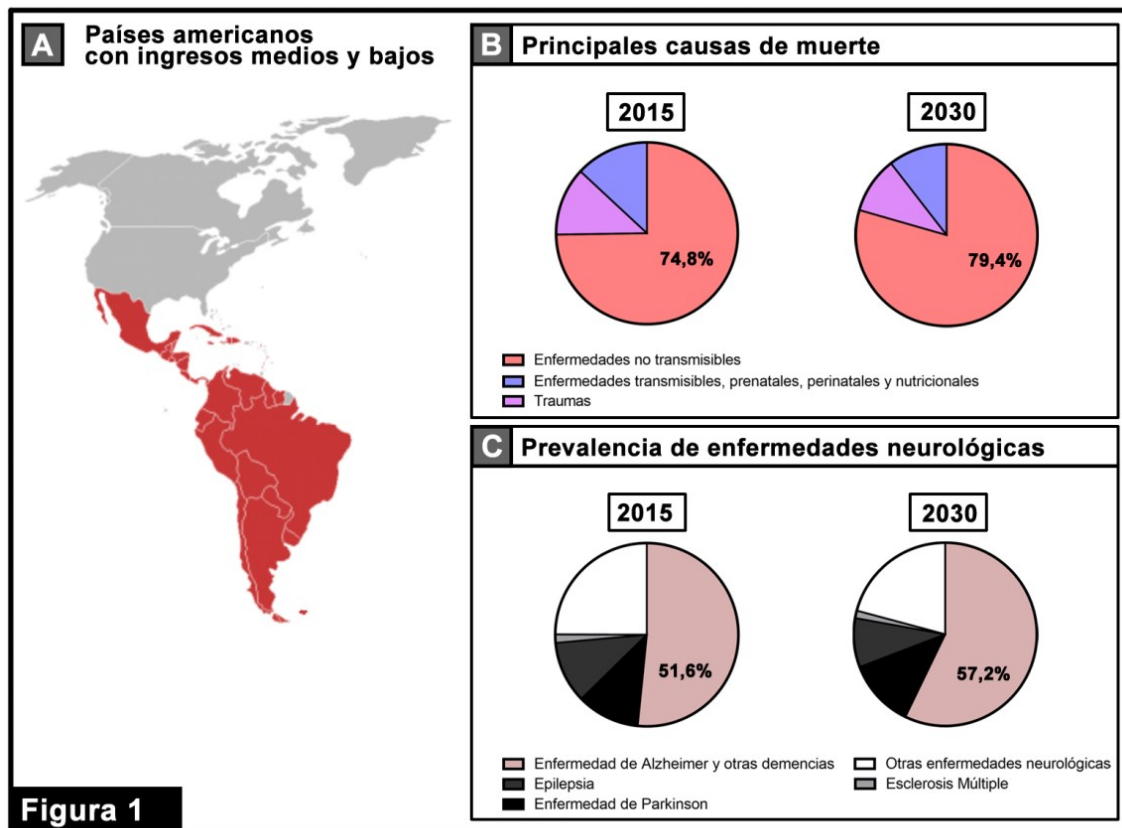
Cap. 1

Introducción

1. Envejecimiento Cerebral

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en pocos años es esperable que ocurra un hito particular en toda la historia registrada de la humanidad: que la población mundial mayor a 65 años sea superior en número a la población menor a 5 años. Para ilustrar este fenómeno, la OMS sostiene que en el año 2050 se espera que se duplique el porcentaje de la población representada por los mayores de 65 años de edad en comparación al año 2010. Esta proyección se basa en las estimaciones de una menor tasa de fertilidad y un aumento general de la expectativa de vida durante las últimas décadas (Organización Mundial de la Salud, 2018).

Este envejecimiento poblacional trae aparejados nuevos desafíos en los sistemas de salud. A modo de ejemplo, hacia finales del siglo XX, los principales desafíos sanitarios estaban relacionados a enfermedades infecciosas o debidas a parásitos, que afectaban fundamentalmente a niños en sus primeros años de vida. Sin embargo, en la actualidad las enfermedades más comunes son crónicas y no transmisibles, como patologías cardiovasculares, cáncer o diabetes. Entre los factores de riesgo para todas estas enfermedades se encuentran aspectos del estilo de vida, pero también la edad (Organización Mundial de la Salud, 2018). Las proyecciones hacia el año 2030 pronostican un aumento acelerado en la proporción de enfermedades crónicas y no transmisibles, que impactará porcentualmente con mayor peso en aquellos países con ingresos bajos o medios. Al considerar únicamente los países con ingresos medios y bajos del continente americano, la OMS prevé que para el año 2030 haya un aumento del 4,6% en las muertes producidas por enfermedades no transmisibles; y que dentro de las enfermedades neurológicas haya un aumento del 5,6% en la prevalencia de la Enfermedad de Alzheimer (EA) y otras demencias si se compara contra las estimaciones del año 2015 (Figura 1). Esta proyección se fundamenta en que una de las estructuras particularmente sensibles al envejecimiento es el Sistema Nervioso Central (SNC).



▲ **Proyección de causas de muerte y prevalencia de enfermedades neurológicas para el año 2030 en países americanos con ingresos medios y bajos.** En el Panel A se muestra un mapa del continente americano donde aparecen indicados en rojo aquellos países con ingresos medios y bajos según la clasificación actual del Banco Mundial. Sobre esta clasificación, la OMS en su último reporte al respecto, compara las causas de muerte (B) y prevalencia de diferentes tipos de enfermedades, entre ellas las neurológicas (C). Los gráficos fueron contruidos a partir de la información disponible en http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/projections/en/.

La demencia es un síndrome que se caracteriza por alteraciones en el lenguaje, en la memoria, en funciones motoras y en la resolución de problemas, además de impedimento en diversas funciones cognitivas que dificultan la realización de las actividades cotidianas de un individuo. Si bien en Argentina no se cuenta con estadísticas sólidas y actualizadas al respecto, en América Latina se estima que el 7,8% de las personas que tienen más de 60 años padece alguna forma de demencia. Se estima además que ese porcentaje aumentaría hasta un 27% a mediados de siglo. Debido a la saturación que experimentan los países latinoamericanos en sus sistemas de salud y a la falta de un diagnóstico certero en etapas tempranas, estos números van acompañados de elevados índices de mortalidad. La expectativa de sobrevivencia luego del diagnóstico varía entre 3 y 12 años, dependiendo del criterio de diagnóstico y la severidad. Para el caso de demencia avanzada, sin embargo, se estima que el

54,8% de los pacientes en América Latina fallecen antes de los 18 meses posteriores al diagnóstico (Custodio, Wheelock, Thumala, & Slachevsky, 2017).

Aún en ausencia de demencia, los cambios cognitivos que se experimentan durante el proceso de envejecimiento fisiológico en ciertos dominios específicos van acompañados de alteraciones a nivel molecular y celular en los componentes del SNC y sus interacciones. Las neuronas y las células gliales son algunos de los tipos celulares que constituyen el SNC, y experimentan alteraciones con la edad. En el contexto de la investigación básica sobre el proceso de envejecimiento fisiológico, las neuronas han sido particularmente estudiadas por ser uno de los actores obligados de todas las sinapsis presentes en el SNC. Sin embargo, no existen evidencias claras que puedan asociar a los cambios cognitivos vinculados al envejecimiento con un menor número de neuronas en las diferentes regiones del cerebro (Burke & Barnes, 2006). Sobre el estudio de este tipo celular, se han podido determinar alteraciones morfológicas sutiles en la arborización y cambios en el patrón de expresión génica debido al envejecimiento, que no llevan a la muerte neuronal (Burke & Barnes, 2006). Las células gliales, en cambio, sí pueden mostrar una disminución en número, evidenciar signos de senescencia celular (Xia, Jiang, McDermott, & Han, 2018) y presentar además un fenotipo de hiperreactividad glial, típico de la respuesta inflamatoria que se dispara en diferentes patologías asociadas al SNC (Xia et al., 2018).

Tanto la glía como las neuronas son células altamente diferenciadas. Excepto en determinadas circunstancias, estas células sobreviven luego del desarrollo como componentes del tejido cerebral y no se dividen (Rusznak, Henskens, Schofield, Kim, & Fu, 2016). Esta condición las vuelve particularmente susceptibles a cualquier tipo de estrés celular que pueda producir daño por efectos acumulativos, como el estrés oxidativo, el estrés por la presencia de proteínas mal plegadas, entre otros. En toda célula altamente diferenciada y longeva, su correcta funcionalidad depende estrictamente del mantenimiento de su proteostasis; es decir, de la homeostasis proteica. Los sistemas de degradación de proteínas que participan de la proteostasis (como la vía ubiquitina-proteasoma y la autofágica-lisosomal) decaen con la edad en prácticamente todos los tipos celulares estudiados. Más aún, se ha asociado a aquellas especies que viven más tiempo con una mayor capacidad de sostenimiento de sus mecanismos de degradación de proteínas, generando una correlación positiva entre la expectativa de vida de una especie y la estabilidad de su proteoma (Kaushik & Cuervo, 2015; Labbadia & Morimoto, 2014; Treaster et al., 2014).

El mantenimiento de la proteostasis puede ser uno de los elementos clave a tener en cuenta cuando se estudia la frontera entre el envejecimiento fisiológico y el patológico, ya que numerosas enfermedades neurodegenerativas que tienen como sustrato un cerebro envejecido son, en parte, proteinopatías. En diversas patologías neurológicas asociadas al envejecimiento como la EA, el mal de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica se distingue como signo común la presencia de agregados proteicos en el tejido cerebral (Morawe, Hiebel, Kern, & Behl, 2012).

2. Enfermedades Neurodegenerativas

Algunas formas de demencia pueden desencadenarse luego de eventos de depresión profunda o como efecto adverso de ciertos medicamentos; sin embargo, esos casos suelen ser tratables y reversibles. Entre las causas irreversibles de demencia se encuentran las enfermedades neurodegenerativas, como la EA, que se definen por la pérdida progresiva y continua de sinapsis y de neuronas. Estas enfermedades son diversas en cuanto a sus manifestaciones clínicas. Algunas son causales de impedimento cognitivo, mientras que otras afectan principalmente a las funciones motoras. Todas estas enfermedades conllevan un importante costo económico y social, y la prevalencia de la mayoría de ellas se encuentra en franco aumento. La comprensión de las causas y mecanismos asociados a cada enfermedad cobra relevancia dada la necesidad de unir esfuerzos y conocimiento para la generación de nuevos tratamientos (Gitler, Dhillon, & Shorter, 2017).

En general, la mayoría de estas patologías comparten la característica de presentar agregados de ciertos tipos específicos de proteínas, estrés proteotóxico, estrés oxidativo, apoptosis neuronal y neuroinflamación. Además, es frecuente que las mismas no se manifiesten de manera exclusiva, sino que pueden estar presentes de forma combinada, generando patologías con rasgos mixtos (Dugger & Dickson, 2017). La mayoría de estas enfermedades comparten la presencia de un contexto neuroinflamatorio crónico que potencia la neurodegeneración. La esclerosis múltiple, particularmente, se trata de una enfermedad autoinmune donde la activación de la respuesta neuroinflamatoria se encuentra entre los fenómenos que hacen a la fisiopatología de la enfermedad (Baecher-Allan, Kaskow, & Weiner, 2018).

Entre las enfermedades neurodegenerativas, las más comunes son proteinopatías, como las amiloidosis, las tauopatías, las α -sinucleinopatías y las enfermedades asociadas a TDP-43 (Dugger & Dickson, 2017), caracterizadas por la presencia de agregados de proteínas específicas.

La amiloidosis se define por la presencia de agregados de proteínas amiloides. Los amiloides son proteínas ricas en hojas plegadas β en sus estructuras secundarias, lo cual les confiere la capacidad de agregarse formando fibrillas insolubles de alto peso molecular (Westermarck et al., 2005). La amiloidosis más frecuente está asociada a la EA y la proteína involucrada se denomina β -Amiloide ($A\beta$). Por otro lado, la amiloidosis también está presente en la enfermedad priónica, caracterizada por agregados de PrP, aunque su prevalencia sea considerablemente menor que en el caso de la EA (Goldfarb et al., 1991; M. O. Kim, Takada, Wong, Forner, & Geschwind, 2018).

Las tauopatías se caracterizan por la acumulación patológica de proteína Tau dentro de neuronas y/o células gliales. Por lo general su capacidad de agregación está asociada a modificaciones postraduccionales, como hiperfosforilación, ubiquitinización, nitración, glicosilación y acetilación. Son ejemplos de tauopatías la parálisis supranuclear progresiva, la encefalopatía traumática crónica, la degeneración corticobasal y la enfermedad de Pick. Además, se definen como tauopatías secundarias a aquellas en las cuales la agregación de Tau ocurre como evento secundario a una causa patológica preexistente, como en el caso de la EA (Kovacs, 2015).

Las α -sinucleinopatías, por su parte, presentan agregados de la proteína pre-sináptica α -sinucleína mayormente en glía y neuronas. Se trata de un péptido de 140 aminoácidos al que se le atribuye participación en el tráfico de vesículas sinápticas (Sudhof & Rizo, 2011). Se ha demostrado que esta proteína es el principal constituyente de los cuerpos de Lewy (Spillantini & Goedert, 1998), los cuales son inclusiones intraneuronales presentes en patologías como la enfermedad de Parkinson y la demencia con cuerpos de Lewy (Dugger & Dickson, 2017). Además, otros tipos de agregados de α -sinucleína han sido descritos en células gliales en el Síndrome de Shy-Drager (Lantos, 1998).

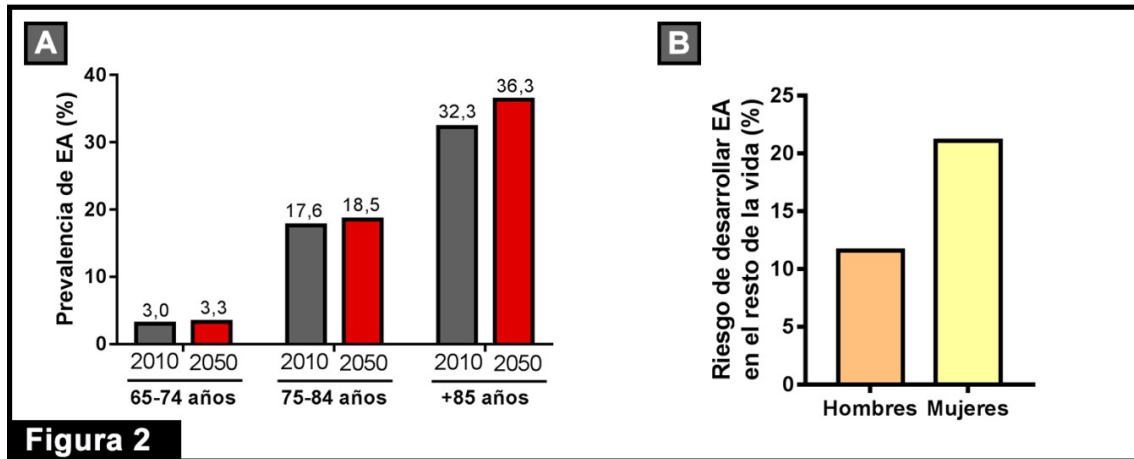
Finalmente, TDP-43 es una proteína que interviene en la represión transcripcional, modulación del *splicing*, metabolismo del ARN y formación de gránulos de estrés (Ratti & Buratti, 2016). En condiciones fisiológicas presenta localización nuclear. Sin embargo, en condiciones patológicas constituye cuerpos de inclusión en el citoplasma, núcleo y procesos celulares en neuronas. Este tipo de eventos patológicos son

característicos de la esclerosis lateral amiotrófica y la degeneración lobular frontotemporal (Neumann et al., 2006).

3. La Enfermedad de Alzheimer

La EA fue descrita por primera vez por el neurólogo y psiquiatra alemán Alois Alzheimer en el año 1906 (Jellinger, 2006). Sin embargo, su estudio ha despertado un gran interés en los últimos 30 años, conforme su prevalencia ha ido aumentando.

La EA es la forma más prevalente de demencia ya que explica entre el 60% y el 80% de los casos a nivel mundial. Las alteraciones que son propias de la EA y otras formas de demencias generan un impacto humano y económico considerable en las sociedades modernas. En Estados Unidos, se estima que el gasto destinado durante el año 2018 por diversos motivos a la atención de estos pacientes ha sido cercano a los 227 mil millones de dólares. Para el caso de Estados Unidos, la prevalencia de la EA para la población entre 65 y 74 años es del 3%, y este número se vuelve 5,87 veces mayor al considerar el rango de edad entre 74 y 85 años. La prevalencia va aumentando a medida que se consideran rangos de edad más avanzados, ya que es el principal factor de riesgo para esta patología (Figura 2A). Respecto del género biológico, existe una mayor probabilidad de desarrollar EA por parte de las mujeres si se compara con hombres de su mismo rango etario (Figura 2B) (Alzheimer's association, 2018). Estas diferencias asociadas al género biológico han sido atribuidas a diferentes causas, entre ellas a la disminución de estrógenos que se experimenta durante la menopausia. Sin embargo, este punto permanece en discusión, ya que para otros tipos de demencias los hombres tienen un mayor riesgo relativo que las mujeres (Nebel et al., 2018).



▲ **La edad y el género como factores de riesgo asociados a la EA.** La edad es el principal factor de riesgo para desarrollar EA, por lo tanto la prevalencia de esta patología aumenta drásticamente conforme se consideran rangos etarios mayores. Además, al proyectarse un aumento en la expectativa de vida hacia el año 2050 lo cual explicaría parte de un proceso de envejecimiento poblacional, se espera un aumento en la prevalencia de la EA para cada rango etario (A). Asimismo, las mujeres tienen un mayor riesgo para padecer EA que hombres de su misma edad cuando se comparan sujetos de 65 años (B). Estas estadísticas son válidas para la población de Estados Unidos y fueron obtenidas del censo poblacional del año 2010. Los datos estadísticos y las proyecciones fueron publicadas por la Alzheimer's Association (Alzheimer's Association, 2018).

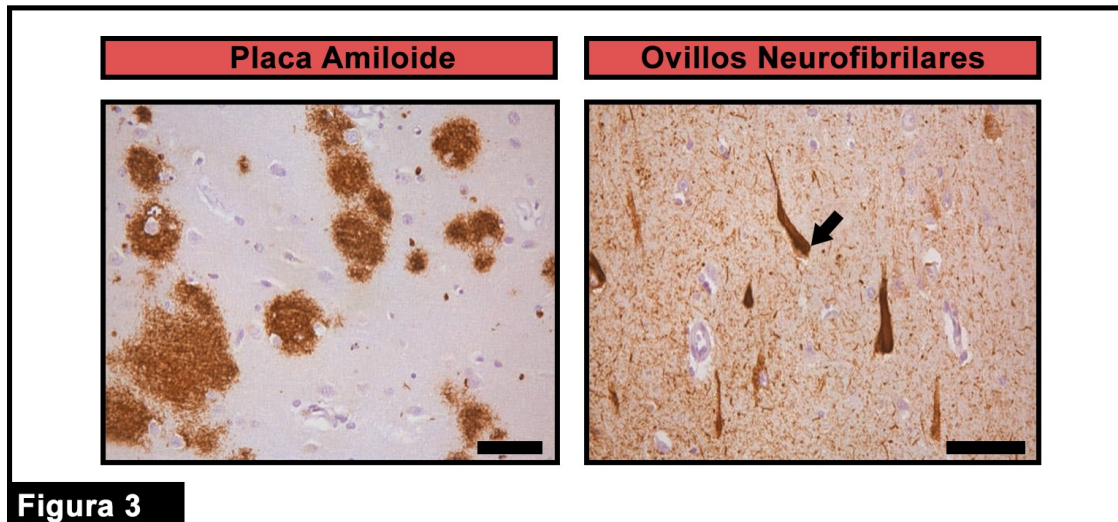
Se definen dos formas para la EA. En la forma familiar, los pacientes portan mutaciones específicas en el gen de la Proteína Precursora de Amiloide (APP, por las siglas en inglés de *Amyloid Precursor Protein*), o de las enzimas encargadas de su procesamiento. Estas mutaciones están caracterizadas y tienen una penetrancia del 100%. Aquellos pacientes que la portan desarrollan los síntomas antes de los 65 años, típicamente alrededor de los 40 años de edad. Sin embargo, según diferentes estimaciones esta forma de EA corresponde aproximadamente al 1-5% de los casos totales (Goldman et al., 2011). El resto corresponde a casos de EA esporádica. En esta otra forma de la enfermedad (la más prevalente) los síntomas se evidencian en edades más tardías y no existe una única causa asociada a los eventos patológicos. En el caso de la EA esporádica sólo se definen una serie de factores de riesgo que epidemiológicamente explican parte de su prevalencia.

Los factores de riesgo para la EA pueden ser modificables y no modificables. Entre los no modificables, el principal es la edad. Además, ciertos polimorfismos génicos pueden aumentar la posibilidad de padecerla. Por ejemplo, la presencia del alelo $\epsilon 4$ para el gen de la Apolipoproteína E (ApoE) puede causar un aumento de la probabilidad de padecer EA en 3,9 o 14,2 veces según se encuentre en heterocigosis u homocigosis respectivamente. La frecuencia de este alelo en la población mundial es del 10,4% (C. C. Liu, Liu, Kanekiyo, Xu, & Bu, 2013).

Entre los factores de riesgo modificables se encuentran aquellos relacionados con la calidad de vida, y también pueden explicar parte del aumento de los casos de EA en las últimas décadas. Particularmente, todos los factores de riesgo asociados a enfermedades cardiovasculares (sedentarismo, obesidad, antecedente de enfermedades metabólicas) y la presencia misma de enfermedades cardiovasculares y metabólicas producen un aumento considerable en la probabilidad de desarrollar EA en la adultez. El estudio de estos factores de riesgo sugiere que durante la instalación del proceso patológico que se desarrolla en el cerebro con EA, no es ajeno el estado general del organismo, particularmente su estado metabólico y la integridad de la vasculatura cerebral (Sagare, Bell, & Zlokovic, 2012; Viggars et al., 2011; B.V. Zlokovic, 2008)

4. Histopatología de la Enfermedad de Alzheimer

Existen actualmente diversas herramientas que permiten orientar a los médicos hacia el diagnóstico de la EA en pacientes. Pruebas de evaluación cognitiva, técnicas de neuroimágenes o la detección de ciertas proteínas en líquido cefalorraquídeo como biomarcadores son algunas de las técnicas que, con mayor o menor certeza, posibilitan el diagnóstico de los pacientes. Sin embargo, el único diagnóstico completamente certero se realiza *post-mortem*, tras la detección en el cerebro de los principales eventos histopatológicos que definen a la EA y la diferencian de otras formas de demencia. Tales eventos son la presencia de placas amiloides y ovillos neurofibrilares (Figura 3).



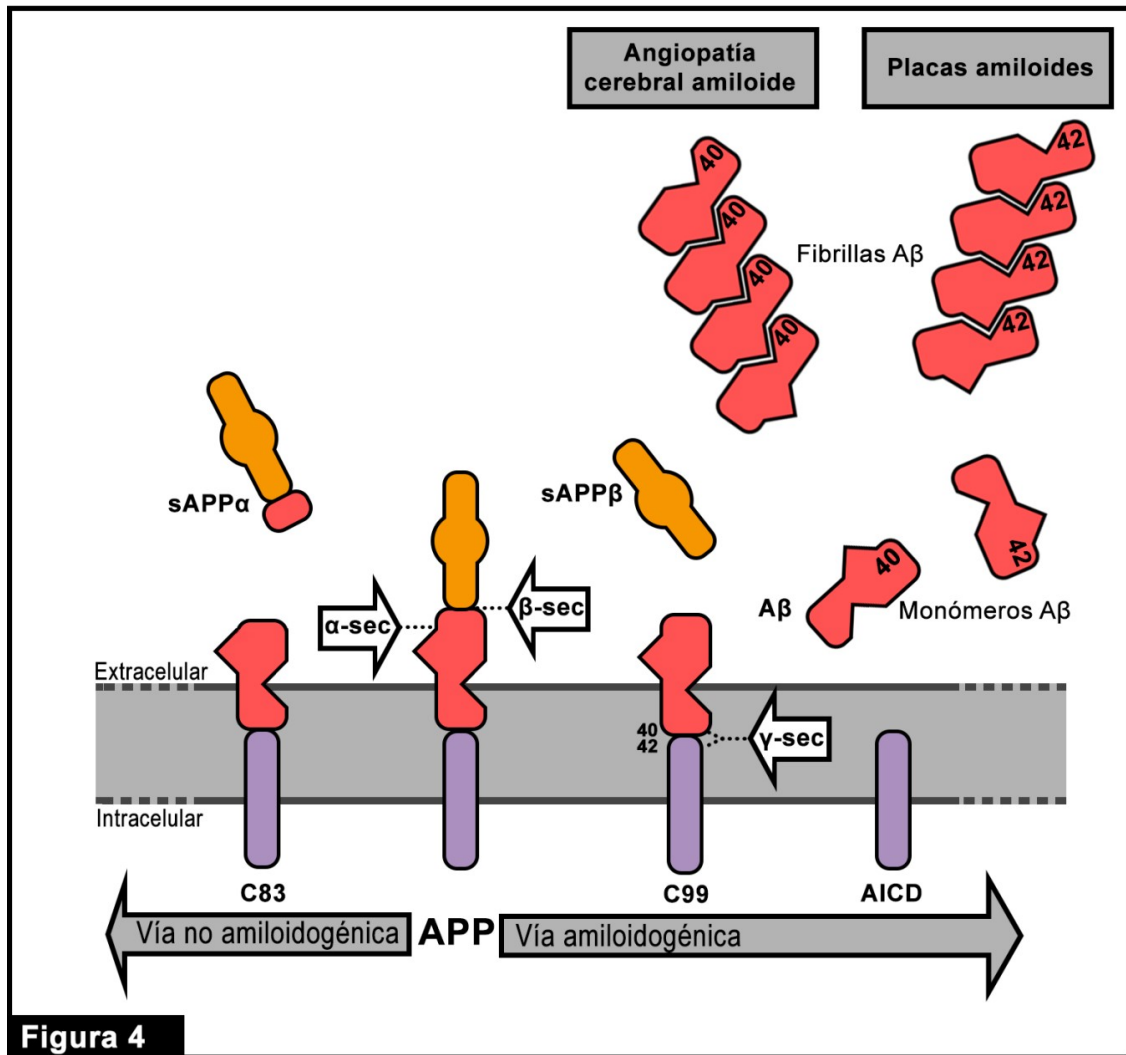
▲Eventos histopatológicos de la EA y formación de ovillos neurofibrilares. Imágenes representativas cortes de cerebro de pacientes con EA procesados para inmunohistoquímica contra A β (izquierda) y contra la proteína Tau hiperfosforilada (derecha). La flecha en la imagen de la derecha señala a un ovilloneurofibrilar. Las barras de escala corresponden a 100 μ m. Modificado a partir de la figura publicada por Aguzzi y colaboradores (Aguzzi & O'Connor, 2010).

Las placas amiloides son agregados proteicos extracelulares, que se depositan en el parénquima cerebral. Si bien su origen se encuentra en discusión y sus componentes pueden ser varios, están mayoritariamente compuestos por péptidos A β (Aguzzi & O'Connor, 2010).

Los péptidos A β derivan del procesamiento enzimático de APP, una proteína de un único paso transmembranal de 770 aminoácidos de longitud que se expresa mayoritariamente en las neuronas, de localización preferencialmente axonal, y que puede ser un sustrato proteolítico de ciertas secretasas. La función fisiológica de esta proteína aún no se ha establecido con precisión, pero existen indicios que demuestran que tendría un efecto positivo sobre el desarrollo y supervivencia neuronal, como se ha demostrado en roedores que sobreexpresan la versión *wild type* de APP. En el mismo sentido, la inyección de ARN de interferencia contra APP por electroporación en embriones de ratón produjo defectos en la migración neuronal (O'Brien & Wong, 2011; Young-Pearse et al., 2007). APP pertenece a una familia mayor de proteínas, denominados en inglés *Amyloid Precursor Protein-Like Proteins*, que se encuentran presentes desde invertebrados hasta vertebrados. Particularmente, el dominio intracelular (C-terminal) de esta proteína presenta alto grado de homología entre especies, y tanto su delección en el gen correspondiente de *Drosophila melanogaster* como su sobreexpresión en roedores producen alteraciones en el transporte axonal de vesículas (Goldstein, 2012; Gunawardena & Goldstein, 2001). El ectodominio N-

terminal se encuentra menos conservado entre especies, y posee varios sitios de unión a heparina, zinc y cobre (van der Kant & Goldstein, 2015).

De todas las proteínas que constituyen esta familia, solamente APP posee un dominio transmembranal que, al ser sustrato de diferentes secretasas, puede llevar a la formación de péptidos A β (O'Brien & Wong, 2011). El esquema de la Figura 4 muestra cómo el procesamiento enzimático de una única molécula de APP puede seguir dos vías mutuamente excluyentes: la vía amiloidogénica y la vía no-amiloidogénica. En el caso de la vía no-amiloidogénica, el producto de un único evento de clivaje por parte de la α -secretasa es el péptido soluble sAPP α y el fragmento de membrana C83, a los cuales se los ha asociado con funciones tróficas (Coronel et al., 2018). Particularmente, el fragmento soluble que contiene el dominio extracelular de APP puede interactuar con el receptor de neurotrofina p75 para estimular el crecimiento de neuritas, y estimular la proliferación de precursores neuronales en condiciones *in vitro* (Demars, Bartholomew, Strakova, & Lazarov, 2011; Hasebe et al., 2013). Por otro lado, APP puede ser procesada por la vía amiloidogénica, donde actúa como sustrato proteolítico de la β -secretasa y la γ -secretasa consecutivamente. El complejo γ -secretasa, que produce el extremo C-terminal de los péptidos A β , puede reconocer distintos sitios de clivado, generando fragmentos que pueden tener entre 30 y 51 aminoácidos de longitud. Sin embargo, las formas mayoritarias que tienen 40 o 42 aminoácidos, y se denominan respectivamente A β 1-40 y A β 1-42 (Olsson et al., 2014). Independientemente de su tamaño, los péptidos A β poseen un dominio de agregación priónico que les permite interactuar con otros péptidos A β formando oligómeros de peso molecular creciente. Estos oligómeros pueden permanecer solubles en el líquido intersticial aunque con una alta probabilidad de formar fibrillas amiloides, las cuales son insolubles y se depositan en el tejido. Estas fibrillas insolubles (que están en equilibrio con una fracción oligomérica soluble) son los principales constituyentes de las placas y otros tipos de depósitos amiloides que se observan en el cerebro de pacientes con EA (Coronel et al., 2018; Penke, Bogar, & Fulop, 2017).



▲ **Procesamiento enzimático de APP.** APP puede ser reconocida como sustrato para el clivaje proteolítico de diferentes enzimas. Al ser sustrato de la α -secretasa (α -sec) ingresa a la vía no amiloidogénica, de la cual se originan el péptido soluble sAPP α y el fragmento de membrana C83. Al ser sustrato de la β -secretasa (β -sec), APP ingresa a la vía amiloidogénica, de la cual se generan los intermediarios sAPP β y el fragmento de membrana C99, que actúa como sustrato de la γ -secretasa (γ -sec). De este último paso se obtienen el péptido de membrana AICD y péptidos A β . Estos péptidos A β pueden tener mayormente 40 o 42 aminoácidos de longitud según cuál sea la unión peptídica hidrolizada por la γ -secretasa.

Las fibrillas de A β actúan como centros de nucleación a partir de los cuáles oligómeros de diferente peso molecular se agregan rápidamente, generando placas amiloides que, en su conformación, son termodinámicamente muy estables. En las placas amiloides también se encuentran presentes otros componentes macromoleculares de naturaleza química diferente. Por ejemplo, suelen estar presentes otras proteínas, como las apolipoproteínas que presentan alta afinidad al A β , y moléculas lipídicas como el colesterol. También se han detectado en las placas amiloides ácidos nucleicos y glucosaminoglicanos (Stewart & Radford, 2017). Uno de los componentes

no proteicos mejor estudiados de las placas amiloides son los iones metálicos. La presencia de metales como Hierro, Cobre, Zinc y Magnesio ha sido estudiada por su capacidad neurotóxica, ya que facilitan la generación de especies reactivas del oxígeno, formación de poros en la membrana plasmática y desregulación de los canales iónicos (Casadesus et al., 2004; P. Wang & Wang, 2017).

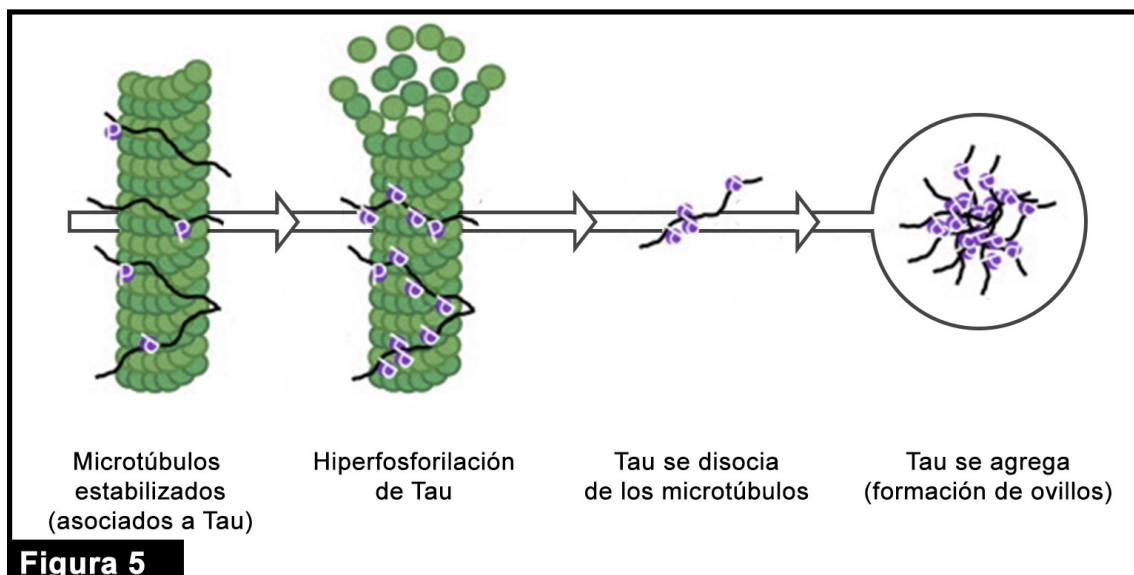
La naturaleza de las placas amiloides puede ser heterogénea; no sólo en cuanto a su composición sino también en cuanto a la arquitectura molecular de las fibrillas de A β . De hecho, la conformación tridimensional de las fibrillas insolubles puede variar entre individuos. Recientemente, Rasmussen y colaboradores han demostrado una asociación entre la heterogeneidad en la arquitectura molecular de las placas amiloides y la dispersión en la progresión de la patología entre diferentes sujetos (Rasmussen et al., 2017). Empleando técnicas de neuroimágenes con sondas que permiten distinguir entre diferentes tipos de conformaciones, demostraron que las placas amiloides se organizan en *clusters* del mismo tipo de agregación, y que el tipo de *clusters* varía entre sujetos que llegan a diferentes niveles de severidad para la EA. De esta manera, demostraron una asociación entre conformaciones estructurales de A β y severidad de la patología.

En el cerebro, la producción de A β a través de la vía amiloidogénica se compensa luego con su *clearance* o depurado. El depurado de A β puede ocurrir por diferentes vías, tales como la acción de enzimas proteolíticas, la internalización y degradación dentro del citoplasma de células gliales y la salida del tejido nervioso a través de los capilares sanguíneos (Xin, Tan, Cao, Yu, & Tan, 2018). Diferentes factores que afectan a este equilibrio entre producción y depurado de A β han demostrado ser factores de riesgo para el desarrollo de la EA. Más aún, las mutaciones que definen a la EA familiar favorecen el procesamiento de APP por la vía amiloidogénica, desplazando este equilibrio hacia la acumulación de A β (Tcw & Goate, 2017).

Existe en la bibliografía cierta discusión respecto de la toxicidad relativa de A β 1-40 y A β 1-42, así como también de sus formas solubles y fibrilizadas o sus modificaciones postraduccionales (Roher et al., 2017). Se ha detectado, en este sentido, una fuerte dependencia entre el efecto de estos péptidos y las condiciones experimentales, sobre todo en ensayos *in vitro*. En condiciones *in vivo*, se debe mencionar que las placas amiloides parenquimáticas presentan mayormente fibrillas de A β 1-42. El A β 1-40, por su parte, constituye preferencialmente depósitos amiloides perivasculares, los cuales tapizan la cara basolateral de vasos sanguíneos cerebrales de pequeño y mediano calibre. Estos últimos eventos constituyen la denominada angiopatía cerebral amiloide,

que también es uno de los eventos característicos de la EA (Miller et al., 1993; Yamada, 2015).

Los ovillos neurofibrilares, en cambio, están compuestos por agregados de proteína Tau hiperfosforilada. Tau es una proteína asociada a los microtúbulos, y le confiere estabilidad al citoesqueleto de tubulina. En el contexto de la EA, Tau se hiperfosforila, se agrega y constituye depósitos insolubles en el citoplasma neuronal. Más allá de la toxicidad de los mismos depósitos, se evidencia inestabilidad en el citoesqueleto, afectando al transporte axonal y, consecuentemente, a la sinapsis (Figura 5). Si bien los ovillos neurofibrilares son uno de los eventos que definen histológicamente a la EA, su sola presencia no es exclusiva de esta patología, y es considerado mayormente un evento secundario a la formación de placas amiloides (Chang, Sang, & Chiang, 2018).



▲ **Hiperfosforilación de Tau y formación de ovillos neurofibrilares.** Se muestra el proceso de formación de ovillos neurofibrilares y la interacción entre Tau y los microtúbulos. La hiperfosforilación de Tau puede producirse por diferentes estímulos e induce una menor interacción de la proteína con los microtúbulos (los cuales se desestabilizan) y una mayor capacidad agregante de la misma.

5. El Hipocampo y la Enfermedad de Alzheimer

El hipocampo es una de las estructuras del cerebro de los mamíferos que forma parte del sistema límbico. Participa del procesamiento de la memoria episódica, el aprendizaje y la representación del espacio (Rosenzweig & Barnes, 2003). Anatómicamente, en humanos es una estructura bilateral que se ubica debajo del

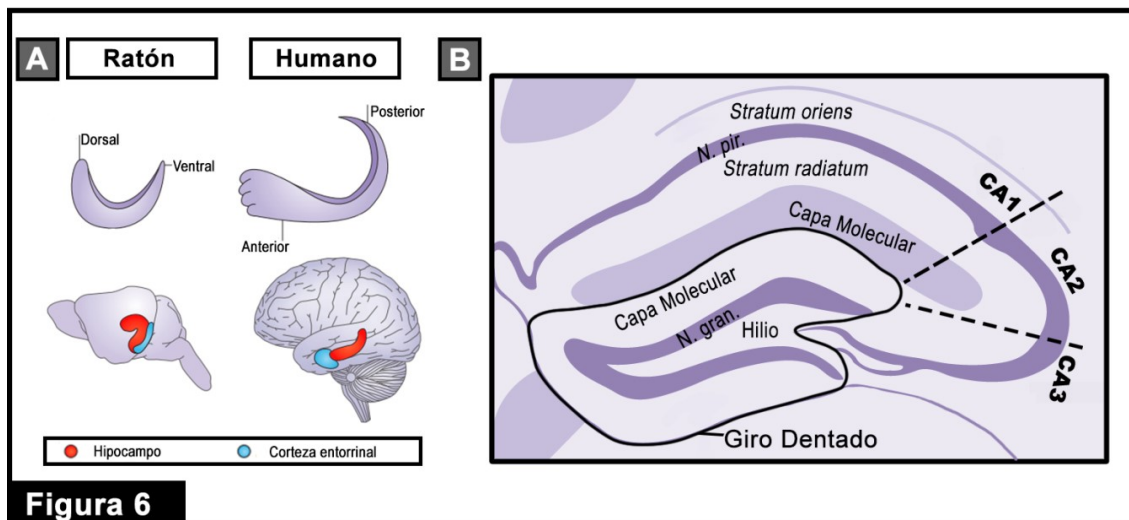
lóbulo temporal medio. En roedores esta estructura tiene mayor extensión relativa y es de localización subcortical (Figura 6A).

El daño a la integridad del hipocampo puede producir alteraciones cognitivas que son comparables a aquellas que se experimentan en la EA o, en menor medida, durante el envejecimiento. La atrofia hipocampal se expresa a nivel cognitivo como un deterioro en la memoria asociativa y de reconocimiento (Dede, Wixted, Hopkins, & Squire, 2013; Rosenzweig & Barnes, 2003). Además, el hipocampo es una de las estructuras que se afectan más tempranamente y en mayor medida durante la progresión de la EA, tanto en pacientes como en modelos animales de la patología (Mufson et al., 2015). El hipocampo es una de las primeras regiones en evidenciar placas amiloides y ovillos neurofibrilares en etapas tempranas de EA, así como también muerte neuronal en etapas más avanzadas (Arriagada, Growdon, Hedley-Whyte, & Hyman, 1992; Kordower et al., 2001). Más aún, desde finales de la década de 1980 se evalúa la atrofia hipocampal selectiva empleando resonancia magnética nuclear como uno de los indicios de progresión de la EA en pacientes (Blanken et al., 2017; Seab et al., 1988).

Organización del Hipocampo.

En el hipocampo, las neuronas se organizan en capas compactas, que responden a la formación de un circuito claramente definido. Si bien la nomenclatura de las diferentes sub-estructuras en las que se puede dividir el hipocampo varía según los autores, en general existe un consenso en reconocer tres componentes generales: el giro dentado, el subículo y el hipocampo propiamente dicho. Este último, al mismo tiempo, se compone de las subregiones de CA1, CA2 y CA3, que constituyen el Asta de Amón. Por su morfología, se distinguen principalmente dos tipos de neuronas excitatorias. Las neuronas piramidales constituyen una capa compacta en el hipocampo propiamente dicho, mientras que las neuronas granulares se agrupan en una estructura con forma de doble hoja en el giro dentado. La zona comprendida entre las dos hojas de neuronas granulares se denomina hilio, mientras que la zona restante del giro dentado es la región molecular. En el límite entre las neuronas granulares y el hilio se ubica la zona subgranular, donde se localizan las células progenitoras que dan lugar al proceso de neurogénesis adulta. Las neuronas que se generan mediante este proceso se integrarán al circuito hipocampal como neuronas granulares. Además, sobre las neuronas piramidales, limitando con el cuerpo calloso, se encuentra la región

del *stratum oriens*. Por debajo de la capa de neuronas piramidales se encuentra la región de *stratum radiatum*, cuya conformación particular se debe a la presencia de los axones de las neuronas piramidales CA3 que recorren paralelamente esta región y realizan sinapsis con las dendritas de las neuronas piramidales de CA1. Debajo del *stratum radiatum*, limitando con el giro dentado, se encuentra la región molecular del hipocampo propiamente dicho (Figura 6B) (Deng, Aimone, & Gage, 2010; Y. Mu & F. H. Gage, 2011; Yan et al., 2018).



▲ **Estructura y organización del hipocampo de ratón.** En el Panel A se muestra la comparación en forma y localización dentro del cerebro entre el hipocampo de ratón y el hipocampo humano (resaltado en rojo). En celeste se muestra la localización de la corteza entorrinal, por la cual ingresan los impulsos nerviosos al hipocampo y que constituye el principal receptor de la información procesada por este. Las ilustraciones de los cerebros para cada especie no comparten escala. En el Panel B se muestra un esquema que ilustra la estructura del hipocampo de ratón tal como se observa en un corte coronal de cerebro. Se señala el giro dentado con sus sub-regiones: la capa molecular, la capa de neuronas granulares (N. gran.) y el hilio. El resto corresponde al hipocampo propiamente dicho, con sus capas: *Stratum oriens*, la capa de neuronas piramidales (N. pir.), *Stratum radiatum* y la capa molecular.

Esta estructura tan definida del hipocampo está asociada a un circuito neuronal que es fundamentalmente excitatorio, tri-sináptico y unidireccional. En este circuito, la información sensorial ingresa desde las capas superficiales de la corteza entorrinal a través del subículo. Mediante axones de proyección, las neuronas corticales hacen sinapsis con neuronas granulares. Los axones de las neuronas granulares (denominadas en su conjunto fibras musgosas) se extienden por el hilio del giro dentado y hacen sinapsis con las neuronas piramidales de CA3. Estas células pueden a su vez hacer sinapsis con otras neuronas de CA3 o con neuronas de CA1. Desde allí, la información puede salir *vía* subículo hacia las capas más profundas de la corteza entorrinal (Y. Li, Mu, & Gage, 2009; Y. Mu & F.H. Gage, 2011).

La sub-región del hilio o capa polimórfica del giro dentado, ha sido propuesta por algunos autores como una zona particularmente sensible a los eventos patológicos que ocurren en la EA. En el hilio se ubican, por ejemplo, interneuronas que expresan somatostatina cuya función se afecta con la edad y en presencia de patologías metabólicas (como la diabetes *mellitus*), ambos factores de riesgo para el desarrollo de EA (Beauquis, Roig, Homo-Delarche, De Nicola, & Saravia, 2006; Maia et al., 2014; Spiegel, Koh, Vogt, Rapp, & Gallagher, 2013). Además, tanto en pacientes como en ratones transgénicos que modelizan la EA se ha observado pérdida selectiva de interneuronas GABAérgicas en el hilio del giro dentado (Takahashi et al., 2010). Finalmente, la evaluación de la integridad vascular mediante MRI de alta resolución ha demostrado que el giro dentado es una de las primeras sub-estructuras del hipocampo que presentan cambios vasculares en paciente con EA o impedimento cognitivo leve (Montagne et al., 2015).

Neurogénesis adulta.

La neuroplasticidad propia del hipocampo es clave para las funciones que esta estructura desempeña. Entre los elementos de neuroplasticidad se debe destacar el fenómeno de neurogénesis adulta. La proliferación, diferenciación e integración al circuito hipocampal por parte de neuronas granulares durante la vida adulta es un evento que comenzó a describirse alrededor del año 1960 (Altman & Das, 1965). Hoy en día se reconoce que la neurogénesis adulta es relevante para las funciones que desempeña el hipocampo y, en este sentido, numerosos experimentos realizados en roedores indican que el impedimento de la neurogénesis afecta especialmente a la memoria espacial y asociativa (Marin-Burgin & Schinder, 2012).

Las neuronas granulares maduras que se producen mediante neurogénesis adulta comparten características con aquellas que se producen durante el desarrollo embrionario. El foco ha sido puesto, por lo tanto, en la fisiología de aquellas neuronas jóvenes que se generan durante la adultez, antes de completar su maduración. En roedores, estas neuronas presentan un desarrollo de varias semanas, tiempo durante el cual sus características electrofisiológicas las hace particularmente sensibles a los *inputs* sinápticos y al remodelamiento sináptico. Por ello, se ha propuesto que a través de la neurogénesis adulta se generan de manera continua neuronas con estas propiedades, que serían particularmente relevantes para la detección de estímulos relacionados con la experiencia cotidiana (Toni & Schinder, 2015).

La neurogénesis adulta se encuentra afectada en modelos animales de EA (Beauquis et al., 2014; Rola et al., 2004). Esta disminución podría estar relacionada con las alteraciones cognitivas propias de la patología. En los últimos años, Hollands y colaboradores han demostrado que el impedimento de la neurogénesis en un modelo de EA familiar exacerba el deterioro cognitivo, afectando principalmente al circuito inhibitorio del hipocampo. De hecho, los mismos autores sugieren que la modulación positiva de la neurogénesis podría ser una estrategia neuroprotectora para este tipo de enfermedades (Hollands, Bartolotti, & Lazarov, 2016; Hollands et al., 2017). La neurogénesis también se ha visto afectada en roedores ante la presencia de factores de riesgo para la EA en humanos, como la diabetes *mellitus* Tipo 1 (Beauquis et al., 2008) y el envejecimiento (Saravia, Beauquis, Pietranera, & De Nicola, 2007). Durante el envejecimiento, disminuye el potencial neurogénico (Galvan & Bredesen, 2007) y se generan neuronas que, en su estadio inmaduro, son más pequeñas, menos desarrolladas y conectadas que en animales de menor edad (Trincherio et al., 2017).

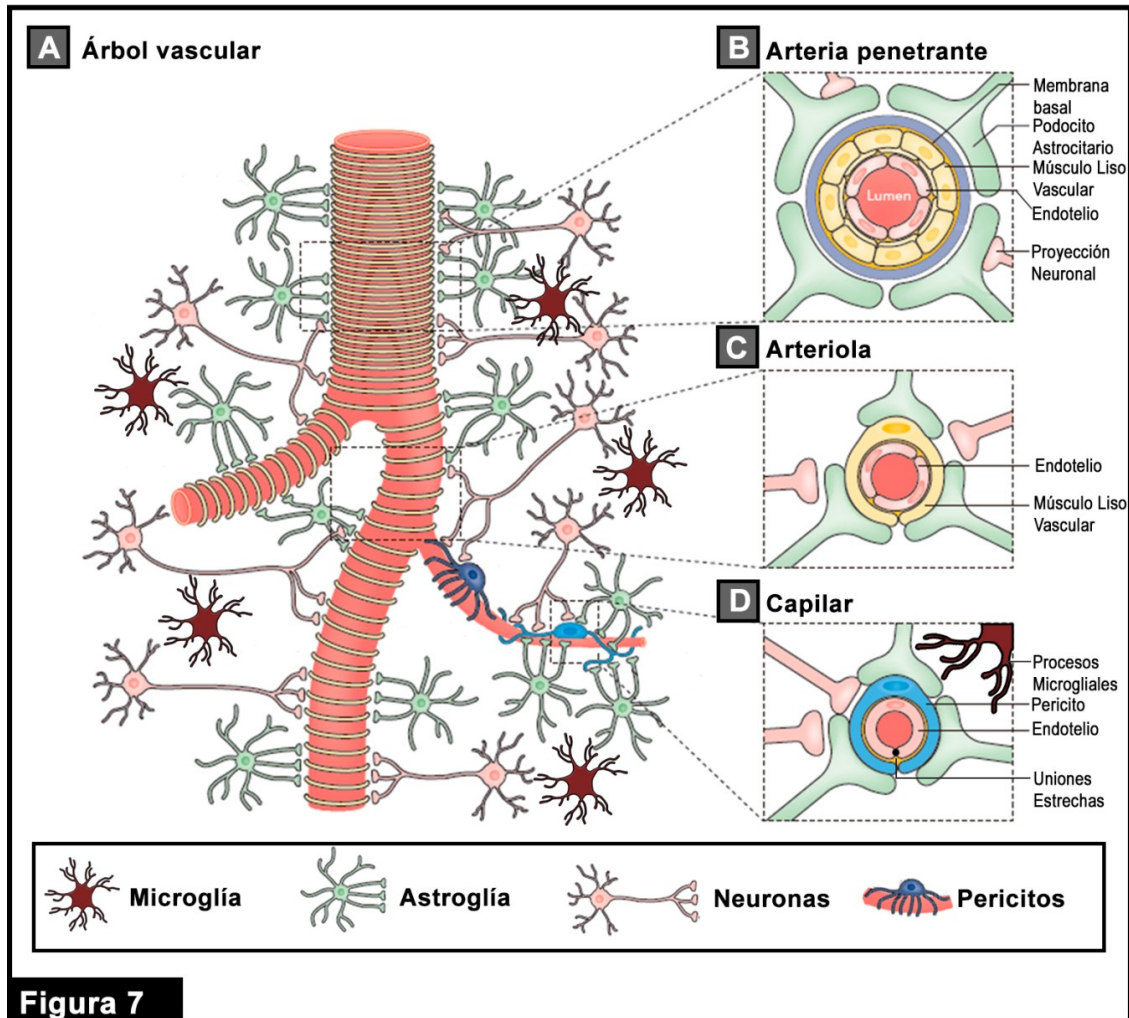
Sin embargo, la extrapolación de estas observaciones a los seres humanos está en discusión en el campo de estudio. Dada la presencia de resultados contradictorios en la bibliografía, la existencia y relevancia misma del fenómeno de neurogénesis adulta en seres humanos permanece actualmente en debate (Kempermann et al., 2018).

6. La Unidad Neurovascular

Al ser una enfermedad neurodegenerativa, la investigación en el campo de la EA estuvo mayormente enfocada en el estudio de las neuronas. Durante décadas se acumuló conocimiento sobre la toxicidad de los péptidos A β y los ovillos neurofibrilares, y cómo estos afectan a las vías involucradas en la supervivencia neuronal, el soporte energético y la sinapsis. Sin embargo, desde los últimos años se ha comprendido la importancia de abordar el estudio de la patología contemplando todo el contexto tisular que rodea a las neuronas.

En el cerebro, las neuronas se encuentran en íntima interacción -física y a través de mediadores solubles- con células de la glía y células vasculares, constituyendo la denominada Unidad Neurovascular (UNV). Los componentes celulares de la UNV son prácticamente los mismos a lo largo de todo el árbol vascular; sin embargo, las diferencias en la organización espacial de estas células son fundamentales para las funciones específicas de cada tipo de vaso sanguíneo (Figura 7).

La vasculatura se clasifica funcional y anatómicamente en diferentes segmentos de acuerdo al diámetro de su luz y los componentes de su pared. A nivel de las arterias penetrantes (los vasos de mayor diámetro en el cerebro), la UNV está compuesta por células endoteliales que tapizan la cara luminal de la pared vascular, embebidas en su membrana basal y rodeada por una a tres capas de músculo liso vascular, que les brinda resistencia mecánica ante la alta presión del plasma sanguíneo. Las arteriolas se encuentran en serie con las arterias y presentan una única capa de músculo liso vascular, lo cual se relaciona con su capacidad para regular localmente el flujo sanguíneo. Además, existe una continuidad entre innervación neuronal y cobertura de astrocitos sobre células endoteliales y musculares a lo largo de las arterias y arteriolas. Finalmente, los vasos sanguíneos de menor diámetro son los capilares, compuestos por una capa de células endoteliales que frecuentemente comparten su membrana basal con pericitos. El complejo formado por estas dos células está a su vez recubierto por podocitos astrocitarios, innervado por neuronas y en contacto íntimo con células microgliales (Kisler et al., 2017). A nivel de los capilares sanguíneos ocurre fundamentalmente el intercambio de gases y nutrientes. La sangre desoxigenada es recolectada a través de vénulas y sale del cerebro por venas, de mayor diámetro vascular (Tanaka, 2017).



▲ **Componentes y organización de la UNV.** Esquema representativo de la UNV, donde se representan algunos segmentos del árbol vascular (A) y cómo neuronas, células gliales y vasculares interactúan a diferentes niveles: arteria (B), arteriola (C) y capilares (D). A nivel de los capilares, el contacto con pericitos mantiene el grado de diferenciación de las células endoteliales, y el contacto con podocitos astrogiales es fundamental para la expresión de proteínas de unión estrecha y la constitución de la barrera hematoencefálica. El esquema fue modificado a partir de aquel publicado por Kisler y colaboradores (Kisler, Nelson, Montagne, & Zlokovic, 2017).

La vasculatura cerebral.

El cerebro es uno de los órganos más vascularizados de los mamíferos. En condiciones de reposo, recibe un 20% del volumen sanguíneo que circula por unidad de tiempo. La existencia de la UNV contempla propiedades emergentes que son generadas y mantenidas a través de la interacción entre los tipos celulares que la componen. Un ejemplo de ello es la constitución de la barrera hematoencefálica (BHE) a nivel de los capilares cerebrales. La misma es una interfaz especializada que permite el flujo específico de sustancias entre el compartimento vascular y el compartimento nervioso, limitando el flujo paracelular. Está constituida por un

endotelio continuo, sellado a través de uniones estrechas, formadas por complejos proteicos de la familia de Ocludina y Claudina. La BHE permite el rápido flujo de oxígeno y dióxido de carbono entre el plasma sanguíneo y el líquido intersticial. Además, posibilita el ingreso de metabolitos y nutrientes, así como la salida de productos de desecho metabólicos, a través de mecanismos específicos de transporte (B. V. Zlokovic, 2011). Esto es posible gracias a que las células endoteliales poseen una membrana altamente polarizada, y expresa en la cara luminal y basolateral receptores y transportadores específicos (Cockerill, Oliver, Xu, Fu, & Zhu, 2018). Al permitir que la composición del líquido intersticial se regule de manera independiente al contenido del plasma sanguíneo, la BHE cumple un rol fundamental en el mantenimiento de la homeostasis del SNC. En humanos se ha sugerido una asociación entre el envejecimiento y la pérdida de integridad de la BHE, con inicio en estructuras clave como el hipocampo (Montagne et al., 2015).

La constitución de la BHE está definida en gran medida por la influencia de otras células de la UNV, entre ellas los astrocitos. A través de factores solubles y del contacto físico entre componentes de la membrana plasmática de los astrocitos y la membrana basal se regula la expresión de proteínas de unión estrecha y de transportadores específicos que permiten mantener el estado diferenciado de las células endoteliales cerebrales (Cabezas et al., 2014). Estudios realizados hace ya dos décadas han demostrado que cultivos primarios de células endoteliales no-cerebrales adquieren propiedades de BHE si son cultivados en contacto físico con células astrogiales o en presencia de su medio condicionado (Hayashi et al., 1997).

A nivel de los capilares cerebrales y segmentos inmediatamente adyacentes, las células endoteliales pueden estar en contacto directo con pericitos. Estas células fueron originalmente descritas por Charles Rouget en 1923, y expresan marcadores compartidos con células musculares y gliales (Winkler, Bell, & Zlokovic, 2011). La presencia de los pericitos es necesaria durante el desarrollo embrionario para facilitar la formación de la BHE. Sin embargo, el efecto de los pericitos sobre la BHE no se encuentra limitado al desarrollo embrionario. Ratones adultos deficientes en pericitos presentan comprometida su BHE, con niveles disminuidos de Ocludina y Claudina, lo cual se intensifica a medida que los animales envejecen (R. D. Bell et al., 2010).

Finalmente, a nivel de vasos sanguíneos de mayor calibre, se hace presente el músculo liso vascular rodeando a las células endoteliales. El músculo liso vascular es el principal regulador del flujo sanguíneo, por lo que actúa como integrador de una gran cantidad de señales que provienen de los vasos sanguíneos mismos o del

parénquima cerebral (Kisler et al., 2017). Se trata de células fundamentales para el fenómeno de acoplamiento neurovascular. Este mecanismo implica que ante un aumento de la actividad neuronal en alguna región del cerebro, aumenta el flujo sanguíneo a dicha zona para suplir los requerimientos energéticos. El acoplamiento neurovascular requiere de la relajación del músculo liso vascular, sobre todo a nivel de arteriolas. La regulación de la contractibilidad de estas células depende de su interacción con células astrogiales y endoteliales. Los astrocitos pueden detectar el grado de actividad neuronal a través de sus receptores metabotrópicos para glutamato. La activación de estos receptores produce la relajación del músculo liso vascular a través de un mecanismo dependiente de la actividad ciclooxigenasa y de la prostaglandina E2 (Zonta et al., 2003). También existen reportes que atribuyen algún rol al calcio citoplasmático y su fluctuación en astrocitos, aunque este punto permanece en controversia (Otsu et al., 2015). Por otro lado, el músculo liso vascular puede recibir señales desde las células endoteliales de manera directa a través de uniones comunicantes o de manera indirecta a través de prostaglandinas. Estos estímulos se liberan en respuesta a un aumento en la tensión de corte debida al flujo sanguíneo o por la activación de innervación colinérgica. Finalmente, la liberación de adenosina por parte de las neuronas puede impactar directamente sobre receptores presentes en la membrana del músculo liso vascular, induciendo la hiperpolarización y relajación de estas células (Lovatt et al., 2012).

Células Gliales.

Uno de los principales componentes de la UNV son las células gliales. Las células gliales fueron originalmente definidas por Rudolf Virchow en 1858, quien utilizó el término “*nervenkitt*” o “cemento de neuronas” para referirse a ellas, término que en inglés derivaría en la palabra “*glue*” para traducirse finalmente como “*glia*”. Con esa terminología se hacía referencia a aquellas células presentes en el tejido nervioso cuya morfología difería de la de las neuronas, y a las que se les asignaba simplemente una función de sostén tisular. En palabras de Virchow, “*(estas células) rellenan el espacio vacío dejado por las neuronas para darle solidez al tejido nervioso*” (Virchow, 1858).

Luego de más de un siglo, la evidencia acumulada permite establecer que dentro del concepto de “glía” se hace referencia a tipos celulares muy diversos, todos ellos con funciones definidas y fundamentales para mantener la función neuronal y la

homeostasis del SNC, en contraposición a la idea original. Astroglía, microglía y oligodendrocitos son ejemplos de tipos celulares del SNC que normalmente se incluyen dentro del concepto de glía.

Las células de la astroglía –o astrocitos– deben su nombre a su forma estrellada. Desde el soma de estas células se desprenden múltiples proyecciones denominadas podocitos, a través de los cuáles un único astrocito puede interactuar con el endotelio. Esta interacción múltiple hace de la astroglía un tipo celular fundamental en la integración de señales entre diferentes componentes de la UNV (Kettenmann & Verkhratsky, 2008; B.V. Zlokovic, 2008). Mediante proyecciones enviadas hacia las neuronas, los astrocitos forman parte de la sinapsis tripartita, donde la membrana astroglial, en íntimo contacto con la membrana presináptica y postsináptica, puede presentar receptores para diferentes neurotransmisores, e incluso recaptadores de glutamato. Su función en el reciclado de glutamato es vastamente conocida (Kettenmann & Verkhratsky, 2008; Verkhratsky et al., 2012). Por otro lado, la interacción física y paracrina con las células endoteliales que forman los capilares cerebrales es fundamental para el soporte nutricional de las neuronas. Dada la existencia de una BHE que limita el flujo paracelular, la expresión de transportadores de glucosa del tipo GLUT1 en células endoteliales y en podocitos astrocitarios es estrictamente necesaria para que la glucosa pueda ingresar al tejido nervioso. Dentro de los astrocitos, la glucosa se metaboliza fundamentalmente de forma anaeróbica, produciendo altos niveles de lactato. El lactato liberado en las inmediaciones de las neuronas es luego captado por estas, a través de un mecanismo que involucra a transportadores de monocarboxilato. Las neuronas son capaces de producir piruvato a partir del lactato y luego oxidarlo de manera aeróbica para producir ATP. Este mecanismo ha sido sugerido como la principal fuente de nutrientes para las neuronas (Abbott, Ronnback, & Hansson, 2006; Allaman et al., 2010; Pellerin, 2003). Finalmente, los astrocitos también expresan una gran cantidad de receptores de moléculas asociadas al daño y citoquinas, y son capaces de participar del proceso de neuroinflamación modulando la activación de otro tipo celular: las células de la microglía (C. Li et al., 2011; Matsui et al., 2002).

Las células de la microglía son consideradas los macrófagos residentes del sistema nervioso. A diferencia de los astrocitos, su origen embrionario se remonta a macrófagos primitivos que provienen del saco vitelino (Ginhoux, Lim, Hoeffel, Low, & Huber, 2013). En etapas tempranas del desarrollo, adquieren una morfología ameboide e invaden al neuroepitelio. De esta manera, migran hacia el cerebro en formación, previamente a la existencia de la BHE. Una vez allí se terminan de

diferenciar a células del sistema inmune y adquieren una morfología altamente ramificada, con múltiples procesos móviles. Estas proyecciones celulares le permiten detectar la potencial presencia de agentes tóxicos (Menassa & Gomez-Nicola, 2018; Wolf, Boddeke, & Kettenmann, 2017).

La microglía es capaz de detectar la presencia de moléculas asociadas al daño, muerte celular o invasión de agentes externos. Ante estos estímulos puede promover una respuesta inflamatoria que se caracteriza por la liberación de citoquinas y un aumento de la motilidad celular y en la capacidad fagocítica (Ferreira, Clarke, Bomfim, & De Felice, 2014; Ransohoff & Brown, 2012). Independientemente de su rol en el contexto inflamatorio, numerosos reportes sostienen que la actividad fagocítica de estas células es importante para remover agregados proteicos incipientes y espinas sinápticas en eventos de “poda sináptica” como los que ocurren durante el desarrollo intrauterino y la niñez (LeDoux, 2003; Maren, 2005).

7. La neuroinflamación como contexto patológico

La inflamación es un proceso biológico clave en respuesta al daño, infección o trauma en los tejidos. El proceso inflamatorio exitoso finaliza con la eliminación de los patógenos, e inicia un proceso de cicatrización y revascularización del tejido a través de la activación de la angiogénesis. A diferencia de otros tejidos, en el SNC la activación aguda o crónica del proceso inflamatorio –denominado proceso neuroinflamatorio– puede tener efectos perjudiciales sobre la función neuronal. En este sentido, numerosos mecanismos en neuronas y otras células cumplen un rol clave en controlar el daño que pueda generar la activación de una respuesta neuroinflamatoria necesaria (Giatti, Boraso, Melcangi, & Viviani, 2012; Shabab, Khanabdali, Moghadamtousi, Kadir, & Mohan, 2017). Por esta razón, la neuroinflamación cumple un rol ambivalente dependiendo del contexto: puede ser necesaria para eliminar focos de daño pero también convertirse en parte del contexto patológico, que potencia y amplifica el daño generado originalmente.

La respuesta neuroinflamatoria involucra a casi todas las células que residen en el SNC. Sólo en ciertos casos las células inmunes que se encuentran en circulación pueden atravesar la BHE y participar de la respuesta inmune cerebral (Carson,

Thrash, & Walter, 2006). Entre las células que actúan localmente, las células de la microglía y la astrogía son las más estudiadas (Skaper, Facci, Zusso, & Giusti, 2018).

Las células microgliales pueden iniciar una respuesta neuroinflamatoria ante la presencia de patógenos, daño tisular, neurotoxinas o infecciones. Este proceso se inicia típicamente por la activación de receptores Fc, receptores de Tipo-Toll (TLR), receptores virales y péptidos antimicrobianos. En respuesta a estos estímulos, la microglía puede disparar una respuesta que, al igual que ocurre en la periferia, incluye la producción y liberación de citoquinas como TNF- α e IL-1 β , y la liberación de quemoquinas como CCL2 que posibilitan el reclutamiento de otras células microgliales. Además, aumenta la actividad de las enzimas óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y ciclooxigenasa 1 y 2 (Hickman, Izzy, Sen, Morsett, & El Khoury, 2018).

Si bien la respuesta neuroinflamatoria puede ser beneficiosa en el corto plazo, en un contexto de neuroinflamación crónica la microglía puede liberar factores neurotóxicos y promover daño a neuronas sanas como si fueran agentes patógenos, induciendo un cuadro neurodegenerativo (Hickman et al., 2018; Lyman, Lloyd, Ji, Vizcaychipi, & Ma, 2014).

Este desbalance es característico de enfermedades neurodegenerativas con un claro componente neuroinflamatorio, como es el caso de la esclerosis múltiple (Baecher-Allan et al., 2018). Sin embargo, durante las últimas décadas se ha acumulado evidencia que demuestra la presencia de un componente neuroinflamatorio en otras enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la EA (Schain & Kreisl, 2017). En estos casos, las células microgliales reaccionan a patrones moleculares asociados al daño (DAMPs, por las siglas en inglés de *Damage-Associated Molecular Patterns*), tales como agregados proteicos, ácidos nucleicos y otros componentes intracelulares, todos ellos indicativos de daño celular. De esta manera, moléculas asociadas a enfermedades neurodegenerativas como A β , α -sinucleína y otras, pueden activar células microgliales a través de receptores para DAMPs, como es el caso del receptor para productos avanzados de glicosilación (RAGE, por las siglas en inglés de "*Receptor for Advanced Glycation Endproducts*") (Doens & Fernandez, 2014; Wolf et al., 2017).

En la microglía, los DAMPs también pueden ser detectados en el medio intracelular a través de los inflamasomas. Los inflamasomas son complejos proteicos de alto peso molecular que reclutan proteínas involucradas en el procesamiento de citoquinas pro-inflamatorias. Algunos tipos de inflamasomas contienen a la proteína NLRP3, la cual

tiene la capacidad de reconocer proteínas mal plegadas y reclutar otras proteínas necesarias para la síntesis y liberación de IL-1 β . Los inflamasomas que contienen NLRP3 han sido particularmente estudiados en modelos de enfermedades neurodegenerativas que pueden ser caracterizadas como proteinopatías (Santoni et al., 2015; Strowig, Henao-Mejia, Elinav, & Flavell, 2012).

La activación de los receptores involucrados en el reconocimiento de patógenos y DAMPs confluyen al producir un aumento en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias. A nivel transcripcional, esta regulación está dada por el factor de transcripción nuclear kappa B, conocido como NF κ B (por las siglas en inglés de "*Nuclear Factor Kappa B*"). NF κ B controla el perfil inflamatorio en células microgliales, y también media la respuesta neuroinflamatoria en otros tipos celulares; favoreciendo por ejemplo la ruptura de la BHE en células endoteliales o promoviendo supervivencia en neuronas (Okun et al., 2009).

La forma activa de la proteína NF κ B corresponde a homodímeros formados por subunidades denominadas p65, o bien heterodímeros formados por p65 y la subunidad p50. La subunidad p65 presenta un dominio de unión al ADN que le permite interactuar con regiones específicas del genoma (Hwang et al., 2009; Noursadeghi et al., 2008). A continuación se denominará como NF κ B a esta conformación activa. En condiciones basales, el dímero se encuentra retenido en el citosol, imposibilitado de translocar al núcleo, debido a su interacción con la proteína I κ B (Huang & Hung, 2013). La activación de la vía se inicia por la llegada de una señal de daño o presencia de patógenos que puedan ser detectados por receptores específicos. Típicamente, moléculas asociadas al daño y citoquinas activan al receptor RAGE, mientras que componentes de algunos patógenos y también citoquinas actúan sobre receptores tipo Toll (Shastri, Bonifati, & Kishore, 2013). La activación de los receptores para citoquinas como IL-1 β y TNF α puede también regular la vía de NF κ B. En todos los casos, se inicia una cascada de transducción de señales que lleva a la activación de la quinasa I κ K. Esta quinasa fosforila a I κ B, favoreciendo la pérdida de interacción con NF κ B y su degradación por ubiquitinización. De esta manera, las subunidades p65/p50 se encuentran libres para translocar al núcleo, reconocer de manera específica elementos respondedores en el ADN y promover la transcripción de genes relacionados globalmente con la respuesta neuroinflamatoria (Huang & Hung, 2013; Noursadeghi et al., 2008) (Figura 8).

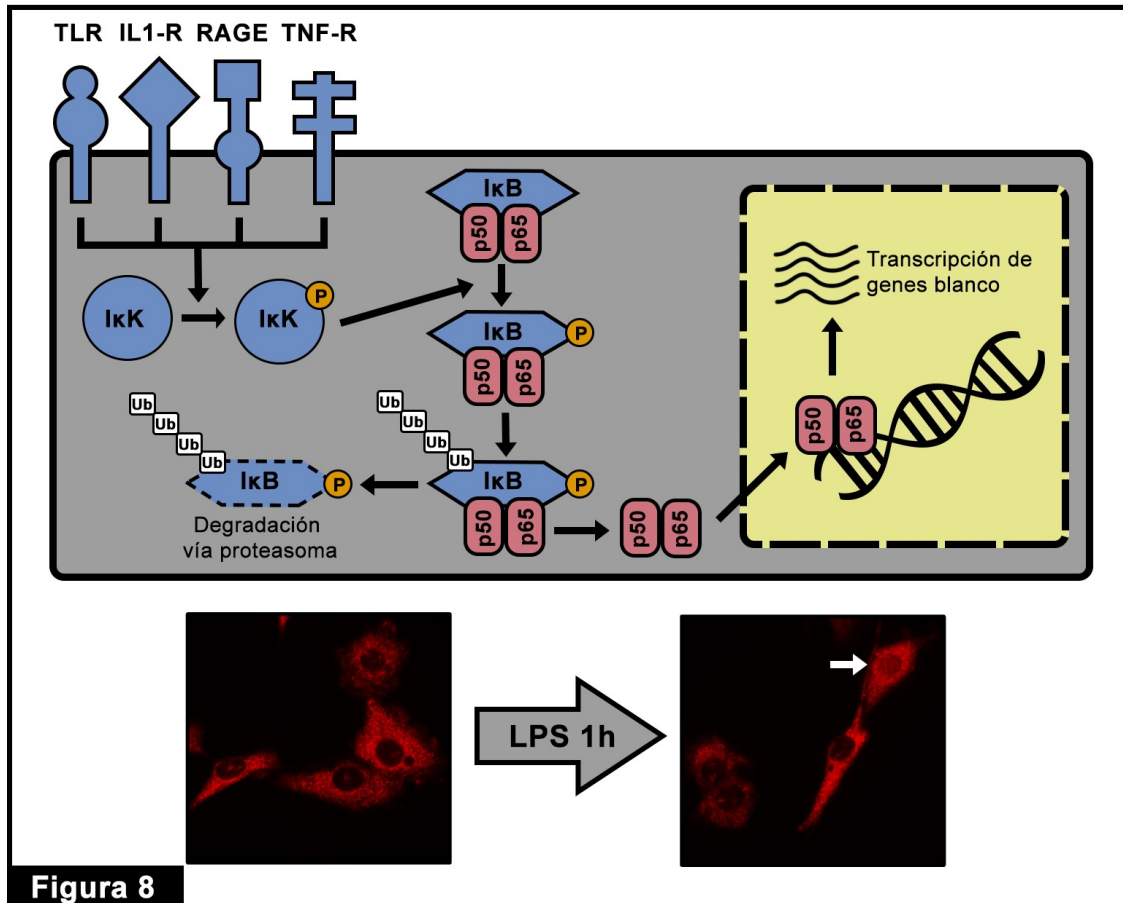


Figura 8

▲ **Mecanismo de regulación y activación de NFκB.** En el panel superior se muestra un esquema representativo de la vía de NFκB en diferentes tipos celulares. En este caso, NFκB está representado por el dímero p50-p65, el cual se encuentra retenido en el citoplasma por la acción de la proteína IκB. Ante la activación de receptores para moléculas asociadas al daño, a patógenos o citoquinas (TLR, Receptor para Interleuquina-1β, RAGE y receptor de TNF), se induce la fosforilación de IKK, que puede fosforilar y destinar a degradación a la proteína IκB. De esta manera, NFκB puede translocar al núcleo e inducir la expresión de genes blancos. En el panel inferior se muestran imágenes representativas de células obtenidas de una línea celular derivada de astrocitoma de rata (C6) que luego del tratamiento durante 1 hora con lipopolisacárido (LPS) de *E. coli* presenta inmunoreactividad para NFκB en su núcleo (célula señalada con flecha blanca, inmunofluorescencia contra p65).

Durante el envejecimiento se evidencia un aumento de la activación glial, que puede predisponer a un cuadro neuroinflamatorio crónico (Cribbs et al., 2012). Estudios en los que se han utilizado modelos animales de la EA o sistemas *in vitro* demuestran que tanto los péptidos Aβ como los agregados de Tau hiperfosforilados generan respuestas proinflamatorias en células gliales (Asai et al., 2014; Laurent, Buee, & Blum, 2018; Maezawa, Zimin, Wulff, & Jin, 2011; Morales, Jimenez, Mancilla, & Maccioni, 2013). En un contexto de neuroinflamación crónica como la que se evidencia en el cerebro de pacientes con EA y modelos animales, el mismo contexto inflamatorio induce la mayor expresión de la proteína APP y favorece su procesamiento por la vía amiloidogénica, generando así un mecanismo de

retroalimentación positiva que impide que el proceso neuroinflamatorio concluya exitosamente (Sastre, Walter, & Gentleman, 2008).

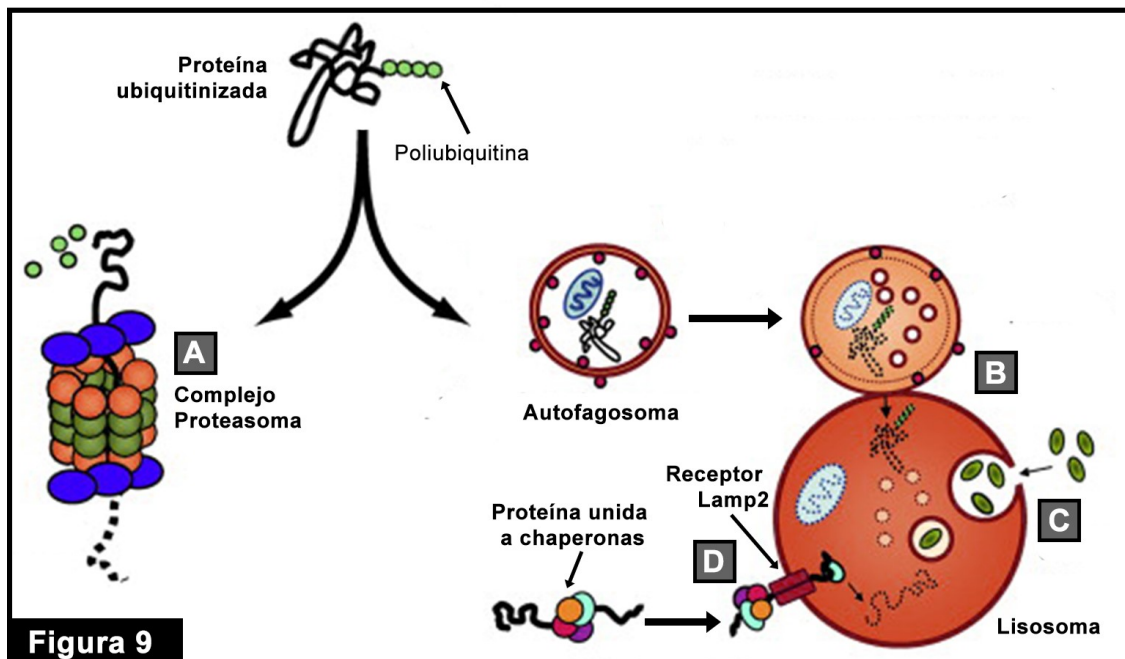
Algunos autores sugieren que la neuroinflamación puede afectar la reserva cognitiva durante el proceso de envejecimiento. El concepto de reserva cognitiva refiere a la capacidad del cerebro de mantener su desempeño cognitivo a pesar de los agentes de estrés y factores degenerativos que se pueden acumular con la edad. Asimismo, la neurogénesis adulta en el hipocampo ha sido considerado como uno de los determinantes clave de la reserva cognitiva. Asimismo, la neurogénesis puede verse afectada negativamente por el repertorio de moléculas pro-inflamatorias que se liberan por la activación microglial (Solano Fonseca et al., 2016; Valero et al., 2017).

Las células microgliales cumplen funciones fundamentales en el nicho neurogénico, sitio donde ocurre la neurogénesis adulta. Se estima que entre el 30% y el 40% de los progenitores neurales y neuroblastos contactan directamente con células microgliales en el giro dentado del hipocampo. Allí, la microglía remueve células apoptóticas y facilita la correcta conexión neuronal a través del podado de espinas sinápticas (Sierra et al., 2010; Valero et al., 2017). En el contexto de la EA, Hoeijmakers y colaboradores demostraron una disminución en marcadores de neurogénesis a edades avanzadas en ratones que modelizan la EA familiar. Este efecto se ha asociado a un aumento de la expresión de marcadores fagocíticos en la microglía cercana (Hoeijmakers et al., 2018).

El estudio del genoma a gran escala de pacientes con EA ha sido una fuente importante de información para dilucidar mecanismos en común entre una patología cuya etiología aún se desconoce y un proceso neuroinflamatorio que puede ser muy heterogéneo. En este sentido, algunos polimorfismos asociados a mayor probabilidad de desarrollar EA esporádico se ubican en genes que codifican para proteínas que participan en el proceso neuroinflamatorio. Tal es el caso de los receptores TREM2 y CD33, involucrados en la modulación de la respuesta proinflamatoria y la actividad fagocítica microglial (Bradshaw et al., 2013; Guerreiro et al., 2013). Por otro lado, el proceso neuroinflamatorio ha sido evaluado como blanco terapéutico para el tratamiento de la EA, con resultados pocos claros hasta el momento (Feldman et al., 2010).

8. La autofagia y sus alteraciones

Las células eucariotas mantienen un delicado y crucial equilibrio entre síntesis y degradación de proteínas. El mantenimiento de este equilibrio es un factor que cobra aún mayor relevancia en células altamente diferenciadas y con baja capacidad de división, donde los agregados de proteínas mal plegadas pueden acumularse con el tiempo en lugar de disminuir su concentración en las sucesivas divisiones celulares. Tal es el caso de las neuronas y de algunos tipos de células gliales. Las células eucariotas tienen dos mecanismos principales de degradación de proteínas: el sistema ubiquitina-proteosoma y la vía autofágica-lisosomal (Figura 9). El primero es un proceso por el cual se degradan una gran cantidad de proteínas de vida media corta de una manera altamente específica y temporalmente controlada. Para esto las proteínas deben ser primero adosadas a una cadena de poliubiquitina (Figura 9A). La vía autofágica-lisosomal (o simplemente autofagia), en cambio, permite degradar una alta variedad de componentes celulares, algunos con mayor especificidad que otros (Dikic, 2017; Ji & Kwon, 2017).



▲ **Mecanismos de degradación proteica en células eucariotas.** Las proteínas mal plegadas o aquellas que están destinadas a degradación son reconocidas por la maquinaria celular e identificadas a través del agregado de una cadena de poliubiquitina. Estas proteínas pueden ser degradadas individualmente en el complejo Proteosoma (A) o bien ser sustrato del proceso de autofagia. En este último caso existen tres tipos de mecanismos: la macroautofagia (B) implica la formación de un autofagosoma, la microautofagia (C) se produce por invaginación de la membrana lisosomal y la autofagia mediada por chaperonas (D) involucra al receptor lisosomal Lamp2 y chaperonas que reclutan proteínas mal plegadas. La figura ha sido modificada a partir de la publicada por Nedelsky y colaboradores (Nedelsky, Todd, & Taylor, 2008).

La degradación por la vía autofágica puede ocurrir de tres maneras posibles. La macroautofagia es la más estudiada de ellas, y por ello en adelante será referida simplemente como autofagia (Figura 9B). En la microautofagia el lisosoma emite prolongaciones que terminan capturando y degradando componentes celulares, desde proteínas hasta organelas como mitocondrias o el núcleo (Mijaljica, Prescott, & Devenish, 2011) (Figura 9C). En la autofagia mediada por chaperonas, la proteína Hsp-70 reconoce motivos relacionados a la secuencia KFERQ en distintas proteínas y produce la incorporación de éstas dentro del lisosoma a través del receptor lisosomal LAMP-2A, donde ocurre su degradación (Kaushik & Cuervo, 2012) (Figura 9D). En cualquier caso, al finalizar el proceso degradativo, los productos son vertidos al citosol donde pueden ser reutilizados para sintetizar nuevos componentes celulares. Asimismo, se regeneran los lisosomas a partir de la elongación de túbulos desde el autolisosoma y su posterior segregación (Meijer, Lorin, Blommaart, & Codogno, 2015).

Mecanismo y relevancia del proceso autofágico.

La autofagia es un proceso altamente conservado en la evolución, presente en levaduras y también en células humanas, y el descubrimiento de los genes involucrados le valió el Premio Nobel de Medicina a Yoshinori Ohsumi en el año 2016 (Comité Nobel, 2017). En 1993 Ohsumi identificó una lista de 15 proteínas codificadas por genes que estaban involucrados con el proceso de autofagia en levaduras. Estas proteínas fueron identificadas con las siglas de Atg (Por el inglés “*autophagy related genes*”), pero luego algunas recibieron otros nombres al encontrarse sus homólogos en mamíferos.

Durante el proceso de autofagia, una membrana de aislamiento se escinde desde alguna organela (típicamente el retículo endoplasmático, aunque aún se encuentran en discusión los posibles orígenes) y constituye una estructura con doble membrana lineal, denominada fagoforo. El fagoforo puede luego elongarse y cerrarse sobre sí mismo para delimitar un sector del citoplasma en el que se acumulan preferencialmente proteínas mal plegadas y organelas disfuncionales. Mientras se completa la elongación del fagoforo, la proteína LC3 es reclutada a la estructura. Luego, el fagoforo se cierra y se forma una vesícula con doble membrana, denominada autofagosoma. LC3 es comúnmente utilizado como marcador de vesículas autofágicas; sin embargo, se debe mencionar que existen dos formas diferentes de esta proteína. Durante el proceso de autofagia, LC3 pasa de su forma delipidada (LC3 I, el cual se encuentra mayormente libre en el citosol) a su forma

lipidada (LC3 II, el cual se recluta al autofagosoma durante su formación). Luego, el autofagosoma puede fusionarse con lisosomas, constituyendo el autolisosoma. De esta manera, las hidrolasas ácidas de los lisosomas degradan las macromoléculas que quedaron confinadas al interior del autofagosoma, incluyendo la membrana interna del mismo y su marcador LC3 (Kulkarni, Chen, & Maday, 2018; Mizushima & Yoshimori, 2007) (Figura 10). Si bien este mecanismo de degradación podría parecer inespecífico, existen proteínas adaptadoras que reclutan proteínas ubiquitinizadas a la membrana del fagoforo. Por esta razón, se considera que la autofagia es un proceso catabólico semi-específico.

