



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Implicación de la proteína C-reactiva monomérica en el desarrollo de demencia de tipo Alzheimer: Modelo experimental y posibles terapias

Elisa García Lara

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

IMPLICACIÓN DE LA PROTEÍNA C-REACTIVA MONOMÉRICA EN EL DESARROLLO DE DEMENCIA DE TIPO ALZHEIMER: MODELO EXPERIMENTAL Y POSIBLES TERAPIAS

Manuscrito realizado por:

ELISA GARCÍA LARA

Para optar al Título de Doctora por el programa de Doctorado en
Biomedicina de la Universitat de Barcelona (UB).

Barcelona, noviembre, 2020



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



UNIVERSITY OF
MEDICINE, PHARMACY,
SCIENCES AND TECHNOLOGY
OF TARGU MURES



Manchester
Metropolitan
University

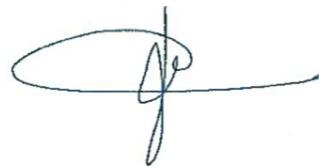
IMPLICACIÓN DE LA PROTEÍNA C-REACTIVA MONOMÉRICA EN EL DESARROLLO DE DEMENCIA DE TIPO ALZHEIMER: MODELO EXPERIMENTAL Y POSIBLES TERAPIAS

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA
UNIVERSITAT DE BARCELONA

Manuscrito presentado por Elisa García Lara para optar al título de doctora por la
Universidad de Barcelona.

DIRECTORES: Coral Sanfeliu y Mark Slevin

TUTOR: Josep Saura Martí



ESTUDIANTE DE DOCTORADO: Elisa García Lara



El proyecto de tesis de **Elisa García Lara** se ha realizado en el grupo de Neurodegeneración y Envejecimiento del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB), CSIC, en colaboración con: Manchester Metropolitan University, y dentro de un proyecto europeo de: University of Medicine, Pharmacy, Science and Technology of Targu Mures, Romania.

Barcelona, noviembre, 2020

El proyecto de tesis doctoral de **Elisa García Lara** ha sido dirigido por:

Dra. Coral Sanfeliu

IIBB, CSIC, IDIBAPS, CIBERESP

08036 Barcelona

y

Dr. Mark Slevin

Faculty of Science and Engineering, Manchester Metropolitan University

Manchester M15 6BH.

University of Medicine, Pharmacy, Science and Technology at Targu Mures

540142 Targu Mures.

FINANCIACIÓN:

Esta investigación ha sido financiada por:

-Operative Program of Competitiveness 2014-2020, C-reactive protein therapy for stroke-associated dementia, ID P_37_674, MySMIS code: 103432, contract 51/05.09.2016; MINECO y FEDER españoles, número de concesión SAF2016-77703; AGAUR de la Generalitat de Catalunya, subvención número 2017-SGR-106; y el Programa CERCA / Generalitat de Catalunya.

“Often contradiction is the clearest way to truth”

-Patti Smith-

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer esta tesis a mi familia. A mis padres, sin quienes todo esto no habría sido posible. Gracias por habernos dado todo siempre, por habernos educado para ser fuertes e independientes, por incentivarnos a estudiar y crecer constantemente. Gracias por haber querido siempre lo mejor para nosotras, aunque eso implicara mudarme a 600 km de casa para hacer lo que quería. Esta tesis os la debo a vosotros. Gracias a mi hermana por poder hacer siempre las mismas tonterías a pesar de estar meses sin vernos, por haber estado siempre la una para la otra, por tu sensibilidad (y la vena Lara ocasional). A mi tía, por enseñarnos desde pequeñas que hay mundo más allá de lo establecido, por inculcarnos el deseo de viajar y de libertad, por ser la más *punky* de la familia sin necesidad de llevar cresta. A mis abuelos por habernos querido tanto; a mi abuela ser un referente de elegancia y simpatía, por todos los buenos ratos atracando tu armario entre todas y probándonos tu ropa. A mi abuelo, que siempre me animó a ser la mejor versión de mí, y, que, sin duda, se sentiría orgulloso ahora, esta tesis también va por ti.

Gracias a todos los amigos que han mantenido mi salud mental en los momentos más difíciles de esta tesis. Gracias Cami, por creer siempre en mi y animarme a ser quien soy, por verme hasta cuando yo no me veo, por ser ese pilar fundamental en Barcelona desde aquella noche en mi balcón hablando de nuestro futuro corto a las 6 de la mañana. Eres grande amiga, montadora, directora, guionista, productora...vas a ser lo que quieras, y si lo dudas tu, ya estaré yo para recordártelo. Gracias Mag, por haber sido imprescindible desde nuestro primer año viviendo juntas, por hacer que la distancia física no importe, por todos los días que me levanto con una reflexión tuya y debatimos sobre lo que sea; música, filosofía, género, cine, estética, la vida... Gracias por todas esas veces en las que estamos cada una a nuestra bola, por todas las fiestas, liadas, carcajadas e idas de olla. Gracias por verme como soy y por creer en mi, y enhorabuena, porque te has convertido en una gran científica siendo tu, igual de lianta, pero tú, disfruta tu fullbright amiga, no puedo estar más orgullosa. Gracias Eli, por ser las Elis, conocidas en el instituto por ser unas petardas habladoras a las que había que separar©, por los concursos de robótica y la desesperación con autocad, por todas las tardes yendo a alemán y los cienmil ataques de risa. Por todos estos años en esta nuestra mayor relación a distancia desde que cada una se mudó de Albacete. Gracias por las

visitas, los viajes, las carcajadas, los llantos, y las liadas en ciudades y países ajenos, gracias por haber estado siempre que nos hemos necesitado. A Augusto y a Alex, por la música, que nos ha unido desde el instituto y ha seguido haciéndolo a pesar de la distancia. Por mi primer FIB, por los Primavera Sound y las fiestas de después, por la mítica noche de Apolo y las *Budweiser*, por el viaje a Londres para ver a *King Gizzard and the Lizard Wizard* y pasarnos medio viaje en *Rough Trade*. Porque ojalá más conciertos y más festivales y más viajes para ir a ver a los grupos que nos gustan donde sea. Al Miquelo y a la Raqueh, por todo lo que hemos crecido desde aquel primer año en Arizala escuchando *Dracula*, bailando *reggae*, yendo a ver a Royal, hinchándonos a croquetas, y poniendo a Jesucristo abanderado en la ventana por navidad. A la Raqueh, por todos los ratos de sofá, por haberme metido en el gremio Mallorquí de pura cepa y por las fiestas y disfraces varios ¡no me pongas más videos folclóricos por dioh!. Al Mikelo, por las deconstrucciones y reconstrucciones varias, por asumir nuestro individualismo, por intentar no ser unas machas fachas neoliberales, y por las fiestecitas y viajes ocasionales. A Steph y a Ana, por haberme aguantado y animado en este arduo proceso de escritura de la tesis doctoral, no se cómo me habéis aguantao'. A Steph por las noches y vinos en la azotea bailando *Lou Reed* a punto ya de perder la cabeza, por haber superado la cuarentena. A Ana por la alegría que has traído al piso desde que llegaste, por tu amor a Spike y por estar como una cabra, aunque una cabra muy divertida. Gracias a las dos, de corazón. A mis vecinos por todas las cenas, fiestas, risas, sesiones de peluquería, música..., por cuidarnos los unos a los otros en esta pandemia mundial que nos ha tocado vivir y que subyace a la escritura de esta tesis doctoral. Sois unos adultos muy *guays*. A Francesc, por todas las veces que me has acogido en tu casa para escribir, por los desayunos, comidas, cenas, fiestas varias y variadas, por las noches de catán y las paellas de Carlos, por la música *techno* y tu lista de reproducción que tantos buenos ratos me ha dado, espero tu presentación de la botella de Klein. Gracias a todos por haber preservado mi salud mental cuando creía que perdía la cabeza, por los buenos ratos que me han dado la vida y por haber sido mi familia en Barcelona.

Respecto al lab. En primer lugar; gracias Coral, por todo lo que he aprendido contigo, por haber estado ahí para que esta tesis fuera posible, por haberme guiado cuando lo he necesitado, por tus rápidas correcciones y por tu buen trabajo en la ciencia y la investigación, me voy habiendo aprendido mucho de este proyecto y esta etapa. Gracias a Mark Slevin por haber codirigido mi tesis y haberme ayudado en todo lo posible aún

en la distancia. Gracias Jou, por aceptar ser mi tutor de esta tesis y por haber sido el primero que creyó que podía ser una buena científica, por tu ayuda, por las clases, y por haberme enseñado en la primera etapa que fue el TFM en la que aprendí muchísimo. Gracias a Cristina Suñol por sus aportaciones y sus ideas en las reuniones. Gracias Rubén, por haberme enseñado todo del comportamiento y los ratones, por haberme enseñado las técnicas, por tu compañía en el lab, por tu paciencia y tu buen carácter, he aprendido mucho contigo y de la mejor manera. Gracias a Clara, a Samuel, a Nuria, a Alaó, a Júlia, y a Lidia, por haber contribuido a algunos experimentos de esta tesis, por la compañía y por haber dado siempre lo mejor de vosotros para aprender y mejorar en el lab, de verdad, lo habéis hecho genial. Gracias a Laia y al equipo del estabulario de Psicología por hacer tan bien vuestro trabajo, por preocuparos, por ayudarnos a los experimentadores y por la compañía y la simpatía que ayudan muchísimo al estar en Mundet con los ratones 24/7.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio que han hecho una buena experiencia de esta tesis doctoral. Gracias por las comidas en la cantina, los cafés y las cervezas post lab. Gracias por todo el apoyo el moral, por la cafetera arreglada :p, por las bromas, los consejos y los buenos ratos. Mil gracias a los que siendo ya doctores, o a punto de serlo, me habéis guiado cada vez que he ido perdida en este proceso de la tesis doctoral, me habéis ayudado muchísimo, de verdad.

Finalmente, esta tesis no habría sido posible sin la música y la literatura que siempre me salvan, y que me han rescatado en los momentos más difíciles de este proceso. Gracias a todas esas voces que aún perteniendo a otras generaciones, a veces, y sin ellas saberlo, me han acompañado a lo largo de esta tesis doctoral, tanto en la escritura como en los días intensivos de trabajo experimental. En cuanto a lo musical, he aquí mis acompañantes: [Lista de reproducción](#).

En definitiva, gracias a todos.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	9
ÍNDICE.....	13
ABREVIATURAS	21
INTRODUCCIÓN.....	27
DEMENCIA	29
1. ¿Qué es la demencia? Definición y características.....	29
2. Epidemiología y costes socio-sanitarios de la demencia.....	29
3. Clasificación y principales tipos de demencias	31
3.2 Demencias secundarias.....	32
3.3 Principales tipos de demencias	32
4. Síntomas conductuales y psicológicos de demencia (BPSD).....	32
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA)	33
1. Definición e historia	33
2. Epidemiología.....	34
3. Etiología y tipos de EA.....	35
4. Áreas cerebrales implicadas en la EA	40
5. Diagnóstico de la EA	43
6. Neuropatología de la EA.	44
MODELOS EXPERIMENTALES <i>IN VIVO</i> Y TERAPIAS DE LA EA	59
1. Modelos experimentales <i>in vivo</i>	59
2. Terapias en la EA	66
CRP y mCRP	69
1. CRP.....	69
2. Activación de CRP mediante cambios conformacionales.....	70
3. mCRP.....	71
4. Implicación de mCRP y CRP en el desarrollo de la EA.	73
5. Anticuerpos monoclonales como tratamiento contra mCRP.....	75

ÍNDICE

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	77
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	79
MATERIALES Y MÉTODOS.....	81
AGENTES EXPERIMENTALES.....	83
1. Proteína C-reactiva monomérica (mCRP).....	83
2. Anticuerpo monoclonal de ratón anti-mCRP. Clon 8C10.....	83
3. Inhibidor soluble de epóxido hidrolasa 1-trifluorometoxifenil-3-(1-propionilpiperidin-4-il)-urea (TPPU)	83
EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	83
1. Animales empleados para los estudios in-vivo.....	83
2. Administración de tratamientos mediante cirugía estereotáxica de forma bilateral en la zona CA1 del hipocampo de ratones	85
3. Administración oral del agente TPPU.....	86
4. Pruebas de comportamiento.....	86
5. Procesamiento del tejido cerebral de los animales	94
6. Inmunohistoquímica del tejido cerebral de ratones	95
7. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR)	96
8. Inmunodetección de proteínas por Western-Blot	97
EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	99
2. Línea celular de microglía murina BV2	99
3. Tratamientos <i>in vitro</i>	100
4. Ensayo de actividad epóxido hidrolasa soluble.....	100
5. Ensayo de nitritos en la línea celular microglial BV2.....	100
5. Inmunodetección de proteínas por Western-Blot	101
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	102
DISEÑOS EXPERIMENTALES	102
• Capítulo 1: Caracterización del modelo de demencia por mCRP y comparación con el modelo de EA, 5XFAD.....	102

3. COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA Y NIVELES DE PROTEINAS DEL MODELO DE RATON POR mCRP CON EL MODELO DE EA, 5XFAD.	125
3.1 El modelo de demencia por mCRP no reprodujo el incremento en la inflamación encontrado en el modelo de EA.....	125
3.2 El modelo de demencia por mCRP no reprodujo la gliosis encontrada en el modelo de EA.	126
3.3 El tratamiento a 6 meses con mCRP no indujo estrés oxidativo, a diferencia del modelo de EA donde se vio aumentado.	128
3.4 El tratamiento con mCRP indujo cambios en la neuroplasticidad, similar al modelo de EA.	128
3.5 El modelo de demencia por mCRP no reprodujo los cambios del modelo de EA encontrados para la patología amiloide.	131
3.6 El tratamiento con mCRP durante 6 meses, indujo la hiperfosforilacion de tau, similar al modelo de EA.	132
4. TERAPIA DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-mCRP EN EL MODELO DE DEMENCIA POR mCRP.	135
4.1 La inyección de mCRP y el anticuerpo 8C10 anti-mCRP, no alteraron el estado de salud sistémico de los ratones.....	135
4.2 El anticuerpo monoclonal anti-mCRP protegió contra la ansiedad y el estrés inducidos por mCRP a 6 meses de tratamiento.	136
4.3 El anticuerpo monoclonal anti-mCRP protegió contra la perdida de memoria espacial y de reconocimiento inducidas por mCRP a 1, 3 y 6 meses de tratamiento.	138
4.4 El anticuerpo monoclonal 8C10 inhibió la hiperfosforilación de tau a los 6 meses de tratamiento.	142
5. EVALUACIÓN DE LA ACCIÓN NEUROPROTECTORA DEL AGENTE ANTI-INFLAMATORIO TPPU COMO TERAPIA CONTRA mCRP	145
5.1 El tratamiento con TPPU no alteró el estado de salud sistémico ni el comportamiento general del modelo <i>in vivo</i> por mCRP.....	145

DISCUSIÓN.....	155
DISCUSIÓN GENERAL	157
EFECTOS COGNITIVOS Y DE BPSD'S INDUCIDOS POR mCRP	157
DISTRIBUCIÓN DE mCRP	160
NEUROINFLAMACIÓN	163
NEUROPLASTICIDAD	167
PATOLOGÍAS AMILOIDE Y TAU	169
COMPARACIÓN DEL MODELO DE DEMENCIA POR mCRP CON EL MODELO DE EA, 5XFAD.....	171
TERAPIAS CONTRA mCRP	174
RESUMEN DE LA DISCUSIÓN	177
CONCLUSIONES.....	179
CONCLUSIONES.....	181
BIBLIOGRAFÍA	183

ABREVIATURAS

- 4G8:** Anticuerpo anti- A β (Clon 4G8)
- 5XFAD:** Modelo de ratón transgénico con 5 mutaciones de Alzheimer familiar
- 8C10:** Anticuerpo anti-mCRP (Clon 8C10)
- A β :** Proteína β -amiloide (β -amyloid peptide)
- ACV:** Accidente cerebrovascular
- Actin:** Actina
- APOE:** Apolipoproteína E
- ADAM10:** *A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10*
- APP:** Proteína precursora del amiloide (β -amyloid precursor protein)
- AT8:** Anticuerpo clon AT8 que se une al epítipo de tau fosforilada (pS199 / pS202 / pT205)
- BACE1:** β -secretasa 1 (*beta-site APP cleaving enzyme 1*)
- Bdnf:** Factor neurotrófico derivado del cerebro (*Brain-derived neurotrophic factor*)
- BHE:** Barrera hematoencefalica
- BPSD:** Síntomas cognitivos y comportamentales de la demencia. *Behavioural and psychological symptoms of dementia.*
- CA1:** Cuerno de Amón 1
- CA2:** Cuerno de Amón 2
- CA3:** Cuerno de Amón 1
- CAA:** Angiopatía amiloide
- Ccl3:** Quimioquina ligando 3 (*Chemokine (C-C motif) ligand 3*)
- Chil1:** Chitinase 3-like-1
- CRP:** Proteína C-reactiva (*C-reactive protein*)
- CSF:** Líquido cefalorraquídeo en inglés (*Cerebrospinal fluid*)
- CTF:** Extremo carboxi-terminal
- DCL:** Demencia por cuerpos de Lewy
- DFT:** Demencia del lóbulo frontotemporal
- DG:** Giro dentado
- EA:** Enfermedad de Alzheimer
- ECM:** Matriz extracelular
- EETs:** Ácido epoxieicosatrienoico
- Egr1:** *Early growth response protein 1*
- EP:** Enfermedad de Parkinson

ABREVIATURAS

- ERK:** Quinasas reguladas por señales extracelulares (Extracellular signal-regulated kinases)
- FBS:** Suero fetal bovino
- FSC:** Flujo sanguíneo cerebral
- GFAP:** Proteína ácida fibrilar glial
- Gpx1:** Glutación peroxidasa 1
- HT7:** Anticuerpo de la proteína de tau total
- IHC:** Análisis inmunohistoquímico
- IL1-B:** Interleuquina 1-B
- IL-6:** Interleuquina 6
- iNOS:** Óxido nítrico sintasa indcible
- LC:** Locus coeruleus
- LCR:** Líquido cefalorraquídeo
- LTD:** Depresión a largo placo (*Long term depression*)
- LTP:** Potenciación a largo placo (*Long term potential*)
- MAP2:** Proteína asociada a microtúbulo 2 (*microtubule-associated protein 2*)
- mCRP:** Proteína C-reactiva monomérica (*C-reactive protein*)
- MCI:** Defecto cognitive leve (*Mild Cognitive Impairment*)
- MWM:** Ensayo del laberinto acuático de Morris (*Morris Water Maze test*)
- NFkB:** *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
- NFT:** Ovillos neurofibrilares de tau (*Neurofibrillary tangles*)
- NMDA:** *N-methyl-D-aspartate*
- NORT:** Ensayo de reconocimiento de nuevos objetos (Novel Object Recognition test)
- NOS:** Óxido nítrico sintasa
- PBS:** Tampón fosfato salino (*Phoshate buffer saline*)
- PHF:** Filamentos helicoidales emparejados (Paired helical filaments)
- PSEN1:** Presenelinina 1
- PSEN2:** Presenilina 2
- OF:** Ensayo de campo abierto (*Open field test*)
- OLT:** Ensayo de localicación de nuevos objetos (*Object Location test*)
- OMS** Organización de la mundial de la salud
- p-ERK:** ERK fosforilada
- p-tau:** Tau fosforilada
- RT-PCR:** PCR cuantitativa

sEH: Enzima epóxido hidrolasa soluble (*Soluble epoxide hydrolase 2*)

sEHi: Inhibidores del enzima epóxido hidrolasa soluble

Ser396: Serina 396

Sirt2: Sirtuina 2

SNC: Sistema nervioso central

Sod2: Superóxido dismutasa-2

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α (tumor necrosis factor alpha)

Trem2: Receptor desencadenante expresado en las células mieloides 2 (Triggering receptor expressed on myeloid cells 2)

T-TBS: Tris con Tween al 0,1% o *Tris-buffered saline with 0.1% Tween* (TBS-T)

TPPU: Trifluorometoxifenil-3- (1- propionilpiperidin-4-il) urea

UNV: Unidad neurovascular

Vegfa: Factor de crecimiento endotelial vascular A (*vascular endothelial growth factor A*)

WB: Western Blot

INTRODUCCIÓN

DEMENCIA

1. ¿Qué es la demencia? Definición y características.

La demencia es un síndrome clínico que se caracteriza por un deterioro progresivo e inexorable de la capacidad cognitiva y la capacidad de vivir de forma independiente. Por lo tanto, la demencia no es una enfermedad específica, sino una determinada sintomatología encontrada en diversas enfermedades (Gale et al., 2018; Prince et al., 2013; Sousa et al., 2009). Los distintos subtipos de demencia se caracterizan por un cuadro clínico con síntomas comunes que difieren en su etiología, edad, forma de presentación, curso clínico y trastornos asociados (Garre-Olmo, 2018; Garre-Olmo et al., 2009; Sacuiu, 2016).

La sintomatología común de los diferentes tipos de demencia es: la pérdida cognitiva, normalmente correlacionada con la pérdida de memoria y la aparición de Síntomas conductuales y psicológicos asociados a la demencia o *Behavioral and psychological symptoms of dementia* (BPSD) (Cerejeira, Lagarto, & Mukaetova-Ladinska, 2012; Cloak & al Khalili, 2020). A pesar de que cada demencia presenta un tipo de neuropatología y etiología diferentes, hay algunos rasgos neuropatológicos que suelen ser comunes a todas ellas. Estos serían: Neuroinflamación, gliosis, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial, pérdida de la neuroplasticidad y neurodegeneración, alteración de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y disfunción cerebrovascular (Raz et al., 2016).

2. Epidemiología y costes socio-sanitarios de la demencia

Actualmente, la incidencia de la demencia está aumentando exponencialmente, convirtiéndose en uno de los principales problemas de salud pública en los últimos años. Según el censo de la Organización Mundial de la Salud, en el 2015 había alrededor de 50 millones de personas con demencia en el mundo y cada año se registran cerca de 8 millones de nuevos casos de demencia, por lo que se estima que, para el año 2050, la demencia afectará a 150 millones de personas.

La prevalencia global de la demencia es de aproximadamente el 7% de las personas de 65 años o más, con una prevalencia ligeramente mayor (8-10%) en los países

INTRODUCCIÓN

desarrollados, debido a una mayor esperanza de vida in embargo, tal y como se muestra en la figura 1, la prevalencia de la demencia está aumentando exponencialmente en los países en desarrollo sobre los países con altos ingresos, debido, principalmente, a la falta de recursos en sanidad e investigación. Actualmente alrededor del 60% de la población con demencia vive en países de ingresos bajos y medios.

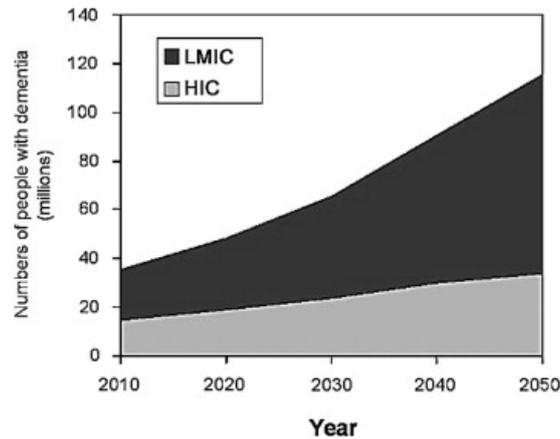


Figura 1. El crecimiento en el número de personas con demencia en países de ingresos altos (HIC) y países de ingresos bajos y medianos (LMIC) (Prince et al., 2013).

Dentro de los diferentes tipos de demencias, la más prevalente es la EA, constituyendo entre un 50% y un 60% de las demencias, y afectando a aproximadamente 800.000 personas en España en 2019 (Sociedad Española de Neurología, 2019). A la EA le sigue la demencia vascular, que representa entre un 5-10% de los casos de demencia. Tras la demencia de EA y la demencia vascular, encontraríamos la demencia mixta y otras demencias minoritarias como son la enfermedad de Parkinson (EP), la demencia por cuerpos de Lewy (DCL) y la demencia frontotemporal (DFT), siendo estas dos últimas las que cursan con mayor mortalidad (Gale et al., 2018; Garre-Olmo, 2018; Sacuiu, 2016).

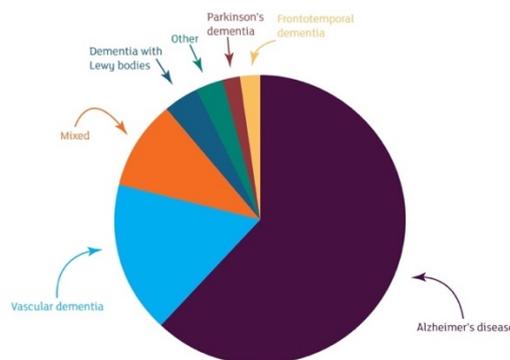


Figura 2. Prevalencia de los diferentes tipos de demencia. (<https://www.alzheimersresearchuk.org/>)

3. Clasificación y principales tipos de demencias

Debido a la heterogeneidad de la presentación clínica y la complejidad de la neuropatología, las clasificaciones de las demencias siguen siendo controvertidas. Algunas de las clasificaciones más comunes son: en función de la etiología (demencias primarias y secundarias), según las zonas anatómicas afectadas (demencias corticales o subcorticales) o en función de la posibilidad de recuperación (reversibles o irreversibles). Estas clasificaciones se pueden solapar entre ellas, donde además se deberían incluir las demencias mixtas. Así, mientras que las demencias primarias suelen ser degenerativas e irreversibles, las demencias secundarias suelen tener una causa no degenerativa y en algunos casos pueden ser reversibles (Ljubenkov & Geschwind, 2016; Sacuiu, 2016).

3.1 Demencias degenerativas primarias

Entre ellas encontramos las corticales y las subcorticales. Entre las corticales se encuentran la EA, la DCL y la DFT. Entre los tipos subcorticales, que afectan a los ganglios basales, núcleos talámicos y tronco encefálico, encontramos la EP o la enfermedad de Huntington (EH) (Raz et al., 2016).

Cabe destacar, que las demencias neurodegenerativas primarias, como la EP, la EA y la DFT, se caracterizan por ser agregopatías proteicas. Así, según el tipo de acumulación proteica las demencias neurodegenerativas primarias se clasificarían en: tauopatías, amiloidopatías y sinucleopatías, tal y como se presenta en la Figura 3.