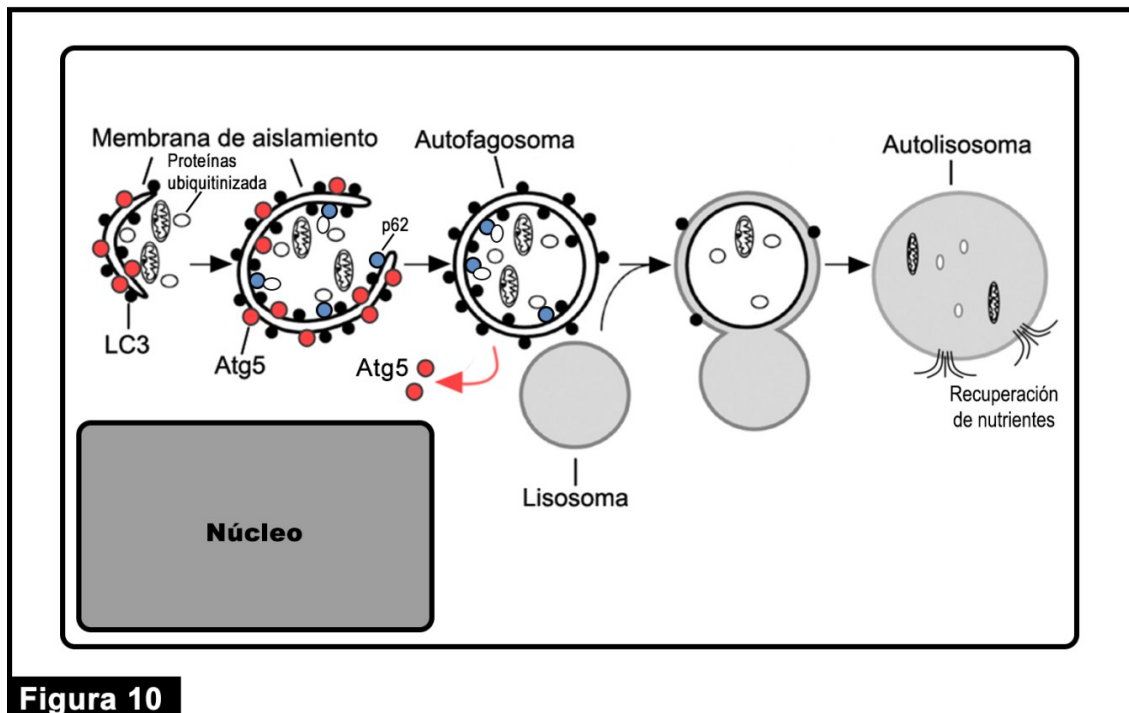


Figura 10

▲ **Progresión del flujo autofágico en una célula eucariota tipo.** Esquema representativo del proceso de autofagia, sus etapas y estructuras. La membrana de aislamiento (o fagoforo) se elonga para constituir el autofagosoma que, tras la fusión con lisosomas pasa a formar parte del autolisosoma. Durante todo el proceso existen diferentes marcadores que se localizan en las membranas autofágicas. LC3 en su forma lipidada (LC3 II) forma parte de la membrana del fagoforo, autofagosoma y autolisosoma, y se degrada por el mecanismo de autofagia. También se degrada por este mecanismo la proteína adaptadora p62, que recluta proteínas ubiquitinizadas a la zona del citoplasma donde se constituye el autofagosoma. Atg5, por su parte, es necesaria para la formación del autofagosoma pero luego deja de localizarse en su membrana durante la maduración del mismo.

La autofagia se mantiene en niveles basales de activación en prácticamente todos los tipos celulares, donde interviene en la proteostasis general (Funderburk, Marcellino, & Yue, 2010). Un aumento considerable de los niveles de autofagia (es decir, un mayor flujo autofágico) puede estar relacionado con mecanismos de muerte celular, que se activan fundamentalmente ante estrés generalizado. Sin embargo, existen otros

factores que pueden inducir un aumento en el flujo autofágico como mecanismo de homeostasis celular (Francois et al., 2013). Entre estos factores, la escasa disponibilidad de nutrientes es el más conocido y estudiado. Esta intervención, junto con agentes farmacológicos que modulan el flujo autofágico, son las estrategias más utilizadas en sistemas experimentales para estudiar el rol de la autofagia en diferentes contextos fisiológicos y patológicos (Figura 11).

En el marco de la restricción de nutrientes ha sido muy estudiado el rol del complejo multiproteico mTOR (del inglés "*mammalian Target of Rapamycin*"), el cual es capaz de activarse ante elevados niveles de aminoácidos intracelulares, señal de disponibilidad de nutrientes. A través de sus subunidades con actividad quinasa puede fosforilar diversos sustratos. Uno de estos sustratos es la proteína ULK1 (anteriormente Atg1), que constituye junto con otras proteínas Atg el complejo de iniciación de la autofagia ULK1. La forma fosforilada del complejo ULK1 es inhibitoria de la iniciación de la autofagia. Sin embargo, en un contexto de escasez de aminoácidos, ULK1 es rápidamente desfosforilado, lo que le permite reclutar y fosforilar otros complejos proteicos necesarios para la formación del fagoforo. Uno de estos complejos que se encuentran río debajo de ULK1 contiene a la proteína fosfatidilinositol-3 kinasa (PI3K), cuya actividad es estrictamente necesaria para la elongación del fagoforo (Yu, Chen, & Tooze, 2018).

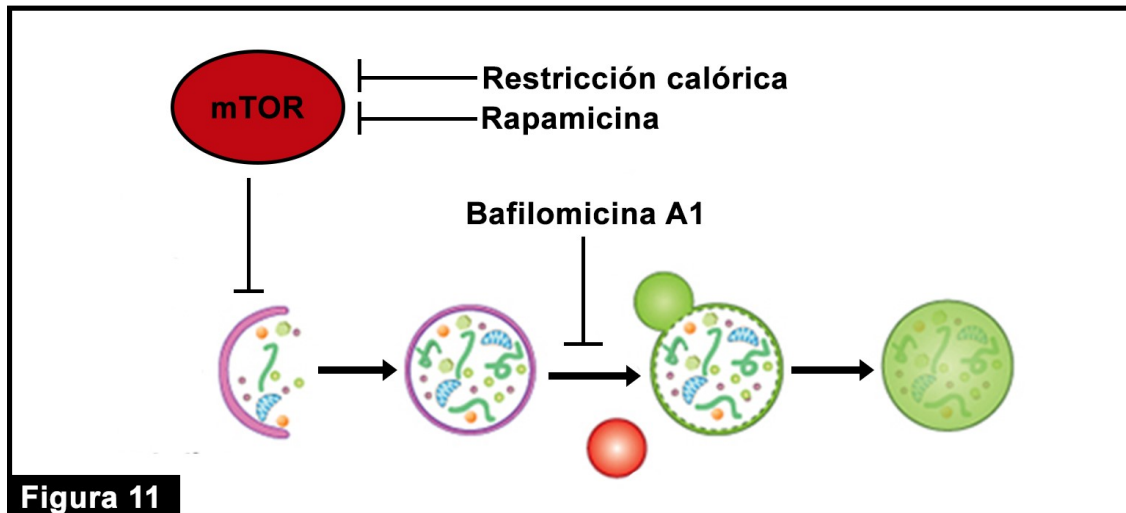
El grado de activación de mTOR depende de su capacidad para detectar aminoácidos, pero también puede estar modulado por la vía de señalización de factores de crecimiento como insulina e IGF-1. La activación de estas vías ejerce una modulación negativa sobre la autofagia, que ocurre de manera paralela a través de 2 mecanismos: la activación de mTOR y la fosforilación inhibitoria de FoxO3, factor de transcripción que regula la expresión de genes relacionados con la autofagia (Meijer & Codogno, 2009).

Otras proteínas cumplen un rol clave durante este proceso. Por ejemplo, Atg5 forma parte de las membranas autofágicas durante estadios tempranos del proceso pero se separa durante la maduración del autofagosoma (Yu et al., 2018). Por otro lado, p62 es una de las responsables de que este proceso de degradación sea semi-específico. La proteína p62 actúa como un adaptador que interactúa con LC3 y con cadenas de poli-ubiquitina, anclando dentro del autofagosoma a una importante cantidad de proteínas marcadas para su degradación. Además, p62 se degrada exclusivamente por la vía autofágica, por lo que sus niveles relativos pueden ser indicativos del flujo autofágico (Katsuragi, Ichimura, & Komatsu, 2015).

Además, se sabe que la autofagia es fundamental durante etapas del desarrollo de varios organismos, -entre ellos, roedores-, ya que ratones mutantes nulos de distintas proteínas que participan de la inducción de la autofagia son inviables o mueren rápidamente (Hara et al., 2006; Yue, Jin, Yang, Levine, & Heintz, 2003). Se ha concluido además que el rol que la autofagia cumple en el SNC es esencial ya que ratones mutantes condicionales para Atg5 o Atg7 (ambas involucradas en la formación del autofagosoma) en neuronas poseen graves deficiencias motoras, baja sobrevivencia, marcada neurodegeneración y agregados de ubiquitina intraneuronales (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006).

La autofagia en contextos patológicos.

El correcto funcionamiento del mecanismo autofágico depende en gran medida de la integridad de los lisosomas. Los lisosomas son vesículas ácidas, típicamente de 100 a 150 nm de diámetro, constituidos por una única bicapa lipídica, que contiene en su interior más de 60 tipos de hidrolasas, entre las cuales se encuentran proteasas y lipasas (Xu & Ren, 2015). Un aumento en la síntesis de hidrolasas y en la biogénesis de lisosomas ha sido asociado a un flujo autofágico exacerbado, e incluso vinculado a la muerte neuronal en condiciones experimentales (S. Lee, Sato, & Nixon, 2011; Settembre et al., 2011). Asimismo, existen factores exógenos y endógenos que son capaces de producir disrupción de la membrana lisosomal, aumentando la permeabilidad de estas organelas y liberando hidrolasas ácidas al citosol. Además del daño producido en el citosol por la acción de estas enzimas catabólicas, se impide el flujo autofágico y los autofagosomas se acumulan en el citoplasma. Este fenómeno ha sido descrito en el SNC, donde factores endógenos de las neuronas como especies reactivas de oxígeno, ceramidas, algunas caspasas y lípidos oxidados pueden favorecer la permeabilidad lisosomal y la disrupción del flujo autofágico (Johansson et al., 2010; Kroemer & Jaattela, 2005; Repnik, Stoka, Turk, & Turk, 2012). Entre los factores exógenos se encuentran algunas drogas, como la Bafilomicina A1 (Figura 11). Esta droga actúa como bloqueante de la bomba de protones vacuolar de cuya actividad depende la acidificación de los lisosomas. Al inhibir la actividad lisosomal, Bafilomicina A1 bloquea la fusión de los autofagosomas con los lisosomas. En condiciones de impedimento de la autofagia ocurre acumulación de mitocondrias disfuncionales, favoreciendo la liberación de factores pro-apoptóticos (Ghavami et al., 2014; Juhasz, 2012; D. S. Yang et al., 2008).



▲ **Tratamientos de uso frecuente para la manipulación experimental de la autofagia.** Esquema representativo de las estructuras y procesos que suceden hasta la formación del autolisosoma. Bafilomicina A1 inhibe el proceso bloqueando la acción de los lisosomas, por lo que se impide el flujo autofágico y se acumulan autofagosomas. Por otro lado, intervenciones farmacológicas (como la rapamicina) y dietarias (como la restricción de nutrientes) aumentan el flujo autofágico a través de la inhibición del complejo multiproteico mTOR.

En el caso particular de la EA, la vía autofágica-lisosomal es uno de los mecanismos involucrados en la degradación de A β , por lo cual su correcto funcionamiento es clave para el depurado de esta molécula proinflamatoria (K. M. Chung, Hernandez, Sproul, & Yu, 2018; Uddin et al., 2018). Más aún, Nilsson y colaboradores han empleado un modelo murino de la EA que a su vez fue cruzado con una cepa *knock out* para Atg7, demostrando que si la autofagia está impedida, los autofagosomas podrían actuar como reservorios intracelulares de A β , exacerbando el contexto de daño (Nilsson et al., 2013). Trabajos relacionados con el papel de la autofagia en la EA muestran que la inducción generalizada de la macroautofagia facilita la degradación de agregados de A β y de Tau, y que su inhibición aumenta significativamente la presencia de estos depósitos tóxicos (Pickford et al., 2008; Y. Wang et al., 2009).

Por otro lado, la presencia de ovillos neurofibrilares y péptidos A β en la EA favorecen la instalación de un cuadro de neuroinflamación crónica que impacta también sobre el proceso autofágico. En este sentido, un estudio pionero publicado en el año 2013 por Francois y colaboradores (Francois et al., 2013) demostró que la liberación de Interleuquina-1 β microglial por la estimulación con A β 1-42 puede modular la expresión de proteínas que intervienen en el proceso autofágico, como p62. Otros trabajos demostraron que durante el proceso degenerativo del ratón APP/PS1 (modelo experimental de EA) ocurre un marcado aumento de mediadores pro-inflamatorios junto con la acumulación de vesículas autofágicas y neuritas distróficas en la corteza

cerebral y el hipocampo, existiendo una correlación positiva entre los niveles de mediadores inflamatorios y la expresión de reguladores claves de la autofagia (Francois et al., 2014). De esta manera, algunos autores sugieren que a través de la modulación del proceso autofágico se podría indirectamente controlar la neuroinflamación crónica que caracteriza a la EA y a otras enfermedades neurodegenerativas (Ye et al., 2017), mostrando estos procesos como antagónicos.

En los últimos años se ha acumulado evidencia de que la autofagia en células microgliales tiene una alta relevancia para las funciones del SNC. Un estudio publicado por Kim y colaboradores demostró que el impedimento autofágico en células microgliales durante el desarrollo de ratones produce defectos en la poda sináptica y causa alteraciones en el comportamiento social, de manera similar a lo observado en modelos animales para desórdenes del espectro autista (H. J. Kim et al., 2017). Mejor caracterizado ha sido el rol de la autofagia microglial como mecanismo de *clearance* de proteínas mal plegadas en enfermedades asociadas a proteinopatías, como la EA. Se ha demostrado que la autofagia no sólo puede actuar como un mecanismo de degradación de A β , sino que su impedimento afecta también a la fagocitosis (Cho et al., 2014; Ries & Sastre, 2016). En el marco de estas patologías con un claro componente neuroinflamatorio es importante destacar que la acumulación de proteínas mal plegadas puede inducir directamente la activación de NLRP3 y el ensamblado de los inflamasomas, actuando como otro estímulo que potencia la respuesta pro-inflamatoria (Broz & Dixit, 2016).

A partir de todo lo mencionado, han surgido trabajos que sugieren proponer la modulación de la autofagia como una intervención terapéutica para patologías como la EA. Durante los últimos años, el grupo de la Dra. Verónica Galván ha estudiado el efecto de la administración crónica de rapamicina, como un inhibidor farmacológico del complejo mTOR, en ratones PDAPP-J20, modelo de la EA (Richardson, Galvan, Lin, & Oddo, 2015). Aquellos ratones que recibieron rapamicina en la dieta durante etapas postsintomáticas de la enfermedad demostraron un mejor desempeño cognitivo, asociado con una reducción en el número y tamaño de placas amiloides en el parénquima cerebral y un aumento en los niveles basales de autofagia neuronal (Spilman et al., 2010). Sin embargo, este tipo de aproximaciones experimentales no permite distinguir entre el efecto de la autofagia neuronal y el que ocurre en otros tipos celulares. Las células gliales, con su reconocida actividad fagocítica, podrían estar involucradas indirectamente en el mejor desempeño cognitivo inducido por estos tratamientos que afectan globalmente a la autofagia. A pesar de ello, han sido

escasamente considerados en la bibliografía, que se ha centrado mayormente en el estudio de la autofagia neuronal.

9. Modelos animales de la Enfermedad de Alzheimer

Si bien la EA fue originalmente descrita por Alois Alzheimer en el año 1907, tomó más de 80 años identificar los principales componentes que constituyen los eventos histopatológicos que caracterizan a la enfermedad. Con un año de diferencia entre ambos hallazgos, se identificaron a A β y Tau como los componentes principales de las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares, respectivamente (Buxbaum, 2017). Posteriores estudios bioquímicos que caracterizaron la toxicidad de estas moléculas dieron lugar a la Hipótesis de la Cascada Amiloide, según la cual la acumulación de péptidos A β sería el primer evento patológico que posteriormente estimularía de alguna manera la formación de los ovillos neurofibrilares, daño y muerte neuronal (Buxbaum, 2017; Selkoe & Hardy, 2016).

El desarrollo de modelos animales que pudieran ser empleados para poner a prueba esta hipótesis se encontró con una clara dificultad para utilizar roedores, especie mayoritariamente empleada en el campo de la biomedicina experimental. Esta dificultad radica en que si bien los roedores poseen su propio gen que codifica para APP, estos animales no desarrollan espontáneamente placas amiloides, como sí se observa en perros, cabras, osos polares y primates no-humanos. Esta diferencia siempre se mostró asociada a la homología en la secuencia de APP, que es más baja entre roedores y seres humanos que otras especies (Johnstone, Chaney, Norris, Pascual, & Little, 1991; Kumaraswamy, Sethuraman, & Krishnan, 2014).

Zanjando este inconveniente, en el año 1992 Frautschy y colaboradores desarrollaron el primer modelo murino de EA, que implicaba inyectar fibrillas de A β extraídas del cerebro de pacientes *post-mortem* directamente en el hipocampo de ratas (Frautschy, Cole, & Baird, 1992). Mediante inmunohistoquímica, se ha demostrado que durante cierto periodo de tiempo las fibrillas permanecen en el parénquima cerebral de ratas formando estructuras similares a las placas amiloides. Esta misma técnica se empleó luego en ratones y primates no-humanos (Clarke et al., 2015; De Felice & Munoz, 2016). Este tipo de modelos ha sido y es utilizado para estudiar la dinámica de fibrilización y depósito del A β , a través de la inyección intracerebral de fibrillas o de oligómeros solubles. Además, se ha comparado el efecto de una única administración,

así como de administraciones repetidas o continuas a través de microdiálisis o bombas de micro-infusión. En este sentido, la administración progresiva y constante de A β mediante bombas de micro-infusión parece ser considerado un modelo válido que paraleliza de manera correcta la cinética de depósito de placas amiloides que se observa en seres humanos (Drummond & Wisniewski, 2017).

Si bien la Hipótesis de la Cascada Amiloide contó desde sus inicios con defensores y detractores, tuvo un gran impulso cuando se identificaron los genes cuyas variantes estaban asociadas a la forma familiar de la EA. Estas variantes implican mutaciones específicas en la secuencia codificante para las proteínas APP y Presenilina 1 y 2 (componentes del complejo γ -secretasa). Este descubrimiento dio lugar a la posibilidad de desarrollar modelos de animales transgénicos que puedan ser utilizados para evaluar el efecto de estas mutaciones sobre la fisiología cerebral y el potencial impacto de tratamientos experimentales. De esta manera surgió una serie de cepas de ratones que portan un transgén que les permite sobreexpresar la proteína APP humana mutada (Mhillaj, Cuomo, & Mancuso, 2017). El uso de este tipo de modelos cuenta con algunas ventajas que favorecieron su uso, cada vez más frecuente en la bibliografía. Entre estas ventajas se encuentra el pequeño tamaño de estos animales (en comparación a otras especies de mamíferos), y la relativa facilidad con que pueden ser manipulados genéticamente. La Tabla 1 resume las características de algunos de los modelos generados por esta tecnología que se encuentran entre los más comúnmente reportados.

Tabla 1. Algunos de los modelos transgénicos para APP humano de uso frecuente en la bibliografía específica y sus características relacionadas con la EA.

Modelo	Mutación/es	Neurodegeneración	Placas Amiloides	Angiopatía Cerebral Amiloide	Ovillos Neurofibrilares	Gliosis Reactiva (asociada a placas)	Impedimento Cognitivo
PD-APP	<i>Indiana</i>	No	Si (~6m)	Si (~12m)	No	Si	Si (~4m)
Tg2576	<i>Swedish</i>	No	Si (~7m)	Si (~12m)	No	Si	Si (~6m)
PDAPP-J20	<i>Indiana, Swedish</i>	Si (3m)	Si (~6m)	Si (~10m)	Evidencia de hiperfosforilación de TAU	Si	Si (~4m)
APP/PS 1	<i>Swedish PSEN1^{L166P}</i>	No	Si (~2m)	Si (~8m)	No	Si	Si (~7m)

La primera generación de animales transgénicos que modelizan la EA está compuesta por ratones que portan un transgén que permite la sobreexpresión de la proteína APP humana con mutaciones asociadas a la forma familiar de la patología. Los ratones PD-APP fueron los primeros en ser utilizados y descritos. Estos animales expresan la proteína APP humana bajo el control del promotor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF β). En su secuencia, APP porta la mutación *Indiana* (V717F), la cual fue una de las primeras en ser identificada como causa de EA familiar. En estos animales se evidencia la presencia de placas amiloides alrededor de los 6 meses de edad, sobre todo en corteza cerebral e hipocampo. Presenta elevados niveles de A β 1-42, atrofia hipocampal y daño sináptico en ausencia de muerte neuronal. Además, se han reportado alteraciones cognitivas (entre ellas, alteraciones en la memoria espacial) al ser evaluada con *tests* específicos (G. Chen et al., 2000; German, Nelson, Liang, Liang, & Games, 2005). Otros modelos de animales transgénicos para APP humano portan mutaciones dobles. Tal es el caso de la mutación doble *Swedish* (K670N y M671L), que se expresa bajo el control del promotor de la proteína priónica en el ratón Tg2576 o del promotor de Thy-1 en la cepa APP23 (Neha, Sodhi, Jaggi, & Singh, 2014).

Posteriormente, fueron descritas otras mutaciones en APP y se desarrollaron nuevos modelos de roedores transgénicos, combinando mutaciones o modificando el promotor involucrado. Los ratones PD-APP, por ejemplo, fueron posteriormente modificados para portar tanto la mutación *Indiana* como la doble mutación *Swedish* bajo el promotor de PDGF β , generando la cepa PDAPP-J20. Esta cepa ha sido caracterizada en la bibliografía, incluyendo trabajos publicados por nuestro grupo. Los ratones PDAPP-J20 retienen las características de la cepa PD-APP en cuanto al déficit cognitivo y cinética de formación de placas amiloides. Además de ello, se ha presentado evidencia de hiperfosforilación de Tau (Mucke et al., 2000; Simon et al., 2009). Nuestro grupo ha aportado a su caracterización reportando alteraciones tempranas en la memoria espacial, en la neurogénesis y signos de neurodegeneración (J. Beauquis et al., 2013; J Beauquis et al., 2013).

Por su parte, una nueva generación de modelos murinos de EA incluyó mutaciones en las proteínas que procesan APP, siendo la mejor descrita Presenilina-1. De esta manera, se generó la cepa PS1, que presenta placas amiloides, disfunción sináptica, alteraciones cognitivas y elevados niveles de A β 1-42. Finalmente, se generaron modelos multigénicos, combinando aquellos con mutaciones en APP y aquellos con mutaciones en Presenilina-1, generando la cepa APP/PS1 (Neha et al., 2014).

Una de las principales limitaciones de los modelos basados en roedores transgénicos para APP humano o Presenilina-1 es la falta de evidencia de una robusta patología Tau en el cerebro de estos animales, o bien que la dinámica de aparición de ovillos neurofibrilares no se condice con lo observado en pacientes con EA. Por esta razón, en el año 2003 Oddo y colaboradores (Oddo et al., 2003) generaron el modelo triple transgénico (3xTg-AD), con el objetivo de dilucidar los mecanismos que vinculan a las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares, tal como se desprende de la Hipótesis de la Cascada Amiloide. Estos roedores portan la mutación M146V en Presenilina-1, expresan la proteína APP humana con la doble mutación *Swedish*, y la proteína Tau humana con la mutación P301L, que favorece la formación de agregados de Tau hiperfosforilados y se asocia al desarrollo de demencia frontotemporal. La principal ventaja de este modelo radica en poder estudiar la interacción entre las proteínas APP y Tau humanas, ya que la proteína Tau murina también tiene importantes diferencias en su estructura primaria con la variante humana. Sin embargo, este modelo ha sido criticado por su lenta cinética de aparición de depósitos amiloides (Mhillaj et al., 2017) y el fenotipo conductual controvertido.

El uso de roedores transgénicos ha recibido principalmente dos críticas en la comunidad científica del campo de estudio de la EA. La primera se sustenta en el hecho de que al no desarrollar la patología naturalmente a partir de sus propios genes para APP y Tau, no son modelos fisiológicamente ideales para estudiar la EA. Por otro lado, al sustentarse en la presencia de mutaciones autosómicas dominantes, modelizan fundamentalmente la forma familiar de la patología, pero no garantizan que los mismos mecanismos estén involucrados en la forma esporádica (Drummond & Wisniewski, 2017). Se han realizado, por lo tanto, numerosos esfuerzos para desarrollar un modelo fisiológico que reproduzca experimentalmente la forma esporádica de la EA.

Algunas cepas de ratones han sido propuestas como modelos de EA esporádico, ya que no son transgénicos para proteínas humanas ni poseen mutaciones asociadas a la EA familiar. Tal es el caso de la cepa SAMP-8 (por las siglas en inglés de “*Senescence-Accelerated Mouse Prone 8*”). Estos ratones presentan un fenotipo de envejecimiento acelerado, alteraciones en la memoria y en el aprendizaje que no son atribuidos al efecto de un único gen. Comparados con cepas consideradas controles, estos ratones presentan alteraciones a nivel de genes y proteínas involucradas en procesos de neuroprotección, degradación de proteínas, transporte a través del citoesqueleto, respuesta neuroinflamatoria y producción de especies reactivas del oxígeno; todos procesos que se encuentran alterados durante la progresión de la EA

(Butterfield & Poon, 2005). En estos ratones, se ha reportado una tendencia hacia la vía amiloidogénica en el procesamiento de APP murino y elevados niveles de A β en el hipocampo. Más aún, el bloqueo de la expresión de APP previene algunas de las alteraciones de aprendizaje de estos ratones, reforzando la idea de que APP está relacionado con esta función (J.E. Morley, 2002; J. E. Morley et al., 2000). Sin embargo, este modelo no exhibe los eventos histopatológicos que caracterizan a la EA, o se presentan en edades muy avanzadas, de manera disociada a las alteraciones cognitivas. Por esta razón, algunos autores lo sugieren como un modelo de demencia asociada a la edad, pero se discute su uso como modelo de EA (Kumaraswamy et al., 2014). Adicionalmente, la multiplicidad de procesos afectados dificulta el estudio de la fisiopatología de la enfermedad en estos ratones.

Otras especies de animales no-mamíferos han sido consideradas en el desarrollo de modelos animales de EA. Sin embargo, el uso de estos modelos es relativamente escaso en la bibliografía, dada la falta de homología genética con humanos. Además, la menor complejidad del SNC y el espectro comportamental relativamente sencillo de estos animales dificulta la comparación con seres humanos. Entre estas especies se encuentra *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* y el pez cebra (*Danio rerio*). Si bien en todos ellos se han encontrado las versiones ortólogas de los genes que codifican para APP, Presenilina-1 y Tau, sus secuencias son muy diferentes a la humana. Además, *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* no producen A β , lo cual constituye un fuerte impedimento para su propuesta como modelos para el estudio de la EA. Entre las ventajas de estos modelos se encuentra su facilidad para ser manipulados y la posibilidad de contar con numerosas variantes genéticas (Alexander, Marfil, & Li, 2014; Fernandez-Funez, de Mena, & Rincon-Limas, 2015; Paquet et al., 2009).

Las especies que tienen patologías tipo EA mejor caracterizadas y con similitudes a la EA son los primates no-humanos. Sin embargo, el uso de grandes simios (chimpancés, gorilas y orangutanes) ha sido escaso hasta el momento debido fundamentalmente a que se trata de animales longevos. Por otro lado, si bien la patología amiloide está claramente reportada en simios de edad avanzada (Perez et al., 2013), la presencia de tauopatías es aún menos frecuente que en seres humanos (Rosen et al., 2008). Un punto a tener en cuenta a la hora de decidir sobre el uso de estos modelos animales, es que si bien la mayoría de estas especies presentan un 100% de homología con la secuencia de A β humano, este péptido puede sufrir una serie de modificaciones post-traduccionales, e incluso generarse otras variantes de A β que no están presentes en el cerebro humano (Rosen et al., 2016).

Entre las especies más alejadas al ser humano que se utilizan como modelos de EA espontáneo, se encuentran los perros y el degú (*Octodon degus*), un tipo de roedor filogenéticamente cercano a los cobayos (*Cavia porcellus*). La secuencia de A β canino es idéntica a la humana (tal como ocurre con primates no-humanos), y presenta placas amiloides y depósitos perivasculares a partir de los 8-9 años de edad, con una cinética similar a la esperada por comparación con los seres humanos (Schmidt et al., 2015). Además, los perros envejecidos con signos de EA presentan el mismo patrón de biomarcadores en líquido cefalorraquídeo que se observan en humanos, y alteraciones cognitivas que pueden ser detectadas por *tests* específicos (Schutt et al., 2016). Entre las desventajas de este modelo se encuentra la heterogeneidad entre sujetos, la falta de predictibilidad respecto de qué animales desarrollarán la patología y la longevidad de la especie. Además, al igual que algunos simios, tampoco presentan ovillos neurofibrilares (Smolek et al., 2016).

Si bien los modelos fisiológicos de EA esporádico fueron originalmente presentados como una gran promesa, existen aún limitaciones científicas (como falta de reproducibilidad de algunos eventos histopatológicos) y prácticas (como el largo periodo de tiempo que se debe esperar para el desarrollo de la patología) que hacen difícil su implementación en la investigación experimental. En este sentido, la ventaja de los modelos basados en roedores transgénicos se basa en la capacidad de estudiar cómo diferentes sistemas fisiológicos se pueden alterar por la sola acumulación de A β , y servir además como un sustrato que permite evaluar el impacto de potenciales terapias sobre el principal signo que caracteriza a la EA.

10. Tratamientos actuales y horizonte terapéutico

Previo al desarrollo de la hipótesis de la cascada amiloide, la investigación sobre esta patología estuvo dirigida por la observación de un déficit en neuronas colinérgicas en pacientes con EA, acompañada además de una menor actividad de la enzima colina acetiltransferasa. Esta evidencia, acompañada del hecho de que la neurotransmisión colinérgica está estrechamente vinculada con los procesos de aprendizaje y memoria que se alteran durante el desarrollo de la EA, llevó a la formulación de la hipótesis colinérgica (J. L. Cummings & Back, 1998). En el marco de esta hipótesis, los primeros tratamientos propuestos apuntaron a potenciar la neurotransmisión colinérgica. Tacrina fue el primer inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa en ser presentado al

mercado farmacéutico como un tratamiento para la EA, pero su comercialización fue luego limitada por ser severamente hepatotóxico (Briggs, Kennelly, & O'Neill, 2016). Posteriormente, otra generación de inhibidores de acetilcolinesterasa ha salido al mercado, como donepezilo, rivestigmina y galantamina, con un rango de acción más amplio y menos efectos adversos que la tacrina. Muchas de estas drogas aún son prescritas hoy en día para el tratamiento de la EA. Sin embargo, las mismas no detienen la neurodegeneración y resultan ser solamente tratamientos paliativos que mejoran los síntomas durante un período de tiempo relativamente corto (Birks & Harvey, 2003).

La excitotoxicidad por sobreexposición a glutamato es un fenómeno que tiene un rol clave en el proceso neurodegenerativo del cerebro con EA. Se ha propuesto que la principal causa de muerte de neuronas colinérgicas es un excesivo ingreso de calcio a través de los receptores glutamatérgicos sensibles a N-Metil-D-Aspartato (NMDA). Este principio es el que justifica la prescripción de otra de las drogas de uso más frecuente en pacientes con EA: la memantina. La memantina es un inhibidor no competitivo de los receptores NMDA, lo cual prevendría la muerte neuronal y mejoraría los síntomas cognitivos (Lipton, 2005). Si bien su uso en la clínica se sostiene hasta la actualidad, su eficacia está demostrada fundamentalmente en las etapas tempranas de la EA. En etapas de desarrollo moderado o avanzado de la patología, no ha mostrado generar ningún tipo de mejora cognitiva en los pacientes (Robinson & Keating, 2006).

Como se mencionara anteriormente, la neuroinflamación es otro de los eventos que caracteriza a la EA. Por lo tanto, este proceso también ha sido abordado como un potencial blanco terapéutico. El tratamiento con algunos antiinflamatorios no esteroideos en ensayos clínicos con pacientes ha demostrado tener efectos positivos sobre los síntomas de la enfermedad. Tal fue el caso de la indometacina (Rogers et al., 1993); sin embargo, el impacto del tratamiento ha demostrado ser fuertemente dependiente del estadio en el cual se aplica. Ensayos clínicos posteriores empleando otros antiinflamatorios no esteroideos han fallado (Feldman et al., 2010; Gold et al., 2010; Sparks et al., 2005; Van Gool, Weinstein, Scheltens, & Walstra, 2001).

De acuerdo a la hipótesis de la cascada amiloide, el evento disparador de la patología es la acumulación de péptidos amiloide. Por ello, se ha desplegado toda una serie de estrategias que tienen por objetivo lograr un óptimo balance de péptidos A β , ya sea inhibiendo su producción o facilitando su depurado. Dentro del primer grupo se encuentran los inhibidores de la enzima β -secretasa, que inicia el procesamiento de la

proteína APP por la vía amiloidogénica. El inhibidor de primera generación empleado fue desestimado luego de ensayos clínicos de fase I por su baja biodisponibilidad y su dificultad para atravesar la BHE. Los de segunda generación también fueron discontinuados, en este caso por ser severamente hepatotóxicos. Los inhibidores de la β -secretasa de tercera generación han llegado a ensayos clínicos de fase III, pero la compañía involucrada anunció en el año 2017 su discontinuidad por falta de efectividad en pacientes con EA moderada a severa (Hung & Fu, 2017).

Entre las terapias que facilitan el depurado de A β se ha hecho especial énfasis en la inmunización pasiva contra péptidos amiloides. Si bien esta estrategia ha sido exitosamente probada en determinados modelos animales, su aplicación a pacientes ha resultado muy difícil. Bapineuzumab, un anticuerpo monoclonal murino humanizado que reconoce el extremo N-terminal de A β ha presentado resultados muy promisorios en roedores, pero fue discontinuado en ensayos clínicos de fase III por su baja efectividad en humanos (Vandenberghe et al., 2016). A partir de este estudio se han intentado otros, empleando anticuerpos que reconocen diferentes epitopes, algunos de los cuáles interactúan con mayor afinidad por la forma monomérica, oligomérica soluble o fibrilar de A β . Algunas de estas drogas se encuentran actualmente en ensayos clínicos de Fase I o II. Sin embargo, hasta el día de hoy, ninguna inmunoterapia basada en anticuerpos contra A β ha logrado demostrar efectos que justifiquen su implementación (Hung & Fu, 2017).

En definitiva, luego de más de un siglo de investigación sobre la EA, ningún tratamiento farmacológico dirigido contra A β o alguna alteración puntual que forma parte del proceso patológico de la EA ha sido efectivo en detener o revertir los síntomas. Esto ha llevado a la comunidad científica a la aceptación de que, independientemente del rol de A β o Tau, estamos en presencia de una patología multifactorial (Carreiras, Mendes, Perry, Francisco, & Marco-Contelles, 2013). Por lo tanto, todo tratamiento dirigido contra un único factor probablemente sólo sea eficiente de manera parcial o lo sea en pocos casos. El desafío frente a esta afirmación radica en el aporte de conocimiento que permita identificar nuevas alteraciones y potenciales blancos terapéuticos, así como la interrelación entre los fenómenos afectados. En este sentido, la investigación básica biomédica resulta un pilar fundamental que sule de contenido los futuros pasos que se realicen en la clínica.

Un ejemplo claro de esto es la dificultad que implica realizar un diagnóstico certero de EA. La gran mayoría de los ensayos clínicos realizados hasta el día de hoy incorporan a pacientes que sólo tienen un diagnóstico clínico (a partir de pruebas para la

detección psiquiátrica de demencia). La falta de un criterio unificado o de la tecnología necesaria para realizar un diagnóstico basado en evidencias de patología amiloide o Tau hacen aumentar la heterogeneidad de respuestas en los pacientes que participan de los ensayos clínicos (J. Cummings, 2018).

En este sentido, investigadores y médicos trabajan intensamente en la actualidad para hallar un criterio unificado de diagnóstico de la enfermedad en etapas tempranas y en identificar nuevos blancos terapéuticos que puedan ser abordados antes de que se instale el cuadro neurodegenerativo.

Cap. 2

Objetivos Generales

El objetivo principal de esta Tesis es evaluar el rol de células gliales (astrocitos y microglía) y de la vasculatura cerebral en el proceso patológico de la EA, en sistemas experimentales *in vivo* e *in vitro*.

Esta Tesis parte de la hipótesis de que, en el contexto de una patología multifactorial como es la EA, la neurodegeneración sucede como consecuencia de eventos que ocurren no sólo de manera directa sobre las neuronas sino además de manera indirecta, mediada por la respuesta de otros tipos celulares al contexto patológico. Por esta razón, se ha decidido realizar el estudio sobre tres tipos celulares altamente involucrados en la homeostasis cerebral e íntimamente relacionados entre sí y con las neuronas como parte de la UNV: la microglía, los astrocitos y el endotelio cerebral.

El abordaje sobre estos tipos celulares se realizará *in vivo* empleando el ratón PDAPP-J20, modelo experimental de EA familiar. Se utilizarán ratones de diferentes edades con el objetivo de evaluar la progresividad de las alteraciones. La caracterización de las alteraciones individuales en cada tipo celular, la modulación de procesos intracelulares y el estudio de las vías involucradas se abordará mediante sistemas *in vitro* empleando líneas celulares de uso frecuente en el área de investigación.

De manera transversal al estudio del endotelio cerebral, la microglía y la astrogliá, se proponen los siguientes objetivos particulares:

- Describir en el ratón PDAPP-J20 potenciales alteraciones que ocurriesen antes de la presencia de placas amiloides, y que por lo tanto puedan ser propuestas en un futuro para el desarrollo de estrategias de diagnóstico temprano o nuevos blancos terapéuticos.
- Evaluar la capacidad de los 3 tipos celulares de modular su flujo autofágico en respuesta al contexto patológico -en particular a los péptidos amiloides-, y el potencial impacto que esto pudiera tener sobre la progresión de la patología.
- Identificar vías involucradas en la integración de la respuesta neuroinflamatoria entre estos tres constituyentes de la UNV. Para ello se evaluará *in vivo* la evidencia de activación glial y de disrupción de la BHE, siendo estos eventos característicos de las enfermedades con un componente neuroinflamatorio. Se estudiará la influencia de las células gliales sobre la activación endotelial como mecanismo de integración entre los tres tipos celulares en estudio.

En definitiva, estos objetivos han sido planteados con la finalidad de comprender la contribución de astrocitos, microglía y endotelio cerebral al contexto patológico de la EA, posicionándolos como posibles blancos terapéuticos para un futuro. De esta

manera, esta Tesis se enmarca dentro de un paradigma de trabajo que se ha instalado en los últimos años respecto de la investigación sobre la EA. Este nuevo paradigma pretende contemplar la alta complejidad de las interacciones entre los tipos celulares que constituyen la UNV, y su aporte al proceso patológico. El carácter sumamente complejo de esta enfermedad multifactorial y la ausencia en la actualidad de tratamientos médicos efectivos ponen de relevancia la importancia del aporte de la investigación biomédica básica al conocimiento de la naturaleza de la patología y los eventos involucrados tempranamente.

Cap. 3

Microglía

1. Introducción

Morfología y activación microglial.

El primer reporte identificando células cerebrales con características de microglía fue realizado a finales del siglo XIX por Nissl y Robertson (Gomez-Nicola & Perry, 2015). Unos años más tarde, Nissl y Alzheimer establecerían una primera relación entre estas células y sus cambios morfológicos en diferentes condiciones neurológicas. En el año 1919, Pío del Río Hortega identificó como células de la microglía a aquellas con morfología ameboide que se observaban en la cercanía a depósitos amiloides y eran positivas para la tinción con carbonato de plata (Ginhoux et al., 2013). Desde entonces, se ha acumulado evidencia acerca de las diferentes funciones de estas células, tanto en la homeostasis cerebral como en diferentes patologías que afectan al SNC (Clayton, Van Enoo, & Ikezu, 2017).

Una de las características distintivas de la microglía es su capacidad para responder rápidamente a estímulos ambientales generando un cambio morfológico (Karperien, Ahammer, & Jelinek, 2013). Numerosos autores sostienen que la morfología microglial se expresa dentro de un espectro que va desde un fenotipo ramificado hacia uno ameboide (Fontainhas et al., 2011). Algunos autores incluyen además uno o dos estadios intermedios, caracterizados por tener procesos celulares gruesos y retraídos y/o un soma redondeado y ligeramente hipertrofiado respecto del estado ramificado (Franco & Fernandez-Suarez, 2015). La microglía ramificada también ha sido denominada como “microglía de vigilancia”. Se les atribuye a sus largas y finas proyecciones celulares la capacidad de hacer contacto con numerosas sinapsis y detectar la potencial presencia de agentes neurotóxicos. La microglía ameboide, por su parte, es la que mayor motilidad posee y generalmente está asociada a focos de daño. La morfología ameboide también se hace presente durante el desarrollo embrionario, en el cual estas células se desplazan grandes distancias para invadir todo el tejido que constituye al cerebro en formación (Fontainhas et al., 2011; Hinwood, Morandini, Day, & Walker, 2012; Karperien et al., 2013).

La morfología microglial está finamente regulada por la neurotransmisión. A través de su contacto con múltiples sinapsis, un exceso en la neurotransmisión excitatoria puede inducir cambios en la morfología de la microglía ramificada. Este proceso ocurre a través de un mecanismo que es dependiente de la señalización por ATP extracelular (Fontainhas et al., 2011; Hong et al., 2016).

La microglía puede experimentar importantes cambios morfológicos debidos al envejecimiento. Para la detección de la microglía en el contexto tisular se suelen utilizar proteínas cuya expresión es compartida con los macrófagos, como la proteína de unión a calcio Iba1 (siglas provenientes del inglés “*ionize calcium binding adapter molecule 1*”) y el receptor de membrana F4/80. Empleando este tipo de técnicas, se ha reportado que la microglía ramificada o de vigilancia es menos dinámica, menos compleja morfológicamente y se mueve más lentamente en ratones de edad avanzada, lo cual probablemente tenga un efecto negativo sobre su capacidad de responder a agentes tóxicos (Clayton et al., 2017; Damani et al., 2011). Además, el envejecimiento sensibiliza la capacidad de activación de la microglía, generando un estado neuroinflamatorio de bajo grado, que puede predisponer a condiciones patológicas (Z. Chen et al., 2012). En este sentido, la respuesta neuroinflamatoria no es independiente de la activación del sistema inmune periférico, ya que las citoquinas solubles pueden ingresar directamente al tejido nervioso y facilitar la activación microglial (Graeber, Li, & Rodriguez, 2011).

Marcando un paralelismo con lo que se estableció para el caso de los macrófagos hace unas décadas, se ha propuesto, de manera simplificada, que el proceso de activación microglial culmina en dos posibles fenotipos: M1 y M2 (Colton, 2009). La activación del tipo M1 o “activación clásica” es causada por la presencia de moléculas pro-inflamatorias, como IFN- γ , TNF α y LPS, en respuesta a las cuales secreta una serie de citoquinas pro-inflamatorias como TNF α , IL-6, IL-12, IL-1 β , y agentes citotóxicos como especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno. Por ello se dice que el fenotipo M1 promueve la neurotoxicidad y amplifica la respuesta inflamatoria. El fenotipo de activación M2 o “activación alternativa” en cambio, presenta características anti-inflamatorias y una elevada actividad fagocítica. Este fenotipo generalmente se induce en presencia de IL-4 y se caracteriza por la liberación de IL-10, IGF-1 y TGF- β (Cherry, Olschowka, & O'Banion, 2014; Dimayuga et al., 2007). Hoy en día, este modelo de activación bipolar ha sido modificado para ser pensado como un espectro, donde M1 y M2 son dos extremos posibles. Otros autores, sin embargo, proponen instancias intermedias entre estos dos estados opuestos y hablan de un perfil compuesto por distintas moléculas cuya expresión puede modificarse (Martinez & Gordon, 2014).

Activación microglial en la EA

La función microglial es necesaria y promueve la reparación tisular luego de eventos de daño agudo. Sin embargo, su activación crónica en el contexto de la EA conduce a

la liberación sostenida de moléculas pro-inflamatorias y agentes citotóxicos que colaboran con la instalación de un cuadro neurodegenerativo. El daño neuronal a su vez actúa como estímulo para favorecer aún más la activación microglial, iniciando así un proceso de retroalimentación positiva que potencia la neuroinflamación y la neurodegeneración. Histológicamente, este proceso se evidencia por la presencia de microglía hipertrofiada, altamente reactiva, lo cual se denomina “microgliosis reactiva” (Clayton et al., 2017).

Durante los últimos años, el desarrollo de técnicas de transcriptómica a nivel de célula única permitió estudiar con mayor detalle un fenómeno tan complejo y heterogéneo como es la activación microglial. Empleando ratones transgénicos que modelizan la EA y otras enfermedades neurodegenerativas, este tipo de técnicas permitió identificar un fenotipo particular de células microgliales (Keren-Shaul et al., 2017). Estas células se denominaron Microglía Asociada a Enfermedad (DAM, siglas en inglés de “*Disease-Associated Microglia*”). Estas células no pueden ser definidas como M1 o M2, ya que presentan marcadores mixtos. Una particularidad de la microglía DAM es que su presencia en contextos neurodegenerativos es progresiva, y su inducción depende de la actividad del receptor de membrana TREM2 (por las siglas en inglés de “*Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2*”). La haplodeficiencia o falta total del receptor TREM2 en ratones transgénicos que modelizan la EA produce una menor acumulación de microglía ameboides en la cercanía a placas, posiblemente microglía DAM (Zhou, Ulland, & Colonna, 2018). Curiosamente, ciertos polimorfismos de este receptor están asociados a un mayor riesgo de padecer EA (Silvin & Ginhoux, 2018).

Los niveles de la citoquina pro-inflamatoria IL-1 β se encuentran elevados en el cerebro de pacientes con EA (Griffin et al., 1989). Las células microgliales son la principal fuente de IL-1 β cerebral, que se sintetiza a través de complejos multiproteicos de alto peso molecular, denominados inflammasomas. Los inflammasomas son necesarios para el procesamiento y secreción de citoquinas pro-inflamatorias. En el contexto de la EA, los inflammasomas del tipo NLRP3 han sido los más estudiados, compuestos por proteínas NLRP3 (que le dan el nombre), proteínas adaptadoras de la familia ASC y Caspasa-1. Los componentes de estos complejos se ensamblan en respuesta a diferentes estímulos y favorecen el clivaje de Pro-IL-1 β a través de Caspasa-1 que la convierte en IL-1 β (Gold & El Khoury, 2015).

El proceso de activación microglial ha sido ampliamente estudiado en etapas avanzadas de la EA, tanto en modelos animales como en pacientes. Sin embargo, existen pocas evidencias sobre su posible rol en etapas tempranas. Uno de los pocos

reportes que existen al respecto es un trabajo reciente de Boza Serrano y colaboradores (Boza-Serrano, Yang, Paulus, & Deierborg, 2018), que emplea el ratón 5xFAD, el cual porta 2 mutaciones en el gen humano que codifica para Presenilina-1 y 3 mutaciones en el gen humano de APP (*Swedish, Florida y London*). En ese trabajo los autores utilizaron ratones de 6 a 10 semanas de edad y generaron muestras a partir de homogenato de cerebro que fueron procesadas para la detección por espectrometría de masa, realizando un análisis de proteómica. El estudio demostró un aumento de los niveles de moléculas relacionadas con el proceso neuroinflamatorio en los ratones transgénicos, con especial énfasis en la activación de las vías de IL-10, IL-1 β y algunas quinasas de la familia MAP. Sin embargo, el trabajo no contempla la posibilidad de que estas alteraciones provengan de otras poblaciones celulares, e incluso puedan estar afectadas por citoquinas que provengan de la periferia. Otra observación tiene que ver con el modelo empleado, conocido por ser agresivo en la aparición y desarrollo de placas amiloides tempranamente (8 semanas). No obstante, con el objetivo de lograr una mayor similitud en cuanto al contexto patológico experimental y a la enfermedad en humanos, sería deseable el estudio de alteraciones microgliales en etapas tempranas empleando modelos con una cinética de depósito de A β más progresiva.

Microglía y proteostasis en la EA.

La EA y (en menor medida) el envejecimiento fisiológico están asociados a pérdida de la proteostasis, alteraciones en la capacidad de detectar la disponibilidad de nutrientes, disfuncionalidad mitocondrial y senescencia celular (Lopez-Otin, Blasco, Partridge, Serrano, & Kroemer, 2013). La mayoría de estos factores actúan como estímulos que modulan los niveles de autofagia y fagocitosis (Rubinsztein, Marino, & Kroemer, 2011).

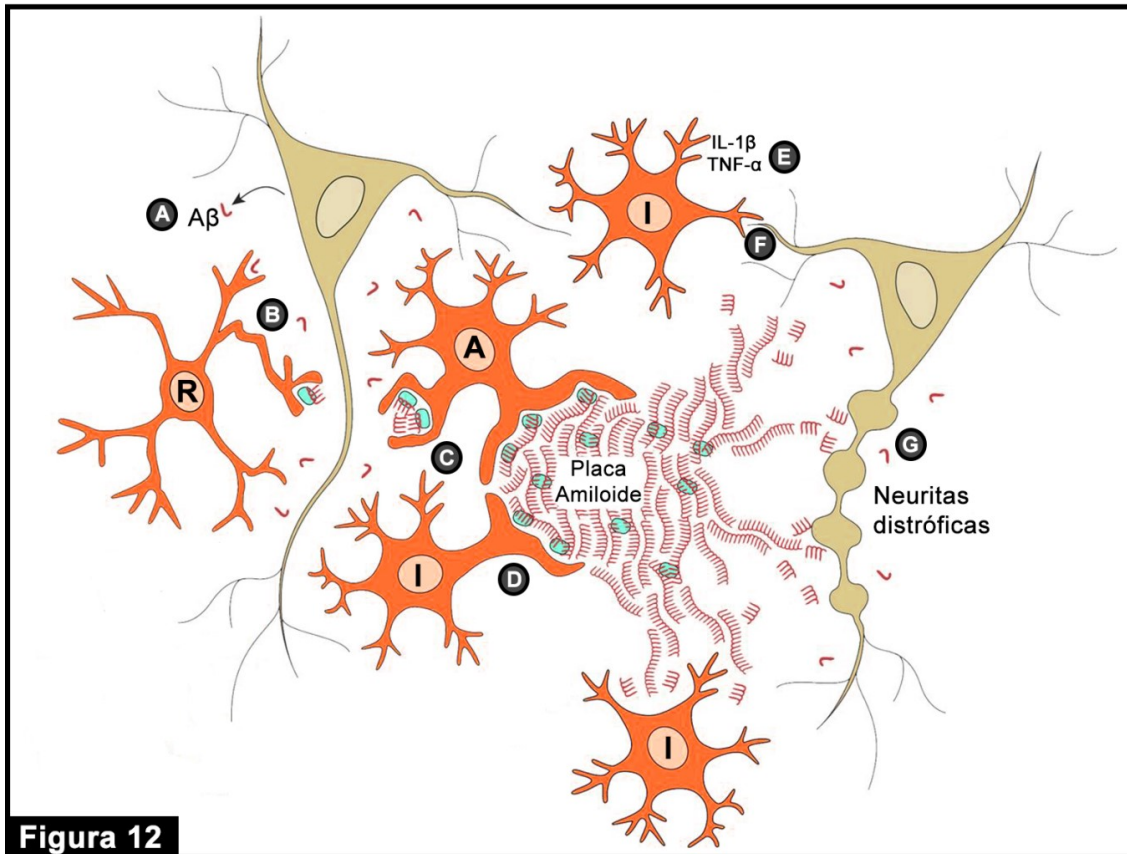
La fagocitosis microglial juega un rol clave en el contexto de la EA, ya que es una de las vías involucradas en el depurado de A β . El estado de agregación de A β debe ser tenido en cuenta, ya que las fibrillas insolubles aumentan la capacidad fagocítica de estas células mientras que los oligómeros solubles la disminuyen (Pan et al., 2011). En etapas tempranas de la EA predominan las formas solubles de A β , el cual se mantiene luego en equilibrio con su forma fibrilizada. Por lo tanto, este menor estadio de agregación podría ser clave para comprender el rol de la microglía durante el inicio del cuadro patológico.

La fagocitosis y la autofagia comparten aspectos morfológicos y mecanísticos. Ambos procesos dependen de la formación transitoria de estructuras vesiculares (autofagosomas o fagosomas) que luego son capaces de fusionarse con lisosomas para la degradación de su contenido. Más aún, la fagocitosis y la autofagia son mecanismos primitivos de adquisición de nutrientes que han evolucionado con roles claves en el mantenimiento de la proteostasis tisular e intracelular (Plaza-Zabala, Sierra-Torre, & Sierra, 2017). La mayoría de los estudios relacionados con autofagia y fagocitosis en contextos de neurodegeneración y envejecimiento se han enfocado principalmente en las neuronas. Sin embargo, existe un interés reciente y creciente en el estudio de la autofagia microglial como uno de los mecanismos involucrados en el depurado de A β . En este sentido, un estudio pionero de Cho y colaboradores destaca la capacidad de las células microgliales en condiciones *in vitro* para degradar péptidos A β por la vía autofágica (Cho et al., 2014). En ese trabajo se demostró que los componentes constitutivos de esta vía son necesarios tanto para la internalización como para la degradación del A β extracelular.

La respuesta neuroinflamatoria y el proceso autofágico en células microgliales no son eventos independientes entre sí, sino que se encuentran mutuamente regulados. Así ha sido demostrado a través del uso de modelos *in vivo* e *in vitro* de diferentes enfermedades neurodegenerativas. Empleando la línea celular microglial de ratón BV-2 y cultivos primarios de microglia, Bussi y colaboradores demostraron que el tratamiento con trealosa y rapamicina (inductores de la autofagia) disminuye la producción de citoquinas pro-inflamatorias ante estímulos con LPS y α -sinucleína (Bussi et al., 2017), sugiriendo una relación entre ambas vías. Asimismo, Wang y colaboradores sugieren que el impedimento en el flujo autofágico favorece la activación de inflammasomas NLRP3 en modelos experimentales de activación microglial por exposición a manganeso. A través de la inyección intraventricular de manganeso a ratones o de la exposición directa sobre células BV-2, demuestran que la acumulación de autofagosomas y el daño lisosomal actúan como estímulos para el ensamblado de inflammasomas y la síntesis de IL-1 β (D. Wang et al., 2017). La naturaleza bidireccional de esta interacción ha sido demostrada recientemente. En células BV-2 se demostró que la inhibición del proceso autofágico favorece el ensamblado de inflammasomas y síntesis de IL-1 β ; mientras que el silenciamiento de NLRP3 favorece el flujo autofágico. Esta interacción también ha sido demostrada en el contexto de la enfermedad priónica experimental, en la cual el tratamiento de células BV-2 con la proteína PrP produce disfunción autofágica mediada por la activación microglial (Lai et al., 2018).

A partir de lo dicho anteriormente, las células microgliales son consideradas un actor clave en la instalación del cuadro patológico de la EA. Esta posición central se debe no sólo a su rol en la respuesta neuroinflamatoria, sino además a su capacidad de participar del depurado de A β . Este cuadro se complejiza aún más al considerar que ambos fenómenos podrían ser mutuamente regulados. La Figura 12 resume de manera esquemática las posibles respuestas que las células microgliales presentarían ante la exposición a A β , según lo desarrollado previamente.

El estudio de estos procesos en el contexto de la EA es sumamente importante ya que las células microgliales emergen como un potencial blanco para futuros tratamientos terapéuticos. Por el momento, estas células se encuentran bien caracterizadas en cuanto a su potencial capacidad para fagocitar péptidos A β y degradarlos, posiblemente mediante el mecanismo de autofagia. A pesar de ello, existen muy pocos trabajos orientados a comprender cómo esa capacidad podría verse afectada en un contexto más complejo caracterizado por la exposición crónica a A β o por la presencia de otros tipos celulares.

**Figura 12**

▲ **Activación y respuesta microglial en el contexto de la EA.** En el esquema se representan células de la microglía (naranja) y neuronas (amarillo verdoso) en íntimo contacto con péptidos Aβ y una placa amiloide. El amiloide es producido y liberado al medio extracelular en su forma monomérica por parte de las neuronas (A). Allí puede ser endocitado por células microgliales con fenotipo ramificado a través de macropinocitosis o por fagocitosis al estar acomplexado con proteínas (B, los óvalos celestes corresponden a proteínas). En la cercanía a la placa amiloide predominan las formas oligoméricas de alto peso molecular y las fibrillas insolubles, así como células microgliales con fenotipo hipertrofiado. Estas células internalizan los agregados a través de fagocitosis (C) y envían proyecciones celulares hacia la placa, lo que restringe el foco de inflamación (D). Si el daño no es resuelto y la activación microglial se vuelve crónica, se puede inducir un fenotipo de activación del tipo M1, caracterizado por la liberación de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1β y TNF-α (E), las cuales pueden ser neurotóxicas y sinaptotóxicas (F). En este mismo contexto las neuronas presentan signos patológicos, evidenciados típicamente como neuritis distróficas (G). Sin embargo, aún está en discusión si estos signos de daño neuronal son consecuencia de un cuadro neuroinflamatorio previo o si simplemente son otro estímulo para la activación microglial. Las letras en las células microgliales indican su grado morfológico de activación. R: estadio ramificado; A: estadio ameboide; I: estadios intermedios. La Figura fue modificada a partir de la publicada por Hansen y colaboradores (Hansen, Hanson, & Sheng, 2018).

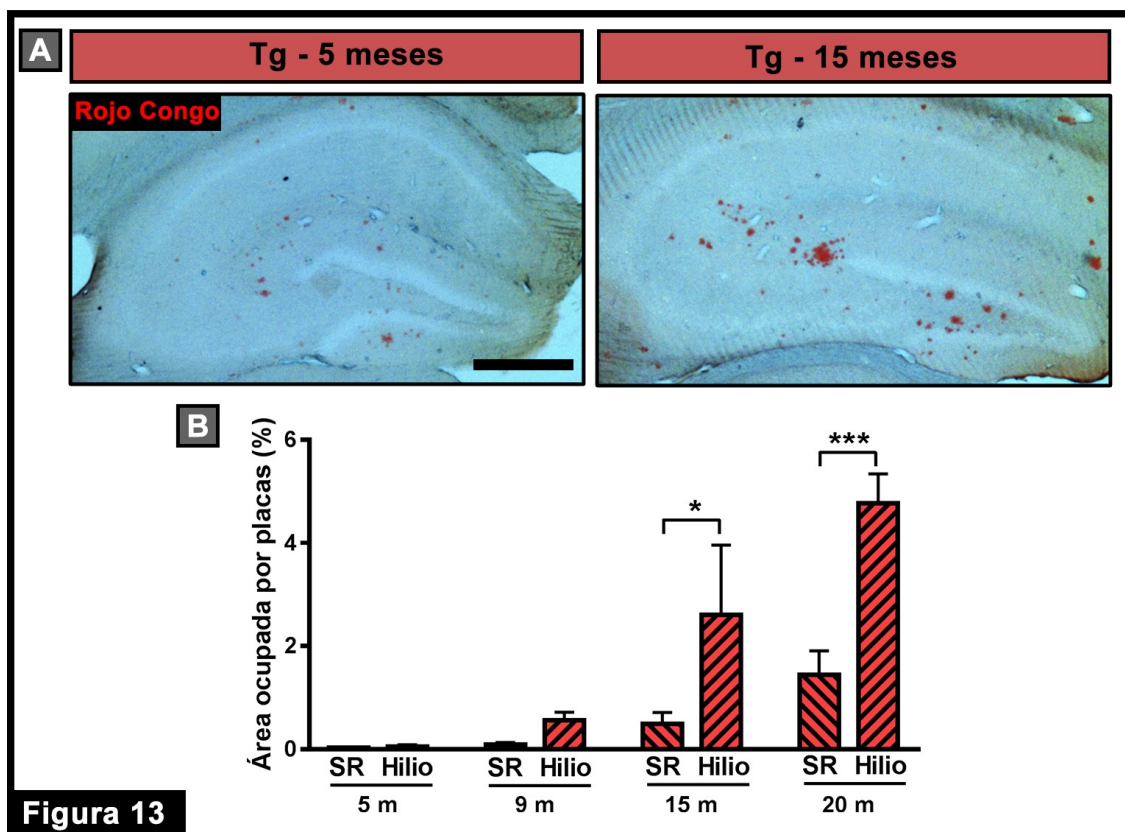
2. Objetivos e Hipótesis

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, los objetivos particulares correspondientes a este Capítulo son:

1. Caracterizar el proceso de activación de la microglía hipocampal desde el punto de vista morfológico durante la progresión patológica del ratón PDAPP-J20 y comparar la evolución de estas alteraciones con el depósito de placas amiloides, haciendo especial énfasis en aquellos cambios que ocurren en células microgliales en etapas tempranas de la enfermedad. En este sentido, se plantea la hipótesis de que *la microglía adquiere progresivamente signos morfológicos de activación y que los mismos estarían presentes (aunque de manera sutil) desde etapas previas a la presencia de placas amiloides.*
2. Evaluar el estado del flujo autofágico en células microgliales como un mecanismo relevante para el depurado de A β en el SNC mediante el estudio de marcadores autofágicos en cortes histológicos, comparando los fenómenos que ocurren en células microgliales asociadas a depósitos amiloides y no asociadas. Asimismo, se propone el desarrollo de un modelo *in vitro* de exposición a fibrillas de amiloide que emule la situación de contacto entre microglía y placas que permita estudiar este proceso de manera dinámica. En este punto se plantea la hipótesis de que *el flujo autofágico se encuentra impedido en células de la microglía como parte de las alteraciones patológicas que ocurren ante la presencia de A β .*

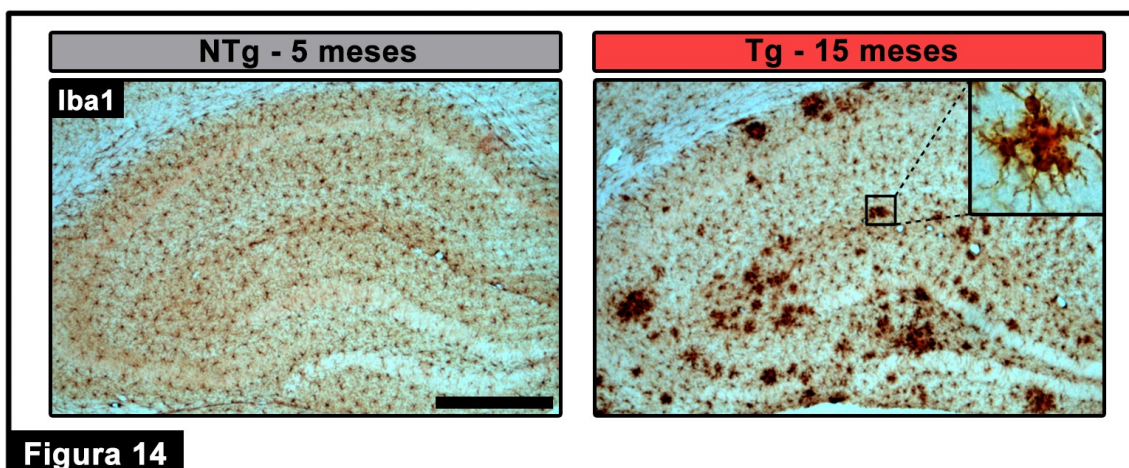
3. Resultados

El uso de modelos experimentales robustos es particularmente relevante para el estudio de los procesos biológicos que subyacen a diferentes patologías. En el caso de la EA, el ratón PDAPP-J20 es un modelo ampliamente validado en la bibliografía. Esta cepa de ratones presenta deterioro cognitivo, depósitos amiloides y reactividad glial en el hipocampo y corteza cerebral, procesos que se instalan de manera progresiva durante la vida de los animales, tal como demostró nuestro grupo y otros (Mucke et al., 2000; Pomilio et al., 2016). La presencia de placas amiloides puede evidenciarse en cortes histológicos a través de la tinción con Rojo Congo (Figura 13A). Según esta técnica, a los 5 meses de edad, los ratones Tg prácticamente no presentan placas amiloides en su hipocampo. Entre los 5 y los 9 meses de edad, la presencia de depósitos comienza a hacerse evidente, sobre todo en la sub-región del hilio del giro dentado. A los 9 meses, el 0,2% del área del hilio está cubierta por placas amiloides, lo cual aumenta aproximadamente 8 veces al llegar a la edad de 15 meses. Comparativamente, otra subregión del hipocampo (como el área de *stratum radiatum* bajo CA1) también presenta una dinámica de aumento en la carga amiloide, pero de inicio más tardío y en valores moderados en comparación a los que se observan en el hilio (Figura 13B). Dada la observación de que la presencia de placas amiloides (signo determinante de la presencia de la patología) se detecta primariamente en el hilio del giro dentado y que llega a valores más elevados que en otras zonas, los estudios histológicos que se muestran a continuación son analizados en esta región, a excepción que se indique lo contrario.



▲ **Progresión de la carga amiloide en el hipocampo del ratón transgénico PDAPP-J20.** En el panel superior se muestra imágenes representativas obtenidas con microscopía óptica (A). A través del análisis de estas imágenes se cuantificó el porcentaje de área ocupada por placas (B) y el tamaño individual de cada placa (C). La barra de escala corresponde a 300µm. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos las regiones del Hilio y stratum radiatum (SR) (ANOVA de dos vías seguido de comparaciones múltiples de Sidak, * $p > 0,05$, *** $p > 0,001$)

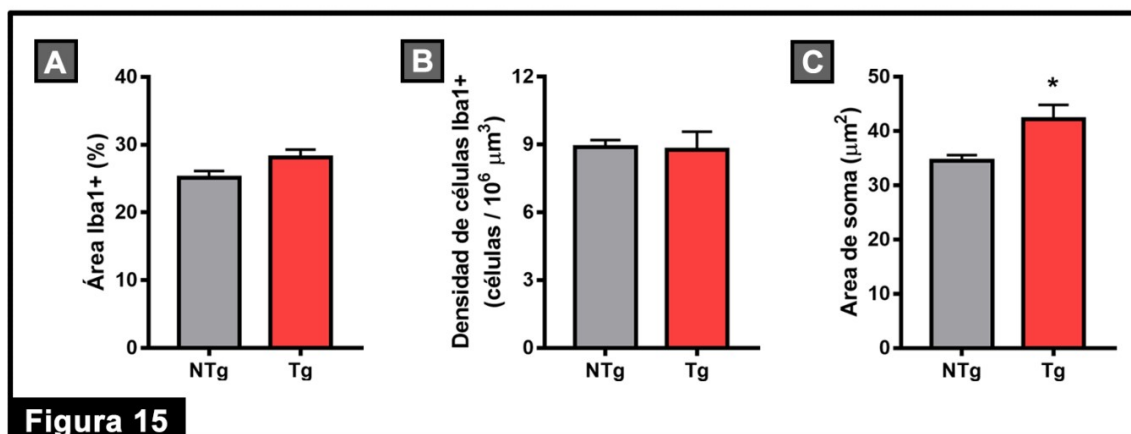
Las células de la microglía son los efectores del sistema inmune en el SNC. Expresan la proteína Iba1, que es un validado marcador de esta población celular. A través del procesamiento con inmunohistoquímica contra Iba1 en cortes coronales se cerebro de ratón de 5 meses de edad se hace evidente que en el hipocampo estas células presentan una distribución uniforme a lo largo de toda la estructura (Figura 14). Ante un evento de daño, las células de la microglía pueden activarse, presentar un soma hipertrofiado y movilizarse hacia el foco del daño. En el contexto de la EA, se observan células de la microglía con estas características en el hipocampo de ratones Tg de 15 meses de edad en la cercanía a placas amiloides (Figura 14).

**Figura 14**

▲ **Patrón de inmunoreactividad para Iba1 en el hipocampo de ratones PDAPP-J20.** Imágenes representativas de una inmunohistoquímica para Iba1, donde se observan claramente los cambios en la reactividad para este marcador microglial y la distribución de células entre animales NTg en etapas tempranas (5 meses, izquierda) y Tg en etapas avanzadas (15 meses, derecha) de la enfermedad. En el caso de los animales más viejos, se muestra con mayor detalle la morfología de las células microgliales asociadas a una placa amiloide Rojo Congo+. La barra de escala representa 300 μm .

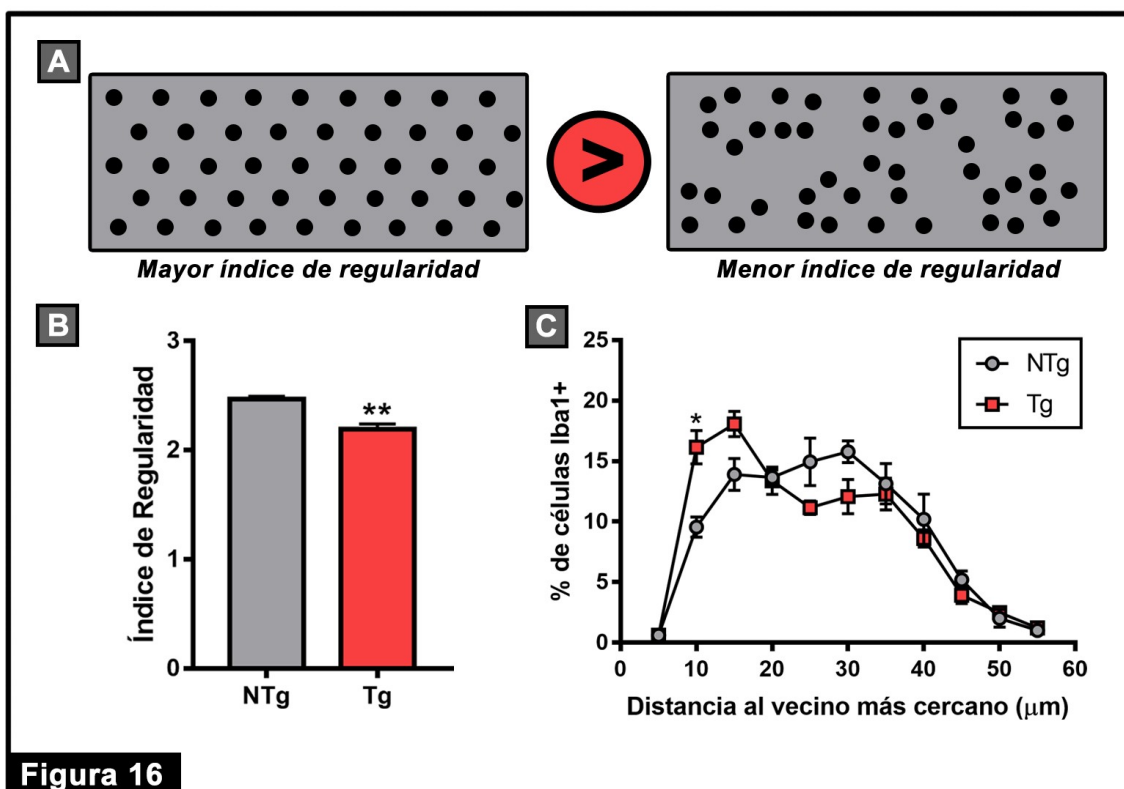
Indicios de activación microglial en el hipocampo del ratón PDAPP-J20 durante estadíos tempranos.

Inicialmente, se caracterizaron las posibles alteraciones que la población de células de la microglía podría presentar en el hipocampo durante etapas previas a la presencia de depósitos amiloides. El análisis de la inmunohistoquímica contra Iba1 en el hilio del giro dentado demostró que a los 5 meses de edad no hay diferencias significativas en el área inmunoreactiva total para este marcador (Figura 15A). Este parámetro puede a su vez estar influenciado tanto por el número de células como por el espacio que ocupa cada una de ellas. Si bien no se hallaron diferencias respecto del número total de células (Figura 15B), el área del soma celular presentó un aumento significativo del 22,0% en los animales Tg respecto de los NTg (Figura 15C), sugiriendo una hipertrofia sutil pero detectable en esta etapa temprana de la patología.



▲ Alteraciones tempranas en la densidad y el tamaño de células microgliales en el hipocampo de ratones PDAPP-J20. Sobre cortes coronales procesados para inmunohistoquímica contra Iba1, se analizó el área Iba1+ (A) así como la densidad microglial (B) y el área ocupada por el soma de cada célula individual (C). Los asteriscos representan diferencias entre animales Tg y NTg (Test de t para dos muestras independientes, * $p < 0,05$).

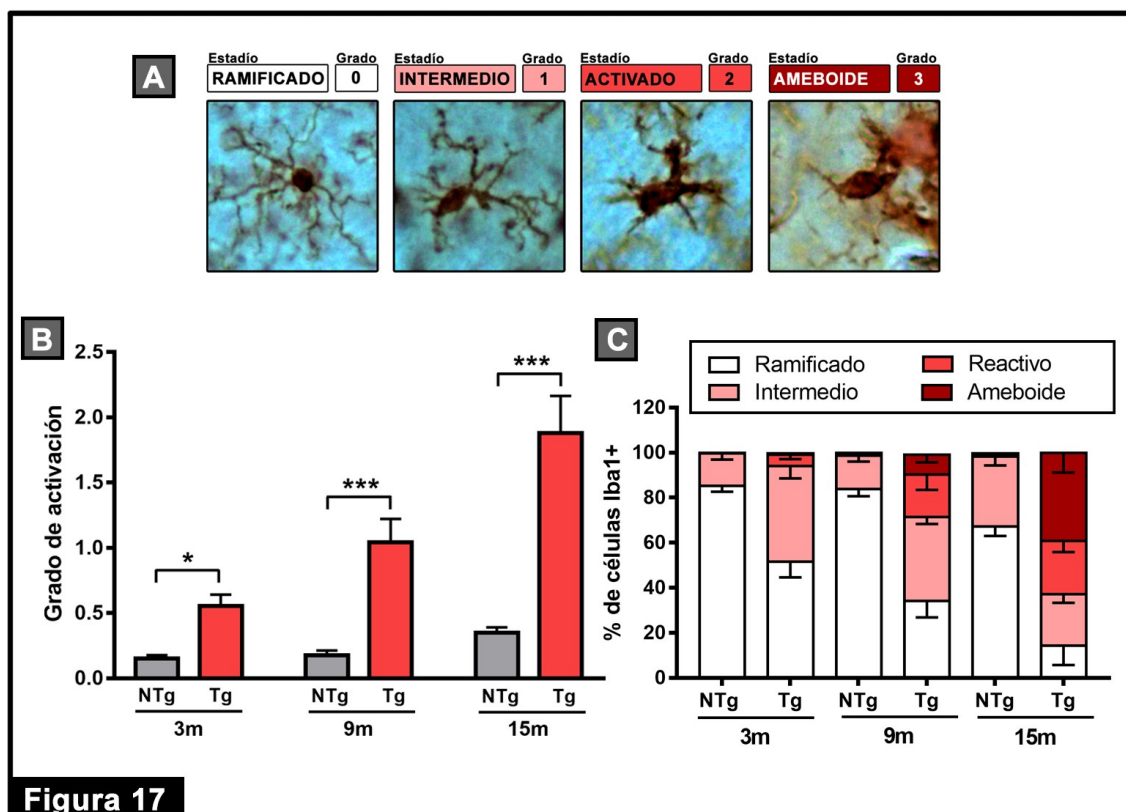
La distribución de células de la microglía en el espacio puede ser un indicativo del grado de activación de las mismas. Al activarse, estas células adquieren la capacidad de migrar y alejarse de la distribución homogénea que las caracteriza en condiciones basales. Esto puede ser cuantificado a través de un índice de regularidad que se calcula a partir de la distancia entre cada célula y su célula adyacente más cercana (Figura 16A). En animales de 5 meses de edad, hay una disminución significativa de la regularidad en la distribución de células Iba1+ en animales Tg respecto de sus hermanos NTg (Figura 16B). La Figura 16C muestra la distribución de frecuencias de distancias entre cada célula y su vecino más cercano, donde se observa claramente que en los animales Tg hay un aumento de la población de células que están más cercanas entre sí, sugiriendo que hay algún tipo de reclutamiento entre las mismas.

**Figura 16**

▲ **Alteraciones en la distribución de células microgliales en el hipocampo de ratones PDAPP-J20.** Sobre cortes coronales procesados para inmunohistoquímica para Iba1, se determinó la regularidad en la distribución de células microgliales del hilio del giro dentado a través de un índice de regularidad que contempla la medición de la distancia al vecino más cercano para cada célula. El panel superior muestra de manera esquemática el cambio de una distribución uniforme a una agrupada (A), lo cual se manifiesta en un menor índice de regularidad, tal como se observó para las células microgliales en ratones Tg de 5 meses de edad (B). La distribución de la distancia al vecino más cercano, muestra que efectivamente la moda de la distancia para ratones Tg es inferior a la de ratones NTg. Los asteriscos representan diferencias entre animales Tg y NTg (Panel B: Test de T para dos muestras independientes, ** $p < 0,01$; Panel C: ANOVA de medidas repetidas seguido de comparaciones de Tukey, * $p < 0,05$).

El grado de activación de las células de la microglía puede evaluarse a través de las características morfológicas de las mismas. Luego de clasificar a células seleccionadas independientemente en un posible estadio de activación (se consideraron estadios crecientes de 1 a 4 de acuerdo a sus características morfológicas, tal como se indica en la Figura 17A), se puede elaborar un índice de activación que contempla un grado asignado a cada estadio y su frecuencia. El índice de activación fue en todas las edades significativamente mayor en animales Tg respecto de sus hermanos NTg (Figura 17B). A las edades de 9 y 15 meses, el aumento de este índice puede explicarse fundamentalmente por el aumento de la frecuencia de células con el fenotipo amebioide, que son aquellas de mayor grado de activación y que típicamente rodean a las placas amiloides. Llamativamente, a los 3 meses de edad (cuando aún no se evidencian placas amiloides), el índice de

activación es 3,65 veces mayor en animales Tg. Este aumento se debe fundamentalmente a una mayor proporción de células con el fenotipo intermedio en detrimento de células con el fenotipo ramificado (Figura 17C).

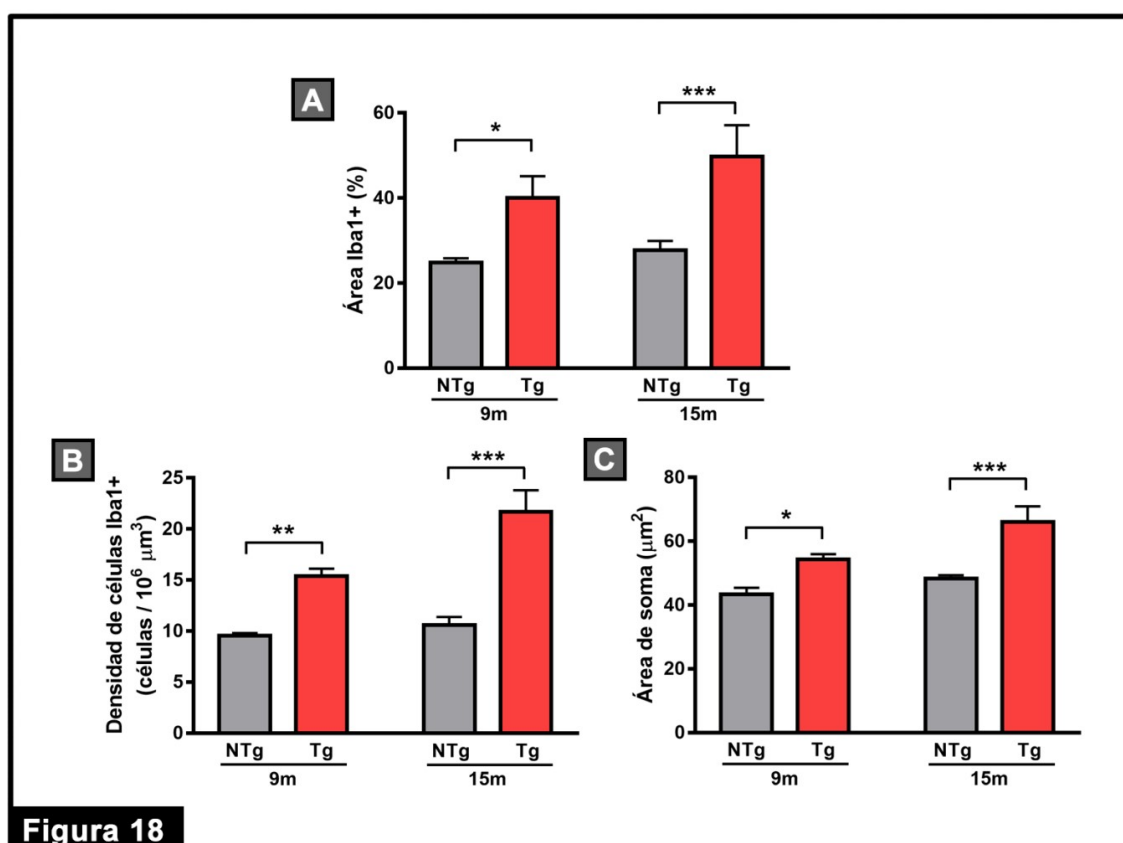


▲ **Evaluación morfológica del grado de activación de células microgliales en el hipocampo de ratones PDAPP-J20.** Se evaluó el grado de activación individual de al menos 25 células Iba1+ por corte histológico seleccionadas al azar, empleando 6 cortes representativos de todo el hipocampo por animal. Al clasificarlas en 1 de 4 posibles estadios crecientes de activación (A) se determinó un índice de activación a partir del promedio de los grados de activación ponderado por las frecuencias de cada uno (B). Asimismo, se muestra el cambio porcentual en cada estadio de activación para ratones Tg y NTg de cada edad (C). Los asteriscos representan diferencias singnificativas entre grupos Tg y NTg de la misma edad (ANOVA de dos vías, seguido de comparaciones múltiples de Sidak, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

En su conjunto estos resultados demuestran que, a una edad en la cual no se detectan depósitos amiloides, las células de la microglía ya presentan globalmente alteraciones que indicarían un estadio incipiente de activación: mayor tamaño del soma, pérdida de la regularidad en la distribución espacial y mayor índice de activación morfológica.

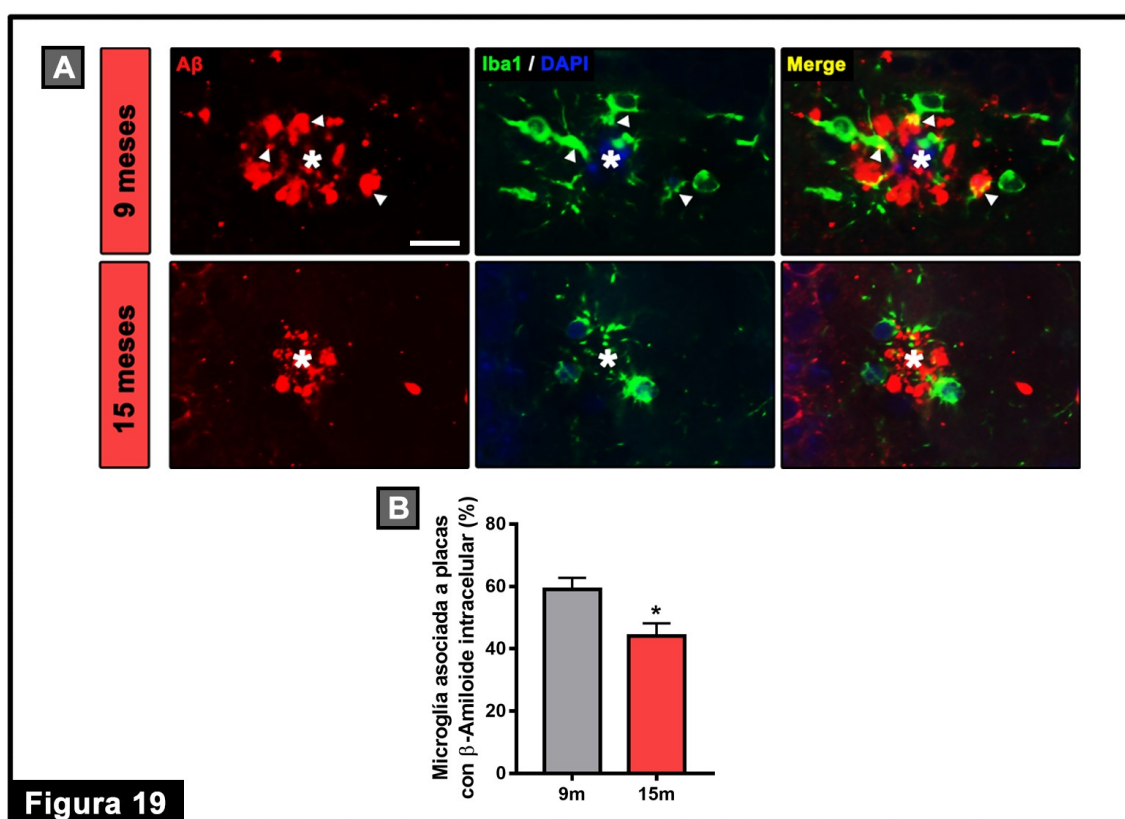
Alteraciones en microglía asociada a placas amiloides: desregulación del flujo autofágico.

Con el objetivo de corroborar cuantitativamente las alteraciones microgliales que se observan en etapas avanzadas de la enfermedad (Figura 14) se analizó en detalle cortes coronales de cerebro procesados para una inmunohistoquímica contra Iba1 acoplada a una tinción con Rojo Congo. Se registró un aumento significativo del área inmunoreactiva total en el hilio del giro dentado a los 9 y 15 meses de edad (Figura 18A), sugiriendo que en estos puntos temporales se evidencia un compromiso general de la integridad del hipocampo. Este aumento del área inmunoreactiva se debe tanto a un aumento en el número de células como en el área del soma de cada célula (Figuras 18B y 18C).



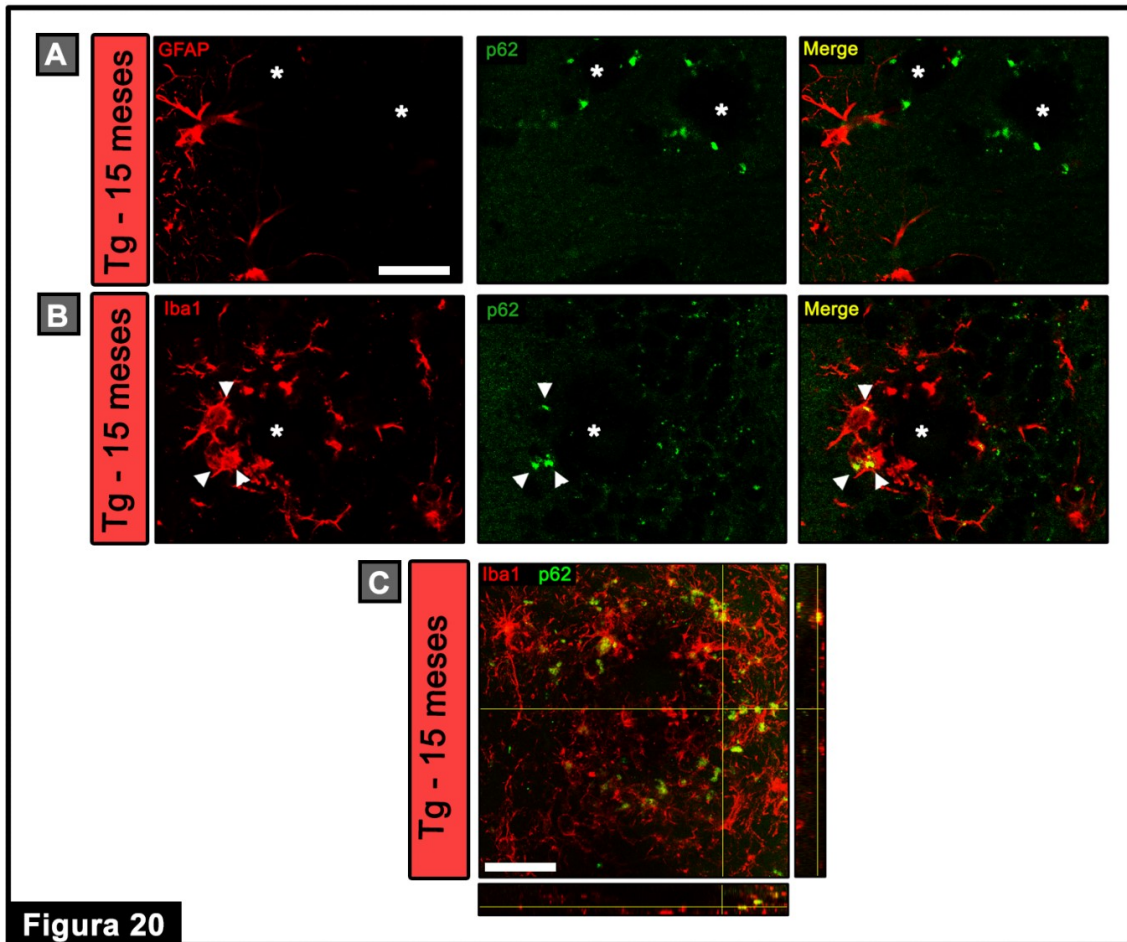
▲ **Alteraciones en células microgliales del hipocampo de ratones PDAPP-J20 en etapas avanzadas.** Cuantificación del porcentaje del área total reactiva para el marcador Iba1 (A), densidad de células Iba1+ (B) y Área individual del soma de células microgliales (C) cuantificado en el hilio del giro dentado a través del análisis de las imágenes obtenidas por a través de microscopía óptica de cortes coronales procesados para inmunohistoquímica contra Iba1. Los asteriscos representan diferencias entre animales Tg y NTg (ANOVA de dos vías seguidas por comparaciones múltiples de Sidak, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

La Figura 19A muestra imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal sobre cortes histológicos conteniendo hipocampo y procesados para una doble inmunofluorescencia contra Iba1 y A β en etapas avanzadas del proceso patológico. Con el objetivo de visualizar las placas amiloides se utilizó el anticuerpo 4G8 –uno de los más reportados en la bibliografía– el cual reconoce la secuencia de A β entre los aminoácidos 18 a 23 (Hatami, Monjazeb, & Glabe, 2016). Si bien este anticuerpo puede dar señal para APP, tiene mayor afinidad por la forma fibrilar de A β . Se observó que en animales Tg de 9 y 15 meses hay inmunoreactividad para el antígeno reconocido por 4G8 en el citoplasma de células Iba1+. Dado que las células de la microglía tienen una elevada capacidad fagocítica, este era un resultado esperado. Sin embargo, el análisis cuantitativo permitió detectar que entre los 9 y los 15 meses de edad el porcentaje de células de la microglía que contienen A β intracelular disminuye significativamente en un 25,3% (Figura 19B).



▲ **A β intracelular en células microgliales asociadas a placas amiloides.** (A) Imágenes de microscopía confocal representativas de una doble inmunofluorescencia para Iba1 y A β que muestran placas presentes en el hilio del giro dentado y su microglía asociada. Sobre estas imágenes se cuantificó la presencia de péptidos amiloides en el interior de células Iba1+ a etapas avanzadas de la enfermedad (B). Los asteriscos representan diferencias significativas entre animales Tg de las dos edades analizadas (Test de t para muestras independientes, * $p < 0,05$).

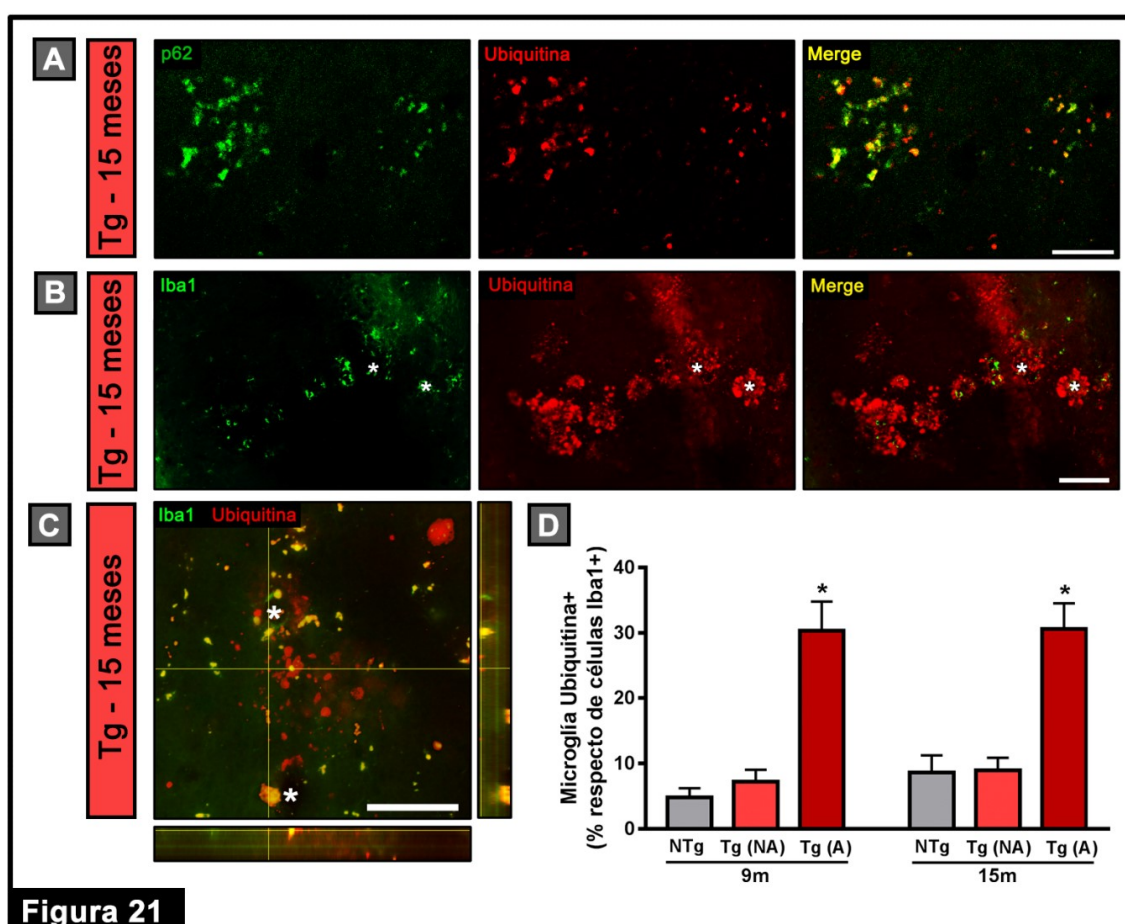
El resultado de la Figura 19 permite identificar que las células de la microglía son capaces de internalizar los péptidos A β derivados de APP. Decidimos entonces abordar si estas células eran capaces de degradarlos. Se conoce que la autofagia es uno de los mecanismos involucrados en este proceso. Con el objetivo de obtener indicios del estado autofágico de las células de la microglía se hizo una doble inmunofluorescencia para Iba1 y p62. La proteína p62 es un sustrato que se degrada exclusivamente por autofagia, y por lo tanto la presencia de agregados p62⁺ son indicativos de un impedimento en el flujo autofágico y acumulación de autofagosomas con contenido sin degradar. Se obtuvieron imágenes por microscopía confocal en el hilio del giro dentado sobre cortes histológicos que fueron procesados para inmunofluorescencia contra p62 y marcadores gliales. La Figura 20 muestra imágenes representativas que fueron tomadas de un ratón de 15 meses de edad donde se evidencian agregados p62⁺ en el citoplasma de células de la microglía (y no de astrocitos) asociadas a placas amiloides.



▲ Agregados p62+ en células microgliales que rodean a placas amiloides. Imágenes de microscopía confocal representativas de una doble inmunofluorescencia para Iba1 y p62 tomadas sobre el hilio del giro dentado. Las imágenes muestran células con depósitos de p62 que no son positivas para el marcador astroglial GFAP (A), pero sí para el marcador microglial Iba1 (B). Los asteriscos indican la presencia de una placa amiloide y las puntas de flechas señalan agregados p62+ en el interior de células microgliales. La barra de escala en A corresponde a 50 μm . En C se muestra una condensación de 20 planos confocales tomados regularmente cada 3 μm a lo largo del espesor del corte histológico. Las vistas ortogonales son reconstrucciones a lo largo del espesor del corte que demuestran que la colocalización entre p62 y el marcador microglial Iba1 se hace evidente en las 3 dimensiones espaciales. La barra de escala del Panel C representa 100 μm .

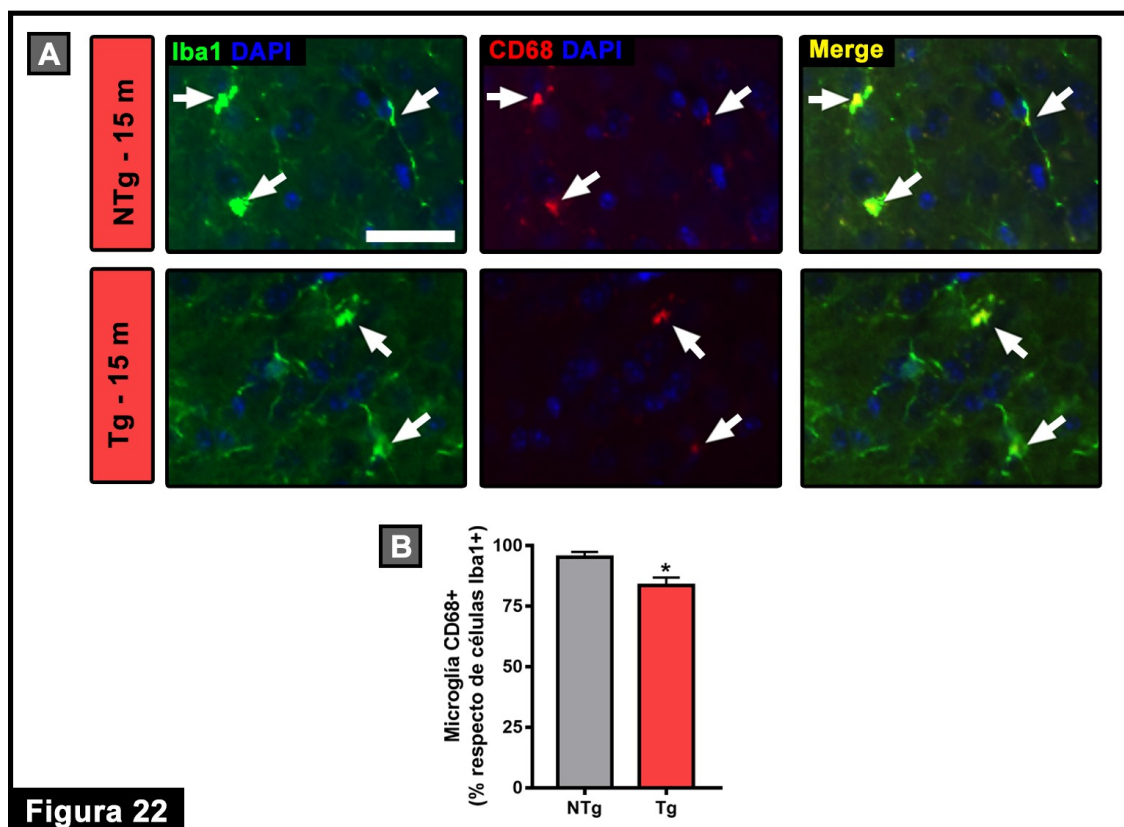
Las proteínas que se encuentran en el interior de los autofagosomas suelen estar altamente ubiquitinizadas; y por lo tanto otro indicador de impedimento en el flujo autofágico es la presencia de depósitos positivos para ubiquitina. Sin embargo, la acumulación de ubiquitina también puede ser indicativa de alteraciones en el sistema de degradación mediado por el proteasoma. A fin de identificar si la presencia de agregados de ubiquitina puede deberse a fallas en el sistema de degradación por autofagia, se realizó una doble inmunofluorescencia para p62 y ubiquitina. Las imágenes obtenidas por microscopía confocal permiten poner en evidencia la alta colocalización entre ambas proteínas, sugiriendo que gran parte de la señal

inmunoreactiva para ubiquitina proviene de autofagosomas (Figura 21A). A fin de estudiar la presencia de estos depósitos en células microgliales, se realizó una doble inmunofluorescencia contra Iba1 y ubiquitina (Figura 21B y 21C), y se cuantificó el porcentaje de células microgliales que contienen depósitos de ubiquitina. Se observa que, independientemente de la edad, alrededor del 30% de las células de la microglía asociadas a placas amiloides poseen depósitos inmunopositivos para ubiquitina. Este porcentaje es significativamente menor tanto en animales NTg como en los mismos Tg cuando se analizan las células no asociadas a placas amiloides (Figura 21D).



▲ **Depósitos de ubiquitina en el citoplasma de células microgliales.** Sobre imágenes de microscopía confocal obtenidas en el hipocampo de ratones Tg y NTg en etapas avanzadas se realizó una doble inmunofluorescencia contra Ubiquitina y p62 (A) o contra Ubiquitina e Iba1 (B). La imagen del panel C es una condensación de 20 planos confocales obtenidos cada 30 μ m y las vistas ortogonales que representan la inmunoreactividad para Iba1 y Ubiquitina a lo largo del espesor del corte. Estas imágenes permiten identificar células de la microglía que contienen depósitos ubiquitina+ en su interior. El Panel D muestra el análisis cuantitativo del porcentaje de células microgliales conteniendo depósitos ubiquitina-positivos. Las barras de escala representan 30 μ m (A), 100 μ m (B) y 50 μ m (C) respectivamente. Los asteriscos blancos de los paneles B y C indican la presencia de una placa amiloide. Los asteriscos del gráfico del Panel D indican diferencias significativas respecto de los animales NTg de la misma edad (ANOVA de dos vías seguido de comparaciones múltiples de Sidak, * $p < 0,05$).

Por otro lado, CD68 es un marcador de actividad fagocítica en microglía y macrófagos. A partir del análisis de una doble inmunofluorescencia para Iba1 y CD68 (Figura 22A), se puede observar que hay una disminución en un 12,3% de células de la microglía con inmunoreactividad para este marcador de actividad fagocítica en animales Tg de 15 meses, respecto de animales NTg de la misma edad (Figura 22B).



▲ **Presencia del marcador fagocítico CD68 en células microgliales.** Sobre imágenes de microscopía confocal obtenidas en el hilio del giro dentado de ratones PDAPP-J20 a partir de una inmunofluorescencia para Iba1 y CD68 (A) se cuantificó el porcentaje de células Iba1+ que contenían CD68 (B). Las flechas del Panel A señalan células que son positivas para ambos marcadores. La barra de escala corresponde a 30 μ m. Los asteriscos del Panel B representan diferencias significativas entre animales Tg y NTg (Test de t para muestras independientes, * $p < 0,05$).

En su conjunto, estos resultados sugieren que en la cercanía a placas amiloides las células microgliales no solo muestran claros indicios morfológicos de activación (evidentes por la hipertrofia de su soma celular) sino también signos de alteraciones en el sistema de degradación por autofagia, tal como son la acumulación de depósitos p62+ y ubiquitina+. Esto podría ser un indicio de las alteraciones crónicas que se desarrollan en el proceso patológico del ratón PDAPP-J20: la capacidad de las células de la microglía de internalizar y degradar el A β por vía de la autofagia podría estar comprometida en etapas avanzadas. Sin embargo, dado que este es un proceso

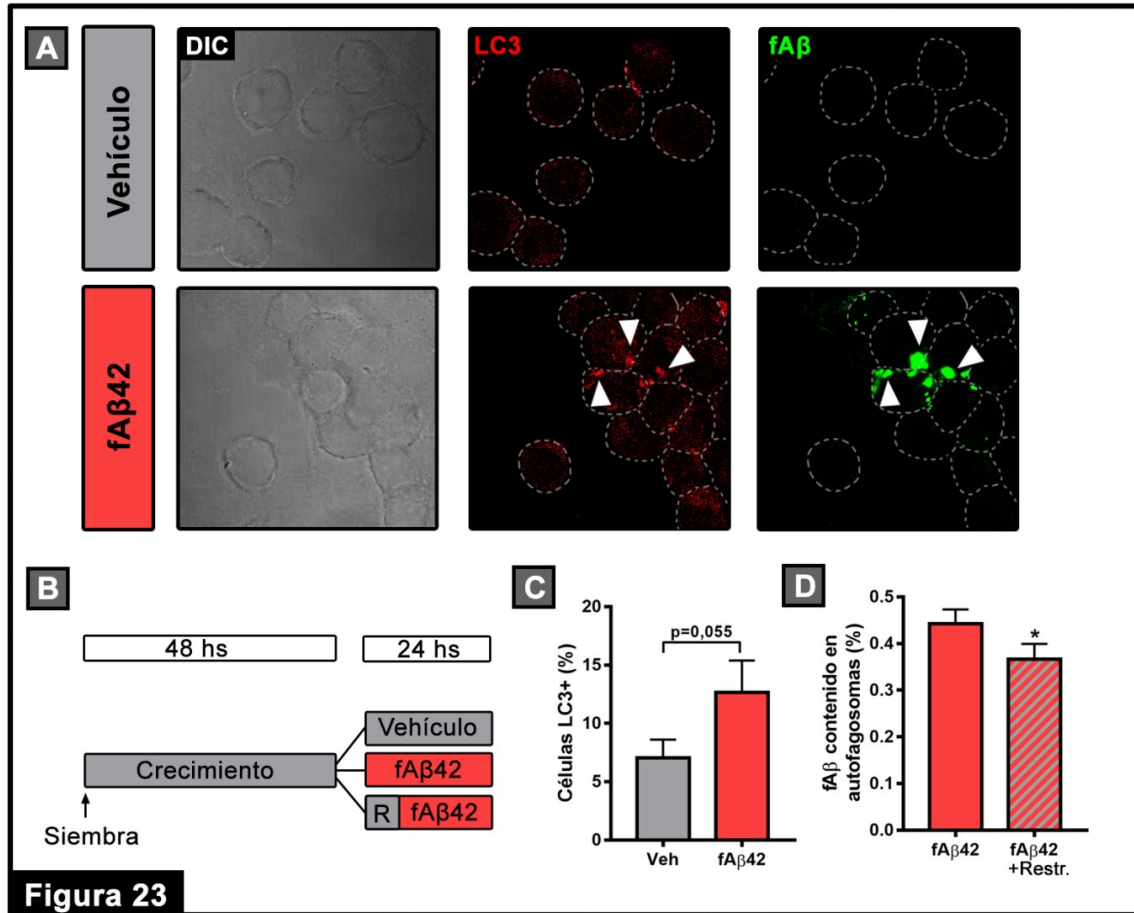
dinámico, no sería válido obtener conclusiones determinantes sobre el estado autofágico de este tipo celular a partir de una imagen que representa estáticamente un momento de todo el proceso.

Evaluación *in vitro* del flujo autofágico microglial en el contexto de la EA.

Con el objetivo de estudiar el flujo autofágico microglial en un sistema simplificado que permita caracterizar dinámicamente este proceso, se empleó la línea de células microgliales de ratón BV-2. En todos los casos, estas células fueron expuestas a péptidos amiloides de 42 aminoácidos de longitud previamente fibrilizados (fA β 42) y a una concentración de 0,5 μ M para simular la situación de cercanía a una placa amiloide.

La Figura 23A muestra imágenes representativas de células BV-2 expuestas durante 24 hs a fA β 42 o vehículo que fueron procesadas para una inmunofluorescencia contra la proteína LC3, reconocido marcador de vesículas autofágicas. El tratamiento con A β produce una clara tendencia al aumento en el porcentaje de células LC3+ (Figura 23C). Sin embargo, no se puede concluir que se deba a un aumento en la autofagia, ya que no podría descartarse que en realidad esté ocurriendo una acumulación de autofagosomas por impedimento en el flujo autofágico.

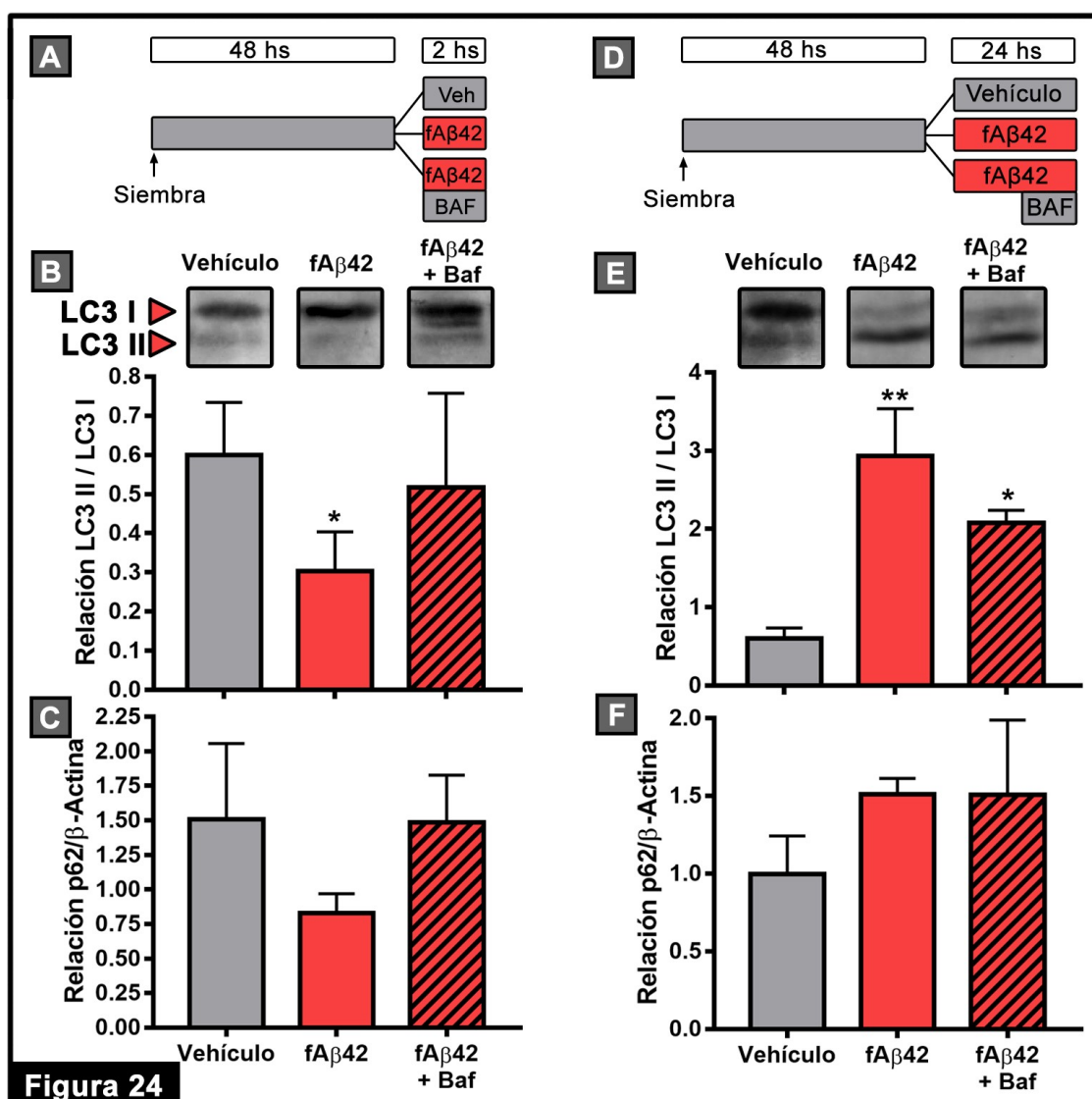
Alternativamente, algunas células fueron sometidas a 2 hs de restricción de la disponibilidad de suero fetal bovino previo a la estimulación con A β (Figura 23B), intervención que según se ha reportado, estimula la autofagia. La restricción en la disponibilidad de suero fetal bovino produjo una disminución significativa en el porcentaje de células que contienen A β intracelular (Figura 23D), sugiriendo que la autofagia es un potencial mecanismo de degradación de A β en estas células.



▲ **Inmunoreactividad para LC3 en células microgliales estimuladas con fAβ42.** Células de la línea BV2 fueron tratadas durante 24hs con fAβ42 o vehículo y luego procesadas para inmunofluorescencia contra LC3. En el Panel A se muestran imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal. El esquema del Panel B ilustra el diseño experimental empleado, según el cual luego de 48 hs de ser sembradas, las células son destinadas a 3 posibles grupos experimentales. Además del tratamiento con vehículo o fAβ42, un tercer grupo fue sometido a 2 hs de restricción en la disponibilidad del suero fetal bovino (de 10% a 2%) previo al tratamiento con fAβ42 (R). Las imágenes obtenidas fueron analizadas cuantitativamente y se determinó el porcentaje de células con inmunoreactividad para LC3 (C) y para Aβ (D). En el Panel D, el asterisco representa diferencias significativas entre los dos grupos analizados (Test de t para muestras independientes, * $p<0,05$). Las líneas punteadas del panel A indican los límites de cada célula.

Con el objetivo de discernir si el tratamiento con fAβ42 estimula o bloquea el flujo autofágico, se realizaron ensayos de *western blot* empleando células tratadas con vehículo, fAβ42, o bien fAβ42 y Bafilomicina A1. La Bafilomicina A1 es un bloqueante de la actividad lisosomal, de manera tal que garantiza que el proceso autofágico se verá impedido y los autofagosomas se acumularán en el citoplasma. La comparación con este control permitiría discriminar si un potencial aumento de LC3 se debe a un mayor flujo autofágico o al impedimento del mismo. Asimismo, se realizaron dos tratamientos diferentes con fAβ42 (Figura 24A y 24D): 2 hs (para simular una exposición breve), y 24 hs (para simular una exposición prolongada). Luego de una

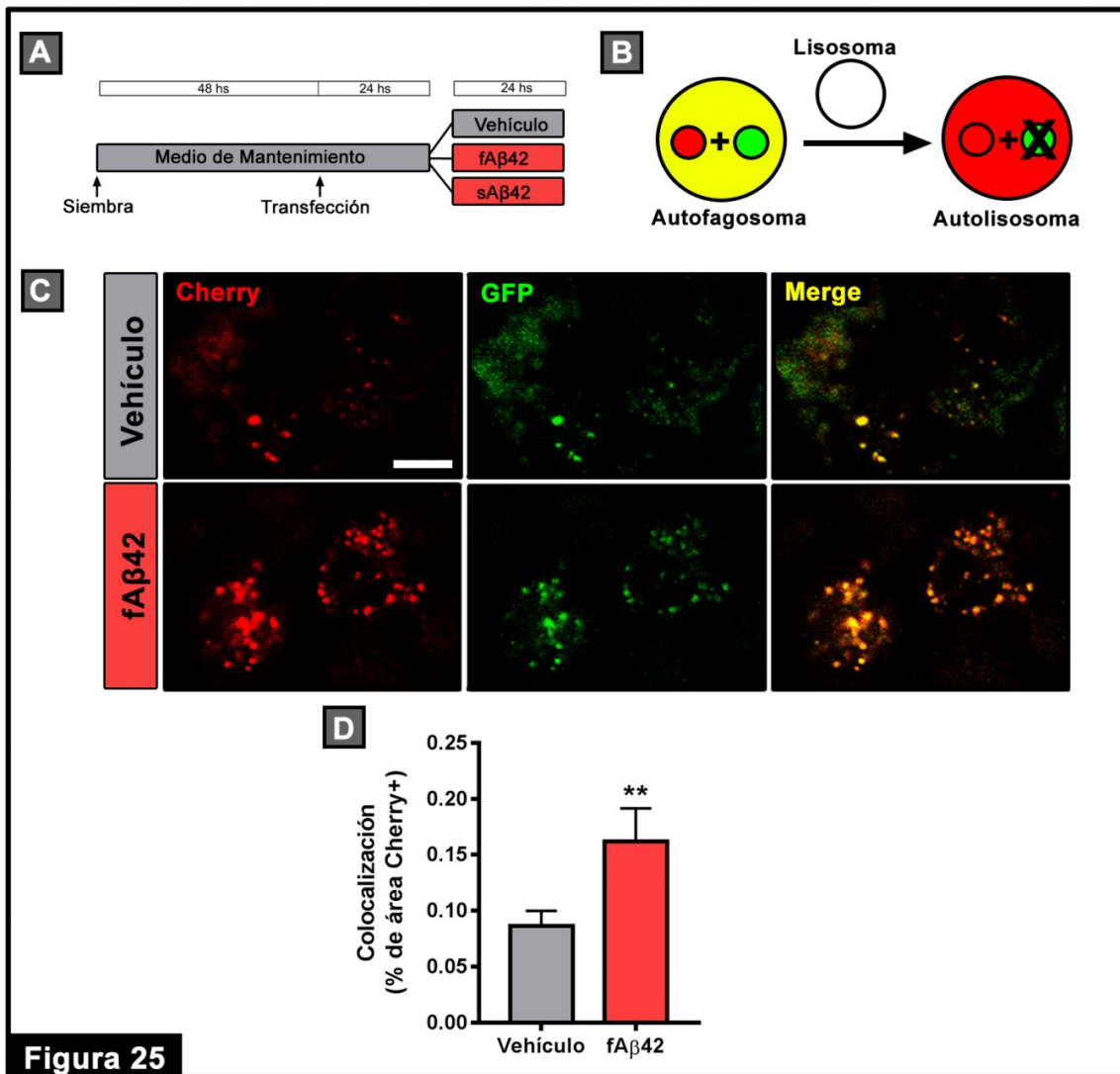
exposición de 2 hs de $\text{fA}\beta 42$ se observa una disminución significativa en la forma lipídica y funcional de LC3 (LC3 II). Dado que LC3 II se degrada por el mismo proceso del que forma parte, esta disminución podría deberse o bien a una menor inducción de la autofagia, o bien a un aumento tal que se degrada más rápido de lo que se está produciendo. Las células microgliales incubadas en presencia de Bafilomicina A1 presentaron niveles de LC3 similares al control, sugiriendo que la disminución en LC3 II efectivamente se debe a un aumento en la actividad autofágica (Figura 24B). Llamativamente, si la estimulación con $\text{fA}\beta 42$ se prolonga durante 24 hs se observa un aumento significativo de LC3 II, que se mantiene elevado a pesar de la presencia de Bafilomicina A1 en el medio de cultivo, sugiriendo que este aumento se debe a una acumulación de autofagosomas por impedimento del flujo autofágico (Figura 24E). La detección de p62 arrojó resultados en el mismo sentido que LC3, aunque las diferencias obtenidas no sean estadísticamente significativas (Figura 24C y 24F).



▲ **Evaluación del flujo autofágico en células microgliales expuestas de manera aguda y crónica a fAβ42.** Sobre extractos proteicos obtenidos de células BV-2 se estimó por *western blot* los niveles de LC3 I y II en células expuestas durante 2 (A y B) o 24 hs (D y E) a fAβ42. En todos los casos se evaluó el efecto del inhibidor de la función lisosomal Bafilomicina A en conjunto con el tratamiento. Sobre estas mismas condiciones se detectó la presencia de p62 (C y F). Los asteriscos representan diferencias significativas respecto del grupo tratado con vehículo (ANOVA de una vía seguido de comparaciones múltiples de Dunnet, *p<0,05, **p<0,01).

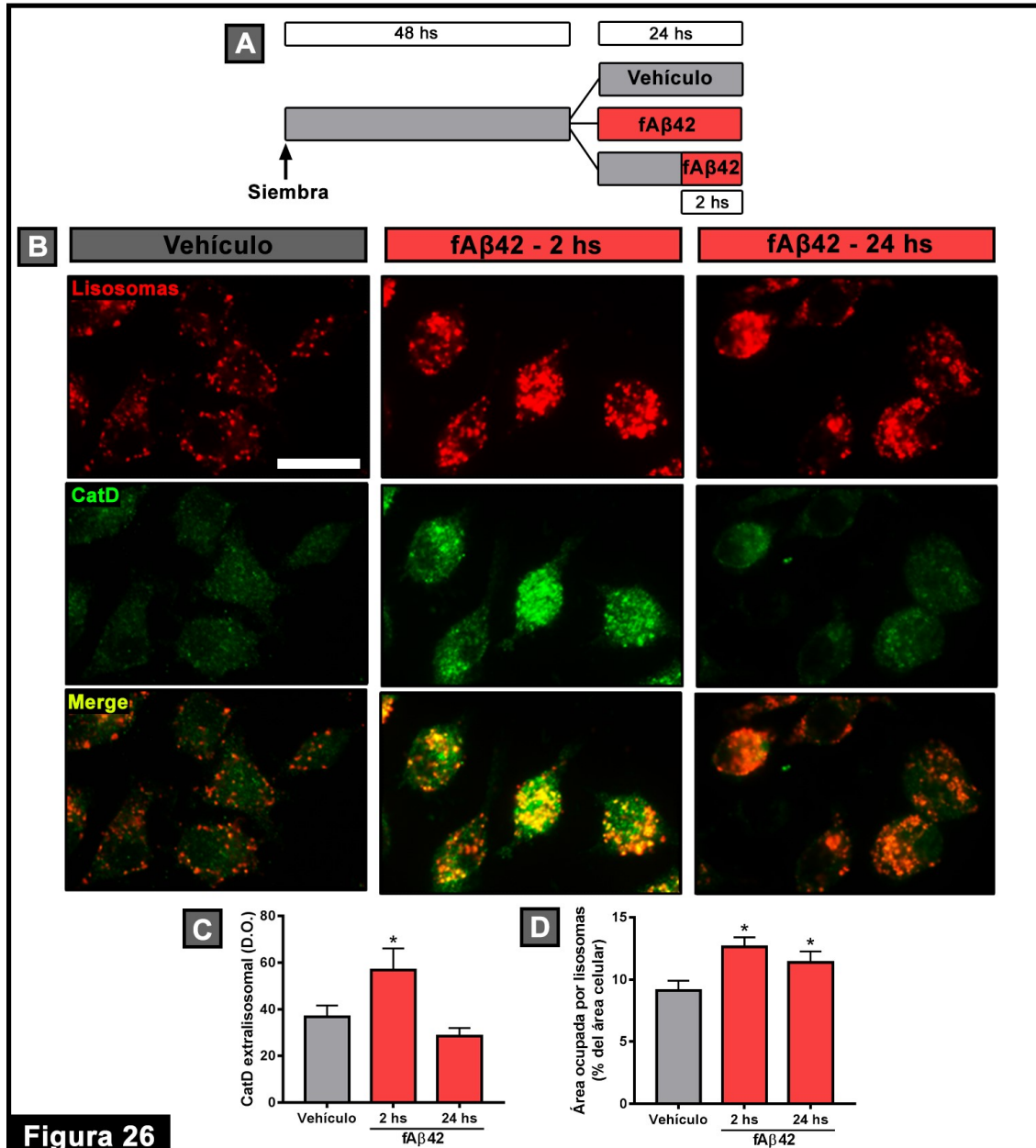
Luego, con el objetivo de establecer si la autofagia efectivamente está impedida tras 24 hs de exposición a fAβ42, se empleó una estrategia de sobreexpresión de la proteína LC3 acoplada a diferentes fluoróforos. Para ello, células de la línea BV-2 fueron transfectadas con un plásmido que permite la expresión de LC3 unido a los fluoróforos GFP y Cherry (Figura 25A). Los autofagosomas deberían por lo tanto observarse en los canales correspondientes a ambos fluoróforos. Sin embargo, dado que GFP es sensible a pH ácido, si la vesícula autofágica se fusiona con un lisosoma, se pierde la marca de GFP (Figura 25B). Con esta estrategia se puede discriminar qué porcentaje

del *pool* de vesículas LC3+ corresponden a autofagosomas y cual a autolisosomas que efectivamente concluyeron el proceso. El estímulo con fA β 42 produce un aumento significativo de la colocalización de ambos fluoróforos en un 87,2%. Este resultado sugiere que en estas condiciones hay una mayor proporción de autofagosomas que autolisosomas, corroborando que hay un impedimento en el flujo autofágico (Figura 25C y 25D).



▲ **Evaluación del flujo autofágico en células microgliales expuestas de manera crónica a fA β 42.** Células de la línea BV-2 fueron transfectadas con el plásmido LC3-GFP-Cherry de acuerdo al esquema que se muestra en el Panel A. Luego de la transfección las células fueron tratadas durante 24 hs con fA β 42 o vehículo, fijadas y finalmente evaluadas por microscopía confocal. La expresión del plásmido empleado para la transfección permite identificar si en las condiciones experimentales empleadas hay un enriquecimiento en vesículas autofágicas en el estadio de autofagosoma o autolisosoma, de acuerdo a los fluoróforos que permanezcan activos en las vesículas, tal como se ilustra en el esquema del Panel B. El Panel C muestra imágenes representativas obtenidas para cada fluoróforo en los grupos experimentales en cuestión (la barra de escala corresponde a 15 μ m). La colocalización entre ambos fluoróforos se utilizó como parámetro de enriquecimiento en autofagosomas (D). Los asteriscos representan diferencias significativas entre los grupos experimentales evaluados (Test de t para muestras independientes, ** $p < 0,01$).

El impedimento en el flujo autofágico puede tener diferentes causas; sin embargo, una de las más abordadas en la bibliografía es la disfunción lisosomal, la cual impide la formación del autolisosoma. Con el objetivo de evaluar el estado de los lisosomas, células de la línea BV-2 fueron expuestas durante 2 o 24 hs a fA β 42, o bien a vehículo (Figura 26A). Las células fueron luego fijadas y procesadas para una inmunofluorescencia contra Catepsina D (CatD) acoplada a una tinción con *Lysotracker*. La detección de CatD permite evaluar la permeabilidad de los lisosomas, ya que esta proteína lisosomal normalmente no se encuentra libre en el citosol. La permeabilidad lisosomal es uno de los signos más frecuentes de alteraciones en estas organelas. *Lysotracker*, por su parte, es un colorante fluorescente que permite identificar y caracterizar vesículas ácidas dentro del citoplasma. Sobre imágenes de microscopía de epifluorescencia (Figura 26B) se evaluó la intensidad de la señal positiva para CatD en el citoplasma de las células, por fuera de los lisosomas. Se observó un aumento temprano en la permeabilidad de estas organelas que deja de hacerse evidente tras 24 hs de estimulación con fA β 42 (Figura 26C). Respecto de la caracterización de los lisosomas, la acumulación y el aumento de tamaño de estas organelas suelen ser un signo de disfunción. Los resultados obtenidos tras el análisis de las imágenes de la tinción con *Lysotracker* muestran que hay un aumento en el área celular ocupada por vesículas ácidas que se hace evidente desde las 2 hs de tratamiento con fA β 42 y se mantiene hasta las 24 hs de tratamiento (Figura 26D). Estos resultados sugieren que los lisosomas presentan signos de alteración desde las 2 hs de tratamiento con fA β 42, a pesar de que con esta exposición aguda la autofagia no se veía impedida. Por lo tanto, o bien las consecuencias de la disfunción lisosomal afecta a la autofagia en tiempos posteriores a aquellos en los que ya puede detectarse signos de alteraciones en lisosomas, o bien el impedimento autofágico se debe a otras causas no analizadas aquí.


Figura 26

▲ **Evaluación del estado de los lisosomas microgliales tras la exposición aguda y crónica a fAβ42.**

El esquema del Panel A ilustra el diseño experimental aplicado sobre células de la línea BV-2. Luego de ser tratadas con vehículo o fAβ42 durante 2 o 24 hs, las células fueron fijadas y procesadas para obtener imágenes de una inmunofluorescencia para CatD acoplada a la tinción con el marcador de vesículas ácidas Lysotracker (B). Sobre estas imágenes se cuantificó la densidad óptica de la señal de CatD extralisosomal (C) y el porcentaje del área del citoplasma ocupada por vesículas ácidas (D). La barra de escala corresponde a 15μm. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del grupo tratado con vehículo (ANOVA de una vía seguido de comparaciones múltiples de Dunnet, *p<0,05).

Considerando los resultados expuestos, el estudio *in vitro* del flujo autofágico empleando células de la línea BV-2 permitió evaluar un efecto diferencial de la exposición a fAβ42 según se trate de una exposición breve (2 hs) o prolongada (24

hs). Durante la exposición breve, si bien hay signos de alteraciones lisosomales, el proceso autofágico puede inducirse y completarse exitosamente. En una exposición crónica, sin embargo, la autofagia no logra completarse y se acumulan autofagosomas. Este último patrón de resultados es compatible con los signos de falla en la autofagia microglial que se hallaron en el hipocampo de ratones Tg de edad avanzada.

4. Discusión

La microglía presenta indicios de activación en etapas tempranas de la EA.

Como se mencionó en las secciones anteriores, la EA –como la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas– posee un claro componente neuroinflamatorio. El desafío radica en discriminar relaciones de causalidad entre la neurodegeneración y la neuroinflamación. Esta pregunta nos obliga a estudiar en mayor detalle a los protagonistas centrales de la respuesta inmune cerebral: las células de la microglía.

La morfología microglial es muy dinámica, y su estudio se propone como un indicador del grado de activación. En esta Tesis, se realizó un aporte significativo al evaluar la morfología microglial en etapas tempranas y avanzadas del proceso patológico del ratón PDAPP-J20, empleando el marcador Iba1.

El estudio detallado de esta población celular en el hipocampo permitió identificar signos morfológicos de activación microglial a edades mayores a los 6 meses, momento en el que se hace evidente el depósito de placas amiloides en el cerebro. Específicamente, a los 9 y 15 meses de edad, los ratones Tg presentan en el hipocampo mayor densidad de células microgliales, las cuales a su vez exhiben mayor tamaño de soma, ambos parámetros indicativos de microgliosis reactiva. La presencia de placas amiloides sugiere que la activación glial podría ser una respuesta al contexto inflamatorio generado por los mismos depósitos, o bien al daño neuronal que caracteriza a estos estadios. Las alteraciones que hemos encontrado en ratones de 3 meses edad, momento en el cual no se evidencian placas amiloides positivas para la tinción con Rojo Congo resultan aún más relevantes. A esta edad se detectaron indicios de incipiente activación microglial en el hipocampo de animales Tg. De hecho, el índice de activación morfológico –que contempla aspectos integrados de la morfología como el tamaño del soma y el largo y ancho de los procesos celulares– es mayor en ratones Tg de 3 meses de edad en comparación a sus hermanos NTg. Si se considera que a medida que una célula microglial adquiere estadios de activación mayores también aumenta su motilidad, este resultado es coherente con una menor regularidad en la distribución de estas células en el tejido.

Por lo tanto, los resultados de esta Tesis demuestran que a la temprana edad de 3 meses existen evidencias de activación microglial, que no pueden ser atribuidas a la presencia de placas amiloides. Dado que las mismas fueron evidenciadas por la

tinción con Rojo Congo, debe contemplarse la posibilidad de que existan pequeños agregados insolubles que no estén pudiendo ser detectados de acuerdo a la resolución de esta técnica. En etapas avanzadas, está claro que las células que se encuentran en estadios mayores de activación migran hacia las placas amiloides, pero a la edad de 3 meses no existe ningún evento histopatológico que haya podido ser detectado como el foco hacia el cual se movilizan las células, y sin embargo se han detectado indicios de pérdida en la distribución regular de la microglía hipocampal..

Además, debe considerarse que la versión humana y mutada de APP en ratones Tg puede expresarse desde edades más tempranas, por lo cual podría haber presencia de moléculas solubles de A β , que no constituirían placas. Si bien esta Tesis no presenta ningún reporte al respecto, un trabajo publicado por nuestro grupo en el año 2014 demostró que a los 5 meses de edad, los valores totales de A β 1-42 en homogenato de cerebro de ratones Tg son bajos pero detectables (Beauquis et al., 2014). Dado que a esa edad aún no se evidencian placas amiloides, estos niveles de A β corresponderían principalmente a péptidos en su forma soluble (monómeros y oligómeros).

En la bibliografía ha sido particularmente caracterizada la capacidad de las células microgliales de activarse ante la presencia de oligómeros solubles de A β . Estudios realizados en cultivos primarios de microglía murina demostraron que la exposición a A β 1-42 oligomérico induce la síntesis IL-1 β mediada por inflamasomas, así como la producción de especies reactivas del oxígeno (Parajuli et al., 2013). Un reporte previo sugiere además que esta forma de A β podría tener un efecto diferencial según el tipo celular. Empleando cultivos primarios derivados de ratón, Maezawa y colaboradores demostraron que en un rango de concentraciones nanomolar, los oligómeros de A β no producen muerte neuronal de manera directa, pero sí un perfil de activación pro-inflamatorio en células microgliales (Maezawa et al., 2011). Más aún, el medio condicionado de estas células es neurotóxico, por lo cual estas bajas concentraciones de A β resultan dañinas para las neuronas de manera indirecta, mediada por la activación microglial.

Por otro lado, la presencia de estos péptidos sería suficiente para inducir déficits cognitivos y activación microglial hacia un perfil pro-inflamatorio. Esto fue demostrado por Balducci y colaboradores, a través de la administración de oligómeros de A β 1-42 por vía intracerebral en ratones C57Bl/6, cuyo *background* genético es compartido con los ratones PDAPP-J20. Más aún, el pre-tratamiento con agentes antiinflamatorios previno la activación microglial y el deterioro cognitivo inducido por A β (Balducci et al.,

2017), sugiriendo que el proceso neuroinflamatorio ocupa un rol central en las alteraciones inducidas por A β .

Tomando en consideración estos antecedentes, los cambios detectados en esta Tesis en animales PDAPP-J20 Tg de 3 meses de edad podrían deberse a los niveles de oligómeros solubles de A β 1-42 que estarían tempranamente presentes a bajos niveles en el cerebro de estos ratones. La presencia de péptidos solubles actuaría como un estímulo crónico, ya que se esperaría que en el modelo empleado los niveles de A β 1-42 aumenten progresivamente. De esta manera, se instala el proceso neuroinflamatorio como un contexto patológico en cuyo marco ocurrirían los eventos neurodegenerativos posteriores. Estos resultados constituyen un aporte significativo a la descripción de los eventos que ocurren en etapas tempranas de la EA y permiten centrar la atención en la relevancia del proceso neuroinflamatorio durante las primeras etapas de la patología.

El flujo autofágico se encuentra comprometido en la microglía asociada a placas amiloides.

En la Figura 19 se muestra que la microglía hipertrofiada en la cercanía de placas amiloides presenta señal inmunoreactiva para A β que claramente forma parte de la placa amiloide. La capacidad de las células microgliales para fagocitar agregados proteicos, y A β en particular, ha sido abordada ya en la bibliografía; y constituye uno de los mecanismos descritos para el depurado de A β . Los péptidos internalizados podrían ser degradados por el mecanismo clásico que involucra la fusión de la vesícula fagocítica con lisosomas, o bien participar del proceso de autofagia. En este Capítulo se describió el estudio en detalle del estado autofágico, dado que sus alteraciones han sido implicadas en otras enfermedades neurodegenerativas, así como en otros tipos celulares en el contexto de la EA.

El proceso de depurado de A β inicia con su internalización. La cuantificación que se muestra en la Figura 19B demostró que a medida que avanza el proceso patológico, disminuye el porcentaje de células que contienen A β intracelular. La disminución de A β intracelular en la microglía a los 15 meses está asociada a una menor inmunoreactividad para CD68 en animales Tg respecto del grupo control. Dado que CD68 es un conocido marcador de actividad fagocítica, estos resultados permiten suponer que, en la medida en que los ratones Tg envejecen, la microglía disminuye su capacidad para internalizar A β desde la placa amiloide. Sin embargo, debe

considerarse que la fagocitosis es un proceso dinámico y resulta difícil obtener conclusiones contundentes a partir de imágenes estáticas, como las que se analizan en esta sección.

En los últimos tiempos, numerosos artículos dan cuenta de la capacidad de las células microgliales para degradar péptidos A β mediante el mecanismo de autofagia. Sin embargo, debe considerarse que en los modelos experimentales como el ratón PDAPP-J20 la patología se desarrolla a pesar de todos los mecanismos de *clearance* de A β que puedan actuar en el tejido cerebral. En este punto, surgen dos hipótesis, que le asignan roles diferentes a la microglía. La primera hipótesis sostiene que los signos patológicos se instalan a pesar de la capacidad de la microglía para degradar A β . La segunda hipótesis, en cambio, sugiere que la microglía al perder su capacidad de degradar A β contribuiría al progreso de la patología. En esta Tesis se realiza un aporte relevante al campo, presentando indicios que apoyan a la segunda hipótesis, mediante la evaluación del flujo autofágico en modelos experimentales de EA avanzado.

Se evaluó el flujo autofágico microglial en el hipocampo de ratones PDAPP-J20 de edad avanzada, utilizando anticuerpos específicos contra p62 y Ubiquitina. Dado que p62 es un sustrato que se degrada específicamente por autofagia, su presencia en forma de agregados citoplasmáticos está asociada a la acumulación de autofagosomas por impedimento en el flujo autofágico. En esta Capítulo, además, se ha puesto en evidencia la presencia de agregados ubiquitina+ en células microgliales tanto en animales Tg de 9 como de 15 meses de edad, fundamentalmente en la cercanía a placas amiloides. Si bien ubiquitina podría estar involucrada en otras vías de degradación de proteínas, la alta colocalización entre p62 y ubiquitina sugiere que esta última es fundamentalmente de localización autofagosomal.

Estas evidencias podrían ser consideradas como indicios de que la autofagia se encuentra impedida en células microgliales cercanas a las placas amiloides. Sin embargo, al ser la autofagia un proceso dinámico, resulta difícil obtener evidencia concluyente que permita caracterizar este proceso a partir del análisis histológico. Por esta razón se planteó la utilización de un sistema *in vitro* que permitiera modelizar la condición de activación microglial en la cercanía a placas amiloides.

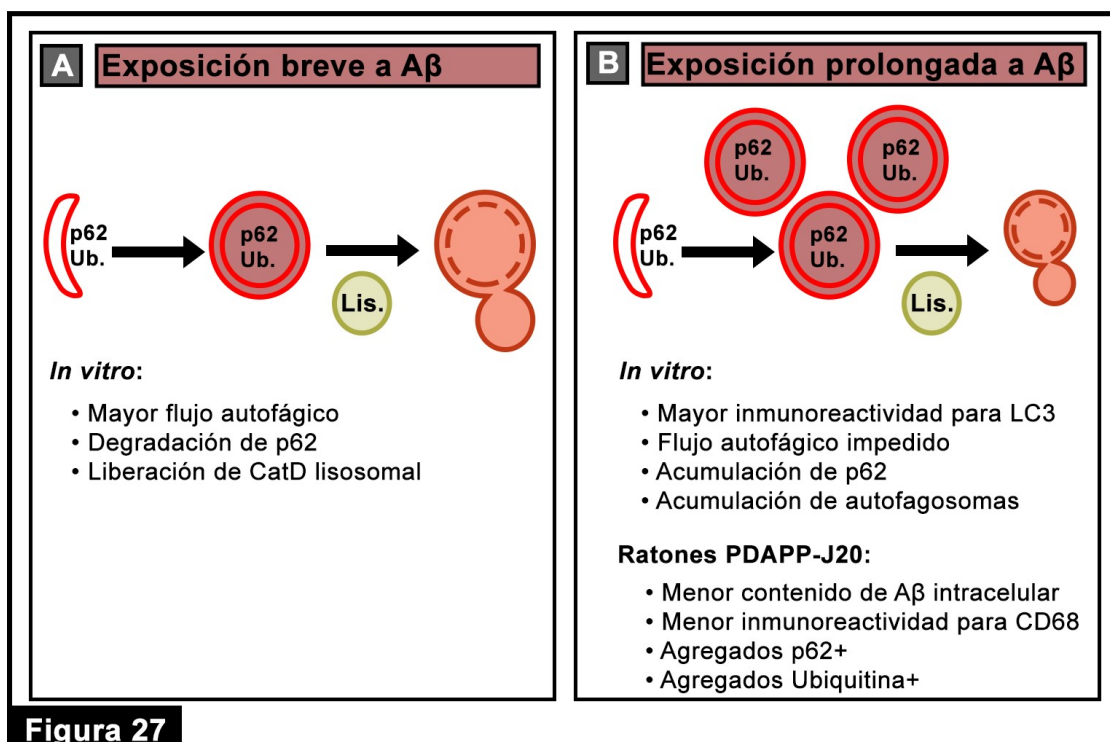
Empleando este tipo de estrategias, Cho y colaboradores demostraron que la exposición durante 2 hs a fA β 42 produce la internalización y degradación de A β por parte de células de la microglía. En su trabajo, no encontraron diferencias entre células de la línea BV-2 y cultivos primarios respecto de esta característica. Demostraron

además que la degradación de estos péptidos es dependiente del proceso de autofagia, ya que se inhibe ante una menor expresión de Atg7 o de LC3 (Cho et al., 2014). Sin embargo, los autores no utilizan un modelo que represente mejor el contexto fisiopatológico de la enfermedad, en el cual el proceso descrito por ellos podría estar afectado.

Con el objetivo de analizar dicha situación, en esta Tesis se utilizaron dos tiempos de exposición a fA β 42: 2 y 24 hs. La primera correspondería a un tiempo de estimulación breve, similar al utilizado en el trabajo de Cho y colaboradores. La segunda correspondería a una estimulación prolongada, que pretende representar lo que ocurre en el contexto tisular, donde la microglía está expuesta de manera crónica a la presencia de placas amiloides. En ambos casos se monitoreó el flujo autofágico empleando bafilomicina A1 y detectando *por western blot* las proteínas LC3 y p62. Los resultados obtenidos sugieren que el efecto de A β depende del tiempo de exposición. Durante una estimulación breve se obtuvieron resultados similares a los presentados por Cho y colaboradores, con indicios de inducción de la autofagia. Sin embargo, con una estimulación de 24 hs se observa un patrón coherente con impedimento autofágico. Este punto fue clarificado a través de la transfección de las células microgliales con el plásmido que permite expresar LC3 acoplado a los fluoróforos GFP y Cherry. El análisis de colocalización entre los fluoróforos demostró que tras la exposición por 24 hs con fA β 42 hay acumulación de autofagosomas en la microglía.

La Figura 27 resume los resultados anteriormente indicados, haciendo énfasis en los parámetros relacionados con la internalización y degradación de A β en sistemas *in vitro* e *in vivo*. De la misma se desprende que tanto en condiciones de exposición prolongada a A β *in vitro* como en ratones Tg existen evidencias de alteraciones autofágicas.

Una de las causas más frecuentes de impedimento en el flujo autofágico es la disfunción lisosomal. Sin embargo, las alteraciones lisosomales que se describieron en el modelo *in vitro* empleado en esta Tesis no permiten explicar completamente el impedimento autofágico que se observa tras 24 hs de exposición a fA β 42.



▲ **Efecto de la exposición de células microgliales a Aβ.** La Figura corresponde a un resumen de los principales resultados presentados en este Capítulo sobre el efecto de Aβ en el sistema de degradación por autofagia. Por un lado, se muestran los principales resultados obtenidos por exposición directa *in vitro* a fAβ42 durante 2 hs (A). Por otro, se comparan los resultados obtenidos por una exposición de 24 hs con fAβ42 *in vitro* con aquellos indicios detectados en células microgliales asociadas a placas amiloides en animales Tg de edad avanzada (B). En el esquema se representan como círculos rojos con doble membrana a los autofagosomas, conteniendo p62 y ubiquitina (Ub.). En amarillo se representan a los lisosomas (Lis.), que luego de fusionarse con los autofagosomas constituyen los autolisosomas, de color naranja.

Las consecuencias del impedimento en el flujo autofágico en células microgliales no solo deben ser evaluadas en términos de la falla en un mecanismo de *clearance* de Aβ. En los últimos años ha sido puesta de manifiesto una compleja interacción entre el estado de la autofagia y la respuesta inflamatoria. En numerosos tipos celulares, la inducción de la autofagia afecta la respuesta inflamatoria mediada por el ensamblado de inflamomas (Shibutani, Saitoh, Nowag, Munz, & Yoshimori, 2015). Inversamente, el impedimento del flujo autofágico favorece la producción de IL-1β por parte de macrófagos en enfermedades con componentes inflamatorios, como la Enfermedad de Crohn (Murthy et al., 2014) y la aterosclerosis (Razani et al., 2012).

Los resultados que se muestran en este Capítulo representan un aporte relevante al estudio de la autofagia microglial como mecanismo de depuración de Aβ en el contexto de la EA. Particularmente, los resultados aquí expuestos pretenden aportar evidencia acerca de la alteración de esta vía como parte del proceso degenerativo del

ratón PDAPP-J20, y, paralelamente, ante una exposición prolongada a A β en condiciones *in vitro*. Estos resultados, en conjunto con los antecedentes previos, permiten proponer a la regulación de la autofagia microglial como un potencial blanco terapéutico para etapas avanzadas de la EA.

Cap. 4

Astroglía

1. Introducción

Morfología y función astrogliar.

Las neuronas son sin dudas las células más estudiadas en el marco de las enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, desde las últimas décadas se ha profundizado el estudio integrado de las neuronas con otros componentes de la UNV. Particularmente, cobran especial interés los astrocitos por ser las células más numerosas del SNC en mamíferos y, lejos de ser simplemente una célula de soporte, cumplen un rol clave en el mantenimiento de la homeostasis cerebral. Por ello, la disfunción astrogliar puede afectar a la funcionalidad de la sinapsis y a la microvasculatura cerebral.

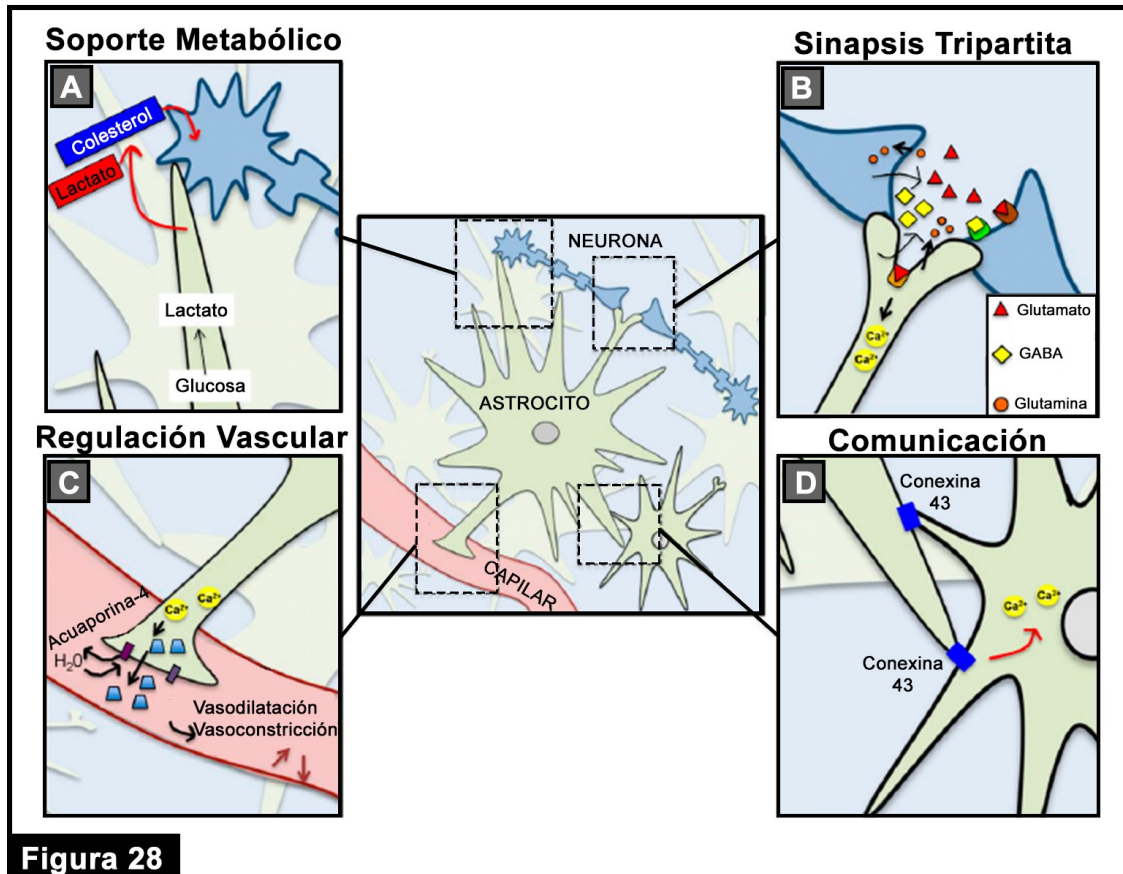
El término “astrocito” fue empleado por primera vez por Michael von Lenhossek en el año 1893, en referencia a su morfología estrellada (Oberheim, Goldman, & Nedergaard, 2012). Desde entonces, ha surgido una gran discusión respecto de la definición de este tipo celular por su heterogeneidad y similitudes con otras células. Por ello, Kimelberg y colaboradores establecieron una serie de criterios que deben ser cumplidos por toda célula para ser considerada astrocito. Los 7 criterios a cumplirse son: ser células no-excitables, manifestar un potencial de membrana muy negativo (determinado por un mayor gradiente de potasio), expresar transportadores para los neurotransmisores GABA y Glutamato, tener un citoesqueleto rico en filamentos intermedios, presentar gránulos de glucógeno en su citoplasma, hacer contacto a través de sus proyecciones con neuronas y vasos sanguíneos, y establecer entre sí uniones comunicantes mediadas por Conexinas (Kimelberg, 2010).

Las células astrogliales son de origen ectodérmico. Su desarrollo ocurre posteriormente al de las neuronas durante la formación del SNC; sin embargo, cumplen un rol fundamental en la conectividad neuronal al orientar la migración de los axones y participar del proceso de podado sináptico. Se debe tener en cuenta que la diferenciación de los astrocitos durante el desarrollo embrionario puede ser ligeramente diferente entre especies, sugiriendo que la función de los mismos en el SNC también puede diferir (Verkhratsky & Nedergaard, 2018).

Los astrocitos son clásicamente categorizados según su morfología y ubicación anatómica. Los astrocitos fibrosos se extienden en mayor medida a lo largo de un eje y se localizan preferencialmente en la sustancia blanca. Los astrocitos protoplásmicos, en cambio, son hallados en la sustancia gris y tienen una estructura más compleja,

con numerosas proyecciones celulares finas (Garwood et al., 2017). Esta clasificación se basó originalmente en la observación de preparados procesados para la tinción de Golgi o inmunohistoquímica contra la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP, por las siglas en inglés de *Glial Fibrillary Acidic Protein*). En estudios posteriores se realizaron inyecciones de moléculas fluorescentes en el citoplasma de astrocitos con el objetivo de visualizar la totalidad del volumen celular. Estos estudios permitieron identificar que los astrocitos protoplásmicos se organizan formando dominios espaciales que no se superponen entre sí (Bushong, Martone, Jones, & Ellisman, 2002). Actualmente se encuentra en análisis la relevancia funcional de la existencia de estos dominios espaciales. Entre las hipótesis más consideradas, se cree que actúan como territorios funcionales de un único astrocito, y que son relevantes para la coordinación de la actividad sináptica y la regulación del flujo sanguíneo (Parpura & Verkhratsky, 2012). Sin embargo, debe considerarse que la clasificación anterior se basa en observaciones realizadas fundamentalmente en roedores, que son los principales modelos experimentales empleados en el estudio del SNC. Para el caso de los humanos, esta clasificación ha resultado ser una simplificación, ya que existe un amplio espectro de morfologías a lo largo de las diferentes estructuras (Perez-Nievas & Serrano-Pozo, 2018).

Como se desprende de las características de los astrocitos propuesta por Kimelberg, estas células son relevantes para una gran cantidad de funciones del SNC. Las principales funciones en las que participan los astrocitos se encuentran representadas en la Figura 28. Como puede observarse en la figura, los puntos de interacción entre estas células y otros componentes de la UNV son los sitios clave donde estas células llevan a cabo sus funciones.



▲ **Funciones de las células astrogiales en el contexto de la UNV en condiciones fisiológicas.** El esquema muestra en su cuadro central a una célula astrogial en íntima asociación con capilares sanguíneos y neuronas. Esta interacción es la que posibilita que los astrocitos realicen funciones de soporte metabólico (A), regulación de la transmisión sináptica entre neuronas (sinapsis tripartita, B), regulación del flujo sanguíneo y el tono vascular (C) y comunicación y coordinación entre astrocitos (D). Esta figura fue modificada a partir de la publicada por Garwood y colaboradores (Garwood et al., 2017).

Los astrocitos protoplásmicos establecen contacto directo con los vasos sanguíneos. A nivel de estos contactos se produce la liberación de prostaglandinas, óxido nítrico y ácido araquidónico, que actúan como vasomoduladores en respuesta a la actividad sináptica (Figura 28C). La síntesis y liberación de estas moléculas está regulada por la frecuencia de cambios en la concentración intracelular de calcio en los astrocitos, que a su vez depende de la actividad sináptica (Mishra, 2017). Esta regulación es de naturaleza fásica; sin embargo, también existe un tono basal de regulación en el flujo sanguíneo mediado por productos de la actividad de ciclooxygenasas en astrocitos (Rosenegger, Tran, Wamsteeker Cusulin, & Gordon, 2015). Esta interacción, además, es relevante para el mantenimiento de la BHE (Zhao et al., 2015). El dominio perivascular de los astrocitos perivascuales también es fundamental para regular el flujo de agua hacia o desde el SNC. En el podocito astrocitario se localizan canales de

potasio y canales de agua tipo Acuaporina-4 que en su conjunto mantienen el balance osmótico del medio extracelular (Abbott et al., 2006; Verkhratsky & Nedergaard, 2018).

Los astrocitos participan además de la regulación de la estabilidad, dinámica y maduración de las espinas dendríticas a través de mecanismos que dependen de la liberación de ATP y de la fagocitosis (W. S. Chung, Allen, & Eroglu, 2015; W. S. Chung et al., 2013; J. Yang et al., 2016). En el cerebro adulto, forman parte de la denominada sinapsis tripartita. Este concepto fue acuñado hace menos de dos décadas en referencia a la extrema proximidad de los procesos astrogliales con las membranas presináptica y postsináptica neuronales (Allen & Eroglu, 2017). Esta localización y la expresión de transportadores y receptores específicos permite un flujo de moléculas entre las células astrogliales y las neuronas que es fundamental para el reciclado sináptico, tal como se explicó en el Capítulo 1 de esta Tesis (Figura 28B).

Por otro lado, la liberación de glutamato, noradrenalina, histamina y acetilcolina puede actuar a través de receptores metabotrópicos o ionotrópicos en la membrana astrogliar, induciendo un aumento transitorio en la concentración de calcio intracelular. En el hipocampo de ratas, se estima que un astrocito individual recibe a través de este mecanismo información sobre la activación de 140.000 sinapsis en el hipocampo (Bushong et al., 2002). De esta manera, los astrocitos son capaces de integrar las señales que indican qué sinapsis se encuentran activas. Esta información -medida como cambios en los niveles intracelulares de calcio- no queda restringida a una única célula, ya que se puede propagar entre astrocitos a través de uniones comunicantes (Fujii, Maekawa, & Morita, 2017) (Figura 28D). Además, las oscilaciones en los niveles de calcio pueden ocurrir aún en ausencia de un estímulo neuronal, e incluso pueden producir excitación en neuronas adyacentes (Nett, Oloff, & McCarthy, 2002). Asimismo, los astrocitos son capaces de producir y liberar a la brecha sináptica moléculas mensajeras que actúan sobre las neuronas a través de receptores específicos, como glutamato, D-Serina y ATP. Estas moléculas mensajeras se denominan gliotransmisores y regulan la excitabilidad de la membrana pre- o postsináptica (Perea, Navarrete, & Araque, 2009). De esta manera se genera una compleja red de interacciones astrocito/neurona y astrocito/astrocito que define un nuevo nivel para el procesamiento de la información en el SNC.

Los astrocitos regulan la viabilidad neuronal a través del suministro constante de lactato y de colesterol (Figura 28A). Esta función de los astrocitos es relevante para el proceso de memoria y aprendizaje. Los astrocitos poseen una elevada tasa glucolítica, que mantiene un flujo constante de glucosa desde los vasos sanguíneos hasta su

citoplasma a través de transportadores GLUT1 (Belanger, Allaman, & Magistretti, 2011). Esta característica es la principal impulsora del mecanismo de provisión de lactato a las neuronas que se explicó en el Capítulo 1 de esta Tesis. En una revisión reciente, Alberini y colaboradores destacan la importancia del soporte metabólico de los astrocitos en el proceso de consolidación de la memoria. La necesidad de captar la glucosa que se encuentra en circulación y regular el equilibrio entre glucogenólisis y glucogenogénesis a través de la señalización de receptores β -Adrenérgicos son eventos necesarios para la formación de nuevas memorias en mamíferos (Alberini, Cruz, Descalzi, Bessieres, & Gao, 2018).

Además de aportar lactato, los astrocitos son la principal fuente de colesterol para las neuronas. Los astrocitos expresan el gen que codifica para la Apolipoproteína E (ApoE), que se libera al medio extracelular acompañada con moléculas de colesterol. Estos complejos pueden ser internalizados y metabolizados por las neuronas. La liberación de estos complejos por parte de astrocitos modula positivamente procesos que requieren síntesis de membrana en las neuronas, como el crecimiento axonal y la sinaptogénesis (Allaman, Belanger, & Magistretti, 2011).

Activación astrogliar en contextos patológicos.

Desde finales de la década de 1980 se ha reportado la existencia de astrocitos con un aspecto hipertrofiado en la corteza cerebral de pacientes con EA (Beach, Walker, & McGeer, 1989; Itagaki, McGeer, Akiyama, Zhu, & Selkoe, 1989). Sin embargo, desde entonces y en los años siguientes, la investigación básica siempre estuvo enfocada hacia la caracterización de las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares, así como el efecto de estos en la función neuronal. Este tipo de respuesta a un evento patológico o presencia de daño se define como reactividad astrocitaria, y se caracteriza por un marcado aumento de expresión de proteínas de filamentos intermedios. Si bien este fenómeno no es exclusivo de la EA, es frecuente ver astrocitos reactivos en la vecindad de placas amiloides, con procesos celulares hipertrofiados que ingresan a la placa. De hecho, esta es una de las características que se emplean histológicamente para definir la existencia de una placa amiloide (Pike, Cummings, & Cotman, 1995; Vehmas, Kawas, Stewart, & Troncoso, 2003).

A diferencia de las células microgliales, los astrocitos no poseen una motilidad considerable. En presencia de eventos de daño, son capaces de re-dirigir sus procesos celulares hacia el foco de activación, pero el soma celular prácticamente no

se desplaza. Esto ha sido demostrado empleando análisis estadístico de distribución espacial sobre astrocitos visualizados en la corteza de ratones APP/PS1, comparando con animales controles (Galea et al., 2015). La reorientación de los procesos celulares es dependiente del citoesqueleto de filamentos intermedios, ya que la ausencia de GFAP o Vimentina en modelos murinos de EA causa que los astrocitos no proyecten sus prolongaciones hacia las placas amiloides (Kraft 2013).

En seres humanos existe una asociación entre el deterioro cognitivo y la presencia de marcadores de neuroinflamación y reactividad astrocitaria, detectadas a través del uso de radioligandos por tomografía de emisión de positrones (Edison, Donat, & Sastre, 2018). Sin embargo, la gran cantidad de tipos celulares involucrados en la respuesta neuroinflamatoria así como la complejidad de las interacciones entre células que componen la UNV hacen que sea difícil estudiar los mecanismos que subyacen a la reactividad astrogliar.

La reactividad astrogliar es producida por una serie de estímulos que pueden provenir del medio extracelular o del medio intracelular. Entre los estímulos externos se debe mencionar a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por las siglas en inglés de *Pathogen-Associated Molecular Patterns*), los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, por las siglas en inglés de *Damage-Associated Molecular Patterns*) y diferentes citoquinas. Para la detección de señales extracelulares los astrocitos expresan, entre otros, receptores para IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, TNF γ y TNF α ; además de receptores de la familia TLR, TREM2 y RAGE. Muchas de estas vías de señalización confluyen hacia la activación del factor de transcripción NF κ B (Gonzalez-Reyes & Rubiano, 2018). Se ha propuesto que el equilibrio en la expresión de los diferentes receptores puede predisponer a la activación astrogliar hacia un perfil neuroprotector o neurodegenerativo. Más aún, los niveles de los mismos pueden variar dependiendo del contexto. Por ejemplo, Rosciszewski y colaboradores demostraron empleando un modelo murino de isquemia y un modelo *in vitro* de privación de oxígeno y glucosa, que estas intervenciones generan un aumento de TLR4 y TREM2 en astrocitos. Ambos receptores regulan de manera opuesta la vía de NF κ B, por lo que el sistema se volvería más sensible a pequeños cambios en la concentración de los ligandos de estos receptores (Rosciszewski et al., 2018).

RAGE es un receptor multiligando que participa del proceso de reconocimiento de patrones moleculares, mayormente DAMPs. Entre sus ligandos mejor caracterizados se encuentran los productos avanzados de glicosilación (Neeper et al., 1992), la proteína de unión al ADN HMGB1 (Hori et al., 1995), proteínas de la familia S100

(Hofmann et al., 1999), fosfatidilserina (Ramamy, Yan, & Schmidt, 2012) y péptidos A β (Du Yan et al., 1997). La translocación al núcleo de NF κ B en respuesta a la activación de este receptor posibilita la expresión de genes relacionados con la respuesta neuroinflamatoria, entre ellas moléculas de adhesión (ICAM-1 y VCAM-1), citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF α y CCL2) y la enzima óxido nítrico sintasa inducible (Harari & Liao, 2010; Villarreal et al., 2014). En sistemas de cultivos primarios de astrocitos de ratas se ha demostrado que concentraciones de S100B (homodímeros formados por las subunidades S100 β) en un rango micromolar son suficientes para inducir alteraciones relacionadas con la reactividad glial, tales como hipertrofia celular, facilitación de la migración y de la mitosis. Todos estos efectos son dependientes de la señalización del receptor RAGE, divergiendo río abajo hacia tres vías diferentes, en las que intervienen Rac-1, Akt y NF κ B. Se demostró también que la expresión del mismo receptor RAGE se encuentra bajo control de NF κ B, generando de esta manera un mecanismo de retroalimentación positiva que podría ser en parte la causa por la cual concentraciones bajas de S100B puedan generar un efecto apreciable (Villarreal et al., 2014).

El efecto de S100B sobre la homeostasis cerebral ha generado controversias y conclusiones disímiles en el pasado. Por un lado, se ha reportado un aumento de esta proteína en diferentes patologías asociadas al SNC, como Síndrome de Down, esquizofrenia, epilepsia y numerosas enfermedades neurodegenerativas (Mrak & Griffinbc, 2001; Sorci et al., 2011). En ratas, se ha demostrado que S100B promueve la reactividad astrocitaria, y aumenta la síntesis de IL-1 β y óxido nítrico (Hu & Van Eldik, 1999). Por otro lado, también se ha reportado que la administración intracerebral de S100B produce un aumento de la neurogénesis, asociado a mejora cognitiva luego de daño cerebral traumático (Kleindienst et al., 2005). Este reporte y otros sugieren que S100B puede tener tanto efectos tóxicos como tróficos en contextos de daño, lo cual depende fundamentalmente de su concentración. Por esta razón, las estrategias experimentales que apuntan a bloquear la señalización mediada por S100B o RAGE han demostrado (hasta ahora) una serie de efectos adversos (Gonzalez-Reyes & Rubiano, 2018).

En el contexto de la EA, experimentos *in vitro* empleando cultivos primarios de astrocitos y concentraciones nanomolares o micromolares de A β demostraron que estas células son capaces de activar la vía de NF κ B y sintetizar IL-1 β e IL-6 (Bales et al., 1998). En cultivos primarios de astrocitos murinos o co-cultivos con neuronas, el uso de Minociclina ha demostrado inhibir la translocación al núcleo de NF κ B en estas células gliales, y disminuir el efecto de agentes pro-inflamatorios en cuanto a la muerte

neuronal y activación de Caspasa-3 (Garwood, Pooler, Atherton, Hanger, & Noble, 2011; Song et al., 2016). Estos antecedentes sugieren que los astrocitos poseen un rol preponderante en la neurotoxicidad producida por cuadros de inflamación crónica.

Astroцитos y proteostasis

En la EA, como en otras enfermedades neurodegenerativas, existe acumulación de proteínas mal plegadas. Numerosos trabajos hacen énfasis en la necesidad de diseñar intervenciones que puedan restituir la proteostasis cerebral permitiendo, entre otras cosas, regular los niveles de A β intracerebral. Debido al protagonismo de múltiples tipos celulares y al carácter general de tratamientos que favorecen la estimulación de la proteostasis –como la restricción dietaria o la administración sistémica de rapamicina–, el aporte de los astrocitos a estos efectos ha sido escasamente abordado.

Los astrocitos participan del depurado de A β a través de la liberación de moléculas que actúan en el medio extracelular, o bien de la internalización y degradación en el medio intracelular. En el primer caso, los astrocitos son capaces de sintetizar y liberar al medio extracelular diferentes metaloproteasas de matriz extracelular y metaloendopeptidasas, como Neprilisina, la Enzima Degradadora de Insulina y la Enzima Convertidora de Endotelina. Todas estas enzimas pueden actuar no solo sobre su sustrato específico sino también degradar monómeros de A β e incluso oligómeros en el caso de Neprilisina. Más aún, en cultivos primarios de astrocitos humanos se ha demostrado que proteínas que normalmente se acomplejan con A β para facilitar su internalización también son un estímulo para la expresión de los genes que codifican para estas enzimas (Mulder, Veerhuis, Blankenstein, & Nielsen, 2012; Ries & Sastre, 2016). Sin embargo, el rol de los astrocitos en el equilibrio entre síntesis y degradación de A β es aún más complejo, ya que existe evidencia que indica que estas células pueden expresar diferentes secretasas y podrían ser una posible fuente de A β en el cerebro (Durand et al., 2014; Frost & Li, 2017).

Por otro lado, los astrocitos son la principal fuente de ApoE en el cerebro. Estudios pioneros demostraron que la inyección intracerebral de astrocitos *wild type* en el hipocampo de ratones PD-APP está asociada a una disminución en el tamaño de placas amiloides. Sin embargo, este efecto no se observaba al inyectar astrocitos proveniente de ratones *knock out* para ApoE. La internalización de A β depende no sólo de la presencia de ApoE, sino también de la disponibilidad de receptores para

lipoproteínas de baja densidad, ya que el uso de antagonistas específicos mimetiza la ausencia de ApoE (Koistinaho et al., 2004).

La autofagia cumple un rol clave en la degradación de A β por parte de neuronas y microglía. Sin embargo, su rol en astrocitos prácticamente no ha sido estudiado. En el contexto de otras enfermedades que afectan al SNC la autofagia astrogliar ha demostrado tener un papel relevante. Recientemente, Liu y colaboradores han empleado un modelo *in vitro* de isquemia y reperusión en un sistema de co-cultivos de astrocitos y neuronas, demostrando que la autofagia astrogliar está impedida en estas condiciones. Más aún, este efecto fue reversible por el tratamiento con el inhibidor de mTOR, rapamicina, lo cual tuvo, a su vez, un efecto neuroprotector sobre las neuronas (Y. Liu et al., 2017). El uso de rapamicina también ha demostrado tener un efecto sobre la reactividad glial, en un modelo animal de daño en la médula espinal (Goldshmit et al., 2015). En modelos de EA, el uso sistémico de rapamicina ha demostrado generar una mejora cognitiva, reducción en el tamaño de placas amiloides y mejora en parámetros cardiovasculares (Richardson et al., 2015; Van Skike & Galvan, 2018). Sin embargo, aún se desconoce el rol de la autofagia astrogliar como mediadora de estos efectos.

2. Objetivos e Hipótesis

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, los objetivos particulares de este Capítulo son:

1. Caracterizar morfológicamente y en cuanto a su densidad a la población de células astrogliales en el hipocampo del ratón PDAPP-J20, considerando edades previas y posteriores a la aparición de placas amiloides. En el caso de edades avanzadas, se propone evaluar diferencialmente a las células asociadas a placas amiloides de aquellas que no lo están. En este sentido, se plantea la hipótesis de que *los astrocitos asociados a placas amiloides evidencian alteraciones coherentes con un proceso de astrogliosis reactiva, y que estas pueden estar presentes –aunque de manera más sutil– tempranamente.*
2. Evaluar el estado de la autofagia astrogliar y su posible modulación durante la progresión del proceso patológico del ratón PDAPP-J20, distinguiendo entre astrocitos asociados a placas amiloides respecto de aquellos que no lo están. Paralelamente, se propone desarrollar un sistema *in vitro* que permita complementar el modelo *in vivo* a través de la manipulación de los niveles basales de autofagia y exposición a A β fibrilar. En el marco de este objetivo se plantea la hipótesis de que *la autofagia se encuentra desregulada en astrocitos asociados a placas amiloides (o expuestos in vitro a péptidos A β fibrilizados).*

3. Resultados

Los astrocitos son células fundamentales para mantener la homeostasis del tejido nervioso. La morfología de los astrocitos varía según su cercanía a placas amiloides. La Figura 29 muestra imágenes representativas obtenidas a partir de cortes histológicos del cerebro de ratones Tg de 5 meses y 15 meses de edad que fueron procesados para co-inmunofluorescencia contra GFAP y A β . Se observa que, en la cercanía a placas amiloides, los astrocitos presentan una morfología alterada, con evidente hipertrofia del citoesqueleto GFAP+.