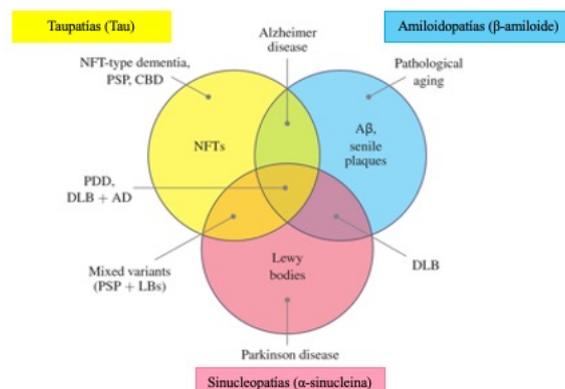


Figura 3. Interrelaciones de sinucleinopatías, tauopatías y amiloidopatías. NFTs: ovillos neurofibrilares; PSP: parálisis supranuclear progresiva; CBD: degeneración corticofrontal; PDD: demencia por enfermedad de Parkinson; DLB: demencia con cuerpos de Lewy; AD: enfermedad de Alzheimer; LB: Cuerpos de Lewy. Adaptada de: (K. A. Jellinger, 2011).

Así, demencias como la EA, la DCL o la EP, pueden clasificarse en función del tipo de proteinopatía que presenten. Por ejemplo, la EA presentaría tanto taupatía, como amiloidopatía. La DCL presentaría amiloidopatía, sinucelopatía y taupatía, mientras que la EP se caracterizaría por ser principalmente una sinucleopatía (Raz et al., 2016; Tenreiro et al., 2014).

3.2 Demencias secundarias

Las más comunes son las de tipo vascular, que pueden clasificarse entre isquémicas (cortical y subcortical), las isquémico hipóxicas, la hemorrágicas y las combinadas. Otras demencias secundarias de tipo no vascular suelen ser reversibles al ir asociadas a otras enfermedades o a factores asociados al estilo de vida. Entre estas demencias se encontrarían: las demencias priónicas, las infecciosas, las tóxicas, las traumáticas, las neoplásicas, las metabólicas etc. Finalmente encontraríamos las demencias mixtas, que son una combinación de varias demencias, entre ellas, la más común es la demencia vascular combinada con la EA (Bello & Schultz, 2011; Iadecola, 2013; Kalaria et al., 2016).

3.3 Principales tipos de demencias

Las demencias más caracterizadas son: La **demencia vascular**, caracterizada por la disfunción endotelial, la aterosclerosis, la afectación de la vasculatura y la presencia de isquemia y/o hemorragia. La **EA**, caracterizada por el depósito de placas seniles y de ovillos neurofibrilares de tau (NFTs), la hiperfosforilación de tau y la angiopatía amiloide. La **DCL**, caracterizada por los depósitos de α -sinucleína, la deposición de cuerpos de Lewy, angiopatía amiloide y tau hiperfosforilada y en forma de NFTs. Y la **DFT** que se caracteriza principalmente por las inclusiones de tau hiperfosforilada y la presencia de TDP-43; proteína 43 de unión a ADN de respuesta transactiva (Raz et al., 2016).

4. Síntomas conductuales y psicológicos de demencia (BPSD)

Durante mucho tiempo, los BPSD se han subestimado, considerándose únicamente como síntomas secundarios al deterioro cognitivo en la demencia. Sin embargo, cada vez más estudios (Alves et al., 2016; Baeta-Corral et al., 2018; Giménez-Llort et al.,

2007; Shinosaki et al., 2000; van der Jeugd et al., 2018) han demostrado que los BPSD no son meramente secundarios al deterioro de la memoria y la pérdida cognitiva, sino que tienen su propia relevancia dentro de la demencia. Los BPSD son un grupo heterogéneo de trastornos conductuales, psicológicos y psiquiátricos que ocurren en el 50% -80% de los pacientes con demencia de cualquier etiología (Vermeiren et al., 2013). Concretamente en la EA, un estudio mostró que casi todos los pacientes (92%) presentaban algún BPSD en el momento de la exploración para el paciente como para sus cuidadores (Fernández et al., 2010).

Por lo tanto, abordar el estudio de los BPSD se torna relevante ya que suelen ir asociados a un mayor deterioro cognitivo, suponiendo una disminución de la calidad de vida tanto para el paciente como para sus cuidadores (Cloak & al Khalili, 2020). La aparición de BPSD varía entre pacientes y entre los diferentes tipos de demencia. En ellos influyen factores genéticos, fisiopatológicos y ambientales. Un ejemplo de la implicación de los factores ambientales en el desarrollo de BPSD, es la influencia de la cuarentena realizada durante la pandemia mundial SARS-CoV-2, declarada en marzo de 2020 por la OMS. Esta supuso un incremento del 60% de aparición de BPSD en los pacientes con demencia, probablemente debido al aislamiento y la falta de estimulación social de los pacientes (Cagnin et al., 2020; Canevelli et al., 2020; Korczyn, 2020; X. Wang et al., 2012)

Los BPSD pueden clasificarse en cinco dominios: cognitivo/perceptual (p.ej.: delirios y alucinaciones), motor (falta de coordinación, movimientos repetitivos, disminución del equilibrio...), verbal (gritos, habla repetitiva, agresión verbal...), emocional (euforia, depresión, apatía, aumento del estrés, ansiedad, irritabilidad...) y vegetativo (alteraciones del sueño y del apetito). Los BPSD más frecuentes son la depresión y la apatía. El delirio, la agitación y la disfunción motora ocurren en aproximadamente un tercio de los pacientes (Cloak & al Khalili, 2020).

ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA)

1. Definición e historia

La EA es una enfermedad neurodegenerativa crónica que por lo general comienza progresivamente y empeora con el tiempo. Sus principales características sintomáticas

son la pérdida cognitiva y de memoria, junto a la alteración conductual. Su principal característica neuropatológica es la acumulación de NFTs y de placas amiloides (Rezazadeh et al., 2019).

La enfermedad de Alzheimer se describió por primera vez en 1906 cuando el médico Aloysius "Alöis" Alzheimer estudió los síntomas de una mujer de 51 años, Auguste Deter, uno de sus pacientes en Frankfurt, Alemania. Alzheimer caracterizó los síntomas neuropsicológicos de Auguste como los que actualmente definimos en la EA:

“Su memoria está seriamente dañada. Si le muestran objetos, los nombra correctamente, pero casi inmediatamente después se olvida de todo. Cuando lee una prueba, salta de una línea a otra o lee deletreando las palabras individualmente o sin sentido a través de su pronunciación. Al escribir, repite sílabas separadas muchas veces, omite otras y rápidamente se descompone por completo. Al hablar, utiliza espacios vacíos y algunas expresiones parafraseadas (“vertedor de leche” en lugar de taza); a veces es obvio que no puede continuar. Claramente, ella no comprende ciertas preguntas. No recuerda el uso de algunos objetos”.

Así, cuando ella murió y pudo analizar microscópicamente su cerebro, describió las principales señas de identidad que caracterizaban la enfermedad que ahora lleva su nombre: En el cerebro de Auguste Deter se encontraron por primera vez: NFTs y placas amiloides. Desde entonces, las descripciones de Alzheimer han contribuido y ayudado a la comunidad médica a diagnosticar pacientes en todo el mundo (Bondi et al., 2017).

2. Epidemiología

La EA es la causa del 60-70% de las demencias. Según las estimaciones actuales, más de 24 millones de personas en todo el mundo se ven afectadas por la EA. Asimismo, se predice que la prevalencia de la EA se triplique en 2050 (24 millones de casos aprox.) a medida que aumente la esperanza de vida. Tanto en los países desarrollados como en los no desarrollados, la EA supone enormes costes y presiones tanto para las personas afectadas como para los cuidadores y los sistemas de salud (Rezazadeh et al., 2019).

3. Etiología y tipos de EA

La etiología de la EA sigue siendo controvertida. La EA es un trastorno heterogéneo con múltiples patrones de expresión. De acuerdo con su etiología, la enfermedad se ha clasificado en dos subtipos: la EA familiar; y la EA esporádica. Aunque ambas tienen cursos bioquímicos y patológicos similares, los mecanismos de cómo conducen a una única entidad fisiopatológica todavía están por determinar (Karch & Goate, 2015).

3.1 EA familiar

La EA familiar es la forma menos frecuente de EA, suponiendo aproximadamente un 5% de los casos totales, se caracteriza por una aparición temprana de la enfermedad, antes de los 60 años. La EA familiar es monogénica, de herencia dominante y se asocia con los patrones clásicos de herencia mendeliana con penetrancia dependiente de la edad (Sarroca et al., 2016). En las formas familiares de EA monogénica, la mayoría de mutaciones están asociadas con una alteración genética de la proteína precursora del β -amiloide (APP), y de los componentes del complejo de escisión de la APP por γ -secretasas; que implica a los genes; PSEN1 y PSEN2 (Karch & Goate, 2015)

- **Genes de herencia dominante: APP, PSEN1 y PSEN2.**

La APP es una proteína neuronal transmembrana que en la EA es escindida por la β -secretasa y la γ -secretasa produciendo el péptido A β . El gen de APP se sitúa en el brazo largo del cromosoma 21 (*21q21.3*). Por otra parte, los genes PSEN1 y PSEN2 codifican para las presenilinas 1 y 2, respectivamente, que constituyen la subunidad catalítica del complejo γ -secretasa, regulando así el procesamiento de APP en la EA. El gen que codifica para PSEN1 se sitúa en el brazo largo del cromosoma 14 (*14q24.3*) y el gen que codifica para PSEN2 se sitúa en el brazo largo del cromosoma 1 (*1q42.13*) (Lanoiselée et al., 2017).

De esta forma, las mutaciones que originan la EA familiar, están principalmente implicadas en la generación y procesamiento del péptido A β , es decir, en la vía amiloidogénica (Fanny M. Elahi and Bruce L. Miller, 2017; Rezazadeh et al., 2019). En cuanto a la frecuencia de las mutaciones en la EA familiar; PSEN1 es el gen más comúnmente involucrado, con 221 mutaciones reportadas como patógenas en la base de datos de Alzforum. El segundo gen más comúnmente involucrado es APP, con 32

mutaciones patógenas descritas, y, por último, encontramos PSEN2, con 19 mutaciones patógenas diferentes (www.alzforum.org/mutations). La mayoría de casos son de aparición temprana, aunque algunas mutaciones menos agresivas pueden producir un fenotipo tardío (Brouwers et al., 2008) afecta aproximadamente al 50% de las personas que tienen 85 años o más. La EA esporádica suele asociarse con la EA de aparición tardía, sin embargo, aunque en la mayoría de pacientes se da a partir de los 65 años, no siempre es así. La EA esporádica es un trastorno multifactorial que resulta de la combinación de genes de riesgo y factores ambientales (Brouwers et al., 2008). Estudios previos reportan que el componente ambiental de la EA esporádica puede suponer hasta casi el 20% de los casos de EA (Prince et al., 2013). Así los factores que influyen en el desarrollo de la EA esporádica son:

3.1.1 Factores de riesgo de la EA esporádica

Los factores de riesgo de la EA esporádica pueden clasificarse entre factores de riesgo no modificables, como el envejecimiento, el sexo y la genética, y factores de riesgo modificables, ligados a otras enfermedades y al estilo de vida.

3.1.1.1 Factores de riesgo no-modificables

3.2.1.1.1 Envejecimiento y sexo

El principal factor de riesgo para sufrir demencia es el envejecimiento. Aunque los casos de demencia temprana (Kuruppu & Matthews, 2013) en adultos jóvenes, están aumentando, la demencia es una condición que típicamente afecta a las personas mayores, entre las cuales es uno de los principales contribuyentes a la discapacidad y la dependencia. De esta forma, se produce un incremento exponencial de los casos de demencia con la edad a partir de los 65 años (0,97% entre los 65-74 años, 7,7% entre los 75-84 años y 22,5% para ≥ 85 años). (Prince et al., 2013).

Asimismo, el sexo es otro factor de riesgo para el desarrollo de EA (Hebert et al., 2013; Pike, 2017) siendo esta un 5,1%, más prevalente en mujeres que en hombres, aunque la mortalidad es más elevada en hombres. Un meta-análisis de ocho estudios poblacionales europeos mostró que la prevalencia de la EA en mujeres era del 7,1% frente al 3,3% en hombres (Bacigalupo et al., 2018).

3.2.1.1.2 Genética

- **APOE**

La apolipoproteína E (APOE) es el factor de riesgo genético más involucrado. Este gen se encuentra en el cromosoma *19q13.2* y codifica tres alelos comunes ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$). Un alelo APOE $\epsilon 4$ aumenta 3 veces el riesgo de la EA y dos alelos APOE $\epsilon 4$ aumentan 12 veces el riesgo de la EA. El alelo APOE $\epsilon 2$ se asocia con un menor riesgo de EA y una edad de inicio más tardía. El alelo APOE $\epsilon 3$ es el más frecuente en la población caucásica. Recientemente, un estudio reportó el hallazgo de una paciente que, incluso con la mutación dominante, PSEN1, una gran carga amiloide a nivel cerebral y unos niveles limitados de tau, no presentó sintomatología de EA hasta los 70 años, 3 veces más tarde de lo esperado. La paciente tenía dos copias de la mutación APOE $\epsilon 3$ Christchurch (R136S), lo que se hipotetizó que podría suponer un factor preventivo en cuanto a la manifestación clínica de la EA (Arboleda-Velasquez et al., 2019). La APOE es un regulador del metabolismo de las lipoproteínas que influye principalmente en tres funciones importantes en el SNC: transporte de colesterol, neuroplasticidad e inflamación. Así, APOE se une a A β mediando su agregación y su eliminación. Algunos estudios han relacionado el genotipo $\epsilon 4$ con niveles de tau y A $\beta 42$ en líquido cefalorraquídeo (LCR) (Day et al., 2019; Morris et al., 2010). Así, la APOE modifica la patogénesis de la EA principalmente de forma dependiente de la APP, pero afectando a su vez a la patología de tau (Brouwers et al., 2008; Chai, 2007; Fanny M. Elahi and Bruce L. Miller, 2017).

- **Genes de riesgo**

En los últimos años se han descrito al menos más de 20 genes y loci de riesgo para la EA. Estos genes están implicados en tres vías moleculares principales: metabolismo de colesterol y lípidos, endocitosis y respuesta inflamatoria e inmunitaria (Karch & Goate, 2015).

Así, los genes implicados en el metabolismo del colesterol serían ABCA7, CLU y SORL1. Las variantes de genes implicados en la neuroinflamación y la respuesta inmune, son los siguientes: CR1, CD33, MS4A, CLU, ABCA7, EPHA y TREM2 (Harold et al., 2009; Lambert et al., 2009).

Asimismo, se han identificado mutaciones en genes asociados a otros mecanismos alterados en la EA como la endocitosis, fundamental para el procesamiento de la APP, la actividad sináptica y la liberación de neurotransmisores. Estos serían: BIN1, PICALM, CD2AP, EPHA1, SORL1 (Cruchaga et al., 2013; Harold et al., 2009; Hollingworth et al., 2011; Lambert et al., 2013; Naj et al., 2011). Estudios de GWAS (*Genome-wide association study*) y NGS (*Next generation sequencing*) también han descrito genes de riesgo que, o bien encajan en las vías conocidas alteradas en la enfermedad, o bien podrían revelar vías adicionales implicadas en ella (Karch & Goate, 2015).

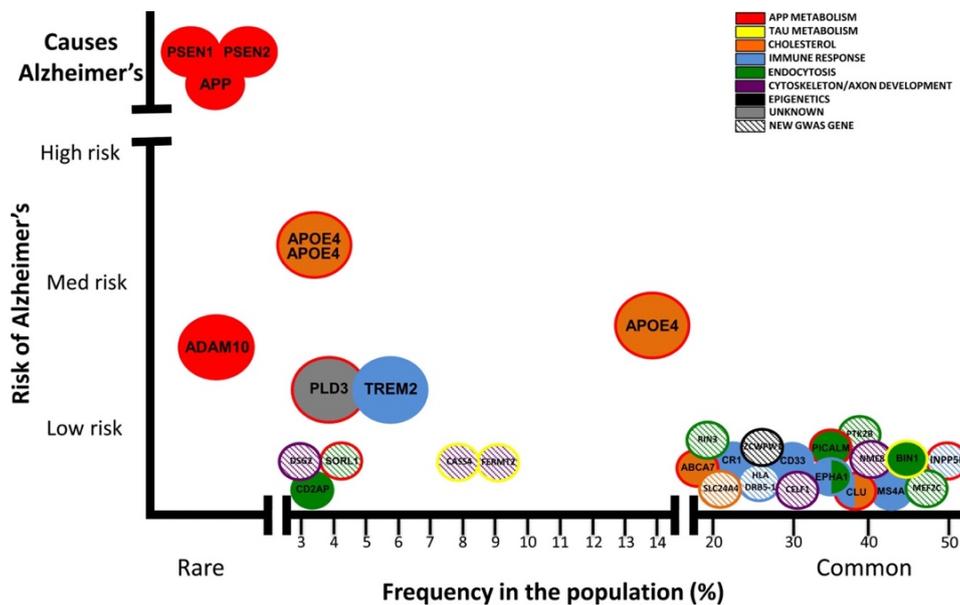


Figura 4. Imagen de los genes que contribuyen a la enfermedad de EA. Se muestran tanto los genes que aumentan el riesgo de desarrollar la enfermedad como los de herencia dominante. Obtenida de (Rouch et al., 2015; Sharp et al., 2011).

3.2.1.2 Factores de riesgo modificables:

3.2.1.2.1 Factores de riesgo ligados a otras enfermedades:

Las enfermedades cardiovasculares suponen un factor de riesgo elevado para el desarrollo de EA: Entre estas encontraríamos la hipertensión (Rouch et al., 2015; Sharp et al., 2011) la diabetes (Biessels et al., 2006; Cheng et al., 2012; Cooper et al., 2015; F. P. Lu et al., 2009; Plassman et al., 2010; Profenno et al., 2010) la obesidad (K. J. Anstey et al., 2011; Beydoun et al., 2008; Gustafson et al., 2012; Lee et al., 2017; Sellbom & Gunstad, 2012) o la hiperlipidemia (Kivipelto & Solomon, 2006; McGuinness et al., 2009). Todas ellas parecen incrementar tanto la pérdida cognitiva como las

probabilidades de sufrir EA y otras demencias. Asimismo, los traumatismos craneoencefálicos (Barnes et al., 2014; Gardner & Yaffe, 2014) o la depresión (Diniz et al., 2013; Ownby et al., 2006) también parecen afectar directamente al desarrollo de la EA. Por otra parte, el hecho de haber sufrido un ictus, tanto isquémico como hemorrágico está directamente relacionado con el desarrollo de EA, un tercio de los pacientes que han sufrido un ictus desarrollan demencia de tipo EA (di Napoli et al., 2018; Garcia et al., 2013; Hachinski, 2018; Jacquin et al., 2014; Kalaria et al., 2016; Leys & Pasquier, 2012; Mijajlović et al., 2017; Mark Slevin et al., 2017; Spsychala et al., 2017; Winovich et al., 2017; Y. Zhang & Cao, 2020).

3.2.1.2.2 Factores de riesgo ligados al estilo de vida:

El tabaquismo (Kaarin J. Anstey et al., 2007; Zhong et al., 2015) y el consumo de alcohol (Neafsey & Collins, 2011) están asociados a una mayor probabilidad de sufrir EA. Asimismo, se ha demostrado que la actividad cognitiva y social (Corpas, Solana, et al., 2019; Garcíá-Mesa et al., 2015) (Corpas, Solana, et al., 2019; Garcíá-Mesa et al., 2015), junto con la educación superior (Corpas, Solana, et al., 2019; Garcíá-Mesa et al., 2015) disminuyen el riesgo de deterioro cognitivo y la EA al aumentar la reserva cognitiva. Se entiende como reserva cognitiva la capacidad del cerebro para resistir los efectos del daño neuropatológico (Lim et al., 2013; Osorio et al., 2015; Potvin et al., 2012; Sterniczuk et al., 2013; Xu et al., 2019). Aproximadamente el 19% de los casos de EA en todo el mundo son potencialmente atribuibles a un bajo nivel educativo (Corpas, Solana, et al., 2019; Garcíá-Mesa et al., 2015). Además, recientemente se ha descubierto que el bilingüismo potencia la reserva cognitiva disminuyendo la neurodegeneración (Lim et al., 2013; Osorio et al., 2015; Potvin et al., 2012; Sterniczuk et al., 2013; Xu et al., 2019). Estos estudios sugieren que el bilingüismo puede retrasar la aparición de la demencia en aproximadamente 4,5 años al contribuir a la reserva cognitiva.

Por otra parte, estudios previos han demostrado que la actividad física (Corpas, Solana, et al., 2019; Garcíá-Mesa et al., 2015) la dieta mediterránea u otras dietas saludables, y una buena calidad de sueño (Lim et al., 2013; Osorio et al., 2015; Potvin et al., 2012; Sterniczuk et al., 2013; Xu et al., 2019) también pueden actuar como factores preventivos para el desarrollo de la EA. Recientemente se ha demostrado que la

disrupción del sueño esta directamente ligado al desarrollo de la EA (Kaneshwaran et al., 2019). Así, una prevención basada en evitar estos factores de riesgo, modificables, como tener un estilo de vida saludable, que a su vez evite el desarrollo de otras enfermedades, fomentar la actividad social e intelectual, hacer ejercicio o seguir una dieta saludable ayudarían a reducir los casos de EA.

4. Áreas cerebrales implicadas en la EA

La neurodegeneración producida en la EA, se traduce en una pérdida de la masa cerebral que, a nivel anatómico, se puede observar como un “encogimiento” del tejido cerebral, acompañado de un aumento ventricular, como se observa en la figura 4.

Así, cuando estos cambios se producen en determinadas áreas del cerebro, la funcionalidad de las mismas se ve afectada, traduciéndose, eventualmente, en la sintomatología encontrada en la EA.

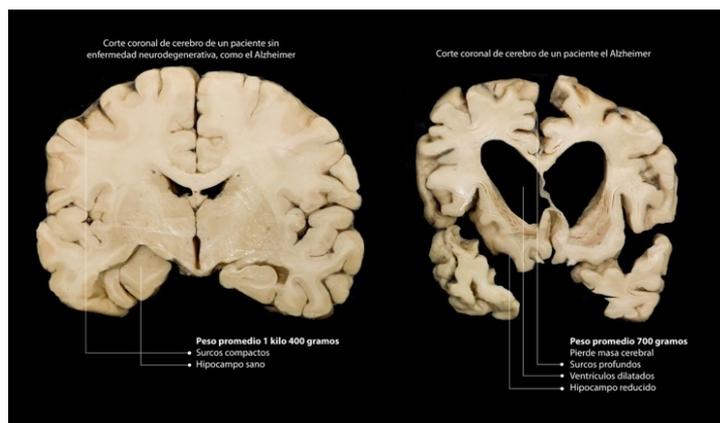


Figura 5. Diferencia entre un cerebro sano y un cerebro con EA, donde se observa la atrofia cortical y el aumento ventricular (https://magazine.medlineplus.gov/pdf/fall_2010.pdf).

Tal y como se describe en la figura 5, las primeras áreas afectadas en la EA son el hipocampo y el córtex etorrinal, que están directamente conectados y ampliamente implicados en la memoria. Estudios recientes también han reportado la importancia del locus coeruleus como posible zona de iniciación de la EA preclínica, previa a la afectación del hipocampo (Chalermpanupap et al., 2017; A. Ghosh et al., 2019). Posteriormente, la neurodegeneración se expande a los lóbulos temporales mediales, diseminándose gradualmente hasta afectar al córtex temporoparietal y cingulado posterior pudiendo llegar al tronco encefálico en las fases más avanzadas de la enfermedad.

Los diferentes lóbulos corticales desempeñan funciones básicas como son el lenguaje, la memoria, la capacidad de planificación, la actividad motora etc. La afectación de los lóbulos parietal y temporal en la EA, se asocia con la desorientación y la pérdida del lenguaje y la memoria (Cerejeira, Lagarto, & Mukaetova-Ladinska, 2012; Kang et al., 2019; McDonald & Mott, 2017; Shinosaki et al., 2000). La afectación del sistema límbico en la EA, por otra parte, está correlacionada tanto con la pérdida cognitiva como con la aparición de BPSD asociados a la emocionalidad (Rolls, 2019; Roxo et al., 2011). El sistema límbico está constituido por centros importantes como el tálamo, hipotálamo, el hipocampo y la amígdala. Este está ampliamente implicado en la regulación de las emociones y la memoria, funcionando, a su vez, en constante interacción con el córtex.

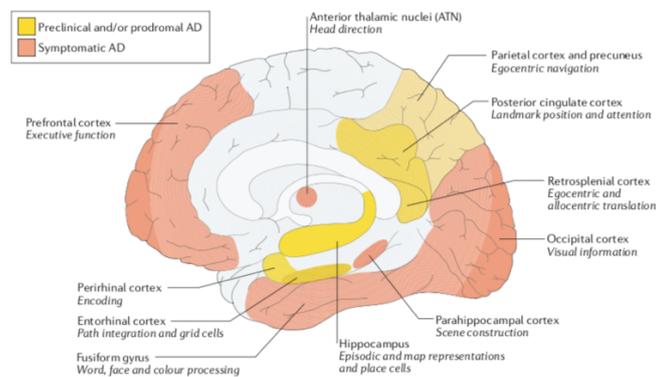


Figura 6: Ilustración de los cambios anatomopatológicos relacionados con la EA (Coughlan et al., 2018).

4.1 Hipocampo

El hipocampo es una estructura subcortical que se encuentra situada en la parte media del lóbulo temporal. Este es un componente clave del "circuito emocional", que abarca el lóbulo temporal medial (MTL: hipocampo, amígdala y corteza entorrinal), el hipotálamo, el septum y el córtex prefrontal. El hipocampo está incluido en la formación hipocámpica, en la cual también se incluyen el giro dentado y el subículo (Eichenbaum et al., 1992; Moser & Moser, 1998) El hipocampo está formado por tres capas celulares: Una capa molecular, que es la zona más superficial del hipocampo, una capa piramidal, que conformaría el continuo CA1, CA2 y CA3, y una capa plexiforme, ausente de cuerpos celulares (Yassa & Stark, 2011).

4.1.1 ¿Cómo está conectado el hipocampo?

Según el bucle clásico trisináptico: El cortex entorrinal proporciona la principal entrada cortical al hipocampo a través de la ruta perforante al giro dentado (DG). El DG se proyecta a la región CA3 a través de la vía de la fibra musgosa. CA3 se proyecta a la región CA1 a través de la vía Schaffer Colateral. Finalmente, CA1 se proyecta hacia la corteza entorrinal, completando el bucle (Knierim, 2015).

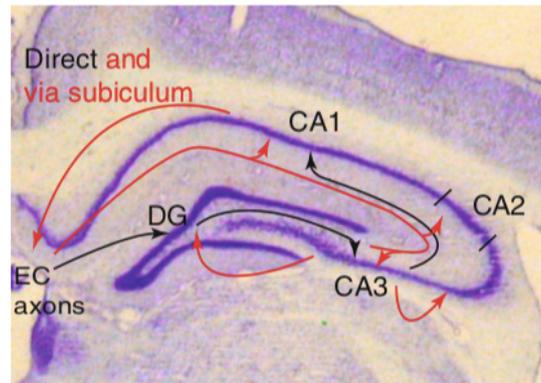


Figura 7. Corte coronal del eje transversal de un hipocampo de ratón. Las líneas negras trazan el clásico "bucle trisináptico". Las líneas rojas representan otras vías importantes en el hipocampo, incluidas las proyecciones directas desde la corteza entorrinal (CE) a los tres campos de CA, la retroalimentación a la CE a través del subículo, los circuitos colaterales recurrentes de CA3 y la proyección de retroalimentación de CA3 a DG (Knierim, 2015; Yassa & Stark, 2011).

Sin embargo, nuevos estudios han revelado la presencia de una conectividad generalizada a lo largo del eje longitudinal y transversal, con múltiples circuitos de procesamiento en paralelo y circuitos de retroalimentación. Así, una adición importante al circuito trisináptico clásico es que los axones CA3, además de sus proyecciones a CA1, hacen sinapsis con otras neuronas CA3. Por otra parte, la corteza entorrinal se proyecta no solo al DG, sino también directamente a las regiones CA3 y CA1. CA3 proporciona una proyección de retroalimentación al DG, a través de las células musgosas excitatorias del giro dentado, indicando así, que las conexiones hipocámpales no son unidireccionales (Knierim, 2015; Yassa & Stark, 2011). Finalmente, estudios recientes han demostrado que la región CA2, tradicionalmente considerada una zona de transición entre CA1 y CA3, también tiene sus propias funciones, como intervenir en la memoria social (Tzakis & Holahan, 2019).

4.1.2 Funciones y afectación del hipocampo en la EA.

El hipocampo está altamente involucrado en el aprendizaje, la memoria declarativa, la consolidación de la memoria, y la memoria espacial. Una de las características principales del hipocampo es su neurogénesis, directamente implicada en el aprendizaje y la memoria, y normalmente disminuida en la EA (Anacker & Hen, 2017; Cameron & Glover, 2015; Kempermann et al., 2015; Kuruppu & Matthews, 2013; Toda et al., 2019). Asimismo, el hipocampo es considerado una de las estructuras primordiales para la potenciación a largo plazo (LTP), que consiste en el refuerzo sináptico, como parte de consolidación de la memoria y del aprendizaje (Cobar et al., 2017; Pang & Lu, 2004; Papaleonidopoulos & Papatheodoropoulos, 2018).

El hipocampo es una de las primeras y principales áreas implicadas en el desarrollo de la EA. Así la afectación del hipocampo se asocia con la pérdida de la memoria, el aprendizaje y la desorientación (Jaroudi et al., 2017; Moodley & Chan, 2014). De hecho, se ha demostrado que la atrofia del hipocampo presente en el defecto cognitivo leve o *Mild Cognitive Impairment* (MCI), típico del envejecimiento, es un predictor de la probabilidad de desarrollar EA. Así, a mayor atrofia hipocampal, más probabilidades de que el MCI desemboque en el desarrollo de EA (Fernández-Cabello et al., 2020; Mueller et al., 2010). Además, diversos estudios basados en modelos animales de EA donde el hipocampo aparece afectado, han demostrado su fuerte implicación en la memoria espacial, el aprendizaje y la memoria de reconocimiento (Barker & Warburton, 2011; Belfiore et al., 2019; Cattaud et al., 2018; Cohen et al., 2013; Cohen & Stackman, 2015; Kim et al., 2017; Squire et al., 2015).

5. Diagnóstico de la EA

Históricamente, la EA se ha dividido en diferentes fases clínicas según su sintomatología. Estas fases serían la fase preclínica, caracterizada por ser la fase silenciosa o asintomática de la enfermedad. La fase pródromo de la EA o MCI. Y la EA clínica que puede ser temprana o avanzada, según el estado de la enfermedad y que se caracteriza por presentar la sintomatología típica de la EA (Benzinger et al., 2013; Dubois et al., 2007; Fanny M. Elahi and Bruce L. Miller, 2017; McKhann et al., 2011)A pesar de que esta clasificación ha sido útil para el diagnóstico clínico de la EA hasta

ahora, nuevas propuestas que entienden la enfermedad como un continuo, están sustituyendo este tipo de praxis.

Así, actualmente el diagnóstico de la EA se está realizando en base a biomarcadores moleculares, analizados a través del LCR y complementados con métodos de neuroimagen que analizan las estructuras anatómicas y su funcionalidad y *tests* psicológicos y cognitivos, que evalúan la sintomatología del paciente (Benzinger et al., 2013; Jack et al., 2010; McKhann et al., 2011; Selkoe & Hardy, 2016). El empleo del uso de biomarcadores facilita el diagnóstico de la enfermedad cuando ésta todavía no presenta sintomatología, ofreciendo así, la posibilidad de prevenirla en los primeros estadios de la misma (Egan et al., 2018). El modelo de la figura 8 representa la evolución temporal de cinco biomarcadores de EA bien establecidos y su relación con la aparición y progresión de los síntomas clínicos (Benzinger et al., 2013; Fleisher et al., 2015).

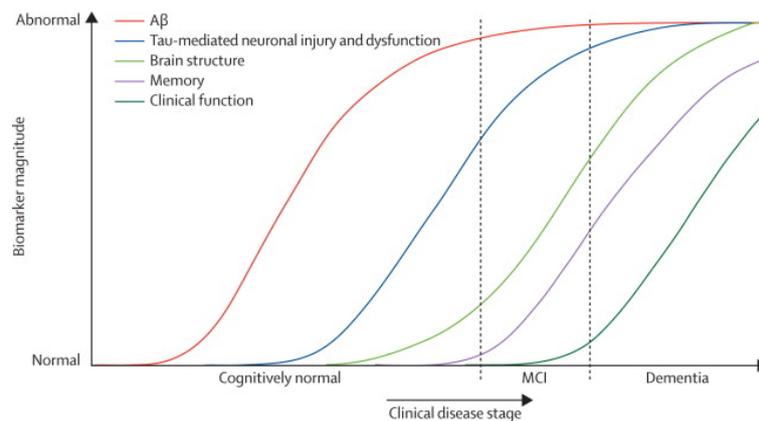


Figura 8. Correlación entre los biomarcadores de la EA y la presentación clínica de la enfermedad (Aisen et al., 2017).

6. Neuropatología de la EA.

La deposición anormal de proteínas mal plegadas es un signo característico de las enfermedades neurodegenerativas. La EA se caracteriza por la deposición extracelular de la proteína β amiloide ($A\beta$) en forma de placas seniles y la agregación intraneuronal de la proteína tau en forma de filamentos. A pesar de que las patologías amiloide y tau son los rasgos característicos de la EA, se han descrito otros mecanismos altamente implicados en el desarrollo de esta enfermedad. Estos son: la neurodegeneración y la pérdida de plasticidad, la neuroinflamación, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y la alteración cerebrovascular.

6.1 Patología amiloide

Desde 1991, la hipótesis de la cascada de amiloide ha desempeñado un papel destacado en la explicación de la patogenia de la EA. Esta hipótesis propone que la deposición de $A\beta$ es el evento patológico inicial de la enfermedad que conduce a la formación de placas amiloides y a la formación de NFTs, con la consecuente neurodegeneración y el desarrollo de la demencia (Hardy & Allsop, 1991). Esta hipótesis ha sido muy discutida y se ha ido reformulando a lo largo de los años. Actualmente se propone que la falta de homeostasis entre la generación de amiloide y su eliminación causa un incremento de oligómeros neurotóxicos de $A\beta$ y péptidos relacionados que desencadenarían la cascada de efectos patológicos en la EA. En la EA familiar hay un exceso de generación de $A\beta$, al igual que en los modelos animales utilizados para el estudio de terapias experimentales. Sin embargo, en la EA esporádica, no se conocen las causas del desequilibrio homeostático que induce la acumulación de $A\beta$ (Huang et al., 2019). Además, el desarrollo de terapias experimentales contra $A\beta$ no se ha traducido en beneficios clínicos hasta el momento. Así, actualmente se propone el estudio de dianas iniciales que puedan inducir el desequilibrio homeostático de $A\beta$ y la patología tau (Imbimbo et al., 2020).

6.1.1 Escisión de APP para la formación del péptido $A\beta$.

El $A\beta$ es un péptido de 39 a 42 aminoácidos que se origina a partir de la proteína transmembrana APP por acción de las secretasas.

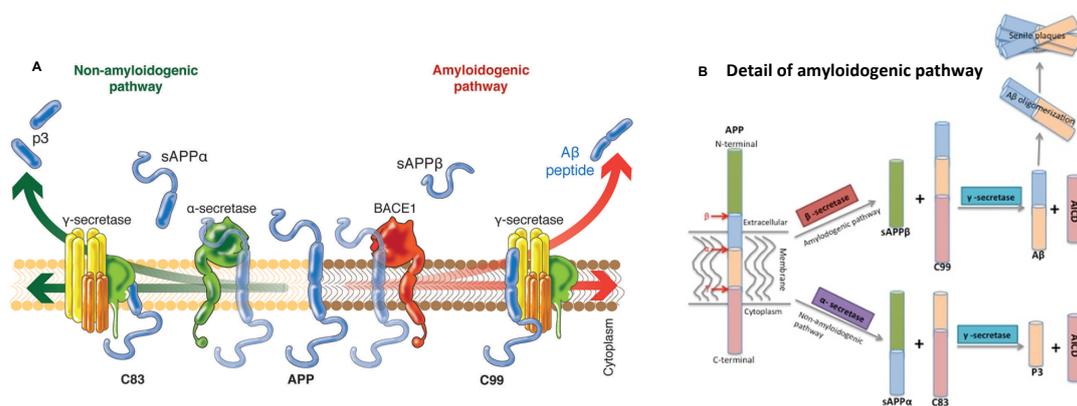


Figura 9. A. Vías no-amiloidogénica y amiloidogénica, implicadas en el procesamiento de la APP (Zolezzi et al., 2014). B. Detalle de la vía amiloidogénica por la que se procesa el APP para producir $A\beta$ (X. Sun et al., 2015).

Dependiendo de la secretasa que corte la APP, se llevará a cabo la vía amiloidogénica o la vía no amiloidogénica. La principal secretasa implicada en la vía no-amiloidogénica, y que corta el APP en condiciones normales es ADAM10 (Ray et al., 2020). La principal secretasa implicada en la vía amiloidogénica que da lugar a la generación del A β es BACE1 (Johnson et al., 2020). Las dos isoformas más importantes de A β en la EA son A β 40 y A β 42, denominadas en base al número de aminoácidos. A β 42 es la isoforma más amiloidogénica ya que se agrega más fácilmente, es esta isoforma la que se encuentra predominantemente en las placas amiloides (Kellett & Hooper, 2009; Nalivaeva & Turner, 2013).

6.1.1.1 Vía no-amiloidogénica

La vía no amiloidogénica se da con el procesamiento no patológico de la APP. Es decir, en condiciones normales la APP se corta mediante la α -secretasa liberando, en el dominio intracelular el fragmento carboxiterminal α -CTF (C83) y una porción soluble denominada sAPP α . Así, con el procesamiento posterior de α -CTF mediante la γ -secretasa, se generan por una parte el dominio intracelular de APP y por otra parte el péptido p3 que no contribuyen a la patogenia de la EA (Ray et al., 2020).

6.1.1.2 Vía amiloidogénica

En la EA, sin embargo, la APP se procesa mediante la vía amiloidogénica, esto implica que la proteína que procesa la APP, es la β -secretasa en vez de la α -secretasa. Esta β -secretasa libera sAPP β , por una parte, y un fragmento carboxi-terminal β -CTF (C99), que, al ser hidrolizado por la γ -secretasa da lugar a A β y a AICD, el dominio amiloide intracelular (Johnson et al., 2020).

6.1.2 Conformaciones amiloideas.

El agregado amiloide más común aislado del cerebro de los pacientes con EA es fibrilar (J. X. Lu et al., 2013). La fibra amiloide está compuesta por una serie de péptidos A β , que se pliegan sobre sí mismos, dispuestos en forma paralela o antiparalela para formar un protofilamento delgado. Cuando estos protofilamentos se envuelven entre sí forman una fibrilla de amiloide madura. Las fibras amiloides se agregan formando las placas amiloides, observables mediante tinción de tioflavina-S en tejido humano postmortem y en modelos de ratón transgénicos de EA (Oakley et al., 2006).

Sin embargo, a pesar de que los agregados fibrilares sean la forma más común, se conoce que los oligómeros son la especie amiloide más tóxica, ya que actúan provocando el colapso sináptico y la pérdida de las estructuras dendríticas (Koffie et al., 2009).

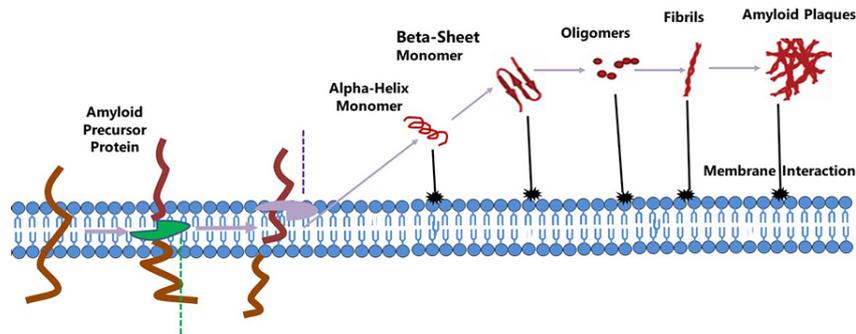


Figura 10. Esquema que muestra el mecanismo de formación de las placas amiloides desde el péptido β -amiloide. (<https://www.bocsci.com/a-beta-pathways-plaque-formation-app-metabolism.html>)

Así, los trímeros tienen una toxicidad 3 veces superior que la de los monómeros y los tetrameros 13 veces mayor que los monómeros (Ono et al., 2009). El orden de toxicidad de los oligómeros amiloides relacionado con la estructura es: tetrameros > trímeros > dímeros > fibrillas > monómeros (Campioni et al., 2010). El motivo principal de su neurotoxicidad es la exposición de motivos hidrofóbicos y no su tamaño (Campioni et al., 2010).

Así, el amiloide en sus diferentes conformaciones, genera neurotoxicidad (Hane et al., 2011; Sokolov et al., 2006), al aumentar: las especies reactivas del oxígeno, la neuroinflamación (Eskici & Axelsen, 2012; Greenough et al., 2013; Mutisya et al., 1994) la formación de canales iónicos de calcio (LIN et al., 2001), con el subsecuente aumento de la permeabilidad de la membrana celular (Hane et al., 2011; Sokolov et al., 2006), la sobreexcitación de los receptores de NMDA (Roberson et al., 2007), la unión competitiva por los receptores de membrana (Q. Wang et al., 2004), y la modificación de la estructura del ADN (Geng et al., 2010). A β también activa diferentes quinasas que favorecen la fosforilación de tau (Cruz & Tsai, 2004; Kitagishi et al., 2014; Noble et al., 2003; Shukla et al., 2012) otra parte, los procesos implicados en la eliminación de los depósitos de A β y de los efectos oxidantes causados por este disminuyen con la edad (Verdier & Penke, 2005). Así, el problema aparece no solo en la producción de A β sino también en la eliminación del mismo (Greenough et al., 2013).

6.2 Patología de tau

La patología de tau en la EA depende de la fosforilación y la agregación de tau. Tau, una proteína asociada a microtúbulos (MAPT) que polimeriza la tubulina de estos y participa en el mantenimiento del citoesqueleto neuronal, particularmente a nivel axonal. El gen tau humano está localizado en el cromosoma 17. En el cerebro humano adulto se expresan seis isoformas de tau como resultado del empalme alternativo del ARNm, con o sin exones 2, 3 y 10. El exón 10 contiene la región de unión a microtúbulos. La inserción del exón 10 produce isoformas de tau de 4 repeticiones (4R), mientras que las isoformas de tau de 3 repeticiones (3R) se producen sin el exón 10 (M. Goedert et al., 1988) El cerebro humano adulto expresa isoformas de tau tanto 3R como 4R. Estas se expresan con mayor abundancia en los axones neuronales del SNC, aunque también pueden encontrarse en el soma y las dendritas, en los oligodendrocitos y en tejidos no neurales (Šimić et al., 2016). La patología de tau en la EA afecta directamente a la estabilidad de los microtúbulos, la pérdida sináptica y la atrofia neuronal, además de la neurotoxicidad originada por sí misma. La importancia de la pérdida de funcionalidad de tau en la EA ha llevado a proponer la hipótesis de tau como principal causante de la EA (Šimić et al., 2016).

6.2.1 Hiperfosforilación de tau

Tau, en su isoforma más larga, contiene 35 residuos de treonina, 45 de serina y 5 de tirosina, lo que significa que casi el 20% de la proteína tau es susceptible de ser fosforilada. La funcionalidad de tau depende de su fosforilación, así tau es más eficaz promoviendo el ensamblaje de los microtúbulos en estados menos fosforilados. En la EA, tau se fosforila en sitios "patológicos", característicos de la enfermedad. En el tejido de cerebro humano con EA se observó inmunorreactividad ante los anticuerpos que detectan lugares patológicos de hiperfosforilación de tau, como por ejemplo: AT8 (epítipo pS199 / pS202 / pT205), PHF-1 (epítipo pS396 / pS404) y pS262 (Mondragón-Rodríguez et al., 2013) En la figura 11 se muestran los aminoácidos que normalmente se fosforilan en ausencia de enfermedad y los fosforilados en los casos de EA.

El estado de fosforilación de tau depende del balance de la actividad de las proteínas quinasas y fosfatasa. Así, una mayor actividad de las quinasas que actúan sobre tau favorecerá su hiperfosforilación, mientras que el estado no fosforilado de tau dependerá

de la actividad de las fosfatasa. tau puede fosforilarse *in vitro* mediante varias proteínas quinasas. Entre ellas, las más estudiadas son: la quinasa 5 dependiente de ciclina (Cdk5) y la glucógeno sintasa quinasa-3 β (GSK-3 β) (F. Liu et al., 2002).

In vitro, GSK-3 β fosforila tau principalmente a través de la vía PI3K / AKT / GSK-3 β (Kitagishi et al., 2014). Cdk5, por otra parte, se define como una quinasa neuronal que se activa mediante p35 y p39 (Shukla et al., 2012), estas a su vez se activan ante el estrés oxidativo, la toxicidad glutamatérgica, la disfunción mitocondrial, la sobreactivación de los canales de calcio y la exposición a A β (Cruz & Tsai, 2004; Noble et al., 2003). Así, el aumento de la entrada de calcio promueve que la calpaína escinda p35 y p39 en fragmentos p25 y p29, formando un complejo más estable e hiperactivo de Cdk5-p25 y Cdk5-29 (Kumar et al., 2015; Noble et al., 2013). La sobreexpresión de estas quinasas (junto a otras), conduce a la hiperfosforilación de tau y la formación de filamentos helicoidales emparejados (PHF) o *Paired helical filaments*. Otras de las proteínas quinasas involucradas en la fosforilación de tau serían: quinasas reguladoras de afinidad de microtubulos (MARK), proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), proteína quinasa II, proteína quinasa A (PKA), proteína quinasa C (PKC), c-Jun N-terminal quinasa (JNK), proteína quinasa asociada a muerte 1 (DAPK1) y proteína quinasa II dependiente de Ca²⁺ + / calmodulina (CaMKII) (Castro-Alvarez et al., 2014; Kumar et al., 2015).

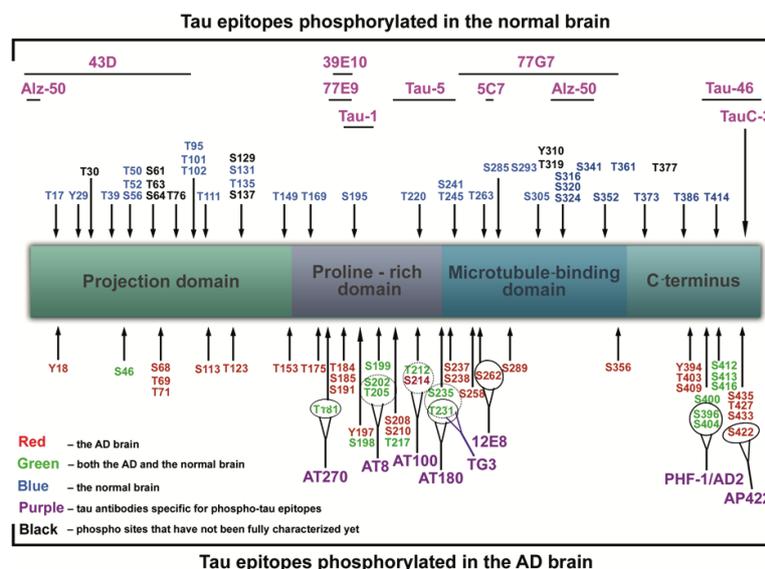


Figura 11. Sitios de fosforilación de la proteína tau en condiciones normales y epítodos específicos de los principales anticuerpos tau en la EA (Arnaud et al., 2011; R. Liu et al., 2008).

Por otra parte, la fosforilación de tau también depende de la actividad de las fosfatasa, encargadas de quitar los grupos fosfato. La proteína fosfatasa más estudiada en cuanto a la desfosforilación de tau es la fosfatasa 2A (PP2A). PP2A es una serina/treonina fosfatasa, compuesta por una subunidad catalítica (PP2Ac) y dos unidades reguladoras de las que depende su actividad (Arnaud et al., 2011; R. Liu et al., 2008).

6.2.2 Conformaciones y propagación de la proteína tau.

Similar a A β , la proteína tau atraviesa una serie de estructuras intermedias antes de agregarse en filamentos helicoidales emparejados (PHF) y NFTs. Así, la tau hiperfosforilada, se desagrega de los microtúbulos, favoreciendo su inestabilidad, y, o bien permanece en forma de oligómeros fosforilados o bien se agrega formando los PHF, que a su vez se agregan para formar los NFTs.

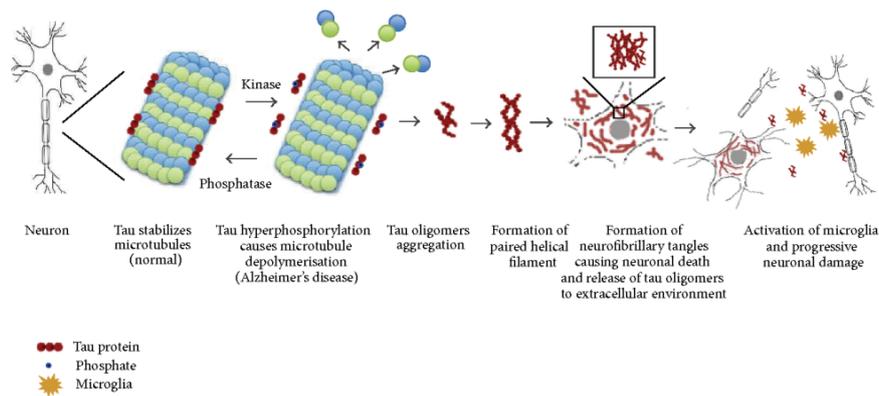


Figura 12. Representación esquemática de las diferentes conformaciones de la proteína tau en la EA.

Igual que ocurre con A β , se ha descubierto que la forma más tóxica de tau es su conformación oligomérica (Steinhilb et al., 2007). De esta forma, tau induce la neurodegeneración de dos formas: 1. Al estar hiperfosforilada y desprenderse de los microtúbulos favoreciendo la inestabilidad del citoesqueleto, la pérdida sináptica y la atrofia neuronal (DuBoff et al., 2012; Tenreiro et al., 2014). 2. Al agregarse en oligómeros, estructuras PHF y NFTs que resultan neurotóxicas a nivel celular (DuBoff et al., 2012; Tenreiro et al., 2014).

Asimismo, estudios *in vivo* e *in vitro* (Clavaguera et al., 2009; Michel Goedert & Spillantini, 2017; Kametani & Hasegawa, 2018; Nonaka et al., 2010; Steinhilb et al., 2007) han demostrado que la forma hiperfosfoilada de tau, al entrar en contacto con tau

no fosforilada, favorece la fosforilación de esta última, lo que plantea la hipótesis de que los agregados de tau se formen en un pequeño número de neuronas, desde donde se propagan a las neuronas vecinas (Frost et al., 2009; Iba et al., 2013). Estudios recientes (Chalermphanupap et al., 2017; A. Ghosh et al., 2019) han confirmado la hipótesis de (Heiko Braak & del Tredici, 2011), que indica que los cúmulos iniciales de tau hiperfosforilada podrían comenzar en las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus (LC) de pacientes jóvenes, que no tendrían porque desarrollar EA, pero aumentando sus probabilidades para desarrollarla. Estos estudios, además han confirmado la correlación entre la hiperfosforilación de tau en el LC, previa a la aparición de sintomatología y neuropatología característica de la EA.

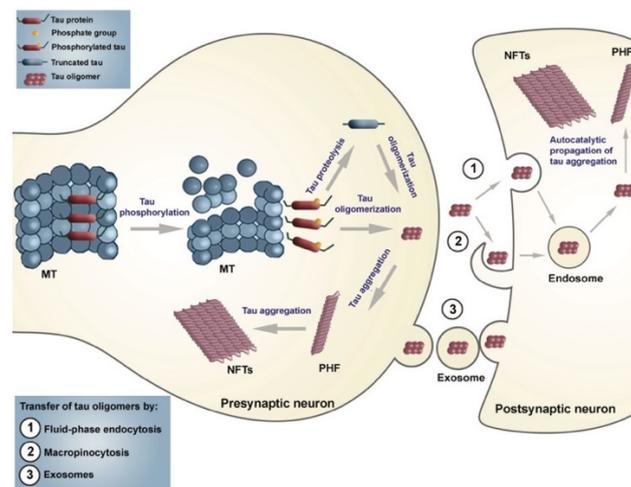


Figura 13. Representación esquemática de la propagación interneuronal de tau. (Palop et al., 2006; Seeley et al., 2009)

6.3 ¿Cómo se relacionan A β y tau en la progresión de la EA?