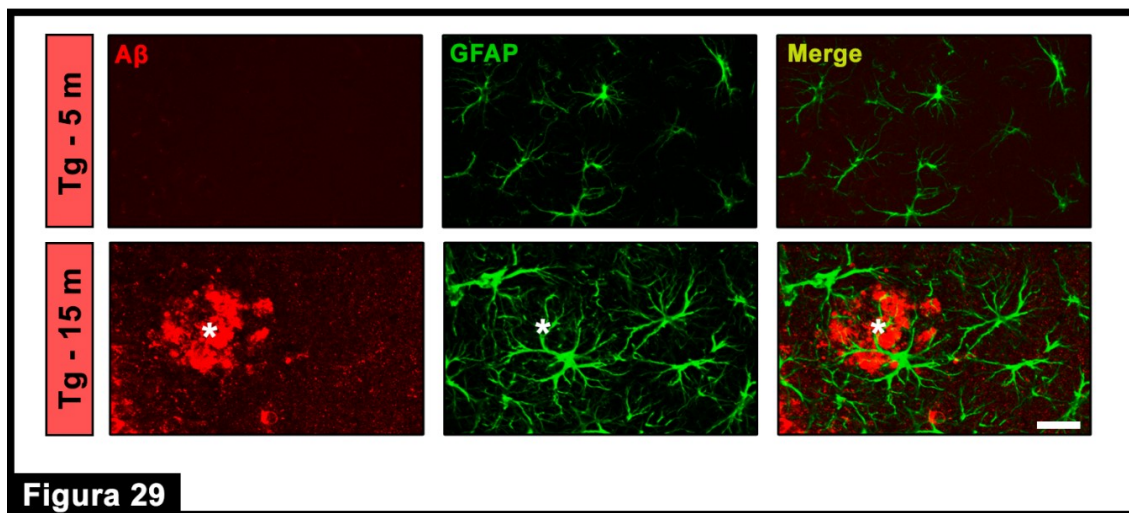
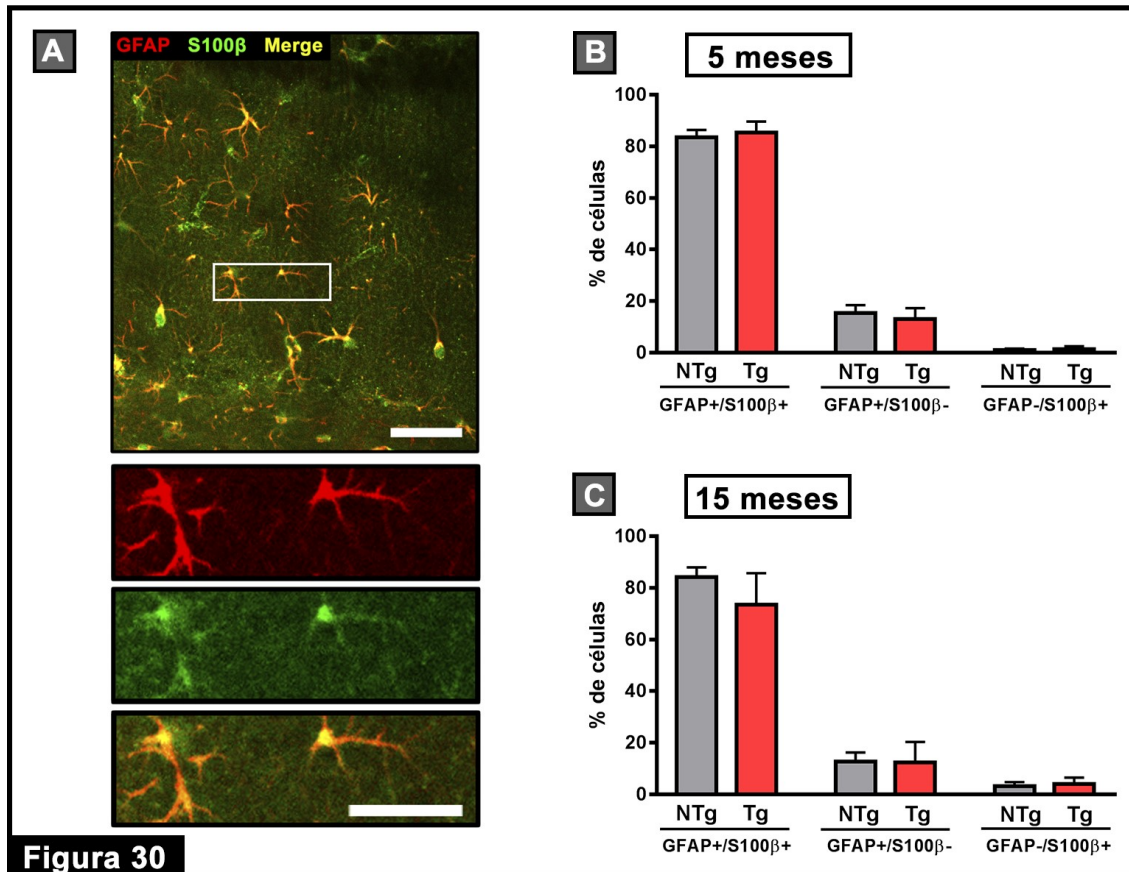


Figura 29 ▲ Cambios en el patrón de inmunoreactividad para el marcador astroglial GFAP en el hipocampo de ratones PDAPP-J20. Imágenes representativas de una doble inmunofluorescencia para GFAP (marcador de astrocitos) y A β , tomada en la sub-región hipocampal de *stratum radiatum* bajo CA1 en animales Tg de 5 y 15 meses de edad. El asterisco representa el centro de una placa amiloide. La barra de escala corresponde a 50 μ m.

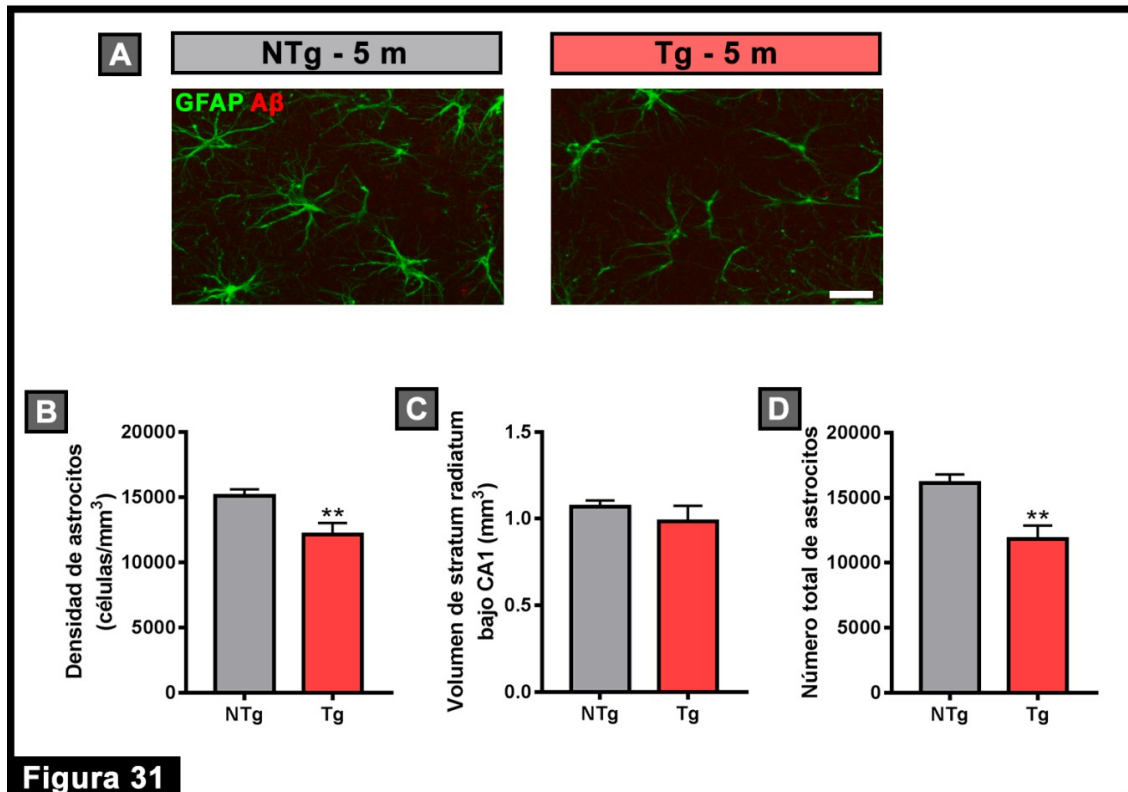
GFAP es una proteína constitutiva del citoesqueleto de filamentos intermedios. Si bien constituye un marcador robusto de la población astroglial (ampliamente reportado), como primer paso de esta sección se validó su uso como identificador de esta población celular. Para ello se realizó una doble inmunomarcación para GFAP y S100 β , otro marcador astroglial de uso frecuente en la bibliografía. La cuantificación arrojó que el 98,8% de las células que son positivas para S100 β lo son también para GFAP a la edad de 5 meses (Figura 30). El porcentaje total de células GFAP+ no cambió significativamente con la edad. A partir de este resultado decidimos utilizar a GFAP como marcador astroglial, dado que permite identificar a la gran mayoría de astrocitos presentes en el tejido, independientemente de la edad estudiada. Además, al ser un componente del citoesqueleto, permitiría evaluar la arquitectura celular.



▲ **Patrón de marcadores astrogliales en el hipocampo de ratones PDAPP-J20.** (A) Imagen obtenida por microscopía confocal a partir de inmunofluorescencia doble para GFAP y S100β. La zona marcada con un recuadro blanco se muestra ampliada y en mayor detalle para cada canal en el panel inferior. La barra de escala superior e inferior representan respectivamente 100 y 40 μm. Sobre este tipo de imágenes se realizó un análisis cuantitativo de la expresión de estos marcadores en células astrogliales en el hilio del giro dentado a la edad de 5 meses (B) y 15 meses (C).

Alteraciones astrogliales tempranas en el ratón PDAPP-J20.

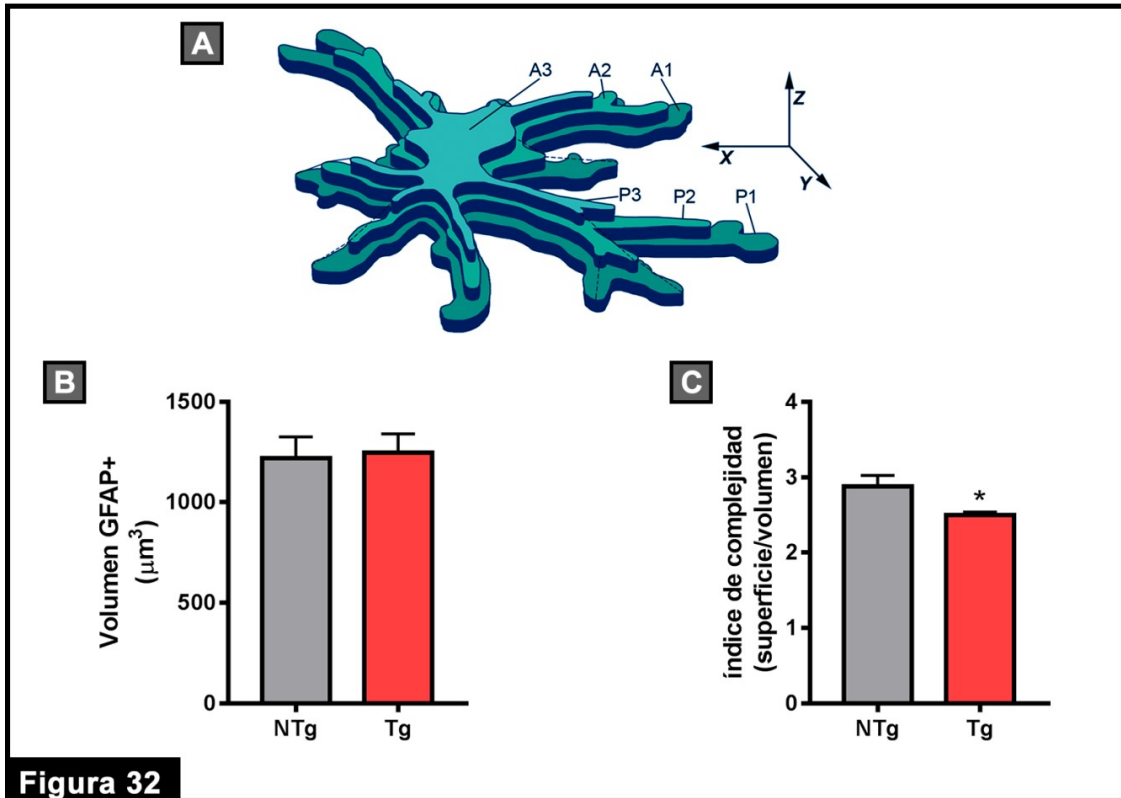
Con el objetivo de detectar alteraciones tempranas que no pudieran ser explicadas por la presencia de depósitos amiloides, se decidió caracterizar la población de células astrogliales en animales de 5 meses de edad. A partir de una inmunofluorescencia para GFAP realizada en cortes coronales de cerebro conteniendo hipocampo (Figura 31A), se cuantificó la densidad de células GFAP+ y su número total. Se observó una disminución significativa del 26,7% en el número de astrocitos presentes en la sub-región del *stratum radiatum* bajo CA1 (Figura 31D). Esta disminución se debió fundamentalmente a una menor densidad de astrocitos, ya que el volumen de la región no se vio significativamente alterado por el genotipo de los animales (Figura 31B y 31C).



▲ **Alteraciones en la densidad de astrocitos hipocampales en etapas tempranas de la patología.**

Sobre cortes coronales de cerebro conteniendo hipocampo y procesados para inmunofluorescencia contra GFAP se tomaron imágenes de microscopía confocal a planos regulares que luego fueron condensadas en una única imagen representativa de todo el espesor del corte histológico (A). Las imágenes fueron analizadas con el objetivo de determinar la densidad de células atrogliales en el area de *stratum radiatum* bajo CA1. Cuantificando el volumen de la estructura se pudo determinar el número total de astrocitos en dicha región. La barra de escala representa 50 μ m. Los asteriscos indican diferencias entre animales Tg y NTg (Test de t para muestras independientes, ** $p < 0,01$).

Para evaluar la arquitectura celular, se realizaron reconstrucciones tridimensionales de astrocitos individuales a partir de múltiples planos obtenidos por microscopía confocal (Figura 32A). Sobre estas reconstrucciones se estimaron la superficie y el volumen individual de cada célula. Comparando con astrocitos de ratones NTg de 5 meses, los de ratones Tg de esa edad no mostraron un cambio significativo en el volumen (Figura 32B). Sin embargo, el índice de complejidad morfológica (expresado como la relación superficie/volumen), permitió detectar una disminución significativa de la complejidad en la arquitectura celular (Figura 32C).

**Figura 32**

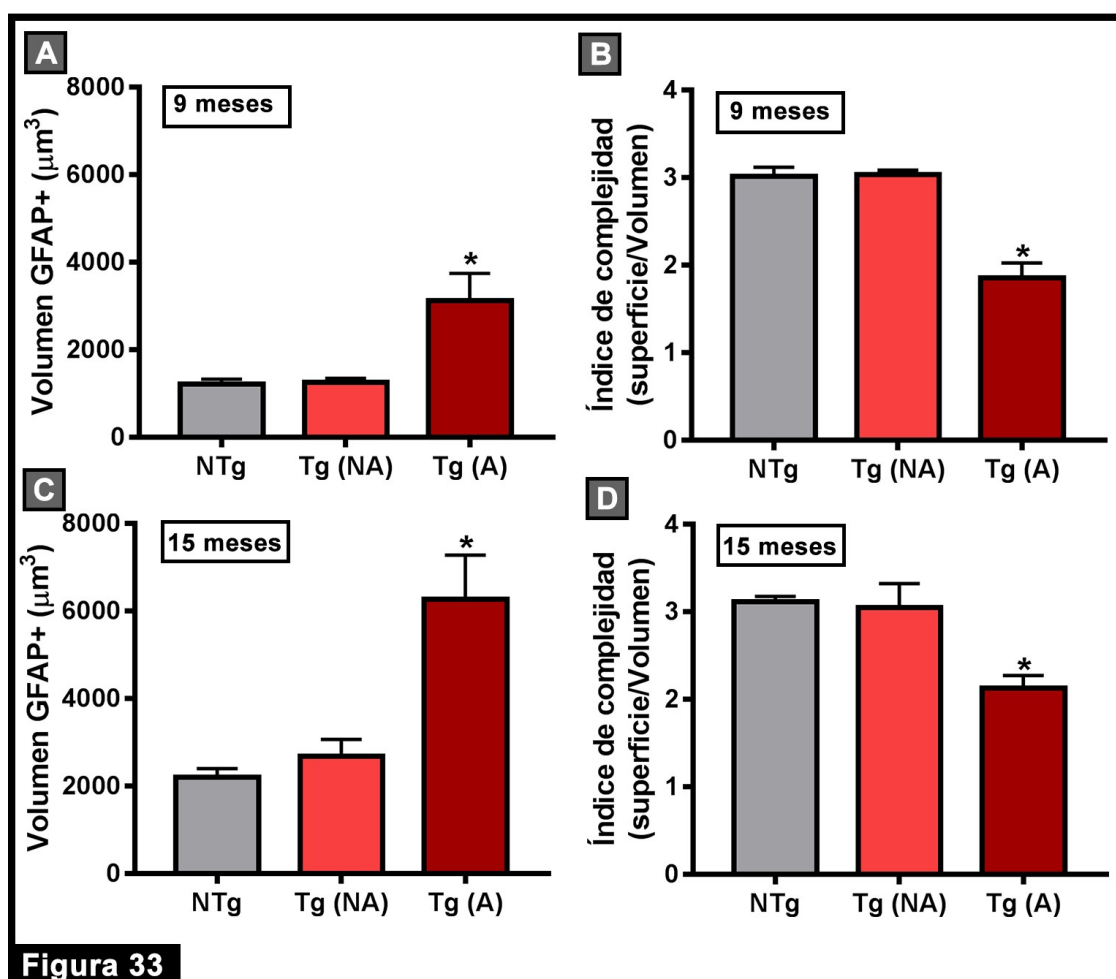
▲ **Alteraciones morfológicas en astrocitos hipocampales en etapas tempranas de la patología.** A partir de cortes histológicos procesados para inmunofluorescencia para GFAP se tomaron secuencialmente imágenes con microscopía confocal para generar reconstrucciones tridimensionales de astrocitos individuales a partir del área y el perímetro GFAP+ en cada plano (A). De esta manera, se estimó el volumen celular (B) y la relación superficie/volumen para células únicas (C). Los asteriscos representan diferencias entre animales Tg y NTg (test de t para muestras independientes, $*p < 0,05$).

En su conjunto, estos resultados sugieren que las células de la astrogliá pueden presentar alteraciones morfológicas en etapas tempranas de la EA experimental: se detectó una menor cantidad de células astrogliales, que a su vez tienen su arquitectura celular alterada.

Alteraciones en astrocitos asociados a placas amiloides: evidencias de autofagia astrogliá.

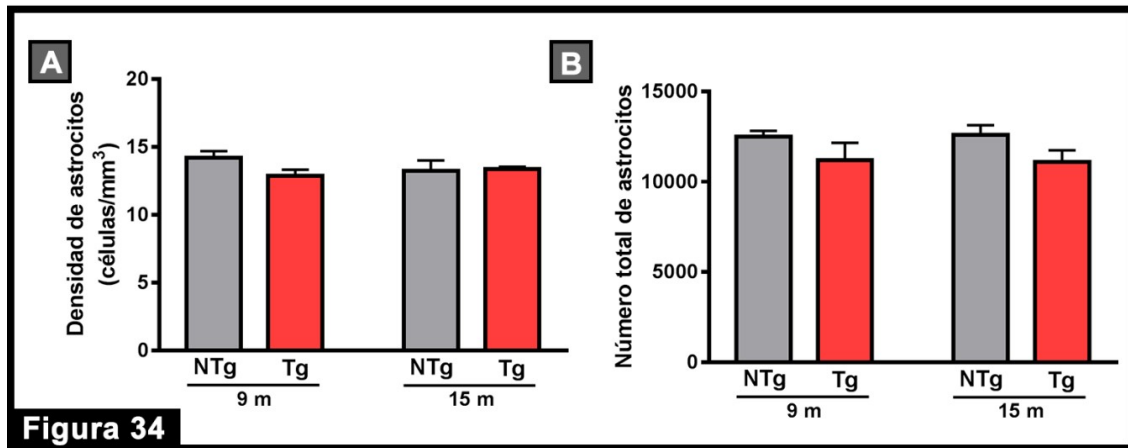
Como se mostró representativamente en la Figura 29, los astrocitos asociados a placas amiloides en etapas avanzadas del proceso patológico presentan claras evidencias de alteraciones morfológicas. Para validar cuantitativamente estos cambios, se realizaron reconstrucciones tridimensionales de astrocitos individuales a partir del hipocampo de ratones Tg y NTg de 9 y 15 meses de edad. Debido a que en

estas edades los animales Tg presentan depósitos amiloides, en este caso se hizo la distinción entre astrocitos asociados y no asociados a placas amiloides, según su distancia al depósito más cercano. Como era esperable, el volumen de los astrocitos asociados a las placas amiloides en los animales Tg fue significativamente mayor que en los demás casos (Figura 33A y 33C). Este marcado aumento del volumen produjo, a su vez, una reducción en el índice de complejidad (Figura 33B y 33D).



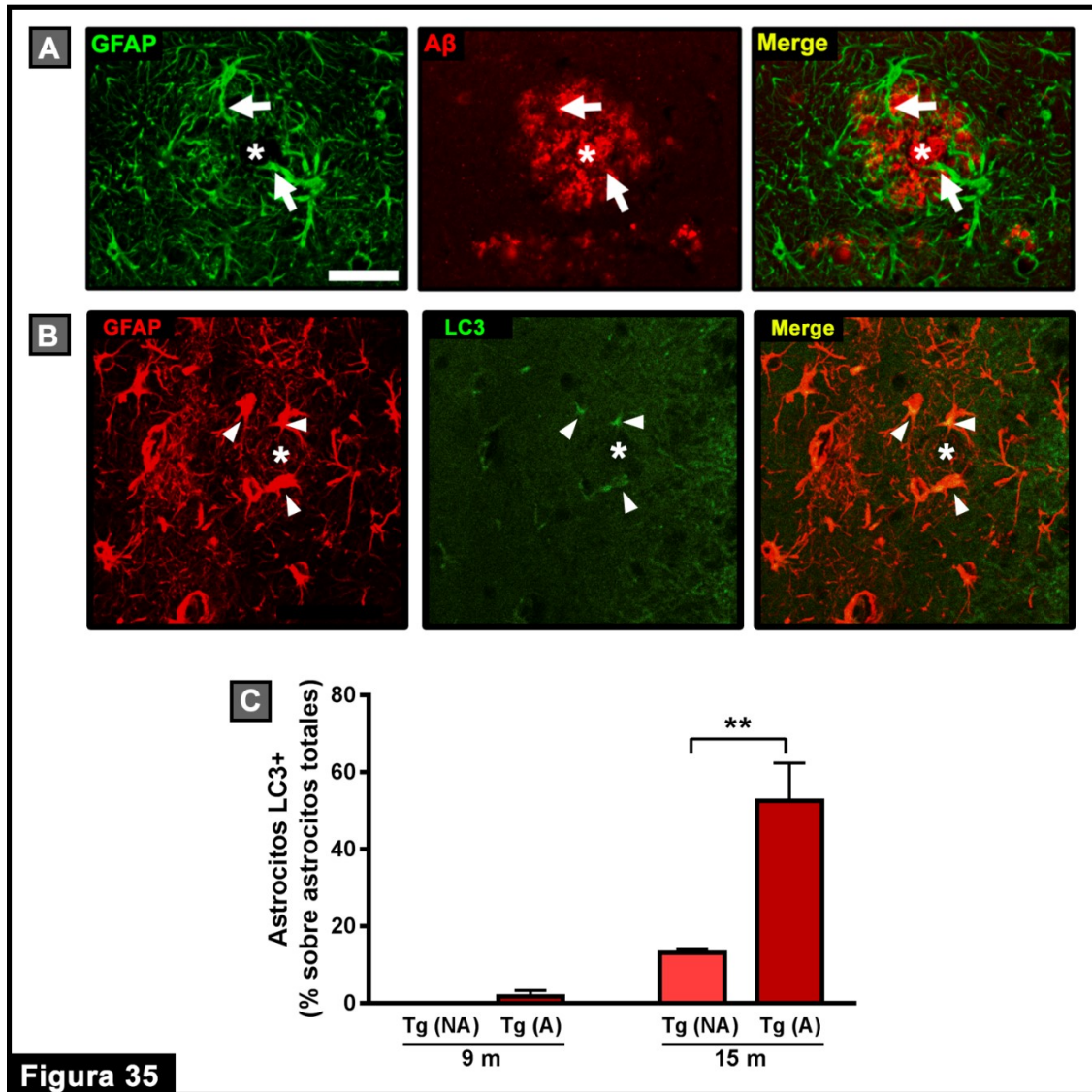
▲ **Alteraciones morfológicas en astrocitos hipocampales en etapas avanzadas de la patología.** Empleando el mismo tipo de reconstrucciones que se ilustra en la Figura 32, se estimó el volumen y la relación superficie/volumen de astrocitos individuales en animales de 9 meses (A y B) y 15 meses de edad (C y D). En todos los casos, para los animales Tg se distinguió entre aquellos astrocitos asociados y no asociados a placas amiloides, identificados respectivamente como Tg (A) y Tg (NA). Los asteriscos representan diferencias respecto del grupo NTg para cada parámetro y edad (ANOVA de una vía seguido de comparaciones múltiples de Dunnet, * $p < 0,05$).

Por su parte, la densidad y el número total de células GPAP+ a los 9 y 15 meses de edad fue menor en animales Tg respecto de sus hermanos NTg (Figura 34A y 34B). Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, debido fundamentalmente a la variabilidad en el volumen de la región evaluada.



▲ Alteraciones en la densidad de astrocitos hipocampales en etapas avanzadas de la patología. Se tomaron imágenes de microscopía confocal de manera regular a diferentes planos y fueron condensados en una única imagen representativa de todo el espesor del corte. Sobre estas imágenes se estimó la densidad (A) y el número total de astrocitos (B), en la sub región de *stratum radiatum* bajo CA1 en animales de 9 meses y 15 meses de edad.

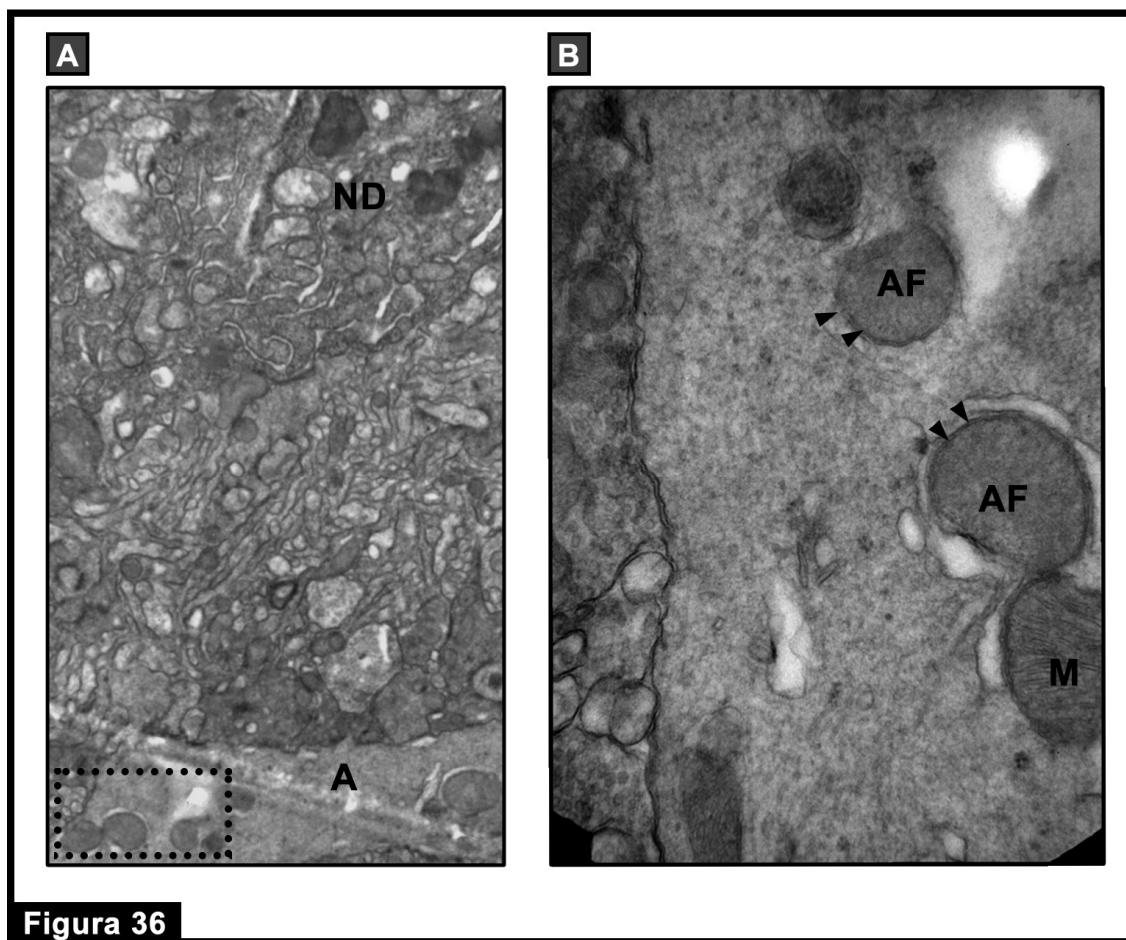
Al analizar las imágenes de microscopía confocal de la doble inmunofluorescencia para GFAP y A β se observó que en algunos casos las células astrogliales que se ubicaban en la periferia de placas amiloides tenían A β en su interior (Figura 35A, flechas). A partir de esta observación se planteó la hipótesis de que los astrocitos con citoesqueleto hipertrofiado y que están asociados a placas amiloides podrían ser capaces de internalizar parte del contenido del depósito. De ser así, el proceso de autofagia podría ser uno de los involucrados en el *clearance* de estos agregados, tal como ocurre en otros tipos celulares del SNC. Dado que existe poca evidencia de la capacidad de las células astrogliales para inducir su autofagia en estas condiciones, se decidió estudiar la presencia del marcador autofágico LC3 en el interior de astrocitos asociados a placas amiloides, mediante doble inmunofluorescencia (Figura 35B). En los animales NTg no se observó inmunoreactividad de LC3 en astrocitos para ninguno de los cortes histológicos evaluados. En los animales Tg de 9 y 15 meses de edad se observó la presencia de LC3 fundamentalmente en astrocitos asociados a placas amiloides (Figura 35C). En el caso de los animales de 15 meses de edad, alrededor de la mitad de los astrocitos asociados a depósitos fueron positivos para LC3, mientras que solo el 15% de los no asociados a placas también lo fueron.


Figura 35

▲ **Presencia del marcador autofágico LC3 en astrocitos cercanos a placas amiloides, y su dependencia con la edad.** Sobre cortes coronales de cerebro de ratones PDAPP-J20 conteniendo hipocampo se realizó una doble inmunofluorescencia para Aβ, empleando el anticuerpo 4G8, y GFAP (A) y para GFAP y LC3 (B). Las imágenes fueron tomadas sobre el hilio del giro dentado con microscopía confocal. Los asteriscos blancos indican el centro de una placa amiloide, las flechas señalan astrocitos que contienen Aβ intracelular y las puntas de flechas astrocitos con depósitos LC3+. La barra de escala corresponde a 50 μm. En el Panel C se muestra la cuantificación del porcentaje de células GFAP+/LC3+ en el hilio del hipocampo. El gráfico corresponde sólo al grupo Tg ya que el NTg no presentó astrocitos inmunopositivos para LC3. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos señalados (ANOVA de dos vías seguido por contrastes múltiples de Sidak, **p<0,01).

Con el objetivo de analizar la ultraestructura celular, se procesaron muestras de tejido para microscopía electrónica y se exploró la presencia de autofagosomas en astrocitos asociados a placas amiloides. Una evaluación preliminar sobre el hipocampo de ratones Tg de 15 meses de edad permitió detectar la presencia de signos de atrofia y daño tisular, compatibles con las alteraciones que se observan en el contexto de la

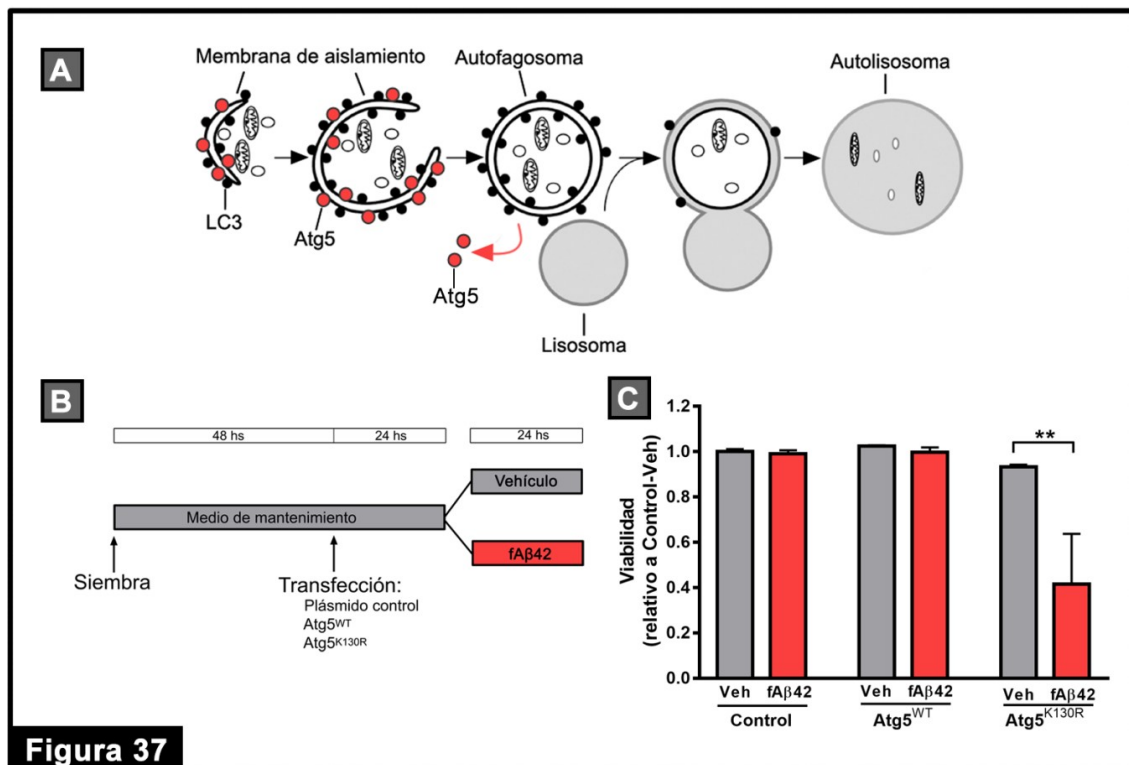
EA. La Figura 36 muestra parte del citoplasma de un astrocito (evidenciado por su aspecto poco electrodenso y la textura rugosa dada por la presencia de gránulos de glucógeno) localizada en la cercanía de un conjunto de neuritas distróficas, que sugieren la presencia de una placa amiloide. Evaluado a mayor aumento, se observa que el astrocito en cuestión posee en su citoplasma estructuras con forma de vesículas con doble membrana (Figura 36B, “AF”, puntas de flechas), que son típicas de los autofagosomas.



▲ **Presencia de autofagosomas en astrocitos cercanos a eventos de daño.** Imágenes representativas de microscopía electrónica obtenidas sobre el hipocampo de ratones Tg de 15 meses de edad. Se muestra un cúmulo de neuritas distróficas (ND) que sugieren la presencia cercana de una placa amiloide (A). Cerca de este foco de daño se encuentra parte del citoplasma de un astrocito (señalado como A). En la micrografía del Panel B se muestra en mayor detalle la zona señalada con línea punteada en A. Allí se observa que el astrocito contiene mitocondrias (M) y vesículas con doble membrana, compatibles con la estructura de autofagosomas (Puntas de flechas, AF).

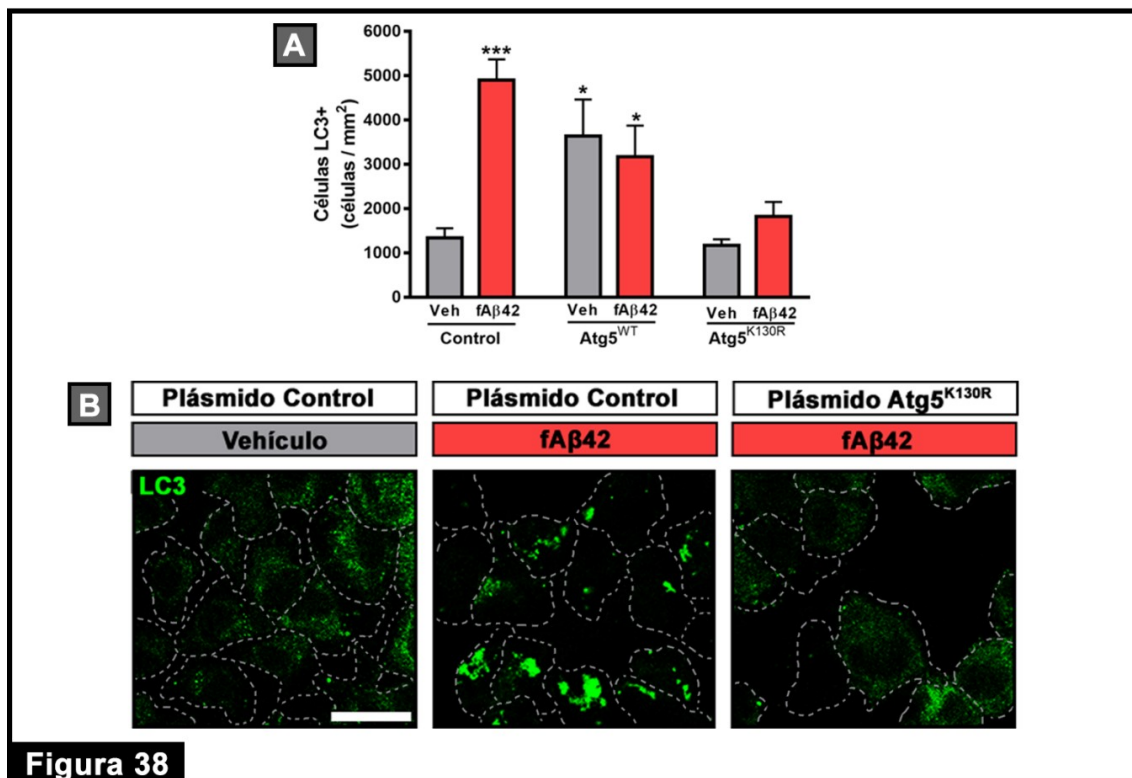
Con el objetivo de estudiar en detalle la modulación de la autofagia en la astrogliá, empleamos un sistema *in vitro* que permitiera evaluar su capacidad para internalizar péptidos amiloides. Para ello se utilizó la línea celular C6, derivada de astrocitoma de

rata, las cuales están ampliamente reportadas en la bibliografía y suelen ser utilizadas por su facilidad para ser transfectadas. En este caso, fueron transfectadas con un plásmido vacío, o bien con un plásmido que permite la sobreexpresión de Atg5 en su versión *wild type* (Atg5^{WT}) o con una mutación de la proteína que la hace no funcional (Atg5^{K130R}). Atg5 es clave en la vía de inducción de la autofagia, por lo tanto esta estrategia nos permite modular los niveles basales de este proceso (Figura 37A). Luego de ser transfectadas, las células fueron expuestas a péptidos Aβ1-42 previamente fibrilizados (fAβ42) para mimetizar la situación de exposición a placas amiloides (Figura 37B). La transfección no afectó *per se* a la viabilidad celular, sin embargo, cuando las células fueron expuestas a fAβ42, aquellas que expresaban Atg5^{K130R} tuvieron una reducción significativa de su viabilidad del 55,5% (Figura 37C).



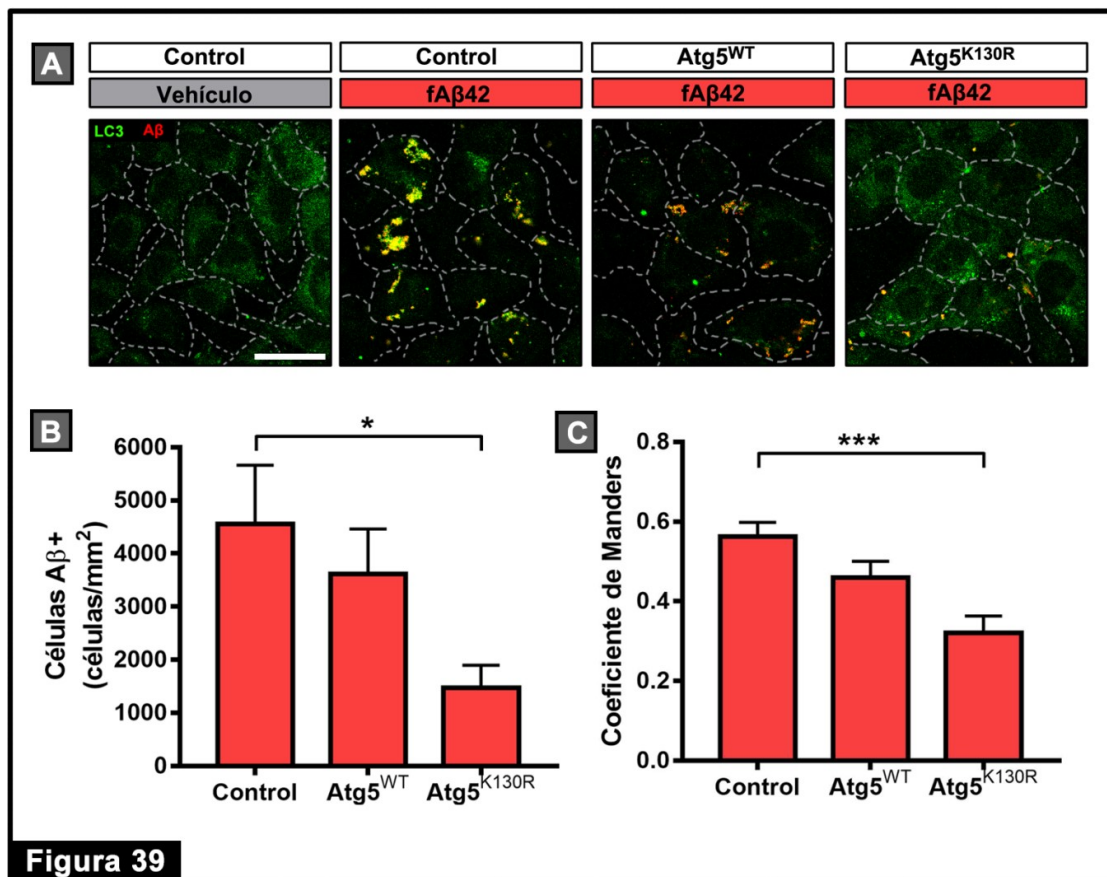
▲ Modulación de la autofagia en astrocitos *in vitro* por intervención en la vía de Atg5. En el Panel A se muestra un esquema que ilustra el rol clave de la proteína Atg5 durante la inducción de la autofagia. A partir de ello, se consideró la estrategia de transfectar a las células con un plásmido vacío o bien que permite la sobreexpresión de Atg5^{WT} y Atg5^{K130R}. Al finalizar la transfección, las células fueron tratadas durante 24 hs con vehículo o fAβ42 (B). Finalmente, se evaluó la viabilidad de las células al concluir el tratamiento mediante el ensayo de reducción de MTT (C). Los asteriscos representan diferencias significativas entre los grupos indicados (ANOVA de dos vías seguido de comparaciones múltiples de Sidak, **p<0,01).

Para corroborar que la transfección fuese efectiva y generase el efecto esperado a nivel de la autofagia, al finalizar el protocolo experimental las células fueron fijadas y procesadas para una inmunofluorescencia contra LC3. Tal como era esperado, la inmunofluorescencia para LC3 reveló que la transfección con Atg5^{WT} produjo un aumento del número basal de células LC3+, mientras que aquellas que expresaban Atg5^{K130R} no diferían del grupo control. Al ser tratadas con fA β 42, las células transfectadas con el vector vacío mostraron un marcado aumento de LC3, que no fue detectado si las células sobreexpresaban Atg5^{K130R} (Figura 38). Estos resultados corroboran que la transfección fue exitosa y que, en en estas condiciones experimentales, los astrocitos fueron capaces de inducir autofagia en respuesta a la estimulación con fA β 42.



▲ **Modulación de los niveles basales de autofagia en astrocitos en cultivo.** Células de la línea C6 fueron transfectadas con plásmidos que permiten la sobreexpresión de la proteína Atg5 en su versión *wild type* o mutada. Las células transfectadas y expuestas a fA β 42 fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia contra LC3. A partir del análisis de imágenes obtenidas con microscopía confocal se estimó la densidad de células LC3-positivas para cada tratamiento (A). Las imágenes del Panel B son representativas de los grupos experimentales que se indican. La barra de escala corresponde a 30 μ m. Las líneas punteadas indican el límite de cada célula. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto del grupo transfectado con el plásmido control y expuesto a vehículo (ANOVA de una vía seguido por comparaciones de Dunnet, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

Finalmente, se quiso evaluar si en aquellos casos en los que se observaba inducción de la autofagia había contenido de A β intracelular. Sobre fotos de microscopía confocal obtenidas a partir de una inmunofluorescencia contra A β , se cuantificó el número de astrocitos con contenido de amiloide intracelular luego de 24 hs de tratamiento (Figura 39). Se observó que el bloqueo de la autofagia por la expresión de Atg5^{K130R} redujo significativamente el número de células que contenían A β en su citoplasma (Figura 39B). Más aún, el estudio de colocalización entre LC3 y A β demostró que el 57% de la marca correspondiente a autofagosomas colocaliza con péptidos amiloides y disminuye si se bloquea la autofagia (Figura 39C). Estos resultados sugieren que, en estas condiciones, los astrocitos de la línea celular C6 son capaces de internalizar los péptidos amiloides a los que son expuestos y localizarlos en autofagosomas. Este proceso se ve impedido si la autofagia está bloqueada, lo cual termina conduciendo a una menor viabilidad celular.



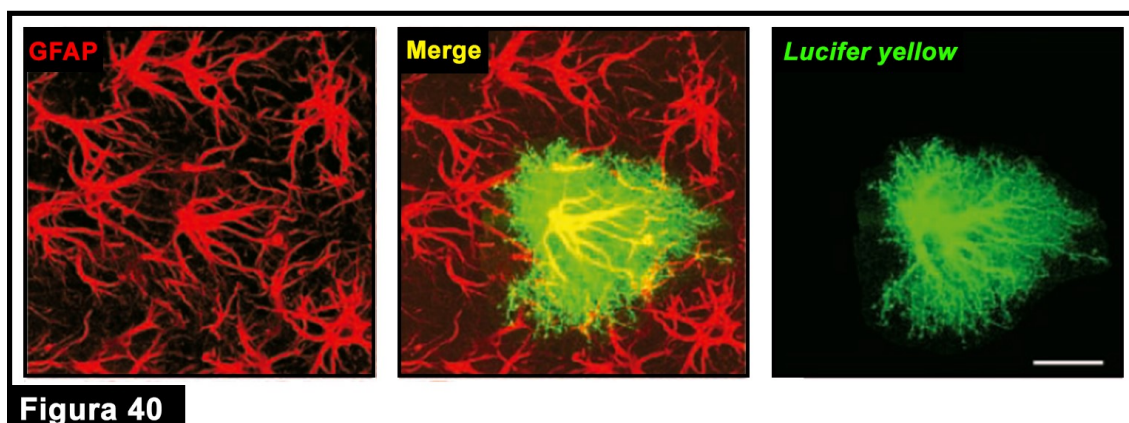
▲ Localización de péptidos A β en autofagosomas de células astrogliales. Luego de 24 hs de exposición a fA β 42, las células fueron procesadas para una doble inmunofluorescencia contra LC3 y A β . A partir de imágenes obtenidas por microscopía confocal (A), se determinó la densidad de células con A β intracelular (B) y la co-localización entre los antígenos detectados (C). La barra de escala representa 30 μ m. Las líneas punteadas en el Panel A indican el límite de cada célula. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos señalados (ANOVA de una vía seguido por comparaciones de Dunnet, *p<0,05, ***p<0,001).

4. Discusión

Los astrocitos presentan alteraciones morfológicas en etapas tempranas del proceso degenerativo del ratón PDAPP-J20.

Los astrocitos ocupan una posición estratégica en la UNV y a través de su interacción con múltiples tipos celulares cumplen funciones relacionadas con el mantenimiento de la homeostasis cerebral y la respuesta coordinada entre componentes de la UNV. En esta Tesis se reportan importantes alteraciones en astrocitos que son visualizados en el hipocampo de ratones PDAPP-J20 de diferentes edades a través de la detección por inmunofluorescencia de la proteína GFAP. La identidad de las células fue corroborada mediante la co-localización con otro reconocido marcador astrogliar: S100 β . De esta manera, se hallaron alteraciones en cuanto a la densidad y morfología de la señal GFAP+ a edades previas y posteriores a la presencia de placas amiloides.

El uso de GFAP para la visualización y el estudio de la morfología astrogliar ha sido sumamente utilizado en la bibliografía (Verkhratsky & Nedergaard, 2018). Sin embargo, se ha señalado que la señal inmunoreactiva para este componente del citoesqueleto no es representativa del volumen total de la célula. La Figura 40 fue tomada de un artículo publicado por Wilhelmsson y colaboradores en el que se compara la señal inmunoreactiva para GFAP y la presencia del trazador fluorescente *Lucifer Yellow*, el cual se inyecta directamente en el citoplasma de una célula única. El trazador fluorescente puede difundir libremente por el citoplasma, revelando que gran parte del volumen celular (con múltiples procesos pequeños en forma de arborizaciones) no es positiva para GFAP (Wilhelmsson et al., 2004). La proteína GFAP se localiza solamente en las ramas principales de los astrocitos, y representa aproximadamente el 15% del volumen celular total; por lo tanto, no sería representativa del volumen total de la célula (Bushong et al., 2002).

**Figura 40**

▲ **Astrocitos identificados por inmunodetección de GFAP o microinyección de la molécula fluorescente Lucifer Yellow.** Las imágenes fueron obtenidas del artículo publicado por Wilhelmsson y colaboradores (Vilhelmsson et al., 2004). La barra de escala corresponde a 20 μm .

Por esta razón, los resultados que se muestran en este Capítulo sobre superficie y volumen astrogliar (además del índice de complejidad morfológica calculado a partir de ellos) no deben ser interpretados como parámetros celulares sino como una caracterización del citoesqueleto astrogliar e indicador de reactividad glial. El citoesqueleto de filamentos intermedios de los astrocitos es muy dinámico, interviene en procesos de transporte intracelular y su organización puede responder a diferentes condiciones (Heimfarth et al., 2016; Potokar et al., 2007). GFAP es el principal componente del citoesqueleto de filamentos intermedios en astrocitos, junto con Vimentina y Nestina, y es necesario para la formación de una cicatriz glial ante un evento de trauma cerebral (Pekny et al., 1999; Wilhelmsson et al., 2004). Por lo tanto, GFAP no es solamente un componente estructural del citoesqueleto astrogliar cuya expresión aumenta pasivamente en astrocitos reactivos, sino que podría participar de la regulación del proceso neuroinflamatorio.

La asociación entre placas amiloides y astrogliosis reactiva (evaluada a través de la detección de GFAP) es un fenómeno conocido desde hace décadas (Rodríguez-Arellano, Parpura, Zorec, & Verkhratsky, 2016; Vijayan et al., 1991). Sin embargo, en esta Tesis se realiza un aporte relevante al describir alteraciones relacionadas con la reactividad glial de manera temprana en un modelo murino de EA, antes de la presencia de placas amiloides.

La menor complejidad en el citoesqueleto GFAP+ detectada a la temprana edad de 5 meses podría ser un indicio de astrogliosis reactiva incipiente si se considera que éste mismo parámetro presenta una disminución más marcada en astrocitos asociados a

depósitos seniles en edades avanzadas. Estos cambios morfológicos y estructurales en los astrocitos podrían implicar una pérdida temprana de función y un aumento en la vulnerabilidad neuronal. En este sentido, cambios similares fueron informados en cortes histológicos obtenidos *post-mortem* de pacientes con demencia y en el modelo experimental de EA conocido como triple transgénico a edades avanzadas (Rodríguez, Olabarria, Chvatal, & Verkhatsky, 2009; Senitz, Reichenbach, & Smith, 1995).

En esta Tesis se reporta además una disminución en el número total de células GFAP+ en animales Tg. Dado que la reducción en el número de astrocitos se observa tempranamente, una interpretación posible podría considerar que los animales Tg completan su desarrollo embrionario con un menor número de astrocitos. Sin embargo, empleando este mismo modelo, Wright y colaboradores reportaron un aumento en el número total de astrocitos en la región de CA3 del hipocampo de ratones Tg de 3 meses de edad; mientras que al mes y medio de edad no observaron diferencias entre ambos genotipos (Wright et al., 2013). Ese reporte permitiría concluir que el fenómeno de gliosis reactiva podría ser aún anterior a lo que se reporta en esta Tesis, y que a la edad de 5 meses ya se haya instalado un cuadro de activación astrogliol crónica.

Un punto relevante a tener en cuenta sería profundizar el estudio de GFAP, contemplando sus 10 isoformas, que se expresan en diferentes células. En cortes histológicos de pacientes con EA, se ha logrado identificar que junto con la astrogliosis reactiva aumenta la expresión de las 10 variantes de GFAP. Particularmente, la isoforma GFAP⁺¹ (generada por un corrimiento del marco de lectura) se expresa en un pequeño grupo de células, pero sus niveles muestran una correlación positiva con la edad de los pacientes y el depósito de A β (Kamphuis et al., 2014). Otra isoforma, denominada GFAP δ , ha sido identificada preferencialmente en zonas con potencial neurogénico, por lo que podría tener algún rol en la regulación de este proceso en contextos de neuroinflamación (Kamphuis et al., 2012).

En su conjunto, los resultados relacionados con la caracterización morfológica de los astrocitos presentados en esta Tesis aportan conocimiento valioso acerca de la capacidad de respuesta de los astrocitos desde etapas tempranas en la EA experimental. Sería importante profundizar acerca de los cambios funcionales que podrían estar asociados a estas alteraciones morfológicas durante la instalación del cuadro degenerativo. En etapas avanzadas, en cambio, cobra relevancia la distinción entre astrocitos cercanos a placas amiloides y no asociados a placas. Aquellos que se encuentran en íntima interacción con placas podrían estar respondiendo

fundamentalmente a A β fibrilizado, mientras que los demás estarían expuestos en mayor medida a A β soluble, generando perfiles de activación diferentes. Por eso, es necesario profundizar en los mecanismos asociados a la heterogeneidad del proceso de reactividad glial entre diferentes poblaciones astrogliales.

La exposición a péptidos A β produce cambios en la autofagia astrogliar.

Una de las funciones que se propone que pueden estar alteradas en astrocitos reactivos es su capacidad para degradar A β . En esta Tesis se aportan datos que permitirían proponer a la autofagia astrogliar como un posible mecanismo involucrado en el depurado de A β . Esta vía aún no ha sido estudiada en profundidad por otros grupos en células astrogliales.

Se utilizó el marcador de autofagosomas LC3 para caracterizar el estado general de la autofagia en células astrogliales de ratones PDAPP-J20. Se observaron agregados LC3+ únicamente en animales transgénicos, y mayormente en astrocitos reactivos cercanos a placas amiloides. La presencia de vesículas de doble membrana, presumiblemente autofagosomas, en el citoplasma de células gliales fue confirmada por microscopía electrónica. Este fenómeno parecería indicar que existe algún tipo de interacción entre la reactividad glial y la vía autofágica-lisosomal.

Sin embargo, la mera observación de cúmulos de LC3 no permite concluir si se debe a un impedimento de la autofagia. Por esta razón, es frecuente que este tipo de estudios tenga que ser complementado con experimentos *in vitro*, de manera tal que el sistema sea más fácil de manipular y permita intervenir sobre un único tipo celular. En este caso, se utilizó la línea celular C6 derivada de astrocitoma de rata. Esta línea celular ha sido utilizada en la bibliografía por su facilidad para el mantenimiento y la transfección. Diferentes estudios demuestran que esta línea no difiere en su capacidad de responder a estímulos relacionados con el proceso de neuroinflamación y a péptidos A β en comparación a cultivos primarios astrogliales (Fontana, Kristensen, Dubs, Gemsa, & Weber, 1982; Pentreath & Mead, 2004). Por lo tanto, ha sido considerado como un modelo válido para este tipo de estudios.

En este caso, las células C6 fueron expuestas a A β 1-42 fibrilizado con la intención de simular la exposición a placas amiloides. Con el objetivo de evaluar si la autofagia astrogliar tenía algún efecto en la respuesta de las células ante los agregados, se modularon los niveles basales de autofagia previamente a la exposición. Para ello se empleó una estrategia genética que permite la sobreexpresión de la proteína Atg5 en

su versión *wild type* o con una mutación no funcional. La expresión de Atg5 mutante produjo una disminución significativa en los niveles intracelulares de A β en células C6. No es posible determinar con este resultado si ello se debe a una menor internalización o a una mayor degradación. Sin embargo, se observó también que estas células fallan en inducir un aumento de LC3 en respuesta a A β . Por lo tanto, si se considera que la autofagia es un posible mecanismo de depurado de estos agregados, sería posible que el resultado obtenido sea causado por una menor internalización. A pesar de ello, se requieren experimentos complementarios que permitan demostrar que la autofagia es efectivamente un mecanismo relevante de depurado de A β en estas células, en comparación a otros mecanismos clásicamente estudiados, como la fagocitosis (S. J. Lee, Seo, & Koh, 2015).

La sobreexpresión de Atg5 mutante *per se* no afectó significativamente la viabilidad mitocondrial de los astrocitos evaluada por el ensayo de MTT, pero sí en presencia de A β . Este resultado indicaría que la autofagia es un proceso relevante para preservar la homeostasis de estas células en contextos patológicos. En el mismo sentido que este resultado, Motori y colaboradores demostraron que la autofagia es necesaria para mantener la estabilidad mitocondrial ante estímulos pro-inflamatorios. El tratamiento con IL-1 β , LPS o IFN- γ favorecen de manera transitoria la fisión mitocondrial en astrocitos aislados y cultivos organotípicos. Este efecto se hace permanente si se bloquea la autofagia. Curiosamente, este cuadro de impedimento autofágico favorece la generación de especies reactivas del oxígeno, estableciendo una relación entre autofagia y reactividad astroglial (Motori et al., 2013).

En el Capítulo 3 de esta Tesis se ha discutido la existencia de una interacción entre la respuesta neuroinflamatoria y el flujo autofágico en células microgliales. Dado que los astrocitos también participan en la respuesta neuroinflamatoria, no debería descartarse la hipótesis de que exista en estas células una regulación similar a la que se observó en la microglía. Sin embargo, sería necesaria una mayor acumulación de evidencia experimental que permita definir si la presencia de A β produce una inhibición de la autofagia en astrocitos, y en tal caso si existen vías comunes que regulan la interrelación entre respuesta inflamatoria y autofagia en ambos tipos de células gliales.

En modelos experimentales de otras enfermedades neurodegenerativas se ha establecido una relación entre presencia de agregados tóxicos y alteraciones en la autofagia astroglial. Agregados de α -sinucleína (como los que se observan en casos de Enfermedad de Parkinson) son capaces de inducir reactividad astroglial y modular la respuesta autofágica (H. J. Lee, Kim, & Lee, 2010). La expresión de α -sinucleína

con mutaciones asociadas a la Enfermedad de Parkinson en células derivadas de astrocitos produce una inhibición del proceso autofágico, evidenciado por acumulación de agregados p62+. Interesantemente, el patrón de resultados es similar al que se describió para células microgliales en el Capítulo 3 de esta Tesis.

La posibilidad de que la autofagia astrogliar tenga algún rol en el proceso patológico de la EA se vuelve especialmente relevante a la hora de plantear posibles intervenciones terapéuticas. En este sentido, numerosos trabajos han evaluado el efecto de la administración periférica de rapamicina, y han detectado un efecto positivo en diferentes modelos murinos de EA. Este efecto es normalmente atribuido a un impacto sobre la autofagia neuronal y el mantenimiento de la proteostasis de ese tipo celular. Sin embargo, a la luz de este y otros resultados no se debe descartar que la inducción de la autofagia glial pueda ser un blanco de acción promisorio, facilitando el depurado de agregados tóxicos.

Cap. 5

Vasculatura Cerebral

1. **Introducción**

Organización y función de la vasculatura cerebral.

El mantenimiento de los millones de neuronas que existen en el cerebro humano requiere de una adecuada administración del acceso a los nutrientes y de la eliminación de los desechos cerebrales. Por lo tanto, la regulación del flujo sanguíneo cerebral y el mantenimiento de la BHE son fenómenos clave en la preservación de la homeostasis cerebral. Ambos fenómenos tienen a las células endoteliales cerebrales como protagonistas indiscutidos.

Recientemente, se ha introducido el concepto de “zonación endotelial” para referirse a la heterogeneidad en las características que las células endoteliales exhiben a lo largo del árbol vascular. Este concepto se fundamenta en el estudio del transcriptoma a nivel de célula endotelial única en diferentes segmentos vasculares del cerebro de ratón (Vanlandewijck et al., 2018). De esta manera, se observa que existe un patrón diferencial de expresión génica de acuerdo al segmento de la vasculatura. Además, las células cercanas entre sí tienen un patrón similar, generando un gradiente continuo. Este tipo de aproximaciones permitió por primera vez afirmar que a nivel del endotelio arterial predomina la expresión de genes que codifican para factores de transcripción, mientras que en el endotelio capilar predomina la expresión de proteínas involucradas en mecanismos de transporte, con especial énfasis en el receptor de transferrina (involucrada en el transporte de hierro hacia el parénquima cerebral) y la proteína MFSD2a (por las siglas en inglés de “*major facilitator superfamily domain containing protein 2a*”), necesaria para el transporte de ácidos grasos omega-3 a través de la BHE. Por otro lado, a lo largo de todo el eje arterial-venoso se verifican altos niveles de expresión de genes relacionados con la síntesis de proteínas y los ribosomas, sugiriendo que hay células con elevada actividad traduccional a lo largo de todo el árbol vascular (Sweeney, Kisler, Montagne, Toga, & Zlokovic, 2018; Vanlandewijck et al., 2018).

La UNV en el cerebro de mamíferos actúa de manera coordinada para regular el flujo sanguíneo en respuesta a la demanda neuronal, a través del proceso de acoplamiento neurovascular. El músculo liso vascular, a través de su actividad contráctil, puede regular el diámetro de arteriolas, aumentando o disminuyendo el flujo sanguíneo localmente en zonas de mayor o menor actividad neuronal, respectivamente (Iadecola, 2017; Kisler et al., 2017). Del mismo modo, pericitos con actividad contráctil pueden regular el diámetro de algunos capilares (Peppiatt, Howarth, Mobbs, & Attwell, 2006).

Como se explicó en el Capítulo 1 de esta Tesis, si bien el músculo liso vascular es uno de los principales efectores de este mecanismo, astrocitos, pericitos, neuronas y células endoteliales establecen una compleja serie de interacciones que hacen posible este fenómeno (Sweeney et al., 2018).

Por otro lado, la BHE está constituida por un endotelio continuo a lo largo de todo el árbol vascular (Zhao et al., 2015). La BHE restringe el flujo paracelular y obliga a definir una serie de mecanismos de transporte específicos para el intercambio de sustancias entre el parénquima cerebral y el plasma en circulación. La formación y el mantenimiento de la BHE está íntimamente vinculada a la presencia de múltiples complejos de unión que conectan células endoteliales adyacentes y limitan el flujo paracelular, tal como se indica en la Figura 41 (Zhao et al., 2015). Las uniones entre células endoteliales son mantenidas a través de una compleja integración entre señales provenientes de células astrogliales, músculo liso vascular, pericitos, neuronas y otras células endoteliales; tanto durante la formación de la BHE en el desarrollo embrionario como en la vida adulta (Sweeney, Zhao, Montagne, Nelson, & Zlokovic, 2019).

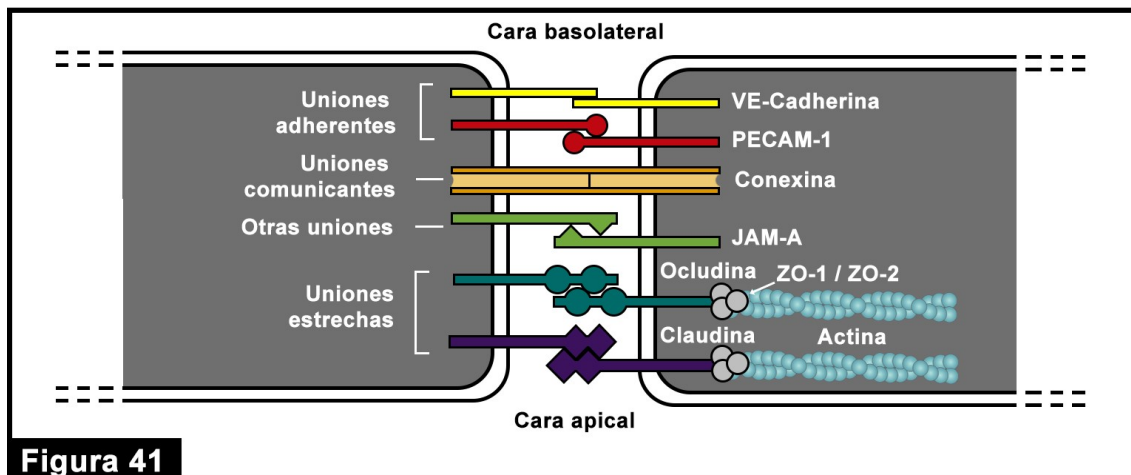


Figura 41

▲ **Complejos de adhesión entre células endoteliales cerebrales.** El esquema representa los diferentes tipos de uniones que se pueden establecer entre células endoteliales cerebrales y las principales familias de proteínas involucradas en su constitución. Las uniones estrechas, particularmente, son un tipo de uniones impermeables que están involucradas con la formación de la BHE. Este esquema fue construido a partir de la información publicada por Sweeney y colaboradores (Sweeney et al., 2019).

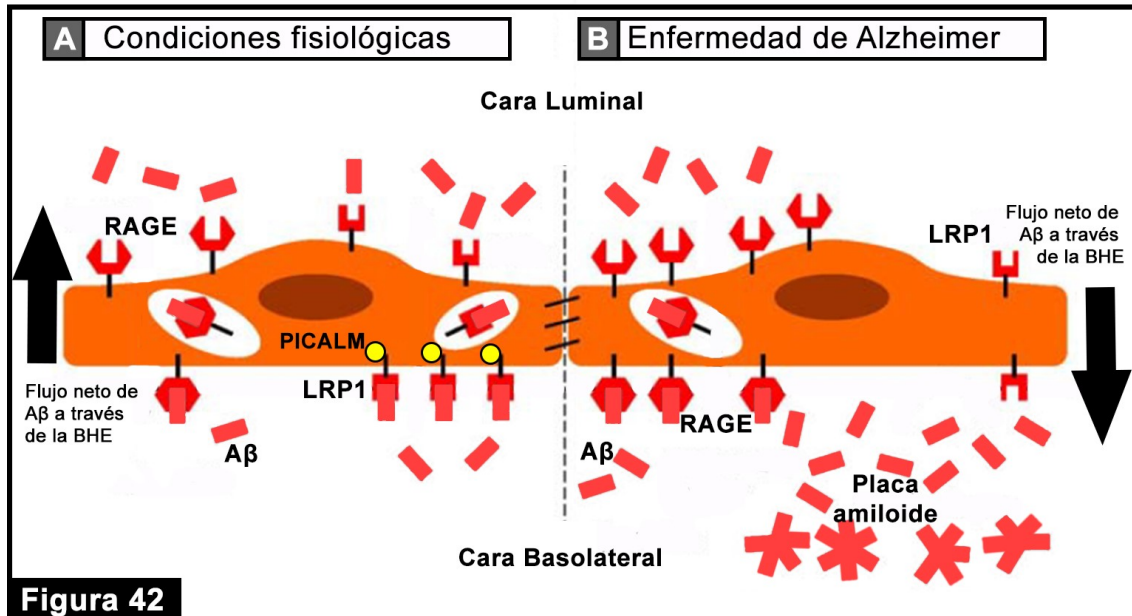
Entre las células endoteliales se establecen uniones adherentes en la proximidad de la membrana basolateral, constituidas fundamentalmente por proteínas de la familia de las Cadherina y la proteína PECAM-1 (por las siglas en inglés de “*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1*”), que establecen uniones directas homofílicas. Asimismo,

los complejos de uniones adherentes interactúan con el citoesqueleto; y la fosforilación de cadherinas es necesaria para la migración transendotelial de linfocitos, monocitos y neutrófilos en condiciones de neuroinflamación (Sweeney et al., 2019).

En el extremo opuesto, cerca de la membrana apical, se localizan los complejos de uniones estrechas, formadas por proteínas de la familia de Ocludina y Claudina (Nitta et al., 2003). Asimismo, estos complejos interactúan del lado citoplasmático con proteínas de la familia *Zona Occludens*, las cuales actúan como adaptadores entre los complejos de unión y el citoesqueleto de actina (Tornavaca et al., 2015). Adicionalmente, Distrofina actúa como una proteína andamiaje que recluta filamentos de Actina y Vinculina a los complejos de unión estrecha, favoreciendo la estabilidad de las uniones y su interacción con el citoesqueleto (Ueda et al., 2000).

Una de las características asociadas al endotelio cerebral es la presencia de una gran cantidad de mitocondrias, debido al elevado gasto energético que implica el mantenimiento de mecanismos de transporte específicos. La mayoría de los transportadores, canales y receptores involucrados en el transporte a través de la BHE han sido validados por estudios de transcriptómica y/o proteómica a partir de cerebro de ratones (Calabria & Shusta, 2008; Daneman et al., 2010). En el endotelio cerebral se expresan en alta densidad transportadores de glucosa GLUT1, transportadores de aminoácidos de monocarboxilatos, de ácidos grasos, de nucleótidos, entre otros (Sweeney et al., 2019). Algunos mecanismos de transporte están directamente ligados a la hidrólisis de ATP, como el mediado por transportadores de tipo ABC (Qosa, Miller, Pasinelli, & Trotti, 2015), la bomba de sodio-potasio (Funck et al., 2015), y otros.

Finalmente, algunas moléculas se vehiculizan a través del endotelio cerebral *via* transporte en masa mediada por receptores, como es el caso del receptor de transferrina (Johnsen et al., 2017), de insulina (Rhea, Rask-Madsen, & Banks, 2018) y de leptina (Golden, Maccagnan, & Pardridge, 1997). Esta transcitosis es también uno de los principales mecanismos a través de los cuales, en condiciones fisiológicas, ocurre el depurado de A β . Como se muestra en la Figura 42A, este mecanismo involucra proteínas del medio extracelular, intracelular y receptores de membrana.



▲ **Mecanismos de transito de Aβ a través de la BHE en condiciones fisiológicas y patológicas.**

El esquema representa una monocapa de células endoteliales y las principales proteínas involucradas en el transporte de Aβ a través de la BHE. RAGE se localiza principalmente en la cara luminal, mientras que LRP1 se localiza en la cara adluminal. En condiciones fisiológicas (A), los niveles de LRP1 son considerablemente mayores que los de RAGE, favoreciendo la salida de péptidos Aβ. En el contexto de la EA (B), aumentan los niveles de RAGE y disminuyen LRP1 y su proteína asociada PICALM, lo cual desplaza el equilibrio hacia la acumulación de Aβ en el parénquima cerebral. El esquema fue modificado a partir del publicado por Weiss y colaboradores (Weiss, Miller, Cazaubon, & Couraud, 2009).

En la cara basolateral las células endoteliales de mamíferos expresan el receptor para lipoproteínas LRP1. Esta proteína puede interactuar directamente con péptidos Aβ solubles (Deane et al., 2004; Shibata et al., 2000). La porción citoplasmática de LRP1 unida a su ligando puede interactuar con la proteína PICALM, la cual actúa como un reclutador de Clatrina para favorecer la endocitosis del complejo (Zhao et al., 2015). LRP1 además, puede interactuar con la proteína ApoE, la cual se acompleja con moléculas de colesterol o de Aβ, permitiendo un flujo masivo de péptidos amiloides (Deane et al., 2008). Algunos autores sugieren que esta interacción explica en parte el riesgo asociado al alelo ε4, ya que esa variante de ApoE tendría menos afinidad por LRP1 y afectaría por lo tanto al depurado de Aβ (Montagne, Zhao, & Zlokovic, 2017).

Por otro lado, en la cara luminal de las células endoteliales se expresa el receptor RAGE. Curiosamente, RAGE en las células endoteliales ha sido poco estudiado por su rol en la respuesta neuroinflamatoria (como sí fue estudiado en astrocitos), pero es bien conocida su intervención en la transito de Aβ en el sentido contrario al mediado por LRP1 (Deane et al., 2003). La interacción entre RAGE y Aβ puede

facilitar el reingreso de estos péptidos al tejido nervioso, fenómeno normalmente asociado a condiciones patológicas (Deane et al., 2003; Deane et al., 2012).

Más recientemente, se ha estudiado en detalle el rol de la Glicoproteína-P en el transporte de A β a través de la BHE en condiciones fisiológicas. Esta proteína es un transportador multi-sustrato asociado a hidrólisis de ATP. Su expresión se encuentra disminuida por factores pro-inflamatorios y aumentada por algunos factores de origen astrogial. En modelos murinos de EA, la ausencia de esta proteína se asoció a una aceleración en la deposición de A β (Park, Kook, Park, & Mook-Jung, 2014; W. Wang, Bodles-Brakhop, & Barger, 2016).

Alteraciones vasculares en el contexto de la EA.

Desde los últimos años se ha obtenido evidencia creciente que permite asociar a la EA con la disfunción neurovascular en pacientes (Iturria-Medina et al., 2016; Kisler et al., 2017; Montagne et al., 2016). Diferentes estudios en humanos demuestran que la patología cerebrovascular contribuye a la demencia y al diagnóstico clínico de la EA (Arvanitakis, Capuano, Leurgans, Bennett, & Schneider, 2016). De manera análoga, la presencia de factores de riesgo cardiovasculares aumentan la probabilidad de padecer EA y pueden actuar sinérgicamente con la patología amiloide promoviendo el deterioro cognitivo (Rabin et al., 2018).

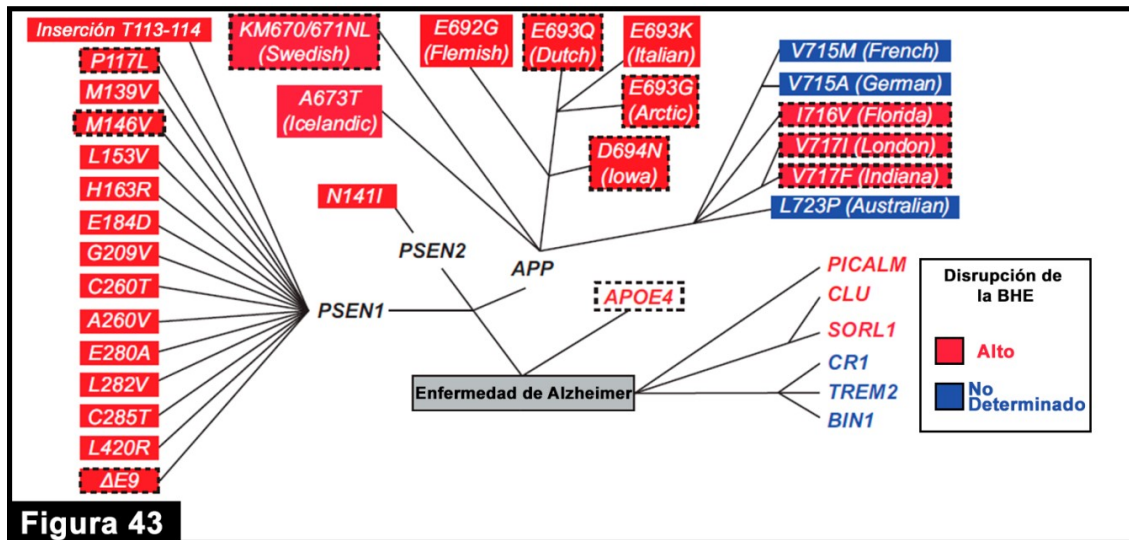
Particularmente, se ha propuesto que la integridad de la BHE podría estar afectada en etapas tempranas de la patología (B.V. Zlokovic, 2008). Estudios de neuroimágenes permiten detectar eventos de ruptura de la BHE fundamentalmente en la región de CA1 y en el giro dentado del hipocampo asociados a la edad, los que se aceleran en individuos con deterioro cognitivo leve incluso antes de que se detecten biomarcadores típicos de la EA en el líquido cefalorraquídeo, como Tau fosforilado y disminución de A β 1-42 (Montagne et al., 2015).

Un evento de daño severo local puede generar una microhemorragia y, en el contexto de la EA, estos eventos suelen estar asociados a vasos afectados por la angiopatía cerebral amiloide. Esto se desprende de trabajos que demuestran que la presencia de microhemorragias está asociada a una patología amiloide instalada, y que las zonas donde se evidencian son aquellas que se afectan más tempranamente y que se encuentran aún más comprometidas por la presencia de depósitos amiloides perivasculares (Brundel et al., 2012; Shams & Wahlund, 2016).

Numerosos autores asocian la presencia de la EA con alteraciones en los mecanismos de *clearance* de A β a través de la BHE. La importancia de este proceso y la evidencia

acumulada acerca de sus alteraciones en el contexto de la EA ha captado el interés de numerosos investigadores. La Hipótesis Neurovascular de la EA pone en el centro a este proceso fisiológico, planteando que la disrupción del mismo es un primer evento que lleva luego a la acumulación de A β y a la patología amiloide (B.V. Zlokovic, 2008) (Figura 42B). Sin embargo, uno de los principales problemas que enfrentó esta hipótesis es la dificultad para hallar un modelo adecuado para contrastarla.

En modelos de ratones transgénicos para APP se ha determinado que la patología amiloide está asociada a alteraciones vasculares, sugiriendo que existe una relación entre la forma familiar de la EA y la integridad vascular. Más aún, el estudio de genoma a gran escala permite asociar a múltiples *loci* en el gen que codifica para APP y Presenilina-1, así como variantes en los genes que codifican para Presenilina-2, ApoE, PICALM, TREM2 y el Receptor Asociado a Sortilina 1 (SORL1) con una mayor incidencia de daño vascular. Esta información luego fue validada por estudios a partir de pacientes que portan mutaciones en los genes mencionados o empleando ratones transgénicos (Figura 43).



▲ **Variantes génicas asociadas a la EA y su efecto sobre la integridad vascular.** La figura fue tomada del artículo publicado por Sweeney y colaboradores (Sweeney et al., 2019). En el mismo se indican mutaciones en el gen que codifica para APP, Presenilina-1 (PSEN1) y Presenilina-2 (PSEN2), así como variantes alélicas en otros genes que representan un aumento en el riesgo de padecer EA según estudios de genoma a gran escala. El color de la letra o del fondo de cada variante representa a la intensidad de daño a la BHE que fue asociada cada una, de acuerdo a la escala que se indica a la derecha. Para el caso de aquellas variantes rodeadas por líneas de puntos, su efecto sobre la integridad de la BHE fue validada a través de modelos animales.

LRP1 es una de las proteínas más estudiadas en el marco del transporte de A β a través de la BHE. Su expresión se encuentra disminuida en células endoteliales afectada por patología amiloide tanto en sistemas *in vitro* como en modelos animales y pacientes con EA (Kanekiyo & Bu, 2014; Shinohara, Tachibana, Kanekiyo, & Bu, 2017) (Figura 42B). Esta observación ha llevado a sugerir a la restauración de los niveles de LRP1 como una posible estrategia para facilitar la eliminación de A β desde el parénquima cerebral. En este sentido, aproximaciones genéticas demostraron que aumentando o disminuyendo los niveles de LRP1 en vasos sanguíneos cerebrales disminuye o acelera respectivamente la deposición de placas amiloides y la angiopatía cerebral amiloide observada en animales transgénicos para APP que portan la mutación *Swedish* en el modelo 5xFAD (R.D. Bell & Zlokovic, 2009; Karch, Cruchaga, & Goate, 2014; Storck et al., 2016).

En sentido opuesto, la expresión de RAGE se encuentra aumentada en la vasculatura cerebral de ratones 5xFAD (Deane et al., 2003; Kook et al., 2012) (Figura 42B). Asimismo, el bloqueo de RAGE disminuye la patología amiloide y mejora el desempeño cognitivo en ratones PD-APP (Deane et al., 2003; Deane et al., 2012).

En el endotelio cerebral, RAGE ha sido estudiado por su rol en la transcitosis de A β . Sin embargo, tal como se describió en capítulos anteriores, cumple un rol fundamental en células gliales durante la respuesta neuroinflamatoria ante la presencia de DAMPs, como A β . El rol de las células endoteliales en la respuesta neuroinflamatoria se encuentra mucho menos estudiado. Llamativamente, así como RAGE induce la activación de la vía de NF κ B en células gliales, esta misma vía se activa en células endoteliales en condiciones angiogénicas (Duran et al., 2017), facilitando la pérdida de adhesión entre células y la ruptura de la matriz extracelular vascular. Este efecto, en el endotelio cerebral, estaría asociado a la ruptura de la BHE. Hace unos años, Kook y colaboradores establecieron que, en un sistema *in vitro* de células endoteliales cerebrales, la interacción entre RAGE y A β 1-42 puede causar disrupción de los complejos de unión estrecha y liberación de metaloproteasas de matriz (Kook et al., 2012). También se ha demostrado que A β 1-40 produce disminución de los niveles de proteínas unión estrecha y mayor permeabilidad en una monocapa de células endoteliales de cerebro murino (Tai, Holloway, Male, Loughlin, & Romero, 2010; Yamazaki & Kanekiyo, 2017). Si bien existe evidencia acerca de los efectos de las diferentes formas de A β sobre la integridad de la BHE y su relación con el proceso inflamatorio, en la mayoría de los trabajos publicados no se evalúa el efecto de A β 1-42 y A β 1-40 sobre el mismo modelo experimental, ni se compara el impacto de los diferentes estadios de agregación de los péptidos amiloides.

En cuanto a modelos animales, la BHE se encuentra claramente afectada en ratones Tg2576, que portan la mutación *Swedish* en la secuencia de APP humano. La integridad de la BHE ha sido evaluada a través del extravasado de moléculas circulantes endógenas, como fibrinógeno, IgG y albúmina, así como también por el extravasado de trazadores fluorescentes administrados exógenamente. Estas características suelen estar asociadas a degeneración o pérdida de pericitos, músculo liso vascular y/o células endoteliales (Biron, Dickstein, Gopaul, & Jefferies, 2011; Kumar-Singh et al., 2005; Park et al., 2014; Paul, Strickland, & Melchor, 2007; Sagare et al., 2012).

Por otro lado, también se han reportado alteraciones en el flujo sanguíneo en pacientes con EA. Diferentes estudios han demostrado que sujetos con impedimento cognitivo leve presentan disminución en el flujo sanguíneo de zonas clave del cerebro (Hays, Zlatar, & Wierenga, 2016; Montagne et al., 2016; Wierenga et al., 2012). Llamativamente, el cambio del diagnóstico de impedimento cognitivo leve a EA se vio asociado a una reducción en el flujo sanguíneo cerebral más global y severa (Alexopoulos et al., 2012; Dai et al., 2009). Cambios similares han sido descritos en modelos experimentales de EA familiar que mostraron un menor flujo sanguíneo cerebral, menor respuesta a agentes vasodilatadores y disfunción en el acoplamiento neurovascular (Kisler et al., 2017; Niwa et al., 2000).

Estos fenómenos han sido atribuidos principalmente a efectos vasoactivos y vasculotóxicos de A β , pero también a otros efectos que son independientes del mismo. Por ejemplo, Park y colaboradores demostraron en un ratón transgénico para APP con las mutaciones *Swedish*, *Dutch* e *Iowa* que el tratamiento con un secuestrador de especies reactivas de oxígeno revierte las alteraciones en el flujo sanguíneo a edades tempranas pero no a edades avanzadas, sugiriendo que el envejecimiento y la deposición de A β generan alteraciones irreversibles, las cuales probablemente estén mediadas por la degeneración de pericitos y músculo liso vascular (Park et al., 2014). Además, ratones que portan el alelo ϵ 4 de ApoE humano presentan disfunción endotelial y alteraciones en el flujo sanguíneo cerebral, de manera independiente a la deposición de A β (Alata, Ye, St-Amour, Vandal, & Calon, 2015; R.D. Bell, 2012).

Estos antecedentes sugieren que existe una asociación entre el desarrollo de demencia tipo Alzheimer y la presencia de alteraciones vasculares. Particularmente, los antecedentes en modelos animales para EA familiar sugieren un vínculo entre A β y la disfunción endotelial. Sin embargo, la mayoría de estos estudios no toman en consideración la progresión de los cambios vasculares en relación a otras patologías asociadas a la EA, como la deposición de A β . Por lo tanto, aún se requieren estudios

en modelos animales que permitan caracterizar la cinética de estos cambios en relación a los eventos histopatológicos.

Vasculatura cerebral y Proteostasis.

Se mencionó en capítulos anteriores de esta Tesis que el tratamiento sistémico de ratones que modelizan la EA experimental con Rapamicina produjo una mejora cognitiva asociada a una disminución de la patología amiloide. Paralelamente, este tipo de intervenciones también generan una mejora en parámetros neurovasculares que se encuentran afectados en estos modelos, tales como el flujo sanguíneo cerebral, la integridad de la BHE y el acoplamiento neurovascular, según fue revisado recientemente por Van Skike y Galván (Van Skike & Galvan, 2018). Estos antecedentes sugieren que el complejo mTOR expresado en células vasculares podría ser relevante en la patogénesis de la EA.