El origen de la deposición de A β suele ser en el hipocampo, los lóbulos frontal y temporal, y el sistema límbico (Figura 14, b, fila superior). Por otra parte, la degeneración causada por tau suele comenzar en el hipocampo y en los lóbulos temporales mediales (córtex entorrinal), diseminándose progresivamente a otras áreas del neocórtex (Figura 14, b fila inferior). Esto, corrobora el hecho de que las patologías neurodegenerativas se diseminan a lo largo de las redes neuronales, conduciendo a la atrofia de las mismas (Palop et al., 2006; Seeley et al., 2009). Además, el número de NFTs y de placas amiloides, está directamente correlacionado con la gravedad de la EA y la aparición de BPSD, tal y como reveló el análisis de cerebros de pacientes de EA (Zubenko et al., 1991). Estudios *in vivo* en modelos de ratón confirmaron esta

correlación entre neuropatología de A β y tau y la aparición de BPSD (Castillo-Mariqueo & Giménez-Llort, 2020).

Asimismo, Braak y Braak describieron la estadificación de la proteína tau (H. Braak & Braak, 1991) y su importante relación con la manifestación de los síntomas clínicos de la enfermedad. Según sus estudios, ésta aparece primero en la región transentorrinal, extendiéndose a la región límbica, y áreas neocorticales, correlacionándose con la pérdida cognitiva y la aparición de BPSD, como han confirmado estudios PET recientes (Okamura & Yanai, 2017) Además, un estudio reciente en el que se realizó el análisis histológico de cerebros post-mortem confirmó que la sintomatología clínica de la EA se corresponde con la patología tau, pero no con la de A β (Cerejeira, Lagarto, Mukaetova-Ladinska, et al., 2012). Por otra parte, el análisis de cerebros de pacientes de EA con BPSD, mostraron niveles cuatro o cinco veces superiores de tau hiperfosforilada en el córtex entorrinal y temporal en comparación con los controles (Cerejeira, Lagarto, Mukaetova-Ladinska, et al., 2012). Por lo tanto, estos hallazgos han sugerido que la EA sea un trastorno que se desencadena por el deterioro del metabolismo del APP, pero que progresa a través de la patología de tau (Snyder & Innis, 1979).

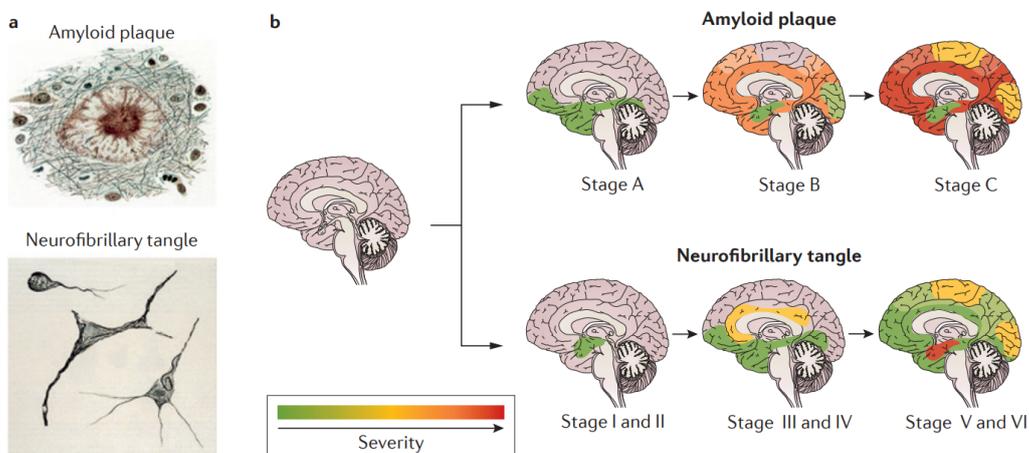


Figura 14. Evolución patológica de la enfermedad de Alzheimer. A. Imágenes de las placas amiloides y los NFTs del libro de texto: Spielmeyer "Histopathologie des Nervensystems. **B.** Propagación de β -amiloide y NFTs a medida que avanza la enfermedad (Masters et al., 2015).

6.3 Neurotransmisores alterados en la EA

Además de las patologías de tau y A β , la EA se caracteriza por una alta disfunción del sistema de neurotransmisores como consecuencia de la atrofia y la pérdida sináptica de determinados grupos neuronales. De hecho, la alteración de los neurotransmisores ha

sido uno de los principales focos de tratamientos para la enfermedad. Los sistemas de neurotransmisores más afectados en la EA son el sistema colinérgico y glutamatérgico, y en menor medida, el gabaérgico (Kandimalla & Reddy, 2017; Snyder & Innis, 1979)

6.3.1 Sistema colinérgico

La acetilcolina (ACh) es un neurotransmisor esencial para el procesamiento de la memoria y el aprendizaje. La ACh también regula la estructura cortical, la dinámica sanguínea cerebral, y el ciclo de vigilia-sueño. En pacientes de EA, tanto la concentración de ACh como su actividad, se encuentran disminuidas. Así, en la EA se produce; la alteración tanto de los niveles como de la actividad de la acetilcolina, la alteración de su recaptación, la pérdida de las neuronas colinérgicas y la disminución de la actividad de la acetilcolinesterasa (Berger-Sweeney, 2003; H. Ferreira-Vieira et al., 2016).

6.3.2 Sistema glutamatérgico

El glutamato un neurotransmisor excitador y una forma iónica del ácido glutámico. El glutamato está ampliamente involucrado en el proceso de aprendizaje y memoria en el cortex y en el hipocampo. Este neurotransmisor interviene en la potenciación a largo plazo (LTP) y la depresión a largo plazo (LTD) que regulan la consolidación de la memoria y el aprendizaje. El glutamato regula la actividad de los receptores NMDA presentes en la membrana postsináptica de las neuronas glutamatergicas. En la EA hay una mayor liberación presináptica del glutamato, que a su vez va acompañada por una menor recaptación del mismo, lo que genera la conocida excitotoxicidad glutamatérgica. Así, se produce una activación sostenida de los receptores NMDA que perjudica el aprendizaje y la memoria (Do et al., 2013; Gal-Ben-Ari. & Rosenblum, 2012; Köles et al., 2016).

6.3.3 Sistema GABAérgico

GABA es un neurotransmisor inhibitor. Mientras que el papel de la transmisión neuronal glutamatérgica y colinérgica ha sido ampliamente investigado en la EA, el papel preciso de los neurotransmisores GABA en la EA todavía no está bien caracterizado. Sin embargo, está demostrado que el receptor GABA (A) del sistema GABAérgico está alterado en el envejecimiento y la EA. Aunque su relevancia en los

procesos de pérdida de memoria es menos conocido, en modelos transgénicos de EA, se ha visto una menor funcionalidad de este receptor en el sitio de unión a benzodiazepinas (Revilla et al., 2014; Rissman et al., 2007). En este sentido, las alteraciones GABAérgicas se proponen como asociadas a la presencia de BPSD.

1.1 6.4 Neurodegeneración y neuroplasticidad

La EA es una enfermedad caracterizada por la neurodegeneración y la pérdida sináptica progresiva (Gómez-Isla et al., 1997). La densidad sináptica esta directamente correlacionada con la capacidad cognitiva y la posibilidad de generar LTPs que favorezcan la consolidación de la memoria (Wosiski-Kuhn & Stranahan, 2012). Así, a medida que evoluciona la enfermedad, la pérdida sináptica aumenta, correlacionándose con los déficits cognitivos.

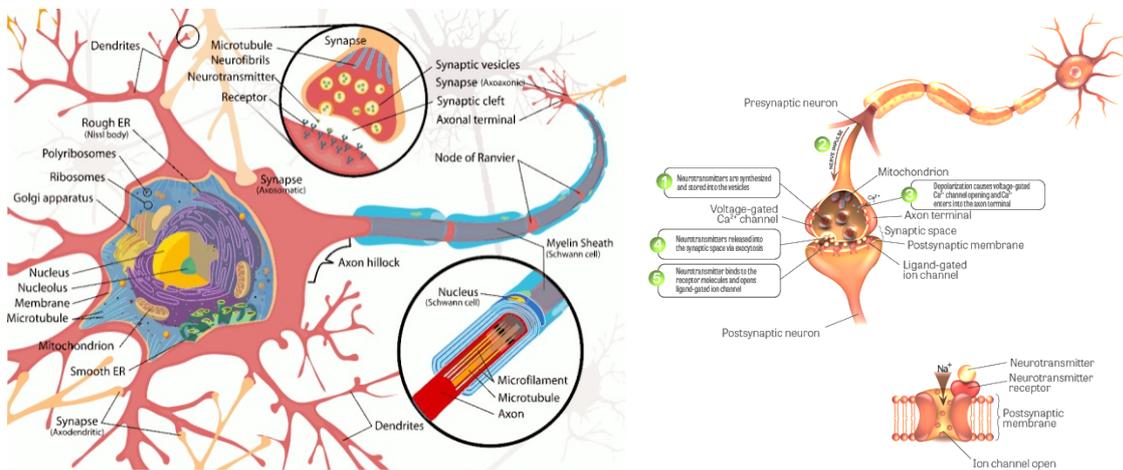


Figura 15. Imágenes representativas de una neurona (izquierda) y una sinapsis (derecha).

A pesar de que inicialmente las investigaciones se centraron en el estudio de A β como principal inductor de sinaptotoxicidad, se ha demostrado que la pérdida neuronal es paralela a la distribución de tau hiperfosforilada y de NFTs en la EA. De hecho, incluso en ausencia de NFTs, los ratones que sobreexpresan tau humana muestran una degeneración sináptica significativa, lo que confirma a la tau oligomérica soluble como la especie sinaptotóxica importante en el desarrollo de la EA (Gao et al., 2018). Por lo tanto, la patología de tau, la pérdida sináptica y la progresión y manifestación clínica de la EA están directamente relacionadas (Forner et al., 2017; Overk & Masliah, 2014).

Por otra parte, está ampliamente demostrado que la pérdida sináptica precede a la pérdida neuronal (Hoover et al., 2010; Masliah et al., 1991; Scheff et al., 2006, 2011).

Así, la afectación axonal y de los extremos presinápticos disminuiría las sinapsis que, eventualmente conducirían a la neurodegeneración celular (Overk & Masliah, 2014). Esto se confirmó al encontrar alteradas proteínas implicadas en el tráfico de las vesículas sinápticas, elementos estructurales de las sinapsis y el reciclaje de neurotransmisores (Ferrer et al., 2010).

6.4 Estrés oxidativo y daño mitocondrial

El aumento del estrés oxidativo se ha relacionado con el proceso de envejecimiento (Venkateshappa et al., 2012). El estrés oxidativo es el estado redox resultante de un desequilibrio entre la generación y la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS son subproductos fisiológicos que actúan como un arma de doble filo en el sistema biológico (Nunomura et al., 2001): pueden cumplir funciones cruciales como señalar moléculas en situaciones controladas, pero también pueden producir daños biológicos cuando están presentes en cantidades excesivas. Su principal característica patológica es la oxidación de biomoléculas principales como los ácidos nucleicos (ADN, ARN), las proteínas y los lípidos. El cerebro es altamente susceptible al desequilibrio oxidativo debido a su alta demanda de energía, alto consumo de oxígeno, abundancia de ácidos grasos poliinsaturados, fácilmente peroxidables, y la escasez relativa de moléculas antioxidantes. Así, el estrés oxidativo juega un papel crítico en la EA (Swerdlow, 2011).

La principal fuente de generación de ROS es la mitocondria. El deterioro progresivo de la función mitocondrial también se ha implicado en el envejecimiento y la EA (Lovell et al., 2001; Williams et al., 2006). Las neuronas dependen de las mitocondrias para la producción de energía mediante la fosforilación oxidativa. Por lo tanto, la disfunción mitocondrial de la EA genera la imposibilidad ejercer su función homeostática en la regulación de ROS, así como sus funciones primordiales. Por otra parte, el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial probablemente se retroalimenten amplificando la patogenia de la EA (Mondragón-Rodríguez et al., 2013) caracterizada a su vez por; la peroxidación lipídica (Anderson et al., 1996), la oxidación de proteínas (Anderson et al., 1996) y la oxidación de ácidos nucleicos (ADN / ARN) (Okamoto et al., 2014).

Además del aumento generalizado de ROS, la EA se caracteriza por un desequilibrio oxidativo que también se traduce en una disminución significativa de los niveles de enzimas y proteínas antioxidantes. Así, pacientes con EA muestran disminuidos niveles plasmáticos de antioxidantes como la albúmina, la bilirrubina, el ácido úrico, el licopeno, la vitamina A, la vitamina C y la vitamina E. Pacientes con EA también mostraron una disminución significativa en la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión peroxidasa 1 y la hemooxigenasa tanto en el cortex prefrontal como en el temporal, aunque los niveles de expresión de algunas de ellas se encontraron aumentados a modo de respuesta compensatoria con el fin de regular el aumento oxidativo de la enfermedad (Cryan & Holmes, 2005).

6.5 Neuroinflamación

La neuroinflamación sostenida es un factor de riesgo de enfermedades relacionadas con la edad, incluidas las lesiones cerebrovasculares y la EA (Furman et al., 2019; Lénárt et al., 2016). Las condiciones inflamatorias sistémicas pueden desencadenar o agravar una serie de enfermedades cardiovasculares y metabólicas que también contribuyen a la disfunción cerebral y la demencia (Ojala et al., 2009; Song et al., 2015; Williams et al., 2006). De hecho, los procesos inflamatorios se consideran cada vez más los culpables de la fragilidad y las enfermedades asociadas a la edad. Nuevos estudios están demostrando que la neuroinflamación no es meramente una consecuencia de la neurodegeneración, sino que contribuye directamente a la patogenia de la EA, dándose incluso antes que la pérdida sináptica (Heneka et al., 2015; Kinney et al., 2018). Además, procesos que promuevan la inflamación como un traumatismo craneoencefálico, inflamación sistémica o un ictus, favorecerán los procesos pro-inflamatorios que contribuyan a la neurodegeneración y el desarrollo de demencia. De igual forma, la neuropatología y la agregación proteica característica de la EA desencadenará procesos inflamatorios que favorecerán la cronicidad de la enfermedad inflamatoria.

6.5.1 Microglía y astrocitos

Los astrocitos y la microglia son los principales tipos celulares implicados en la respuesta inflamatoria en el SNC y la homeostasis del mismo (Bolós et al., 2017). Las células microgliales son los macrófagos residentes del SNC; y representan alrededor del

10% de la población del SNC. Estas juegan un papel crucial, no sólo en la neurogénesis, y plasticidad neuronal, sino también como primera línea de defensa inmune en caso de cualquier tipo de lesión cerebral (Calsolaro & Edison, 2016). La actividad microglial varía según el área cerebral (Bachiller et al., 2018). Se ha propuesto que los cambios tanto funcionales como morfológicos del hipocampo están asociados con cambios en la respuesta de las células microgliales durante la progresión de la EA (Henneman et al., 2009). En la EA, la microglía juega un papel beneficioso en la generación de anticuerpos anti-A β y en la eliminación de las placas amiloides (Cai et al., 2014). Sin embargo, por otro lado, favorece la inflamación al liberar mediadores proinflamatorios que contribuyen a la producción y acumulación de A β (Prinz & Priller, 2014). Asimismo, la formación de placas amiloides induce la activación microglial a través del componente del inflammasoma: NLRP3, que a su vez se correlaciona con una mayor expresión del receptor de activación expresado por células mieloides 2 (TREM2) y una mayor expresión de APOE observable en la microglía activada (Bachiller et al., 2018).

Diversos estudios también han reportado que la microglía, además de activarse ante la tau fosforilada (p-tau) o agregada en forma de PHF o NFTs, favorece la hiperfosforilación de la misma. Así, se demostró que TREM 2, un receptor de respuesta microglial, agravaba la hiperfosforilación de tau en la EA (Maphis et al., 2015)

Los astrocitos, por otra parte, contribuyen a la homeóstasis y neuroprotección del tejido neuronal, así en la EA se produce una marcada astrogliosis que acompaña a la activación de la microglía (Sofroniew, 2009; Sofroniew & Vinters, 2010). Estudios de análisis del tejido post-mortem de pacientes con EA (Medeiros & LaFerla, 2013) y modelos animales (Olabarria et al., 2010) han reportado una marcada astrogliosis en esta enfermedad, que puede ocurrir incluso antes que la deposición de A β (Kummer et al., 2014).

6.5.2 Citoquinas y óxido nítrico.

La activación de la microglía está caracterizada y modulada por citoquinas, ampliamente implicadas en los procesos pro- y anti-inflamatorios. Estudios con animales transgénicos de A β revelaron la presencia de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 y IL-1 α (Lee et al., 2017; Wood et al., 1993). Asimismo, la exposición de

la microglía a A β 42 aumentó la producción de pro-IL-1 β , IL-6 y TNF- α (Medeiros & LaFerla, 2013; Rangaraju et al., 2018) Otros estudios revelaron la correlación entre p-tau y la presencia elevada de citoquinas como IL- β , IL-6, IL-8, IL18, TNF- α , (S. Ghosh et al., 2013). La sobreexpresión de IL-1 β también provocó la activación de p38 MAPK y GSK-3 β que a su vez provocaron la hiperfosforilación de tau en ratones 3xTg-AD (K. Li et al., 2019).

Además de sus acciones directas a través de receptores de superficie, las citoquinas estimulan el enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) tanto en la microglia como en la astrogliá, produciendo altos niveles de NO (óxido nítrico) que pueden ser tóxicos para las neuronas. iNOS está regulado al alza en los cerebros con EA (Vodovotz et al., 1996) y el *knockout* genético de iNOS es protector en modelos de ratón con EA (Nathan et al., 2005). Por otra parte, el NO se ha relacionado con un marcado deterioro cognitivo asociado con la disfunción sináptica y la activación glial. Estudios *in vivo* han demostrado que A β 40 promueve la activación de iNOS y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) conduciendo a la posterior activación de c-Jun-NH2-quinasa terminal (JNK) y el factor nuclear KB (NFKB) y suponiendo un deterioro significativo del aprendizaje y la memoria (Marcus et al., 1998; Omar et al., 1999; Venkateshappa et al., 2012).

6.6 Alteración de la unidad neurovascular y la barrera hematoencefálica.

La unidad neurovascular (NVU) está constituida por células endoteliales, pericitos, glía y neuronas. Su función es controlar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) y el flujo sanguíneo cerebral (FSC), manteniendo la composición química necesaria para el funcionamiento adecuado de los circuitos neuronales. Así, la NVU y la BHE regulan la homeostasis cerebral, limitan la entrada de células plasmáticas, glóbulos rojos y leucocitos, e impiden la entrada de macromoléculas potencialmente neurotóxicas (Guo & Lo, 2009; Moskowitz et al., 2010; Zlokovic, 2008, 2011).

Los trastornos neurodegenerativos como la EA se caracterizan por la afectación de la NVU, la BHE y la disminución del FSC. Así, la interrupción del FSC induce la hipoxia y la muerte neuronal, mientras que la afectación de la NVU y la BHE, promueven la acumulación de especies neurotóxicas y proteínas agregadas que favorecen la neurodegeneración y la aparición de patologías concomitantes como la angiopatía amiloide (AAC) (Guo & Lo, 2009; Moskowitz et al., 2010; Zlokovic, 2008, 2011). La

AAC consiste en el depósito de A β a lo largo de la cerebrovasculatura, favoreciendo la disfunción de la misma y el agravamiento de la EA. Aproximadamente el 80% de los pacientes con EA presentan AAC. De esta forma la alteración de la vasculatura en la EA afecta de dos formas principales: 1. El daño cerebrovascular es suficiente para iniciar la lesión neuronal y la neurodegeneración. 2. La disfunción de la NVU y la BHE, promueven la acumulación de A β y tau al afectar a las vías de eliminación del cerebro (Gupta & Iadecola, 2015; A. R. Nelson et al., 2016; Zlokovic, 2008, 2011). Esto supone, a la vez, la retroalimentación de la patogenia de la EA y la alteración cerebrovascular, ya que, si bien la afectación cerebrovascular puede favorecer el desarrollo de la EA, la EA agrava la BHE y la NVU cronificando su patogenia.

MODELOS EXPERIMENTALES *IN VIVO* Y TERAPIAS DE LA EA

1. Modelos experimentales *in vivo*

El uso de modelos experimentales en la EA es fundamental para una mejor comprensión de los mecanismos biopatológicos implicados en la enfermedad y el desarrollo de nuevos tratamientos. La mayoría de modelos experimentales utilizados para el estudio de la EA han sido modelos *in vivo* de ratones transgénicos que reproducen, principalmente, las mutaciones características de la EA familiar, es decir, las asociadas a APP, PSEN1 y PSEN2 (Puzzo et al., 2015; Wisniewski & Goñi, 2015; Wisniewski & Sigurdsson, 2010). dando como resultado el desarrollo de la patología amiloide. Se han desarrollado algunos modelos con inducción de patología tau por expresión de mutaciones asociadas a taupatías, pero en menor proporción. Esto ha ayudado a comprender la patología relacionada sobre todo con la EA familiar derivada de mutaciones genéticas y con un elevado grado de patología amiloide. Sin embargo, es poco representativo en cuanto a la EA esporádica, que es la más prevalente, como demuestra la complejidad de la EA humana y el fallo clínico de las terapias beneficiosas a nivel experimental. Por ello, el establecimiento de nuevos modelos que reproduzcan otras características patológicas de la enfermedad es de suma importancia.

1.1 Modelos de ratón

Los modelos de ratón han sido los más empleados para el estudio de la EA. El córtex humano es unas 700 veces más grande que el de ratón en cuanto a áreas corticales y número neuronal. La arquitectura básica parece estar conservada a pesar de diferencias

INTRODUCCIÓN

como la presencia de marcadas circunvoluciones en el cerebro humano, y la ausencia de ellas en el cerebro de ratón. Ambos cerebros también presentan diferencias en cuanto a la composición celular y molecular, así, moléculas clave en la EA como A β , tau y APOE son diferentes en sus secuencias, patogenicidad y número de isoformas expresadas. Además, el sistema inmune también es distinto en el cerebro de ratón respecto al humano, diferenciándose entre la proporción de fenotipos microgliales y el patrón de expresión de genes relacionados con la inflamación (Franco Bocanegra et al., 2018)

Los modelos de ratón utilizados en la actualidad se pueden dividir entre modelos de primera y de segunda generación. La diferencia entre ambos tipos de modelo es que los modelos de primera generación están basados en la inserción de transgenes externos con el fin de expresar proteínas vinculadas a la EA. Los modelos de segunda generación, por el contrario, se basan en la realización de mutaciones sin la inserción de transgenes.

Los modelos de primera generación son los más empleados históricamente, constituyendo los denominados modelos transgénicos. Los más utilizados son transgénicos inducidos a partir de transgenes que sobreexpresan proteínas vinculadas a la EA familiar como la APP o las PSEN. Los primeros (hAPP), desarrollados hace más de 25 años, estaban basados en mutaciones que sobreexpresaban APP. Estos, sin embargo, presentaban una muerte temprana además de no reproducir totalmente la patología de la EA (Hsiao et al., 1203).

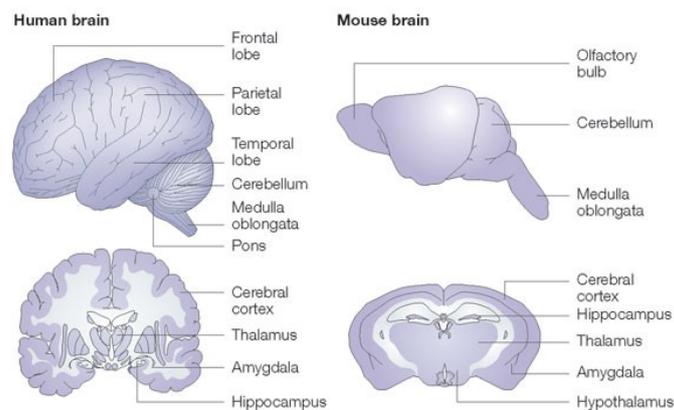


Figura 16. Comparación esquemática entre el cerebro humano y el cerebro de ratón (Atri, 2019).

Posteriormente se desarrollaron transgénicos de ratón con la proteína APP mutada de diferentes formas, dando lugar a los modelos: PDAPP, Tg2576, APP23, APPInd y Tg-APPArcSwe) que reprodujeron mejor la patología amiloide, presentando neuritas

distróficas, pérdida sináptica y cognitiva, microgliosis, inflamación, A β neurotóxico y generación de placas amiloides (Hsiao et al., 2003; Lord et al., 2006; Mucke et al., 2000). Los siguientes modelos de ratón transgénicos se basaron en la mutación de las PSEN (PS1M146V-KI, PS1M146L) (Morgan et al., 2007) estos presentaban excitotoxicidad, degeneración neuronal, alteración del sistema inmune, estrés oxidativo etc. Posteriormente, se desarrollaron los modelos con mutaciones tanto de APP como de PSEN (PS1APP y PS2APP) (Lamb et al., 1999; Richard et al., 2015) caracterizados por presentar; amiloidosis, inflamación, depósitos de A β en el cortex e hipocampo etc. Sin embargo, estos modelos basados en mutaciones de la EA familiar presentaban limitaciones como la aparición de fenotipos adicionales no relacionados con la EA, así como una reproducción sesgada de la enfermedad, basada únicamente en la patología amiloide. En un esfuerzo por replicar la patología de tau, Oddo et al., 2003 generó un modelo triple transgénico, 3xTg-AD. Los 3xTg-AD sobreexpresan APP^{swe} y tauP301L con un fondo *knock-in* PS1M146V. Estos ratones presentan una progresión temporal de gran parte de la patología de la EA, incluida la formación de placas amiloides y NFTs, pérdida sináptica y déficits cognitivos y comportamentales (Belfiore et al., 2019; García-Mesa et al., 2011; Giménez-Llort et al., 2007; Oddo et al., 2003; Torres-Lista et al., 2019; van der Jeugd et al., 2018). Otro modelo con varias mutaciones, 5 concretamente, fueron los ratones 5XFAD generados por (Oakley et al., 2006). Estos portan cinco mutaciones de la EA familiar en los transgenes APP y PS1 (APPK670N / M671L / I716V / V717I Tg y PSEN1M146L / L286V Tg) impulsadas por el promotor Thy-1. Este modelo se caracterizó por una marcada neuroinflamación, gliosis, presencia del péptido A β 42, el más neurotóxico, desde los 2 meses de edad, presentando déficits cognitivos progresivos desde los 4-5 meses y placas amiloides observables mediante la tinción de tioflavina S (Flanigan et al., 2014; Griñán-Ferré et al., 2016; L. Gu et al., 2018; Manji et al., 2019; Oakley et al., 2006; Sadleir et al., 2018).

También se han generado modelos que reproducen la patología tau: 1. Mediante la mutación de tau (MAPT), que resultó en la aparición de NFTs y pérdida cognitiva o 2. De alguna de las quinasas que la fosforilan como GSK3- β , que resultó en tau hiperfosforilada en el hipocampo y córtex, estrés neuronal y astrogliosis reactiva (Lewis et al., 2000). Asimismo, modelos de senescencia acelerada como los SAM también han

revelado la presencia de tau hiperfosforilada asociada a la pérdida cognitiva (Drummond & Wisniewski, 2017)

Como alternativa a los modelos de primera generación y las limitaciones que suponían en cuanto a reproducibilidad de la EA y la investigación farmacológica, se han desarrollado los modelos de ratón de segunda generación (Saito et al., 2014) estos están basados en mutaciones de los genes endógenos sin inserción de transgenes externos. Así, en la EA, estos modelos de ratón se basan en métodos *knock-in* o *knock-out* de mutaciones igualmente asociadas a la EA familiar, por lo que no parecen resolver completamente el problema de los transgénicos de primera generación. Finalmente, se está trabajando en modelos inducidos mediante cirugía, infusión de compuestos, determinadas dietas etc.

1.1.1 Modelo 5XFAD

1.1.1.1 Mutaciones

Los ratones 5XFAD (Oakley et al., 2006) expresan transgenes de APP y PSEN1 humanos con un total de cinco mutaciones ligadas a la EA familiar: la mutación Sueca (K670N / M671L), la más empleada, Florida (I716V) y Londres (V717I) en APP; y las mutaciones M146L y L286V en PSEN1. La mutación Sueca (APPSwe) promueve un mayor aumento de la escisión de APP, produciendo un cambio doble de aminoácidos en las posiciones 670/671 cerca del lugar de corte de la β -secretasa. Las mutaciones London (V717I) y Florida (I716V) se encuentran en la zona de corte de la γ -secretasa, incrementando a su vez la formación de A β . Las mutaciones M146L y L286V en PSEN1 incrementan la ratio de los niveles de A β 42/A β 40. Los ratones 5XFAD se crearon originalmente sobre un fondo híbrido B6SJL, aunque la mayoría de 5XFAD utilizados son con fondo C57BL/6J.

1.1.1.2 Neuropatología

El modelo 5XFAD se caracteriza por una clara patología amiloide de inicio temprano. A los 16 días se observa APP de forma intraneuronal en las neuronas subiculares y piramidales, que, a las 6 semanas, se traduce en la aparición de A β intraneuronal (Richard et al., 2015). Asimismo, la deposición de placas amiloides extracelulares comienza alrededor de los 2 meses, siendo detectables mediante la tinción de tioflavina

S, alrededor de los 2 y 4 meses. Pueden observarse placas amiloides en el córtex (Frontal, parietal y etorrinal), el hipocampo (subículo y giro dentado), el tálamo, y la médula espinal. Esta clara patología amiloide está asociada a una marcada astrogliosis y microgliosis que a su vez se correlaciona con el daño vascular (Giannoni et al., 2016) y la pérdida neuronal y sináptica. Así, se observó un 40% de neuritas distróficas piramidales tras un año, que se correspondió con la pérdida sináptica (Crowe & Ellis-Davies, 2014; Jawhar et al., 2012) También se produjo una reducción de la mielina asociada a la pérdida axonal de la zona CA1 y el córtex a los 2 meses de edad, independientemente de la afectación amiloide (L. Gu et al., 2018). A pesar de la ausencia de NFTs en el modelo 5XFAD, algunos estudios han encontrado tau significativamente hiperfosforilada en dominios asociados a la EA, como la Ser396, a incluso mucho antes de la aparición de cambios cognitivos y conductuales, produciéndose un incremento de su fosforilación con la edad (Griñán-Ferré et al., 2016, 2020; Kanno et al., 2014; Wirths & Zampar, 2020).

1.1.1.3 Comportamiento

El modelo 5XFAD se caracteriza por presentar pérdida cognitiva entre los 3 y 6 meses de edad, según lo evaluado mediante el laberinto en Y, y el laberinto elevado, en cruz (Griñán-Ferré et al., 2018; Pallas et al., 2008) Otros estudios han reportado la pérdida cognitiva en este modelo a partir de un mes, según lo evaluado mediante el Ensayo de reconocimiento de nuevos objetos (NORT) (Griñán-Ferré et al., 2018; Pallas et al., 2008). y el laberinto acuático de Morris (MWM) (Griñán-Ferré et al., 2018; Pallas et al., 2008). Otro estudio, por el contrario, reportó la pérdida de memoria espacial a partir de los 7 meses de edad, según lo evaluado en el MWM (“Recent Perspective About the Amyloid Cascade Hypothesis and Stem Cell-Based Therapy in the Treatment of Alzheimer’s Disease,” 2016)

Por otra parte, este modelo se caracteriza por una disminución de la ansiedad, cuyo tiempo de aparición varía según el test que la evalúe, lo que también representa una de las limitaciones del empleo de modelos animales para el estudio de patologías neurológicas en las que se evalúa el comportamiento y la cognición. Así, según lo evaluado mediante el laberinto en cruz elevado, los 5XFAD muestran una disminución de la ansiedad entre los 3 y 6 meses. Sin embargo, resultados del Ensayo de campo

abierto, indicaron una disminución de la ansiedad entre los 9 y 12 meses de edad (Griñán-Ferré et al., 2018; Pallas et al., 2008), contrario a otros estudios que mostraron un incremento de la misma (Griñán-Ferré et al., 2018; Pallas et al., 2008).

Por último, ni la actividad motora ni la actividad exploratoria se encontraron alteradas en este modelo hasta aproximadamente un año de edad, según lo evaluado en el Ensayo de campo abierto (OF). Por el contrario, los reflejos y la capacidad prensil se encontraron disminuidas entre los 5 y 9 meses de edad según lo evaluado mediante el test sensorimotor y el test de suspensión por la cola (Camus et al., 2015; Heuer et al., 2012).

1.2 Otros modelos

1.2.1 Invertebrados

Asimismo, se han desarrollado modelos de animales invertebrados debido a sus ventajas para analizar características genéticas, su fácil manejo, ciclo de vida corto etc. En *Drosophila melanogaster* se han desarrollado dos modelos, uno basado en la inserción de transgenes APP/BACE1 y otro en la inserción de y mutación de tau (Griñán-Ferré et al., 2018; Pallas et al., 2008), ambos desarrollaron características típicas de la EA, lo mismo ocurre con *Caenorhabditis elegans*, en el que también se ha generado un modelo mediante la inserción de transgenes relacionados con A β , así como con tau, aquí se encontró formación de placas amiloides, degeneración axonal etc. Sin embargo, dada la gran distancia que tienen estos modelos de la fisiología humana, su uso es limitado.

1.2.2 Ratas

Además de los modelos de ratón, se ha desarrollado un menor número de modelos de EA con ratas transgénicas. Estas tienen la ventaja de que son más similares a los humanos en sus características fisiológicas, morfológicas y genéticas. Además, presentan un fenotipo conductual más rico, lo que hace posible realizar pruebas conductuales más complejas (Camus et al., 2015; Heuer et al., 2012). Sin embargo, las limitaciones de los modelos de ratas son similares a las de ratones, sólo reproducen la EA familiar. Actualmente existen varios modelos bien caracterizados como: hPS1, basado en la sobreexpresión de PS1 humano o ratas triple-transgénicas de PS/AP (Griñán-Ferré et al., 2018; Pallas et al., 2008),

1.1.1 Cerdos

También se han desarrollado modelos transgénicos en modelos porcinos debido a su similitud con los humanos, más cercana que los modelos murinos y su mayor esperanza de vida. Así, actualmente hay modelos porcinos, transgénicos, de varios genes que incluyen; APP mutada (APPSw) (Camus et al., 2015; Heuer et al., 2012) APP/PS1 (Schmidt et al., 2015; Schütt et al., 2016) y APP/tau/PS1 (Griñán-Ferré et al., 2018; Pallas et al., 2008).

1.1.2 Modelos fisiológicos

Así encontrar un modelo animal que reproduzca la EA de manera natural resulta atractivo en cuanto a la investigación de la EA esporádica.

El ratón SAMP8 (Senescence-accelerated mouse prone 8) es un modelo de envejecimiento obtenido por selección fenotípica que desarrolla demencia y patología de EA más leve que en ratones transgénicos y no forma placas de amiloide ni NFTs. Se ha propuesto como modelo de EA esporádica en las fases tempranas, aunque no está validado como tal (Camus et al., 2015; Heuer et al., 2012).

Varias especies más cercanas a la humana que los roedores, desarrollan de forma natural características neuropatológicas similares a las observadas en la EA. Las más conocidas son:

1.1.2.1 Primates no humanos. Desarrollan de manera típica la patología A β relacionada con la edad, sin embargo, la taupatía es rara y/o limitada y la pérdida cognitiva es más típica de la pérdida de memoria relacionada con la edad que del deterioro cognitivo encontrado en la EA (Schmidt et al., 2015; Schütt et al., 2016).

1.1.2.2 Perros. Son de las especies más caracterizadas en cuanto al desarrollo de la EA. Los perros de edad avanzada tienen la misma secuencia A β que los humanos y desarrollan placas a partir de los 8-9 años de edad. Sin embargo, las limitaciones de este modelo incluyen la falta de NFTs, la falta de placas

compactas y la variabilidad presentada patológicamente entre los diferentes animales (Schmidt et al., 2015; Schütt et al., 2016).

1.1.2.3 **Cerdos *Octodon degu***. Tienen una alta homología de secuencia con el A β humano, además presentan acumulación intracelular y extracelular de A β , placas amiloides en edades avanzadas, acumulación de tau intracelular, astrocitosis, cambios sinápticos y deterioro de la memoria que se correlaciona con elevados niveles de oligómeros. Sin embargo, su patología parece ser inconsistente y con alta variabilidad (Steffen et al., 2016).

En resumen, los modelos fisiológicos representan los mejores modelos disponibles en cuanto a las formas esporádicas de la EA. Sin embargo, existen limitaciones científicas y prácticas que impiden el uso generalizado de estos modelos. Por ejemplo, los mejores modelos tienen una larga vida útil, puede haber mucha variabilidad entre animales implicando mayores costes y tiempo del estudio etc. Finalmente, a pesar de una mayor homología de secuencia con la tau humana, muy pocos modelos fisiológicos tienen evidencia de tauopatía y ninguno tiene una presencia generalizada de NFTs similar a la de la EA (Braidy et al., 2015; Drummond & Wisniewski, 2017; Salazar et al., 2016).

2. Terapias en la EA

2.1 Tratamientos actuales de la EA

Actualmente no existe cura para la EA y los medicamentos que están disponibles únicamente actúan sobre la sintomatología de la enfermedad, sin alterar la progresión de la misma. Su utilidad es mejorar la calidad del paciente y sus cuidadores. Estos, a su vez, mejoran la capacidad cognitiva, pero sin mejorar los BPSD presentados por los pacientes. Los dos tipos de medicamentos disponibles son: inhibidores de la colinesterasa y antagonistas del NMDA. Dentro de los inhibidores de la colinesterasa encontramos el donepezil, la galantamina y la rivastigmina. Los efectos generados por los inhibidores colinérgicos son sobre la cognición y son generalmente modestos y variables entre pacientes (Grossberg et al., 2013; H. Ferreira-Vieira et al., 2016). En cuanto al antagonista del NMDA, la memantina; se ha demostrado que tiene beneficios moderados en la EA (Areosa Sastre et al., 2005; Atri et al., 2013; Grossberg et al., 2013). La adición de memantina a la monoterapia con donepezil, puede ser beneficiosa en aquellos con EA en etapa intermedia (Howard et al., 2012). Si bien estos

medicamentos representan los mejores tratamientos farmacológicos disponibles actualmente en la EA, su efecto es leve y no alteran el curso del proceso neurodegenerativo subyacente. Además, los pocos ensayos clínicos que se han realizado en la EA en la última década han tenido una tasa de fracaso del 99,6% (Cummings et al., 2014).

2.2 Tratamientos en estudio.

Los tratamientos actuales farmacológicos en estudio para el tratamiento de la EA son; tratamientos antiinflamatorios, antihipertensivos, inhibidores de las secretasas, inmunosupresivos etc. (Atri, 2019; Robinson & Keating, 2006; Yiannopoulou & Papageorgiou, 2020). En cuanto a los tratamientos no farmacológicos; se han estudiado terapias basadas en la inmunización tanto activa, mediante el desarrollo de una vacuna contra A β (Rosenberg & Lambracht-Washington, 2020) como pasiva; mediante el uso de anticuerpos monoclonales contra A β (Bapinezumab, solanezumab y aducanumab) y tau (Briggs et al., 2016). Otros tratamientos en estudio son la inyección de células madre, el uso de nutriceuticos (Sawikr et al., 2017) como la melatonina (Corpas et al., 2018), el resveratrol (Corpas, Griñán-Ferré, et al., 2019) la cúrcuma (Tang et al., 2017) y el uso de vitaminas (Yiannopoulou & Papageorgiou, 2020) el uso de oscilaciones gamma y mediante estimulación de luz y sonido (Adaikkan et al., 2019) para romper las placas amiloides, y la reducción sanguínea del amiloide por plasmaferesis (Boada et al., 2019; Cuberas-Borrós et al., 2018).

Por otra parte, la mayoría de estudios actuales se encuentran focalizados en estrategias preventivas de la enfermedad como: 1-Mejorar el diagnóstico de la enfermedad mediante neuroimagen y el uso de biomarcadores. 2-Realizar recomendaciones dirigidas a la población general y población de riesgo con el fin de controlar y evitar los factores de riesgo asociados al estilo de vida que favorecen la aparición de la EA. 3- El tratamiento de enfermedades precedentes a la EA (Crous-Bou et al., 2017).

2.2.1 TPPU

La neuroinflamación es una de las características fundamentales de la EA y el envejecimiento. Así, recientemente están emergiendo nuevas terapias que la aborden mediante el uso de compuestos antiinflamatorios. Entre estos compuestos, se

encuentran los inhibidores del enzima epóxido hidrolasa soluble (sEH). Los sEH tienen un efecto terapéutico debido a que aumentan la disponibilidad del ácido epoxieicosatrienoico (EET), permitiendo que sus efectos beneficiosos se prolonguen en el tiempo.

El enzima epóxido hidrolasa soluble humana (sEH) se encuentra en múltiples tejidos participando en la regulación de la presión arterial, la inflamación, y la función neural (Morisseau & Hammock, 2013). El sEH hidroliza los ácidos grasos epoxi (EpFA) como los ácidos epoxieicosatrienoicos (EET) en sus correspondientes ácidos dihidroxieicosatrienoicos (DHET) (Spector & Norris, 2007). Los eicosanoides (ETTs) son moléculas de señalización lipídica derivadas del ácido araquidónico (ARA) por la actividad enzimática de ciclooxigenasas (COX), lipoxigenasas (LOX) y citocromo P450 (CYP450). Los principales eicosanoides antiinflamatorios son los ácidos grasos epoxi (EpFA), derivados de la actividad del CYP450 sobre ácidos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA). EpFA incluye dos tipos de metabolitos: ácidos hidroxieicosatrienoicos (HETE) e isómeros del ácido epoxieicosatrienoico (EET) (Wagner et al., 2017). Las principales funciones descritas para los EET son la regulación de la vasodilatación y la angiogénesis, sus efectos antiinflamatorios y la reducción del estrés oxidativo y el bloqueo de la respuesta al estrés del retículo endoplasmático (RE) (Spector & Norris, 2007). Además, recientemente se ha demostrado que los EET ejercen funciones en el SNC como la modulación de la angiogénesis, la regulación del FSC, median la señalización neuroendocrina y modulan procesos neuronales y gliales específicos (Zarriello et al., 2019).

Así, los sEH, como el 1-trifluorometoxifenil-3-(1-propionilpiperidin-4-il) urea (TPPU) suprimen eficazmente la respuesta inflamatoria, regulando el flujo sanguíneo y protegiendo a las neuronas de la excitotoxicidad (Zarriello et al., 2019). El TPPU, concretamente, es un sEH comercialmente disponible cuya alta disponibilidad oral (Ostermann et al., 2015; L. Zhang et al., 2020) ha sido previamente demostrada. Además, estudios recientes han demostrado la eficacia del TPPU en modelos *in vivo* de EA (Griñán-Ferré et al., 2020).

CRP y mCRP

1. CRP

La proteína C-reactiva (CRP) fue identificada por Tillet y Francis en 1930 en la sangre de pacientes con infección neumocócica (Tillett & Francis, 1930). La CRP es conocida por ser un marcador de procesos pro-inflamatorios altamente utilizado. La prueba de CRP de alta sensibilidad (hsCRP), capaz de detectar valores por debajo de 3 mg/L, es una prueba sensible de inflamación de bajo grado; la población normal presenta niveles medios de hsCRP de 2 mg / L, a pesar de que los valores deseables son inferiores a 1 mg/L (Strang et al., 2012). Su síntesis se produce en el hígado y es estimulada por citoquinas proinflamatorias, en particular IL-6, IL-1 y TNF- α (Sproston et al., 2018) durante la fase aguda de la infección (Strang et al., 2012). La expresión crónica moderadamente elevada de CRP se asocia con un mayor riesgo de una amplia gama de enfermedades (Simats et al., 2016) Además, otros tipos de células, como las neuronas del cerebro con EA, pueden producir CRP, aunque en cantidades más bajas que los hepatocitos (Yasojima et al., 2000).

La CRP nativa secretada por el hígado consta de cinco subunidades idénticas de 206 aminoácidos dispuestas en una estructura aplanada de anillo de gelatina β característica de la superfamilia de proteínas de las pentraxinas. Las pentraxinas son proteínas conservadas evolutivamente implicadas en respuestas inmunológicas. Estas subunidades de 23 KDa con la misma orientación se ensamblan estrechamente mediante enlaces no covalentes para formar un pentámero discoide con un vacío central (Caprio et al., 2018)

Cada subunidad o monómero de CRP contiene un núcleo hidrófobo compuesto por dos láminas beta antiparalelas estabilizadas mediante un enlace disulfuro. El pentámero de CRP presenta dos caras: la cara A o efectora; que se une a los receptores de la superficie celular C1q y Fc γ del complemento en los leucocitos, mediando la respuesta inmune. Y la cara B o de unión; que exhibe un sitio de unión por subunidad, asociándose a la fosfocolina expuesta en las membranas lipídicas celulares apoptóticas e inflamadas, y paredes celulares bacterianas. La cara B por lo tanto, media la respuesta inflamatoria (Caprio et al., 2018).

Así, cuando la cara B de la CRP se une a la fosfocolina, la CRP se transforma en la proteína C-reactiva pentamérica modificada (pCRP*), que posteriormente se disociará en la proteína C-reactiva monomérica (mCRP), es decir, en sus monómeros o subunidades. De esta forma, la CRP regula la respuesta inflamatoria dependiendo de su conformación. Así, CRP no muestra propiedades proinflamatorias intrínsecas. De hecho, la CRP es esencial en la defensa del huésped y la eliminación de las células apoptóticas, ejerciendo, según el contexto, propiedades antiinflamatorias. Sin embargo, las isoformas estructurales; mCRP y pCRP*, poseen potentes efectos proinflamatorios que pueden mediar las respuestas inmunes, inflamatorias, protrombóticas y angiogénicas de múltiples enfermedades (Caprio et al., 2018).

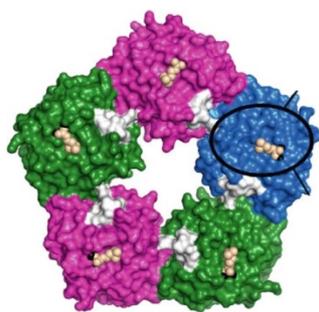


Figura 17. Estructura de CRP. La estructura del pentámero de pCRP con cada monómero individual resaltado en un color diferente (púrpura, verde, azul) y fosfocolina (rodeado) ubicada en el lugar de unión del ligando (resaltado en un círculo negro) (McFadyen et al., 2018b).

2. Activación de CRP mediante cambios conformacionales

Estudios moleculares *ex vivo* han demostrado que la activación de la CRP se produce en los vasos, plaquetas y monocitos activados y tejidos dañados, donde las formas proinflamatorias (mCRP y pCRP*), pueden activar las células inmunitarias y las reacciones del complemento (Strang et al., 2012). También se ha informado recientemente de una fracción libre de mCRP en suero de pacientes con niveles elevados de CRP nativa circulante (>100 mg / L; en la respuesta inflamatoria aguda), aunque el sitio de origen de la disociación no está claro (Caprio et al., 2018).

La disociación de CRP a mCRP está mediada por la unión de las subunidades de CRP a los residuos de fosfocolina de fosfatidilcolinas (PC), expuestos en las membranas celulares (Figura 18). Las PCs se generan por la acción de las enzimas fosfolipasa proinflamatoria (PLA2) que actúan sobre los fosfolípidos de la superficie celular. Así, cuando la CRP se asocia a la PC, sufre un cambio conformacional a un pentámero

activado denominado pCRP *. Este resto, aunque todavía pentamérico, existe en una forma más abierta, uniéndose a un grupo de cabeza globular del complemento, C1q, que se inserta en la cavidad central forzando a las subunidades del pentámero a separarse más, lo que finalmente causa la disociación a mCRP (Caprio et al., 2018). La mCRP cuya solubilidad acuosa es mucho menor, se asocia con la ECM tisular del tejido dañado, de vasculatura inflamada o de componentes inflamatorios activos (Mark Slevin et al., 2018). Demostró que el bloqueo de mCRP a la PC puede ser una buena diana en cuanto a la inhibición de los efectos patológicos generados por mCRP.

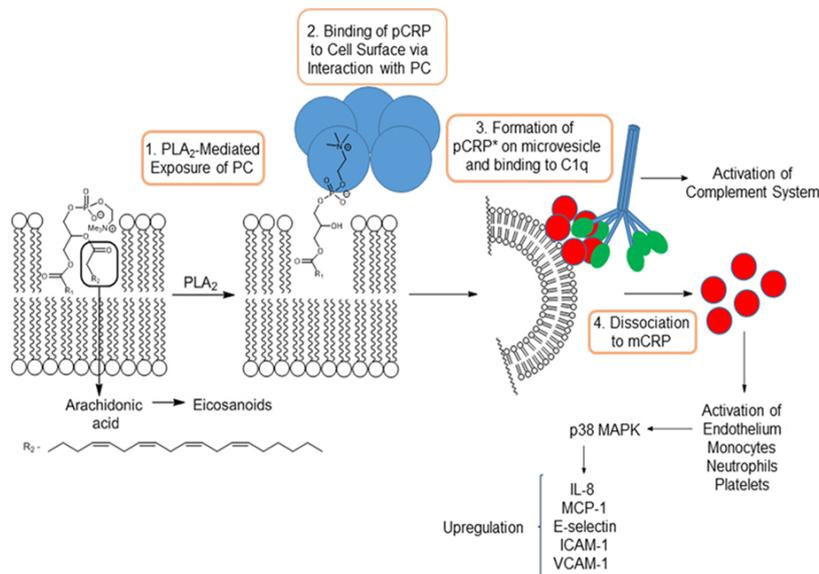


Figura 18. Representación esquemática del mecanismo de modificación de CRP, en la imagen descrita como pCRP (proteína C-reactiva pentamérica) a pCRP*, para su posterior disociación a mCRP y detalle de sus posteriores funciones (Caprio et al., 2018).

3. mCRP

Por análisis microscópico electrónico, CRP se ve como un disco pentamérico estrechamente compacto de cinco subunidades globulares que rodean un vacío anular de acuerdo con la estructura de la proteína definida por análisis de cristalización (Figura 19). La mCRP biológica, sin embargo, existe como agregados de fibras cortas pero gruesas que no parecen ser estructuras densas, sino estructuras similares a varillas cortas asociadas sueltas (Fig. 1B) (Potempa et al., 1983, 2015a).

Durante mucho tiempo se pensó que CRP era el mediador directo de la inflamación que conducía a la regulación positiva de las moléculas de adhesión celular endotelial, la activación del sistema del complemento, la fagocitosis y la liberación de una variedad

de proteínas de señalización inflamatorias. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que realmente es la forma monomérica de CRP, la mCRP la que desempeña la inflamación comúnmente asociada a CRP. Esta, interactúa con células endoteliales, neutrófilos, macrófagos y plaquetas. La mCRP induce una regulación positiva de IL-8, MCP-1, E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1 en las células endoteliales, lo que da como resultado una mayor adhesión de neutrófilos mediado por la señalización de p38 MAPK (Caprio et al., 2018). Asimismo, la mCRP es fuertemente angiogénica tanto *in vitro* como *in vivo* y es probable que contribuya a la neovascularización de los tejidos en los que se deposita o sintetiza.

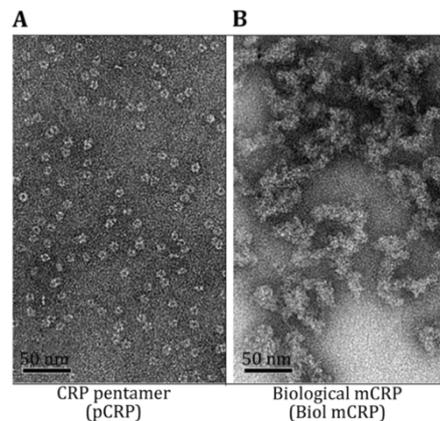


Figura 19. Visualización de (A) pCRP y (B) mCRP biológica. Visualización de las distintas diferencias estructurales entre el pCRP pentamérico con forma de disco y la subunidad mCRP con forma fibrosa. Todos los aumentos son 50.0009. Se considera que la pCRP (A) existe como discos pentaméricos cíclicos de subunidades muy compactas que rodean un vacío central con un diámetro medio de $10,42 \pm 0,08$ nm ($n = 200$). La mCRP biológica (B) se ve que existe como agregados fibrosos cortos con un diámetro promedio de $14,45 \pm 0,33$ nm ($n = 20$) (Potempa et al., 2015b).