Sin embargo, otros autores sugieren que el aumento de la autofagia vascular podría no ser beneficioso para la integridad de la UNV, formando parte de los eventos patológicos que ocurren en el marco de la EA y otras patologías que afectan al SNC (K. A. Kim et al., 2018). Recientemente, Chan y colaboradores demostraron que la menor actividad de mTOR y el aumento de LC3 están asociados a una disminución en los niveles de las proteínas de unión estrecha inducida por A β 1-42 en un cultivo de células endoteliales cerebrales, sugiriendo un rol vasculotóxico de la autofagia endotelial (Chan et al., 2018). Resultados similares se observaron en otros contextos patológicos. Por ejemplo, la privación de oxígeno y glucosa produce una disminución de Claudina-5 en sistemas *in vitro* mediada por la degradación de esta proteína vía autofagia (J. Liu et al., 2016), mientras que, en un modelo murino de isquemia cerebral, un aumento de la autofagia es capaz de exacerbar el daño ocasionado a la BHE (W. L. Li et al., 2013). Estos antecedentes ponen en evidencia que aún se dispone de poca información acerca del rol de mTOR y los procesos regulados por este durante cuadros patológicos y de qué manera su intervención podría regular el curso de las alteraciones patológicas.

Los efectos de A β sobre la proteostasis vascular no estarían limitados únicamente a la degradación de proteínas por la vía autofágica-lisosomal. Fonseca y colaboradores demostraron que células endoteliales derivadas de cerebro de rata expuestas a A β 1-40 presentan estrés de retículo endoplasmático, con fallas en el mecanismo de respuesta a proteínas mal plegadas, desregulación del sistema ubiquitina-proteasoma,

acumulación de proteínas ubiquitinizadas e impedimento en el flujo autofágico (Fonseca, Oliveira, Pereira, & Cardoso, 2014).

Estos antecedentes permiten inferir que la pérdida de la proteostasis y sus consecuencias en el contexto de la EA no sería un evento exclusivo de células gliales y neuronales, sino que tendría también sus efectos sobre células endoteliales. Sin embargo, dado que la gran mayoría de esta evidencia se sustenta en experimentos *in vitro*, estas hipótesis todavía deben ser confirmadas en modelos animales. De ser así, el mantenimiento de la proteostasis vascular podría ser propuesto como una estrategia de intervención en patologías que presentan compromiso de la vasculatura cerebral, como la EA.

2. Objetivos e Hipótesis

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, los objetivos particulares de este Capítulo son:

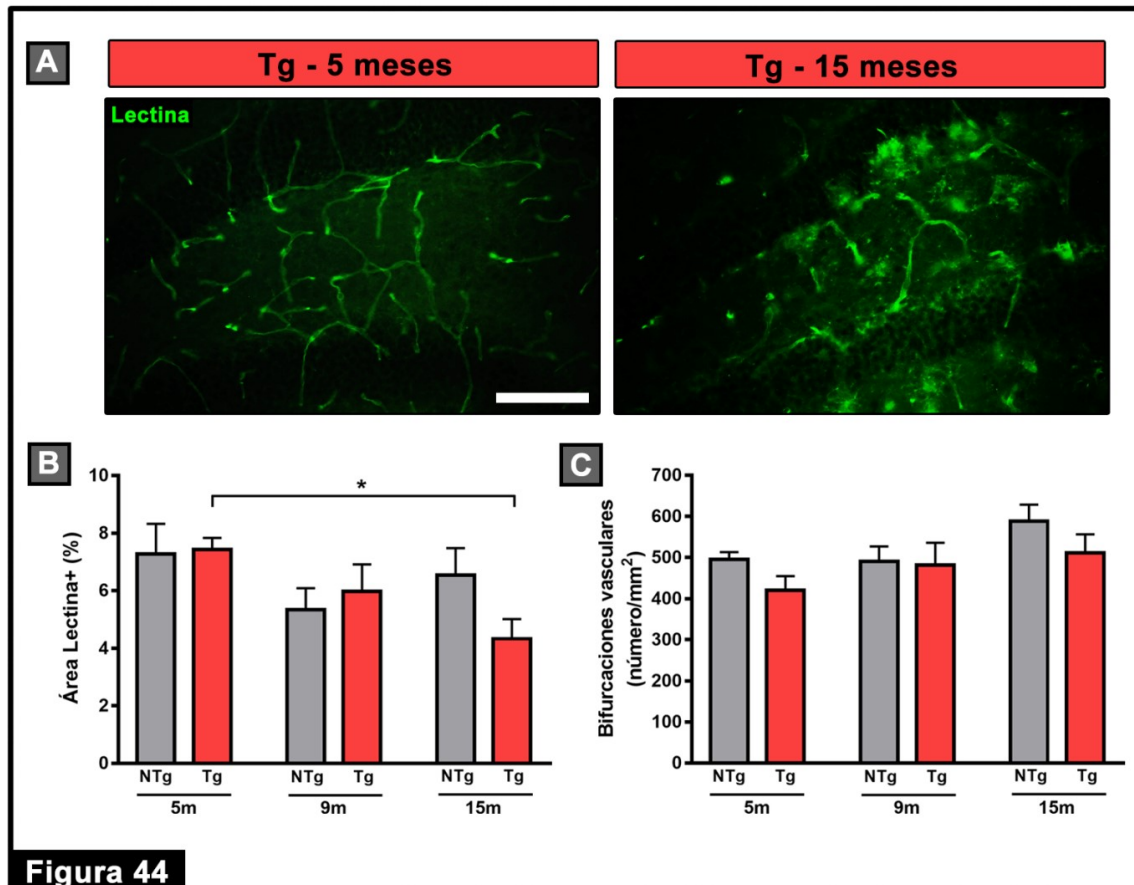
1. Evaluar la progresión de las alteraciones vasculares en el hipocampo del ratón PDAPP-J20, haciendo énfasis en los cambios que puedan detectarse antes de la formación de depósitos amiloides y aquellos relacionados con la integridad de la BHE. En este sentido, *se plantea la hipótesis de que, al igual que en otros modelos de ratones transgénicos para APP humano, algunas alteraciones sutiles pueden hacerse evidentes desde etapas tempranas, pero la ruptura de la BHE ocurre en etapas avanzadas de la patología amiloide.*
2. Comparar el efecto diferencial de las especies A β 1-40 y A β 1-42 en sus formas solubles y fibrilares para inducir la activación de las células endoteliales. Se propone *la hipótesis de que las células endoteliales poseen mayor sensibilidad a ambas formas del péptido A β 1-40, la especie más abundante en los depósitos perivasculares.*
3. Estudiar el rol del receptor RAGE en el proceso de activación endotelial y pérdida de las propiedades de BHE. En este punto se evaluará *la hipótesis de que el bloqueo de RAGE antagoniza el efecto de A β sobre los cambios relacionados con la activación endotelial.*
4. Analizar la capacidad de las células endoteliales de inducir autofagia en presencia de A β 1-42, de manera comparativa a lo ya descrito para células gliales. En este sentido, *se propone la hipótesis de que el flujo autofágico aumenta en células endoteliales como consecuencia de la exposición al contexto patológico de la EA.*
5. Estudiar a nivel de la microvasculatura cerebral las vías y los procesos alterados de manera global a través de un estudio de proteómica. Se pretende analizar los resultados obtenidos con el objetivo de caracterizar a las funciones de las proteínas afectadas de manera global.

3. Resultados

Alteraciones anatómicas de la vasculatura cerebral

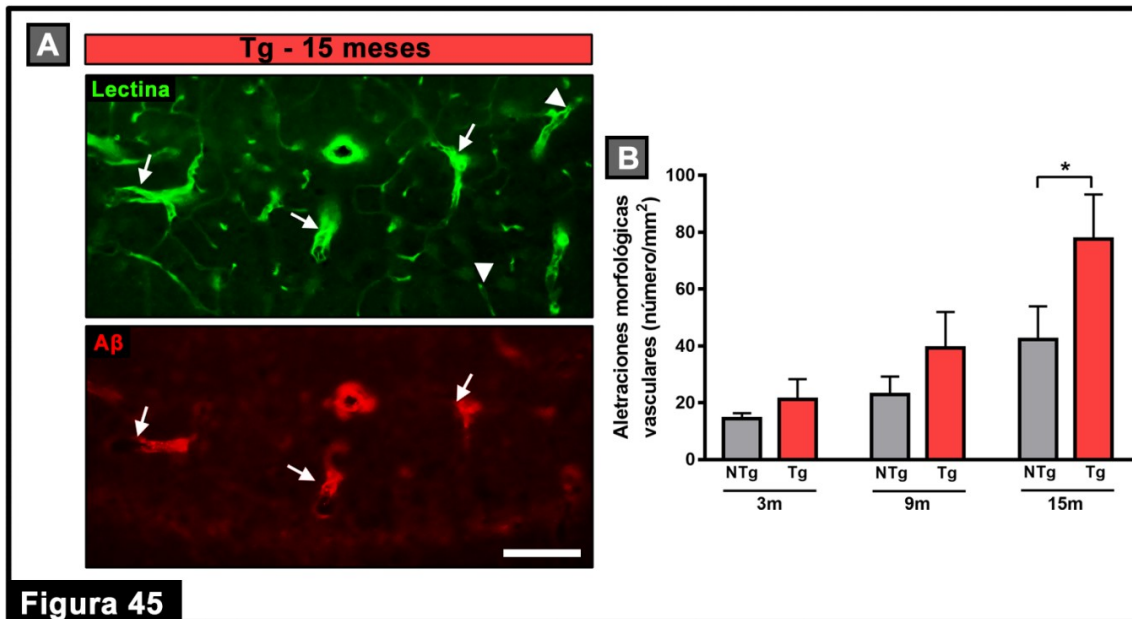
El cerebro es uno de los órganos más vascularizados en mamíferos. Alteraciones en la vasculatura cerebral pueden llevar a la disfunción del sistema nervioso, ya sea mediante la desregulación del transporte específico de sustancias a través de la BHE, o bien por su participación en el proceso neuroinflamatorio. Las células endoteliales cerebrales expresan en sus membranas glicoproteínas capaces de interactuar con la lectina de tomate. Por ello, la tinción con lectina de tomate acoplada a fluoresceína sobre cortes histológicos de cerebro de ratón permite visualizar la vasculatura cerebral y estudiar sus características morfológicas. Esta tinción permite identificar no sólo vasos de calibre medio y grande, si no también visualizar capilares sanguíneos con cierto grado de detalle (Figura 44A).

La cuantificación del área vascular total en el hilio del giro dentado –una de las zonas más vascularizadas del hipocampo–, demostró que los animales Tg presentaron una disminución significativa de la densidad vascular a los 15 meses de edad, cambio que no se observó en los animales NTg (Figura 44B). La complejidad del árbol vascular fue evaluada a través de la cuantificación de los eventos de bifurcaciones vasculares, parámetro que no mostró diferencias significativas entre edades ni genotipos. Si bien la microglía hiperreactiva se marcó positivamente en la tinción con lectina de tomate, su morfología fue distinguible de la de los vasos sanguíneos y excluida del análisis.



▲ **Densidad y complejidad del árbol vascular en el hipocampo de ratones PDAPP-J20.** Sobre cortes coronales de cerebro de ratones NTg y Tg de diferentes edades se realizó una tinción con lectina fluorescente. A través de imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia (A) se cuantificó el área vascular total (B) y la densidad de eventos de ramificaciones vasculares (C). La barra de escala corresponde a 70 μ m. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos señalados (ANOVA de dos vías seguido por comparaciones de Tukey, * $p < 0,05$)

El análisis detallado de la morfología vascular visualizada por la tinción con lectina de tomate permite identificar en animales Tg de edad avanzada eventos anormales, tales como la presencia de repliegues de la pared vascular (Figura 45A, flechas) y angostamiento de la luz de los vasos sanguíneos (Figura 45A, punta de flecha). El acoplamiento con una inmunofluorescencia específica contra A β permitió evaluar que algunas de estas alteraciones coincidieron con la presencia de depósitos amiloides perivasculares. La cuantificación de estos eventos permitió corroborar que, a los 15 meses de edad, los animales Tg presentaron un aumento significativo de las anomalías vasculares con respecto a los animales NTg.



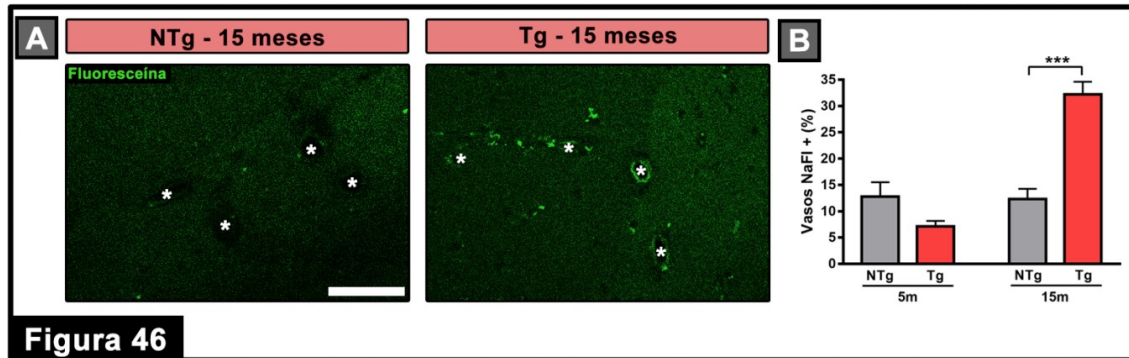
▲ **Alteraciones morfológicas vasculares en el hipocampo del ratón PDAPP-J20 y su relación con depósitos perivascuales.** Se realizó una inmunofluorescencia contra Aβ acoplada a una tinción con lectina fluorescente y se tomaron imágenes por microscopía de epifluorescencia (A). Sobre las imágenes obtenidas de vasos positivos para lectina se cuantificó la densidad de eventos de repliegues de la pared vascular (Flechas) y angostamiento de la luz vascular (puntas de flechas) en animales NTg y Tg de diferentes edades (B). La barra de escala corresponde a 30 μm. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos señalados (ANOVA de dos vías seguido por comparaciones múltiples de Sidak, *p<0,05).

En su conjunto, estos resultados sugieren que, en etapas avanzadas del proceso degenerativo del ratón PDAPP-J20, el hilio del giro dentado presenta atrofia vascular y signos morfológicos de daño en vasos sanguíneos, fundamentalmente en aquellos que contienen en su periferia agregados de Aβ.

Integridad de la Barrera Hematoencefálica.

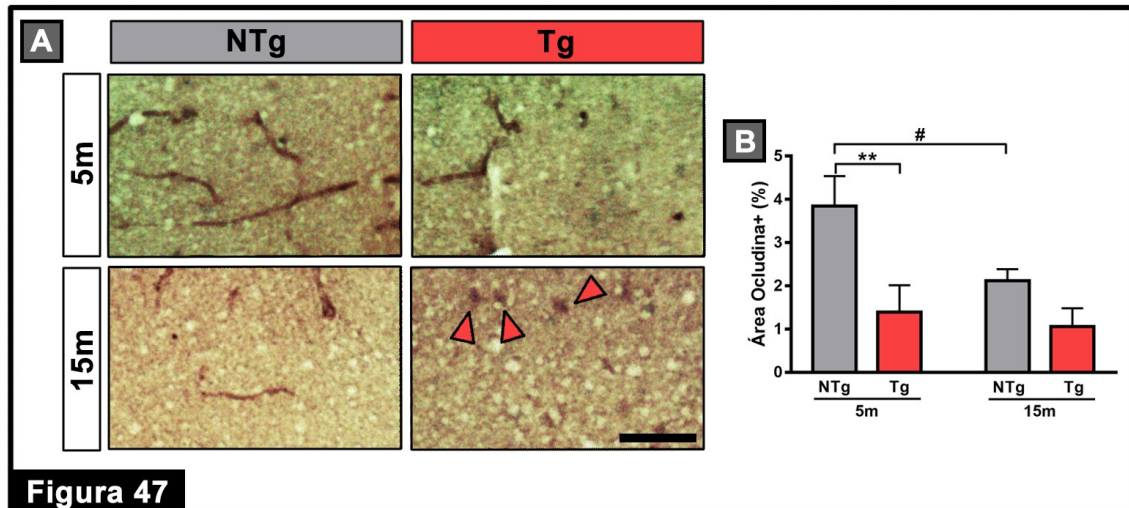
La vasculatura cerebral –a diferencia de la vasculatura de otros órganos- tiene la particularidad de constituir la BHE. Con el objetivo de evaluar si las alteraciones anatómicas observadas estaban asociadas a alteraciones en la integridad de la BHE, se analizó el extravasado de fluoresceína de sodio en vasos sanguíneos hipocámpales, luego de someter a los animales a una inyección intraperitoneal de solución concentrada de esta molécula fluorescente y posterior perfusión con solución fisiológica. Dado que la fluoresceína normalmente no atraviesa la BHE, su presencia en la cara basolateral pone en evidencia la presencia de eventos de ruptura o

debilitamiento de la misma. Sobre cortes coronales de cerebro de ratones que recibieron fluoresceína, se obtuvieron imágenes con microscopía de epifluorescencia y se evaluó la presencia de extravasado en vasos sanguíneos de la zona molecular del Asta de Amón y del giro dentado (Figura 46A). El porcentaje de vasos positivos para el extravasado de fluoresceína fue significativamente mayor en animales Tg de 15 meses respecto de los controles de la misma edad, y respecto de los propios animales Tg en etapas tempranas (Figura 46B)



▲ **Detección de la pérdida de integridad de la BHE por el extravasado de fluoresceína de sodio.** Animales Tg y NTg de 5 y 15 meses de edad recibieron por vía intraperitoneal 100 μ L de solución de fluoresceína de sodio 2%. Luego de permitir la circulación durante 45 minutos, los animales fueron anestesiados, perfundidos y decapitados. Se obtuvieron cortes histológicos que fueron luego analizados por microscopía de epifluorescencia (A). Los asteriscos blancos representan la luz de vasos sanguíneos. Sobre las imágenes obtenidas se cuantificó el porcentaje de vasos de la zona molecular del Asta de Amón y el giro dentado con extravasado de fluoresceína de sodio (B). La barra de escala corresponde a 50 μ m. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos señalados (ANOVA de dos vías seguido por comparaciones múltiples de Tukey, *** $p < 0,001$).

Paralelamente, se evaluó el patrón de la expresión de la proteína Ocludina, uno de los principales componentes de los complejos de uniones estrechas que constituyen la BHE. A través de una inmunohistoquímica empleando un anticuerpo específico (Figura 47A), se observó que en el giro dentado, los animales Tg presentan una disminución del 63,7% en el área inmunoreactiva para Ocludina desde los 5 meses de edad, y se mantiene en estos valores bajos hasta al menos los 15 meses. Los animales NTg, en cambio, presentaron valores más elevados a edades tempranas y un descenso de los mismos durante el envejecimiento (Figura 47B). A los 15 meses de edad, si bien no hay diferencias entre genotipos, se observó que en el grupo Tg la expresión de ocludina muestra un patrón de inmunoreactividad alterado, con mayor segmentación que en el hipocampo de los animales controles (Figura 47A, puntas de flechas).



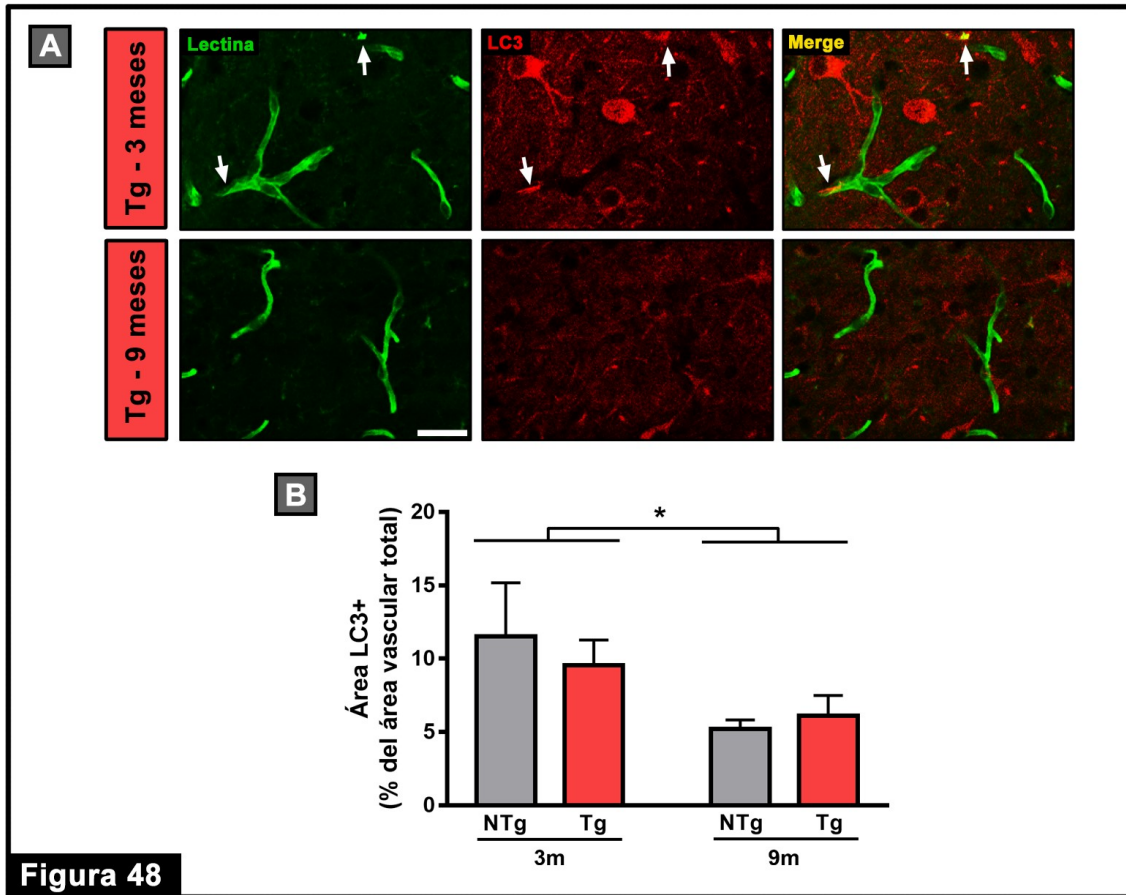
▲ **Patrón de inmunoreactividad para ocludina en el hilio del giro dentado de ratones PDAPP-J20.** Se realizó una inmunohistoquímica contra ocludina empleando secciones finas de cerebro de ratones PDAPP-J20 conteniendo hipocampo. El panel A muestra imágenes representativas obtenidas por microscopio óptico. Sobre dichas imágenes, se cuantificó el área total positiva para ocludina (B). La barra de escala corresponde a 50 μ m. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos señalados (ANOVA de dos vías seguido por comparaciones múltiples de Tukey, ** $p < 0,01$, # $p < 0,05$).

Los resultados aquí expuestos sugieren que las alteraciones anatómicas observadas en los animales Tg a edades avanzadas están asociadas a la pérdida de la integridad de la BHE, evaluada por el extravasado de fluoresceína. A edades tempranas, si bien no fue posible detectar daño en la BHE, la disminución de la inmunoreactividad para Ocludina podría ser un signo temprano de debilitamiento de la misma.

Autofagia en células endoteliales cerebrales.

Como se demostró en los capítulos anteriores, cambios en los niveles de autofagia o su desregulación son parte de los fenómenos que se observan en células gliales durante el proceso patológico del ratón PDAPP-J20. Con el objetivo de evaluar si la autofagia podría estar desregulada también en células endoteliales cerebrales, como parte de los eventos patológicos que podrían llevar a atrofia vascular y daño en la BHE, se realizó una inmunofluorescencia para el marcador de vesículas autofágicas LC3 acoplado a una tinción con lectina de tomate fluorescente (Figura 48A). El estudio de colocalización entre ambos marcadores demostró que no existieron diferencias entre animales Tg y NTg respecto de la inmunoreactividad para LC3 en células endoteliales. Sin embargo, se observó una disminución significativa del 46,2% en

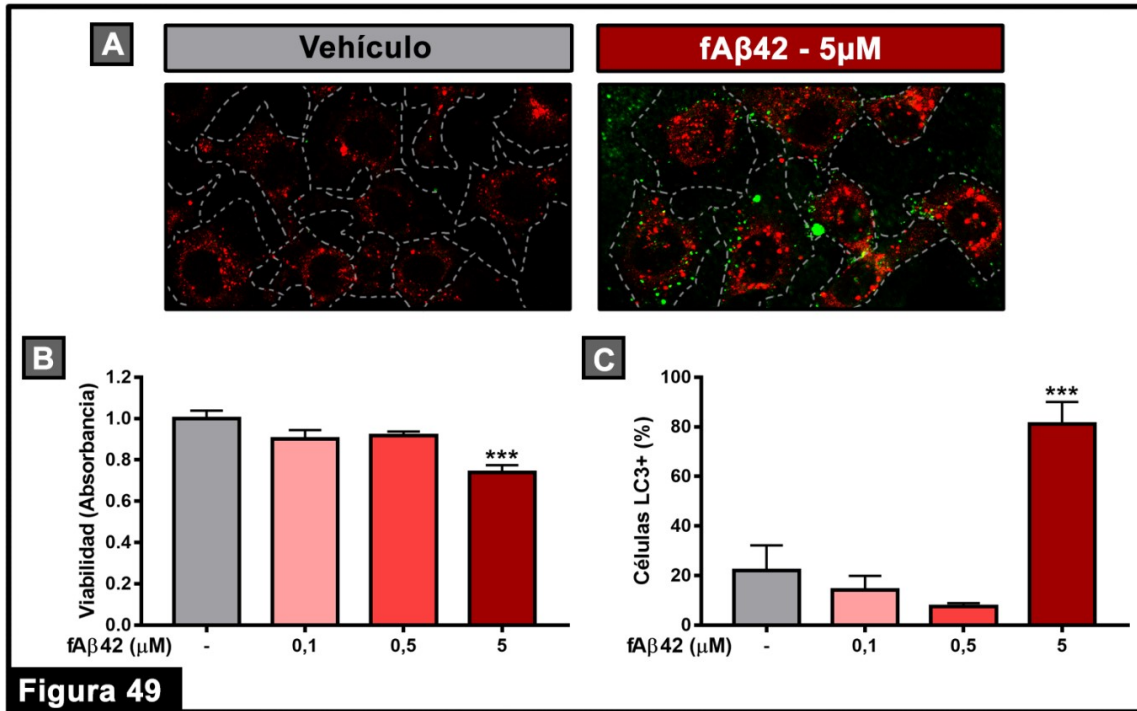
promedio debida al envejecimiento, que es independiente del genotipo de los animales.



▲ **Patrón de inmunoreactividad para LC3 en la vasculatura hipocámpal de ratones PDAPP-J20.** Cortes coronales de cerebro de ratón conteniendo hipocampo fueron procesados para una inmunofluorescencia contra LC3 combinada con una tinción con lectina de tomate. Sobre imágenes obtenidas por microscopía confocal, se pudo evidenciar acumulación de autofagosomas en células vasculares (A, flechas). La colocalización entre ambas señales fue analizada cuantitativamente (B). La barra de escala corresponde a 20 μ m. El asterisco indica un efecto principal debido a la edad, independientemente del genotipo de los animales (ANOVA de dos vías, * $p < 0,05$).

A continuación, se empleó un modelo *in vitro* para evaluar en mayor detalle la capacidad de las células endoteliales para modular la autofagia en presencia de péptidos amiloides. Se emplearon células endoteliales de microvasculatura cerebral humana (HBMEC, por las siglas en inglés de *Human Brain Microvascular Endothelial Cells*). Estas células fueron expuestas a concentraciones crecientes de A β 1-42 previamente fibrilizado (fA β 42), con el objetivo de simular la condición de exposición a depósitos amiloides y así intentar mimetizar el contexto de la patología. Sobre estas células, se realizó una doble inmunofluorescencia para LC3 y A β (Figura 49A). La

concentración de 5 μM , la más alta de las ensayadas, estuvo asociada a un aumento significativo del porcentaje de células LC3+ (Figura 49C), un aumento de casi 4 veces comparado con células que fueron expuestas a vehículo. Sin embargo, el ensayo de MTT demostró que a esta misma concentración hubo una reducción del 22% en la viabilidad celular (Figura 49B).



▲ **Inmunoreactividad para LC3 en células endoteliales expuestas a fAβ42.** Células de la línea HBMEC fueron estimuladas con concentraciones crecientes de fAβ42, fijadas y procesadas para inmunofluorescencia contra LC3 y Aβ (A, el canal rojo corresponde a LC3 y el verde a Aβ). Sobre las imágenes obtenidas por microscopía confocal se cuantificó el porcentaje de células positivas para LC3 (C). Paralelamente, se determinó la viabilidad celular a través del ensayo de reducción de MTT (B). Los asteriscos representan diferencias significativas respecto del grupo que recibió vehículo (ANOVA de una vía seguido por comparaciones múltiples de Dunnet, *** $p < 0,001$).

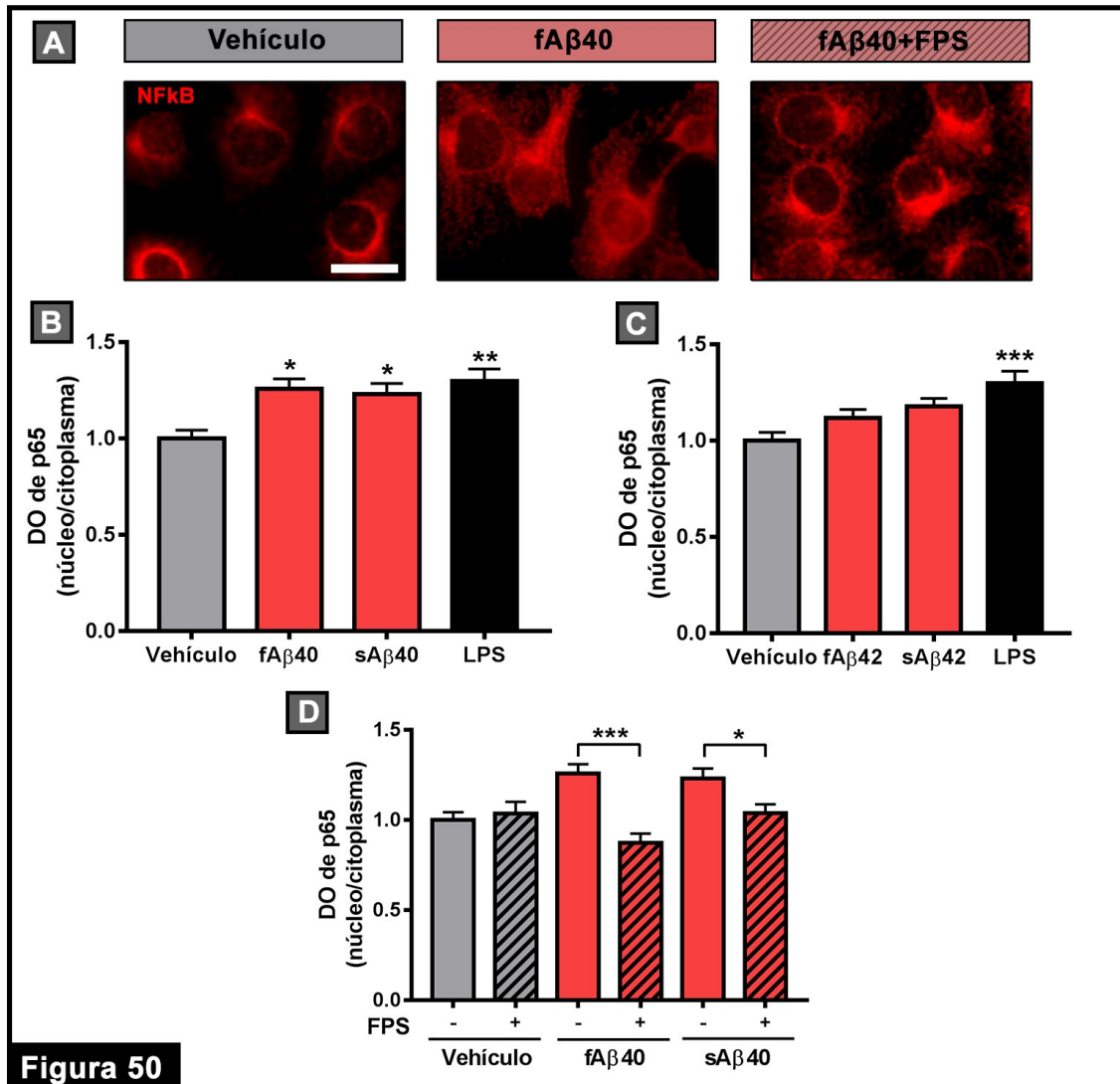
Estos resultados sugieren que (al menos en este modelo experimental), las células endoteliales cerebrales no presentan importantes cambios en el marcador autofágico LC3 en el contexto patológico de la EA (como sí ocurre en células gliales), y que el aumento de células LC3+ ante la exposición a fAβ42 5 μM se debería mayoritariamente a una activación de la autofagia como mecanismo de muerte celular y en menor medida a una adaptación al contexto adverso.

Activación *in vitro* de células endoteliales cerebrales por A β .

En un contexto de daño tisular, diferentes factores pro-inflamatorios y moléculas asociadas al daño pueden inducir la activación endotelial y de esta manera regular la transcripción específica de ciertos genes. Como parte del proceso neuroinflamatorio, la presencia de estas señales puede producir pérdida de la integridad de la BHE. Como ocurre en otros tipos celulares, la señalización mediada por estos estímulos confluye en la vía del factor de transcripción NF κ B, que puede activarse en respuesta a la presencia de A β . En la EA, las formas predominantes de A β son aquellas que tienen 40 y 42 aminoácidos de longitud, siendo la primera la que preferencialmente se deposita en la zona perivascular. Más aún, existe un equilibrio entre la forma soluble y la forma agregada de cada uno de estos péptidos. Con el objetivo de distinguir entre la capacidad de cada una de estas especies y formas de A β para activar a las células endoteliales, se evaluó la translocación al núcleo de NF κ B en células HBMEC mediante inmunofluorescencia contra la subunidad p65 (Figura 50A).

La estimulación durante 2 hs con A β 1-40 (tanto fibrilar como soluble) produjo un aumento significativo de la intensidad de la señal para NF κ B en el núcleo respecto del citoplasma, comparando contra aquellas células que se expusieron al vehículo (Figura 50B). En cambio, ni la forma fibrilizada de A β 1-42 ni su forma soluble promovieron la activación endotelial, evaluada de esta manera (Figura 50C).

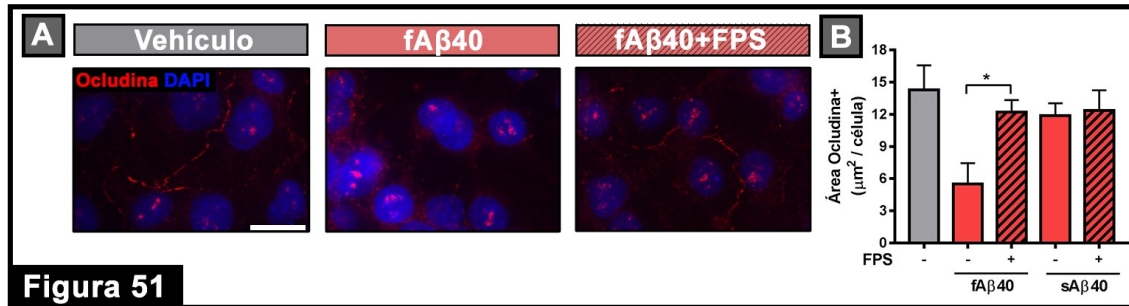
La translocación nuclear de NF κ B puede ser inducida en respuesta a la activación de diferentes receptores de membrana. En el contexto de la EA, el A β puede interactuar con diferentes proteínas de membrana. Una de estas moléculas es el receptor RAGE, el cual se expresa en alta densidad en células endoteliales cerebrales. La interacción RAGE-A β ha sido muy bien caracterizada en el marco de la transcitosis de A β a través de la BHE; sin embargo, existe menos evidencia acerca del rol de este receptor en la activación endotelial por A β . Para evaluar si RAGE está involucrado en la translocación nuclear de NF κ B inducida por A β 1-40 se utilizó el compuesto FPS-ZM1 (FPS). Esta molécula actúa como un inhibidor competitivo de A β para el receptor RAGE. La cuantificación de la inmunofluorescencia contra la subunidad p65 demostró que la presencia de FPS previno la translocación de NF κ B inducida por A β 1-40, tanto en su forma fibrilar como soluble (Figura 50D). Estos resultados indicarían que la especie de A β de 40 aminoácidos de longitud (aquella que se deposita preferencialmente en la zona perivascular) es capaz de activar las células endoteliales de manera RAGE-dependiente, al menos en las condiciones de este experimento *in vitro*.


Figura 50

▲ **Translocación nuclear del factor NFκB por exposición *in vitro* a péptidos amiloides en células endoteliales.** Células de la línea HBMEC fueron estimuladas con péptidos Aβ1-40 o Aβ1-42 a una concentración de 0,5 μM, en estado fibrilizado o soluble durante 2 hs. Sobre imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia tras realizar una inmunofluorescencia contra NFκB (A) se cuantificó la densidad óptica (D) de la señal en el núcleo relativizada a la señal en el citoplasma para diferentes estadios de agregación de Aβ1-40 (A) o Aβ1-42 (C). Además, se evaluó el efecto de la presencia del inhibidor competitivo del receptor RAGE, FPS-ZM1 (FPS, 100 nM), sobre la activación inducida por Aβ1-40 (D). Los valores que se muestran en los gráficos están relativizados al grupo que recibió vehículo. La barra de escala corresponde a 15 μm. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del grupo que solo recibió vehículo (ANOVA de una vía seguido de comparaciones múltiples de Dunnet, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

A continuación, se intentó contrastar la hipótesis que relaciona la activación de las células endoteliales con potencial pérdida de la integridad de la BHE. Para ello se expusieron células endoteliales durante 24 hs a fAβ40. Al finalizar el tratamiento, las células fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia contra ocludina, poniendo en evidencia su localización en la membrana plasmática (Figura 51A). La

cuantificación del área ocludina+ (considerando únicamente aquella señal que se localiza en la membrana plasmática), demostró que fA β 40 era capaz de producir una disminución de los niveles de ocludina en membrana cercana al 35% de lo observado en el grupo control. Esta disminución se previno si el inhibidor de RAGE se encontraba presente en el medio, sugiriendo que la vía involucrada es la misma que produce la translocación nuclear de NF κ B.

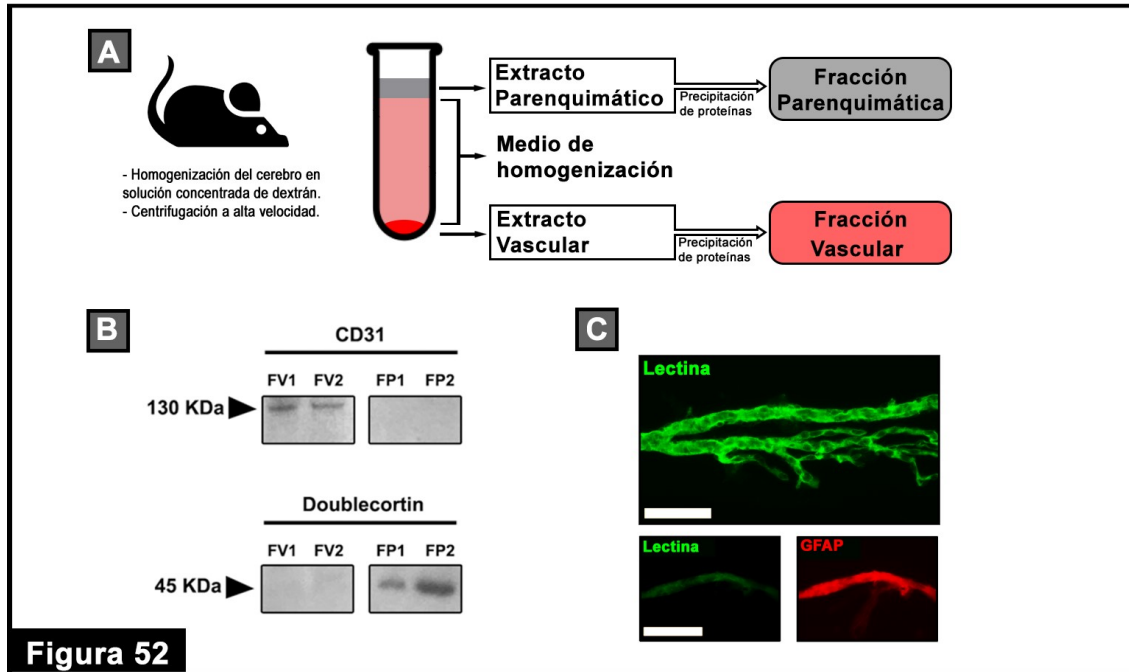


▲ **Inmunoreactividad para Ocludina en células endoteliales expuestas a A β 1-40.** Se trataron células HBMEC con péptido A β 1-40 (0,5 μ M) fibrilar o soluble durante 24 hs en presencia o ausencia de FPS-ZM1 (FPS, 100 nM). Al finalizar el tratamiento las células fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia contra ocludina. Sobre imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia (A), se cuantificó el área positiva para la señal de ocludina localizada en la membrana plasmática (B). La barra de escala corresponde a 20 μ m. Los asteriscos representan diferencias significativas entre los grupos señalados (ANOVA de una vía seguido por comparaciones de Tukey, * $p < 0,05$).

Análisis del proteoma de células vasculares en ratones PDAPP-J20.

En el marco de un proyecto de colaboración con el laboratorio de la Dra. Verónica Galván (Universidad de Texas en San Antonio, Estados Unidos), se realizó una estadía corta en su laboratorio en la que se puso a punto la extracción de microvasculatura partiendo del cerebro de ratones PDAPP-J20 de 1 año de edad. A través de una homogenización en solución concentrada de dextrán seguida por centrifugaciones a alta velocidad se logró separar una fracción enriquecida en microvasculatura y otra enriquecida en parénquima cerebral (Figura 52A). Con el objetivo de validar la técnica, el contenido de las muestras obtenidas fue analizado por *western blot* empleando un anticuerpo específico contra la proteína endotelial CD31, siendo positivas las fracciones vasculares y no las parenquimáticas. La proteína *Doublecortin*, en cambio, sólo se expresa en neuronas jóvenes en ciertas regiones del cerebro adulto. Tal como se esperaba, las fracciones vasculares fueron negativas para esta proteína neuronal, mientras que las fracciones parenquimáticas mostraron señal positiva para este marcador (Figura 52B). Paralelamente, algunos extractos vasculares fueron inmovilizados sobre portaobjetos antes de la lisis y precipitación de proteínas. Sobre estos extractos se detectaron segmentos de vasos sanguíneos que fueron

positivos para la tinción con lectina de tomate fluorescente, sugiriendo la presencia de células endoteliales. En segmentos de menor calibre, además, hay señal positiva para el marcador astroglial GFAP, detectado por inmunofluorescencia (Figura 52C). Estos resultados demuestran que con la técnica empleada es posible obtener fracciones vasculares altamente enriquecidas, donde predominan células endoteliales pero también se encuentran presentes otras células vasculares, en menor grado y limitado a ciertos segmentos de la vasculatura.



▲ Obtención de fracciones vasculares a partir de homogenato de cerebro de ratón. En el Panel A se muestra esquemáticamente el proceso de obtención de fracciones vasculares y parenquimáticas a partir de un homogenato de cerebro de ratón. Las fracciones obtenidas (FV: Fracción Vascular; FP: Fracción Parenquimática) fueron analizadas por *western blot* (B) empleando proteínas de expresión endotelial (CD31) y parenquimática (*Doublecortin*). Asimismo, se corroboró que las fracciones generadas contenían segmentos vasculares que fueron positivos para marcadores de vasculatura cerebral y astrocitario (C). Las barras de escala representan 30 µm.

Las fracciones vasculares obtenidas fueron enviadas para su análisis al Servicio de Proteómica de la Universidad de Washington (University of Washington's Proteomics Resource). De esta manera, se pretendió realizar una caracterización general del estado de la vasculatura en ratones PDAPP-J20 de 1 año de edad, identificando de manera global funciones celulares alteradas en el compartimiento vascular del tejido nervioso. Para ello se detectaron los niveles y la identidad de las proteínas presentes en las fracciones vasculares empleando espectrometría de masa. Los niveles de cada proteína fueron relativizados a la cantidad total de proteínas, con el objetivo de que cambios globales en los niveles proteicos no generasen resultados espurios. Los

valores comparados entre animales Tg y NTg indicaron que solamente una proteína tenía mayores niveles relativos en los animales Tg: los péptidos A β . En cambio, otras 96 proteínas están presentes en menores niveles relativos en animales Tg, respecto del grupo control.

Posteriormente, se estudiaron de manera global las funciones celulares en las que se encuentran involucradas las 97 proteínas detectadas que presentaban niveles diferenciales entre animales Tg y NTg. Para ello se utilizaron las categorías definidas por *gene ontology*. Este se trata de un vocabulario específico que permite asignar funciones discretas y pre-establecidas a genes y productos proteicos de dichos genes. Estas categorías (o anotaciones) se definen en consenso entre los investigadores que forman parte del consorcio y son de acceso libre. Las anotaciones se agrupan formando diferentes ontologías, siendo una de ellas la de “Función Molecular”. La Figura 53 muestra las categorías de función molecular que están representadas en la muestra de 97 proteínas detectadas en este experimento. El 42,2% de las proteínas que se expresan diferencialmente presentan actividad de molécula estructural. Dentro de este sub-grupo, aproximadamente tres cuartos son moléculas que unen ácidos nucleicos. Por otro lado, 41 de las 97 proteínas identificadas se encuentran categorizadas dentro de la función de *binding*, de las cuales más del 90% son constituyentes de los ribosomas.

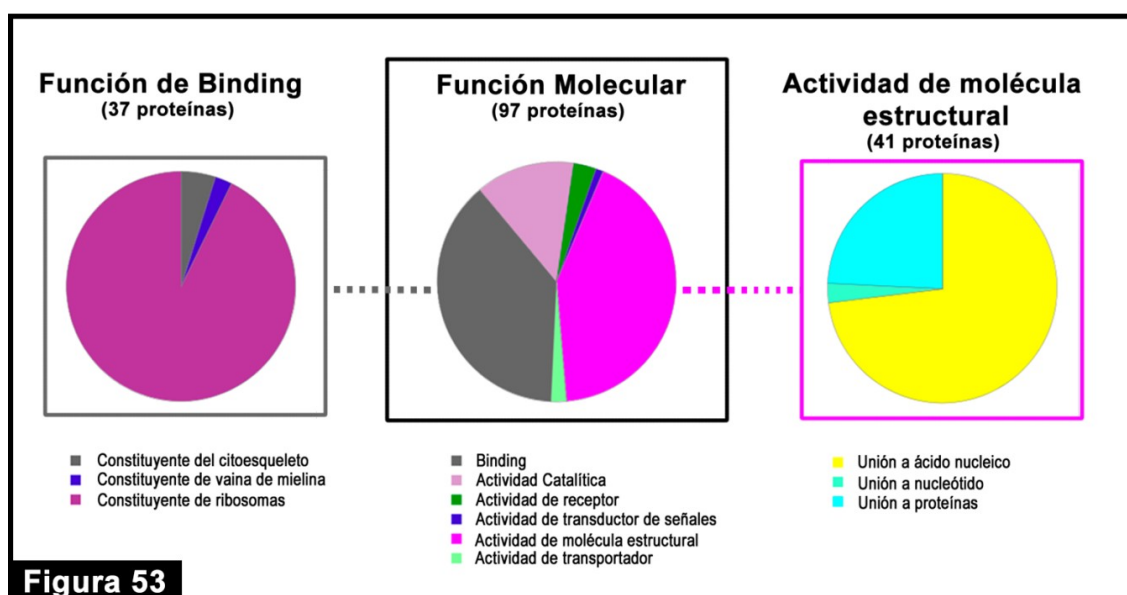


Figura 53

▲ **Análisis por Gene Ontology de las proteínas que se encuentran en menores niveles en la vasculatura de animales Tg respecto de los controles NTg.** Sobre la lista de 97 proteínas que se encontraban disminuidas en animales Tg se determinó su función molecular, de acuerdo a las categorías de análisis por *Gene Ontology*. Asimismo, se muestran las sub-categorías para los dos grupos de funciones mayormente representados: Función de *binding* y actividad de molécula estructural.

Estos resultados son coherentes con los que se muestran en la Tabla 1. La misma representa la información obtenida a partir de un análisis de enriquecimiento. Este análisis compara las categorías de funciones representadas en la muestra de 97 proteínas que se pretende caracterizar con las funciones representadas en el proteoma de referencia (en este caso, el proteoma de *Mus musculus*). Si una dada categoría de *gene ontology* está porcentualmente más representada en la muestra de 97 proteínas que en el proteoma de referencia, dicha categoría tendrá un factor de enriquecimiento mayor a 1. Dado que la muestra correspondió a proteínas que estaban diferencialmente expresadas entre animales Tg y NTg, este tipo de análisis permitió inferir qué procesos celulares podían estar alterados en la vasculatura cerebral de ratones PDAPP-J20

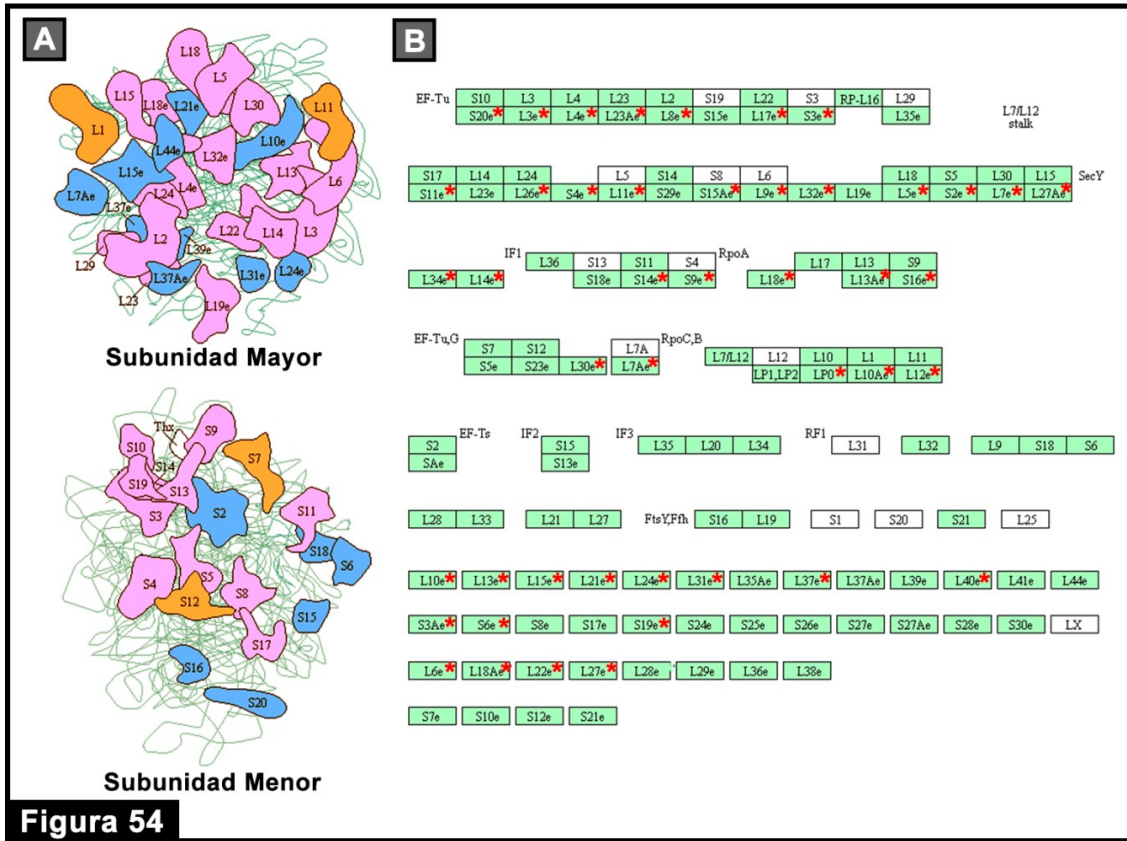
Según los resultados obtenidos, las funciones asociadas a la traducción proteica y al procesamiento del ARN por el mecanismo de *splicing* se encontraron claramente alteradas en la vasculatura cerebral de animales PDAPP-J20 Tg de 1 año de edad (Tabla 2).

Tabla 2. Estudio de enriquecimiento según categorías de gene ontology realizado sobre las proteínas que presentan cambios significativos entre animales Tg y NTg.

Categoría	Factor de enriquecimiento	p-valor ajustado
Traducción	27,77	$9,49 \cdot 10^{-19}$
Procesos metabólicos de proteínas	2,74	$3,16 \cdot 10^{-4}$
Procesos metabólicos primarios	2,26	$1,19 \cdot 10^{-6}$
Procesos metabólicos	2,02	$3,19 \cdot 10^{-6}$
Procesos metabólicos de rRNA	22,34	$3,94 \cdot 10^{-10}$
Procesos metabólicos de RNA	5,13	$1,28 \cdot 10^{-8}$
Procesos metabólicos de compuestos que contienen nucleobases	3,14	$1,56 \cdot 10^{-6}$
Splicing de RNA (vía reacciones de transesterificación)	14,44	$7,32 \cdot 10^{-7}$
Splicing de RNA	13,41	$1,17 \cdot 10^{-6}$
Splicing de RNA (vía spliceosoma)	12,37	$1,65 \cdot 10^{-6}$
Procesamiento de RNA	9,10	$1,45 \cdot 10^{-5}$

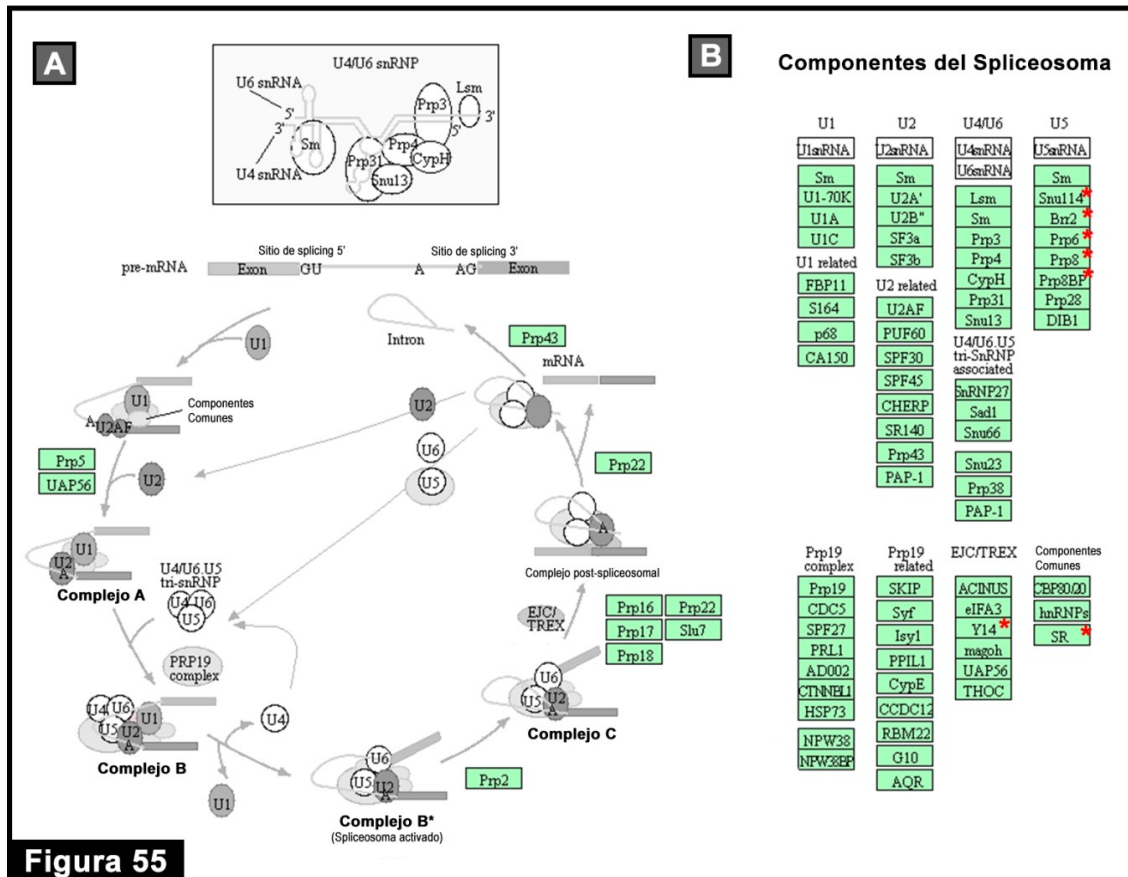
Con el objetivo de ilustrar la cantidad e identidad de proteínas alteradas en las funciones anteriores, se representaron los componentes proteicos que constituyen a los ribosomas y spliceosomas. Respecto de aquellas proteínas que constituyen los ribosomas, las que se encontraron disminuidas en animales Tg forman parte tanto de

la subunidad mayor como de la subunidad menor, sin mostrar evidencias de que alguna de estas subunidades estuviera preferencialmente afectada (Figura 54, asteriscos rojos).



▲ **Proteínas ribosomales que se encuentran en menores niveles la vasculatura cerebral de animales Tg.** En el Panel A se muestra la composición de proteínas de la subunidad menor y la subunidad mayor en ratones. En el Panel B se muestran en mayor detalle las proteínas que componen los complejos ribosomales. Aquellas proteínas señaladas con estrellas rojas son aquellas que se encontraron disminuidas en animales Tg respecto de sus hermanos NTg.

En lo que respecta a aquellas proteínas que forman parte del spliceosoma, se observó que aquellas que constituyen el complejo U5 se encontraban preferencialmente disminuidas en animales Tg (Figura 55, estrellas rojas).



▲ **Proteínas involucradas en el proceso de *splicing* cuyos niveles se encontraron disminuidos en la vascularura cerebral de animales Tg.** En el Panel A se muestran las proteínas que componen el spliceosoma y sus diferentes complejos. En el Panel B se muestra en mayor detalle los péptidos que forman parte de cada componente, y se indican con estrella roja a aquellas cuyos niveles se encontraron disminuidos en el cerebro de animales Tg.

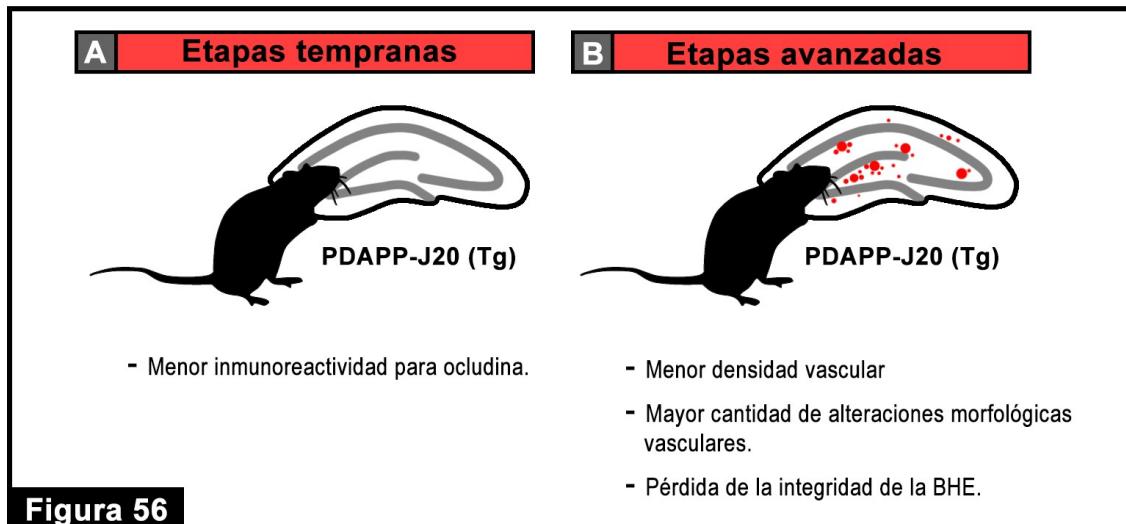
4. Discusión

La presencia de péptidos amiloides induce la activación endotelial y disrupción de la BHE en condiciones *in vitro* y en el hipocampo del ratón PDAPP-J20.

Como se indicó anteriormente en este mismo Capítulo, numerosos autores sugieren que las alteraciones en la vasculatura cerebral podrían jugar un rol clave en el proceso patológico de la EA, ya sea como parte de las alteraciones producidas por el cuadro de amiloidosis o como un evento temprano. Para discernir cuál es el rol de estas alteraciones es necesario evaluar el compromiso vascular contemplando la progresividad de los modelos animales, así como integrando información proveniente de diversos modelos experimentales.

En esta Tesis se evaluaron aspectos morfológicos de la vasculatura cerebral e indicadores de la integridad de la BHE en el hipocampo de ratones PDAPP-J20, abarcando edades previas y posteriores a la presencia de placas amiloides. Los principales hallazgos se encuentran representados en la Figura 56. Se observó que la densidad de la vasculatura presentaba una ligera disminución en animales Tg de edad avanzada, la cual se acompañó de un aumento en la ocurrencia de alteraciones morfológicas en la pared vascular. En coherencia con estos resultados, la medición del extravasado de fluoresceína de sodio inyectada de manera sistémica demostró un aumento de la permeabilidad de la BHE en animales Tg de 15 meses respecto de controles de la misma edad, el cual no se observó en animales jóvenes que no presentaban placas amiloides. Estos resultados sugerirían que, en el hipocampo de ratones PDAPP-J20, el compromiso de la integridad de la vasculatura cerebral es un evento tardío, que ocurre con posterioridad a la presencia de depósitos de A β , y que probablemente forme parte del contexto de daño tisular causado por estos depósitos; o bien la sensibilidad del ensayo empleado no resulta adecuada.

Sin embargo, al evaluar la inmunoreactividad para el componente de uniones estrechas Ocludina, se observó que la misma se encontraba disminuida desde etapas tempranas. Este resultado podría sugerir que antes de la presencia de placas amiloides la vasculatura presenta un estado de susceptibilidad, aunque el mismo no se traduzca en una ruptura de la BHE detectable por el ensayo de extravasado de fluoresceína de sodio.



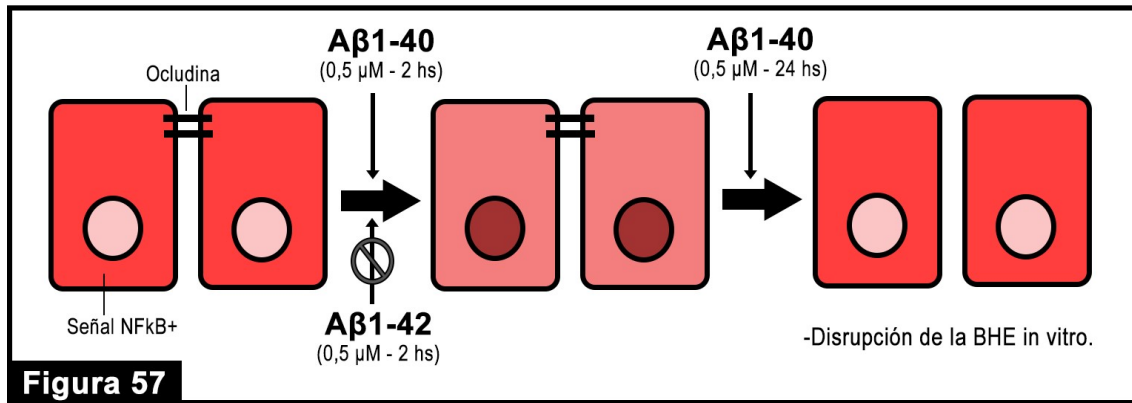
▲ **Evidencias de alteraciones vasculares en el hipocampo del ratón PDAPP-J20.** El esquema representa los principales resultados mencionados en esta Tesis respecto de las alteraciones vasculares que se evidencian en ratones Tg en etapas tempranas (A, previo a la presencia de placas amiloides) y en etapas avanzadas (B, posterior a la presencia de placas amiloides).

Según nuestro conocimiento, esta es la primera caracterización de las alteraciones vasculares que se observan en el ratón PDAPP-J20 considerando diferentes edades. Este tipo de estudios es relevante, ya que distintos modelos murinos de EA familiar mostraron diferente grado y cinética del daño vascular, lo cual genera discusión acerca del papel que juega la vasculatura cerebral en el proceso patológico de la EA.

Un estudio similar fue publicado por Janota y colaboradores, caracterizando las alteraciones vasculares en diferentes etapas del proceso degenerativo del ratón APP/PS1 (Janota, Brites, Lemere, & Brito, 2015). Estos ratones portan además de la mutación *Swedish* en APP, una mutación en el gen que codifica para Presenilina-1. En estos ratones se evidencian depósitos parenquimáticos de Albúmina y Trombina (indicativos de ruptura de la BHE) en presencia de placas amiloides. Estos cambios no se observan en animales control de la misma edad, sugiriendo que son específicos de la patología. Sin embargo, los animales controles muestran a edades muy avanzadas una disminución en el número de pericitos, lo cual puede sugerir la presencia de un debilitamiento vascular debido al envejecimiento fisiológico. Llamativamente, en animales transgénicos, la disminución ocurre en edades muy tempranas (previo a la presencia de placas amiloides), que podría ser indicativo de un fenotipo de envejecimiento acelerado.

Estos resultados parecen sugerir que en los modelos animales de EA familiar las alteraciones vasculares son fundamentalmente posteriores a la presencia de placas parénquimáticas, aunque los oligómeros solubles que están presentes desde etapas tempranas pueden generar un cuadro de debilitamiento temprano de la vasculatura. En este punto es importante aclarar que la presencia de diferentes mutaciones en APP puede aportar características específicas a los eventos de daño vascular y su cinética de aparición. Li y colaboradores demostraron que la presencia específica de la mutación *Dutch* en APP introducida en un modelo experimental que ya portaba las mutaciones *Swedish* y *London* genera una mayor cantidad de depósitos perivasculares (H. Li et al., 2014). Llamativamente, en ese trabajo demuestran una interrelación entre el flujo sanguíneo cerebral y la presencia de este tipo de depósitos. Por un lado, a medida que los ratones envejecen se acumulan péptidos A β en la zona perivascular y disminuye el flujo sanguíneo.

En esta Tesis se complementa el estudio *in vivo* realizado en el ratón PDAPP-J20 con la evolución *in vitro* de los mecanismos involucrados en la activación endotelial. En la bibliografía, es frecuente que en ensayos *in vitro* se justifique el uso de A β 1-42 por ser la especie mejor caracterizada y más neurotóxica. Por otro lado, algunos autores justifican el uso de A β 1-40 en ensayos que emplean células endoteliales por ser la especie más representada en depósitos perivasculares, y por lo tanto aquella a la que el endotelio se encuentra preferencialmente expuesto en condiciones *in vivo*. Sin embargo, muy raramente se compara sobre el mismo sistema experimental el uso de ambas especies de A β , así como sus formas solubles y fibrilares. Esta Tesis aporta información relevante al campo al estudiar comparativamente la capacidad de cada una de estas formas de A β para inducir activación endotelial, evaluada a través de la translocación al núcleo de la subunidad p65 de NF κ B. Los resultados obtenidos se representan de manera esquemática en la Figura 57.



▲ **Activación de células endoteliales HBMEC y ruptura de la BHE en condiciones *in vitro* por diferentes especies de Aβ.** El esquema resume los principales resultados obtenidos en esta Tesis sobre células HBMEC respecto de la activación endotelial inducida por Aβ. Se evaluó la capacidad de Aβ1-40 y 1-42 en sus formas solubles y fibrilares para inducir la activación endotelial, evaluada a través de la translocación nuclear de NFkB (la intensidad de color rojo indica inmunoreactividad para NFkB en el esquema). Ambas formas de Aβ1-40 (fibrilar y soluble) producen la translocación de NFkB al núcleo en tiempos y concentración indicados, no así las dos formas de Aβ1-42. La incubación por 24 hs con Aβ1-40 fibrilar produjo una disminución de la densidad de proteínas de unión estrecha (occludina) y una disminución de la resistencia eléctrica en una monocapa de células HBMEC, indicativo de ruptura en dicho modelo de BHE *in vitro*.

Los resultados demuestran que tras 2 hs de estimulación con péptidos amiloides, solo el Aβ1-40 produjo activación de la vía de NFkB, tanto en su forma soluble como en su forma insoluble. Aβ1-42, por su parte, no produjo un cambio significativo en este parámetro de activación endotelial. La estimulación con Aβ1-40 fibrilar durante 24 hs produjo además una disminución de los niveles de ocludina en membrana, sugiriendo que la activación de NFkB por Aβ1-40 produce posteriormente un fenotipo de debilitamiento de las uniones entre células endoteliales. Este efecto no se observó cuando la incubación se realizó con Aβ1-40 soluble. Sin embargo, debe señalarse que en este caso la estimulación no fue de 24 hs sino de 2 hs, reemplazadas luego por 22 hs de medio de mantenimiento. El protocolo se adaptó de esa manera para evitar que durante la estimulación prolongada los péptidos Aβ fibrilicen y haya confusión de efectos al comparar con el grupo que recibió durante 24 hs Aβ fibrilizado. La ausencia de cambios en este grupo experimental puede deberse en realidad a una recuperación por las 22 hs que las células estuvieron en medio de mantenimiento luego de un estímulo corto. Nuevas modificaciones deberían incorporarse a este protocolo para poder evaluar comparativamente el efecto de Aβ1-40 soluble durante exposiciones mayores a 2 hs. Finalmente, tras 24 hs de exposición a Aβ1-40 fibrilar se observó una disminución significativa de la permeabilidad de una monocapa de células endoteliales, sugiriendo que la integridad de la barrera constituida se encontraba

comprometida. En su conjunto, estos resultados sugieren una mayor susceptibilidad de las células HBMEC hacia la especie de A β que se encuentra mayormente representada en los depósitos perivasculares.

El estudio comparativo de las diferentes especies de A β es relevante a la hora de diseñar terapias dirigidas hacia estos péptidos. Por ejemplo, durante la última década se han realizado numerosos esfuerzos por validar el uso de anticuerpos anti-A β como inmunoterapia pasiva para disminuir la carga de depósitos amiloides y la toxicidad asociada a estos (Graham, Bonito-Oliva, & Sakmar, 2017). Sin embargo, la evidencia acumulada en modelos animales y en ensayos clínicos sugiere que en muchos casos este tipo de estrategias es efectiva disminuyendo el número de placas amiloides pero exacerba la angiopatía cerebral amiloide, favoreciendo la formación de edemas y el daño vascular (Boche et al., 2008; B. Liu et al., 2009; Mo, Li, Yang, Liu, & Feng, 2017). Por esta razón, algunos autores contemplan la posibilidad de utilizar anticuerpos que reconozcan distintas especies de A β según las características o el grado de avance de la EA en cada paciente (Y. J. Wang, 2014).

En las células gliales y endoteliales, la activación de la vía de NF κ B ocurre como respuesta a la integración de las señales provenientes desde múltiples receptores. En esta Tesis se decidió poner a prueba la hipótesis de que el receptor RAGE (extensamente estudiado por su rol en la transítosis de A β a través de la BHE) media la activación endotelial al detectar la presencia de A β como un DAMP, de manera análoga a lo que fue descrito por otros autores para células gliales (Fang et al., 2010; Villarreal et al., 2014). En este sentido, el uso de un inhibidor competitivo de RAGE bloqueó completamente la translocación de NF κ B inducida tanto por la forma soluble como la fibrilar de A β 1-40. Más aún, esta misma estrategia previno la disminución de ocludina causada por 24 hs de estimulación con A β 1-40 fibrilar. Estos resultados apoyan la hipótesis planteada y colocan a RAGE como un mediador necesario de las alteraciones producidas por A β en estas condiciones experimentales.

El receptor RAGE ha sido evaluado como blanco terapéutico en estudios realizados años atrás por el grupo de Zlokovic. En estos estudios se utiliza el mismo inhibidor competitivo empleado en esta Tesis para bloquear la transítosis de A β y disminuir de esta manera la acumulación de péptidos amiloides, favoreciendo su *clearance* a través de la BHE (Deane et al., 2012). De acuerdo al aporte realizado en esta Tesis, el bloqueo de RAGE empleando FPS-ZM1 podría además tener efectos positivos a través de evitar la activación endotelial y mantener el estado diferenciado de las células endoteliales, preservando la integridad de la BHE.

El flujo autofágico en células endoteliales aumenta ante elevadas concentraciones de A β .

Como se ha descrito anteriormente, las células endoteliales juegan un rol muy importante en el depurado de A β a partir de facilitar la remoción de estos péptidos por transcitosis a través de la BHE. Sin embargo, prácticamente no ha sido estudiada la capacidad de las células endoteliales para inducir autofagia en respuesta a estos agregados y potencialmente degradarlos.

En esta Tesis se evalúa el estado general de la autofagia endotelial a través del uso del marcador de autofagosomas LC3 y su co-localización con la señal positiva para lectina de tomate fluorescente en el giro dentado de ratones PDAPP-J20. El estudio de co-localización demostró que los animales Tg no difieren en cuanto al porcentaje del área vascular inmunoreactiva para LC3 en comparación a animales NTg de la misma edad. Sin embargo, entre los 3 y los 9 meses de edad, ocurre una disminución de la inmunoreactividad para LC3, lo cual es esperable si se considera que el flujo autofágico disminuye con la edad en diversos tipos celulares (Martinez-Lopez, Athonvarangkul, & Singh, 2015). A estas edades, además, no se detectaron cambios en el área positiva para la tinción con lectina de tomate, por lo cual el resultado obtenido implica realmente una reducción en los niveles de LC3 endotelial. El curso de estas alteraciones coincide con el aumento en los eventos de daño vascular que se analizó en la Figura 45.

En el modelo *in vitro*, se simuló la presencia de placas amiloides a través de la exposición a A β 1-42 fibrilizado. En este caso, se utilizaron diferentes concentraciones de péptidos con el objetivo de comparar la sensibilidad de las células HBMEC con la ya descrita en los Capítulos 3 y 4 para células astro- y microgliales. Esta especie de A β produjo un marcado aumento de la inmunoreactividad para LC3 a una concentración de 5 μ M, 10 veces mayor que la empleada en los experimentos con células gliales. Al mismo tiempo, esta concentración de A β produjo una disminución significativa de la viabilidad celular, sugiriendo que el aumento de LC3 podría deberse a la activación de mecanismos de muerte celular y no necesariamente a la activación de la autofagia para la degradación de los péptidos internalizados.

El experimento anterior fue diseñado para evaluar comparativamente la capacidad de las células endoteliales y gliales de regular su flujo autofágico ante la exposición a A β 1-42. Sin embargo, para una caracterización profunda sobre el estado de la

autofagia en células endoteliales sería relevante evaluar la estimulación con A β 1-40. En este sentido, un estudio de Fonseca y colaboradores demuestra que el uso de A β 1-40 a una concentración de 2,5 μ M induce un aumento de la autofagia endotelial, con marcadores de impedimento en el flujo autofágico como la acumulación de p62 (Fonseca et al., 2014). Este antecedente sugiere asimismo que la exposición de células endoteliales a A β 1-40 produce un aumento de la autofagia como parte de los mecanismos de toxicidad.

En otro estudio, Chan y colaboradores demostraron que proteínas típicamente involucradas en la inducción de la autofagia –como LC3 y Atg7– son necesarias para que A β 1-42 produzca una disminución de las proteínas de unión estrecha a concentraciones mayores de 5 μ M en células endoteliales de vasculatura cerebral murina (Chan et al., 2018). En este mismo trabajo se demuestra que el efecto tóxico de A β depende de la presencia en membrana del receptor RAGE. Dicho trabajo demostró por primera vez la interacción entre el receptor RAGE, la pérdida de proteínas de unión estrecha y la autofagia, sugiriendo que los 3 mecanismos se encuentran relacionados entre sí y son interdependientes. Es probable que la activación de RAGE regule a través de vías diferentes a la de NF κ B la activación de la autofagia, y que este proceso sea necesario para la internalización y degradación de complejos de uniones estrechas.

La vasculatura cerebral presenta alteraciones en la traducción y el procesamiento del ARN en el ratón PDAPP-J20.

Con el objetivo de determinar qué otras vías y procesos podrían estar alteradas en la vasculatura cerebral del ratón PDAPP-J20 se realizó un trabajo en colaboración con la Dra Verónica Galvan. El mismo se desarrolló en su laboratorio en el *Health Science Center* de la Universidad de Texas en San Antonio (Estados Unidos) e implicó la obtención de fracciones vasculares a partir del cerebro de ratones PDAPP-J20 de 1 año de edad para su posterior purificación de proteínas y evaluación por un servicio de espectrometría de masa. El protocolo de extracción de fracciones vasculares fue puesto a punto y validado a través de la identificación por *western blot*, inmunofluorescencia y tinción con marcadores específicos de microvasculatura cerebral.

Las muestras de proteínas obtenidas fueron enviadas para su análisis a la Universidad de Washington (*University of Washington's Proteomics Resource*). Los resultados

expuestos en esta Tesis corresponden a un análisis general y descriptivo que simplemente pretende identificar a grandes rasgos nuevos mecanismos involucrados en el daño vascular que se detecta en el ratón PDAPP-J20. Esta información serviría de base para la elaboración de nuevas hipótesis que permitan continuar con el trabajo iniciado en esta Tesis. Los cambios a nivel de proteína individual deberían ser validados posteriormente empleando ensayos de *western blot* o similares para cada caso. Por lo tanto, las conclusiones y nuevas hipótesis que se desprenden de este estudio se plantean en términos generales, a la espera de mayor confirmación luego del trabajo en futuras líneas de investigación.

De acuerdo a nuestro conocimiento, no existen antecedentes de este tipo de estudios realizados sobre muestras obtenidas a partir de la vasculatura cerebral de modelos animales para la EA familiar, por lo cual consideramos que la información aquí presentada representa un aporte potencialmente relevante para el campo de estudio.

El análisis ha arrojado una lista de 97 proteínas que presentan cambios significativos entre animales Tg y NTg. Llamativamente, todas esas proteínas (a excepción de A β) se encuentran disminuidas en animales Tg respecto del grupo control. Con el objetivo de detectar vías de regulación y funciones en común entre estas proteínas se realizó un análisis empleando las anotaciones de *Gene Ontology*. La gran mayoría de estas proteínas están asociadas a una función de *binding*, específicamente por su interacción a ácidos nucleicos. Este resultado es coherente con aquel que se obtuvo a partir del análisis de enriquecimiento, el cual demuestra que los principales procesos afectados es la traducción (a través de una menor cantidad de proteínas constituyentes de los ribosomas) y el *splicing*. En este punto, surge el interrogante de si estos cambios en procesos tan fundamentales del metabolismo celular junto con el hecho de que casi todos los cambios significativos en proteínas sean disminuciones, se deben en realidad a una menor cantidad de muestra obtenida en animales Tg, debidos por ejemplo a una reducción de la densidad vascular. Sin embargo, es importante destacar que los niveles de cada proteína fueron relativizados a la cantidad total de proteínas en la muestra. Por lo tanto, los resultados obtenidos son independientes de cambios en la cantidad de muestra ingresada para su análisis.

Las alteraciones observadas en proteínas constituyentes de los ribosomas podrían ser parte de un efecto supresor de la traducción de manera global, pudiendo afectar al mantenimiento del estado diferenciado de estas células (Brant-Zawadzki et al., 2007). Llamativamente, mTOR es un regulador maestro de la traducción, de manera tal que su activación aumenta los niveles globales de este proceso (Masvidal, Hulea, Furic,

Topisirovic, & Larsson, 2017). Así como la inhibición de mTOR favorece la inducción de la autofagia de manera patológica en células endoteliales (según los reportes antes mencionados) es posible que el mismo fenómeno sea responsable de la disminución en la actividad traduccional. Todo ello llevaría, mediante un cuadro crónico, a la pérdida del fenotipo y finalmente a la degeneración de la célula endotelial.

Por último, las proteínas que se encuentran disminuidas en el spliceosoma son aquellas que se unen preferencialmente al ARN pequeño no codificante U5, componente constitutivo de los spliceosomas mayores. Este ARN y sus proteínas asociadas se encuentran presentes en células humanas (Zhang et al., 2018). Si bien se desconoce su rol a nivel individual, se ha reportado que mutaciones en proteínas que forman este y otros complejos del spliceosoma mayor pueden afectar al proceso de *splicing* alternativo y facilitar la aparición de ciertos tipos de tumores y de patologías asociadas al SNC (Padgett, 2012).

Cap. 6

Interacción Glía-Endotelio

1. Introducción

Barrera hematoencefálica y sistema glinfático.

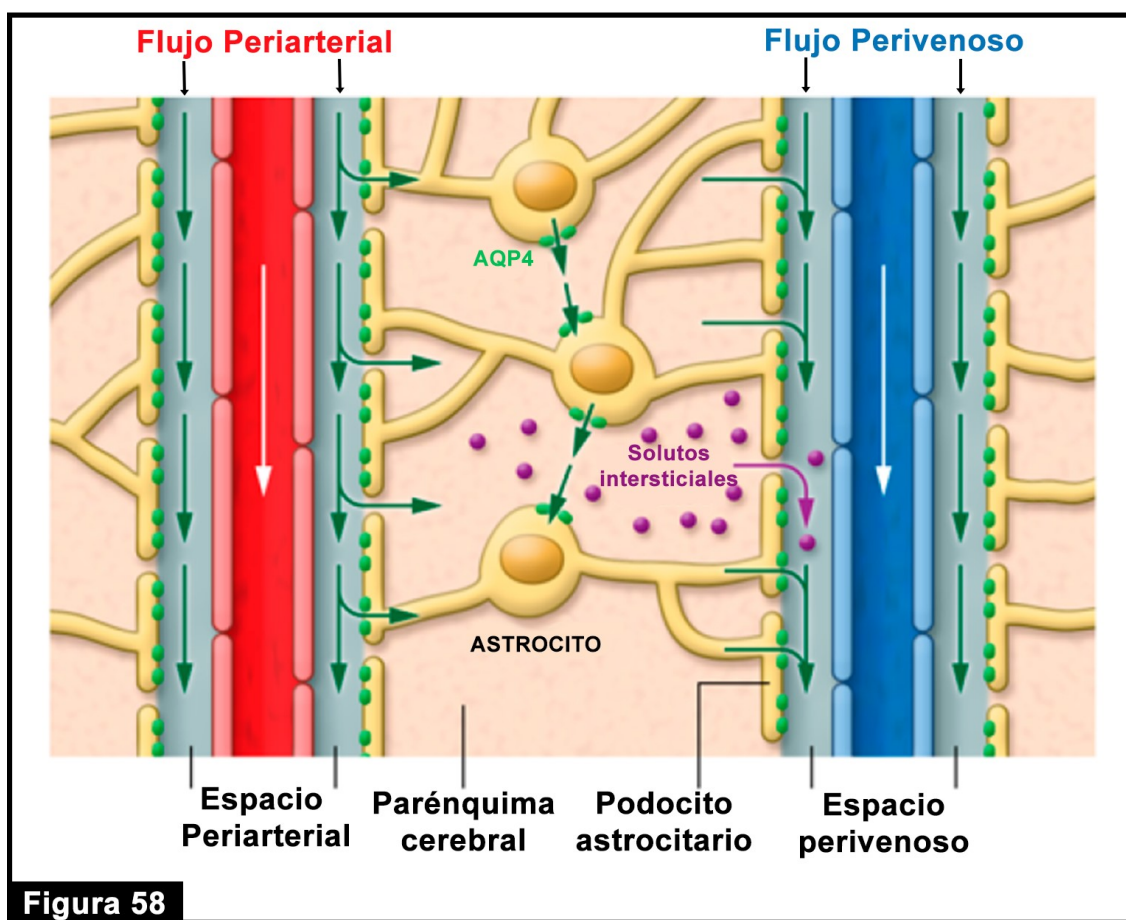
Como se mencionó anteriormente, las interacciones físicas y a través de mediadores solubles entre células gliales y endoteliales son fundamentales para la aparición de propiedades emergentes en la UNV. Dentro de las interacciones físicas, se ha descrito que el reconocimiento de componentes de la membrana basal (matriz extracelular vascular) y proteínas de la membrana plasmática astroglial son necesarias para inducir la polarización de los astrocitos. Este proceso es el responsable de la formación de dominios celulares en los astrocitos para la realización de funciones específicas, como es el podocito astrocitario (Lecuyer, Kebir, & Prat, 2016). El contacto físico entre astrocitos y células endoteliales es esencial para el mantenimiento de al menos dos de las propiedades emergentes de la UNV: la BHE y el sistema glinfático.

La capacidad de los astrocitos de regular la generación y el mantenimiento de la BHE ha sido mencionada ya en capítulos anteriores de esta Tesis. Este rol clave de la astrogliá en la diferenciación endotelial es conocido desde hace décadas y la discusión principal ha girado en torno a la importancia relativa de los mediadores solubles o del contacto físico entre ambos tipos celulares. El trabajo de Hayashi y colaboradores constituye una contribución importante que revela que ambos tipos de comunicación son relevantes para inducir propiedades de BHE en células endoteliales no-cerebrales en condiciones *in vitro*. Por un lado, experimentos de medios condicionados demostraron el rol crucial de factores solubles en la expresión de ciertos transportadores específicos en células endoteliales, mientras que el contacto físico a través de un sistema de co-cultivos con transwells favorece la aparición de complejos de uniones estrechas y expresión de otras proteínas transportadoras (Hayashi et al., 1997). Más recientemente, se ha demostrado a través del uso de células endoteliales cerebrales humanas que la interacción física con astrocitos genera un aumento de la resistencia de la BHE *in vitro* aún mayor que en sistemas de co-cultivos indirectos o de monocultivos de células endoteliales, poniendo de manifiesto la importancia del contacto físico con células astrogliales (Kulczar, Lubin, Lefebvre, Miller, & Knipp, 2017).