Por otra parte, semejante a la CRP, la mCRP también desempeña una función importante en el sistema inmune debido, tanto a la activación de la cascada del complemento, como a la regulación del mismo. Así, mCRP está implicada en la regulación de la respuesta inmune innata. mCRP y la pCRP * se unen fácilmente a Cq1 conduciendo a la vía clásica del complemento, que finalmente culmina en la formación del complejo de ataque a la membrana dañada. Trabajos experimentales recientes han demostrado que la cabeza globular de Cq1 sólo puede unirse a mCRP disociado o pCRP * pero no a CRP, lo que confirma la asociación estructural de CRP con sus diferentes funciones. mCRP también induce la activación plaquetaria, otro de los grandes implicados en las respuestas inmunitarias e inflamatorias (Caprio et al., 2018)

Finalmente, un estudio reciente demostró la asociación entre cada isoforma de CRP y un perfil distinto de respuestas de NO en monocitos. Aquí, CRP produjo la inhibición de la producción de NO/iNOS, mientras que mCRP indujo la producción de NO/iNOS en los monocitos. Esto respalda la evidencia de que mCRP es la responsable de la respuesta inflamatoria de CRP (Sproston & Ashworth, 2018).

4. Implicación de mCRP y CRP en el desarrollo de la EA.

La deposición de mCRP se ha demostrado en un gran número de enfermedades con componente inflamatorio. Así, un estudio reciente reveló la deposición de mCRP en el cerebro de áreas infartadas de pacientes con EA (Strang et al., 2012) y en regiones con carga amiloide (Strang et al., 2012), en la retina dañada en la degeneración macular relacionada con la edad (Molins et al., 2018), en placas ateroscleróticas en enfermedades vasculares y en otros tejidos inflamados.

La proteína mCRP se ha relacionado con la EA de varias formas diferentes: 1. Por suponer un nexo entre el ictus y el posterior desarrollo de demencia de tipo EA 2. Por sus propiedades neuroinflamatorias que juegan un papel fundamental tanto en el ictus como en la EA (di Napoli et al., 2018; M. Slevin et al., 2015; Mark Slevin et al., 2017) y 3. Por su implicación directa en la EA asociándose con la patología característica de la enfermedad (A β y tau) (Strang et al., 2012).

El ictus duplica el riesgo de demencia, predominantemente demencia vascular y EA (Vijayan & Reddy, 2016). Así, un tercio de los pacientes que sufren un ictus desarrollan demencia (Kalara et al., 2016) Los mecanismos por los que un accidente cerebrovascular (ACV) puede causar el desarrollo de demencia son todavía desconocidos (Love & Miners, 2016). Sin embargo, se hipotetiza que están relacionados con los factores de riesgo y la neuropatología compartidos entre ambas enfermedades (Love & Miners, 2016). Así, algunos de los principales contribuidores al desarrollo de demencia después del ictus podrían ser la cronicidad de los procesos pro-inflamatorio (Kudo et al., 2000), la afectación de la unidad vascular y de la BHE, normalmente alteradas en la EA y la demencia vascular (Love & Miners, 2016). En el ACV previo al desarrollo de la EA; el daño inflamatorio se propaga desde los vasos sanguíneos

relacionándose con la desregulación de A β en las neuronas (Johns et al., 2018) y la neurodegeneración y la EA (McFadyen et al., 2020; Mark Slevin et al., 2017; Mark Slevin & Molins, 2018).

La mCRP se encontró abundantemente expresada en cerebros de pacientes después de sufrir un ictus, tanto isquémico como hemorrágico. Así, estudios de nuestro grupo han demostrado la deposición de mCRP en la ECM del tejido isquémico después del ACV, donde se deposita de manera intraneuronal, además de asociarse a la microvasculatura, donde promueve la angiogénesis aberrante, la acumulación de A β y probablemente la síntesis *de novo* de A β , (M. Slevin et al., 2015; Mark Slevin et al., 2020) Estos hallazgos han sido confirmados mediante el estudio (Mark Slevin et al., 2017) en el que se demuestra que la deposición de mCRP es mayor en aquellas regiones afectadas por ACV, donde además hubo más interacción y colocalización de mCRP con las principales proteínas clásicas de neurodegeneración (A β y tau). Cabe destacar, de este estudio, que, el depósito de A β aumenta de manera independiente en áreas infartadas favoreciendo la inflamación después de un ACV, y que una de las consecuencias de mCRP excesiva, sería perpetuar esa neuroinflamación de manera crónica favoreciendo las consecuencias neurodegenerativas. Por otra parte, se encontró la localización de mCRP con p-tau en neuronas al analizar el cerebro de estos pacientes con demencia después de sufrir un ictus. Estudios previos de nuestro grupo demostraron la capacidad de mCRP de inducir la fosforilación de tau (Ser 202,396) *in vitro* (M. Slevin et al., 2015). A pesar de la colocalización de tau y mCRP de forma intraneuronal, cabe destacar que ambas proteínas se encontraban presentes en regiones diferentes de las mismas neuronas. (Mark Slevin et al., 2017)

Independientemente de los eventos cerebrovasculares (Strang et al., 2012) demostraron la implicación directa de mCRP en la EA. En su estudio presentaron como las placas amiloides generadas *in vitro* eran capaces de disociar CRP en mCRP, produciendo mCRP *de novo* dentro de la ECM cerebral, el análisis de los niveles de CRP y mCRP demostró, a su vez, diferencias significativas en los niveles de mCRP que no se encontraron al evaluar los niveles de CRP. Por otra parte, el análisis de cerebros de pacientes con EA, revelaron que mCRP se depositaba en el córtex de los pacientes con EA pero no en el de los pacientes sanos lo que sugiere un papel patológico o regulador en el desarrollo de la EA. Estos hallazgos establecen que las placas de A β poseen un

potencial previamente no reconocido para disociar la CRP pentamérica a la mCRP (Strang et al., 2012).

Asimismo, diversos estudios han estudiado la correlación entre los niveles de CRP circulante y el desarrollo de la EA y el envejecimiento (Bi et al., 2012a; Gabin et al., 2018; Locascio et al., 2012; Luan & Yao, 2018; McFadyen et al., 2018a; Song et al., 2015). Estos parecen variar según la fase del desarrollo de la EA, lo que hace que los resultados de los estudios que los han evaluado hasta el momento sean controvertidos (Bi et al., 2012b; Lin et al., 2009; Locascio et al., 2012). Algunos estudios apuntan a que los niveles de CRP son significativamente más altos en pacientes con EA que en controles (Song et al., 2015). Otros, por el contrario, presentan que elevados niveles de CRP podrían tener un papel neuroprotector en pacientes de ≥ 70 años (Gabin et al., 2018). Curiosamente, otro estudio proporcionó evidencias de la correlación de la edad biológica subjetiva y la inflamación sistémica entre los adultos mayores. Así, una regresión logística reveló que sentirse menor de la edad de la edad biológica objetiva se asoció con un riesgo reducido de CRP (Stephan et al., 2015).

Finalmente, en un estudio experimental previo de nuestro grupo de investigación demostró que la inyección de mCRP en el hipocampo de ratones inducía la pérdida de memoria 4 semanas después del tratamiento. Así como otros rasgos de la EA como patología amiloide y la presencia de tau en neuronas del hipocampo y áreas corticales (M. Slevin et al., 2015).

5. Anticuerpos monoclonales como tratamiento contra mCRP

Dada la patogenia causada por mCRP, nuevos estudios investigan el uso de anticuerpos monoclonales con el fin de inhibir o bloquear los efectos proinflamatorios inducidos por mCRP. Estos anticuerpos, como el 8C10 y el 3H12 han sido elaborados con el fin de unirse de manera específica a la proteína mCRP pero no a CRP. El anticuerpo 8C10 anti-mCRP ha sido previamente ensayado *in vitro* demostrando su capacidad de bloqueo frente a mCRP (Potempa et al., 2015b; Mark Slevin et al., 2010).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis en que se basa esta tesis es que la mCRP, la forma activada de la CRP, contribuye al desarrollo y progresión de la enfermedad de EA (M. Slevin et al., 2015). Esta hipótesis se ha formulado a partir del hallazgo de depósitos de proteína mCRP en tejido cerebral de enfermos de EA (Griñán-Ferré et al., 2016) y de un estudio experimental previo (Griñán-Ferré et al., 2016), en el que demostramos que la mCRP inyectada en el hipocampo de ratones induce pérdida de memoria después de 4 semanas, así como otros rasgos de la EA, como patología amiloide y de tau en neuronas del hipocampo y áreas corticales. De esta forma, terapias que aborden el bloqueo de mCRP o de sus propiedades pro-inflamatorias, podrían reducir el daño neurológico en las zonas donde mCRP se deposita e interacciona con el tejido cerebral, así como el deterioro cognitivo que conlleva. Así, en esta tesis se proponen como terapias experimentales el uso del anticuerpo monoclonal 8C10 contra mCRP y el uso del agente anti-inflamatorio TPPU. Con el fin de probar nuestra hipótesis, esta tesis se ha desarrollado en base a los siguientes objetivos:

1. Caracterizar los efectos cognitivos y de BPSD producidos por la inyección de la proteína mCRP en el hipocampo de ratones a diferentes tiempos de tratamiento (1 mes, 3 meses y 6 meses). Comparación cognitiva y de BPSD de este modelo de demencia por mCRP, con el modelo de ratón de EA, 5XFAD.
2. Analizar inmunohistoquímicamente la distribución de mCRP en el tejido tras la inyección intrahipocampal, así como los cambios neuropatológicos producidos por esta.
3. Comparar los cambios en la expresión génica y niveles de proteínas inducidos por la inyección bilateral de mCRP en el hipocampo de ratones, con los del modelo de EA, 5XFAD.
4. Evaluar, en el modelo de demencia por mCRP, si un anticuerpo monoclonal (8C10) contra la proteína mCRP puede bloquear los efectos cognitivos, los BPSD y los cambios neuropatológicos inducidos por mCRP.
5. Evaluar, en el modelo de demencia por mCRP y en la línea celular de microglía BV2, la acción neuroprotectora del agente anti-inflamatorio TPPU frente a mCRP.

MATERIALES Y MÉTODOS

AGENTES EXPERIMENTALES

1. Proteína C-reactiva monomérica (mCRP)

La proteína mCRP se obtuvo a partir de una fuente comercial de CRP nativa humana recombinante (nCRP; YO Proteins, Ronninge, Suecia) utilizando el método Potempa (Griñán-Ferré et al., 2016). 1 mL de proteína CRP comercial fue quelado en una proporción de 1:1 con tampón EDTA/urea (EDTA 10 mM, urea 8 M). La solución se incubó a 37°C durante 2 h y se dializó adicionalmente (MWCO de 20 kDa) en tampón (Tris-HCl 25 mM, NaCl 50 mM; pH 8,3) durante 48 h con el fin de obtener los monómeros puros de mCRP.

2. Anticuerpo monoclonal de ratón anti-mCRP. Clon 8C10

El anticuerpo monoclonal de ratón contra el clon 8C10 de mCRP humana se obtuvo del Dr. L.A. Potempa mediante tecnología de hibridoma, siendo caracterizado, como se ha descrito en trabajos anteriores (Borsini et al., 2002). Se obtuvo 8C10 murino como sobrenadante del cultivo de hibridoma no purificado.

3. Inhibidor soluble de epóxido hidrolasa 1-trifluorometoxifenil-3-(1-propionilpiperidin-4-il)-urea (TPPU)

El inhibidor soluble de epóxido hidrolasa 1-trifluorometoxifenil-3-(1-propionilpiperidin-4-il)-urea (TPPU) se utilizó como agente antiinflamatorio de referencia. Se adquirió TPPU de MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ, EE.UU.).

EXPERIMENTOS *IN VIVO*

1. Animales empleados para los estudios in-vivo

Todos los procedimientos con animales, incluida la cirugía, las pruebas de comportamiento y las necropsias, se realizaron en las instalaciones de animales de la Universitat de Barcelona (UB), en la Facultad de Psicología. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal de la UB (Comitè Ètic d'Experimentació Animal, CEEA-UB) bajo las directrices de la Comisión de Experimentación Animal de la Generalitat de Catalunya (Comissió d'Experimentació Animal, Generalitat de Catalunya) (Referencias de homologación: DAAM-6991 y

DAAM-10921). Todos los trámites se realizaron de acuerdo con la Directiva 214/97 de la Generalitat de Catalunya, la legislación española (Real Decreto 1386/2018) y la Directiva 2010/63 / UE de la Unión Europea (UE) para la experimentación con animales. Todos los animales empleados en el estudio se alojaron individualmente en jaulas Makrolon (Techniplast, Buguggiate, Italia) con libre acceso a comida y agua en una habitación con temperatura controlada (22 ± 2 °C) con un ciclo de 12 h de luz / 12 h de oscuridad. Todos los animales se inspeccionaron visualmente y se pesaron de manera regular para controlar el estado de salud general.

1.1 C57BL/6J

Para esta tesis se utilizaron 240 ratones macho C57BL/6J adultos de 3 meses de edad con el fin de evitar los efectos de la senescencia en los experimentos con tratamiento crónico. Los ratones fueron criados por Janvier Labs (Francia) y adquiridos de Novainterned (Pipera, Rumanía). Estos fueron mantenidos para el estudio en la Unidad Animal de la Universidad de Barcelona (UB), en las condiciones previamente mencionadas. Los animales C57BL/6J se trataron con los diferentes compuestos a analizar mediante cirugía estereotáxica en el hipocampo, y mediante la administración oral de TPPU como se describe más adelante.

1.2 Modelo transgénico de Alzheimer 5XFAD

En este estudio se utilizaron 60 ratones transgénicos 5XFAD y 10 animales *wild type* (WT). Se seleccionó este modelo de EA por caracterizarse por una clara neuroinflamación (Griñán-Ferré et al., 2016) y un rápido y agresivo desarrollo de la patología amiloide (Borsini et al., 2002).

El *background* genético de estos animales es C57BL/6J. Se adquirieron ratones macho 5XFAD al Jackson Laboratory (Maine, EE. UU.) y ratones hembra híbridas B6SJLF1/J a JANVIER LABS (Le Genest-Saint-Isle, Francia), para mantener la colonia en hemicigosis, siguiendo las directrices de cría de Jackson Lab. Los animales utilizados en nuestros estudios fueron heterocigotos o WT. Siendo los heterocigotos los utilizados como modelo de EA y los WT como controles. Los animales empleados para el estudio fueron de 3 meses de edad, como los C57BL/6J. La colonia se estableció en la Facultad

de Psicología de la Universidad de Barcelona (UB) igual que para los ratones C57BL/6J, donde se mantuvieron los animales en las mismas condiciones.

El genotipado de los animales se realizó utilizando el kit comercial REDExtract-N-Amp Tissue PCR kit de Sigma (XNAT-1KT). Se partió de una biopsia de la oreja de los ratones, se extrajo el ADN y se realizó una PCR con los *primers*: IMR42, IMR43, IMR3610 y IMR3611. En esta reacción, se amplificó un fragmento de 377bp del gen APP mutado, presente en los transgénicos 5XFAD, y un fragmento de 324bp del gen IL-2 como control de los dos grupos de animales.

El ADN amplificado se cargó en un gel de agarosa al 1,5% en TBE 0,5x, con SYBR Safe 1: 10.000 (Invitrogen, S33102), donde se realizó la electroforesis a 100V durante 1 h y 30 mins. Como marcador de peso molecular, se utilizó el 100bp DNA Ladder, de Gene Craft (GC-015-004) combinado con Gel Loading Dye Blue 6x (Biolabs, # B7021S). Finalmente, las bandas de los genotipos se visualizaron en el transiluminador.

2. Administración de tratamientos mediante cirugía estereotáxica de forma bilateral en la zona CA1 del hipocampo de ratones

Se anestesiaron ratones C57BL/6J de tres meses de edad con 100 mg / kg de ketamina (Ketolar 50 mg / ml, Pfizer) y 10 mg / kg de xilacina (Rompun 2%, Bayer, intraperitonealmente (i.p.). Los animales fueron inmovilizados en un aparato estereotáxico (David Kopf Instruments) a través de los oídos y la boca. Las soluciones de agentes experimentales se infundieron bilateralmente en el área CA1 del hipocampo. Las inyecciones se realizaron siguiendo las coordenadas relativas a Bregma de: -2mm A/ P, \pm 1,3 mm M/L y -1,6 mm V/D. Las coordenadas se seleccionaron en estudios preliminares mediante la inyección del colorante *Fast Green*. Se suministraron dos microlitros de cada solución en el punto de inyección mediante una jeringa Neuros serie 7000 de 2 μ L de calibre 25 (Hamilton Central Europe S.R.L., Giarmata, Rumania).

La jeringa se conectó a una bomba de microinfusión (Bioanalytical Systems Inc., West Lafayette, IN, EE.UU.) con el fin de suministrar cada solución a una velocidad constante de 5×10^{-4} ml / min. La jeringa se dejó en la misma posición de infusión durante 5 minutos tras la administración de las soluciones con el fin de evitar el reflujo de las soluciones administradas. Los compuestos administrados mediante cirugía

esterotáxica fueron: CSF (líquido cefalorraquídeo artificial), mCRP y 8C10. Los tratamientos administrados para los animales de cada estudio se detallan en el diseño experimental (Figura 20) y fueron los siguientes: CSF (NaCl 148 mmol / l, KCl 3 mmol / l, CaCl₂ 1 mmol / l, MgCl₂ 0,8 mmol / l, Na₂HPO₄ 0,8 mmol / l, NaH₂PO₄ 0,2 mmol / l). y mCRP para el primer estudio. Y CSF, mCRP, mCRP+8C10 y 8C10 para el segundo estudio.

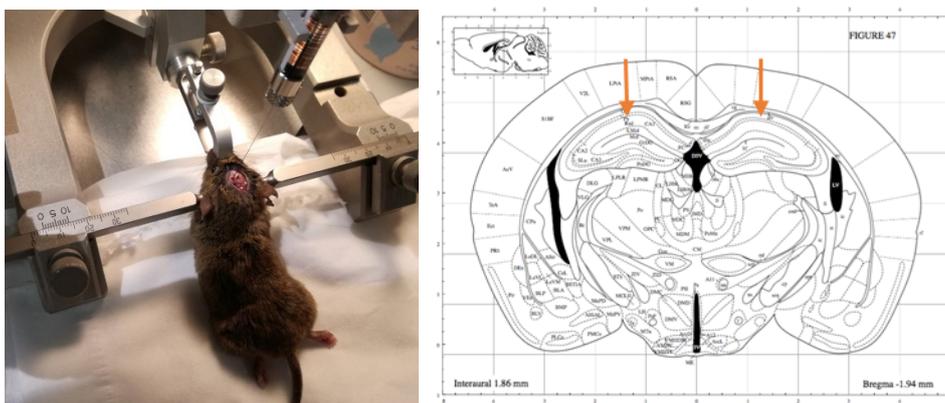


Figura 20. A la izquierda: Imagen de la cirugía estereotáxica realizada para suministrar los compuestos de estudio. A la derecha: Zona CA1 del hipocampo donde se realizaron las inyecciones estereotáxicas, imagen de: Paxinos, G., & Franklin, K. B. (2004).

3. Administración oral del agente TPPU.

El agente TPPU se administró por vía oral comenzando 2 días antes de la inyección bilateral de mCRP o CSF. El TPPU se administró durante todo el estudio en el agua de bebida, mezclado con ciclodextrina al 3% con el fin de mejorar su solubilidad. El grupo control recibió la misma dosis de ciclodextrina en la bebida. El consumo de agua se controló cada 3-4 días, en que se renovó el agua de bebida con el tratamiento con el fin de asegurar una dosis diaria constante de TPPU de 5 mg/kg de peso corporal. La dosis se decidió respecto a estudios previos donde el tratamiento de TPPU había resultado neuroprotector para modelos de EA (Borsini et al., 2002).

4. Pruebas de comportamiento

Todos los animales fueron evaluados para detectar cambios en el comportamiento general y cognitivo. La edad de los animales en el momento de realización de las pruebas fue de 4, 6 y 9 meses, equivalentes a 1, 3 y 6 meses de exposición al tratamiento en el caso de los animales C57BL/6J. La batería de los diferentes ensayos evaluados se llevó a cabo en días consecutivos durante un mes para cada estudio.

Después de una habituación al experimentador, los animales fueron analizados en busca de cambios sensoriomotores y BPSD como neofobia, apatía a la exploración, ansiedad y depresión. El aprendizaje y la memoria se analizaron mediante pruebas centradas en la evaluación de la memoria de reconocimiento y la memoria espacial. Todo el material utilizado en las diferentes pruebas se limpió con etanol al 10% para eliminar las señales olfativas entre los ratones.

1.2 Handling

El *handling* o manipulación previa a los ensayos de comportamiento se realizó para minimizar el estrés de los animales, así como su habituación al experimentador y a la manipulación.



Figura 21. Imagen de la manipulación de un animal para entrenar su habituación al experimentador y a ser manipulado, previa a la realización de los tests de comportamiento.

En el procedimiento de manipulación, el ratón fue cogido por la cola y sostenido en la mano durante 2 minutos. A los ratones se les permitió moverse a lo largo del brazo del experimentador antes de ser devueltos a su jaula. Este procedimiento se repitió dos veces al día durante 2 minutos, 3 días consecutivos con todos los animales incluidos en el estudio.

1.3 Ensayo sensoriomotor

El reflejo visual y el reflejo de extensión de las extremidades de los animales se midieron sujetando al animal por la cola y bajándolo lentamente hacia una superficie negra. La coordinación y el equilibrio motor se evaluaron mediante la distancia recorrida y la latencia para caer de una barra de madera (1 cm²) y una barra de metal (1 cm de diámetro) horizontales y de un metro de longitud.

Cada ensayo se realizó dos veces, durante 20 segundos cada uno, los tres se llevaron a cabo de manera consecutiva. La prensilidad y la coordinación motora se evaluaron mediante la distancia recorrida en la prueba de suspensión del cable de metal, en la que se permitió al animal aferrarse del cable (2 mm de diámetro x 40 cm de longitud) durante dos ensayos de 5s y una tercera prueba de 60s. La altura a la que se situaron las dos barras y el cable era de 60 cm sobre una superficie acolchada para proteger a los animales en su caída.



Figura 22. Imagen representativa de un ratón C57BL/6J realizando las diferentes pruebas del ensayo sensorimotor. De izquierda a derecha: Ensayo de la barra de madera, ensayo de la barra de metal y ensayo del cable de metal.

1.4 Ensayo de las esquinas

La neofobia a una nueva jaula se evaluó introduciendo al animal en el centro de una jaula cuadrada estándar (jaula Makrolon 35 × 35 × 25 cm) con viruta nueva.



Figura 23. Ejemplo de un ratón C57BL/6J realizando el ensayo de las esquinas.

Se contaron el número de esquinas visitadas y el número de exploraciones verticales (*rearings*) durante un período de 30s. También se registró la latencia de la primera exploración vertical realizada.

1.5 Ensayo de campo abierto

En esta prueba se analizó el comportamiento y la actividad general de los animales. Así, se midieron parámetros relacionados con la actividad exploratoria y la emocionalidad de los animales. Los ratones se colocaron en el centro de una caja blanca, de madera, con una superficie de 55 x 55 cm y paredes de 25 cm de alto), donde se

observaron durante 5 min. La actividad exploratoria se evaluó mediante los patrones de actividad locomotora horizontal desde el centro, donde se situaron inicialmente los ratones, hacia la periferia de la caja (distancia recorrida y tigmotaxis) y el movimiento vertical (número de exploraciones verticales). Como indicadores de la emocionalidad se registraron: la inmovilidad inicial o *freezing time* al situar al animal en el centro de la caja, el comportamiento de aseo (*grooming activity*) y el número de orinas y defecaciones realizadas durante el test. Asimismo, además de la evaluación del experimentador, se utilizó un sistema de seguimiento computarizado (SMART v3.0, Panlab S.A., Barcelona, España) para medir la distancia recorrida y el patrón ambulatorio.

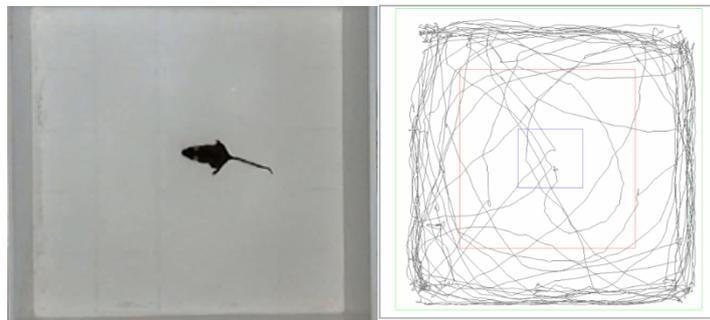


Figura 24. A la izquierda: Ejemplo de un ratón C57BL/6J realizando el ensayo de campo abierto. A la derecha: *track* o recorrido realizado por el ratón durante los 5 minutos del ensayo procedente del programa SMART v3.0.

1.6 Ensayo de la tabla de cuatro agujeros de Boissier

El comportamiento exploratorio también se evaluó durante el ensayo de la tabla de los cuatro agujeros de Boissier, donde se presupone la actividad innata de los animales para explorar.

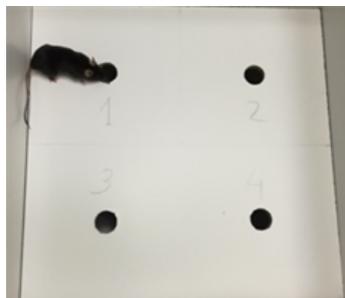


Figura 25. Imagen representativa de un ratón realizando el ensayo de la tabla de los 4 agujeros de Boissier.

Así, se contabilizó el número de exploraciones en cada agujero, la latencia de la primera exploración, la latencia de exploración de los 4 agujeros y el tiempo dedicado a la

exploración de cada uno de los agujeros (3 cm de diámetro) igualmente espaciados en la tabla (caja blanca de madera de 32 × 32 × 32 cm). El ensayo se realizó durante 5 minutos para cada animal.

1.7 Ensayo de caja oscura/ caja iluminada

El comportamiento de ansiedad se midió en una caja con un compartimento oscuro y uno iluminado. El aparato constaba de dos compartimentos (negro: 27 × 18 × 27 cm con luz roja; blanco: 27 × 27 × 27 cm con intensidad de luz blanca de 600 lux) conectados por una abertura (7 × 7 cm). El compartimento iluminado suponía 2/3 de la caja mientras que el compartimento oscuro suponía 1/3 de la caja. Los roedores prefieren las áreas más oscuras a las áreas más claras. Sin embargo, cuando se presentan en un entorno nuevo, estos tienden a explorar. Estas dos emociones en conflicto conducen a síntomas similares a la ansiedad evaluable durante el test. Los ratones suelen pasar más tiempo en el compartimento oscuro que en el compartimento iluminado. En ensayos previos se ha demostrado que si a los roedores se les inyectan medicamentos ansiolíticos, aumentará el porcentaje de tiempo que pasan en el compartimento iluminado. Sin embargo, al tratar con fármacos ansiogénicos, los ratones pasaban más tiempo en el compartimento oscuro (Gresa-Arribas et al., 2012). Los ratones se introdujeron inicialmente en el compartimento oscuro y se observaron durante 5 min. Se registró la latencia para entrar en el compartimento iluminado, el tiempo de permanencia en el compartimento iluminado, el número de cruces a cada compartimento, la actividad vertical, y el número de defecaciones y orinas en cada zona.

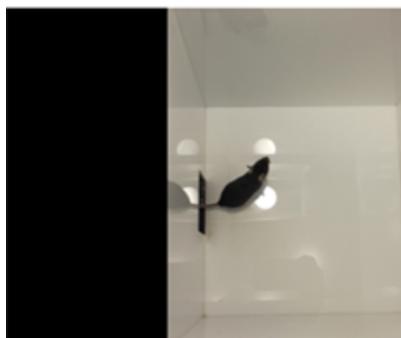


Figura 26. Imagen de un ratón entrando en la zona iluminada durante el test de la caja oscura/caja iluminada.

1.8 4.5 Ensayo de suspensión por la cola

Para evaluar el comportamiento de tipo depresivo los ratones fueron suspendidos por la cola a 30 cm de altura. El tiempo que los ratones permanecían inmóviles, sin tratar de escapar, se interpretó como un síntoma de depresión.



Figura 27. Imagen de un ratón durante la realización del test de la cola.

La cola se fijó con cinta adhesiva a 1 cm de la punta de los animales, colgando de un cordón sujeto a una barra. La duración de la inmovilidad (definida como la ausencia de todos los movimientos excepto los necesarios para la respiración) se cronometró sobre un período de 6 minutos.

1.9 Ensayo de reconocimiento de objetos nuevos (NORT)

Se utilizó el NORT para evaluar la memoria de reconocimiento. Esta prueba se basa en la tendencia espontánea de los roedores a dedicar más tiempo a explorar un objeto nuevo que uno familiar. Los animales se colocaron en el medio de una caja rectangular negra (30 x 40 x 30,5 cm) con una intensidad de iluminación de 100 lux. Los objetos a discriminar fueron de plástico (6-10 cm de altura) y de diferentes formas y colores. Cada prueba de retención duró 10 minutos. Después de tres días de habituación a la caja, sin objetos, los animales se sometieron a una prueba de adquisición (*Training* o primera prueba) durante la cual se colocaron en la caja en presencia de dos objetos idénticos (A+A), colocados equidistantes entre sí. 2 horas más tarde (segunda prueba), el objeto A de la caja (el explorado durante la adquisición o familiar) fue reemplazado por el objeto nuevo, B. 24 h más tarde (tercera prueba), el objeto A de la caja fue reemplazado por el objeto nuevo, C. Las pruebas se grabaron usando una cámara suspendida sobre la caja donde se realizó el ensayo; posteriormente, se analizó el tiempo que el animal exploró el nuevo objeto y el objeto antiguo. Para evitar sesgos de preferencia de objetos, la secuencia de presentación de los diferentes objetos fue

aleatorizada para cada ratón en todos los grupos experimentales. La exploración de objetos se definió como la orientación de la nariz al objeto a una distancia menor de 2 cm.

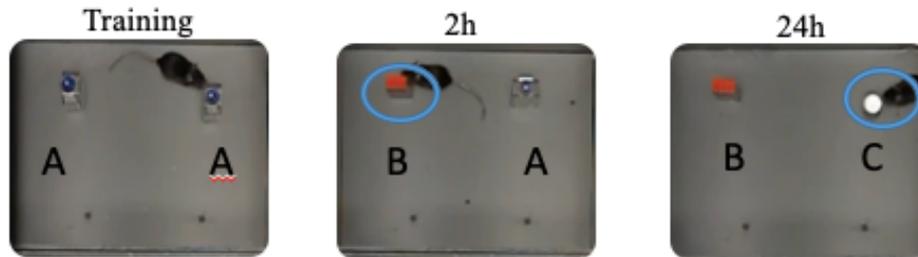


Figura 28. Imagen de un ratón durante la realización del NORT. Se muestra la prueba de adquisición o *training* y las pruebas de retención de memoria 2 horas y 24 horas después de la adquisición.

Se cronometraron los tiempos de exploración y se utilizaron para calcular un índice de discriminación $[\text{Objeto nuevo (t)} - \text{objeto familiar (t)}] / [\text{tiempo total (t) explorando el objeto nuevo} + \text{explorando el objeto familiar}]$ tanto a las 2 horas, como 24 horas después de la fase de adquisición. Los índices de discriminación entre el objeto nuevo y el familiar indicaron la presencia o ausencia de memoria de los ratones.

1.10 Ensayo de nueva ubicación de objetos (OLT)

La memoria espacial se evaluó mediante el OLT. Esta prueba se basa en la capacidad de los roedores para reconocer cuándo un objeto se ha movido de su posición inicial, así como su tendencia espontánea a pasar más tiempo explorando el objeto reubicado que el que se encuentra en una posición familiar.



Figura 29. Imagen de un ratón durante la realización del OLT. Se muestra la prueba de adquisición o *training* y la prueba de retención de memoria espacial 2 horas después de la adquisición.

La prueba se realizó en la misma caja negra que el NORT (30 x 40 x 30,5 cm), donde se habituaron los animales durante 5 min el día previo a la prueba, en ausencia de objetos. Al día siguiente, se introdujeron dos objetos idénticos en la caja oscura. En la prueba de

adquisición, los objetos se colocaron equidistantes entre sí con espacio a su alrededor para que los ratones pudieran explorarlos (A + A').

A cada ratón se le permitió explorar los objetos durante 5 min. La exploración de objetos se definió como la orientación de la nariz del ratón al objeto a una distancia inferior a 2 cm. La prueba de retención de memoria se realizó 2 h después; el animal volvió a encontrarse con los dos objetos, aunque uno de ellos había sido reubicado (A+A'). Para cada ratón se cronometró la cantidad de tiempo dedicado a explorar cada objeto, los animales fueron grabados por una cámara durante la realización del test como en el NORT. La memoria espacial se evaluó mediante el índice de discriminación: [objeto reubicado (t) – objeto familiar (t)] / [tiempo total (t) explorando el objeto nuevo + tiempo total (t) explorando el objeto familiar].

1.11 Ensayo del laberinto acuático de Morris (MWM)

El MWM se utilizó con el fin de analizar el aprendizaje espacial y la memoria. El ensayo consistió en un día de entrenamiento, en el que se dejó nadar a los ratones durante 60s en la piscina con el fin de conseguir su habituación al agua y comprobar su capacidad de nado. Se realizaron 6 días de aprendizaje previos a la prueba de retención de la memoria y del aprendizaje espacial, donde se entrenó a los ratones para que localizaran una plataforma oculta, de 10 cm de diámetro, ubicada a 20 cm de la pared y 0,5 cm por debajo de la superficie del agua. La plataforma se colocó en una piscina circular de 100 cm de diámetro, 40 cm de altura, con agua opaca a 22 - 24 ° C, rodeada de cortinas negras para evitar influencias exteriores. Los animales aprendieron a encontrar la plataforma usando 4 puntos de referencia distintivos como señales visuales adheridos a la pared de la piscina y colocados equidistantes entre sí. La plataforma se colocó entre dos de estos puntos de referencia. Durante los 6 días de entrenamiento se realizaron cinco ensayos de 60s por día. En cada prueba, el ratón se soltó suavemente (de cara a la pared) desde un punto de partida seleccionado al azar (N, S, E o W) y dejándolo nadar hasta que encontrara la plataforma de escape.

Los ratones que no pudieron encontrar la plataforma en 60s se colocaron sobre ella durante 20s después de cada ensayo. Los ratones que encontraron la plataforma antes de los 60s también se dejaron sobre ésta 20s antes de recogerlos.

El día 7, se retiró la plataforma y los ratones realizaron la prueba de aprendizaje y de memoria durante 60 s con el fin de probar la retención del aprendizaje y la memoria espacial. Se utilizó el sistema de seguimiento computarizado (SMART) para medir la distancia recorrida durante todas las pruebas, tanto en el entrenamiento como en la prueba de retención de memoria. Además de la distancia se analizaron: el tiempo empleado en cada cuadrante, la latencia en llegar a la zona de la plataforma, la velocidad de nado, el número de veces que los ratones cruzaban la plataforma y el porcentaje de tiempo y distancia recorridos en cada cuadrante.

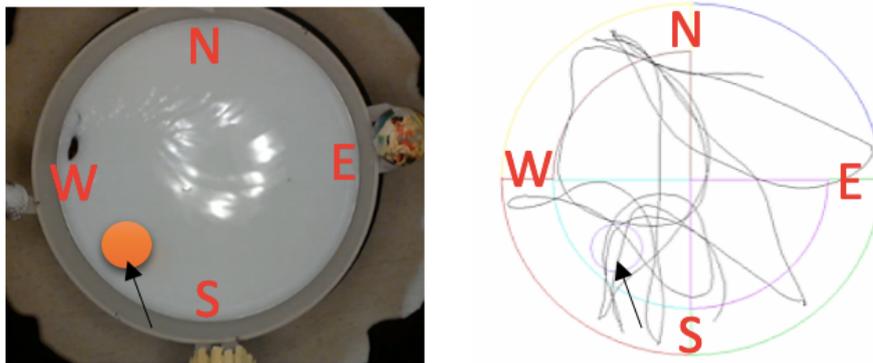


Figura 30. Imagen de un ratón durante la realización del MWM a la izquierda y *track* obtenido con el programa SMART del recorrido de este ratón en la piscina durante la prueba de retención de memoria a la derecha.

5. Procesamiento del tejido cerebral de los animales

Después de completar las pruebas de comportamiento, uno, tres y seis meses después de la inyección, se esperó una semana antes de proceder al sacrificio de los ratones con el fin de minimizar la posible variabilidad inducida por las pruebas de comportamiento en nuestros resultados. Los animales se sacrificaron de dos maneras diferentes según el tipo de análisis neuropatológico a realizar en el tejido cerebral. Así, aproximadamente la mitad de los animales (n=130), tanto los inyectados, como los 5XFAD empleados en los diferentes estudios se perfundieron con fijador histológico con el fin de realizar el análisis inmunohistoquímico del tejido. La otra mitad (n=170) se sacrificó mediante dislocación cervical con el fin de analizar la expresión génica y los niveles de proteínas.

1.12 Perfusión de los animales e inclusión de los cerebros en parafina

Los animales se anestesiaron con 100 mg/kg de ketamina (Ketolar 50 mg / ml, Pfizer, Alcobendas, Madrid, España) y 10 mg/kg de xilacina (Rompun 2%, Bayer, Leverkusen,

Alemania) intraperitonealmente (i.p.). Una vez anestesiados los animales se perfundieron transcardialmente con NaCl al 0,9% que contenía heparina 0,1 mg/ml (Mayne Pharma, España) seguido de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato. Los cerebros se extrajeron después de la perfusión y fijación del tejido y se sumergieron en paraformaldehído frío durante toda la noche, al día siguiente se aclararon con tampón fosfato salino o *phosphate buffer saline* (PBS) frío.

Los cerebros se dividieron en hipocampo, cerebelo y bulbos olfatorios y se incluyeron en diferentes casetes utilizados para su procesado hasta su inclusión en bloques de parafina. Las diferentes partes del cerebro se deshidrataron en series graduadas de etanol, se aclararon en xilol y se incluyeron en parafina para su subsecuente análisis inmunohistoquímico.

1.13 Disecado de cerebros en N₂ líquido.

Los animales utilizados para el análisis de expresión génica y de los niveles de proteínas, se dislocaron cervicalmente. Una vez sacrificados se obtuvieron los cerebros y se dividieron en bulbos olfatorios, hipocampo, corteza y el resto del cerebro. Todo el procedimiento se llevó a cabo sobre hielo. El tejido se congeló con nitrógeno líquido para el posterior estudio de los cambios moleculares mediante RT-PCR y Western-Blot.

6. Inmunohistoquímica del tejido cerebral de ratones

Los cerebros incluidos en parafina se cortaron en secciones seriadas a 5µm, y se llevó a cabo el análisis inmunohistoquímico (IHC) a intervalos de 1 mm con el fin de determinar la expresión y localización de mCRP, así como los cambios producidos por esta. Se utilizó doble IHC para evaluar la distribución de mCRP (anticuerpo específico de ratón anti-mCRP humana, 8C10), así como la presencia de moléculas relacionadas con la inflamación como: el factor de necrosis tumoral (Tnf α), la interleucina Il-1B (Il-1B) y el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NfkB). Además, se analizó β -amiloide, p-tau y p-ERK/ERK. Después de la incubación de estos anticuerpos policlonales primarios de conejo durante 1 hora a temperatura ambiente (1:100), las secciones se lavaron y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes (1:50) peroxidasa (HRP), IgG anti-ratón de oveja conjugada con isotiocianato de fluoresceína o anti-cabra de conejo conjugado con

tetrametilrodaminaisotiocianato. Las imágenes se tomaron con el microscopio digital Nikon 80i utilizando el software Nis Elements 3.21 con opción de captura multicanal. Se incluyeron portaobjetos de control negativo donde el anticuerpo primario se reemplazó por PBS. Se usaron kits Vector ABC para todas las IHC y Vector mouse on mouse (M.O.M) al aplicar anticuerpos mCRP primarios de ratón a las secciones de cerebro murino con secundario de ratón.

7. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR)

1.14 Extracción de ARNm del tejido hipocampal.

El ARN total de los hipocampos previamente congelados con nitrógeno líquido se extrajo usando el kit de aislamiento de ARN mirVana™ (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El rendimiento, la pureza y la calidad del ARN se determinaron espectrofotométricamente (NanoDrop, EE. UU.) y mediante electroforesis capilar (Bioanalyzer 2100). Se seleccionaron los ARN con 260/280 entre 1.8-2.0. La concentración de la muestra de ADN se calcula teniendo en cuenta el valor de absorbancia obtenido a una longitud de onda de 260nm. La relación A260/280 es muy estable y se considera que un ADN de pureza óptima tiene un valor entre 1.8-2.0. Un ADN de pureza aceptable debe tener al menos una relación $A_{260}/A_{280} > 1.6$. Un valor $A_{260}/A_{280} < 1.6$ indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas. Un radio $A_{260}/A_{280} > 2.1$ podría deberse a la presencia de ARN en la muestra.

1.15 Transcripción inversa de ADNc.

La transcripción reversa se realizó con el kit de transcripción inversa de ADN complementario (ADNc) de alta capacidad (Life Technologies, 4368814). Se calculó el volumen necesario por muestra para tener una concentración final de 300 ng de ARN. El volumen correspondiente de muestra se transfirió a nuevos eppendorfs y se ajustó con agua libre de nucleasas hasta 14,2 µl. Finalmente, se colocaron los tubos en la PCR y al finalizar el programa, se diluyeron todas las muestras en una proporción 1:4, almacenándose a -20°C hasta su uso.

1.16 PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR)

Cada muestra se analizó por duplicado para cada gen en una placa óptica de 96 pocillos. Se utilizaron sondas TaqMan (Applied Biosystems) detalladas en la Tabla 1 para determinar los niveles de transcripción de genes individuales.

Tabla 1. Lista de sondas TaqMan utilizadas para el análisis de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

Gen	Sonda TaqMan
<i>Actin</i>	Mm01281449_m1
<i>Bdnf</i>	Mm04230607_s1
<i>Ccl3</i>	Mm00441259_g1
<i>Chill1</i>	Mm00801477_m1
<i>Gpx1</i>	Mm00656767_g1
<i>Egr1</i>	Mm00656724_m1
<i>Il1-B</i>	Mm00434228_m1
<i>Il6</i>	Mm00446191_m1
<i>Sirt2</i>	Mm01149204_m1
<i>Tbp</i>	Mm00446971_m1
<i>TNF-α</i>	Mm00443258_m1
<i>Trem2</i>	Mm00451744_m1
<i>Vegfa</i>	Mm02619580_g1

Para cada pocillo, se mezclaron 9 μ l de *master mix* (3,5 μ l de H₂O + 5 μ l de tampón de *master mix* (Biotools) + 0,5 μ l de sonda TaqMan) con 1 μ l de muestra de ADNc previamente diluida 1:4. La reacción se realizó en el sistema de RT-PCR StepOnePlus (Applied Biosystems Utilizando el siguiente protocolo: 95 °C 5 min; 40 ciclos a 95°C durante 10 min; 60°C 1min. Finalmente, el gen de la proteína de unión a caja TATA (*Tbp*) y la actina (*Actb*) se utilizaron como estándar (*housekeeping*) para normalizar los valores obtenidos. Para el análisis de la expresión génica relativa de la RT-PCR se eligió el método 2- $\Delta\Delta$ CT32.

8. Inmunodetección de proteínas por Western-Blot

1.17 Homogenización del tejido y extracción de proteínas.

Los hipocampos congelados en nitrógeno líquido se suspendieron en 15 volúmenes de tampón RIPA (IGEPAL al 1%, sal sódica del ácido desoxicólico al 0,5%, SDS al 0,1% en PBS) suplementado con ortovanadato 1 mM, fluoruro de sodio 5 mM, SDS al 2% y 1 comprimido Completo de un Cóctel de inhibidor de proteasas /50 ml de solución (Roche). Las muestras se sonicaron y, después de centrifugar (13.000 x g, 10 min, 4°C), se recogieron los sobrenadantes. La concentración de proteínas de los lisados del tejido, se determinó mediante el ensayo de proteínas de Bradford (Bio-Rad). Las absorbancias se midieron en el espectrofotómetro de espectro Multiskan (Thermo fisher Scientific) a 595 nm.

1.18 Inmunodetección por Western-Blot

Se preparó una concentración igual de proteínas para todas las muestras (20 µg) con 6x DTT y agua destilada hasta llegar a 18 µl. Las muestras preparadas se centrifugaron, se hirvieron durante 5 min y se volvieron a centrifugar. Se cargaron 20 µg de proteína en geles de poliacrilamida, al 10% o 15% según el tamaño de las proteínas a analizar, y se separaron por electroforesis a 100V durante aproximadamente 2 horas. Finalmente, los geles se transfirieron a membranas de PVDF de 0,45 µm (Immobilon-P, Millipore, Burlington, MA, EE. UU.) a 180 A durante 1h 30'. Las diferentes membranas fueron bloqueadas durante 1 h a temperatura ambiente con tampón solución salina tamponada con Tris con Tween al 0,1% o *Tris-buffered saline with 0.1% Tween* (TBS-T) y 5% de bloqueo (n° 170-6404; Bio-Rad). Posteriormente, las membranas se incubaron durante la noche a 4°C con anticuerpos primarios.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron los descritos en la tabla 2. Después de realizar 3 lavados con T-TBS, se preparó el correspondiente anticuerpo secundario (1: 2.000) donde se incubaron las membranas durante 1h 30 mins a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios eran conjugados con peroxidasa (GE Healthcare). Todos los anticuerpos se diluyeron en West Vision Block y Diluent SP-7000 (Vector Labs Inc., Burlingame, CA, EE. UU.). Las proteínas se visualizaron usando el agente de detección de quimioluminiscencia mejorada (ECL) (Chemidoc TM Imaging System, Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) Los niveles semicuantitativos de proteínas se identificaron usando el software Image Lab (v3.0.1; Bio-Rad). Las proteínas se

normalizaron en relación con la actina y la β -tubulina o con la forma total de la proteína fosforilada de tau (HT7)

Tabla 2. Lista de anticuerpos primarios utilizados para el análisis de Western-Blot *in vivo*.

Anticuerpo	Huesped	Dilución	Referencia
APP-CTF	Mouse	1:1000	Covance (<i>SIG-39152</i>)
Actin	Rabbit	1:10000	Sigma (<i>A5060</i>)
BACE1	Rabbit	1:1000	Abcam (<i>ab2077</i>)
BDNF	Rabbit	1:500	Santa Cruz (<i>sc-546</i>)
GFAP	Mouse	1:1000	Sigma (<i>G3893</i>)
IL-6	Rabbit	1:1000	Cell Signaling (<i>#12912</i>)
MAP2	Mouse	1:1000	Sigma (<i>M1406</i>)
tau clone HT7	Mouse	1:1000	Pierce Endogen (<i>MN1000</i>)
p-tau clone AT8	Mouse	1:1000	Thermo Fisher (<i>MN1020</i>)
p-tau (S396)	Rabbit	1:1000	Life Technologies (<i>44752G</i>)
Beta -Tubulin	Mouse	1:10000	Abcam (<i>ab21754</i>)
mCRP clone 8C10	Mouse	1:1000	Potempa Laboratory
Amyloid beta clone 4G8	Mouse	1:1000	Covance (<i>SIG-39220</i>)

EXPERIMENTOS *IN VITRO*

2. Línea celular de microglía murina BV2

Utilizamos una línea celular de un modelo murino de células microgliales BV2, cuya utilidad se ha demostrado en estudios de respuesta inflamatoria y neuroinflamación *in vitro* (Gresa-Arribas et al., 2012).

Esta línea celular se ha obtenido de HyperCLDB (Banca Biologica e Cell Factory, ICLC ATL 03001). Las células BV2 se cultivaron en frascos de cultivos T25 (NuncTM, ThermoFisher Scientific) con medio de cultivo compuesto por RPMI 1640 con L-glutamina 2 mM (Gibco BRL Cat no 25030-024), gentamicina 50 μ g/ml (Gibco BRL cat no 15750-037) y suero fetal bovino inactivado por calor (FBS) 10%. Las condiciones de crecimiento fueron a 37 ° C en una incubadora humidificada con 5% de CO₂. Las células se cultivaron hasta un 80-90% de confluencia.

3. Tratamientos *in vitro*

Para los experimentos, las células se sembraron en placas de pocillos a la concentración de 3×10^5 células /ml; 100 μ L y 1 ml por pocillo, en placas de 96 y 12 pocillos respectivamente. Después de 24 h, el medio se reemplazó con medio de cultivo fresco sin FBS o por agentes antiinflamatorios. Los tratamientos antiinflamatorios fueron TPPU a 50 μ M o 100 μ M y anticuerpo monoclonal 8C10 a una dilución 1:20. Se usó DMSO al 0,1% como vehículo en los experimentos de tratamiento con TPPU. Después de 1 h de incubación, las células se trataron con los productos químicos proinflamatorios: lipopolisacárido (LPS; 0,1 μ g / ml) o mCRP (100 μ g/ml) y se incubaron adicionalmente durante 24 h. La nCRP a 100 μ g / ml también se ensayó como un control adicional en experimentos de mCRP.

4. Ensayo de actividad epóxido hidrolasa soluble

La determinación de la actividad inhibidora de sEH del TPPU en células BV-2 se realizó con el Kit de ensayo para células; sEH de Cayman (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EE. UU.). Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos a 3×10^5 células/ml. Después de 24 h se trataron con TPPU a diferentes concentraciones (0,1, 1, 3, 10, 30 y 100 μ M) mediante diluciones seriadas. Las células se procesaron siguiendo el protocolo del fabricante, ya que esta línea celular necesitaba una incubación adicional de tampón de lisis durante la noche para permeabilizar la membrana celular. Se utilizó Epoxy Fluor 7, un sustrato fluorescente para sEH, para controlar la actividad enzimática. Se utilizó AUDA, un sEH_i, como control según lo indicado por el kit; y se hizo una curva estándar de 6-metoxi-2-naftaldehído. Las absorbancias se midieron en el fluorímetro Spectramax Gemini XS a longitudes de onda de excitación y emisión de 330 y 465 nm, respectivamente. Se calculó una curva de regresión logarítmica no lineal con el fin de determinar la actividad inhibidora de sEH del TPPU.

5. Ensayo de nitritos en la línea celular microglial BV2

Analizamos los cambios inflamatorios en un entorno experimental *in vitro* mediante la determinación de la generación de óxido nítrico en la línea celular microglial de ratón BV2. Para los experimentos del ensayo de nitritos se sembraron placas de 96 pocillos. La generación de óxido nítrico por las BV2 activadas se midió mediante la reacción colorimétrica de Griess (Lawrence, 2009) que detecta nitritos (NO_2^-), un producto de

reacción estable del óxido nítrico y el oxígeno molecular. Así, para evaluar el óxido nítrico (NO) liberado de cada muestra, realizamos un ensayo de Griess con el kit de reactivos Griess para la determinación de nitritos (Thermo fisher Scientific), que puede detectar nitritos formados por oxidación espontánea de NO. El reactivo de Griess se preparó mezclando 1:1 solución de Griess A (100 ml de agua mili-Q, sulfanilamida al 1%, ácido ortofosfórico al 5%) y solución de Griess B (100 ml de agua mili-Q, N- (1-naftil) etilendiamina dihidrocloruro 0,1%). Las muestras se recogieron en eppendorfs y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min a 4°C. 50 µl / pocillo del estándar. Las soluciones y los sobrenadantes se colocaron en una placa de 96 pocillos. Se incubaron 50 µl de medio acondicionado con 50µl de reactivo de Griess durante 10 min a temperatura ambiente. La densidad óptica se midió a 540 nm usando un lector de microplacas (iEMS Reader MF; Labsystems). La concentración de nitritos se determinó a partir de una curva estándar de nitrito de sodio.