La membrana del podocito astrocitario está enriquecida en complejos constituidos por el canal de agua Acuaporina-4 (AQP4) y por canales de potasio del tipo “*inward rectifier*”. Esta localización depende de la expresión de agrina y su interacción con

lamininas y perlecanos de la matriz extracelular y componentes del citoesqueleto astrogial (Abbott et al., 2006). AQP4 es una proteína con 6 dominios transmembranales y forma parte de una familia de proteínas que tienen la capacidad de mediar el transporte bidireccional de agua. Por lo tanto, cumple un rol fundamental en la regulación osmótica del SNC. Más recientemente, se describió que AQP4 media el intercambio de moléculas entre el líquido cefalorraquídeo y el fluido intersticial a través de un sistema paravascular que por su similitud con el sistema linfático y por la participación de la glía fue denominado sistema glinfático.

A nivel del espacio subaracnoideo y arterias penetrantes, el líquido cefalorraquídeo es transportado a través de un espacio virtual limitado por células gliales denominado Espacio de Virchow Robin. Desde allí se moviliza por la zona perivascular de las arterias y arteriolas hasta los capilares cerebrales, facilitado por la alta resistencia que ofrece la malla fibrosa que constituye la membrana basal. Desde el árbol arterial, AQP4 favorece la salida de agua hacia el parénquima cerebral. De esta manera se generan pulsos o corrientes de agua que arrastran diferentes moléculas y productos de desecho hacia el espacio perivascular venoso, desde donde es recolectado para su depurado (Jessen, Munk, Lundgaard, & Nedergaard, 2015). El esquema de la Figura 58 muestra cómo este flujo de agua desde el espacio paravascular arterial hacia el venoso facilita el depurado de sustancias tóxicas y desechos de metabolismo.

**Figura 58**

▲ **Organización y función del sistema glinfático.** El esquema representa de manera esquemática el flujo de agua desde el espacio periarterial hacia el espacio perivenoso, y su rol en el transporte de solutos intersticiales. Las flechas verdes representan la dirección del movimiento de agua, que puede darse por el espacio entre los podocitos astrocitarios y, en mayor medida, a través de las células astrogiales mediante el canal de agua AQP4. El esquema fue modificado a partir de Louveau y colaboradores (Louveau et al., 2017).

Weller y colaboradores fueron los primeros en hipotetizar que el sistema glinfático podría ser una vía posible para el depurado de A β (Carare et al., 2008). Empleando microscopía electrónica y de fluorescencia en condiciones *ex vivo*, este grupo evaluó la localización de diferentes trazadores moleculares, concluyendo que solutos de pequeño volumen en el parénquima cerebral (pero no células) pueden movilizarse a través de los espacios parivascuales. Posteriormente, Iliff y colaboradores demostraron luego la relevancia de este sistema en el transporte de solutos y su salida del SNC, empleando ratones *knock out* para AQP4. Mediante esta aproximación *in vivo* concluyeron que AQP4 es necesaria para explicar parte de la reducción de los niveles A β luego de una inyección intracerebral en ratones *wild type* (Iliff et al., 2012).

Este sistema de depurado de sustancias sería particularmente relevante durante la fase de sueño (Plog & Nedergaard, 2018). Estudios en ratones empleando

microscopía de 2 fotones demostraron que el transporte de solutos a través del sistema glinfático disminuye hasta un 90% en estado de vigilia comparado con el sueño profundo inducido con agentes anestésicos (Xie et al., 2013). Si este sistema es importante en el depurado de A β , entonces la privación del sueño debería facilitar su acumulación en el cerebro. Esta hipótesis fue corroborada por Shokri-Kojori y colaboradores recientemente, quienes demostraron que la privación de sueño por una sola noche genera un aumento significativo de A β en el hipocampo y el tálamo de humanos sanos, evaluado mediante tomografía por emisión de positrones empleando radioligandos específicos (Shokri-Kojori et al., 2018).

Se ha descrito en ratones que este sistema de depurado se ve seriamente afectado con la edad. Ratones envejecidos presentan una reducción en el flujo de líquido por el sistema glinfático de hasta un 40% (Kress et al., 2014). En el contexto de la EA, se ha demostrado que el transporte de solutos por este sistema está marcadamente reducido antes de la presencia de placas amiloides en ratones APP/PS1 en comparación al grupo control (Peng et al., 2016). Curiosamente, la presencia de A β 1-40, pero no de A β 1-42, en el líquido cefalorraquídeo de animales *wild type* afecta además a este mecanismo de transporte (Peng et al., 2016).

Se ha propuesto que, en el contexto de patologías que afectan al SNC y presentan daño vascular, la disrupción de la interacción física entre astrocitos y endotelio puede ser parte del proceso patológico. Este tipo de alteraciones fue descrita en el hipocampo del ratón APP/PS1 (Janota et al., 2015; Kimbrough, Robel, Roberson, & Sontheimer, 2015) y de un ratón que porta las mutaciones *Swedish*, *Indiana* e *Iowa* en APP humano (Duncombe et al., 2017).

Neuroinflamación e interacciones paracrinas.

Como se indicó en los capítulos anteriores de esta Tesis, tanto la microglía como las células astrogliales y endoteliales expresan en sus membranas receptores para DAMPs, PAMPs y citoquinas. La presencia de estas moléculas sugiere que, en un contexto neuroinflamatorio, al menos estos componentes de la UNV son capaces de responder de manera coordinada. Esta respuesta puede implicar la activación del mismo tipo de vías ante un estímulo en común, como podría ser la presencia de A β y su capacidad para producir la translocación de NF κ B al núcleo en los tres tipos celulares. Sin embargo, también podría implicar la activación secuencial de diferentes

tipos celulares, a través de factores solubles que se secreten en unos y que modulen luego la respuesta de otros.

En el capítulo anterior se demostró que A β 1-40 es capaz de inducir activación de manera directa actuando sobre células endoteliales en condiciones *in vitro*. Sin embargo, el efecto indirecto de las diferentes especies de A β sobre la activación endotelial mediada por factores gliales ha sido escasamente abordado en la bibliografía. Un antecedente previo de Spampinato y colaboradores demostró que la exposición de una línea celular de astrocitos a A β 1-42 2 μ M y posterior tratamiento de células endoteliales cerebrales con el medio condicionado de estas células genera un aumento de la actividad de las metaloproteasas de matriz (Spampinato, Merlo, Sano, Kanda, & Sortino, 2017). Estas enzimas se secretan al medio extracelular y son capaces de degradar proteínas de la membrana basal y constituyentes de los complejos de uniones estrechas, por lo que su mayor actividad está relacionada a un fenotipo de ruptura de la BHE. Este efecto depende de la disponibilidad de VEGF en el medio condicionado astrogial, sugiriendo que este factor de crecimiento es responsable de la activación endotelial (Spampinato et al., 2017).

En las células endoteliales, la interacción de DAMPs, citoquinas pro-inflamatorias y VEGF con sus receptores confluye en la activación de la vía de NF κ B. La inducción del proceso angiogénico implica la pérdida de adhesión entre células endoteliales y con la matriz extracelular, lo cual implica en el caso de las células endoteliales cerebrales un fuerte compromiso a la integridad de la BHE (B.V. Zlokovic, 2008). Por esta razón, estímulos pro-angiogénicos en el SNC están más asociados a contextos de daño que a funciones tróficas. En modelos animales y ensayos *ex vivo* también se ha demostrado que la administración intracerebral de A β genera un contexto pro-angiogénico, debido en parte a una mayor producción de VEGF (Boscolo et al., 2007; Zand, Ryu, & McLarnon, 2005). Más aún, durante la respuesta neuroinflamatoria exacerbada, este mecanismo permitiría el paso de monocitos y leucocitos circulantes al parénquima cerebral para participar (junto a células de la microglía) del proceso inflamatorio (B.V. Zlokovic, 2008).

Por otro lado, existen estudios que demuestran que la activación microglial puede ser un causal de disrupción en la BHE. Sumi y colaboradores demostraron que el uso de un reconocido PAMP como LPS no indujo a las concentraciones ensayadas disrupción de la BHE de manera directa en un modelo *in vitro* de BHE. Sin embargo, en presencia de células microgliales, el tratamiento con LPS produjo una marcada disminución de la resistencia de la monocapa endotelial (Sumi et al., 2010). Actualmente se sabe que la

acción de IL-1 β de origen microglial y astrogial puede actuar a través de su receptor endotelial IL-1R1 y generar un fenotipo de disrupción de la BHE que está mediado por liberación de metaloproteasas de matriz y ruptura de los complejos de unión estrecha (da Fonseca et al., 2014).

Una de las funciones de la BHE es prevenir el ingreso de monocitos y leucocitos desde la circulación hacia el parénquima cerebral (Town, Tan, Flavell, & Mullan, 2005). Sin embargo, se ha observado en pacientes con EA una mayor presencia de linfocitos T en el parénquima cerebral en comparación a sujetos controles (Monson et al., 2014). Se ha demostrado que la migración de linfocitos T depende de la ruptura de la BHE inducida por la liberación de TNF α de origen microglial, el cual induce la expresión de proteínas MHC de clase I en células endoteliales cerebrales, permitiendo el reconocimiento y migración de linfocitos (Y. M. Yang, Shang, Zhao, Fang, & Chen, 2013). Sin embargo, la presencia y relevancia de este mecanismo en modelos animales de EA familiar se encuentra en discusión.

Otro de los factores que se liberan en microglía y astrocitos en respuesta a estímulos pro-inflamatorios es el óxido nítrico (NO) producido por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Balez & Ooi, 2016; Santos, Lourenco, Ledo, Barbosa, & Laranjinha, 2012). La producción masiva de NO en un contexto de neuroinflamación crónica produce especies reactivas del nitrógeno que pueden afectar a la supervivencia neuronal e instalar un cuadro de estrés oxidativo en células endoteliales. La ausencia de iNOS en el ratón APP/PS1 previene en parte la formación de placas y la activación microglial y astrocitaria, sugiriendo que esta molécula tiene un rol en la patogénesis de la enfermedad (Balez & Ooi, 2016; Nathan et al., 2005).

Si bien la liberación fásica de altas concentraciones de NO pueden producir estrés oxidativo e instalar un contexto pro-inflamatorio, la liberación tónica de NO por enzimas de expresión constitutiva es necesaria para la homeostasis cerebral. Entre ellas, las células endoteliales expresan una isoforma constitutiva de la óxido nítrico sintasa, denominada eNOS. Esta proteína también ha sido relacionada con el proceso patológico de la EA. Estudios empleando ratones de edad avanzada deficientes en eNOS demostraron la presencia de alteraciones similares a las que se observan en modelos murinos de EA (Austin, Santhanam, Hinton, Choi, & Katusic, 2013). Entre estas alteraciones se encuentran un aumento de la expresión de APP y Presenilina-1, así como de la producción de A β intracerebral, activación microglial y mayores niveles de citoquinas pro-inflamatorias.

El NO de origen endotelial, producido a través de la actividad de la enzima eNOS, es uno de los principales agentes vasodilatadores en el cerebro. La deficiencia en esta proteína ha estado asociada a alteraciones en el acoplamiento neurovascular y por lo tanto desregulación en el flujo sanguíneo cerebral. Por esta razón, algunos autores proponen la realización de tratamientos experimentales en modelos animales, apuntando a aumentar la actividad de esta enzima y restaurar la homeostasis vascular (Asiimwe, Yeo, Kim, Jung, & Jeong, 2016; Lin et al., 2013).

2. Objetivos e Hipótesis

Teniendo en cuenta los antecedentes antes mencionados, los objetivos particulares de este Capítulo son:

1. Evaluar la progresión de alteraciones relacionadas con el contacto astrocito-endotelio en el giro dentado del ratón PDAPP-J20, contemplando edades previas y posteriores a la presencia de placas amiloides. Entre los marcadores a evaluar se estudiará el contacto físico célula-célula a través de la detección de ambos tipos celulares por tinciones o inmunofluorescencia, la localización vascular de la proteína AQP4 y la inmunoreactividad para la enzima eNOS. *Se plantea como hipótesis que el desacoplamiento físico entre astrocitos y endotelio es un evento temprano en la patología, lo cual se manifestaría por un menor contacto entre la vasculatura y podocitos astrocitarios, y menor densidad de señal inmunopositiva para eNOS y AQP4.*
2. Estudiar el rol de las células gliales en la mediación del proceso de activación endotelial debida a A β . Para ello se emplearán sistemas *in vitro* y se evaluará el efecto de mediadores solubles de origen astroglial y microglial empleando un esquema de medios condicionados. En todos los casos se pretende analizar la relevancia de RAGE en el proceso de activación endotelial. En este sentido, *se plantea la hipótesis de que la estimulación de células gliales con A β genera la liberación de factores solubles capaces de activar la translocación nuclear de NF κ B, probablemente a través de la acción del receptor multiligando RAGE.*

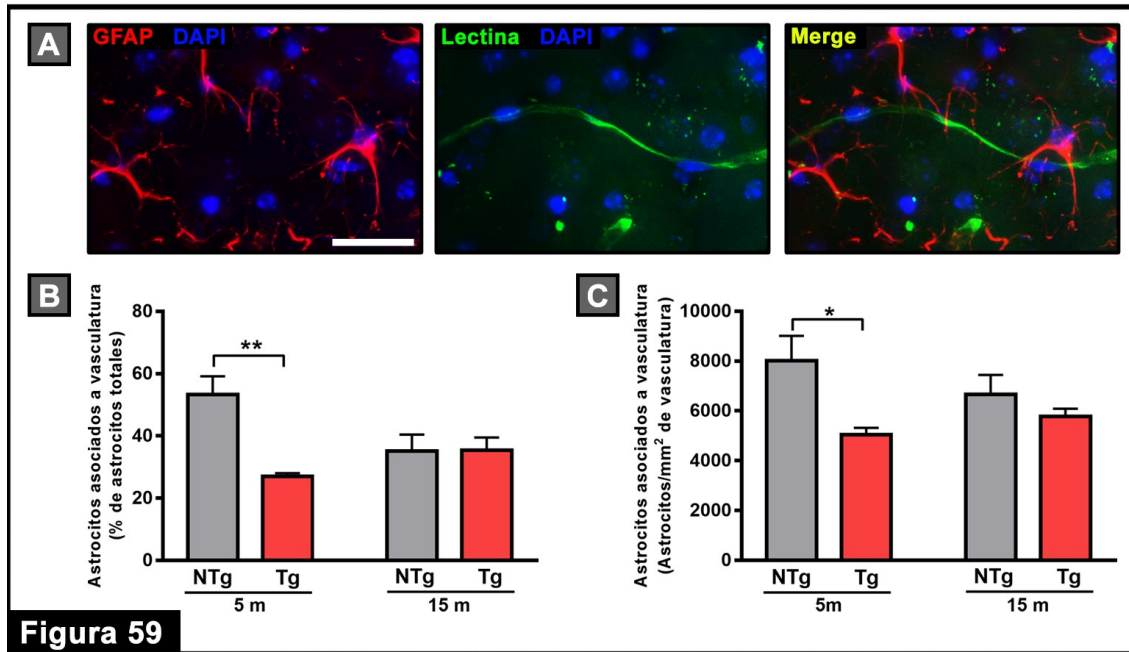
3. Resultados

Evidencias de alteraciones en la interacción astrocito-endotelio en el hipocampo de ratones PDAPP-J20.

El correcto acoplamiento entre células de la astroglia y células endoteliales cerebrales es necesario para que la vasculatura cerebral preserve sus propiedades distintivas, como es la formación de la BHE. Particularmente, el contacto físico entre astrocitos y los capilares sanguíneos a través de los podocitos astrocitarios es uno de los factores que permite mantener el estado diferenciado de las células endoteliales. En nuestro caso, se evaluó de manera general el contacto físico entre estos tipos celulares empleando marcadores específicos. Se procesaron cortes coronales de cerebro de ratones PDAPP-J20 conteniendo hipocampo para una inmunofluorescencia contra GFAP, acoplada a una tinción con lectina de tomate fluorescente. Posteriormente, se obtuvieron imágenes con microscopía confocal sobre el hilio del giro dentado, tomando regularmente planos discretos a lo largo del espesor del corte (*Z-stack*). Estas imágenes fueron luego condensadas en una sola imagen que permitió evaluar la disposición de ambos tipos celulares de manera representativa en todo el corte histológico (Figura 59A).

Empleando estas imágenes se cuantificó el porcentaje de astrocitos que enviaban proyecciones celulares hacia la vasculatura circundante. A la edad de 5 meses (previo a la presencia de placas amiloides), los animales Tg presentaron una menor cantidad de astrocitos en contacto con células endoteliales que sus hermanos NTg; mientras que a edades avanzadas los valores se mantuvieron bajos y sin distinción según el genotipo (Figuras 59B y 59C). Este parámetro podría estar influenciado por cambios globales a nivel de la densidad vascular y de la cantidad de astrocitos. Como se indicó en el Capítulo 4 de esta Tesis, a los 5 meses de edad los animales Tg presentaron menor número de astrocitos en otra sub-región del hipocampo; sin embargo, en este caso el número de astrocitos en contacto con los vasos sanguíneos fue relativizado al número total de células GFAP+, independizándose de ese cambio (Figura 59B). Respecto de la densidad vascular, en el capítulo 5 de esta Tesis se muestra que a los 5 meses de edad no se detectaron diferencias globales entre animales Tg y NTg. De manera coherente con esto, al relativizar el número de astrocitos en contacto con la vasculatura por la densidad vascular total se verificó el patrón de resultados mencionado anteriormente (Figura 59C). Estas determinaciones permiten afirmar que en el hipocampo de ratones Tg jóvenes se encontró una menor cantidad de células

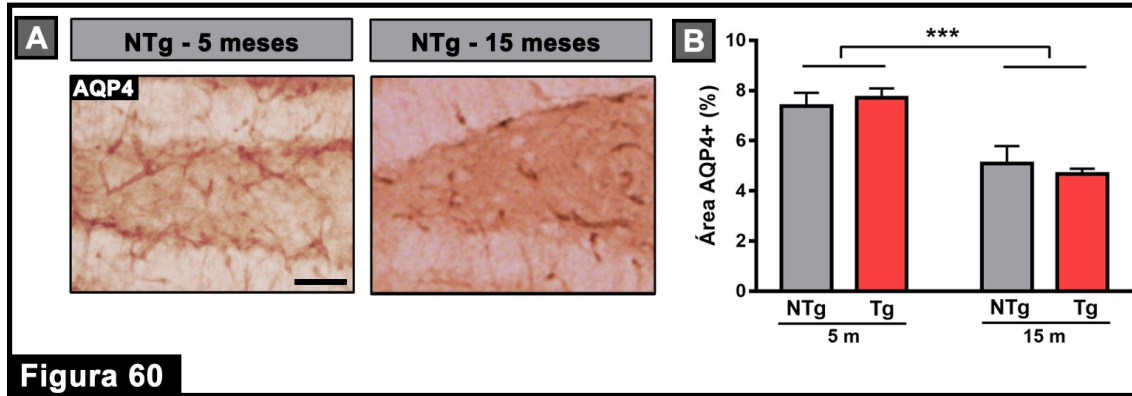
astrogliales con podocitos en contacto con la vasculatura que en el grupo NTg. Si bien no se encuentra reflejado con la estadística, es importante notar que en todos los casos el envejecimiento genera una tendencia a la disminución del contacto entre astrocitos y células endoteliales en los animales NTg, parámetro que el grupo Tg posee disminuido desde etapas incipientes.



▲ **Evaluación histológica del contacto físico entre células endoteliales y astrogliales en el hipocampo del ratón PDAPP-J20.** Inmunofluorescencia para GFAP acoplada a tinción de lectina FITC sobre cortes histológicos de cerebro de ratón conteniendo hipocampo. Se tomaron imágenes de microscopía confocal a planos regulares a fin de ser condensados en una única imagen que fuera representativa de todo el espesor del corte (A). Sobre dichas imágenes se evaluó la cantidad de astrocitos que estaban en contacto directo con la vasculatura, relativizada al número total de astrocitos (B) y al área vascular (C). La barra de escala corresponde a 50 μm . Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos señalados (ANOVA de dos vías seguido por comparaciones de Sidak, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

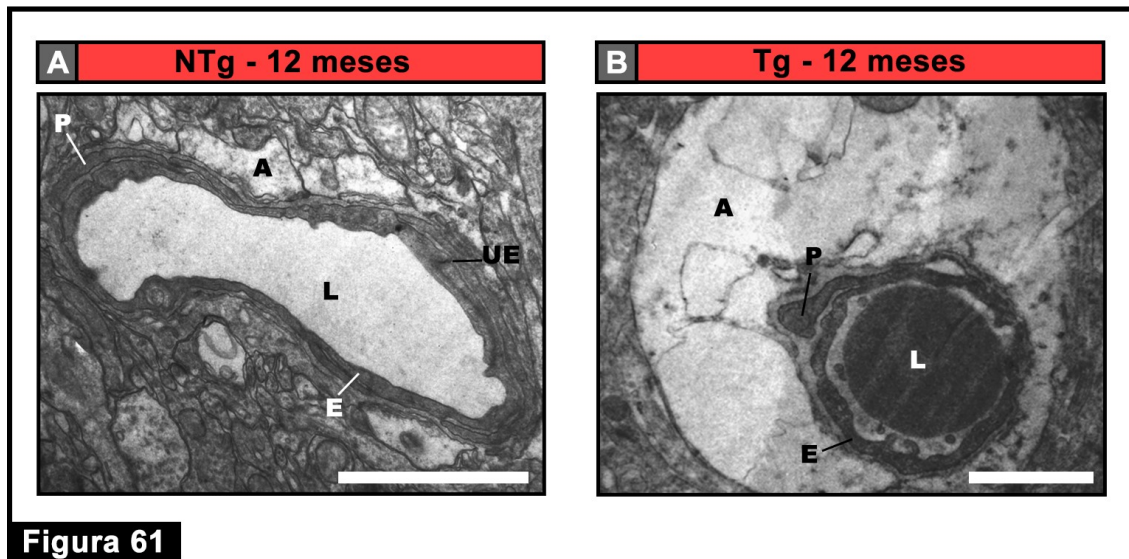
Asimismo, la interacción física entre astrocitos y endotelio fue evaluada indirectamente a través del patrón de distribución de la proteína de expresión astroglial Acuaporina-4 (AQP4). La interacción física entre estas células es necesaria para que AQP4 se localice en el extremo del podocito, en contacto con el vaso sanguíneo jugando un rol clave en el flujo de agua, como se mencionó anteriormente. Por esta razón, al realizar una inmunohistoquímica contra AQP4 en cortes histológicos de cerebro de ratones PDAPP-J20 se observa un patrón de localización vascular (Figura 60A). El área

vascular AQP4-positiva en el giro dentado presentó una marcada disminución con la edad, tanto en animales Tg como NTg (Figura 60B). Sin embargo, con esta técnica de evaluación indirecta, no fue posible identificar cambios significativos entre los genotipos a edades tempranas.



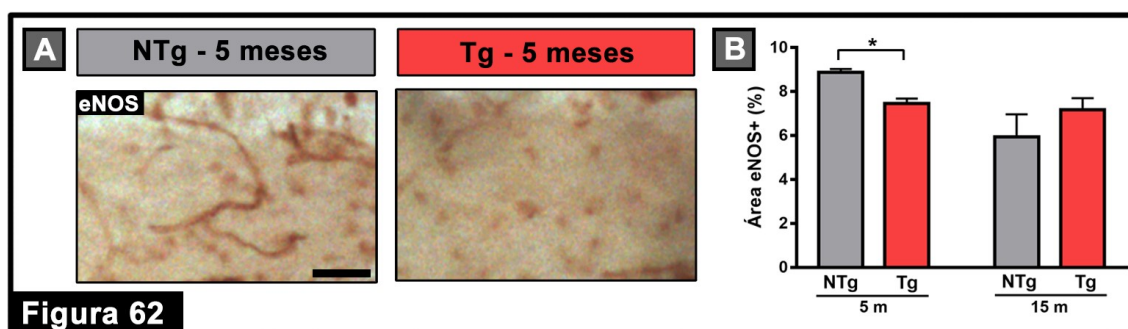
▲ **Patrón de inmunoreactividad para la proteína astroglial AQP4.** Se realizó una inmunohistoquímica contra AQP4 en cortes histológicos de cerebro de ratón y se tomaron imágenes a través del microscopio óptico (A). Sobre estas imágenes se cuantificó el porcentaje del área del hilio en el giro dentado que estaba ocupada por señal vascular de AQP4. La barra de escala corresponde a 70 μ m. Los asteriscos representan un efecto significativo de la edad, independiente del genotipo (ANOVA de dos vías, ***p<0,001).

Complementariamente, se observó por microscopía electrónica de transferencia la presencia de podocitos astrocitarios edematizados en contacto cercano a capilares sanguíneos en el giro dentado de ratones Tg de edad avanzada. Este tipo de eventos patológicos sugiere un fuerte compromiso de la capacidad astroglial para regular el flujo de agua (Figura 61).



▲ **Ultraestructura de células vasculares en el hipocampo del ratón PDAPP-J20.** La figura muestra imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transferencia donde se observa la luz de un capilar sanguíneo (L), rodeado por una única capa de células endoteliales (E) y en contacto próximo a un pericito (P). Rodeando esta estructura se visualiza el podocito de un astrocito, identificable por su citoplasma más claro (A). La imagen de la izquierda fue obtenida tomada a partir de cortes ultrafinos realizados sobre el hipocampo de un ratón NTg de 12 meses de edad (A), mientras que en el caso de la derecha se utilizó un ratón Tg de la misma edad (B). En el caso del animal Tg, se observa que el podocito astrocitario presenta evidentes signos de hipertrofia producidos probablemente por un cuadro de edema. La barra de escala corresponde a 7 µm.

Las células astrogliales y endoteliales también interactúan de manera paracrina, el sistema que utiliza al óxido nítrico como mediador es uno de los más relevantes. En este sentido, los niveles de la isoforma endotelial de la enzima óxido nítrico sintetasa (eNOS), puede brindar indicios sobre el estado de este sistema de interacción. Sobre cortes coronales de cerebro procesados para inmunohistoquímica contra eNOS (Figura 62A) se determinó el área eNOS+. A la edad de 5 meses de edad, el área eNOS+ fue un 16,4% menor en animales Tg en comparación con sus hermanos NTg (Figura 62B), sugiriendo una posible alteración en este sistema en etapas tempranas.



▲ **Patrón de inmunoreactividad para la proteína endotelial eNOS.** En el Panel A se muestran imágenes representativas obtenidas con el microscopio óptico sobre cortes histológicos procesados para inmunohistoquímica contra eNOS. A partir de estas imágenes se cuantificó el porcentaje del área del hilio en el giro dentado que era inmunopositiva para esta proteína. La barra de escala corresponde a 50 μ m. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos señalados (ANOVA de dos vías seguido por comparaciones múltiples de Sidak, * $p<0,05$).

En su conjunto, estos resultados sugieren que la interacción entre astrocitos y células endoteliales está alterada como parte del proceso fisiológico del envejecimiento cerebral denotando, una pérdida progresiva de la funcionalidad asociada a esta interacción. En el contexto del proceso patológico del ratón PDAPP-J20 se evidencia una significativa pérdida temprana de esta interacción. Particularmente, resulta interesante destacar la presencia de alteraciones antes de la detección de placas amiloides, tanto en los sistemas de interacción física como paracrina.

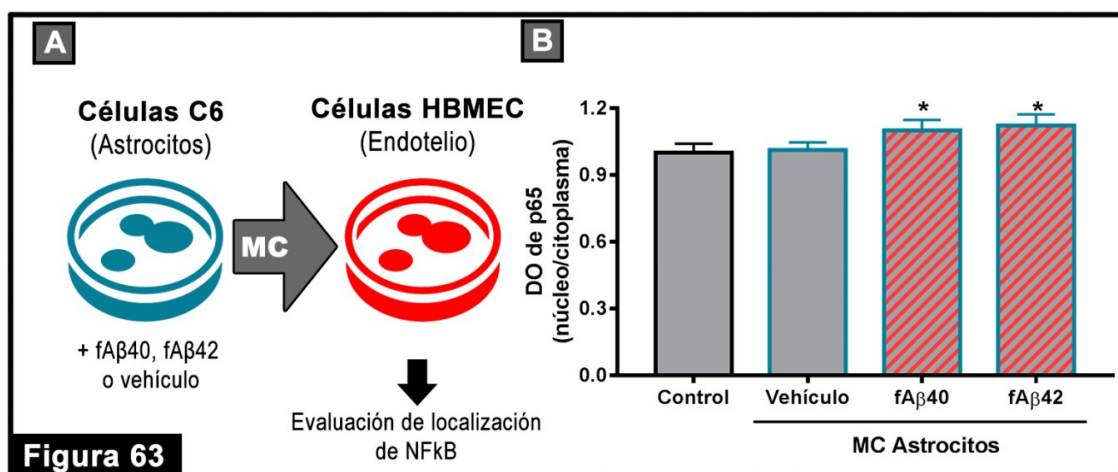
Activación *in vitro* de células endoteliales cerebrales por factores gliales.

Como constituyentes de la UNV, las células endoteliales reciben constantemente factores solubles derivados de otros tipos celulares. En un contexto neuroinflamatorio, citoquinas y otros mediadores derivados de la activación de la microglía y los astrocitos pueden inducir la activación endotelial. En el contexto de la EA, se ha demostrado en el Capítulo 5 de esta Tesis que las células endoteliales son capaces de activarse por su exposición directa a A β 1-40 pero no a A β 1-42, siendo este último el principal componente de las placas amiloides parenquimáticas. Por este motivo, se evaluó el potencial de ambos péptidos de inducir la activación endotelial de manera indirecta, mediada por factores gliales.

Para ello se utilizaron líneas celulares derivadas de astrogía (C6), microglía (BV-2) y endotelio cerebral (HBMEC). Todas estas líneas celulares han sido validadas en la bibliografía para su uso en el estudio de condiciones neuroinflamatorias. Respecto de los procesos de activación glial y endotelial, estas líneas celulares no presentan

diferencias relevantes respecto de los cultivos primarios de los cuales derivan. Se empleó un sistema de medios condicionados con el objetivo de estudiar el efecto de mediadores solubles derivados de la glía sobre la activación endotelial.

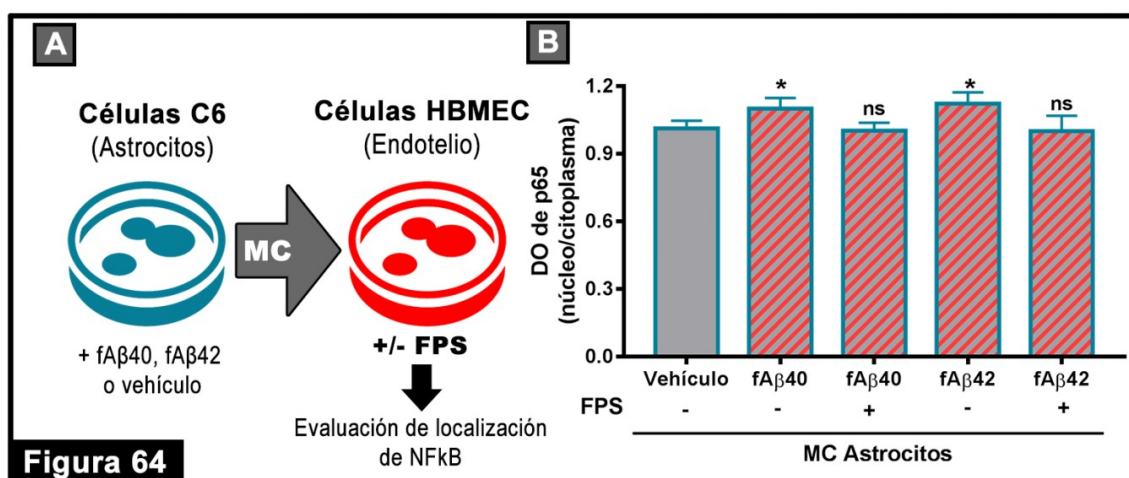
Se estimuló durante 24 hs a astrocitos de la línea C6 con vehículo, fA β 40 o fA β 42 inmovilizado sobre una capa de nitrocelulosa. El medio condicionado obtenido fue empleado sin diluir para tratar a células endoteliales HBMEC durante 2 hs. Luego, las células HBMEC fueron fijadas y procesadas para evaluar la translocación nuclear de NF κ B por inmunofluorescencia como parámetro de activación (Figura 63A). Los resultados obtenidos demostraron que el tratamiento de las células endoteliales con medio condicionado de astrocitos expuestos a fA β 40 o fA β 42 produjo un aumento significativo de la translocación nuclear de NF κ B en comparación con aquellas que recibieron medio condicionado de astrocitos expuestos a vehículo (Figura 63B).



▲ Activación endotelial en respuesta a factores solubles astrocitarios liberados por la exposición a péptidos amiloides. El esquema del Panel A ilustra el diseño experimental, según el cual células astrogliales fueron expuestas a fA β 40, fA β 42 o vehículo durante 24 hs. El tratamiento con péptidos A β fibrilizados se realizó sobre la superficie de cultivo empleando una solución 3 μ M. Las células HBMEC se expusieron al medio condicionado (MC) proveniente del cultivo astrogliar durante 2 h y luego fueron luego fijadas y procesadas para inmunofluorescencia contra la subunidad p65 de NF κ B. Sobre imágenes tomadas con microscopio de epifluorescencia, se evaluó la translocación nuclear de NF κ B como medida de la activación endotelial, a través de la relación entre la densidad óptica (DO) del núcleo y el citoplasma (B). Los resultados obtenidos fueron relativizados al grupo control, que fue expuesto al medio de mantenimiento de las células HBMEC. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto del grupo control (ANOVA de una vía seguido por comparaciones de Dunnet, *p<0,05).

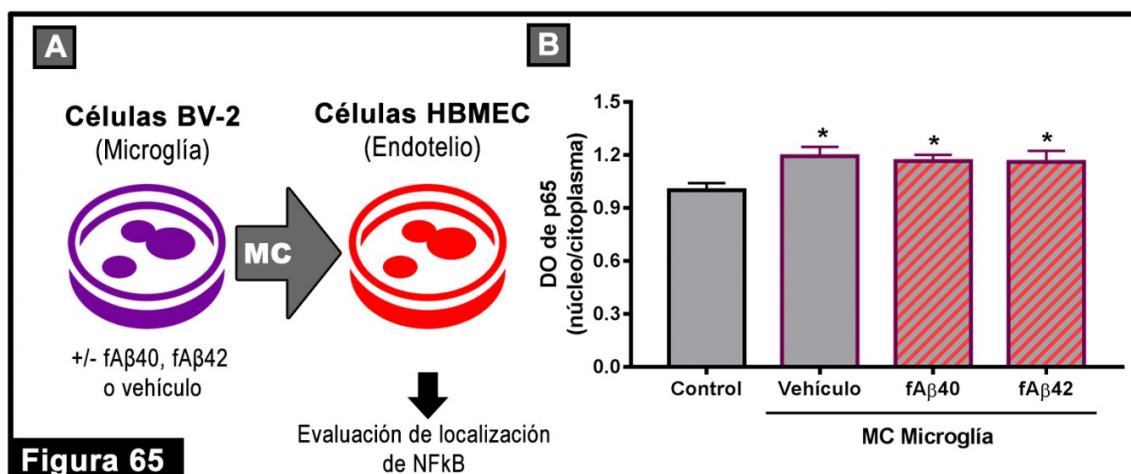
Posteriormente, se pretendió identificar alguna de las moléculas involucradas en este tipo de interacción. Dado que múltiples factores pro-inflamatorios pueden actuar a través de su interacción con el receptor RAGE, y que el mismo está involucrado en la activación endotelial mediada por A β 1-40 (como se demostró en el Capítulo 5 de esta Tesis), se evaluó si la activación indirecta del endotelio por factores astrogliales está

mediada por este receptor. Para ello, las células HBMEC fueron tratadas durante 2 hs con el medio condicionado derivado de células astrogliales expuestas a vehículo, fA β 40 o fA β 42, en presencia o ausencia de FPS-ZM1, un inhibidor competitivo de RAGE (Figura 64A). Los resultados obtenidos demostraron que la presencia del inhibidor de RAGE previno la translocación nuclear en células endoteliales producida por factores astrogliales (Figura 64B). Estos resultados demuestran que tanto A β 1-40 como A β 1-42 son capaces de inducir la activación endotelial (en estas condiciones y evaluada por la localización de NF κ B) de manera indirecta, a través de factores astrogliales, de manera dependiente del receptor RAGE en células endoteliales.



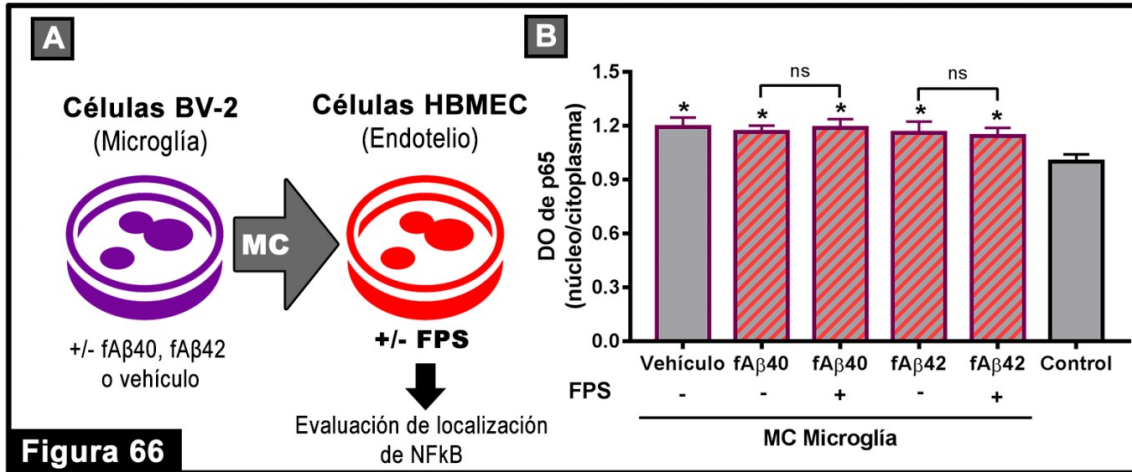
▲ **Activación endotelial en respuesta a factores solubles astrocitarios liberados por la exposición a péptidos amiloides.** Se utilizó un sistema de medios condicionados (MC) para evaluar el efecto de factores astrogliales sobre células endoteliales HBMEC (A). El esquema experimental es similar al que se muestra en la Figura 63, pero en este caso junto con el medio condicionado las células endoteliales fueron incubadas con vehículo o FPS-ZM1 (FPS, 100 nM). La activación endotelial fue evaluada por la translocación nuclear de NF κ B, mediante inmunofluorescencia (B). Los resultados fueron relativizados al grupo que recibió vehículo. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto del grupo de células HBMEC que fueron expuestas al medio condicionado de células astrogliales expuestas a vehículo (ANOVA de una vía seguido por comparaciones de Dunnet, * $p < 0,05$; ns: no significativo).

El mismo esquema experimental fue empleado para evaluar el impacto de factores solubles derivados de la microglía sobre la activación de células endoteliales. En este nuevo caso, se emplearon células microgliales murinas de la línea celular BV-2 (Figura 65A). Los resultados obtenidos mostraron que el medio condicionado derivado de microglía que ha sido expuesta a los diferentes péptidos amiloides o vehículo produjo en todos los casos un aumento en la translocación al núcleo de NF κ B comparado con células endoteliales que recibieron medio de mantenimiento (Figura 65B).



▲ **Activación endotelial en respuesta a factores solubles microgliales liberados por la exposición a péptidos amiloides.** El esquema del Panel A ilustra el diseño experimental, según el cual células microgliales BV-2 fueron expuestas a vehículo, fAβ40 o fAβ42 durante 24 hs. El tratamiento con péptidos Aβ fibrilizados se realizó sobre la superficie de cultivo empleando una solución 3 μM. Las células HBMEC fueron incubadas con el medio condicionado (MC) proveniente del cultivo microglial durante 2 h, luego fijadas y procesadas para inmunofluorescencia contra NFκB. Sobre imágenes tomadas con microscopio de epifluorescencia, se evaluó la translocación nuclear de NFκB como medida de la activación endotelial (B). Los resultados obtenidos fueron relativizados al grupo control. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto del grupo control, el cual solo recibió medio de mantenimiento de las propias células HBMEC (ANOVA de una vía seguido por comparaciones de Dunnet, *p<0,05).

Asimismo, se evaluó si el receptor RAGE estaba involucrado en la activación endotelial mediada por factores derivados de la microglía. Para ello se realizó el tratamiento con los medios condicionados en presencia o ausencia de FPS-ZM1 (Figura 66A). En ningún caso la translocación nuclear de NFκB fue revertida por el inhibidor de RAGE. Estos resultados sugieren que, al menos en estas *condiciones in vitro*, las células microgliales producen basalmente factores solubles capaces de inducir la activación endotelial por vías independientes del receptor RAGE (Figura 66B).



▲ **Activación endotelial en respuesta a factores solubles astrocitarios liberados por la exposición a péptidos amiloides.** Se utilizó un sistema de medios condicionados (MC) para evaluar el efecto de factores microgliales sobre células endoteliales de la línea HBMEC (A). El esquema experimental es similar al que se muestra en la Figura 65, pero en este caso junto con el medio condicionado las células endoteliales fueron tratadas con vehículo o FPS-ZM1 (FPS, 100 nM). La activación endotelial fue evaluada por la translocación nuclear de NFkB, mediante inmunofluorescencia (B). Los resultados obtenidos fueron relativizados al grupo control. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto del grupo control, el cual fue expuesto al medio de mantenimiento de las propias células HBMEC (ANOVA de una vía seguido por comparaciones de Dunnet, * $p < 0,05$). La leyenda "ns" indica diferencias no significativas entre los grupos señalados, evaluado por comparaciones de Tukey.

4. Discusión

El acoplamiento entre astrocitos y endotelio se encuentra afectado en el hipocampo del ratón PDAPP-J20 desde etapas tempranas.

En este Capítulo se ha evaluado histológicamente la presencia de marcadores relacionados con la interacción entre células endoteliales y gliales en el giro dentado de ratones PDAPP-J20 de diferentes edades. Uno de estos marcadores es AQP4. Como se indicó anteriormente, la localización perivascular de esta proteína es dependiente de la correcta interacción física entre proteínas de la membrana plasmática astroglial y de la matriz extracelular vascular (Lecuyer et al., 2016). En las imágenes tomadas a partir de los cortes coronales procesados para inmunohistoquímica contra AQP4 se observó que la mayoría de la señal inmunoreactiva presentó morfología vascular, lo cual es coherente con lo reportado por otros trabajos (Di Benedetto et al., 2016; Zeppenfeld et al., 2017).

El porcentaje de área del giro dentado positiva para AQP4 no mostró diferencias entre animales Tg y NTg, sin embargo sí se evidenció una marcada reducción debida a la edad. Este resultado va en el mismo sentido de lo reportado por Duncombe y colaboradores en un modelo murino de EA transgénico para APP humano que porta las mutaciones *Swedish*, *Dutch* e *Iowa* (Duncombe et al., 2017). En dicho trabajo, además, se observa una leve tendencia en los animales Tg a tener una mayor inmunoreactividad para AQP4 que animales NTg de la misma edad. Sin embargo, a la hora de comparar este tipo de parámetros deben considerarse las diferencias que puedan existir entre las técnicas empleadas para la cuantificación. En esta Tesis, la densidad de la señal AQP4+ fue relativizada al área total del giro dentado, independizándose de posibles cambios en el volumen de la estructura. Sin embargo, en el Capítulo 5 se ha mostrado que animales Tg de 15 meses presentan una menor densidad vascular, por lo que es posible que el área vascular positiva para AQP4 sea mayor en animales Tg que en animales NTg.

Los cambios observados a nivel de AQP4 podrían favorecer el desbalance osmótico del tejido nervioso. Así quedó demostrado al menos para animales Tg tras la observación de podocitos astrocitarios edematizados mediante microscopia electrónica, un evento patológico asociado a la desregulación del flujo de agua entre la vasculatura y el parénquima cerebral. Asimismo, la desregulación de AQP4 podría tener implicancias negativas sobre el depurado de A β a través del sistema glinfático,

favoreciendo de esta manera la acumulación de A β desde etapas tempranas de la patología en este y otros modelos experimentales.

Dado que la localización perivascular de AQP4 es dependiente de la correcta interacción física entre astrocitos y células endoteliales, en esta Tesis se evaluó el contacto físico entre estas células a través de una inmunofluorescencia para GFAP acoplada a una tinción con lectina fluorescente. Como se describió anteriormente, al ser GFAP un componente del citoesqueleto de las células astrogiales, el análisis de la señal GFAP+ es en realidad una subestimación del área total cubierta por un astrocito. En el análisis que se presentó en este Capítulo, se cuantificó el número de astrocitos que establecen contacto directo con la vasculatura cerebral a través de sus podocitos GFAP+. Sin embargo, es importante aclarar que este parámetro puede ser una subestimación del valor real, a pesar de lo cual ha sido empleado en la bibliografía por varios autores como un análisis exploratorio (Fletcher et al., 2010; Janota et al., 2015).

En este Capítulo, el número de astrocitos que establecen contacto físico con la vasculatura fue relativizado tanto al número total de astrocitos como al área vascular, con el objetivo de independizarse de cambios en esos parámetros. En ambos casos se observó una disminución de la cobertura astrogial en el endotelio del hipocampo de animales Tg a edades previas a la aparición de placas amiloides. Los ratones Tg presentan desde los 5 meses de edad niveles similares a los que presentan animales de ambos genotipos a edades avanzadas, sugiriendo la presencia de un fenotipo de envejecimiento acelerado en cuanto a este parámetro.

Otros trabajos sugieren que la pérdida de contacto entre astrocitos y células endoteliales sería un evento temprano en la progresión de la patología, que llevaría luego a alteraciones en la funcionalidad de ambas células. Merlini y colaboradores han evaluado este contacto en ratones transgénicos para APP humano que expresa la mutación *Arctic* a diferentes edades (Merlini, Meyer, Ulmann-Schuler, & Nitsch, 2011). En la corteza cerebral de esos ratones han descrito la presencia de hipertrofia en podocitos astrocitarios y un menor contacto físico con la vasculatura en etapas tempranas del proceso patológico. Estos cambios tempranos estuvieron acompañados de un desacoplamiento metabólico, dado por una menor expresión de transportadores GLUT1 y, en astrocitos, menor expresión de transportadores de lactato (Merlini et al., 2011). Estos cambios pueden volverse más severos a medida que los animales envejecen y los péptidos A β se depositan en la zona perivascular. En un trabajo posterior, Kimbrough y colaboradores emplearon microscopía de 2 fotones en la cepa de ratones PDAPP-J20 para demostrar que el A β se deposita en la membrana basal,

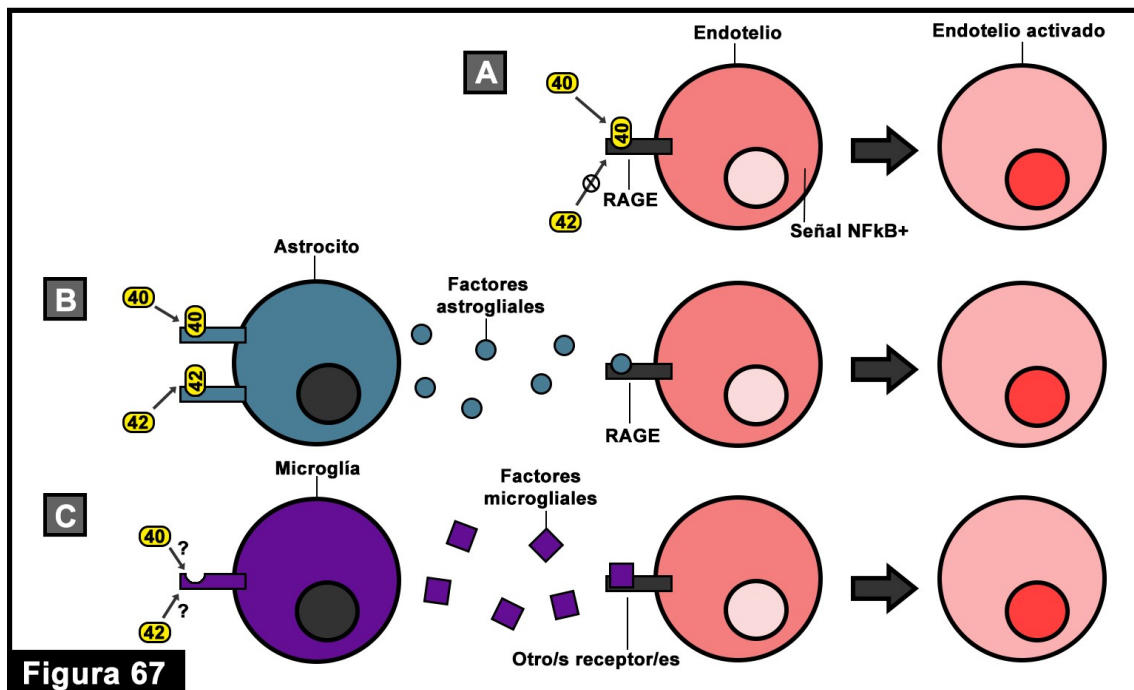
separando físicamente al podocito astrocitario de la célula endotelial (Kimbrough et al., 2015).

Otra de las funciones asociadas a la interacción entre astrocitos y células endoteliales es la regulación del flujo sanguíneo cerebral. Este mecanismo depende, entre otras cosas, de la liberación de agentes vasodiladores por parte de las células endoteliales, siendo el NO uno de los más relevantes. En esta Tesis se reporta que la inmunoreactividad para eNOS se encuentra disminuida desde etapas tempranas en animales Tg, en niveles comparables con aquellos que se observan para ambos grupos a edades avanzadas. Esto podría sugerir la presencia de un fenotipo de envejecimiento acelerado en el grupo Tg. Si bien en esta Tesis se evalúa la inmunoreactividad para eNOS y no la actividad de la enzima, una potencial disminución en su función podría estar relacionada con una menor capacidad para regular el flujo sanguíneo en etapas tempranas. En este sentido, se ha propuesto que la menor capacidad de la vasculatura cerebral de producir vasodilatación es un evento temprano en el proceso patológico de la EA, tanto en pacientes como en modelos animales (Kisler et al., 2017). En este último caso, estudios pioneros empleando el modelo murino de EA Tg2576 joven demostraron que la capacidad del endotelio de regular la contratibilidad del músculo liso vascular puede verse afectada desde etapas tempranas (Iadecola et al., 1999; Niwa et al., 2000).

En su conjunto, los resultados presentados en este Capítulo sugieren que el acoplamiento entre astrocitos y células endoteliales se encuentra comprometido en el hipocampo durante el proceso patológico del ratón PDAPP-J20. La disminución en AQP4 se debería al mismo proceso de envejecimiento, mientras que otras (como la reducción de eNOS y el menor contacto físico entre células) se evidencian desde etapas previas a la presencia de placas amiloides. Estos resultados son descritos por primera vez en este modelo y, en conjunto con los antecedentes publicados en otras cepas, contribuyen a dar relevancia al rol de la interacción entre los componentes de la UNV desde etapas tempranas de la EA experimental.

A β 1-42 puede inducir la activación indirecta de células endoteliales a través de factores gliales en condiciones *in vitro*.

En el Capítulo 5 de esta Tesis se demostró que el A β 1-40 (pero no el A β 1-42) es capaz de producir directamente la activación de células HBMEC evaluada a través de la translocación al núcleo de NFkB. Dicho efecto es dependiente de la interacción con el receptor multiligando RAGE. Este resultado se encuentra representado de manera esquemática en la Figura 67A. Asimismo, se incluye en la figura los resultados mostrados en este Capítulo acerca del efecto del medio condicionado de astrocitos (Figura 67B) y microglía (Figura 67C) sobre la activación de células endoteliales.



▲ Modelo de activación de células HBMEC en respuesta a diferentes especies de A β de manera directa e indirectamente a través de factores de origen glial. El esquema resume resultados mostrados en el Capítulo 5 y en este Capítulo sobre la activación de células endoteliales *in vitro* debido a A β . Las células de la derecha representan células endoteliales, y la intensidad del color rojo a la inmunoreactividad para NFkB. Se representa el efecto directo de péptidos A β sobre células endoteliales y el rol del receptor RAGE (A). Se indica además el efecto indirecta de A β mediada por factores solubles derivados por astrocitos (B, células C6, receptores de membrana y factores de origen astroglial en azul) y microglía (C, Células BV-2, receptores y factores de origen microglial en violeta). Los óvalos amarillos con la inscripción “40” corresponden a A β 1-40, mientras que aquellos con la inscripción “42” corresponden a A β 1-42.

Llamativamente, si bien A β 1-42 no produjo la activación de células endoteliales por acción directa, sí es capaz de inducir la translocación de NF κ B mediada por factores astrocitarios. Los experimentos de medios condicionados demostraron que la estimulación de células C6 con ambas especies de A β genera factores solubles que inducen la activación de células HBMEC mediada (en ambos casos) por el receptor RAGE. Este resultado se complementa con el mostrado en el Capítulo 5 y demuestra que las células endoteliales en estas condiciones experimentales son capaces de responder de manera directa a A β 1-40 y de manera indirecta a A β 1-42, mediado por la presencia del astrocito. En este experimento no se evaluó la identidad de los receptores astrocitarios que detectan la presencia de ambas especies de A β , pero no se descarta la posibilidad de que sea el mismo receptor RAGE, ya que como se indicó en el Capítulo 4 este se expresa en células astrogiales y participa del proceso de activación astrogial (Jones, Minogue, Connor, & Lynch, 2013; Villarreal et al., 2014). Tampoco se evalúa en esta Tesis la identidad de los mediadores solubles de origen astrogial. Sin embargo, al ser RAGE un receptor multiligando abre la posibilidad de que un gran número de DAMPs (como S100B) o citoquinas (como IL-1 β) puedan estar actuando a través de este receptor. Es probable incluso que más de una especie molecular esté involucrada en este efecto.

Por otro lado, el medio condicionado de las células microgliales BV-2 generó la activación de las células HBMEC independientemente del estímulo con péptidos amiloides. Por lo tanto, ha sido imposible discriminar si existe algún efecto diferencial por la presencia de A β 1-40 y A β 1-42, ya que en ausencia de estímulo también se observa translocación de NF κ B en células endoteliales. Adicionalmente, la activación endotelial mediada por factores microgliales no depende de la interacción con el receptor RAGE, a diferencia de lo observado para el caso de astrocitos. Dado que no se ha determinado la identidad de estos mediadores solubles, es posible que en esta interacción estén involucrados más de un agente paracrino y más de un receptor. Por ejemplo, la liberación de diferentes citoquinas pro-inflamatorias por parte de células microgliales incluso en estado de reposo a bajas concentraciones podría activar la vía de NF κ B en células endoteliales.

Estudios complementarios son necesarios para profundizar en la identidad de los mediadores solubles y en el mecanismo de activación de células microgliales y astrogiales por parte de las diferentes especies de A β . Asimismo, es necesario corroborar la ausencia de A β en los medios condicionados, para descartar una posible contaminación. La técnica aquí empleada implica inmovilizar el A β sobre una capa de nitrocelulosa previa a la exposición de células gliales, pero es posible que lo haga en

forma parcial. Este método ha sido validado por otros autores en la bibliografía (Combs, Johnson, Karlo, Cannady, & Landreth, 2000; Lagenaur & Lemmon, 1987).

En su conjunto, estos resultados aportan conocimiento novedoso acerca de la capacidad de las células endoteliales de modular su activación en respuesta directa a A β e indirectamente por la influencia de la activación de células gliales. Estos resultados ponen en relevancia el rol de la interacción entre los componentes de la UNV para montar una respuesta orquestada en un contexto neuroinflamatorio, donde el receptor RAGE tiene un rol clave en la regulación de este proceso en células endoteliales.

Cap. 7

Discusión

Existe consenso en considerar a la EA como una patología multifactorial. La bibliografía en general y los antecedentes mencionados en esta Tesis dan cuenta de que, durante casi un siglo de investigación sobre esta patología, se han empleado numerosos enfoques para su estudio. Así, algunos autores hacen énfasis en la centralidad de algún tipo celular, o mencionan ciertas alteraciones como eventos tempranos fundamentales para la instalación de la patología.

En esta Tesis se pretende contemplar el carácter complejo que tiene la EA, incluso en un modelo animal de la forma familiar de la enfermedad, como el ratón PDAPP-J20. Si bien este tipo de modelos tienen determinísticamente definida la patología por portar el gen de APP humano con mutaciones específicas, las alteraciones que se disparan en consecuencia son progresivas, muy variadas y afectan a múltiples tipos celulares desde estadios tempranos, tal como se demuestra en esta Tesis y en otros artículos (Beauquis et al., 2014; Pomilio et al., 2016).

Para considerar los diferentes eventos y procesos que se han estudiado a lo largo de esta Tesis, el presente Capítulo se divide en 4 secciones. Inicialmente se discute acerca del modelo empleado, sus alcances y limitaciones. Seguidamente, se discute acerca del rol del proceso neuroinflamatorio y de activación glial durante etapas tempranas de la patología, el papel de la autofagia glial como mecanismo de *clearance* de A β y la vasculatura cerebral como blanco del proceso patológico.

1. Alcances y limitaciones del modelo experimental

La multiplicidad de factores que se encuentran alterados en el proceso patológico de la EA, sumada al carácter progresivo y a su asociación con el envejecimiento, constituye una gran dificultad para la obtención de un modelo experimental suficientemente válido para el estudio de esta enfermedad. Los modelos animales basados en roedores transgénicos han sido y son de gran utilidad; sin embargo, han recibido ciertas críticas, ya que prácticamente ninguno de ellos recapitula la totalidad de eventos observados en pacientes ni la cinética de aparición de los mismos. Por otro lado, esta misma multifactorialidad ha sido el principal inconveniente para el desarrollo de modelos animales validados para el estudio de la EA esporádica (Drummond & Wisniewski, 2017).

Por esta razón, los modelos animales más ampliamente utilizados en la bibliografía son en realidad modelos de EA familiar, que en pacientes corresponde a menos del 5% de los casos de EA (Goldman et al., 2011). Aunque ambas condiciones compartan el núcleo de eventos histopatológicos que definen a la enfermedad, algunos autores mantienen cautela a la hora de concluir que los eventos patofisiológicos e incluso la etiología de ambas condiciones sean las mismas. Esta observación plantearía un gran inconveniente a la hora de extrapolar los resultados obtenidos en modelos animales con objetivos translacionales. Más aún, algunos autores sugieren que este punto es una de las razones por las cuales numerosas estrategias terapéuticas fueron exitosas en roedores pero fallaron drásticamente al iniciarse los ensayos clínicos en pacientes con EA esporádica (Franco & Cedazo-Minguez, 2014). Autores como Franco y Cedazo-Minguez han sido críticos al sugerir que la mayoría de los esfuerzos están orientados a “curar la EA en ratones, pero no en seres humanos” (Franco & Cedazo-Minguez, 2014).

Sin embargo, estas críticas no plantean la nulidad de los modelos animales para EA familiar, sino simplemente la necesidad de ser conscientes de sus alcances y limitaciones. Estos modelos fueron construidos en el marco de la Hipótesis de la Cascada Amiloide, y por su propia naturaleza permiten demostrar los efectos patológicos de las alteraciones en el procesamiento de APP. Sin embargo, desde hace unos años, ha surgido la hipótesis de que la acumulación de A β podría no ser un evento disparador de la patología, sino más bien un proceso que ocurre en paralelo con otros eventos desde etapas tempranas, que potenciaría el cuadro patológico. Desde esta perspectiva, la etiología de la EA esporádica y de la EA familiar sería

diferente, y por lo tanto la investigación translacional en este tipo de modelos animales podría no ser extrapolable a la mayoría de los casos de EA.

Los modelos basados en ratones transgénicos para APP humano, lejos de ser descartados, han permitido demostrar que el procesamiento de APP por la vía amiloidogénica y la acumulación de A β genera múltiples alteraciones presentes en la EA, incluso considerando que los roedores no desarrollan espontáneamente este tipo de eventos patológicos, dado que si bien expresan la proteína APP murina, naturalmente no se evidencia la acumulación de depósitos amiloides.

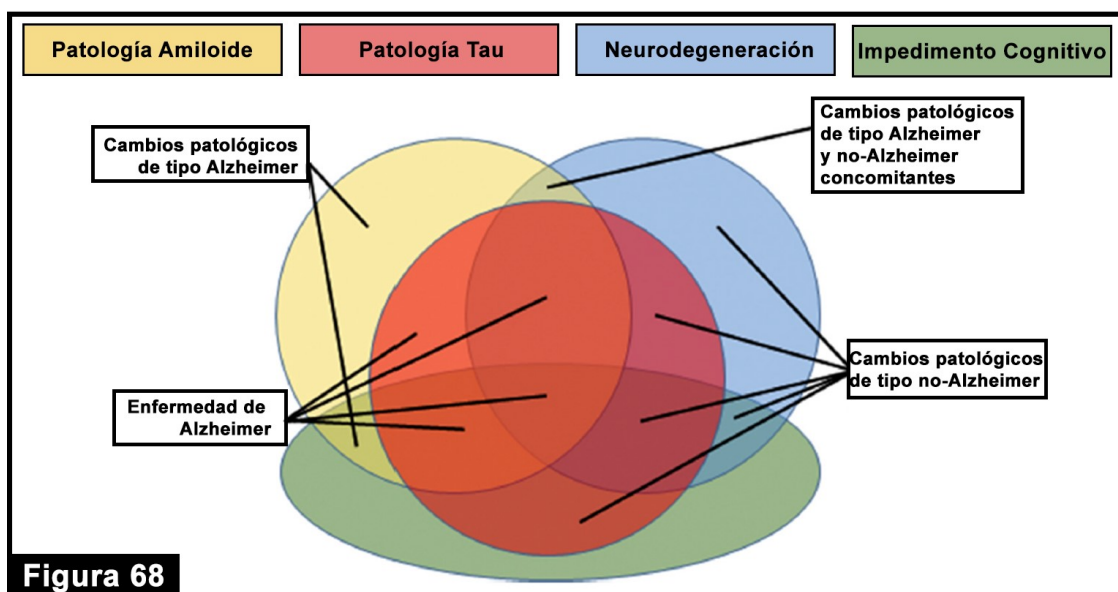
La discusión respecto de los modelos experimentales para la EA pone de manifiesto la falta de un criterio unificado a la hora misma de definir la patología en seres humanos. El análisis de estudios realizados con pacientes en distintos centros médicos del mundo demuestra ciertas discrepancias en el diagnóstico. Se comprueba que pacientes con una serie de cambios neuropatológicos o bien con un síndrome clínico sin verificación de las alteraciones neurológicas reciben frecuentemente el mismo diagnóstico. Recientemente, el *National Institute on Aging* de Estados Unidos y la *Alzheimer's Association* han realizado esfuerzos conjuntos por establecer una definición neuropatológica de la EA con el objetivo de establecer un marco de investigación para los futuros trabajos que empleen pacientes diagnosticados con EA (Jack et al., 2018).

El marco de investigación parte de la necesidad de entender a la EA como una neuropatología definible a través de biomarcadores y alteraciones fisiológicas en lugar de cómo un síndrome que abarca un conjunto de síntomas clínicos. Este punto ha sido particularmente controversial en la bibliografía, ya que algunos trabajos consideran como pacientes con EA a aquellos sujetos que tienen depósitos amiloides en el parénquima cerebral aunque estén cognitivamente intactos, mientras que otros incluyen sujetos con deterioro cognitivo pero sin ningún tipo de análisis de la presencia de depósitos amiloides. Sin embargo, comprender los mecanismos de una enfermedad hace necesaria una definición biológica más que sindrómica, ya que las intervenciones que modifiquen el curso de la enfermedad deben enfocarse en blancos terapéuticos definidos biológicamente. Más aún, una definición biológica permite describir alteraciones tempranas que puedan ser blancos de intervenciones con el objetivo de prevenir o retrasar el inicio de la patología.

A partir de esta motivación, Jack y colaboradores (en representación de las instituciones mencionadas) establecieron una definición para el diagnóstico de EA basada en tres tipos de biomarcadores: la presencia de agregados de A β , agregados

de Tau y neurodegeneración (Jack et al., 2018). Estos tres tipos de eventos pueden ser detectables mediante la medición de proteínas específicas en líquido ceforraquídeo o a través de neuroimágenes (Russo et al., 2014; Surace et al., 2013; Veitch et al., 2018). Específicamente, se ha asociado con la progresión de la patología una disminución en los niveles de A β 1-42, aumento de Tau fosforilado y aumento de Tau total en líquido ceforraquídeo, los cuáles reflejarían respectivamente la acumulación de péptidos amiloides intracerebrales, formación de ovillos neurofibrilares y neurodegeneración (Niemantsverdriet, Valckx, Bjerke, & Engelborghs, 2017). En cualquier caso, se establece un continuo dentro del espectro de la EA, cuyo diagnóstico depende irremediamente de la presencia de depósitos de A β , mientras que los agregados de Tau y los signos de neurodegeneración pueden aparecer con posterioridad (Jack et al., 2018). Bajo este concepto, el simple diagnóstico de demencia, e incluso en presencia de signos de neurodegeneración o patología Tau no permite definir el diagnóstico de EA, sino que deben considerarse otras posibles patologías.

A partir de la combinación de estos elementos, los autores definen cuatro posibles diagnósticos, como se indica en la Figura 68: Enfermedad de Alzheimer, Cambios patológicos de tipo Alzheimer, Cambios patológicos de tipo No-Alzheimer, cambios patológicos de tipo Alzheimer y No-Alzheimer concomitantes. Según esta clasificación, los cambios patológicos de tipo Alzheimer corresponden a estadios tempranos de la patología y, en ausencia de alteraciones cognitivas, podría ser una etapa clave para la intervención terapéutica.



▲ **Criterio de diagnóstico para la EA según el *National Institute on Aging* y la *Alzheimer's Association*.** La figura muestra el espectro de diagnósticos posibles dado por la superposición de tres tipos diferentes de biomarcadores y la presencia de impedimento cognitivo. La figura fue modificada a partir de la publicada por Jack y colaboradores (Jack et al., 2018).

De acuerdo a la definición anterior, los modelos de animales transgénicos basados en la expresión de APP humana mutada serían una herramienta válida para evaluar posibles intervenciones que puedan luego ser aplicadas a pacientes con diagnóstico temprano de EA. En esta Tesis se ha descrito toda una serie de alteraciones asociadas a la presencia del transgén de APP humano mutado en ratones PDAPP-J20 que guardan estrecha similitud con los eventos patológicos detectables en pacientes y su cinética de aparición. Como quedó demostrado en el Capítulo 3 de esta Tesis, estos ratones presentan una patología amiloide robusta, que inicia de manera incipiente durante la adultez temprana y se desarrolla a lo largo del proceso de envejecimiento. Además, nuestro grupo y otros han reportado en este modelo la presencia de hiperfosforilación Tau, neurodegeneración hipocampal y alteraciones cognitivas a nivel de la memoria espacial y un comportamiento de tipo-ansioso (Beauquis et al., 2014; Fu, Rusznak, Kwok, Kim, & Paxinos, 2014; Simon et al., 2009). Otros hallazgos descritos en esta Tesis y asociadas a la EA son los signos morfológicos y tisulares de activación microglial y astrogial, alteraciones en el proceso de autofagia y compromiso de la vasculatura cerebral.

Por lo tanto, los ratones PDAPP-J20 presentan durante su proceso patológico la gran mayoría de las alteraciones que se utilizan en seres humanos para describir la patología, e incluso para su diagnóstico. Sin embargo entre las limitaciones del modelo

pueden enumerarse algunas discrepancias en el orden y la cinética de instalación de los eventos patológicos, que deben ser tenidos en cuenta a la hora de realizar extrapolaciones.

2. Activación glial y neuroinflamación

En los Capítulos 3 y 4 de esta Tesis se describen alteraciones microgliales y astrogliales progresivas en el hipocampo del ratón PDAPP-J20 que son características del proceso de activación glial durante la respuesta neuroinflamatoria. La capacidad de estas células de activarse frente a la estimulación con fibrillas amiloides en condiciones *in vitro* o por la presencia de placas amiloides en modelos animales ha sido ampliamente reportada (Gonzalez-Reyes, Nava-Mesa, Vargas-Sanchez, Ariza-Salamanca, & Mora-Munoz, 2017; Navarro et al., 2018). Sin embargo, esta tesis realiza un aporte considerable al detectar signos incipientes de activación en ambos tipos celulares antes de la presencia de placas amiloides. Desde etapas tempranas las células microgliales exhiben un mayor tamaño de soma y una pérdida de la regularidad en su distribución espacial. Las células astrogliales, por su parte, presentan una menor complejidad morfológica para su citoesqueleto GFAP y una menor densidad en el hipocampo comparado con ratones NTg. Todo esto sugiere fuertemente una implicancia temprana de la glía en la patología.

Estos eventos ponen en relevancia que el proceso de neuroinflamación en el ratón PDAPP-J20 no se inicia a partir de la presencia de placas amiloides, sino que se instala desde etapas previas y se va desarrollando de manera gradual, probablemente como consecuencia de la patología amiloide que el mismo contexto neuroinflamatorio contribuye a instalar.

Lo dicho anteriormente permite inferir que la microglía no solo responde a la presencia de péptidos A β desde que estos se encuentran a concentraciones bajas y en estado soluble, sino que además el mismo proceso de activación microglial puede contribuir a la instalación de la patología amiloide. En este sentido, un artículo publicado por Baik y colaboradores demuestra empleando microscopía de 2 fotones que la microglía activada puede estar involucrada en la generación de nuevas placas amiloides, participando activamente del proceso de amiloidosis (Baik, Kang, Son, & Mook-Jung, 2016). Esto ocurriría a través de la internalización de péptidos A β y posterior

disfunción y muerte de la célula, luego de lo cual liberaría su contenido al medio extracelular, sirviendo como centro de nucleación para otros péptidos A β .

Indicios de activación microglial también han sido detectados en pacientes que presentan EA en etapas tempranas. Hace unos años, Sudduth y colaboradores midieron una serie de genes involucrados en la respuesta inmune en el cerebro *post-mortem* de pacientes con diagnóstico de EA temprana y avanzada (Sudduth, Schmitt, Nelson, & Wilcock, 2013). En su análisis identificaron que más allá de la heterogeneidad esperada, los genes relacionados con la respuesta pro-inflamatoria están mayormente expresados en etapas tempranas de la patología, y afecta a la corteza cerebral pero no al cerebelo.

Más recientemente, un artículo publicado por Janelidze y colaboradores demuestra a partir de un estudio longitudinal que la presencia de moléculas involucradas en el proceso inflamatorio (como I-CAM, V-CAM y varias interleuquinas) se encuentran aumentadas en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con deterioro cognitivo leve que luego evolucionarán a demencia de tipo Alzheimer (Janelidze et al., 2018). Más aún, estos marcadores mostraron una correlación positiva con los niveles de Tau fosforilado en líquido cefalorraquídeo, un indicador de la presencia de patología Tau.

La hipótesis de que la neuroinflamación podría ser un actor central y temprano en el proceso patológico de la EA abre toda una serie de posibles intervenciones a poner a prueba. Recientemente, el bloqueo del *checkpoint* mediado por PD-1 ha sido evaluado en modelos murinos de EA, con resultados promisorios (Baruch et al., 2016). Sin embargo, la relación entre el proceso inmune cerebral y la patogénesis de la EA es muy compleja, siendo el proceso neuroinflamatorio al mismo tiempo benéfico y perjudicial para algunas funciones del SNC, dependiendo del contexto (Du, Wang, & Geng, 2018). Por esta razón, es necesario profundizar acerca de los mecanismos que puedan estar involucrados de manera específica en la activación glial dentro del contexto de la EA.

Siguiendo con la línea de razonamiento anterior, el receptor microglial TREM2 ha sido vinculado al desarrollo de la EA a través del análisis de genomas a gran escala (Keren-Shaul et al., 2017). Los mecanismos que vinculan a TREM2 con procesos neurodegenerativos han sido ampliamente estudiados y vinculan a este receptor con la capacidad fagocítica microglial. Algunos autores sostienen que en ratones que modelizan la EA familiar y en pacientes existe un aumento de la reactividad para TREM2 en la microglía asociada a placas amiloides (Frank et al., 2008; Lue et al., 2015; Y. Wang et al., 2015). En este mismo sentido, modelos murinos de EA

deficientes en TREM2 presentan un menor número de células microgliales asociadas a placas amiloides, de manera dependiente a la dosis génica en la que se encuentra presente el alelo funcional (Jay et al., 2015; Y. Wang et al., 2015). Sin embargo, no existen aún suficientes evidencias que permitan demostrar que TREM2 podría jugar algún rol en etapas tempranas de la patología, y que podría por lo tanto estar involucrado en alguna de las alteraciones que se reportan en esta Tesis. Serán necesarios nuevos experimentos para evaluar si la pérdida de la distribución regular o el aumento del tamaño del soma que se observa en la microglía del hipocampo de ratones PDAPP-J20 son dependientes de la señalización del receptor TREM2.

En esta Tesis además se describen alteraciones en astrocitos en etapas previas a la deposición de placas amiloides. La ausencia de placas sugeriría que estos efectos sobre células astrogiales pueden deberse a la presencia de oligómeros solubles de A β . Sin embargo, a diferencia de lo que se discutió para la microglía en el Capítulo 3, existe menor cantidad de evidencia acerca del efecto de péptidos amiloides solubles sobre la activación astrogial. Uno de los pocos trabajos que abordan esta posibilidad fue publicado en el año 2005 y evalúa comparativamente el efecto A β 1-42 en su forma fibrilar y soluble sobre la activación astrogial *in vitro* (White, Manelli, Holmberg, Van Eldik, & Ladu, 2005). Los resultados presentados en dicho trabajo demuestran que si bien los oligómeros solubles son capaces de inducir la síntesis y liberación de IL-1 β , NO y TNF- α (todas ellas moléculas pro-inflamatorias), esto ocurre de manera aguda, con un aumento pronunciado en tiempos cortos de exposición y una posterior disminución hasta los niveles basales. Las fibrillas de A β 1-42, en cambio, producen una respuesta sostenida en el tiempo. Estos resultados permiten hipotetizar que los astrocitos aportarían a la respuesta inflamatoria crónica por la presencia sostenida del A β fibrilar o la cercanía a placas amiloides.

3. Rol de la autofagia glial

La autofagia es reconocida como uno de los mecanismos involucrados en el depurado de A β dentro del cerebro. A pesar de ello, su rol en el proceso patológico de la EA es controversial. Por un lado, estímulos que producen un aumento del flujo autofágico - como la administración de rapamicina o la restricción dietaria- han tenido efectos positivos en modelos animales. Sin embargo, la gran mayoría de estos estudios se

han enfocado en la autofagia neuronal como mecanismo de *clearance* de A β , a pesar de que la mayoría de las intervenciones podrían potencialmente actuar sobre todos los tipos celulares.

En esta Tesis se muestra evidencia de que existe un aumento en marcadores autofágicos tanto en células de la microglía como en astrocitos en el contexto de la patología. Esta observación ha sido validada en la cercanía de placas amiloides del hipocampo del ratón PDAPP-J20, y en condiciones *in vitro* por exposición a A β 1-42 fibrilar. Para el caso de las células astrogliales, los resultados aquí mostrados se cuentan entre los primeros en reportar que la autofagia glial es un proceso que se regula en el contexto de la EA. Sin embargo, el significado de este fenómeno en la progresión de las alteraciones patológicas queda aún por ser determinado.

En cuanto a las células microgliales, se ha acumulado evidencia indirecta que sugiere que la autofagia se encuentra impedida en aquellas células que se localizan cercanas a placas amiloides en ratones PDAPP-J20. La capacidad del A β 1-42 fibrilar de producir este efecto ha sido corroborado *in vitro* mediante la exposición de esta especie a células microgliales BV-2 en cultivo. Llamativamente, los efectos deletéreos sobre la autofagia se observan luego de una exposición prolongada, y no tras una corta exposición (2 hs). Esta diferencia en el efecto del A β 1-42 dependiendo del tiempo de exposición permitiría proponer que, una vez instalada la patología, la autofagia microglial dejaría de participar del depurado de A β y favorecería por lo tanto la formación de placas amiloides.

El rol patológico de estas células estaría además caracterizado por su capacidad de producir una respuesta pro-inflamatoria. Como se discutió en el Capítulo 3 de esta Tesis, existe una compleja interacción entre la presencia de agregados proteicos, el mecanismo de inducción de la autofagia y la regulación de la síntesis y liberación de citoquinas. En el centro de este mecanismo de regulación de múltiples procesos se encuentran los inflamasomas, siendo los más estudiados aquellos constituidos por NLRP3 que participan de la síntesis de IL-1 β , citoquina que promueve el estatus inflamatorio (Shibutani et al., 2015).

El rol de los inflamasomas en el contexto de la EA es un tópico abordado en los últimos años en la bibliografía. Se ha demostrado que la falta de expresión de NLRP3 en ratones APP/PS1 favorece la adquisición de un fenotipo M2 por parte de células microgliales y previene el déficit cognitivo (Heneka et al., 2015). Por otro lado, recientemente se ha vinculado la activación de los inflamasomas con la instalación de la patología amiloide. En presencia de placas amiloides, la microglía genera cúmulos

del dímero proteico ASC -que participa del complejo multiproteico del inflamasoma-, necesarios para el aumento del tamaño de las placas. Esto ha sido demostrado por Venegas y colaboradores, quienes han reportado que la administración intrahipocampal de anticuerpo anti-ASC detiene la formación de placas amiloides en animales APP/PS1. Más aún, la administración de homogenato de cerebro de ratones APP/PS1 en el hipocampo de ratones de la misma cepa acelera la formación de placas, lo cual se previene si se impide la expresión de ASC (Venegas et al., 2017).

En otro artículo reciente, You y colaboradores sugieren que esta interacción entre autofagia y neuroinflamación podría ser un punto clave para regular al mismo tiempo el *clearance* de A β y controlar el daño por moléculas pro-inflamatorias. Los autores, empleando cultivo de células BV-2 y de microglía primaria, demuestran que un inhibidor específico de la fosfodiesterasa-4 (involucrado en la respuesta neuroinflamatoria), produce una disminución de la síntesis y liberación de IL-1 β ante la exposición a péptidos amiloides, a la vez que induce el mecanismo de autofagia. En esta línea, el efecto antiinflamatorio del inhibidor depende del correcto funcionamiento de la autofagia, ya que al ser bloqueada farmacológicamente se inhiben los efectos protectores asociados a esta vía (You et al., 2017).

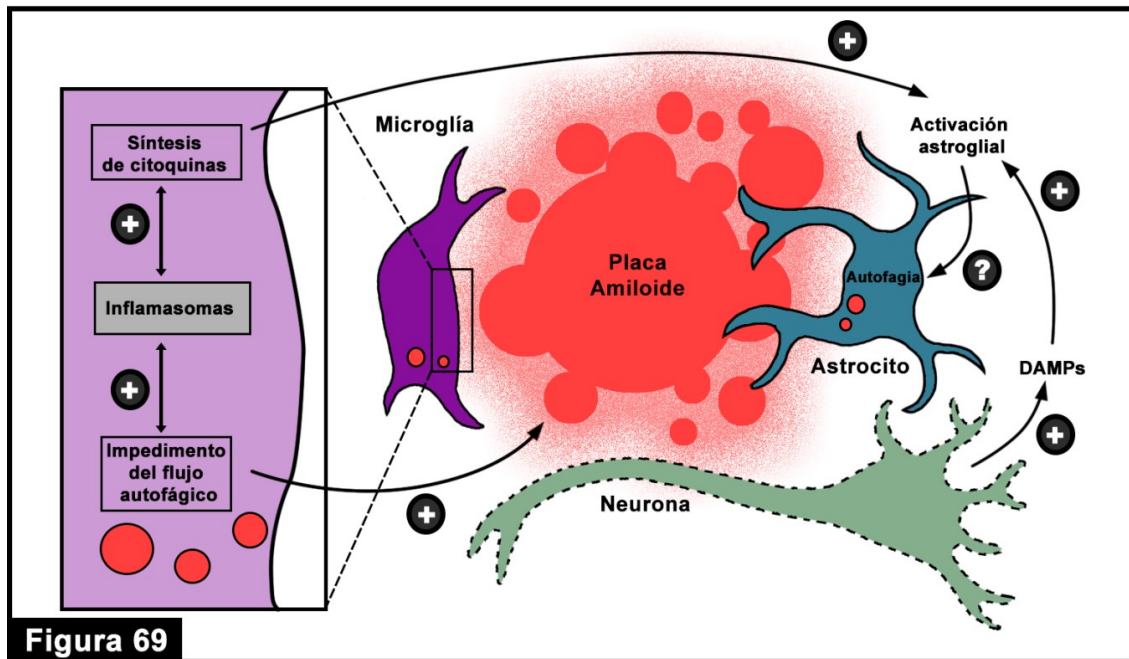
En astrocitos, sin embargo, no está claro que exista el mismo tipo de mecanismos en el contexto de la EA. Gustin y colaboradores, empleando cultivos primarios de astrocitos y organotípicos, demostraron que en presencia de estímulos proinflamatorios los astrocitos no expresan NLRP3 ni otros componentes del inflamasoma, a diferencia de células microgliales (Gustin et al., 2015). En contraposición, Zhu y colaboradores sostienen que estos complejos juegan un rol importante en el proceso neuroinflamatorio mediado por los astrocitos en un modelo murino de la enfermedad de Parkinson y cultivos primarios astrogiales (Zhu et al., 2018). Además, Johann y colaboradores han detectado expresión de NLRP3 en astrocitos de médula espinal en un modelo murino de esclerosis lateral amiotrófica y en muestras obtenidas de pacientes *post-mortem* de esta enfermedad (Johann et al., 2015). Sin embargo, no se han encontrado al día de hoy reportes acerca del posible rol de los inflamasomas de origen astrogial en el cerebro, dentro del contexto de la EA.

Uno de los tópicos donde la alteración de la autofagia astrogial ha sido estudiada por su potencial rol patológico es en la deficiencia múltiple de sulfatasas, una patología debida a disfunción lisosomal. Empleando ratones con mutaciones que modelizan esta patología, Di Palma y colaboradores demostraron que la autofagia astrogial se encuentra impedida, y que esta condición afecta a las capacidades neurotróficas de

los astrocitos (C. Di Malta, J.D. Fryer, C. Settembre, & A. Ballabio, 2012; C. Di Malta, J. D. Fryer, C. Settembre, & A. Ballabio, 2012).

Por otro lado, de acuerdo a los resultados presentados en el Capítulo 5, la autofagia endotelial se induce a concentraciones de A β 1-42 10 veces mayores a las necesarias para evidenciar acumulación de LC3 en células gliales, y este mecanismo estaría asociado a una menor viabilidad de las células. Esto sugiere que, de encontrarse afectado este proceso en células endoteliales, el mismo ocurriría en etapas muy avanzadas de la patología. Sin embargo, no se puede descartar que concentraciones menores de A β 1-42 e incluso de A β 1-40 produzcan alteraciones dependientes de mTOR que no necesariamente se reflejen en un aumento o disminución del flujo autofágico neto.

A partir del aporte realizado por esta Tesis y de los antecedentes aquí mencionados se constituye un modelo que podría actuar como fuente de nuevas hipótesis a ser corroboradas en futuras líneas de investigación. Este modelo se encuentra representado de manera esquemática en la Figura 69. El mismo muestra una célula astrogliar y una microglial hipertrofiadas en la cercanía a una placa amiloide, en etapas avanzadas de la EA. En la microglía, la activación progresiva hacia un perfil pro-inflamatorio y el impedimento en el flujo autofágico son eventos que se sostendrían a través de la mutua regulación, mediada por los inflammasomas del tipo NLRP3. Al verse impedido el *clearance* de A β a través de la autofagia microglial, se facilita la deposición de estos péptidos y por lo tanto la permanencia del estímulo pro-inflamatorio. De esta manera, la microglía entra en un contexto regulatorio que se retroalimenta a sí mismo y potencia aún más el origen del daño. Por otro lado, el contexto tóxico dado por la presencia de A β , de DAMPs (de origen astrogliar, microglial o neuronal) y de las citoquinas proinflamatorias liberadas por las células microgliales recluta a los astrocitos hacia un perfil de activación crónico que, a largo plazo, afectaría a sus funciones homeostáticas y neurotróficas. La autofagia astrogliar podría constituir una de esas funciones protectoras que, al igual que la autofagia microglial pero probablemente a través de un mecanismo independiente de NLRP3, se encuentra afectada en el contexto de la EA.



▲ **Modelo hipotético de interacción entre la autofagia y la activación glial en etapas avanzadas del proceso patológico del ratón PDAPP-J20.** En el esquema se representan una célula de la microglía activada (violeta), un astrocito activado (celeste) y una neurona en degeneración (verde) en la cercanía a una placa amiloide (rojo). A la izquierda se muestra con mayor detalle los eventos que ocurren en el interior de la célula microglial. Las flechas representan interacciones entre los tipos celulares, donde los signos “+” indican potenciación del proceso señalado. El signo de pregunta indica una posible relación entre la activación astrogliótica y la autofagia en este tipo celular.

De este modelo se desprenden múltiples hipótesis que deben ser abordadas en futuros trabajos. En cualquier caso, los resultados aquí expuestos y el modelo planteado permiten poner en relevancia a las células microgliales y a los astrocitos por su posible rol en el proceso patogénico de la EA. De esta manera, se proyectan como blancos de estrategias terapéuticas orientadas a normalizar el flujo autofágico, revertir las condiciones pro-inflamatorias o al menos desacoplar estos mecanismos.

4. Alteraciones vasculares en la enfermedad de Alzheimer

En los últimos años, la vasculatura cerebral y sus células asociadas han cobrado especial protagonismo en el estudio de la patogénesis de la EA. Algunos autores colocan a las células endoteliales y su capacidad de intervenir en el *clearance* de A β como uno de los primeros elementos en ser alterados durante la instalación de la EA

esporádica (Kisler et al., 2017; Sweeney et al., 2018; B.V. Zlokovic, 2008). Si bien es difícil abordar esta hipótesis empleando modelos animales basados en la expresión de APP humana mutada, el empleo de este tipo de modelos ha permitido describir que la acumulación de A β en el parénquima cerebral y en las zonas perivasculares producen una serie de alteraciones vasculares que podrían ser parte del contexto de daño de la EA.

En esta Tesis se han reportado alteraciones vasculares cerebrales tempranas, como la disminución de los niveles de la inmunoreactividad de la proteína de unión estrecha Ocludina en el hipocampo del ratón PDAPP-J20, que sugeriría un compromiso incipiente de la BHE. Estas alteraciones podrían ser explicadas a partir de la presencia de oligómeros solubles, ya que no se detectan placas amiloides a esta edad. Ensayos *in vitro* demostraron además que los oligómeros solubles de A β 1-40 son capaces de producir la activación endotelial tras una exposición breve. A edades avanzadas –en presencia de abundante A β fibrilar– el deterioro vascular se acelera, con evidentes signos de ruptura de la BHE, anomalías en la pared vascular y atrofia de la vasculatura hipocampal, como se describió en esta Tesis empleando el ratón PDPAPP-J20.

Estos resultados sugieren que la vasculatura cerebral se encuentra alterada como parte del proceso patológico de la EA. El enfoque neurovascular sobre esta patología es relativamente novedoso, si se tiene en cuenta que hace unos años el estudio de la vasculatura cerebral en condiciones patológicas estaba prácticamente restringido a la demencia vascular. La demencia vascular y la demencia por EA se ubicaban en dos extremos patológicos que a lo largo de los últimos años se han acercado, contemplando que, más allá de la etiología de cada enfermedad, en ambos casos todos los componentes de la UNV se encuentran comprometidos (Rizzi, Rosset, & Roriz-Cruz, 2014; Vijayan et al., 1991).

Por lo tanto, es posible proponer estrategias que tengan por objetivo proteger la integridad vascular, sin ir en detrimento de las estrategias que apuntan a controlar la neuroinflamación o a disminuir los niveles de A β . Una observación interesante en este sentido surge de los numerosos esfuerzos realizados en las últimas décadas por validar el uso de anticuerpos anti-A β como inmunoterapia pasiva para disminuir la carga de depósitos amiloides y la toxicidad asociada a estos (Graham et al., 2017). La evidencia acumulada en modelos animales y en ensayos clínicos sugiere que en muchos casos este tipo de estrategias es efectiva en disminuir el número de placas amiloides pero exacerba la angiopatía cerebral amiloide, favoreciendo la formación de

edemas y el daño vascular (Boche et al., 2008; B. Liu et al., 2009; Mo et al., 2017). Este tipo de antecedentes sugiere la posibilidad de combinar tratamientos que disminuyan los agregados de A β con aquellos orientados a proteger la integridad vascular.

En este sentido y a partir de los resultados presentados en esta Tesis surge que el receptor RAGE juega un rol importante en la activación de células endoteliales inducida directamente o indirectamente por péptidos A β . Los ensayos *in vitro* empleando células HBMEC sugieren que estas células de microvasculatura cerebral humana pueden activarse de manera directa por A β 1-40 e indirectamente por A β 1-42, mediado por factores astrocitarios. En ambos casos la translocación nuclear de NF κ B dependió de la disponibilidad del receptor RAGE en la membrana plasmática de células endoteliales. Por lo tanto, el bloqueo de la activación del receptor RAGE surge como una propuesta interesante orientada a evitar la activación endotelial (y consecuente ruptura de la BHE). Dado que RAGE también participa de la activación de células microgliales y astrocitos (Choi et al., 2014; Doens & Fernandez, 2014; Fang et al., 2010; Gonzalez-Reyes et al., 2017), este tipo de estrategias permitiría al mismo tiempo controlar el proceso neuroinflamatorio.

En modelos experimentales se ha probado el efecto de dos inhibidores de RAGE: TTP488 y FPS-ZM1. En un modelo murino de EA, la administración de TTP488 redujo la deposición de A β y este tratamiento se asoció a una mejora cognitiva (Walker, Lue, Paul, Patel, & Sabbagh, 2015). La droga TTP488 ha sido empleada en ensayos clínicos bajo el nombre comercial de Azeliragon, la cual se administra por vía oral y atraviesa la BHE. En ensayos clínicos de Fase II, las dosis más altas de la droga generaron una aceleración del deterioro cognitivo, por lo que debió ser discontinuado (Sabbagh et al., 2011). Actualmente se encuentra en desarrollo un ensayo clínico de Fase III empleando las dosis más bajas evaluadas durante la Fase II (Panza et al., 2016). FPS-ZM1, por su parte, produce en modelos experimentales de EA familiar una restauración en el equilibrio en el transporte de A β a través de la BHE, disminuye los niveles de Presenilina-1 y marcadores de activación hacia un fenotipo pro-inflamatorio en células microgliales (Carnevale et al., 2012; Deane et al., 2012).

Como se desprende de este antecedente y de otros mencionados en capítulos anteriores, RAGE presenta un rol ambiguo en el contexto patológico de la EA y otras condiciones patológicas que afectan al SNC. En algunos casos, la inhibición total de la señalización de este receptor podría traer consecuencias más drásticas que su activación. Por tal razón, el esfuerzo debería orientarse a determinar el intervalo

adecuado de dosis dentro del cual los inhibidores de RAGE puedan promover funciones terapéuticas.

La expresión de RAGE en los múltiples tipos celulares que constituyen la UNV y su asociación a diferentes vías de señalización y efectos biológicos lo convierten en un blanco interesante para el diseño de estrategias terapéuticas pero también muestra un cariz problemático. Desde la investigación básica, es necesario profundizar los esfuerzos por comprender en detalle las implicancias de la activación de este receptor en diferentes tipos celulares. De esta manera, la intervención en un tipo celular específico podría ser más relevante a la hora de plantear objetivos con un fin translacional. Empleando este tipo de enfoques, recientemente se ha reportado el uso de nanopartículas que son específicamente captadas por astrocitos reactivos en el contexto del proceso neuroinflamatorio que se dispara luego de un accidente cerebrovascular (Murta, Schilrreff, Rosciszewski, Morilla, & Ramos, 2018).

Como se dijo en el Capítulo 1 de esta Tesis, la EA es una enfermedad multifactorial, e incluso el nivel de complejidad de la interacción entre los eventos patológicos puede ser mucho más elevado en humanos de lo que se observa en modelos murinos. Por tal razón, es poco probable que una aproximación terapéutica evaluada desde un único evento patológico y ensayada en modelos experimentales altamente homogéneos en la expresión de la patología pueda luego ser aplicada con éxito en pacientes. Esta Tesis pone de manifiesto que aún en un modelo que está diseñado para desarrollar la patología amiloide, ocurre toda una serie de cambios que involucran a células gliales y vasculares, comprometiéndolas en sus funciones aún desde etapas tempranas. Es necesario, por lo tanto, enfatizar la relevancia del enfoque multifactorial a la hora de evaluar el potencial de futuros tratamientos, desarrollar nuevos modelos experimentales y de profundizar el conocimiento que se tiene actualmente sobre todos los eventos patológicos que se desarrollan en el contexto de la EA.

Cap. 8

Materiales y Métodos

1. Experimentos *in vivo*

Ratones PDAPP-J20.

En esta Tesis se empleó la cepa de ratones PDAPP-J20. Hemos constituido una colonia en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (CONICET) gracias al aporte de la doctora Verónica galván, del *Buck Institute* (California, Estados Unidos). Con el objetivo de estudiar la progresión del proceso patológico, se emplearon 3 rangos de diferentes edades: 3 meses (2-3 meses), 5 meses (4-5 meses), 9 meses (8-9 meses) y 15 meses (15-16 meses). Los ratones PDAPP-J20 portan en heterocigosis un transgén que les permite expresar la proteína APP humana con las mutaciones *Swedish* (K670N/M671L) e *Indiana* (V717F) bajo el control del promotor de la cadena β del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF β). La cepa es mantenida mediante cruzamiento con ratones C57BL/6. En todos los experimentos en que se emplearon ratones transgénicos (Tg), se utilizaron sus hermanos no transgénicos (NTg) como control. Los ratones se mantuvieron en *racks* ventilados bajo condiciones controladas de temperatura (22°C) y humedad (50%) con ciclos de luz/oscuridad de 12h/12h. Para la identificación del genotipo de cada animal, en el momento del destete se extrajo ADN (Viagen) a partir de un pequeño trozo de la cola y se realizó una PCR usando primers específicos para el transgen humano.

Obtención de cortes histológicos.

Los animales fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de ketamina (80 mg/kg BW; Holliday-Scott, Argentina) y xilacina (10 mg/kg BW; Bayer, Argentina). Luego de comprobar la ausencia de reflejos fueron perfundidos transcardíacamente con 20 ml de solución fisiológica seguidos de 20 ml de fijador (paraformaldehído 4%) en buffer fosfato salino (PBS: 0,1 M, pH 7,4). Los cerebros fueron removidos del cráneo, seccionados ambos hemisferios y fijados a 4°C durante una noche. Luego el tejido fue cortado coronalmente con vibrátomo en secciones de 60 μ m de espesor (Vibratome 1000P). Los cortes resultantes se guardaron a -20°C en una placa de 48 pocillos embebidos en solución crioprotectora (25% glicerol, 25% etilenglicol, 50% buffer fosfato 0,1 M, pH 7,4) hasta su uso, de forma tal que en cada pocillo hubiere 6 cortes equidistantes a lo largo del eje dorsal-ventral, representativos de la totalidad del hipocampo.

Para la detección de Ocludina, los ratones fueron rápidamente decapitados, y el cerebro congelado en hielo seco durante 20 minutos. El material extraído fue utilizado para realizar cortes de 10 μ m de espesor empleando criostato (Thermo).

Tinción con Rojo Congo.

Se incubaron secciones coronales de cerebro conteniendo hipocampo en el modo *free floating* con una solución de Rojo Congo 0,2%, cloruro de sodio 3% e hidróxido de sodio 0,01% en etanol 80% (Biopack). Los cortes fueron colocados en portaobjetos pre-tratados con gelatina, dejados a secar durante una noche, deshidratados en etanol, aclarados en xileno y finalmente montados con bálsamo de Canadá.

Inmunofluorescencia.

Se realizó inmunofluorescencia empleando 6 cortes representativos de toda la extensión del hipocampo por animal en modo *free floating*. Se utilizó el protocolo general que se indica a continuación, con las modificaciones particulares que se mencionan más abajo para cada caso.

Los cortes fueron colocados en una placa de 24 pocillos donde se lavaron con PBS para remover la solución crioprotectora. La recuperación de antígeno se realizó por incubación con buffer citrato 10 mM (pH=6) durante 40 min a 85 °C. Luego, se realizó la incubación con solución de bloqueo conteniendo suero de cabra 3% en PBS-Tritón X-100 0,1% durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se dejó incubando a los cortes durante una noche a 4°C en solución de incubación (PBS-Tritón 0,1% más 1% del suero utilizado en bloqueo) conteniendo el o los anticuerpos que correspondan. Luego de realizarse lavados, se incubó durante 1 h con solución de bloqueo anticuerpo anti-IgG de la especie que corresponda acoplados a los fluoróforos Alexa 555 o Alexa 488 (Invitrogen). Finalmente se lavaron los cortes, se colocaron en portaobjetos pre-tratados con gelatina y se montó con alcohol polivinílico con DABCO (Sigma). Ocasionalmente, previo al lavado los cortes histológicos recibieron un tratamiento con DAPI para visualizar los núcleos.

Detección doble de Iba1 y p62. Se utilizó una combinación de anticuerpos primarios anti-Iba1 (WAKO, 1:1500, hecho en conejo) y p62 (1:500, Progen, hecho en ratón), con sus respectivos anticuerpos secundarios.

Detección de GFAP y p62. Se utilizó una combinación de anticuerpos primarios anti-GFAP (Sigma, 1:400, hecho en conejo) y p62 (1:500, Progen, hecho en ratón) con sus respectivos anticuerpos secundarios.

Detección de Iba1 y Ubiquitina. Se utilizó una combinación de anticuerpos primarios anti-Iba1 (WAKO, 1:1500, hecho en conejo) y Ubiquitina (1:1000, Chemicon, hecho en ratón), con sus respectivos anticuerpos secundarios.

Detección de Iba1 y A β . Se omitió el paso de recuperación de antígeno. Se utilizó una combinación de anticuerpos primarios anti-Iba1 (WAKO, 1:1500, hecho en conejo) y 4G8 (Invitrogen, 1:1000, hecho en ratón), con sus respectivos anticuerpos secundarios.

Detección de Iba1 y CD68. Se omitió el paso de recuperación de antígeno. Se utilizó una combinación de anticuerpos primarios anti-Iba1 (WAKO, 1:1500, hecho en conejo) y CD68 (1:1000, Sigma, hecho en ratón), con sus respectivos anticuerpos secundarios.

Detección de GFAP y A β . Se omitió el paso de recuperación de antígeno. Se utilizó una combinación de anticuerpos primarios anti-GFAP (Sigma, 1:400, hecho en conejo) y 4G8 (Sigma, 1:1000, hecho en ratón), con sus respectivos anticuerpos secundarios.

Detección de GFAP y S100B. Se omitió el paso de recuperación de antígeno. Se utilizó una combinación de anticuerpos primarios anti-GFAP (Sigma, 1:400, hecho en conejo) y anti-S100B (1:1000, Sigma, hecho en ratón). Se utilizaron anticuerpos secundarios anti-conejo y anti-ratón (Invitrogen).

Detección de GFAP y LC3. Se utilizó una combinación de anticuerpos primarios anti-GFAP (1:1000, Sigma, hecho en ratón) y anti-LC3 (Novus, 1:700, hecho en conejo). Se utilizaron anticuerpos secundarios anti-conejo y anti-ratón (Invitrogen).

Detección de GFAP y tinción con lectina fluorescente. Se omitió el paso de recuperación de antígeno. Se utilizó como anticuerpos primario anti-GFAP (Sigma, 1:500, hecho en conejo), como se indicó anteriormente. El protocolo fue acoplado a una tinción con lectina agregando a la solución de anticuerpo primario lectina de *Lycopersicum esculentum* acoplada a fluoresceína (Vector) a una concentración 1:400. Luego se procedió normalmente con el protocolo de inmunofluorescencia.

Detección de LC3 y tinción con lectina fluorescente. Se utilizó como anticuerpos primario anti-LC3 (Novus, 1:700, hecho en conejo), como se indicó anteriormente. El protocolo fue acoplado a una tinción con lectina agregando a la solución de anticuerpo primario lectina de *Lycopersicum esculentum* acoplada a fluoresceína (Vector) a una concentración 1:400. Luego se procedió normalmente con el protocolo de inmunofluorescencia.

Detección de A β y tinción con lectina fluorescente. Se omitió el paso de recuperación de antígeno. Se utilizó como anticuerpos primario 4G8 (Sigma, 1:1000, hecho en ratón), como se indicó anteriormente. El protocolo fue acoplado a una tinción con lectina agregando a la solución de anticuerpo primario lectina de *Lycopersicum esculentum* acoplada a fluoresceína (Vector) a una concentración 1:400. Luego se procedió normalmente con el protocolo de inmunofluorescencia.

Inmunohistoquímica.

Se realizó inmunohistoquímica empleando 6 cortes representativos de toda la extensión del hipocampo por animal en modo *free floating*. Se utilizó el protocolo general que se indica a continuación, con las modificaciones particulares que se mencionan más abajo para cada caso.

Los cortes fueron colocados en una placa de 24 pocillos donde se lavaron con PBS para remover la solución crioprotectora. La peroxidasa endógena fue inhibida incubando 10 min con una solución 50:50:1 metanol:PBS:H₂O₂. Luego se bloquearon los sitios inespecíficos a temperatura ambiente con suero de cabra 10% en PBS-Tritón 0,1% durante 30 min. Posteriormente, se incubó durante una noche en solución de incubación (PBS-Tritón 0,1% más 1% del suero utilizado en bloqueo) conteniendo el anticuerpo primario que corresponda. Luego, se lavó y se incubó 60 min con anticuerpo anti-IgG de la especie correspondiente. Para la amplificación de la señal se incubó 30 min con el Kit ABC (Vector Laboratories) y luego de lavados se incubó un tiempo variable en una solución de diaminobencidina 2 mM (Sigma, USA) y 0,5 mM H₂O₂ en Buffer Tris 0,1 M a temperatura ambiente para el revelado. A continuación los cortes se pusieron en portaobjetos tratados con gelatina y se dejaron secar toda la noche, luego fueron deshidratados en soluciones crecientes de alcohol, aclarados en xileno y montados con bálsamo de Canadá.

Detección de Iba1 acoplado a tinción con rojo congo. Se utilizó un anticuerpo primario anti-Iba1 (Wako, 1:1500, hecho en conejo), y el correspondiente secundario anti-conejo biotinilado (1:500 Vector). Al finalizar el revelado, se realizó la tinción con Rojo Congo como se indica en el apartado correspondiente de este mismo Capítulo.

Detección de Ocludina. El protocolo se realizó sobre cortes congelados colocados en portaobjetos. Se utilizó un anticuerpo primario anti-Ocludina (1:500, Invitrogen), y un anticuerpo secundario anti-conejo biotinilado (1:500, Vector).

Detección de Acuaporina-4 y eNOS. Se utilizó un anticuerpo primario anti-Acuaporina-4 (Santa Cruz, 1:100, hecho en conejo) o anti-eNOS (Santa Cruz, 1:100, hecho en conejo), con sus correspondientes anticuerpos anti-conejo.

Preparación de muestras para microscopía electrónica.

Los ratones fueron antestesiados como se indicó anteriormente y perfundidos con una solución 2% de glutaraldehído 2% en buffer fosfato (pH=7,4). Luego de la eutanasia, secciones de cerebro de 1 mm³ conteniendo hipocampo fueron incubados durante 4 hs con la misma solución de fijación a 4°C y luego lavados con buffer fosfato. Las muestras fueron postfijadas en una solución 1% de tetróxido de osmio durante 1 h a 4°C, lavadas y luego incubadas durante 2 hs en una solución 2% de acetato de uranilo. Luego de la deshidratación, las muestras fueron embebidas en Durcupan. Se analizaron inicialmente cortes finos (0,5 µm de espesor) al microscopio óptico con el propósito de seleccionar áreas de interés. Luego, se realizaron cortes ultrafinos (0,09 µm de espesor), se montaron en grillas y fueron teñidos con acetato de uranilo antes de la observación en un microscopio electrónico Zeiss 109.

Cuantificaciones y análisis histológicos.

Todas las imágenes de microscopía óptica fueron tomadas utilizando un microscopio Nikon Eclipse E200. Las imágenes de fluorescencia fueron tomadas usando un microscopio Nikon Eclipse E80, o un microscopio Olympus TIRF DSU IX83. Este último equipo se utilizó también para obtener imágenes de microscopía confocal. Todas las cuantificaciones que se indican a continuación se realizaron de manera ciega al genotipo y edad de cada animal.

Cuantificaciones del Capítulo 3

Área ocupada por placas amiloides. A partir de cortes teñidos con solución de Rojo Congo, se tomaron imágenes a 40x en microscopio óptico. Las imágenes obtenidas fueron procesadas con el programa Optimas (Media Cybernetics), con el que se midió el área total positiva para la tinción luego de definir un umbral para la marca positiva de rojo congo, en *stratum radiatum* y el hilio del giro dentado. Se promedió el porcentaje de la región ocupada por placas amiloides en los distintos cortes de un mismo animal.

Area Iba1+. Se determinó el area inmunoreactiva sobre imágenes de inmunohistoquímica para Iba1 obtenidas en el area del hilio del hipocampo con una magnificación de 100x utilizando el software Optimas (Media Cybernetics). Este parámetro se estimó como el porcentaje del campo que es positivo para Iba1, empleando un umbral de detección constante en las sucesivas imágenes.

Densidad de células Iba1+. La densidad de células Iba1+ fue estimada localizando aleatoriamente marcos de conteo de $6.10^5 \mu\text{m}^3$ en cada campo obtenido a partir de cada corte. En todos los casos se contaron al menos 100 células por animal.

Área del soma de células Iba1+. Se estimó el tamaño del soma como una medida indirecta de la activación microglial. Para ello, se tomaron imágenes aleatorias en el hilio del hipocampo sobre cortes histológicos procesados para inmunohistoquímica contra Iba1. De estas imágenes se seleccionaron aleatoriamente células individuales que se encuentren en foco sobre el plano del diámetro mayor de dichas células. Empleando el software ImageJ (NIH), se delineó el soma celular y se calculó la superficie de la misma. Para estimar un valor representativo se cuantificaron al menos 50 células por animal.

Índice de regularidad en células Iba1+. La distribución de células Iba1+ fue estimada empleando el parámetro de la distancia al vecino más cercado. Para ello se utilizó un umbral definido para las condiciones en que se tomaron las imágenes de manera tal que solo sean visibles los somas de las células marcadas. Empleando un *plugin* del software ImageJ (Plugin Nnd, Yuxiong Mao) se midió la distancia al vecino más cercano de cada célula. Luego, como parámetro de homogeneidad en la distribución, se determina un índice de regularidad definido como la relación entre la media de las distancias calculadas previamente y el desvío estándar de las mismas. Este parámetro se estimó

independientemente para cada corte, en al menos 6 cortes por animal que abarcan toda la extensión del hipocampo. Luego se promediaron los valores por corte para obtener una medida representativa de todo el hipocampo.

Índice de activación morfológica de células Iba1+. A partir de las imágenes obtenidas para cuantificar el tamaño del soma, se seleccionaron células al azar y se las clasificó en 1 de 4 diferentes estadios de activación en función de sus características morfológicas: el estadio ramificado se identifica por un soma pequeño, redondeado y la presencia de múltiples procesos finos. El fenotipo intermedio engloba una serie de modificaciones al fenotipo anterior, como un soma más alargado y procesos más gruesos. La microglía reactiva muestra un menor número de procesos, considerablemente más gruesos que en los casos anteriores. Finalmente, la microglía ameboide posee un soma considerablemente mayor que en todos los demás casos, y pocos o ningún proceso.

Cuantificación de células Iba1+ con A β intracelular. Se utilizaron imágenes confocal tomadas a 600x de aumento sobre el hilio en cortes procesados para inmunofluorescencia doble contra Iba1 y A β . Se cuantificó el porcentaje de células Iba1+ que además tenían marca inmunoreactiva para el anticuerpo 4G8. Solo se consideró aquellas células que se encontraban a una distancia máxima de 50 μ m de una placa amiloide. Se contabilizaron al menos 70 células por animal.

Cuantificación de células Iba1+ / CD68+. Se utilizaron de imágenes tomadas a 600x de aumento con microscopía confocal en el hilio de cortes procesados para doble inmunofluorescencia contra Iba1 y CD68. Se cuantificó el porcentaje de células Iba1+ que además tenían marca inmunoreactiva para el anticuerpo CD68. Solo se tuvieron en cuenta células con su soma positivo para DAPI visible.

Cuantificaciones del Capítulo 4

Estudio de co-localización entre GFAP y S100B. Se partió de imágenes tomadas sobre cortes procesados para la inmunofluorescencia en cuestión, a un aumento de 200x con microscopía confocal en el hilio del giro dentado. Se realizó la cuantificación empleando marcos de conteo de 200x200 μ m. Solo se

consideraron células con su soma visible. Se clasificó cada célula según si era inmunoreactiva para GFAP, S100B o ambos. Un mínimo de 100 células por animal fueron contabilizadas.

Número de células GFAP+. A partir de una inmunofluorescencia para GFAP se tomaron con un objetivo de 40x imágenes consecutivas a lo largo del eje Z con intervalos de 0,65 μm (Z-stack) en la región hipocampal de *stratum radiatum* bajo CA1. Las imágenes fueron integradas y promediadas en una única imagen utilizando el software ImageJ (NIH) sobre la cual se colocó un marco de conteo de 200 μm x 200 μm en el que, estableciendo bordes de inclusión y exclusión, se contó el número de células GFAP-positivas. A partir de este dato, y considerando que el Z-stack abarca todo el espesor del corte, se determinó el número de células GFAP+ por unidad de volumen. Posteriormente, a partir de las imágenes obtenidas se midió el volumen de la región de *stratum radiatum* bajo CA1. Para obtener el volumen de esta región se midió el área de la misma en 6 cortes por animal, representativos de todo el hipocampo, utilizando el programa Optimas (Media Cybernetics). Los valores obtenidos fueron promediados y multiplicados por 48 y por 60 μm . El volumen de la región se multiplicó por la densidad de células GFAP+ para obtener el número de células GFAP+ en la región de *stratum radiatum* bajo CA1.

Índice de complejidad morfológica de células GFAP+. A partir de las imágenes obtenidas de un Z-stack se binarizaron las imágenes y se recortaron empleando el programa ImageJ (NIH) para trabajar solamente con el área ocupada por un astrocito, borrando manualmente aquella marca que provenga de otras células. Las imágenes obtenidas para cada célula fueron analizadas con el programa Optimas, de donde se extrajo el área y perímetro total de la región inmunopositiva para GFAP en cada imagen. Con esta información se determinó el volumen y la superficie de cada célula individual según se ha reportado previamente (Chvatal et al., 2007), con modificaciones en el cálculo de la superficie.

Asumiendo que el área y la superficie total se mantienen constantes en el espacio entre una foto y otra, puede obtenerse el volumen celular como:

$$Volumen = d \sum_{i=1}^n A_i$$

Asumiendo que de haber un cambio en el perímetro o en el área total éste será gradual y lineal en el espacio entre una imagen y otra del Z-stack, puede calcularse la superficie celular como:

$$Superficie = A_1 + A_n + \frac{d}{2}(p_1 + p_n) + d \sum_{i=2}^n p_i$$

En ambos casos, $A_1, \dots, A_n$ y $P_1, \dots, P_n$ representan el área y perímetro respectivamente de las imágenes del Z-stack desde la cara superior a la inferior del corte; mientras que d representa a la distancia entre imágenes. El Índice de Complejidad Morfológico se expresa como la relación entre la superficie y el volumen celular.

Se determinó superficie, volumen e Índice de Complejidad Morfológico de 10 astrocitos en la región de *stratum radiatum* bajo CA1 por animal. Finalmente, se promediaron los resultados obtenidos en las 10 células para expresar un resultado por animal. En el caso de los animales TG con PA, se distinguió en una población de astrocitos asociados a PA, denominada TG (A), y una no asociada a PA, denominada TG (NA).

Estudio de co-localización entre GFAP y LC3. De la doble inmunofluorescencia de GFAP/LC3, se tomaron imágenes a un aumento de 200x correspondientes a la zona CA1 del hipocampo. En los animales Tg se tomaron imágenes conteniendo, en lo posible, placas amiloides. En estas imágenes se establecieron dos marcos de conteo de 200x200 μm en el *stratum radiatum* y dos en el *stratum lacunosum moleculare* utilizando el programa Adobe Photoshop CS3, a ciegas respecto del grupo experimental al que pertenecían. El marco de conteo fue colocado de manera de situar una placa en el centro del cuadrado para la obtención del dato de las células asociadas a las placas amiloides, y en un sector ausente de placas para el dato de las no asociadas. Se obtuvieron dos marcos de conteo con placa y dos sin placas (uno por cada región). En cada marco se estableció el porcentaje de células GFAP+/LC3+ contando la cantidad de células GFAP+ totales y las que también presentaban el fenotipo LC3+ asociado.

Cuantificaciones del Capítulo 5

Cuantificación de la densidad vascular y ramificaciones vasculares. Para determinar el área ocupada por vasos en *stratum radiatum* bajo CA1 se cuantificó el área de esa región mediante el programa Optimas, a partir de imágenes obtenidas por microscopio de epifluorescencia sobre cortes tratados para inmunofluorescencia de A β acoplada a tinción con lectina fluorescente (A=100x). Paralelamente, se cuantificó el área de esa región que era positiva para la marca de lectina, a partir del uso de un umbral para considerar la marca positiva. El área ocupada por vasos se expresó como el porcentaje de la región que es positiva para la marca de lectina. La densidad de ramificaciones en la vasculatura de *stratum radiatum* bajo CA1 se determinó contando el número de puntos donde se bifurcan los vasos, relativizados al área de la región

Cuantificación de la densidad alteraciones morfológicas vasculares. Empleando imágenes de microscopio de epifluorescencia, se evaluó la señal positiva para la tinción con lectina de tomate en busca de vasos sanguíneos con repliegues en su pared vascular y eventos de angostamiento de la luz vascular. La cuantificación se realizó sobre el hilio del giro dentado, y el número de eventos observados fue relativizado al área total de la estructura.

Área Ocludina+. Se tomaron imágenes con microscopía óptica a partir de los cortes procesados para inmunohistoquímica contra Ocludina (Aumento = 200x). Empleando el software Optimas se utilizó un umbral de densidad óptica para seleccionar solo la marca específica. Se determinó el área inmunoreactiva solamente en la región del hilio, y luego fue relativizado a área total de la estructura.

Estudio de co-localización entre lectina de tomate y LC3. Se tomaron imágenes con microscopio confocal a un aumento de 1000x sobre cortes coronales de cerebro de ratón procesado para inmunofluorescencia contra LC3 acoplada a una tinción con lectina de tomate. El análisis de co-localización se realizó empleando el *plugin* JACoP para el programa ImageJ (NIH).

Cuantificaciones del Capítulo 6

Cuantificación de células GFAP+ en contacto con la vasculatura. Se tomaron imágenes sucesivas con microscopía confocal a lo largo del eje Z (Z-

stack) en cortes de cerebro de ratón procesados para una inmunofluorescencia contra GFAP acoplada a una tinción con lectina fluorescente. Las mismas fueron colapsadas en una única imagen, representativa de todo el espesor del corte (*Z-project*). El procesamiento de estas imágenes se realizó con el software ImageJ (NIH). Sobre las mismas se cuantificó el número total de astrocitos (se consideró solamente aquellas células GFAP+ con un soma visible y conteniendo marca positiva para DAPI) y el porcentaje del área inmunoreactiva para la tinción con lectina (relativizada al área total de la estructura). Los astrocitos fueron discriminados entre aquellos que establecen contactos visibles con los vasos sanguíneos positivos para la tinción con lectina y los que no. Se cuantificó el número de astrocitos que establecen contacto con la vasculatura, relativizado al número total de células GFAP+ en el corte histológico o al área vascular total. Se contabilizaron por lo menos 70 astrocitos en contacto con la vasculatura para cada animal.

Área vascular Acuaporina-4+ y eNOS+. Se tomaron imágenes con microscopía óptica a partir de los cortes procesados para inmunohistoquímica contra Acuaporina-4 o eNOS (Aumento = 200x). Para evaluar solamente la señal vascular, se realizó una máscara con el programa Photoshop CS3 (Adobe) a partir de la selección manual de la señal inmunoreactiva con morfología vascular. El área total seleccionada fue cuantificada utilizando el programa Optimas, la cual fue relativizada al área total del giro dentado.

Determinación de la integridad de la BHE.

Al menos 4 ratones por grupo experimental fueron inyectados intraperitonealmente con 100 µl de una solución 10% de fluoresceína de sodio (Biopack) en solución fisiológica. Luego de 45 minutos, los ratones fueron anestesiados, perfundidos, y los cerebros extraídos para la realización de cortes coronales como se indica en el apartado “Obtención de cortes histológicos”. Los cortes fueron colocados en portaobjetos y montados con polivinil alcohol con DABCO. Se tomaron imágenes con microscopía confocal de los vasos sanguíneos ubicados entre la región molecular del giro dentado y de CA1, considerando solo los vasos con un diámetro mayor a 7,8 µm. Abarcando distintos cortes se analizó un total de al menos 30 vasos por corte, y se determinó el porcentaje de vasos con extravasado de NaFl. Para tener certeza de la especificidad de la marca de NaFl, solo se consideraron como positivos aquellos vasos en donde se

podía apreciar marca en el canal verde pero no en el rojo, considerando que NaFl emite fluorescencia a una longitud de onda de 520 nm.

Análisis de proteómica.

El análisis de proteómica a partir de muestras de microvasculatura cerebral extraída de ratones PDAPP-J20 se realizó en colaboración con el grupo de la Dra Verónica Galvan, en su laboratorio de la Universidad de Texas y el Barshop Institute for Longevity and Aging Studies (San Antonio, Texas).

Obtención de fracciones vasculares.

Se partió de hemiserebros congelados en nitrógeno líquido y conservados a -80°C pertenecientes a ratones PDAPP-J20 Tg y NTg de 1 año de edad. Al menos 7 animales de cada genotipo fueron incluidos en el estudio. Las muestras fueron procesadas tal empleando un protocolo reportado previamente por el grupo de la Dra Galván (Lin et al., 2013). Brevemente, los hemiserebros fueron lavados con medio de cultivo MCDB131 conteniendo 2% suero fetal bovino. Las muestras fueron luego cortadas en cubos pequeños empleando bisturí esteril. Los fragmentos obtenidos fueron colocados luego en un homogeneizador tipo Douncer, y homogeneizadas con 5 golpes. Se le añadió al homogenato el mismo volumen de medio de cultivo conteniendo dextrán de alto peso molecular hasta llegar a una concentración 17 % m/v. La mezcla fue centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C, luego de lo cual se separó la fracción superior (enriquecida en el parénquima cerebral) y el sobrenadante, conteniendo mayormente medio de cultivo y dextrán. El pellet (enriquecido en microvasculatura cerebral) fue lavado 3 veces empleando PBS estéril y resuspendido finalmente en buffer de lisis. Una muestra no fue lisada, sino resuspendida en PBS y colocada sobre portaobjetos tratados con gelatina para facilitar su adhesión, luego de lo cual la muestra fue procesada para inmunofluorescencia contra GFAP y tinción con lectina fluorescente. Todas las soluciones acuosas empleadas durante la obtención de fracciones vasculares contienen inhibidores de proteasas (Roche).

Precipitación de proteínas.

Se procedió a realizar una precipitación de proteínas para eliminar posibles contaminantes. La misma fue realizada según reportes previos (Wessel & Flugge, 1984). Brevemente, los pellets resuspendidos en buffer de lisis fueron mezclados con 4 volúmenes de metanol y centrifugados a 9.000 g durante 10 segundos. Luego se añade una cantidad de cloroformo igual al volumen de muestra inicial y se centrifuga en las mismas condiciones. Finalmente, se añade una cantidad de agua estéril conteniendo inhibidores de proteasas igual a 3 veces el volumen de muestra inicial, y se centrifuga durante 1 minuto a 9.000 g. Se descarta la fase acuosa y se añade un volumen de metanol igual a 3 veces el volumen de muestra inicial, tras lo cual la muestra se centrifuga durante 2 min a 9.000 g. El pellet obtenido corresponde a las proteínas precipitadas, las cuales son luego resuspendidas en 50 µL de SDS 5% con inhibidores de proteasas. Sobre las muestras generadas se determina la concentración de proteínas por el método de Bradford y se envían para su análisis empleando espectrometría de masa en la Universidad de Washington.

Análisis de resultados por *Gene Ontology*.

El servicio de proteómica de la Universidad de Washington realizó la identificación de las proteínas presentes en cada muestra y la medición de los niveles relativos de cada una, en relación a la concentración total de proteínas. A partir de esta información, se compararon los niveles de cada proteína para ambos grupos empleando test de T, corrigiendo el p-valor según el criterio de Bonferroni. Además, se estableció un segundo nivel de eliminación estadística realizando el test de Benjamini-Hochberg para descartar posibles falsos descubrimientos (Test BH-FDR), que permite ajustar el p-valor nuevamente sobre la sub-lista obtenida luego de la aplicación del criterio de Bonferroni. Finalmente, de la lista de proteínas obtenidas solo se utilizaron aquellas que fueron identificadas por más de una secuencia peptídica dentro de su estructura primaria. De esta manera, se obtuvo una lista final de 97 proteínas verificadas y validadas estadísticamente que presentan diferencias significativas entre animales Tg y NTg.

Con el objetivo de evaluar las posibles funciones en las que se encuentran involucradas estas proteínas se realizó un análisis empleando anotaciones de Gene Ontology disponibles en internet (<https://david.ncifcrf.gov/>).

Análisis de Enriquecimiento.

Con el objetivo de identificar qué funciones estaban mayormente representadas en la muestra de 97 proteínas cuyos niveles estaban alterados entre ratones Tg y NTg, se realizó un análisis de enriquecimiento, el cual se encuentra disponible en la web (<http://www.pantherdb.org/>). Este tipo de análisis identifica todas las funciones atribuidas a cada proteína de la lista ingresada según las anotaciones de *Gene Ontology*. El análisis finalmente compara las funciones representadas en la sub-muestra ingresada comparando contra el proteoma de referencia de ratón. De esta manera, se identifican términos de *Gene Ontology* que se encuentran estadísticamente más representados en la muestra analizada.

2. Experimentos *in vitro*

Líneas celulares BV-2 y C6.

La línea celular BV-2 deriva de un cultivo primario de microglía murina inmortalizada mediante la infección con el virus *v-raf/v-myc*. Esta línea es de uso frecuente en el área y aparece en la bibliografía particularmente recomendada para el estudio de la respuesta inflamatoria inducida por A β y procesos relacionados con la fagocitosis (Stansley, Post, & Hensley, 2012). Por otro lado, algunos artículos evalúan el proceso autofágico en estas células ante estímulos pro-inflamatorios, observando que no existen diferencias con lo que se detecta para cultivos primarios microgliales (Bussi et al., 2017; Cho et al., 2014).

La línea celular C6 (ATCC CCL-107) deriva de un astrocitoma de rata inducido con N-nitrosometilurea fue provista por el grupo de la Dra Mónica Kotler (Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires). Esta línea celular fue elegida por su facilidad de manipulación y transfección. Además, existen evidencias de que la capacidad de las células C6 de responder ante estímulos inflamatorios y a A β no difiere considerablemente respecto de cultivos primarios astrogiales (Fontana et al., 1982; Pentreath & Mead, 2004).

En ambos casos las células fueron mantenidas en medio de cultivo comercial (RPMI) suplementado con 10% suero fetal bovino inactivado por calor (Internegocios), 2mM de glutamina (Glutamax, Invitrogen), 100 unidades/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomicina. Las células fueron crecidas y mantenidas a 37°C en atmósfera húmeda conteniendo 5% de CO₂. El medio de mantenimiento ha sido renovado tres veces por semana. En todos los casos los experimentos fueron realizados cuando las células llegaban aproximadamente a un 70% de confluencia.

Línea celular HBMEC.

La línea celular de microvasculatura cerebral humana (HBMEC, por las siglas en inglés de *Human Brain Microvascular Endothelial Cells*) fue gentilmente cedida por el Dr Kwang Sik Kim para su uso en nuestro laboratorio. Esta línea celular ha sido ampliamente utilizada para el estudio de las propiedades de la BHE y es considerada como una de las líneas celulares de endotelio cerebral que mejor preservan las características de cultivo primario (Eigenmann et al., 2013; Miraglia et al., 2018).

Para el mantenimiento de la línea celular HBMEC se empleó medio de mantenimiento conteniendo Nu Serum (Corning) 10%, Suero Fetal Bovino (Gibco) 10%, piruvato 0,055 mg/mL, penicilina 100 µg/ml, estreptomicina µg/ml, glutamina 2 mM, MEM *Vitamin Solution* (Sigma) 1%, MEM *Non-Essential Amino Acids Solution* 1% en RPMI 1640 (Gibco). La línea de células endoteliales HBMEC se mantuvo en una atmósfera húmeda a 37°C, 5% CO₂ y 95% aire, en medio de mantenimiento, el cual se cambió regularmente cada 2-3 días. Cuando el cultivo logró una confluencia igual o superior al 80%, se levantaron las células mediante un breve tratamiento con tripsina (0,05% en 50:50, 2 min a 37°C) seguido de inactivación con medio RPMI + SFB 10%.

Reactivos y tratamientos.

El tratamiento con Aβ₁₋₄₀ o Aβ₁₋₄₂ (Sigma) se realizó en cada caso según el tipo celular. Ambos tipos de péptidos se almacenaron por separado a una concentración de 0,5 mM en DMSO. Para obtener péptidos fibrilizados de cada especie se ha procedido según las condiciones óptimas de fibrilización reportada por otros autores (Ajit, Udan, Paranjape, & Nichols, 2009; Paranjape, Gouwens, Osborn, & Nichols, 2012). Brevemente, los mismos fueron incubados a una concentración final de 50 µM en agua estéril durante 72 hs a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂, y luego disueltos en el medio de mantenimiento hasta la concentración final de trabajo. Para obtener péptidos mayormente en estado soluble, se evitó la incubación durante 72 hs en solución acuosa, de manera tal que los péptidos son disueltos directamente en medio de cultivo hasta la concentración deseada. Como vehículo se utilizó DMSO a la misma concentración final que en la solución con los péptidos Aβ.

En las células C6, la condición de hambreado se realizó incubando durante el tiempo correspondiente con medio de mantenimiento conteniendo 2% suero fetal bovino.

El tratamiento con bafilomicina (Fermentek) en células BV-2 se realizó a una concentración de 100 nM, coincidiendo con las últimas 2 hs de la exposición a Aβ₁₋₄₂.

El tratamiento de células HBMEC con FPS-ZM1 (Merck) se realizó a una concentración final de 100 nM, y fue en simultáneo con la exposición a Aβ o al medio condicionado proveniente de otras células.

Inmunofluorescencia y tinciones.

Se utilizó el protocolo general que se indica a continuación, con las modificaciones particulares que se mencionan más abajo para cada caso. Una vez fijadas con

paraformaldehído 4% en solución salina (Sigma), las células fueron lavadas con PBS, y permeabilizadas con tritón X-100 0,25% en PBS durante 10 min a temperatura ambiente. Luego, las células fueron lavadas y expuestas a una solución de bloqueo consistente en seroalbúmina bovina 1% (Sigma) en PBS-Tween 0,05% durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las células fueron incubadas con el anticuerpo primario en solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Luego de lavar con PBS, se incubó con el o los anticuerpos secundarios correspondiente acoplados a los fluoróforos Alexa 555 y/o Alexa 488 (Invitrogen, 1:1000) en solución de bloqueo. Finalmente, los cubreobjetos fueron montados sobre portaobjetos empleando polivinil alcohol con DABCO (Sigma).

Detección de LC3 y A β . En este caso los anticuerpos primarios no se incubaron juntos sino de manera secuencial. Inicialmente se incubó con anti-LC3 (Novus) durante 1 h, se lavó 3 veces con PBS y luego se volvió a incubar con 4G8 (1:1000, Sigma) durante 1 h. El protocolo continuó normalmente, empleando los anticuerpos secundarios correspondientes.

Detección de Catepsina D acoplada a tinción con LysoTracker. La tinción con LysoTracker Red DND-99 (Invitrogen) se realizó sobre las células vivas, en medio de mantenimiento sin suero durante a 500 nM durante 30 minutos a 37°C, al finalizar el tratamiento. Luego las células fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia contra Catepsina-D. Se empleó el protocolo general mencionado anteriormente, omitiendo el paso de la permeabilización con detergente. Se utilizó anticuerpo anti-Catepsina-D (1:100, Santa Cruz, hecho en ratón) y secundario correspondiente.

Detección de la subunidad p65 de NF κ B y Occludina. Se utilizó el protocolo general anteriormente indicado, empleando anticuerpo anti-p65 (1:200, Santa Cruz) y anti-Occludina (1:200, Invitrogen) según corresponda, y anticuerpo secundario anti-conejo.

Cuantificaciones y análisis de inmunofluorescencia y tinciones.

Las imágenes de fluorescencia fueron tomadas usando un microscopio Olympus TIRF DSU IX83 en su modalidad de epifluorescencia o confocal según corresponda. Todas las cuantificaciones que se indican a continuación se realizaron de manera ciega tratamiento experimental.

Densidad de células A β + y LC3+. Imágenes obtenidas con microscopía confocal sobre células C6 o BV-2 y tratadas fueron tomadas con un objetivo de 60x y empleando un umbral definido para marcar solamente las células LC3+ o A β +. El número de células conteniendo vesículas positivas fue estimado por unidad de área del campo analizado en al menos 4 campos por grupo experimental. Dado que el plano focal fue determinado para solo detectar vesículas intracelulares, no se observaron depósitos amiloides extracelulares sobre estas imágenes.

Densidad de Catepsina D en el citoplasma de células BV-2. Las cuantificaciones se realizaron a partir de imágenes confocal obtenidas sobre células procesadas para inmunofluorescencia contra Catepsina D y acopladas a una tinción con *Lysotracker* y DAPI. Las imágenes correspondientes a la señal inmunoreactiva para Catepsina D fueron procesadas con el programa ImageJ (NIH). Brevemente, se eliminó la señal de Catepsina D lisosomal al restarle la señal positiva para *lysotracker* binarizada, y la señal nuclear al restarle la marca correspondiente a DAPI binarizada. Luego, se cuantificó la densidad óptica en el citoplasma, utilizando un umbral de intensidad para que solo se considere la porción del citoplasma que posee señal. La medición se realizó en al menos 100 células por grupo experimental.

Área ocupada por lisosomas en células BV-2. El análisis se realizó sobre células procesadas para una tinción con *Lysotracker*. Empleando el programa ImageJ (NIH) se midió el área de al menos 100 células por grupo experimental, y el área positiva total para *Lysotracker* en cada célula. Finalmente, se expresó el área ocupada por lisosomas como el porcentaje del área del citoplasma positivo para la tinción con *Lysotracker*.

Área Ocludina+ en células HBMEC. Esta cuantificación se realizó sobre imágenes tomadas con microscopía de epifluorescencia sobre células HBMEC procesadas para una inmunofluorescencia contra Ocludina acoplada a una tinción con DAPI. Las imágenes obtenidas fueron procesadas utilizando el software ImageJ (NIH) sobre el canal correspondiente a la señal de Ocludina. La eliminación de la señal nuclear no específica se realizó restando la señal de DAPI binarizada. Empleando un umbral de intensidad acorde, se seleccionó solamente la señal de ocludina presente en la membrana plasmática, y se midió el área total positiva. Este parámetro fue relativizado al número de células

presentes en cada campo. Al menos 6 campos por grupo experimental fueron evaluados.

Translocación nuclear de NFkB en células HBMEC. La translocación al núcleo de la subunidad p65 de NFkB se evaluó como medida indirecta de la activación celular. Para ello se utilizaron imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia sobre células procesadas para la inmunofluorescencia contra p65 y acopladas a una tinción con DAPI. Empleando el software ImageJ (NIH) se midió la densidad óptica en el citoplasma y en el núcleo. Finalmente, se informó la relación entre la densidad óptica del núcleo y el citoplasma. En todos los casos los valores obtenidos fueron relativizados a un grupo control.

Ensayos de *western blot*

Al finalizar el tratamiento, las células fueron homogeneizadas en buffer RIPA suplementado. La cuantificación de proteínas totales se realizó mediante el método estandarizado de Bradford y luego de la lisis con buffer de carga 5x, fueron sembradas en geles de acrilamida 10%, separadas electroforéticamente por SDS-PAGE y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Los sitios inespecíficos de las membranas fueron bloqueados con leche descremada en polvo o BSA 5% en buffer TBS con detergente Tween-20 al 0,5% (TTBS). Para evaluar los niveles de las proteínas de interés, las membranas fueron incubadas a 4° C durante 18-24 hs con anticuerpos primarios anti-LC3 (1:100, Cell Signalling), anti-p62 (1:100, Santa Cruz) y anti-Actina (1:200, Santa Cruz). Luego, las membranas fueron adecuadamente lavadas en soluciones TTBS 0,5% y TBS, incubadas durante una hora con diluciones 1:1000 de los anticuerpos secundarios especie-específicos, conjugados a HRP. La inmunoreactividad fue revelada mediante la reacción con los reactivos ECL (luminol y ácido p-cumárico; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) por 3 minutos, seguido de la exposición inmediata en el sistema Chemi gel doc G-Box (Syngene, UK). La densidad óptica de las bandas correspondientes a los pesos moleculares específicos de las proteínas de interés fue cuantificada utilizando el *plugin* del software ImageJ (NIH) para análisis de geles. Se comparó la relación entre la densidad óptica de la proteína proteína de interés y la de actina.

Transfecciones y análisis.

Las células fueron sembradas a una densidad de $8 \cdot 10^3$ células/pocillo en una placa de 24 pocillos conteniendo cubreobjetos esterilizados de 10 mm de diámetro. 48 hs más tarde se preparó el complejo de transfección en medio de cultivo libre de suero en una relación de polietilamina:DNA 3,75:1 (1 mg de plásmido por well). La mezcla fue luego vortexeada e incubada durante 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, las células fueron expuestas a la mezcla de polietilamina-DNA durante 5 hs en condiciones de mantenimiento, luego de lo cual las células fueron tratadas.

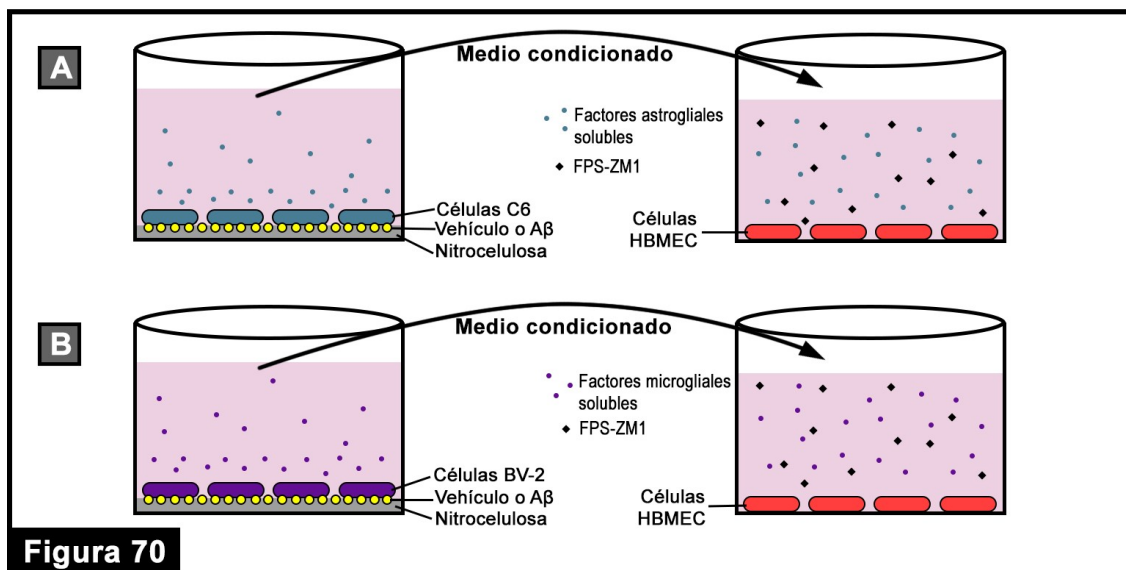
Expresión de Cherry-GFP-LC3 en células BV-2. Las células BV-2 fueron todas transfectadas con el plásmido CHerry-GFP-LC3, gentilmente cedido por el Dr Juan Bonifacino (NIH) para su uso en nuestro laboratorio. Una vez transfectadas, las células recibieron los tratamientos correspondientes y finalmente fueron fijadas y preparadas para la observación al microscopio confocal. A partir de las imágenes obtenidas, se evaluó la co-localización entre la señal positiva para los fluoróforos CHerry y GFP en al menos 30 células por grupo experimental, empleando el software ImageJ (NIH) y el *plugin* JACoP.

Modulación de la expresión de Atg5 en células C6. En el caso de las células C6, fueron transfectadas o bien con un plásmido vacío (pCI-neo) o bien con plásmidos que permiten la sobreexpresión de ATG5 en sus versiones wild type (ATG5^{WT}) o portando una mutación no funcional (ATG5^{K130R}). Al finalizar la transfección las células fueron tratadas por 24 hs con vehículo o β -Amiloide 0,5 μ M (Sigma, previamente fibrilizado durante 72 hs), luego de lo cual fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia.

Experimentos de medios condicionados.

Se empleó un paradigma de medios condicionados para evaluar el efecto de factores solubles de origen microglial (células BV-2) y astrogial (células C6) sobre células endoteliales (HBMEC). El sistema utilizado se representa esquemáticamente en la Figura 70, y representa una adaptación de protocolos previamente publicados (Combs et al., 2000; Lagenaur & Lemmon, 1987). Brevemente, los pocillos de placas multiwell fueron pre-tratados con una solución de nitrocelulosa en metanol. La solución fue preparada disolviendo 1 cm² de membrana de nitrocelulosa (Amersham) en 1,2 mL de metanol (Biopack). Luego de dejar secar el contenido durante 10 minutos, se realizaron lavados con PBS y medio de mantenimiento. Finalmente, se cubrió el fondo

del pocillo con una solución de vehículo, 1-40 o A β 1-42 previamente fibrilizado y suspendido en medio completo hasta una concentración de 3 μ M. Luego de 10 minutos, se retira el exceso de solución, se lava con medio completo y se siembran 100.000 células por well. Luego de 24 hs, se toma el medio condicionado, se centrifuga a 1200 rpm durante 5 minutos y se utiliza el sobrenadante para tratar directamente a células HBMEC. La incubación de células HBMEC con el medio condicionado de células C6 o BV-2 se realiza en presencia o ausencia del inhibidor de RAGE FPS-ZM1.



▲ **Esquema experimental basado en medios condicionados.** El esquema es una representación del sistema empleado para evaluar el efecto de mediadores solubles de origen astrogial (A, células C6) o de origen microglial (B, células BV-2) sobre la línea de endotelio cerebral HBMEC. Se utilizó una capa de nitrocelulosa para inmovilizar los péptidos A β . El tratamiento sobre células HBMEC se realizó en presencia o ausencia de FPS-ZM1, un inhibidor del receptor RAGE.

3. **Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en esta Tesis se realizó empleando el software libre Infostat (Universidad Nacional de Córdoba), y en algunos casos el programa Prism 7 (GraphPad). Las representaciones gráficas de los resultados aquí expuestos fueron realizadas con el programa Prism 7.

En todos los análisis estadísticos utilizados en esta Tesis se consideró una tasa de error Tipo I del 5%. En todos los casos el número de réplicas fue estimado a partir de

considerar una potencia del 80%. Para el análisis histológico se utilizó al menos 4 animales por edad y genotipo.

Para el caso en el que se grafican y comparan 2 grupos experimentales, se emplearon Test de T a una cola de acuerdo a la hipótesis previa. Para la comparación de 3 o más grupos experimentales se utilizó Análisis de la Varianza paramétrico con previa evaluación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Para el caso del Análisis de la Varianza, los grupos experimentales fueron comparados entre sí empleando los siguientes contrastes *a posteriori*:

- Comparaciones de Tukey, cuando se pretende comparar todos los grupos experimentales entre sí.
- Comparaciones múltiples de Sidak, en modelos de dos factores cruzados, para evaluar las diferencias entre los niveles de un factor dentro de cada nivel del otro factor.
- Comparaciones de Dunnett, para evaluar diferencias entre los grupos experimentales respecto de un grupo considerado control. Este tipo de comparaciones fueron realizadas con el software Prism 7.

En el caso del experimento de proteómica, el análisis estadístico fue realizado por el personal del Servicio de Proteómica de la Universidad de Washington. El detalle del análisis se menciona en el apartado correspondiente dentro de este mismo Capítulo.

Cap. 9

Bibliografía

- Abbott, N. J., Ronnback, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat.Rev.Neurosci.*, 7(1), 41-53.
- Aguzzi, A., & O'Connor, T. (2010). Protein aggregation diseases: pathogenicity and therapeutic perspectives. *Nat Rev Drug Discov*, 9(3), 237-248. doi: 10.1038/nrd3050
- Ajit, D., Udan, M. L., Paranjape, G., & Nichols, M. R. (2009). Amyloid-beta(1-42) fibrillar precursors are optimal for inducing tumor necrosis factor-alpha production in the THP-1 human monocytic cell line. *Biochemistry*, 48(38), 9011-9021. doi: 10.1021/bi9003777
- Alata, W., Ye, Y., St-Amour, I., Vandal, M., & Calon, F. (2015). Human apolipoprotein E varepsilon4 expression impairs cerebral vascularization and blood-brain barrier function in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 35(1), 86-94. doi: 10.1038/jcbfm.2014.172
- Alberini, C. M., Cruz, E., Descalzi, G., Bessieres, B., & Gao, V. (2018). Astrocyte glycogen and lactate: New insights into learning and memory mechanisms. *Glia*, 66(6), 1244-1262. doi: 10.1002/glia.23250
- Alexander, A. G., Marfil, V., & Li, C. (2014). Use of *Caenorhabditis elegans* as a model to study Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Front Genet*, 5, 279. doi: 10.3389/fgene.2014.00279
- Alexopoulos, P., Sorg, C., Forschler, A., Grimmer, T., Skokou, M., Wohlschlager, A., . . . Preibisch, C. (2012). Perfusion abnormalities in mild cognitive impairment and mild dementia in Alzheimer's disease measured by pulsed arterial spin labeling MRI. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 262(1), 69-77. doi: 10.1007/s00406-011-0226-2
- Altman, J., & Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol.*, 124(3), 319-335.
- Allaman, I., Belanger, M., & Magistretti, P. J. (2011). Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends Neurosci*, 34(2), 76-87. doi: 10.1016/j.tins.2010.12.001
- Allaman, I., Gavillet, M., Belanger, M., Laroche, T., Viertl, D., Lashuel, H. A., & Magistretti, P. J. (2010). Amyloid-beta aggregates cause alterations of astrocytic metabolic phenotype: impact on neuronal viability. *J.Neurosci.*, 30(9), 3326-3338.
- Allen, N. J., & Eroglu, C. (2017). Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions. *Neuron*, 96(3), 697-708. doi: 10.1016/j.neuron.2017.09.056
- Alzheimer's Association (2018). Alzheimer's Disease facts and Figures. Disponible en <https://www.alz.org/media/HomeOffice/Facts%20and%20Figures/facts-and-figures.pdf>
- Arriagada, P. V., Growdon, J. H., Hedley-Whyte, E. T., & Hyman, B. T. (1992). Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology*, 42(3 Pt 1), 631-639.
- Arvanitakis, Z., Capuano, A. W., Leurgans, S. E., Bennett, D. A., & Schneider, J. A. (2016). Relation of cerebral vessel disease to Alzheimer's disease dementia and cognitive function in elderly people: a cross-sectional study. *Lancet Neurol*, 15(9), 934-943. doi: 10.1016/S1474-4422(16)30029-1
- Asai, H., Ikezu, S., Woodbury, M. E., Yonemoto, G. M., Cui, L., & Ikezu, T. (2014). Accelerated neurodegeneration and neuroinflammation in transgenic mice expressing P301L tau mutant and tau-tubulin kinase 1. *Am J Pathol*, 184(3), 808-818. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.11.026
- Asimwe, N., Yeo, S. G., Kim, M. S., Jung, J., & Jeong, N. Y. (2016). Nitric Oxide: Exploring the Contextual Link with Alzheimer's Disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 7205747. doi: 10.1155/2016/7205747
- Austin, S. A., Santhanam, A. V., Hinton, D. J., Choi, D. S., & Katusic, Z. S. (2013). Endothelial nitric oxide deficiency promotes Alzheimer's disease pathology. *J Neurochem*, 127(5), 691-700. doi: 10.1111/jnc.12334
- Baecher-Allan, C., Kaskow, B. J., & Weiner, H. L. (2018). Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. *Neuron*, 97(4), 742-768. doi: 10.1016/j.neuron.2018.01.021
- Baik, S. H., Kang, S., Son, S. M., & Mook-Jung, I. (2016). Microglia contributes to plaque growth by cell death due to uptake of amyloid beta in the brain of Alzheimer's disease mouse model. *Glia*, 64(12), 2274-2290. doi: 10.1002/glia.23074
- Balducci, C., Frasca, A., Zotti, M., La Vitola, P., Mhillaj, E., Grigoli, E., . . . Forloni, G. (2017). Toll-like receptor 4-dependent glial cell activation mediates the impairment in memory establishment induced by beta-amyloid oligomers in an acute mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Behav Immun*, 60, 188-197. doi: 10.1016/j.bbi.2016.10.012
- Bales, K. R., Du, Y., Dodel, R. C., Yan, G. M., Hamilton-Byrd, E., & Paul, S. M. (1998). The NF-kappaB/Rel family of proteins mediates Abeta-induced neurotoxicity and glial activation. *Brain Res Mol Brain Res*, 57(1), 63-72.
- Balez, R., & Ooi, L. (2016). Getting to NO Alzheimer's Disease: Neuroprotection versus Neurotoxicity Mediated by Nitric Oxide. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 3806157. doi: 10.1155/2016/3806157
- Baruch, K., Deczkowska, A., Rosenzweig, N., Tsitsou-Kampeli, A., Sharif, A. M., Matcovitch-Natan, O., . . . Schwartz, M. (2016). PD-1 immune checkpoint blockade reduces pathology and improves memory in mouse models of Alzheimer's disease. *Nat Med*, 22(2), 135-137. doi: 10.1038/nm.4022
- Beach, T. G., Walker, R., & McGeer, E. G. (1989). Patterns of gliosis in Alzheimer's disease and aging cerebrum. *Glia*, 2(6), 420-436.
- Beauquis, J., Pavia, P., Pomilio, C., Vinuesa, A., Podlutska, N., Galvan, V., & Saravia, F. (2013). Environmental enrichment prevents astroglial pathological changes in the hippocampus of APP transgenic mice, model of Alzheimer's disease. *Exp.Neurol.*, 239, 28-37.
- Beauquis, J., Pomilio, C., Vinuesa, A., Pavia, P., Galvan, V., & Saravia, F. (2013). Early astroglial and neuronal changes in the hippocampus of PDAPP-J20 transgenic mice, model of Alzheimer's disease. *Comunicación oral en la Reunión Anual de la Society for Neuroscience, noviembre 2013, San Diego, USA.*
- Beauquis, J., Roig, P., Homo-Delarche, F., De Nicola, A., & Saravia, F. (2006). Reduced hippocampal neurogenesis and number of hilar neurones in streptozotocin-induced diabetic mice: reversion by antidepressant treatment. *Eur.J Neurosci*, 23(6), 1539-1546.
- Beauquis, J., Saravia, F., Coulaud, J., Roig, P., Dardenne, M., Homo-Delarche, F., & De Nicola, A. (2008). Prominently decreased hippocampal neurogenesis in a spontaneous model of type 1 diabetes, the nonobese diabetic mouse. *Exp.Neurol.*, 210(2), 359-367.
- Beauquis, J., Vinuesa, A., Pomilio, C., Pavia, P., Galvan, V., & Saravia, F. (2014). Neuronal and glial alterations, increased anxiety, and cognitive impairment before hippocampal amyloid deposition in PDAPP mice, model of Alzheimer's disease. *Hippocampus*, 24(3), 257-269.
- Belanger, M., Allaman, I., & Magistretti, P. J. (2011). Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab*, 14(6), 724-738. doi: 10.1016/j.cmet.2011.08.016
- Bell, R. D. (2012). The imbalance of vascular molecules in Alzheimer's disease. *J.Alzheimers.Dis.*, 32(3), 699-709.

- Bell, R. D., Winkler, E. A., Sagare, A. P., Singh, I., LaRue, B., Deane, R., & Zlokovic, B. V. (2010). Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. *Neuron*, 68(3), 409-427. doi: 10.1016/j.neuron.2010.09.043
- Bell, R. D., & Zlokovic, B. V. (2009). Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.*, 118(1), 103-113.
- Birks, J. S., & Harvey, R. (2003). Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev*(3), CD001190. doi: 10.1002/14651858.CD001190
- Biron, K. E., Dickstein, D. L., Gopaul, R., & Jefferies, W. A. (2011). Amyloid triggers extensive cerebral angiogenesis causing blood brain barrier permeability and hypervascularity in Alzheimer's disease. *PLoS One*, 6(8), e23789. doi: 10.1371/journal.pone.0023789
- Blanken, A. E., Hurtz, S., Zarow, C., Biado, K., Honarpisheh, H., Somme, J., . . . Apostolova, L. G. (2017). Associations between hippocampal morphometry and neuropathologic markers of Alzheimer's disease using 7 T MRI. *Neuroimage Clin*, 15, 56-61. doi: 10.1016/j.nicl.2017.04.020
- Boche, D., Zotova, E., Weller, R. O., Love, S., Neal, J. W., Pickering, R. M., . . . Nicoll, J. A. (2008). Consequence of Abeta immunization on the vasculature of human Alzheimer's disease brain. *Brain*, 131(Pt 12), 3299-3310. doi: 10.1093/brain/awn261
- Boscolo, E., Folini, M., Nico, B., Grandi, C., Mangieri, D., Longo, V., . . . Ribatti, D. (2007). Beta amyloid angiogenic activity in vitro and in vivo. *Int J Mol Med*, 19(4), 581-587.
- Boza-Serrano, A., Yang, Y., Paulus, A., & Deierborg, T. (2018). Innate immune alterations are elicited in microglial cells before plaque deposition in the Alzheimer's disease mouse model 5xFAD. *Sci Rep*, 8(1), 1550. doi: 10.1038/s41598-018-19699-y
- Bradshaw, E. M., Chibnik, L. B., Keenan, B. T., Ottoboni, L., Raj, T., Tang, A., . . . De Jager, P. L. (2013). CD33 Alzheimer's disease locus: altered monocyte function and amyloid biology. *Nat Neurosci*, 16(7), 848-850. doi: 10.1038/nn.3435
- Brant-Zawadzki, P. B., Schmid, D. I., Jiang, H., Weyrich, A. S., Zimmerman, G. A., & Kraiss, L. W. (2007). Translational control in endothelial cells. *J Vasc Surg*, 45 Suppl A, A8-14. doi: 10.1016/j.jvs.2007.02.033
- Briggs, R., Kennelly, S. P., & O'Neill, D. (2016). Drug treatments in Alzheimer's disease. *Clin Med (Lond)*, 16(3), 247-253. doi: 10.7861/clinmedicine.16-3-247
- Broz, P., & Dixit, V. M. (2016). Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol*, 16(7), 407-420. doi: 10.1038/nri.2016.58
- Brundel, M., Heringa, S. M., de Bresser, J., Koek, H. L., Zwanenburg, J. J., Jaap Kappelle, L., . . . Biessels, G. J. (2012). High prevalence of cerebral microbleeds at 7Tesla MRI in patients with early Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 31(2), 259-263. doi: 10.3233/JAD-2012-120364
- Burke, S. N., & Barnes, C. A. (2006). Neural plasticity in the ageing brain. *Nat Rev Neurosci*, 7(1), 30-40. doi: 10.1038/nrn1809
- Bushong, E. A., Martone, M. E., Jones, Y. Z., & Ellisman, M. H. (2002). Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci*, 22(1), 183-192.
- Bussi, C., Peralta Ramos, J. M., Arroyo, D. S., Gaviglio, E. A., Gallea, J. I., Wang, J. M., . . . Iribarren, P. (2017). Autophagy down regulates pro-inflammatory mediators in BV2 microglial cells and rescues both LPS and alpha-synuclein induced neuronal cell death. *Sci Rep*, 7, 43153. doi: 10.1038/srep43153
- Butterfield, D. A., & Poon, H. F. (2005). The senescence-accelerated prone mouse (SAMP8): a model of age-related cognitive decline with relevance to alterations of the gene expression and protein abnormalities in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol.*, 40(10), 774-783.
- Buxbaum, J. N. (2017). Alzheimer's Disease: It's More Than Abeta. *FASEB J*, 31(1), 2-4. doi: 10.1096/fj.201601179
- Cabezas, R., Avila, M., Gonzalez, J., El-Bacha, R. S., Baez, E., Garcia-Segura, L. M., . . . Barreto, G. E. (2014). Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson's disease. *Front Cell Neurosci*, 8, 211. doi: 10.3389/fncel.2014.00211
- Calabria, A. R., & Shusta, E. V. (2008). A genomic comparison of in vivo and in vitro brain microvascular endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab*, 28(1), 135-148. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600518
- Carare, R. O., Bernardes-Silva, M., Newman, T. A., Page, A. M., Nicoll, J. A., Perry, V. H., & Weller, R. O. (2008). Solutes, but not cells, drain from the brain parenchyma along basement membranes of capillaries and arteries: significance for cerebral amyloid angiopathy and neuroimmunology. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 34(2), 131-144. doi: 10.1111/j.1365-2990.2007.00926.x
- Carnevale, D., Mascio, G., D'Andrea, I., Fardella, V., Bell, R. D., Branchi, I., . . . Lembo, G. (2012). Hypertension induces brain beta-amyloid accumulation, cognitive impairment, and memory deterioration through activation of receptor for advanced glycation end products in brain vasculature. *Hypertension*, 60(1), 188-197. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.195511
- Carreiras, M. C., Mendes, E., Perry, M. J., Francisco, A. P., & Marco-Contelles, J. (2013). The multifactorial nature of Alzheimer's disease for developing potential therapeutics. *Curr Top Med Chem*, 13(15), 1745-1770.
- Carson, M. J., Thrash, J. C., & Walter, B. (2006). The cellular response in neuroinflammation: The role of leukocytes, microglia and astrocytes in neuronal death and survival. *Clin Neurosci Res*, 6(5), 237-245. doi: 10.1016/j.cnr.2006.09.004
- Casadesus, G., Smith, M. A., Zhu, X., Aliev, G., Cash, A. D., Honda, K., . . . Perry, G. (2004). Alzheimer disease: evidence for a central pathogenic role of iron-mediated reactive oxygen species. *J Alzheimers Dis*, 6(2), 165-169.
- Clarke, J. R., Lyra, E. S. N. M., Figueiredo, C. P., Frozza, R. L., Ledo, J. H., Beckman, D., . . . De Felice, F. G. (2015). Alzheimer-associated Abeta oligomers impact the central nervous system to induce peripheral metabolic deregulation. *EMBO Mol Med*, 7(2), 190-210. doi: 10.15252/emmm.201404183
- Clayton, K. A., Van Enoo, A. A., & Ikezu, T. (2017). Alzheimer's Disease: The Role of Microglia in Brain Homeostasis and Proteopathy. *Front Neurosci*, 11, 680. doi: 10.3389/fnins.2017.00680
- Cockerill, I., Oliver, J. A., Xu, H., Fu, B. M., & Zhu, D. (2018). Blood-Brain Barrier Integrity and Clearance of Amyloid-beta from the BBB. *Adv Exp Med Biol*, 1097, 261-278. doi: 10.1007/978-3-319-96445-4_14
- Colton, C. A. (2009). Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol*, 4(4), 399-418. doi: 10.1007/s11481-009-9164-4
- Combs, C. K., Johnson, D. E., Karlo, J. C., Cannady, S. B., & Landreth, G. E. (2000). Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease: inhibition of beta-amyloid-stimulated proinflammatory responses and neurotoxicity by PPARgamma agonists. *J Neurosci.*, 20(2), 558-567.

- Comité Nobel (2017). The Nobel prize in Physiology and Medicine. Disponible en https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2016/
- Coronel, R., Bernabeu-Zornoza, A., Palmer, C., Muniz-Moreno, M., Zambrano, A., Cano, E., & Liste, I. (2018). Role of Amyloid Precursor Protein (APP) and Its Derivatives in the Biology and Cell Fate Specification of Neural Stem Cells. *Mol Neurobiol*, 55(9), 7107-7117. doi: 10.1007/s12035-018-0914-2
- Cribbs, D. H., Berchtold, N. C., Perreau, V., Coleman, P. D., Rogers, J., Tenner, A. J., & Cotman, C. W. (2012). Extensive innate immune gene activation accompanies brain aging, increasing vulnerability to cognitive decline and neurodegeneration: a microarray study. *J Neuroinflammation*, 9, 179. doi: 10.1186/1742-2094-9-179
- Cummings, J. (2018). Lessons Learned from Alzheimer Disease: Clinical Trials with Negative Outcomes. *Clin Transl Sci*, 11(2), 147-152. doi: 10.1111/cts.12491
- Cummings, J. L., & Back, C. (1998). The cholinergic hypothesis of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. *Am J Geriatr Psychiatry*, 6(2 Suppl 1), S64-78.
- Custodio, N., Wheelock, A., Thumala, D., & Slachevsky, A. (2017). Dementia in Latin America: Epidemiological Evidence and Implications for Public Policy. *Front Aging Neurosci*, 9, 221. doi: 10.3389/fnagi.2017.00221
- Chan, Y., Chen, W., Wan, W., Chen, Y., Li, Y., & Zhang, C. (2018). Abeta1-42 oligomer induces alteration of tight junction scaffold proteins via RAGE-mediated autophagy in bEnd.3 cells. *Exp Cell Res*, 369(2), 266-274. doi: 10.1016/j.yexcr.2018.05.025
- Chang, H. Y., Sang, T. K., & Chiang, A. S. (2018). Untangling the Tauopathy for Alzheimer's disease and parkinsonism. *J Biomed Sci*, 25(1), 54. doi: 10.1186/s12929-018-0457-x
- Chen, G., Chen, K. S., Knox, J., Inglis, J., Bernard, A., Martin, S. J., . . . Morris, R. G. (2000). A learning deficit related to age and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature*, 408(6815), 975-979. doi: 10.1038/35050103
- Chen, Z., Jalabi, W., Shpargel, K. B., Farabaugh, K. T., Dutta, R., Yin, X., . . . Trapp, B. D. (2012). Lipopolysaccharide-induced microglial activation and neuroprotection against experimental brain injury is independent of hematogenous TLR4. *J Neurosci*, 32(34), 11706-11715. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0730-12.2012
- Cherry, J. D., Olschowka, J. A., & O'Banion, M. K. (2014). Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation*, 11, 98. doi: 10.1186/1742-2094-11-98
- Cho, M. H., Cho, K., Kang, H. J., Jeon, E. Y., Kim, H. S., Kwon, H. J., . . . Yoon, S. Y. (2014). Autophagy in microglia degrades extracellular beta-amyloid fibrils and regulates the NLRP3 inflammasome. *Autophagy*, 10(10), 1761-1775.
- Choi, B. R., Cho, W. H., Kim, J., Lee, H. J., Chung, C., Jeon, W. K., & Han, J. S. (2014). Increased expression of the receptor for advanced glycation end products in neurons and astrocytes in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Exp Mol Med*, 46, e75. doi: 10.1038/emmm.2013.147
- Chung, K. M., Hernandez, N., Sproul, A. A., & Yu, W. H. (2018). Alzheimer's disease and the autophagic-lysosomal system. *Neurosci Lett*. doi: 10.1016/j.neulet.2018.05.017
- Chung, W. S., Allen, N. J., & Eroglu, C. (2015). Astrocytes Control Synapse Formation, Function, and Elimination. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(9), a020370. doi: 10.1101/cshperspect.a020370
- Chung, W. S., Clarke, L. E., Wang, G. X., Stafford, B. K., Sher, A., Chakraborty, C., . . . Barres, B. A. (2013). Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature*, 504(7480), 394-400. doi: 10.1038/nature12776
- Chvatal, A., Anderova, M., Hock, M., Prajerova, I., Neprasova, H., Chvatal, V., . . . Sykova, E. (2007). Three-dimensional confocal morphometry reveals structural changes in astrocyte morphology in situ. *J.Neurosci.Res.*, 85(2), 260-271.
- da Fonseca, A. C., Matias, D., Garcia, C., Amaral, R., Geraldo, L. H., Freitas, C., & Lima, F. R. (2014). The impact of microglial activation on blood-brain barrier in brain diseases. *Front Cell Neurosci*, 8, 362. doi: 10.3389/fncel.2014.00362
- Dai, W., Lopez, O. L., Carmichael, O. T., Becker, J. T., Kuller, L. H., & Gach, H. M. (2009). Mild cognitive impairment and alzheimer disease: patterns of altered cerebral blood flow at MR imaging. *Radiology*, 250(3), 856-866. doi: 10.1148/radiol.2503080751
- Damani, M. R., Zhao, L., Fontainhas, A. M., Amaral, J., Fariss, R. N., & Wong, W. T. (2011). Age-related alterations in the dynamic behavior of microglia. *Aging Cell*, 10(2), 263-276. doi: 10.1111/j.1474-9726.2010.00660.x
- Daneman, R., Zhou, L., Agalliu, D., Cahoy, J. D., Kaushal, A., & Barres, B. A. (2010). The mouse blood-brain barrier transcriptome: a new resource for understanding the development and function of brain endothelial cells. *PLoS One*, 5(10), e13741. doi: 10.1371/journal.pone.0013741
- De Felice, F. G., & Munoz, D. P. (2016). Opportunities and challenges in developing relevant animal models for Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*, 26, 112-114. doi: 10.1016/j.arr.2016.01.006
- Deane, R., Du, Y. S., Subramanyam, R. K., LaRue, B., Jovanovic, S., Hogg, E., . . . Zlokovic, B. (2003). RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat.Med.*, 9(7), 907-913.
- Deane, R., Sagare, A., Hamm, K., Parisi, M., Lane, S., Finn, M. B., . . . Zlokovic, B. V. (2008). apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain. *J Clin Invest*, 118(12), 4002-4013. doi: 10.1172/JCI36663
- Deane, R., Singh, I., Sagare, A. P., Bell, R. D., Ross, N. T., LaRue, B., . . . Zlokovic, B. V. (2012). A multimodal RAGE-specific inhibitor reduces amyloid beta-mediated brain disorder in a mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest*, 122(4), 1377-1392. doi: 10.1172/JCI58642
- Deane, R., Wu, Z., Sagare, A., Davis, J., Du Yan, S., Hamm, K., . . . Zlokovic, B. V. (2004). LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms. *Neuron*, 43(3), 333-344. doi: 10.1016/j.neuron.2004.07.017
- Dede, A. J., Wixted, J. T., Hopkins, R. O., & Squire, L. R. (2013). Hippocampal damage impairs recognition memory broadly, affecting both parameters in two prominent models of memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(16), 6577-6582. doi: 10.1073/pnas.1304739110
- Demars, M. P., Bartholomew, A., Strakova, Z., & Lazarov, O. (2011). Soluble amyloid precursor protein: a novel proliferation factor of adult progenitor cells of ectodermal and mesodermal origin. *Stem Cell Res Ther*, 2(4), 36. doi: 10.1186/srct77
- Deng, W., Aimone, J. B., & Gage, F. H. (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci*, 11(5), 339-350. doi: 10.1038/nrn2822

- Di Benedetto, B., Malik, V. A., Begum, S., Jablonowski, L., Gomez-Gonzalez, G. B., Neumann, I. D., & Rupprecht, R. (2016). Fluoxetine Requires the Endfeet Protein Aquaporin-4 to Enhance Plasticity of Astrocyte Processes. *Front Cell Neurosci*, 10, 8. doi: 10.3389/fncel.2016.00008
- Di Malta, C., Fryer, J. D., Settembre, C., & Ballabio, A. (2012). Astrocyte dysfunction triggers neurodegeneration in a lysosomal storage disorder. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 109(35), E2334-E2342.
- Di Malta, C., Fryer, J. D., Settembre, C., & Ballabio, A. (2012). Autophagy in astrocytes: a novel culprit in lysosomal storage disorders. *Autophagy*, 8(12), 1871-1872. doi: 10.4161/auto.22184
- Dikic, I. (2017). Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annu Rev Biochem*, 86, 193-224. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-044908
- Dimayuga, F. O., Wang, C., Clark, J. M., Dimayuga, E. R., Dimayuga, V. M., & Bruce-Keller, A. J. (2007). SOD1 overexpression alters ROS production and reduces neurotoxic inflammatory signaling in microglial cells. *J Neuroimmunol*, 182(1-2), 89-99. doi: 10.1016/j.jneuroim.2006.10.003
- Doens, D., & Fernandez, P. L. (2014). Microglia receptors and their implications in the response to amyloid beta for Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neuroinflammation*, 11, 48. doi: 10.1186/1742-2094-11-48
- Drummond, E., & Wisniewski, T. (2017). Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*, 133(2), 155-175. doi: 10.1007/s00401-016-1662-x
- Du, X., Wang, X., & Geng, M. (2018). Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. *Transl Neurodegener*, 7, 2. doi: 10.1186/s40035-018-0107-y
- Du Yan, S., Zhu, H., Fu, J., Yan, S. F., Roher, A., Tourtellotte, W. W., . . . Schmidt, A. M. (1997). Amyloid-beta peptide-receptor for advanced glycation endproduct interaction elicits neuronal expression of macrophage-colony stimulating factor: a proinflammatory pathway in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(10), 5296-5301.
- Dugger, B. N., & Dickson, D. W. (2017). Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9(7). doi: 10.1101/cshperspect.a028035
- Duncombe, J., Lennen, R. J., Jansen, M. A., Marshall, I., Wardlaw, J. M., & Horsburgh, K. (2017). Ageing causes prominent neurovascular dysfunction associated with loss of astrocytic contacts and gliosis. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 43(6), 477-491. doi: 10.1111/nan.12375
- Duran, C. L., Howell, D. W., Dave, J. M., Smith, R. L., Torrie, M. E., Essner, J. J., & Bayless, K. J. (2017). Molecular Regulation of Sprouting Angiogenesis. *Compr Physiol*, 8(1), 153-235. doi: 10.1002/cphy.c160048
- Durand, D., Carniglia, L., Beauquis, J., Caruso, C., Saravia, F., & Lasaga, M. (2014). Astroglial mGlu3 receptors promote alpha-secretase-mediated amyloid precursor protein cleavage. *Neuropharmacology*, 79, 180-189.
- Edison, P., Donat, C. K., & Sastre, M. (2018). In vivo Imaging of Glial Activation in Alzheimer's Disease. *Front Neurol*, 9, 625. doi: 10.3389/fneur.2018.00625
- Eigenmann, D. E., Xue, G., Kim, K. S., Moses, A. V., Hamburger, M., & Oufir, M. (2013). Comparative study of four immortalized human brain capillary endothelial cell lines, hCMEC/D3, hBMEC, TY10, and BB19, and optimization of culture conditions, for an in vitro blood-brain barrier model for drug permeability studies. *Fluids Barriers CNS*, 10(1), 33. doi: 10.1186/2045-8118-10-33
- Fang, F., Lue, L. F., Yan, S., Xu, H., Luddy, J. S., Chen, D., . . . Yan, S. S. (2010). RAGE-dependent signaling in microglia contributes to neuroinflammation, Abeta accumulation, and impaired learning/memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J*, 24(4), 1043-1055. doi: 10.1096/fj.09-139634
- Feldman, H. H., Doody, R. S., Kivipelto, M., Sparks, D. L., Waters, D. D., Jones, R. W., . . . Investigators, L. E. (2010). Randomized controlled trial of atorvastatin in mild to moderate Alzheimer disease: LEADe. *Neurology*, 74(12), 956-964. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181d6476a
- Fernandez-Funez, P., de Mena, L., & Rincon-Limas, D. E. (2015). Modeling the complex pathology of Alzheimer's disease in Drosophila. *Exp Neurol*, 274(Pt A), 58-71. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.05.013
- Ferreira, S. T., Clarke, J. R., Bomfim, T. R., & De Felice, F. G. (2014). Inflammation, defective insulin signaling, and neuronal dysfunction in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.*, 10(1S), S76-S83.
- Fletcher, E. L., Downie, L. E., Hatzopoulos, K., Vessey, K. A., Ward, M. M., Chow, C. L., . . . Wilkinson-Berka, J. L. (2010). The significance of neuronal and glial cell changes in the rat retina during oxygen-induced retinopathy. *Doc Ophthalmol*, 120(1), 67-86. doi: 10.1007/s10633-009-9193-6
- Fonseca, A. C., Oliveira, C. R., Pereira, C. F., & Cardoso, S. M. (2014). Loss of proteostasis induced by amyloid beta peptide in brain endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*, 1843(6), 1150-1161. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.02.016
- Fontainhas, A. M., Wang, M., Liang, K. J., Chen, S., Mettu, P., Damani, M., . . . Wong, W. T. (2011). Microglial morphology and dynamic behavior is regulated by ionotropic glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *PLoS One*, 6(1), e15973. doi: 10.1371/journal.pone.0015973
- Fontana, A., Kristensen, F., Dubs, R., Gerns, D., & Weber, E. (1982). Production of prostaglandin E and an interleukin-1 like factor by cultured astrocytes and C6 glioma cells. *J Immunol*, 129(6), 2413-2419.
- Franco, R., & Cedazo-Minguez, A. (2014). Successful therapies for Alzheimer's disease: why so many in animal models and none in humans? *Front Pharmacol*, 5, 146. doi: 10.3389/fphar.2014.00146
- Franco, R., & Fernandez-Suarez, D. (2015). Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Prog Neurobiol*, 131, 65-86. doi: 10.1016/j.pneurobio.2015.05.003
- Francois, A., Rioux Bilan, A., Quellard, N., Fernandez, B., Janet, T., Chassaing, D., . . . Page, G. (2014). Longitudinal follow-up of autophagy and inflammation in brain of APPswePS1dE9 transgenic mice. *J Neuroinflammation*, 11, 139. doi: 10.1186/s12974-014-0139-x
- Francois, A., Terro, F., Janet, T., Rioux, B. A., Paccalin, M., & Page, G. (2013). Involvement of interleukin-1beta in the autophagic process of microglia: relevance to Alzheimer's disease. *J.Neuroinflammation.*, 10, 151.
- Frank, S., Burbach, G. J., Bonin, M., Walter, M., Streit, W., Bechmann, I., & Deller, T. (2008). TREM2 is upregulated in amyloid plaque-associated microglia in aged APP23 transgenic mice. *Glia*, 56(13), 1438-1447. doi: 10.1002/glia.20710
- Frautschy, S. A., Cole, G. M., & Baird, A. (1992). Phagocytosis and deposition of vascular beta-amyloid in rat brains injected with Alzheimer beta-amyloid. *Am J Pathol*, 140(6), 1389-1399.
- Frost, G. R., & Li, Y. M. (2017). The role of astrocytes in amyloid production and Alzheimer's disease. *Open Biol*, 7(12). doi: 10.1098/rsob.170228
- Fu, Y., Rusznak, Z., Kwok, J. B., Kim, W. S., & Paxinos, G. (2014). Age-dependent alterations of the hippocampal cell composition and proliferative potential in the hAbetaPPSwInd-J20 mouse. *J.Alzheimers.Dis.*, 41(4), 1177-1192.

- Fujii, Y., Maekawa, S., & Morita, M. (2017). Astrocyte calcium waves propagate proximally by gap junction and distally by extracellular diffusion of ATP released from volume-regulated anion channels. *Sci Rep*, 7(1), 13115. doi: 10.1038/s41598-017-13243-0
- Funck, V. R., Ribeiro, L. R., Pereira, L. M., de Oliveira, C. V., Grigoletto, J., Della-Pace, I. D., . . . Oliveira, M. S. (2015). Contrasting effects of Na⁺, K⁺-ATPase activation on seizure activity in acute versus chronic models. *Neuroscience*, 298, 171-179. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.04.031
- Funderburk, S. F., Marcellino, B. K., & Yue, Z. (2010). Cell "self-eating" (autophagy) mechanism in Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med*, 77(1), 59-68. doi: 10.1002/msj.20161
- Galea, E., Morrison, W., Hudry, E., Arbel-Ornath, M., Bacskaï, B. J., Gomez-Isla, T., . . . Hyman, B. T. (2015). Topological analyses in APP/PS1 mice reveal that astrocytes do not migrate to amyloid-beta plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(51), 15556-15561. doi: 10.1073/pnas.1516779112
- Galvan, V., & Bredesen, D. E. (2007). Neurogenesis in the adult brain: implications for Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 6(5), 303-310.
- Garwood, C. J., Pooler, A. M., Atherton, J., Hanger, D. P., & Noble, W. (2011). Astrocytes are important mediators of Abeta-induced neurotoxicity and tau phosphorylation in primary culture. *Cell Death Dis*, 2, e167. doi: 10.1038/cddis.2011.50
- Garwood, C. J., Ratcliffe, L. E., Simpson, J. E., Heath, P. R., Ince, P. G., & Wharton, S. B. (2017). Review: Astrocytes in Alzheimer's disease and other age-associated dementias: a supporting player with a central role. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 43(4), 281-298. doi: 10.1111/nan.12338
- German, D. C., Nelson, O., Liang, F., Liang, C. L., & Games, D. (2005). The PDAPP mouse model of Alzheimer's disease: locus coeruleus neuronal shrinkage. *J Comp Neurol*, 492(4), 469-476. doi: 10.1002/cne.20744
- Ghavami, S., Shojaei, S., Yeganeh, B., Ande, S. R., Jangamreddy, J. R., Mehrpour, M., . . . Los, M. J. (2014). Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol*, 112, 24-49. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.10.004
- Giatti, S., Boraso, M., Melcangi, R. C., & Viviani, B. (2012). Neuroactive steroids, their metabolites, and neuroinflammation. *J Mol Endocrinol*, 49(3), R125-134. doi: 10.1530/JME-12-0127
- Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D., & Huber, T. (2013). Origin and differentiation of microglia. *Front Cell Neurosci*, 7, 45. doi: 10.3389/fncel.2013.00045
- Gitler, A. D., Dhillon, P., & Shorter, J. (2017). Neurodegenerative disease: models, mechanisms, and a new hope. *Dis Model Mech*, 10(5), 499-502. doi: 10.1242/dmm.030205
- Gold, M., Alderton, C., Zvartau-Hind, M., Egginton, S., Saunders, A. M., Irizarry, M., . . . Sawchak, S. (2010). Rosiglitazone monotherapy in mild-to-moderate Alzheimer's disease: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 30(2), 131-146. doi: 10.1159/000318845
- Gold, M., & El Khoury, J. (2015). beta-amyloid, microglia, and the inflammasome in Alzheimer's disease. *Semin Immunopathol*, 37(6), 607-611. doi: 10.1007/s00281-015-0518-0
- Golden, P. L., Maccagnan, T. J., & Pardridge, W. M. (1997). Human blood-brain barrier leptin receptor. Binding and endocytosis in isolated human brain microvessels. *J Clin Invest*, 99(1), 14-18. doi: 10.1172/JCI119125
- Goldfarb, L. G., Brown, P., McCombie, W. R., Goldgaber, D., Swergold, G. D., Wills, P. R., . . . Gajdusek, D. C. (1991). Transmissible familial Creutzfeldt-Jakob disease associated with five, seven, and eight extra octapeptide coding repeats in the PRNP gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(23), 10926-10930.
- Goldman, J. S., Hahn, S. E., Catania, J. W., LaRusse-Eckert, S., Butson, M. B., Rumbaugh, M., . . . the National Society of Genetic, C. (2011). Genetic counseling and testing for Alzheimer disease: joint practice guidelines of the American College of Medical Genetics and the National Society of Genetic Counselors. *Genet Med*, 13(6), 597-605. doi: 10.1097/GIM.0b013e31821d69b8
- Goldshmit, Y., Kanner, S., Zacs, M., Frisca, F., Pinto, A. R., Currie, P. D., & Pinkas-Kramarski, R. (2015). Rapamycin increases neuronal survival, reduces inflammation and astrocyte proliferation after spinal cord injury. *Mol Cell Neurosci*, 68, 82-91. doi: 10.1016/j.mcn.2015.04.006
- Goldstein, L. S. (2012). Axonal transport and neurodegenerative disease: can we see the elephant? *Prog Neurobiol*, 99(3), 186-190. doi: 10.1016/j.pneurobio.2012.03.006
- Gomez-Nicola, D., & Perry, V. H. (2015). Microglial dynamics and role in the healthy and diseased brain: a paradigm of functional plasticity. *Neuroscientist*, 21(2), 169-184. doi: 10.1177/1073858414530512
- Gonzalez-Reyes, R. E., Nava-Mesa, M. O., Vargas-Sanchez, K., Ariza-Salamanca, D., & Mora-Munoz, L. (2017). Involvement of Astrocytes in Alzheimer's Disease from a Neuroinflammatory and Oxidative Stress Perspective. *Front Mol Neurosci*, 10, 427. doi: 10.3389/fnmol.2017.00427
- Gonzalez-Reyes, R. E., & Rubiano, M. G. (2018). Astrocyte s RAGE: More Than Just a Question of Mood. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*, 18(1), 39-48. doi: 10.2174/1871524916999160505105121
- Graeber, M. B., Li, W., & Rodriguez, M. L. (2011). Role of microglia in CNS inflammation. *FEBS Lett*, 585(23), 3798-3805. doi: 10.1016/j.febslet.2011.08.033
- Graham, W. V., Bonito-Oliva, A., & Sakmar, T. P. (2017). Update on Alzheimer's Disease Therapy and Prevention Strategies. *Annu Rev Med*, 68, 413-430. doi: 10.1146/annurev-med-042915-103753
- Griffin, W. S., Stanley, L. C., Ling, C., White, L., MacLeod, V., Perrot, L. J., . . . Araoz, C. (1989). Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(19), 7611-7615.
- Guerreiro, R., Wojtas, A., Bras, J., Carrasquillo, M., Rogaeva, E., Majounie, E., . . . Alzheimer Genetic Analysis, G. (2013). TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 368(2), 117-127. doi: 10.1056/NEJMoa1211851
- Gunawardena, S., & Goldstein, L. S. (2001). Disruption of axonal transport and neuronal viability by amyloid precursor protein mutations in *Drosophila*. *Neuron*, 32(3), 389-401.
- Gustin, A., Kirchmeyer, M., Koncina, E., Felten, P., Losciuto, S., Heurtaux, T., . . . Dostert, C. (2015). NLRP3 Inflammasome Is Expressed and Functional in Mouse Brain Microglia but Not in Astrocytes. *PLoS One*, 10(6), e0130624. doi: 10.1371/journal.pone.0130624
- Hansen, D. V., Hanson, J. E., & Sheng, M. (2018). Microglia in Alzheimer's disease. *J Cell Biol*, 217(2), 459-472. doi: 10.1083/jcb.201709069
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., . . . Mizushima, N. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, 441(7095), 885-889.

- Harari, O. A., & Liao, J. K. (2010). NF-kappaB and innate immunity in ischemic stroke. *Ann N Y Acad Sci*, 1207, 32-40. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05735.x
- Hasebe, N., Fujita, Y., Ueno, M., Yoshimura, K., Fujino, Y., & Yamashita, T. (2013). Soluble beta-amyloid Precursor Protein Alpha binds to p75 neurotrophin receptor to promote neurite outgrowth. *PLoS One*, 8(12), e82321. doi: 10.1371/journal.pone.0082321
- Hatami, A., Monjazebe, S., & Glabe, C. (2016). The Anti-Amyloid-beta Monoclonal Antibody 4G8 Recognizes a Generic Sequence-Independent Epitope Associated with alpha-Synuclein and Islet Amyloid Polypeptide Amyloid Fibrils. *J Alzheimers Dis*, 50(2), 517-525. doi: 10.3233/JAD-150696
- Hayashi, Y., Nomura, M., Yamagishi, S., Harada, S., Yamashita, J., & Yamamoto, H. (1997). Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes. *Glia*, 19(1), 13-26.
- Hays, C. C., Zlatar, Z. Z., & Wierenga, C. E. (2016). The Utility of Cerebral Blood Flow as a Biomarker of Preclinical Alzheimer's Disease. *Cell Mol Neurobiol*, 36(2), 167-179. doi: 10.1007/s10571-015-0261-z
- Heimfarth, L., da Silva Ferreira, F., Pierozan, P., Loureiro, S. O., Mingori, M. R., Moreira, J. C. F., . . . Pessoa-Pureur, R. (2016). Calcium signaling mechanisms disrupt the cytoskeleton of primary astrocytes and neurons exposed to diphenyliditelluride. *Biochim Biophys Acta*, 1860(11 Pt A), 2510-2520. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.07.023
- Heneka, M. T., Carson, M. J., El Khoury, J., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., . . . Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*, 14(4), 388-405. doi: 10.1016/S1474-4422(15)70016-5
- Hickman, S., Izzy, S., Sen, P., Morsett, L., & El Khoury, J. (2018). Microglia in neurodegeneration. *Nat Neurosci*, 21(10), 1359-1369. doi: 10.1038/s41593-018-0242-x
- Hinwood, M., Morandini, J., Day, T. A., & Walker, F. R. (2012). Evidence that microglia mediate the neurobiological effects of chronic psychological stress on the medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex*, 22(6), 1442-1454. doi: 10.1093/cercor/bhr229
- Hoeijmakers, L., Meerhoff, G. F., de Vries, J. W., Ruigrok, S. R., van Dam, A. M., van Leuven, F., . . . Lucassen, P. J. (2018). The age-related slow increase in amyloid pathology in APP.V717I mice activates microglia, but does not alter hippocampal neurogenesis. *Neurobiol Aging*, 61, 112-123. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2017.09.013
- Hofmann, M. A., Drury, S., Fu, C., Qu, W., Taguchi, A., Lu, Y., . . . Schmidt, A. M. (1999). RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*, 97(7), 889-901.
- Hollands, C., Bartolotti, N., & Lazarov, O. (2016). Alzheimer's Disease and Hippocampal Adult Neurogenesis; Exploring Shared Mechanisms. *Front Neurosci*, 10, 178. doi: 10.3389/fnins.2016.00178
- Hollands, C., Tobin, M. K., Hsu, M., Musaraca, K., Yu, T. S., Mishra, R., . . . Lazarov, O. (2017). Depletion of adult neurogenesis exacerbates cognitive deficits in Alzheimer's disease by compromising hippocampal inhibition. *Mol Neurodegener*, 12(1), 64. doi: 10.1186/s13024-017-0207-7
- Hong, S., Beja-Glasser, V. F., Nfonoyim, B. M., Frouin, A., Li, S., Ramakrishnan, S., . . . Stevens, B. (2016). Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science*, 352(6286), 712-716. doi: 10.1126/science.aad8373
- Hori, O., Brett, J., Slattery, T., Cao, R., Zhang, J., Chen, J. X., . . . et al. (1995). The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphotericin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphotericin in the developing nervous system. *J Biol Chem*, 270(43), 25752-25761.
- Hu, J., & Van Eldik, L. J. (1999). Glial-derived proteins activate cultured astrocytes and enhance beta amyloid-induced glial activation. *Brain Res*, 842(1), 46-54.
- Huang, W. C., & Hung, M. C. (2013). Beyond NF-kappaB activation: nuclear functions of IkappaB kinase alpha. *J Biomed Sci*, 20, 3. doi: 10.1186/1423-0127-20-3
- Hung, S. Y., & Fu, W. M. (2017). Drug candidates in clinical trials for Alzheimer's disease. *J Biomed Sci*, 24(1), 47. doi: 10.1186/s12929-017-0355-7
- Hwang, S. H., Choi, Y. G., Jeong, M. Y., Hong, Y. M., Lee, J. H., & Lim, S. (2009). Microarray analysis of gene expression profile by treatment of Cinnamomi Ramulus in lipopolysaccharide-stimulated BV-2 cells. *Gene*, 443(1-2), 83-90. doi: 10.1016/j.gene.2009.04.024
- Iadecola, C. (2017). The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron*, 96(1), 17-42. doi: 10.1016/j.neuron.2017.07.030
- Iadecola, C., Zhang, F., Niwa, K., Eckman, C., Turner, S. K., Fischer, E., . . . Carlson, G. A. (1999). SOD1 rescues cerebral endothelial dysfunction in mice overexpressing amyloid precursor protein. *Nat Neurosci*, 2(2), 157-161. doi: 10.1038/5715
- Iliff, J. J., Wang, M., Liao, Y., Plogg, B. A., Peng, W., Gundersen, G. A., . . . Nedergaard, M. (2012). A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid beta. *Sci Transl Med*, 4(147), 147ra111. doi: 10.1126/scitranslmed.3003748
- Itagaki, S., McGeer, P. L., Akiyama, H., Zhu, S., & Selkoe, D. (1989). Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. *J Neuroimmunol*, 24(3), 173-182.
- Iturria-Medina, Y., Sotero, R. C., Toussaint, P. J., Mateos-Perez, J. M., Evans, A. C., & Alzheimer's Disease Neuroimaging, I. (2016). Early role of vascular dysregulation on late-onset Alzheimer's disease based on multifactorial data-driven analysis. *Nat Commun*, 7, 11934. doi: 10.1038/ncomms11934
- Jack, C. R., Jr., Bennett, D. A., Blennow, K., Carrillo, M. C., Dunn, B., Haeberlein, S. B., . . . Contributors. (2018). NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 14(4), 535-562. doi: 10.1016/j.jalz.2018.02.018
- Janelidze, S., Mattsson, N., Stomrud, E., Lindberg, O., Palmqvist, S., Zetterberg, H., . . . Hansson, O. (2018). CSF biomarkers of neuroinflammation and cerebrovascular dysfunction in early Alzheimer disease. *Neurology*, 91(9), e867-e877. doi: 10.1212/WNL.00000000000006082
- Janota, C. S., Brites, D., Lemere, C. A., & Brito, M. A. (2015). Glio-vascular changes during ageing in wild-type and Alzheimer's disease-like APP/PS1 mice. *Brain Res*, 1620, 153-168. doi: 10.1016/j.brainres.2015.04.056
- Jay, T. R., Miller, C. M., Cheng, P. J., Graham, L. C., Bemiller, S., Broihier, M. L., . . . Lamb, B. T. (2015). TREM2 deficiency eliminates TREM2+ inflammatory macrophages and ameliorates pathology in Alzheimer's disease mouse models. *J Exp Med*, 212(3), 287-295. doi: 10.1084/jem.20142322
- Jellinger, K. A. (2006). Alzheimer 100--highlights in the history of Alzheimer research. *J Neural Transm.*, 113(11), 1603-1623.
- Jessen, N. A., Munk, A. S., Lundgaard, I., & Nedergaard, M. (2015). The Glymphatic System: A Beginner's Guide. *Neurochem Res*, 40(12), 2583-2599. doi: 10.1007/s11064-015-1581-6

- Ji, C. H., & Kwon, Y. T. (2017). Crosstalk and Interplay between the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy. *Mol Cells*, 40(7), 441-449. doi: 10.14348/molcells.2017.0115
- Johann, S., Heitzer, M., Kanagaratnam, M., Goswami, A., Rizo, T., Weis, J., . . . Beyer, C. (2015). NLRP3 inflammasome is expressed by astrocytes in the SOD1 mouse model of ALS and in human sporadic ALS patients. *Glia*, 63(12), 2260-2273. doi: 10.1002/glia.22891
- Johansson, A. C., Appelqvist, H., Nilsson, C., Kagedal, K., Roberg, K., & Ollinger, K. (2010). Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane permeabilization. *Apoptosis*, 15(5), 527-540. doi: 10.1007/s10495-009-0452-5
- Johnsen, K. B., Burkhart, A., Melander, F., Kempen, P. J., Vejlebo, J. B., Siupka, P., . . . Moos, T. (2017). Targeting transferrin receptors at the blood-brain barrier improves the uptake of immunoliposomes and subsequent cargo transport into the brain parenchyma. *Sci Rep*, 7(1), 10396. doi: 10.1038/s41598-017-11220-1
- Johnstone, E. M., Chaney, M. O., Norris, F. H., Pascual, R., & Little, S. P. (1991). Conservation of the sequence of the Alzheimer's disease amyloid peptide in dog, polar bear and five other mammals by cross-species polymerase chain reaction analysis. *Brain Res Mol Brain Res*, 10(4), 299-305.
- Jones, R. S., Minogue, A. M., Connor, T. J., & Lynch, M. A. (2013). Amyloid-beta-induced astrocytic phagocytosis is mediated by CD36, CD47 and RAGE. *J Neuroimmune Pharmacol*, 8(1), 301-311. doi: 10.1007/s11481-012-9427-3
- Juhasz, G. (2012). Interpretation of bafilomycin, pH neutralizing or protease inhibitor treatments in autophagic flux experiments: novel considerations. *Autophagy*, 8(12), 1875-1876.
- Kamphuis, W., Mamber, C., Moeton, M., Kooijman, L., Sluijs, J. A., Jansen, A. H., . . . Hol, E. M. (2012). GFAP isoforms in adult mouse brain with a focus on neurogenic astrocytes and reactive astrogliosis in mouse models of Alzheimer disease. *PLoS One*, 7(8), e42823. doi: 10.1371/journal.pone.0042823
- Kamphuis, W., Middeldorp, J., Kooijman, L., Sluijs, J. A., Kooi, E. J., Moeton, M., . . . Hol, E. M. (2014). Glial fibrillary acidic protein isoform expression in plaque related astrogliosis in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 35(3), 492-510. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.035
- Kanekiyo, T., & Bu, G. (2014). The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 and amyloid-beta clearance in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci*, 6, 93. doi: 10.3389/fnagi.2014.00093
- Karch, C. M., Cruchaga, C., & Goate, A. M. (2014). Alzheimer's disease genetics: from the bench to the clinic. *Neuron*, 83(1), 11-26. doi: 10.1016/j.neuron.2014.05.041
- Karperien, A., Ahammer, H., & Jelinek, H. F. (2013). Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Front Cell Neurosci*, 7, 3.
- Katsuragi, Y., Ichimura, Y., & Komatsu, M. (2015). p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. *FEBS J*, 282(24), 4672-4678. doi: 10.1111/febs.13540
- Kaushik, S., & Cuervo, A. M. (2012). Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol*, 22(8), 407-417. doi: 10.1016/j.tcb.2012.05.006
- Kaushik, S., & Cuervo, A. M. (2015). Proteostasis and aging. *Nat Med*, 21(12), 1406-1415. doi: 10.1038/nm.4001
- Kempermann, G., Gage, F. H., Aigner, L., Song, H., Curtis, M. A., Thuret, S., . . . Frisen, J. (2018). Human Adult Neurogenesis: Evidence and Remaining Questions. *Cell Stem Cell*, 23(1), 25-30. doi: 10.1016/j.stem.2018.04.004
- Keren-Shaul, H., Spinrad, A., Weiner, A., Matcovitch-Natan, O., Dvir-Szternfeld, R., Ulland, T. K., . . . Amit, I. (2017). A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell*, 169(7), 1276-1290 e1217. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.018
- Kettenmann, H., & Verkhratsky, A. (2008). Neuroglia: the 150 years after. *Trends Neurosci*, 31(12), 653-659.
- Kim, H. J., Cho, M. H., Shim, W. H., Kim, J. K., Jeon, E. Y., Kim, D. H., & Yoon, S. Y. (2017). Deficient autophagy in microglia impairs synaptic pruning and causes social behavioral defects. *Mol Psychiatry*, 22(11), 1576-1584. doi: 10.1038/mp.2016.103
- Kim, K. A., Shin, D., Kim, J. H., Shin, Y. J., Rajanikant, G. K., Majid, A., . . . Bae, O. N. (2018). Role of Autophagy in Endothelial Damage and Blood-Brain Barrier Disruption in Ischemic Stroke. *Stroke*, 49(6), 1571-1579. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.017287
- Kim, M. O., Takada, L. T., Wong, K., Forner, S. A., & Geschwind, M. D. (2018). Genetic PrP Prion Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 10(5). doi: 10.1101/cshperspect.a033134
- Kimbrough, I. F., Robel, S., Roberson, E. D., & Sontheimer, H. (2015). Vascular amyloidosis impairs the gliovascular unit in a mouse model of Alzheimer's disease. *Brain*, 138(Pt 12), 3716-3733. doi: 10.1093/brain/awv327
- Kimelberg, H. K. (2010). Functions of mature mammalian astrocytes: a current view. *Neuroscientist*, 16(1), 79-106. doi: 10.1177/1073858409342593
- Kisler, K., Nelson, A. R., Montagne, A., & Zlokovic, B. V. (2017). Cerebral blood flow regulation and neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci*, 18(7), 419-434. doi: 10.1038/nrn.2017.48
- Kleindienst, A., McGinn, M. J., Harvey, H. B., Colello, R. J., Hamm, R. J., & Bullock, M. R. (2005). Enhanced hippocampal neurogenesis by intraventricular S100B infusion is associated with improved cognitive recovery after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 22(6), 645-655. doi: 10.1089/neu.2005.22.645
- Koistinaho, M., Lin, S., Wu, X., Esterman, M., Koger, D., Hanson, J., . . . Paul, S. M. (2004). Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-beta peptides. *Nat Med*, 10(7), 719-726. doi: 10.1038/nm1058
- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., . . . Tanaka, K. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*, 441(7095), 880-884.
- Kook, S. Y., Hong, H. S., Moon, M., Ha, C. M., Chang, S., & Mook-Jung, I. (2012). Abeta1(-)(4)(2)-RAGE interaction disrupts tight junctions of the blood-brain barrier via Ca(2)(+)-calcineurin signaling. *J Neurosci*, 32(26), 8845-8854. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6102-11.2012
- Kordower, J. H., Chu, Y., Stebbins, G. T., DeKosky, S. T., Cochran, E. J., Bennett, D., & Mufson, E. J. (2001). Loss and atrophy of layer II entorhinal cortex neurons in elderly people with mild cognitive impairment. *Ann Neurol*, 49(2), 202-213.
- Kovacs, G. G. (2015). Invited review: Neuropathology of tauopathies: principles and practice. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 41(1), 3-23. doi: 10.1111/nan.12208
- Kress, B. T., Iliff, J. J., Xia, M., Wang, M., Wei, H. S., Zeppenfeld, D., . . . Nedergaard, M. (2014). Impairment of paravascular clearance pathways in the aging brain. *Ann Neurol*, 76(6), 845-861. doi: 10.1002/ana.24271
- Kroemer, G., & Jaattela, M. (2005). Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer*, 5(11), 886-897. doi: 10.1038/nrc1738

- Kulczar, C., Lubin, K. E., Lefebvre, S., Miller, D. W., & Knipp, G. T. (2017). Development of a direct contact astrocyte-human cerebral microvessel endothelial cells blood-brain barrier coculture model. *J Pharm Pharmacol*, 69(12), 1684-1696. doi: 10.1111/jphp.12803
- Kulkarni, A., Chen, J., & Maday, S. (2018). Neuronal autophagy and intercellular regulation of homeostasis in the brain. *Curr Opin Neurobiol*, 51, 29-36. doi: 10.1016/j.conb.2018.02.008
- Kumar-Singh, S., Pirici, D., McGowan, E., Serneels, S., Ceuterick, C., Hardy, J., . . . Van Broeckhoven, C. (2005). Dense-core plaques in Tg2576 and PSAPP mouse models of Alzheimer's disease are centered on vessel walls. *Am J Pathol*, 167(2), 527-543. doi: 10.1016/S0002-9440(10)62995-1
- Kumaraswamy, P., Sethuraman, S., & Krishnan, U. M. (2014). Designing in vitro strategies and in vivo models for Alzheimer's disease - promises & challenges. *Curr Alzheimer Res*, 11(6), 588-607.
- Labbadia, J., & Morimoto, R. I. (2014). Proteostasis and longevity: when does aging really begin? *F1000Prime Rep*, 6, 7. doi: 10.12703/P6-7
- Lagenaur, C., & Lemmon, V. (1987). An L1-like molecule, the 8D9 antigen, is a potent substrate for neurite extension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(21), 7753-7757.
- Lai, M., Yao, H., Shah, S. Z. A., Wu, W., Wang, D., Zhao, Y., . . . Yang, L. (2018). The NLRP3-Caspase 1 Inflammasome Negatively Regulates Autophagy via TLR4-TRIF in Prion Peptide-Infected Microglia. *Front Aging Neurosci*, 10, 116. doi: 10.3389/fnagi.2018.00116
- Lantos, P. L. (1998). The definition of multiple system atrophy: a review of recent developments. *J Neuropathol Exp Neurol*, 57(12), 1099-1111.
- Laurent, C., Buee, L., & Blum, D. (2018). Tau and neuroinflammation: What impact for Alzheimer's Disease and Tauopathies? *Biomed J*, 41(1), 21-33. doi: 10.1016/j.bj.2018.01.003
- Lecuyer, M. A., Kebir, H., & Prat, A. (2016). Glial influences on BBB functions and molecular players in immune cell trafficking. *Biochim Biophys Acta*, 1862(3), 472-482. doi: 10.1016/j.bbdis.2015.10.004
- LeDoux, J. (2003). The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cell Mol Neurobiol*, 23(4-5), 727-738.
- Lee, H. J., Kim, C., & Lee, S. J. (2010). Alpha-synuclein stimulation of astrocytes: Potential role for neuroinflammation and neuroprotection. *Oxid Med Cell Longev*, 3(4), 283-287. doi: 10.4161/oxim.3.4.12809
- Lee, S., Sato, Y., & Nixon, R. A. (2011). Lysosomal proteolysis inhibition selectively disrupts axonal transport of degradative organelles and causes an Alzheimer's-like axonal dystrophy. *J Neurosci*, 31(21), 7817-7830. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6412-10.2011
- Lee, S. J., Seo, B. R., & Koh, J. Y. (2015). Metallothionein-3 modulates the amyloid beta endocytosis of astrocytes through its effects on actin polymerization. *Mol Brain*, 8(1), 84. doi: 10.1186/s13041-015-0173-3
- Li, C., Zhao, R., Gao, K., Wei, Z., Yin, M. Y., Lau, L. T., . . . Hoi Yu, A. C. (2011). Astrocytes: implications for neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*, 8(1), 67-80.
- Li, H., Guo, Q., Inoue, T., Polito, V. A., Tabuchi, K., Hammer, R. E., . . . Zheng, H. (2014). Vascular and parenchymal amyloid pathology in an Alzheimer disease knock-in mouse model: interplay with cerebral blood flow. *Mol Neurodegener*, 9, 28. doi: 10.1186/1750-1326-9-28
- Li, W. L., Yu, S. P., Chen, D., Yu, S. S., Jiang, Y. J., Genetta, T., & Wei, L. (2013). The regulatory role of NF-kappaB in autophagy-like cell death after focal cerebral ischemia in mice. *Neuroscience*, 244, 16-30. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.03.045
- Li, Y., Mu, Y., & Gage, F. H. (2009). Development of neural circuits in the adult hippocampus. *Curr Top Dev Biol*, 87, 149-174. doi: 10.1016/S0070-2153(09)01205-8
- Lin, A. L., Zheng, W., Halloran, J. J., Burbank, R. R., Hussong, S. A., Hart, M. J., . . . Galvan, V. (2013). Chronic rapamycin restores brain vascular integrity and function through NO synthase activation and improves memory in symptomatic mice modeling Alzheimer's disease. *J Cereb Blood Flow Metab*, 33(9), 1412-1421.
- Lipton, S. A. (2005). The molecular basis of memantine action in Alzheimer's disease and other neurologic disorders: low-affinity, uncompetitive antagonism. *Curr Alzheimer Res*, 2(2), 155-165.
- Liu, B., Rasool, S., Yang, Z., Glabe, C. G., Schreiber, S. S., Ge, J., & Tan, Z. (2009). Amyloid-peptide vaccinations reduce {beta}-amyloid plaques but exacerbate vascular deposition and inflammation in the retina of Alzheimer's transgenic mice. *Am J Pathol*, 175(5), 2099-2110. doi: 10.2353/ajpath.2009.090159
- Liu, C. C., Liu, C. C., Kanekiyo, T., Xu, H., & Bu, G. (2013). Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol*, 9(2), 106-118. doi: 10.1038/nrneurol.2012.263
- Liu, J., Weaver, J., Jin, X., Zhang, Y., Xu, J., Liu, K. J., . . . Liu, W. (2016). Nitric Oxide Interacts with Caveolin-1 to Facilitate Autophagy-Lysosome-Mediated Claudin-5 Degradation in Oxygen-Glucose Deprivation-Treated Endothelial Cells. *Mol Neurobiol*, 53(9), 5935-5947. doi: 10.1007/s12035-015-9504-8
- Liu, Y., Wang, R., Zhao, Z., Dong, W., Zhang, X., Chen, X., & Ma, L. (2017). Short-term caloric restriction exerts neuroprotective effects following mild traumatic brain injury by promoting autophagy and inhibiting astrocyte activation. *Behav Brain Res*, 331, 135-142. doi: 10.1016/j.bbr.2017.04.024
- Lopez-Otin, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194-1217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039
- Louveau, A., Plog, B. A., Antila, S., Alitalo, K., Nedergaard, M., & Kipnis, J. (2017). Understanding the functions and relationships of the glymphatic system and meningeal lymphatics. *J Clin Invest*, 127(9), 3210-3219. doi: 10.1172/JCI90603
- Lovatt, D., Xu, Q., Liu, W., Takano, T., Smith, N. A., Schnermann, J., . . . Nedergaard, M. (2012). Neuronal adenosine release, and not astrocytic ATP release, mediates feedback inhibition of excitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(16), 6265-6270. doi: 10.1073/pnas.1120997109
- Lue, L. F., Schmitz, C. T., Serrano, G., Sue, L. I., Beach, T. G., & Walker, D. G. (2015). TREM2 Protein Expression Changes Correlate with Alzheimer's Disease Neurodegenerative Pathologies in Post-Mortem Temporal Cortices. *Brain Pathol*, 25(4), 469-480. doi: 10.1111/bpa.12190
- Lyman, M., Lloyd, D. G., Ji, X., Vizcaychipi, M. P., & Ma, D. (2014). Neuroinflammation: the role and consequences. *Neurosci Res*, 79, 1-12. doi: 10.1016/j.neures.2013.10.004
- Maezawa, I., Zimin, P. I., Wulff, H., & Jin, L. W. (2011). Amyloid-beta protein oligomer at low nanomolar concentrations activates microglia and induces microglial neurotoxicity. *J Biol Chem*, 286(5), 3693-3706. doi: 10.1074/jbc.M110.135244
- Maia, G. H., Quesado, J. L., Soares, J. I., do Carmo, J. M., Andrade, P. A., Andrade, J. P., & Lukoyanov, N. V. (2014). Loss of hippocampal neurons after kainate treatment correlates with behavioral deficits. *PLoS One*, 9(1), e84722.
- Maren, S. (2005). Synaptic mechanisms of associative memory in the amygdala. *Neuron*, 47(6), 783-786.

- Marin-Burgin, A., & Schinder, A. F. (2012). Requirement of adult-born neurons for hippocampus-dependent learning. *Behav. Brain Res.*, 227(2), 391-399.
- Martínez-López, N., Athonvarangkul, D., & Singh, R. (2015). Autophagy and aging. *Adv Exp Med Biol*, 847, 73-87. doi: 10.1007/978-1-4939-2404-2_3
- Martínez, F. O., & Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*, 6, 13. doi: 10.12703/P6-13
- Masvidal, L., Hulea, L., Furic, L., Topisirovic, I., & Larsson, O. (2017). mTOR-sensitive translation: Cleared fog reveals more trees. *RNA Biol*, 14(10), 1299-1305. doi: 10.1080/15476286.2017.1290041
- Matsui, T., Mori, T., Tateishi, N., Kagamiishi, Y., Satoh, S., Katsube, N., . . . Asano, T. (2002). Astrocytic activation and delayed infarct expansion after permanent focal ischemia in rats. Part I: enhanced astrocytic synthesis of s-100beta in the periinfarct area precedes delayed infarct expansion. *J.Cereb.Blood Flow Metab*, 22(6), 711-722.
- Meijer, A. J., & Codogno, P. (2009). Autophagy: regulation and role in disease. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 46(4), 210-240. doi: 10.1080/10408360903044068
- Meijer, A. J., Lorin, S., Blommaert, E. F., & Codogno, P. (2015). Regulation of autophagy by amino acids and MTOR-dependent signal transduction. *Amino Acids*, 47(10), 2037-2063. doi: 10.1007/s00726-014-1765-4
- Menassa, D. A., & Gomez-Nicola, D. (2018). Microglial Dynamics During Human Brain Development. *Front Immunol*, 9, 1014. doi: 10.3389/fimmu.2018.01014
- Merlini, M., Meyer, E. P., Ulmann-Schuler, A., & Nitsch, R. M. (2011). Vascular beta-amyloid and early astrocyte alterations impair cerebrovascular function and cerebral metabolism in transgenic arcAbeta mice. *Acta Neuropathol.*, 122(3), 293-311.
- Mhillaj, E., Cuomo, V., & Mancuso, C. (2017). The contribution of transgenic and nontransgenic animal models in Alzheimer's disease drug research and development. *Behav Pharmacol*, 28(2 and 3-Spec Issue), 95-111. doi: 10.1097/FBP.0000000000000296
- Mijaljica, D., Prescott, M., & Devenish, R. J. (2011). Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy*, 7(7), 673-682.
- Miller, D. L., Papayannopoulos, I. A., Styles, J., Bobin, S. A., Lin, Y. Y., Biemann, K., & Iqbal, K. (1993). Peptide compositions of the cerebrovascular and senile plaque core amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Arch Biochem Biophys*, 301(1), 41-52. doi: 10.1006/abbi.1993.1112
- Miraglia, M. C., Rodriguez, A. M., Barrionuevo, P., Rodriguez, J., Kim, K. S., Dennis, V. A., . . . Giambartolomei, G. H. (2018). Brucella abortus Traverses Brain Microvascular Endothelial Cells Using Infected Monocytes as a Trojan Horse. *Front Cell Infect Microbiol*, 8, 200. doi: 10.3389/fcimb.2018.00200
- Mishra, A. (2017). Binaural blood flow control by astrocytes: listening to synapses and the vasculature. *J Physiol*, 595(6), 1885-1902. doi: 10.1113/JP270979
- Mizushima, N., & Yoshimori, T. (2007). How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, 3(6), 542-545.
- Mo, J. J., Li, J. Y., Yang, Z., Liu, Z., & Feng, J. S. (2017). Efficacy and safety of anti-amyloid-beta immunotherapy for Alzheimer's disease: a systematic review and network meta-analysis. *Ann Clin Transl Neurol*, 4(12), 931-942. doi: 10.1002/acn3.469
- Monson, N. L., Ireland, S. J., Ligocki, A. J., Chen, D., Rounds, W. H., Li, M., . . . Zhang, R. (2014). Elevated CNS inflammation in patients with preclinical Alzheimer's disease. *J Cereb Blood Flow Metab*, 34(1), 30-33. doi: 10.1038/jcbfm.2013.183
- Montagne, A., Barnes, S. R., Sweeney, M. D., Halliday, M. R., Sagare, A. P., Zhao, Z., . . . Zlokovic, B. V. (2015). Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron*, 85(2), 296-302.
- Montagne, A., Nation, D. A., Pa, J., Sweeney, M. D., Toga, A. W., & Zlokovic, B. V. (2016). Brain imaging of neurovascular dysfunction in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 131(5), 687-707. doi: 10.1007/s00401-016-1570-0
- Montagne, A., Zhao, Z., & Zlokovic, B. V. (2017). Alzheimer's disease: A matter of blood-brain barrier dysfunction? *J Exp Med*, 214(11), 3151-3169. doi: 10.1084/jem.20171406
- Morales, I., Jimenez, J. M., Mancilla, M., & Maccioni, R. B. (2013). Tau oligomers and fibrils induce activation of microglial cells. *J Alzheimers Dis*, 37(4), 849-856. doi: 10.3233/JAD-131843
- Morawe, T., Hiebel, C., Kern, A., & Behl, C. (2012). Protein homeostasis, aging and Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*, 46(1), 41-54. doi: 10.1007/s12035-012-8246-0
- Morley, J. E. (2002). The SAMP8 mouse: a model of Alzheimer disease? *Biogerontology*, 3(1-2), 57-60.
- Morley, J. E., Kumar, V. B., Bernardo, A. E., Farr, S. A., Uezu, K., Tumosa, N., & Flood, J. F. (2000). Beta-amyloid precursor polypeptide in SAMP8 mice affects learning and memory. *Peptides*, 21(12), 1761-1767.
- Motori, E., Puyal, J., Toni, N., Ghanem, A., Angeloni, C., Malaguti, M., . . . Bergami, M. (2013). Inflammation-induced alteration of astrocyte mitochondrial dynamics requires autophagy for mitochondrial network maintenance. *Cell Metab*, 18(6), 844-859. doi: 10.1016/j.cmet.2013.11.005
- Mrak, R. E., & Griffinbc, W. S. (2001). The role of activated astrocytes and of the neurotrophic cytokine S100B in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol.Aging*, 22(6), 915-922.
- Mu, Y., & Gage, F. H. (2011). Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*, 6, 85. doi: 10.1186/1750-1326-6-85
- Mucke, L., Masliah, E., Yu, G. Q., Mallory, M., Rockenstein, E. M., Tatsuno, G., . . . McConlogue, L. (2000). High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J.Neurosci.*, 20(11), 4050-4058.
- Mufson, E. J., Mahady, L., Waters, D., Counts, S. E., Perez, S. E., DeKosky, S. T., . . . Binder, L. I. (2015). Hippocampal plasticity during the progression of Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 309, 51-67. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.03.006
- Mulder, S. D., Veerhuis, R., Blankenstein, M. A., & Nielsen, H. M. (2012). The effect of amyloid associated proteins on the expression of genes involved in amyloid-beta clearance by adult human astrocytes. *Exp.Neurol.*, 233(1), 373-379.
- Murta, V., Schilreff, P., Rosciszewski, G., Morilla, M. J., & Ramos, A. J. (2018). G5G2.5 core-shell tecto-dendrimer specifically targets reactive glia in brain ischemia. *J Neurochem*, 144(6), 748-760. doi: 10.1111/jnc.14286
- Murthy, A., Li, Y., Peng, I., Reichelt, M., Katakam, A. K., Noubade, R., . . . van Lookeren Campagne, M. (2014). A Crohn's disease variant in Atg16l1 enhances its degradation by caspase 3. *Nature*, 506(7489), 456-462. doi: 10.1038/nature13044

- Nathan, C., Calingasan, N., Nezezon, J., Ding, A., Lucia, M. S., La Perle, K., . . . Beal, M. F. (2005). Protection from Alzheimer's-like disease in the mouse by genetic ablation of inducible nitric oxide synthase. *J Exp Med*, 202(9), 1163-1169. doi: 10.1084/jem.20051529
- Navarro, V., Sanchez-Mejias, E., Jimenez, S., Munoz-Castro, C., Sanchez-Varo, R., Davila, J. C., . . . Vitorica, J. (2018). Microglia in Alzheimer's Disease: Activated, Dysfunctional or Degenerative. *Front Aging Neurosci*, 10, 140. doi: 10.3389/fnagi.2018.00140
- Nebel, R. A., Aggarwal, N. T., Barnes, L. L., Gallagher, A., Goldstein, J. M., Kantarci, K., . . . Mielke, M. M. (2018). Understanding the impact of sex and gender in Alzheimer's disease: A call to action. *Alzheimers Dement*, 14(9), 1171-1183. doi: 10.1016/j.jalz.2018.04.008
- Nedelsky, N. B., Todd, P. K., & Taylor, J. P. (2008). Autophagy and the ubiquitin-proteasome system: collaborators in neuroprotection. *Biochim Biophys Acta*, 1782(12), 691-699. doi: 10.1016/j.bbadis.2008.10.002
- Neeper, M., Schmidt, A. M., Brett, J., Yan, S. D., Wang, F., Pan, Y. C., . . . Shaw, A. (1992). Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem*, 267(21), 14998-15004.
- Neha, Sodhi, R. K., Jaggi, A. S., & Singh, N. (2014). Animal models of dementia and cognitive dysfunction. *Life Sci*, 109(2), 73-86. doi: 10.1016/j.lfs.2014.05.017
- Nett, W. J., Oloff, S. H., & McCarthy, K. D. (2002). Hippocampal astrocytes in situ exhibit calcium oscillations that occur independent of neuronal activity. *J Neurophysiol*, 87(1), 528-537. doi: 10.1152/jn.00268.2001
- Neumann, M., Sampathu, D. M., Kwong, L. K., Truax, A. C., Micsenyi, M. C., Chou, T. T., . . . Lee, V. M. (2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 314(5796), 130-133. doi: 10.1126/science.1134108
- Niemantsverdriet, E., Valckx, S., Bjerke, M., & Engelborghs, S. (2017). Alzheimer's disease CSF biomarkers: clinical indications and rational use. *Acta Neurol Belg*, 117(3), 591-602. doi: 10.1007/s13760-017-0816-5
- Nilsson, P., Loganathan, K., Sekiguchi, M., Matsuba, Y., Hui, K., Tsubuki, S., . . . Saido, T. C. (2013). Abeta secretion and plaque formation depend on autophagy. *Cell Rep*, 5(1), 61-69.
- Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., . . . Tsukita, S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol*, 161(3), 653-660. doi: 10.1083/jcb.200302070
- Niwa, K., Younkin, L., Ebeling, C., Turner, S. K., Westaway, D., Younkin, S., . . . Ladecola, C. (2000). Abeta 1-40-related reduction in functional hyperemia in mouse neocortex during somatosensory activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(17), 9735-9740.
- Noursadeghi, M., Tsang, J., Haustein, T., Miller, R. F., Chain, B. M., & Katz, D. R. (2008). Quantitative imaging assay for NF-kappaB nuclear translocation in primary human macrophages. *J Immunol Methods*, 329(1-2), 194-200. doi: 10.1016/j.jim.2007.10.015
- O'Brien, R. J., & Wong, P. C. (2011). Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci*, 34, 185-204. doi: 10.1146/annurev-neuro-061010-113613
- Oberheim, N. A., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (2012). Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods Mol Biol*, 814, 23-45. doi: 10.1007/978-1-61779-452-0_3
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., . . . LaFerla, F. M. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39(3), 409-421.
- Okun, E., Griffioen, K. J., Lathia, J. D., Tang, S. C., Mattson, M. P., & Arumugam, T. V. (2009). Toll-like receptors in neurodegeneration. *Brain Res Rev*, 59(2), 278-292. doi: 10.1016/j.brainresrev.2008.09.001
- Olsson, F., Schmidt, S., Althoff, V., Munter, L. M., Jin, S., Rosqvist, S., . . . Lundkvist, J. (2014). Characterization of intermediate steps in amyloid beta (Abeta) production under near-native conditions. *J Biol Chem*, 289(3), 1540-1550. doi: 10.1074/jbc.M113.498246
- Otsu, Y., Couchman, K., Lyons, D. G., Collot, M., Agarwal, A., Mallet, J. M., . . . Chrapak, S. (2015). Calcium dynamics in astrocyte processes during neurovascular coupling. *Nat Neurosci*, 18(2), 210-218. doi: 10.1038/nn.3906
- Organización Mundial de la Salud (2018). Global Health and Aging. Disponible en http://www.who.int/ageing/publications/global_health.pdf
- Padgett, R. A. (2012). New connections between splicing and human disease. *Trends Genet*, 28(4), 147-154. doi: 10.1016/j.tig.2012.01.001
- Pan, X. D., Zhu, Y. G., Lin, N., Zhang, J., Ye, Q. Y., Huang, H. P., & Chen, X. C. (2011). Microglial phagocytosis induced by fibrillar beta-amyloid is attenuated by oligomeric beta-amyloid: implications for Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.*, 6, 45.
- Panza, F., Seripa, D., Solfrizzi, V., Imbimbo, B. P., Lozupone, M., Leo, A., . . . Logroscino, G. (2016). Emerging drugs to reduce abnormal beta-amyloid protein in Alzheimer's disease patients. *Expert Opin Emerg Drugs*, 21(4), 377-391. doi: 10.1080/14728214.2016.1241232
- Paquet, D., Bhat, R., Sydow, A., Mandelkow, E. M., Berg, S., Hellberg, S., . . . Haass, C. (2009). A zebrafish model of tauopathy allows in vivo imaging of neuronal cell death and drug evaluation. *J Clin Invest*, 119(5), 1382-1395. doi: 10.1172/JCI37537
- Parajuli, B., Sonobe, Y., Horiuchi, H., Takeuchi, H., Mizuno, T., & Suzumura, A. (2013). Oligomeric amyloid beta induces IL-1beta processing via production of ROS: implication in Alzheimer's disease. *Cell Death Dis*, 4, e975. doi: 10.1038/cddis.2013.503
- Paranjape, G. S., Gouwens, L. K., Osborn, D. C., & Nichols, M. R. (2012). Isolated amyloid-beta(1-42) protofibrils, but not isolated fibrils, are robust stimulators of microglia. *ACS Chem Neurosci*, 3(4), 302-311. doi: 10.1021/cn2001238
- Park, R., Kook, S. Y., Park, J. C., & Mook-Jung, I. (2014). Abeta1-42 reduces P-glycoprotein in the blood-brain barrier through RAGE-NF-kappaB signaling. *Cell Death Dis*, 5, e1299. doi: 10.1038/cddis.2014.258
- Parpura, V., & Verkhratsky, A. (2012). Neuroglia at the crossroads of homeostasis, metabolism and signaling: Evolution of the concept. *ASN. Neuro*.
- Paul, J., Strickland, S., & Melchor, J. P. (2007). Fibrin deposition accelerates neurovascular damage and neuroinflammation in mouse models of Alzheimer's disease. *J Exp Med*, 204(8), 1999-2008. doi: 10.1084/jem.20070304
- Pekny, M., Johansson, C. B., Eliasson, C., Stakeberg, J., Wallen, A., Perlmann, T., . . . Frisen, J. (1999). Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin. *J Cell Biol*, 145(3), 503-514.
- Pellerin, L. (2003). Lactate as a pivotal element in neuron-glia metabolic cooperation. *Neurochem.Int.*, 43(4-5), 331-338.

- Peng, W., Achariyar, T. M., Li, B., Liao, Y., Mestre, H., Hitomi, E., . . . Deane, R. (2016). Suppression of glymphatic fluid transport in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*, 93, 215-225. doi: 10.1016/j.nbd.2016.05.015
- Penke, B., Bogar, F., & Fulop, L. (2017). beta-Amyloid and the Pathomechanisms of Alzheimer's Disease: A Comprehensive View. *Molecules*, 22(10). doi: 10.3390/molecules22101692
- Pentreath, V. W., & Mead, C. (2004). Responses of Cultured Astrocytes, C6 Glioma and 1321NI Astrocytoma Cells to Amyloid beta-Peptide Fragments. *Nonlinearity Biol Toxicol Med*, 2(1), 45-63. doi: 10.1080/15401420490426990
- Peppiatt, C. M., Howarth, C., Mobbs, P., & Attwell, D. (2006). Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature*, 443(7112), 700-704. doi: 10.1038/nature05193
- Perea, G., Navarrete, M., & Araque, A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci*, 32(8), 421-431. doi: 10.1016/j.tins.2009.05.001
- Perez-Nievas, B. G., & Serrano-Pozo, A. (2018). Deciphering the Astrocyte Reaction in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci*, 10, 114. doi: 10.3389/fnagi.2018.00114
- Perez, S. E., Raghanti, M. A., Hof, P. R., Kramer, L., Ikonomic, M. D., Lacor, P. N., . . . Mufson, E. J. (2013). Alzheimer's disease pathology in the neocortex and hippocampus of the western lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*). *J Comp Neurol*, 521(18), 4318-4338. doi: 10.1002/cne.23428
- Pickford, F., Masliah, E., Britschgi, M., Lucin, K., Narasimhan, R., Jaeger, P. A., . . . Wyss-Coray, T. (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), 2190-2199.
- Pike, C. J., Cummings, B. J., & Cotman, C. W. (1995). Early association of reactive astrocytes with senile plaques in Alzheimer's disease. *Exp Neurol*, 132(2), 172-179.
- Plaza-Zabala, A., Sierra-Torre, V., & Sierra, A. (2017). Autophagy and Microglia: Novel Partners in Neurodegeneration and Aging. *Int J Mol Sci*, 18(3). doi: 10.3390/ijms18030598
- Plog, B. A., & Nedergaard, M. (2018). The Glymphatic System in Central Nervous System Health and Disease: Past, Present, and Future. *Annu Rev Pathol*, 13, 379-394. doi: 10.1146/annurev-pathol-051217-111018
- Pomilio, C., Pavia, P., Gorjod, R. M., Vinuesa, A., Alaimo, A., Galvan, V., . . . Saravia, F. (2016). Glial alterations from early to late stages in a model of Alzheimer's disease: Evidence of autophagy involvement in Abeta internalization. *Hippocampus*, 26(2), 194-210. doi: 10.1002/hipo.22503
- Potokar, M., Kreft, M., Li, L., Daniel Andersson, J., Pangrsic, T., Chowdhury, H. H., . . . Zorec, R. (2007). Cytoskeleton and vesicle mobility in astrocytes. *Traffic*, 8(1), 12-20. doi: 10.1111/j.1600-0854.2006.00509.x
- Qosa, H., Miller, D. S., Pasinelli, P., & Trotti, D. (2015). Regulation of ABC efflux transporters at blood-brain barrier in health and neurological disorders. *Brain Res*, 1628(Pt B), 298-316. doi: 10.1016/j.brainres.2015.07.005
- Rabin, J. S., Schultz, A. P., Hedden, T., Viswanathan, A., Marshall, G. A., Kilpatrick, E., . . . Chhatwal, J. P. (2018). Interactive Associations of Vascular Risk and beta-Amyloid Burden With Cognitive Decline in Clinically Normal Elderly Individuals: Findings From the Harvard Aging Brain Study. *JAMA Neurol*, 75(9), 1124-1131. doi: 10.1001/jamaneurol.2018.1123
- Ramasamy, R., Yan, S. F., & Schmidt, A. M. (2012). The diverse ligand repertoire of the receptor for advanced glycation endproducts and pathways to the complications of diabetes. *Vascul Pharmacol*, 57(5-6), 160-167. doi: 10.1016/j.vph.2012.06.004
- Ransohoff, R. M., & Brown, M. A. (2012). Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest*, 122(4), 1164-1171.
- Rasmussen, J., Mahler, J., Beschoner, N., Kaeser, S. A., Hasler, L. M., Baumann, F., . . . Jucker, M. (2017). Amyloid polymorphisms constitute distinct clouds of conformational variants in different etiological subtypes of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(49), 13018-13023. doi: 10.1073/pnas.1713215114
- Ratti, A., & Buratti, E. (2016). Physiological functions and pathobiology of TDP-43 and FUS/TLS proteins. *J Neurochem*, 138 Suppl 1, 95-111. doi: 10.1111/jnc.13625
- Razani, B., Feng, C., Coleman, T., Emanuel, R., Wen, H., Hwang, S., . . . Semenkovich, C. F. (2012). Autophagy links inflammasomes to atherosclerotic progression. *Cell Metab*, 15(4), 534-544. doi: 10.1016/j.cmet.2012.02.011
- Repnik, U., Stoka, V., Turk, V., & Turk, B. (2012). Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death. *Biochim Biophys Acta*, 1824(1), 22-33. doi: 10.1016/j.bbapap.2011.08.016
- Rhea, E. M., Rask-Madsen, C., & Banks, W. A. (2018). Insulin transport across the blood-brain barrier can occur independently of the insulin receptor. *J Physiol*, 596(19), 4753-4765. doi: 10.1113/JP276149
- Richardson, A., Galvan, V., Lin, A. L., & Oddo, S. (2015). How longevity research can lead to therapies for Alzheimer's disease: The rapamycin story. *Exp Gerontol*, 68, 51-58. doi: 10.1016/j.exger.2014.12.002
- Ries, M., & Sastre, M. (2016). Mechanisms of Abeta Clearance and Degradation by Glial Cells. *Front Aging Neurosci*, 8, 160. doi: 10.3389/fnagi.2016.00160
- Rizzi, L., Rosset, I., & Roriz-Cruz, M. (2014). Global epidemiology of dementia: Alzheimer's and vascular types. *Biomed Res Int*, 2014, 908915. doi: 10.1155/2014/908915
- Robinson, D. M., & Keating, G. M. (2006). Memantine: a review of its use in Alzheimer's disease. *Drugs*, 66(11), 1515-1534. doi: 10.2165/00003495-200666110-00015
- Rodriguez-Arellano, J. J., Parpura, V., Zorec, R., & Verkhratsky, A. (2016). Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 323, 170-182. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.01.007
- Rodriguez, J. J., Olabarria, M., Chvatal, A., & Verkhratsky, A. (2009). Astroglia in dementia and Alzheimer's disease. *Cell Death Differ*, 16(3), 378-385.
- Rogers, J., Kirby, L. C., Hempelman, S. R., Berry, D. L., McGeer, P. L., Kaszniak, A. W., . . . et al. (1993). Clinical trial of indomethacin in Alzheimer's disease. *Neurology*, 43(8), 1609-1611.
- Roher, A. E., Kokjohn, T. A., Clarke, S. G., Sierks, M. R., Maarouf, C. L., Serrano, G. E., . . . Beach, T. G. (2017). APP/Abeta structural diversity and Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurochem Int*, 110, 1-13. doi: 10.1016/j.neuint.2017.08.007
- Rola, R., Raber, J., Rizk, A., Otsuka, S., VandenBerg, S. R., Morhardt, D. R., & Fike, J. R. (2004). Radiation-induced impairment of hippocampal neurogenesis is associated with cognitive deficits in young mice. *Exp Neurol*, 188(2), 316-330. doi: 10.1016/j.expneurol.2004.05.005
- Rosciszewski, G., Cadena, V., Murta, V., Lukin, J., Villarreal, A., Roger, T., & Ramos, A. J. (2018). Toll-Like Receptor 4 (TLR4) and Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-2 (TREM-2) Activation Balance Astrocyte Polarization into a Proinflammatory Phenotype. *Mol Neurobiol*, 55(5), 3875-3888. doi: 10.1007/s12035-017-0618-z

- Rosen, R. F., Farberg, A. S., Gearing, M., Dooyema, J., Long, P. M., Anderson, D. C., . . . Walker, L. C. (2008). Tauopathy with paired helical filaments in an aged chimpanzee. *J Comp Neurol*, 509(3), 259-270. doi: 10.1002/cne.21744
- Rosen, R. F., Tomidokoro, Y., Farberg, A. S., Dooyema, J., Ciliax, B., Preuss, T. M., . . . Walker, L. C. (2016). Comparative pathobiology of beta-amyloid and the unique susceptibility of humans to Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 44, 185-196. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.04.019
- Rosenegger, D. G., Tran, C. H., Wamsteeker Cusulin, J. I., & Gordon, G. R. (2015). Tonic Local Brain Blood Flow Control by Astrocytes Independent of Phasic Neurovascular Coupling. *J Neurosci*, 35(39), 13463-13474. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1780-15.2015
- Rosenzweig, E. S., & Barnes, C. A. (2003). Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog Neurobiol*, 69(3), 143-179.
- Rubinsztein, D. C., Marino, G., & Kroemer, G. (2011). Autophagy and aging. *Cell*, 146(5), 682-695. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.030
- Russo, M. J., Gustafson, D., Vazquez, S., Surace, E., Guinjoan, S., Allegri, R. F., . . . Argentina-Alzheimer's Disease Neuroimaging, I. (2014). Creation of the Argentina-Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. *Alzheimers Dement*, 10(1 Suppl), S84-87.
- Rusznak, Z., Henskens, W., Schofield, E., Kim, W. S., & Fu, Y. (2016). Adult Neurogenesis and Gliogenesis: Possible Mechanisms for Neurorestoration. *Exp Neurobiol*, 25(3), 103-112. doi: 10.5607/en.2016.25.3.103
- Sabbagh, M. N., Agro, A., Bell, J., Aisen, P. S., Schweizer, E., & Galasko, D. (2011). PF-04494700, an oral inhibitor of receptor for advanced glycation end products (RAGE), in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 25(3), 206-212. doi: 10.1097/WAD.0b013e318204b550
- Sagare, A. P., Bell, R. D., & Zlokovic, B. V. (2012). Neurovascular dysfunction and faulty amyloid beta-peptide clearance in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2(10).
- Santoni, G., Cardinali, C., Morelli, M. B., Santoni, M., Nabissi, M., & Amantini, C. (2015). Danger- and pathogen-associated molecular patterns recognition by pattern-recognition receptors and ion channels of the transient receptor potential family triggers the inflammasome activation in immune cells and sensory neurons. *J Neuroinflammation*, 12, 21. doi: 10.1186/s12974-015-0239-2
- Santos, R. M., Lourenco, C. F., Ledo, A., Barbosa, R. M., & Laranjinha, J. (2012). Nitric oxide inactivation mechanisms in the brain: role in bioenergetics and neurodegeneration. *Int J Cell Biol*, 2012, 391914. doi: 10.1155/2012/391914
- Saravia, F., Beauquis, J., Pietranera, L., & De Nicola, A. (2007). Neuroprotective effects of estradiol in hippocampal neurons and glia of middle age mice. *Psychoneuroendocrinology*, 32, 480-492.
- Sastre, M., Walter, J., & Gentleman, S. M. (2008). Interactions between APP secretases and inflammatory mediators. *J Neuroinflammation*, 5, 25. doi: 10.1186/1742-2094-5-25
- Schain, M., & Kreisl, W. C. (2017). Neuroinflammation in Neurodegenerative Disorders-a Review. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 17(3), 25. doi: 10.1007/s11910-017-0733-2
- Schmidt, F., Boltze, J., Jager, C., Hofmann, S., Willems, N., Seeger, J., . . . Stolzing, A. (2015). Detection and Quantification of beta-Amyloid, Pyroglutamate Abeta, and Tau in Aged Canines. *J Neuropathol Exp Neurol*, 74(9), 912-923. doi: 10.1097/NEN.0000000000000230
- Schutt, T., Helboe, L., Pedersen, L. O., Waldemar, G., Berendt, M., & Pedersen, J. T. (2016). Dogs with Cognitive Dysfunction as a Spontaneous Model for Early Alzheimer's Disease: A Translational Study of Neuropathological and Inflammatory Markers. *J Alzheimers Dis*, 52(2), 433-449. doi: 10.3233/JAD-151085
- Seab, J. P., Jagust, W. J., Wong, S. T., Roos, M. S., Reed, B. R., & Budinger, T. F. (1988). Quantitative NMR measurements of hippocampal atrophy in Alzheimer's disease. *Magn Reson Med*, 8(2), 200-208.
- Selkoe, D. J., & Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*, 8(6), 595-608. doi: 10.15252/emmm.201606210
- Senitz, D., Reichenbach, A., & Smith, T. G., Jr. (1995). Surface complexity of human neocortical astrocytic cells: changes with development, aging, and dementia. *J Hirnforsch.*, 36(4), 531-537.
- Settembre, C., Di Malta, C., Polito, V. A., Garcia Arencibia, M., Vetrini, F., Erdin, S., . . . Ballabio, A. (2011). TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science*, 332(6036), 1429-1433. doi: 10.1126/science.1204592
- Shabab, T., Khanabadi, R., Moghadamtousi, S. Z., Kadir, H. A., & Mohan, G. (2017). Neuroinflammation pathways: a general review. *Int J Neurosci*, 127(7), 624-633. doi: 10.1080/00207454.2016.1212854
- Shams, S., & Wahlund, L. O. (2016). Cerebral microbleeds as a biomarker in Alzheimer's disease? A review in the field. *Biomark Med*, 10(1), 9-18. doi: 10.2217/bmm.15.101
- Shastri, A., Bonifati, D. M., & Kishore, U. (2013). Innate immunity and neuroinflammation. *Mediators Inflamm*, 2013, 342931. doi: 10.1155/2013/342931
- Shibata, M., Yamada, S., Kumar, S. R., Calero, M., Bading, J., Frangione, B., . . . Zlokovic, B. V. (2000). Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest*, 106(12), 1489-1499. doi: 10.1172/JCI10498
- Shibutani, S. T., Saitoh, T., Nowag, H., Munz, C., & Yoshimori, T. (2015). Autophagy and autophagy-related proteins in the immune system. *Nat Immunol*, 16(10), 1014-1024. doi: 10.1038/ni.3273
- Shinohara, M., Tachibana, M., Kanekiyo, T., & Bu, G. (2017). Role of LRP1 in the pathogenesis of Alzheimer's disease: evidence from clinical and preclinical studies. *J Lipid Res*, 58(7), 1267-1281. doi: 10.1194/jlr.R075796
- Shokri-Kojori, E., Wang, G. J., Wiers, C. E., Demiral, S. B., Guo, M., Kim, S. W., . . . Volkow, N. D. (2018). beta-Amyloid accumulation in the human brain after one night of sleep deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(17), 4483-4488. doi: 10.1073/pnas.1721694115
- Sierra, A., Encinas, J. M., Deudero, J. J., Chancey, J. H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L. S., . . . Maletic-Savatic, M. (2010). Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell*, 7(4), 483-495. doi: 10.1016/j.stem.2010.08.014
- Silvin, A., & Ginhoux, F. (2018). Microglia heterogeneity along a spatio-temporal axis: More questions than answers. *Glia*, 66(10), 2045-2057. doi: 10.1002/glia.23458
- Simon, A. M., Schiapparelli, L., Salazar-Colocho, P., Cuadrado-Tejedor, M., Escribano, L., Lopez de Maturana, R., . . . Frechilla, D. (2009). Overexpression of wild-type human APP in mice causes cognitive deficits and pathological features unrelated to Abeta levels. *Neurobiol Dis*, 33(3), 369-378. doi: 10.1016/j.nbd.2008.11.005
- Skaper, S. D., Facci, L., Zusso, M., & Giusti, P. (2018). An Inflammation-Centric View of Neurological Disease: Beyond the Neuron. *Front Cell Neurosci*, 12, 72. doi: 10.3389/fncel.2018.00072

- Smolek, T., Madari, A., Farbakova, J., Kandrac, O., Jadhav, S., Cente, M., . . . Zilka, N. (2016). Tau hyperphosphorylation in synaptosomes and neuroinflammation are associated with canine cognitive impairment. *J Comp Neurol*, 524(4), 874-895. doi: 10.1002/cne.23877
- Solano Fonseca, R., Mahesula, S., Apple, D. M., Raghunathan, R., Dugan, A., Cardona, A., . . . Kokovay, E. (2016). Neurogenic Niche Microglia Undergo Positional Remodeling and Progressive Activation Contributing to Age-Associated Reductions in Neurogenesis. *Stem Cells Dev*, 25(7), 542-555. doi: 10.1089/scd.2015.0319
- Song, Z. P., Xiong, B. R., Guan, X. H., Cao, F., Manyande, A., Zhou, Y. Q., . . . Tian, Y. K. (2016). Minocycline attenuates bone cancer pain in rats by inhibiting NF-kappaB in spinal astrocytes. *Acta Pharmacol Sin*, 37(6), 753-762. doi: 10.1038/aps.2016.1
- Sorci, G., Giovannini, G., Riuzzi, F., Bonifazi, P., Zelante, T., Zagarella, S., . . . Romani, L. (2011). The danger signal S100B integrates pathogen- and danger-sensing pathways to restrain inflammation. *PLoS Pathog.*, 7(3), e1001315.
- Spampinato, S. F., Merlo, S., Sano, Y., Kanda, T., & Sortino, M. A. (2017). Astrocytes contribute to Abeta-induced blood-brain barrier damage through activation of endothelial MMP9. *J Neurochem*, 142(3), 464-477. doi: 10.1111/jnc.14068
- Sparks, D. L., Sabbagh, M. N., Connor, D. J., Lopez, J., Launer, L. J., Browne, P., . . . Ziolkowski, C. (2005). Atorvastatin for the treatment of mild to moderate Alzheimer disease: preliminary results. *Arch Neurol*, 62(5), 753-757. doi: 10.1001/archneur.62.5.753
- Spiegel, A. M., Koh, M. T., Vogt, N. M., Rapp, P. R., & Gallagher, M. (2013). Hilar interneuron vulnerability distinguishes aged rats with memory impairment. *J Comp Neurol.*, 521(15), 3508-3523.
- Spilman, P., Podlitskaya, N., Hart, M. J., Debnath, J., Gorostiza, O., Bredesen, D., . . . Galvan, V. (2010). Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One.*, 5(4), e9979.
- Spillantini, M. G., & Goedert, M. (1998). Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.*, 21(10), 428-433.
- Stansley, B., Post, J., & Hensley, K. (2012). A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*, 9, 115. doi: 10.1186/1742-2094-9-115
- Stewart, K. L., & Radford, S. E. (2017). Amyloid plaques beyond Abeta: a survey of the diverse modulators of amyloid aggregation. *Biophys Rev*, 9(4), 405-419. doi: 10.1007/s12551-017-0271-9
- Storck, S. E., Meister, S., Nahrath, J., Meissner, J. N., Schubert, N., Di Spiezio, A., . . . Pietrzik, C. U. (2016). Endothelial LRP1 transports amyloid-beta(1-42) across the blood-brain barrier. *J Clin Invest*, 126(1), 123-136. doi: 10.1172/JCI81108
- Strowig, T., Henao-Mejia, J., Elinav, E., & Flavell, R. (2012). Inflammasomes in health and disease. *Nature*, 481(7381), 278-286. doi: 10.1038/nature10759
- Sudduth, T. L., Schmitt, F. A., Nelson, P. T., & Wilcock, D. M. (2013). Neuroinflammatory phenotype in early Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 34(4), 1051-1059. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.09.012
- Sudhof, T. C., & Rizo, J. (2011). Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(12). doi: 10.1101/cshperspect.a005637
- Sumi, N., Nishioku, T., Takata, F., Matsumoto, J., Watanabe, T., Shuto, H., . . . Kataoka, Y. (2010). Lipopolysaccharide-activated microglia induce dysfunction of the blood-brain barrier in rat microvascular endothelial cells co-cultured with microglia. *Cell Mol Neurobiol*, 30(2), 247-253. doi: 10.1007/s10571-009-9446-7
- Surace, E., Cohen, G., Martinetto, H., ChremMendez, P., Martin, E., Smyth, E., . . . Campos, J. (2013). Latin American experience with Alzheimer's disease cerebrospinal fluid biomarkers. *J Am Geriatr Soc*, 61(7), 1229-1231. doi: 10.1111/jgs.12352
- Sweeney, M. D., Kisler, K., Montagne, A., Toga, A. W., & Zlokovic, B. V. (2018). The role of brain vasculature in neurodegenerative disorders. *Nat Neurosci*, 21(10), 1318-1331. doi: 10.1038/s41593-018-0234-x
- Sweeney, M. D., Zhao, Z., Montagne, A., Nelson, A. R., & Zlokovic, B. V. (2019). Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiol Rev*, 99(1), 21-78. doi: 10.1152/physrev.00050.2017
- Tai, L. M., Holloway, K. A., Male, D. K., Loughlin, A. J., & Romero, I. A. (2010). Amyloid-beta-induced occludin down-regulation and increased permeability in human brain endothelial cells is mediated by MAPK activation. *J Cell Mol Med*, 14(5), 1101-1112. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00717.x
- Takahashi, H., Brasnjevic, I., Rutten, B. P., Van Der, K. N., Perl, D. P., Bouras, C., . . . Dickstein, D. L. (2010). Hippocampal interneuron loss in an APP/PS1 double mutant mouse and in Alzheimer's disease. *Brain Struct.Funct.*, 214(2-3), 145-160.
- Tanaka, M. (2017). Functional Vascular Anatomy of the Brain. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 57(11), 584-589. doi: 10.2176/nmc.ra.2017-0030
- Tcw, J., & Goate, A. M. (2017). Genetics of beta-Amyloid Precursor Protein in Alzheimer's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 7(6). doi: 10.1101/cshperspect.a024539
- Toni, N., & Schinder, A. F. (2015). Maturation and Functional Integration of New Granule Cells into the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8(1), a018903. doi: 10.1101/cshperspect.a018903
- Tornavaca, O., Chia, M., Dufton, N., Almagro, L. O., Conway, D. E., Randi, A. M., . . . Balda, M. S. (2015). ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell-cell tension, angiogenesis, and barrier formation. *J Cell Biol*, 208(6), 821-838. doi: 10.1083/jcb.201404140
- Town, T., Tan, J., Flavell, R. A., & Mullan, M. (2005). T-cells in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med*, 7(3), 255-264. doi: 10.1385/NMM:7:3:255
- Treaster, S. B., Ridgway, I. D., Richardson, C. A., Gaspar, M. B., Chaudhuri, A. R., & Austad, S. N. (2014). Superior proteome stability in the longest lived animal. *Age (Dordr)*, 36(3), 9597. doi: 10.1007/s11357-013-9597-9
- Trinchero, M. F., Buttner, K. A., Sulkes Cuevas, J. N., Temprana, S. G., Fontanet, P. A., Monzon-Salinas, M. C., . . . Schinder, A. F. (2017). High Plasticity of New Granule Cells in the Aging Hippocampus. *Cell Rep*, 21(5), 1129-1139. doi: 10.1016/j.celrep.2017.09.064
- Uddin, M. S., Stachowiak, A., Mamun, A. A., Tzvetkov, N. T., Takeda, S., Atanasov, A. G., . . . Stankiewicz, A. M. (2018). Autophagy and Alzheimer's Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Implications. *Front Aging Neurosci*, 10, 04. doi: 10.3389/fnagi.2018.00004
- Ueda, H., Baba, T., Terada, N., Kato, Y., Fujii, Y., Takayama, I., . . . Ohno, S. (2000). Immunolocalization of dystrobrevin in the astrocytic endfeet and endothelial cells in the rat cerebellum. *Neurosci Lett*, 283(2), 121-124.

- Valero, J., Bernardino, L., Cardoso, F. L., Silva, A. P., Fontes-Ribeiro, C., Ambrosio, A. F., & Malva, J. O. (2017). Impact of Neuroinflammation on Hippocampal Neurogenesis: Relevance to Aging and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, 60(s1), S161-S168. doi: 10.3233/JAD-170239
- van der Kant, R., & Goldstein, L. S. (2015). Cellular functions of the amyloid precursor protein from development to dementia. *Dev Cell*, 32(4), 502-515. doi: 10.1016/j.devcel.2015.01.022
- Van Gool, W. A., Weinstein, H. C., Scheltens, P., & Walstra, G. J. (2001). Effect of hydroxychloroquine on progression of dementia in early Alzheimer's disease: an 18-month randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet*, 358(9280), 455-460.
- Van Skike, C. E., & Galvan, V. (2018). A Perfect sTORM: The Role of the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) in Cerebrovascular Dysfunction of Alzheimer's Disease: A Mini-Review. *Gerontology*, 64(3), 205-211. doi: 10.1159/000485381
- Vandenberghe, R., Rinne, J. O., Boada, M., Katayama, S., Scheltens, P., Vellas, B., . . . Clinical Study, I. (2016). Bapineuzumab for mild to moderate Alzheimer's disease in two global, randomized, phase 3 trials. *Alzheimers Res Ther*, 8(1), 18. doi: 10.1186/s13195-016-0189-7
- Vanlandewijck, M., He, L., Mae, M. A., Andrae, J., Ando, K., Del Gaudio, F., . . . Betsholtz, C. (2018). A molecular atlas of cell types and zonation in the brain vasculature. *Nature*, 554(7693), 475-480. doi: 10.1038/nature25739
- Vehmas, A. K., Kawas, C. H., Stewart, W. F., & Troncoso, J. C. (2003). Immune reactive cells in senile plaques and cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 24(2), 321-331.
- Veitch, D. P., Weiner, M. W., Aisen, P. S., Beckett, L. A., Cairns, N. J., Green, R. C., . . . Alzheimer's Disease Neuroimaging, I. (2018). Understanding disease progression and improving Alzheimer's disease clinical trials: Recent highlights from the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. *Alzheimers Dement*. doi: 10.1016/j.jalz.2018.08.005
- Venegas, C., Kumar, S., Franklin, B. S., Dierkes, T., Brinkschulte, R., Tejera, D., . . . Heneka, M. T. (2017). Microglia-derived ASC specks cross-seed amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nature*, 552(7685), 355-361. doi: 10.1038/nature25158
- Verkhatsky, A., & Nedergaard, M. (2018). Physiology of Astroglia. *Physiol Rev*, 98(1), 239-389. doi: 10.1152/physrev.00042.2016
- Verkhatsky, A., Sofroniew, M. V., Messing, A., Delanerolle, N. C., Rempe, D., Rodriguez Arellano, J. J., & Nedergaard, M. (2012). Neurological diseases as primary gliopathies: A reassessment of neurocentrism. *ASN.Neuro*.
- Viggars, A. P., Wharton, S. B., Simpson, J. E., Matthews, F. E., Brayne, C., Savva, G. M., . . . Ince, P. G. (2011). Alterations in the blood brain barrier in ageing cerebral cortex in relationship to Alzheimer-type pathology: a study in the MRC-CFAS population neuropathology cohort. *Neurosci.Lett.*, 505(1), 25-30.
- Vijayan, V. K., Geddes, J. W., Anderson, K. J., Chang-Chui, H., Ellis, W. G., & Cotman, C. W. (1991). Astrocyte hypertrophy in the Alzheimer's disease hippocampal formation. *Exp.Neurol.*, 112(1), 72-78.
- Villarreal, A., Seoane, R., Gonzalez Torres, A., Roszczewski, G., Angelo, M. F., Rossi, A., . . . Ramos, A. J. (2014). S100B protein activates a RAGE-dependent autocrine loop in astrocytes: implications for its role in the propagation of reactive gliosis. *J Neurochem*, 131(2), 190-205. doi: 10.1111/jnc.12790
- Virchow, R. (1858, 1858). *Gesammelte Abbildung zur wissenschaftlichen Medizin*.
- Walker, D., Lue, L. F., Paul, G., Patel, A., & Sabbagh, M. N. (2015). Receptor for advanced glycation endproduct modulators: a new therapeutic target in Alzheimer's disease. *Expert Opin Investig Drugs*, 24(3), 393-399. doi: 10.1517/13543784.2015.1001490
- Wang, D., Zhang, J., Jiang, W., Cao, Z., Zhao, F., Cai, T., . . . Luo, W. (2017). The role of NLRP3-CASP1 in inflammasome-mediated neuroinflammation and autophagy dysfunction in manganese-induced, hippocampal-dependent impairment of learning and memory ability. *Autophagy*, 13(5), 914-927. doi: 10.1080/15548627.2017.1293766
- Wang, P., & Wang, Z. Y. (2017). Metal ions influx is a double edged sword for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*, 35, 265-290. doi: 10.1016/j.arr.2016.10.003
- Wang, W., Bodles-Brakhop, A. M., & Barger, S. W. (2016). A Role for P-Glycoprotein in Clearance of Alzheimer Amyloid beta -Peptide from the Brain. *Curr Alzheimer Res*, 13(6), 615-620.
- Wang, Y., Cella, M., Mallinson, K., Ulrich, J. D., Young, K. L., Robinette, M. L., . . . Colonna, M. (2015). TREM2 lipid sensing sustains the microglial response in an Alzheimer's disease model. *Cell*, 160(6), 1061-1071. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.049
- Wang, Y., Martinez-Vicente, M., Kruger, U., Kaushik, S., Wong, E., Mandelkow, E. M., . . . Mandelkow, E. (2009). Tau fragmentation, aggregation and clearance: the dual role of lysosomal processing. *Hum Mol Genet*, 18(21), 4153-4170. doi: 10.1093/hmg/ddp367
- Wang, Y. J. (2014). Alzheimer disease: Lessons from immunotherapy for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*, 10(4), 188-189. doi: 10.1038/nrneurol.2014.44
- Weiss, N., Miller, F., Cazaubon, S., & Couraud, P. O. (2009). The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1788(4), 842-857. doi: 10.1016/j.bbamem.2008.10.022
- Wessel, D., & Flugge, U. I. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem*, 138(1), 141-143.
- Westmark, P., Benson, M. D., Buxbaum, J. N., Cohen, A. S., Frangione, B., Ikeda, S., . . . Nomenclature Committee of the International Society of, A. (2005). Amyloid: toward terminology clarification. Report from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid*, 12(1), 1-4. doi: 10.1080/13506120500032196
- White, J. A., Manelli, A. M., Holmberg, K. H., Van Eldik, L. J., & Ladu, M. J. (2005). Differential effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta 1-42 on astrocyte-mediated inflammation. *Neurobiol Dis*, 18(3), 459-465. doi: 10.1016/j.nbd.2004.12.013
- Wierenga, C. E., Dev, S. I., Shin, D. D., Clark, L. R., Bangen, K. J., Jak, A. J., . . . Bondi, M. W. (2012). Effect of mild cognitive impairment and APOE genotype on resting cerebral blood flow and its association with cognition. *J Cereb Blood Flow Metab*, 32(8), 1589-1599. doi: 10.1038/jcbfm.2012.58
- Wilhelmsson, U., Li, L., Pekna, M., Berthold, C. H., Blom, S., Eliasson, C., . . . Pekny, M. (2004). Absence of glial fibrillary acidic protein and vimentin prevents hypertrophy of astrocytic processes and improves post-traumatic regeneration. *J Neurosci*, 24(21), 5016-5021. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0820-04.2004
- Winkler, E. A., Bell, R. D., & Zlokovic, B. V. (2011). Central nervous system pericytes in health and disease. *Nat Neurosci*, 14(11), 1398-1405. doi: 10.1038/nn.2946

- Wolf, S. A., Boddeke, H. W., & Kettenmann, H. (2017). Microglia in Physiology and Disease. *Annu Rev Physiol*, 79, 619-643. doi: 10.1146/annurev-physiol-022516-034406
- Wright, A. L., Zinn, R., Hohensinn, B., Koenen, L. M., Beynon, S. B., Tan, R. P., . . . Vissel, B. (2013). Neuroinflammation and Neuronal Loss Precede Abeta Plaque Deposition in the hAPP-J20 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *PLoS One*, 8(4), e59586.
- Xia, X., Jiang, Q., McDermott, J., & Han, J. J. (2018). Aging and Alzheimer's disease: Comparison and associations from molecular to system level. *Aging Cell*, 17(5), e12802. doi: 10.1111/ace1.12802
- Xie, L., Kang, H., Xu, Q., Chen, M. J., Liao, Y., Thiyagarajan, M., . . . Nedergaard, M. (2013). Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science*, 342(6156), 373-377. doi: 10.1126/science.1241224
- Xin, S. H., Tan, L., Cao, X., Yu, J. T., & Tan, L. (2018). Clearance of Amyloid Beta and Tau in Alzheimer's Disease: from Mechanisms to Therapy. *Neurotox Res*, 34(3), 733-748. doi: 10.1007/s12640-018-9895-1
- Xu, H., & Ren, D. (2015). Lysosomal physiology. *Annu Rev Physiol*, 77, 57-80. doi: 10.1146/annurev-physiol-021014-071649
- Yamada, M. (2015). Cerebral amyloid angiopathy: emerging concepts. *J Stroke*, 17(1), 17-30. doi: 10.5853/jos.2015.17.1.17
- Yamazaki, Y., & Kanekiyo, T. (2017). Blood-Brain Barrier Dysfunction and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*, 18(9). doi: 10.3390/ijms18091965
- Yan, B. C., Jiang, D., Wang, J., Zhang, Y., Zhu, X., Xu, P., . . . Su, P. Q. (2018). Both decreased Akt expression and mTOR phosphorylation are related to decreased neuronal differentiation in the hippocampal alveus of aged mice. *Aging Clin Exp Res*, 30(7), 737-743. doi: 10.1007/s40520-017-0833-5
- Yang, D. S., Kumar, A., Stavrides, P., Peterson, J., Peterhoff, C. M., Pawlik, M., . . . Nixon, R. A. (2008). Neuronal apoptosis and autophagy cross talk in aging PS/APP mice, a model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, 173(3), 665-681. doi: 10.2353/ajpath.2008.071176
- Yang, J., Yang, H., Liu, Y., Li, X., Qin, L., Lou, H., . . . Wang, H. (2016). Astrocytes contribute to synapse elimination via type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-dependent release of ATP. *Elife*, 5, e15043. doi: 10.7554/eLife.15043
- Yang, Y. M., Shang, D. S., Zhao, W. D., Fang, W. G., & Chen, Y. H. (2013). Microglial TNF-alpha-dependent elevation of MHC class I expression on brain endothelium induced by amyloid-beta promotes T cell transendothelial migration. *Neurochem Res*, 38(11), 2295-2304. doi: 10.1007/s11064-013-1138-5
- Ye, J., Jiang, Z., Chen, X., Liu, M., Li, J., & Liu, N. (2017). The role of autophagy in pro-inflammatory responses of microglia activation via mitochondrial reactive oxygen species in vitro. *J Neurochem*, 142(2), 215-230. doi: 10.1111/jnc.14042
- You, T., Cheng, Y., Zhong, J., Bi, B., Zeng, B., Zheng, W., . . . Xu, J. (2017). Roflupram, a Phosphodiesterase 4 Inhibitor, Suppresses Inflammasome Activation through Autophagy in Microglial Cells. *ACS Chem Neurosci*, 8(11), 2381-2392. doi: 10.1021/acscchemneuro.7b00065
- Young-Pearse, T. L., Bai, J., Chang, R., Zheng, J. B., LoTurco, J. J., & Selkoe, D. J. (2007). A critical function for beta-amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference. *J Neurosci*, 27(52), 14459-14469. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4701-07.2007
- Yu, L., Chen, Y., & Tooze, S. A. (2018). Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy*, 14(2), 207-215. doi: 10.1080/15548627.2017.1378838
- Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A. J., & Heintz, N. (2003). Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(25), 15077-15082. doi: 10.1073/pnas.2436255100
- Zand, L., Ryu, J. K., & McLarnon, J. G. (2005). Induction of angiogenesis in the beta-amyloid peptide-injected rat hippocampus. *Neuroreport*, 16(2), 129-132.
- Zeppenfeld, D. M., Simon, M., Haswell, J. D., D'Abreo, D., Murchison, C., Quinn, J. F., . . . Iliff, J. J. (2017). Association of Perivascular Localization of Aquaporin-4 With Cognition and Alzheimer Disease in Aging Brains. *JAMA Neurol*, 74(1), 91-99. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.4370
- Zhang, X., Yan, C., Zhan, X., Li, L., Lei, J., & Shi, Y. (2018). Structure of the human activated spliceosome in three conformational states. *Cell Res*, 28(3), 307-322. doi: 10.1038/cr.2018.14
- Zhao, Z., Sagare, A. P., Ma, Q., Halliday, M. R., Kong, P., Kisler, K., . . . Zlokovic, B. V. (2015). Central role for PICALM in amyloid-beta blood-brain barrier transcytosis and clearance. *Nat Neurosci*, 18(7), 978-987. doi: 10.1038/nn.4025
- Zhou, Y., Ulland, T. K., & Colonna, M. (2018). TREM2-Dependent Effects on Microglia in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci*, 10, 202. doi: 10.3389/fnagi.2018.00202
- Zhu, J., Hu, Z., Han, X., Wang, D., Jiang, Q., Ding, J., . . . Hu, G. (2018). Dopamine D2 receptor restricts astrocytic NLRP3 inflammasome activation via enhancing the interaction of beta-arrestin2 and NLRP3. *Cell Death Differ*, 25(11), 2037-2049. doi: 10.1038/s41418-018-0127-2
- Zlokovic, B. V. (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, 57(2), 178-201.
- Zlokovic, B. V. (2011). Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci*, 12(12), 723-738. doi: 10.1038/nrn3114
- Zonta, M., Angulo, M. C., Gobbo, S., Rosengarten, B., Hossmann, K. A., Pozzan, T., & Carmignoto, G. (2003). Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci*, 6(1), 43-50. doi: 10.1038/nn980