5. Inmunodetección de proteínas por Western-Blot

5.1 Lisado celular y extracción de proteínas.

El lisado celular se realizó después de un tiempo de incubación de 24 horas en placas de 12 pocillos. Después de la incubación, las células se lisaron con tampón de lisis RIPA (Tris-HCl 25 mM pH 7,6, NaCl 150 mM, desoxicolato de sodio al 1%, dodecilsulfato de sodio al 0,1%) (Thermo fisher Scientific) suplementado con SDS al 2%, los inhibidores de fosfatasas: ortovanadato 1 mM, fluoruro de sodio 5 mM, un comprimido del cóctel inhibidor de proteasas cOmplete (Roche). La concentración de proteínas de los lisados celulares se determinó mediante el ensayo de proteínas de Bradford (Bio-Rad). Las absorbancias se midieron en el espectrofotómetro de espectro Multiskan (Thermo Fisher Scientific) a 595 nm.

5.2 Inmunodetección por Western-Blot

Se preparó una concentración igual de proteínas para todas las muestras (10 µg) con 6x DTT y agua destilada hasta llegar a 18 µl. Se realizó el mismo protocolo de Western-Blot descrito previamente en el apartado 8.2. Los anticuerpos primarios utilizados para el análisis fueron los descritos en la tabla 3.

Tabla 3. Lista de anticuerpos primarios utilizados para el análisis de Western-Blot *in vitro*.

Anticuerpo	Huesped	Dilución	Referencia
Actina	Rabbit	1:10000	Sigma (A5060)
IL-1B precursor	Hamster	1:500	Santa Cruz (sc-12742)
IL-1B maduro	Rabbit	1:500	Cell Signalling (#52718)
iNOS	Rabbit	1:500	Cell Signalling (#13120)

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se muestran como media \pm SEM. La distribución de los datos se verificó con la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Los datos fueron analizados por ANOVA de una o dos vías en función del número de variables a analizar. Los resultados se consideraron significativos cuando $P < 0,05$. Se realizó la prueba de LSD de Fisher post-hoc para comparar las medias entre los grupos. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad Prism 6.

DISEÑOS EXPERIMENTALES

Se detallan en el siguiente apartado los diseños experimentales correspondientes a cada capítulo de resultados.

- **Capítulo 1: Caracterización del modelo de demencia por mCRP y comparación con el modelo de EA, 5XFAD.**

Se llevaron a cabo tres estudios independientes de iguales características a 1, 3 y 6 meses de tratamiento. Para cada tiempo de estudio se incluyó el modelo de EA, 5XFAD con las edades correspondientes a los animales C57Bl/6J inyectados de cada estudio. Es decir; a 4 meses de edad (1 mes de tratamiento para los animales inyectados), 6 meses (correspondientes a 3 meses de tratamiento) y 9 meses de edad (6 meses de tratamiento). Los animales 5XFAD no recibieron inyección estereotáxica ya que se emplearon como control de EA. A los animales C57BL/6J inyectados se les suministró 1 μ l de mCRP a 3,5 μ g/ μ l o CSF. Todos los animales del estudio fueron sometidos a las mismas pruebas de comportamiento después de los tiempos de tratamiento especificados. El número de animales por condición experimental fue entre 8 y 12. Los tests de comportamiento se realizaron 1 mes, 3 meses y 6 meses después de realizar la inyección estereotáxica a los ratones con el fin de estudiar las alteraciones inducidas por mCRP.

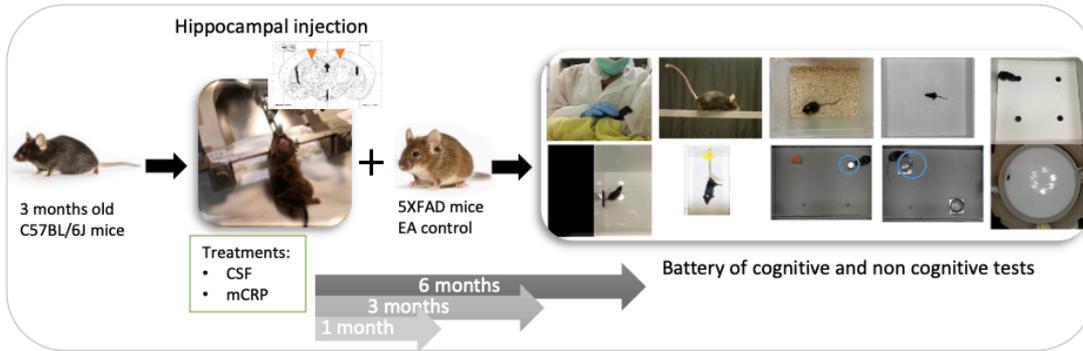


Figura 31. Imagen del diseño experimental del capítulo 1 de resultados correspondiente a los estudios realizados a 3 tiempos diferentes.

- **Capítulo 2: Neuropatología inducida por la inyección bilateral de mCRP en el hipocampo de ratón.**

Con el fin de estudiar la distribución de mCRP y los efectos inducidos por ésta a nivel neuropatológico se analizó todo el tejido cerebral de los animales C57BL/6J mediante IHC.

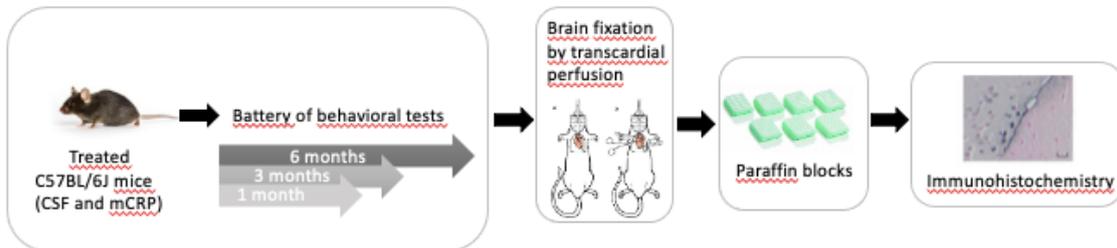


Figura 32. Imagen del diseño experimental del capítulo 2 de resultados correspondiente al procesamiento y análisis del tejido de los animales empleados en el capítulo 1.

La mitad de los animales empleados en los estudios de comportamiento del capítulo anterior (a diferentes tiempos de tratamiento), fueron perfundidos intracardialmente con la finalidad de fijar el tejido para su posterior análisis inmunohistoquímico. La *n* mínima experimental fue de 4.

- **Capítulo 3: Comparación de la expresión génica y niveles de proteínas del modelo de ratón por mCRP con el modelo de EA, 5XFAD.**

Para este capítulo se emplearon parte de los animales utilizados en el capítulo 1 para el análisis comportamental.

Se seleccionaron los animales pertenecientes al estudio de 6 meses con el fin de observar los cambios producidos en la expresión génica y de proteínas inducidos por el tratamiento con mCRP. Se procesaron los hipocampos tanto de los animales C57BL/6J como de los 5XFAD. Se compararon molecularmente los cambios inducidos por mCRP con los animales inyectados con tratamiento control (CSF) y las alteraciones de los animales 5XFAD con los WT correspondientes.

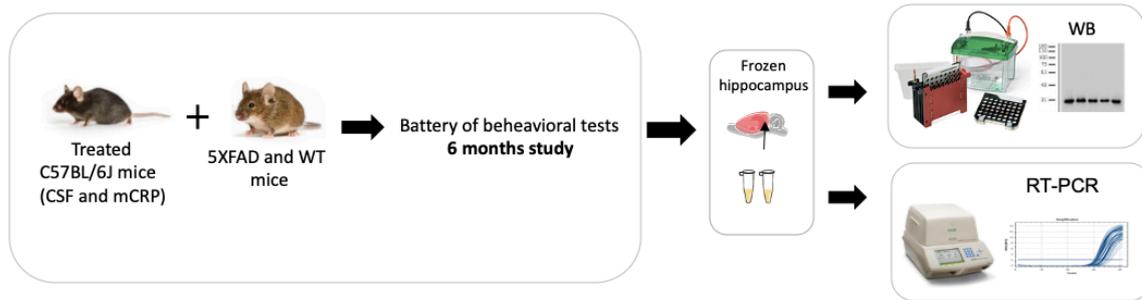


Figura 33. Imagen del diseño experimental del capítulo 3 de resultados correspondiente al procesamiento y análisis del tejido de los animales empleados en el capítulo 1.

- **Capítulo 4: Terapia de un anticuerpo monoclonal anti-mCRP en el modelo de demencia por mCRP.**

Se realizaron 3 estudios independientes durante períodos de 1 mes, 3 meses y 6 meses respectivamente para probar la neuroprotección del anticuerpo monoclonal 8C10 respecto a mCRP. Los animales C57BL/6J fueron tratados mediante cirugía estereotáxica realizada de manera bilateral en el hipocampo. Se administraron 2 μ l de tratamiento mediante cirugía estereotáxica, inyectando, de manera bilateral en el hipocampo, 1 μ l de mCRP a 3,5 μ g/ μ l y / o 1 μ l de solución de anticuerpo 8C10. El volumen de los ratones a los que se les administró una de las dos soluciones se completó hasta 2 μ l con 1 μ l de solución artificial de CSF. Los ratones del grupo de control recibieron una inyección bilateral de 2 μ l de CSF. Por lo tanto, para cada estudio los grupos experimentales fueron los siguientes: control (CSF), mCRP, más anticuerpo anti-mCRP (mCRP+8C10) y anticuerpo anti-mCRP (8C10). El número de animales por tratamiento fue entre 8 y 12. Los tests de comportamiento se realizaron 1 mes, 3 meses y 6 meses después del tratamiento. Una vez finalizados los tests, los animales se sacrificaron por dislocación y los hipocampos de los ratones correspondientes al estudio

de 6 meses fueron seleccionados para realizar el análisis de expresión génica y proteínas.

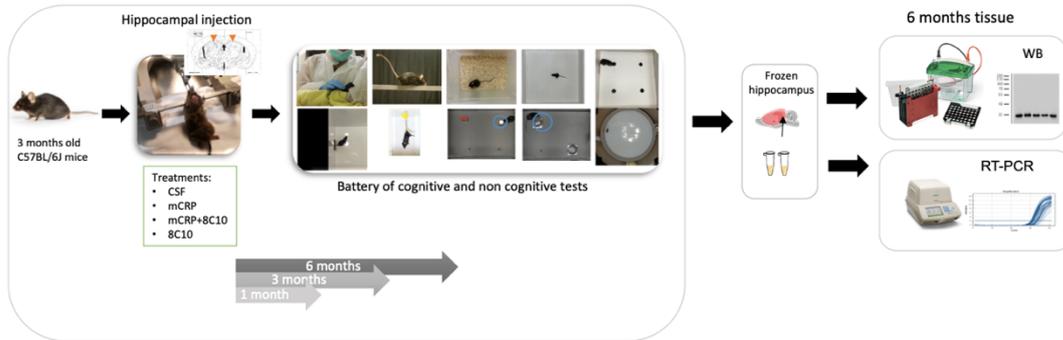


Figura 34. Imagen del diseño experimental del capítulo 4 de resultados correspondiente a los estudios llevados a cabo a 3 tiempos diferentes.

Capítulo 5: Evaluación de la acción neuroprotectora del agente anti-inflamatorio TPPU como terapia contra mCRP.

- **Diseño experimental *in vivo***

Se realizó un estudio adicional durante un periodo de 1 mes con el fin de probar si el agente TPPU podía proteger de los efectos inducidos por mCRP. Se emplearon animales C57BL/6J de 3 meses de edad, que fueron inyectados con mCRP o CSF mediante cirugía estereotáxica de forma bilateral en el hipocampo.

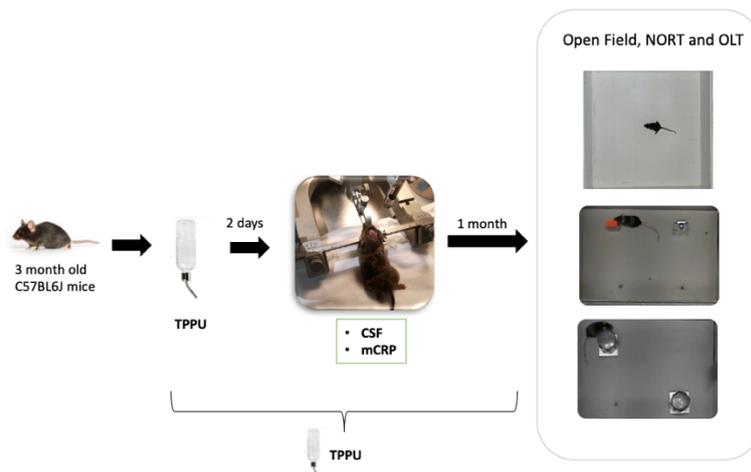


Figura 35. Imagen del diseño experimental del capítulo 5 de resultados correspondiente al estudio realizado *in vivo*.

El agente TPPU se administró por vía oral en el agua de la bebida comenzando 2 días antes de la inyección bilateral de mCRP o CSF. El TPPU se administró mezclado con ciclodextrina. El grupo control recibió la misma dosis de ciclodextrina en la bebida. Los

grupos experimentales fueron: control (CSF), mCRP y mCRP más TPPU (mCRP + TPPU). El número de animales por condición experimental fue de 9. Para este estudio se realizó el Ensayo de campo abierto, el NORT y el OLT, como pruebas comportamentales seleccionadas. Las pruebas de comportamiento se llevaron a cabo 1 mes después de los tratamientos con el fin de estudiar los efectos inducidos por estos.

- **Diseño experimental *in vitro***

Para los experimentos *in vitro* se utilizó la línea celular BV2 antes descrita sembrada siempre a la misma concentración: 3×10^5 células /ml. Todos los tratamientos se incubaron durante un periodo de 24 horas. Los tratamientos estudiados fueron los mencionados anteriormente y se sembraron placas de 12 o 96 pocillos para los experimentos de Western Blot o de nitritos respectivamente como se muestra en la figura 36. En todos los experimentos se utilizaron células de pocillos procedentes de 3 o más experimentos independientes y con número de subcultivo distinto.

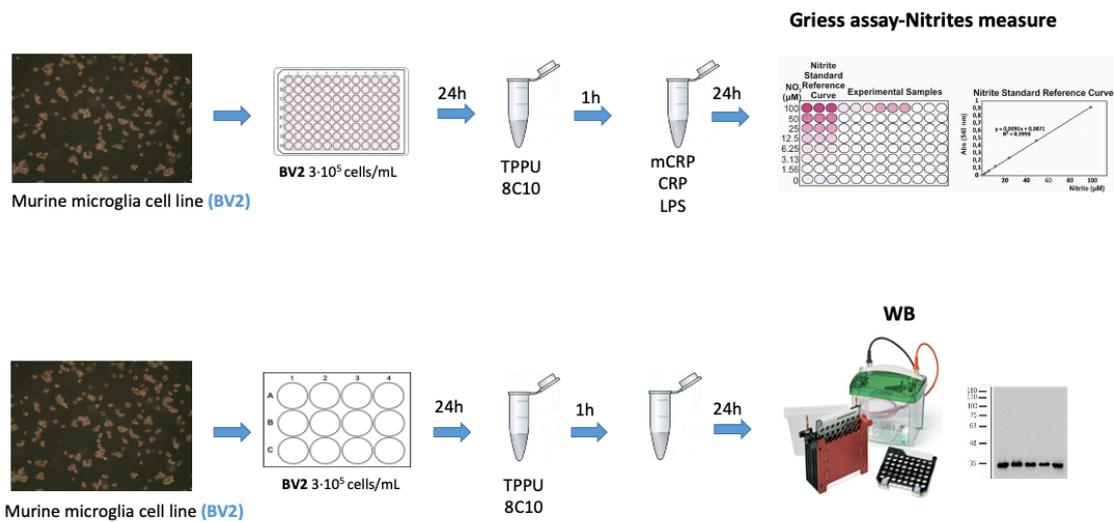


Figura 36. Imagen del diseño experimental del capítulo 5 de resultados correspondiente a los experimentos realizados *in vitro*.

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE DEMENCIA POR mCRP Y COMPARACION CON EL MODELO DE EA, 5XFAD.

La finalidad de este capítulo consistió en caracterizar los efectos cognitivos y de BPSD inducidos por la inyección estereotáxica de mCRP en el hipocampo de ratones a 1, 3 y 6 meses de tratamiento, así como la comparación con el modelo de EA, 5XFAD.

1.1 El tratamiento con mCRP no indujo alteraciones en la salud sistémica de los animales. El modelo de EA mostró deterioro en la actividad motora en los estudios de 1, 3 y 6 meses de duración.

El tratamiento intrahipocampal con mCRP no indujo alteraciones graves en la salud sistémica de los animales en cuanto a alteraciones del peso (Fig. 37), visión y sensibilidad, reflejos, coordinación motora, equilibrio y prensilidad (Fig. 38).

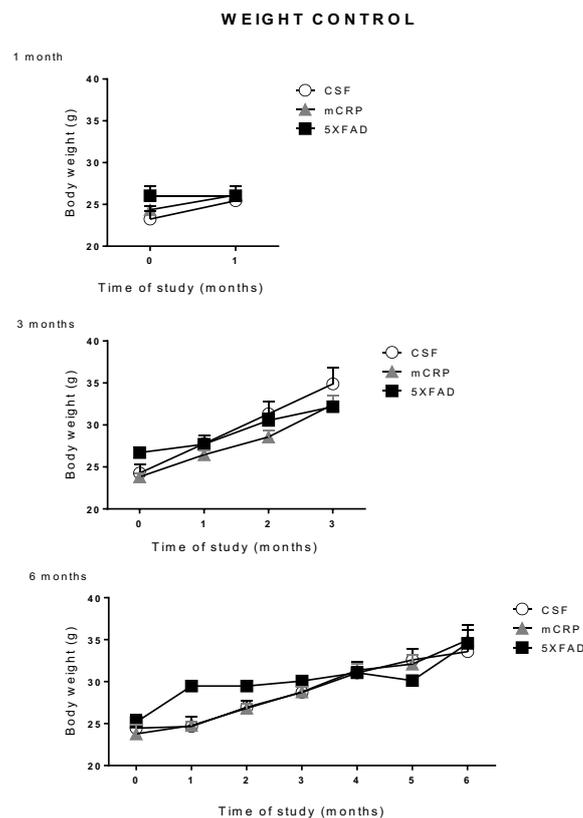


Figura 37. Curva de pesos (*Weight control*) de los grupos experimentales de ratones CSF, mCRP y 5XFAD para cada uno de los estudios de 1 mes, 3 meses y 6 meses de duración. Todos los datos se muestran como la media \pm SEM (n= 8-11).

A diferencia del modelo de EA 5XFAD, que, a pesar de no mostrar alteraciones en cuanto al peso, visión, reflejos y sensibilidad, sí que mostró un deterioro de la

RESULTADOS

coordinación motora, el equilibrio y la prensilidad en los estudios de 1 mes, 3 meses y 6 meses de duración (Fig. 38). Como era de esperar, el peso de los animales incrementó significativamente en relación al tiempo de duración de los estudios [ANOVA de dos vías; efecto de los meses de duración del estudio; $F(1, 48) = 4,636$, $P = 0,0364$; $F(3, 104) = 18,73$, $P < 0,0001$ and $F(6, 186) = 31,67$, $P < 0,0001$, para los estudios de 1 mes, 3 meses y 6 meses de duración respectivamente]. Así, todos los grupos experimentales mostraron una curva de peso corporal que incrementaba a lo largo del tiempo. No se detectó deterioro visual ni físico inspeccionado cualitativamente durante el ensayo sensorimotor, para ninguno de los grupos de ratones utilizados en el estudio.

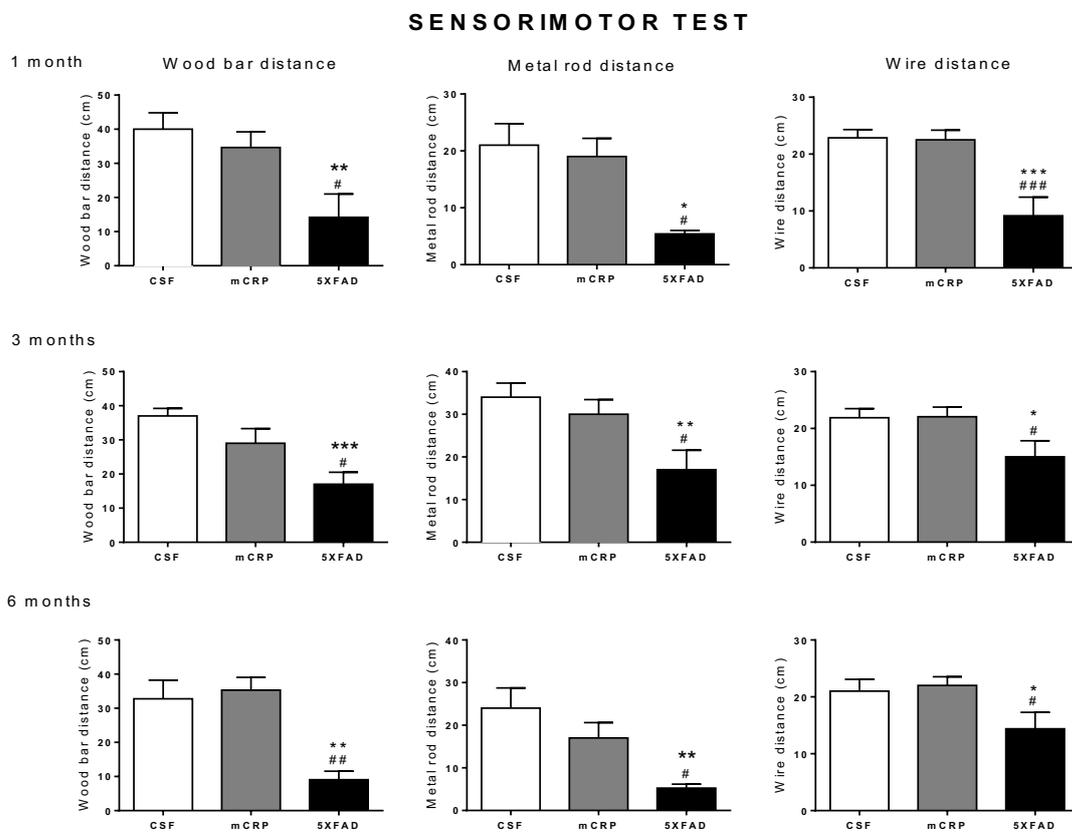


Figura 38. Ensayo sensorimotor (*Sensorimotor test*), en el que se muestran las distancias recorridas por cada grupo experimental (CSF, mCRP y 5XFAD) en la barra de madera, la barra de metal y el cable de metal a 1, 3 y 6 meses. Todos los datos se muestran como la media \pm SEM ($n = 8-11$) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$ vs CSF, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs mCRP.**

Los animales 5XFAD mostraron una disminución significativa de la coordinación motora, el equilibrio y la prensilidad en comparación con los controles y el modelo por mCRP, a todas las edades, al andar por la barra de madera [ANOVA de una vía; $F(2,$

23) = 4,754, P = 0,0182; F (2, 26) = 7,540, P = 0,0022 y F (2, 30) = 9,773, P= 0,0005 a 1 mes, 3 meses y 6 meses respectivamente] al andar por la barra de metal [ANOVA de una vía; F (2, 23) = 4,671, P = 0,0194, F (2, 26) = 4,932, P = 0,0141 y F (2, 30) = 4,914, P = 0,014, a 1 mes, 3 meses y 6 meses respectivamente] y al sujetarse al hilo de metal [ANOVA de una vía; F (2, 23) = 10,72, P = 0,0005; F (2, 26) = 3,596, P = 0,0398; y F (2, 30) = 3,577, P = 0,0404 a 1 mes, 3 meses y 6 meses respectivamente].

1.2 El tratamiento con mCRP indujo un incremento en el estrés y la ansiedad a 6 meses de tratamiento, similar al modelo de EA, 5XFAD.

La inyección intrahipocámpal con mCRP indujo BPSD relacionados con la emocionalidad produciendo un aumento de la ansiedad (Fig. 42) y el estrés (Fig. 40), a los 6 meses de tratamiento. Por el contrario, el tratamiento con mCRP no afectó a la neofobia (Fig. 39), a la actividad exploratoria, (Figs. 40 y 41), ni indujo signos de depresión en los animales tratados (Fig. 43). Similar al modelo de EA que mostró BPSD relacionados con la emocionalidad en los estudios de 1, 3 y 6 meses de duración (Figs. 40 y 42) sin mostrar alteraciones en la actividad exploratoria, la neofobia, ni la depresión relacionada con la demencia (Figs. 39, 40, 43).

El análisis estadístico del Ensayo de las esquinas (*Corner test*), en el que se estudió la neofobia de los animales a una nueva caja y la capacidad de explorarla y adaptarse a ella; no reveló diferencias significativas para los animales tratados con mCRP ni para los ratones 5XFAD respecto a los controles (Fig. 39) a ninguno de los tiempos estudiados.

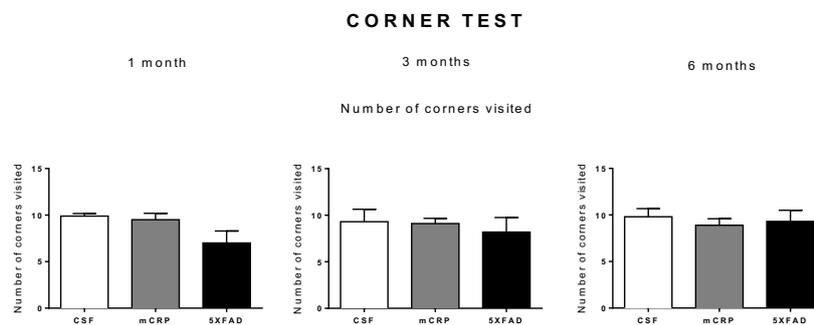


Figura 39. Ensayo de las esquinas (*Corner test*), en el que se muestra el número de esquinas visitadas por cada grupo de animales (CSF, mCRP y 5XFAD) en los estudios de 1 mes, 3 meses y 6 meses de duración. Todos los datos se muestran como la media ± SEM (n= 8-11).

RESULTADOS

De igual manera, tal y como se observa en el Ensayo de campo abierto (*Open field test*) (Fig. 40, B) el tratamiento con mCRP no indujo alteraciones en la actividad exploratoria de los animales a ninguno de los tiempos estudiados, tal y como revelan la actividad vertical, o número de rearings realizados, la actividad horizontal y la velocidad de los animales al explorar el tablero (Fig. 40, A).

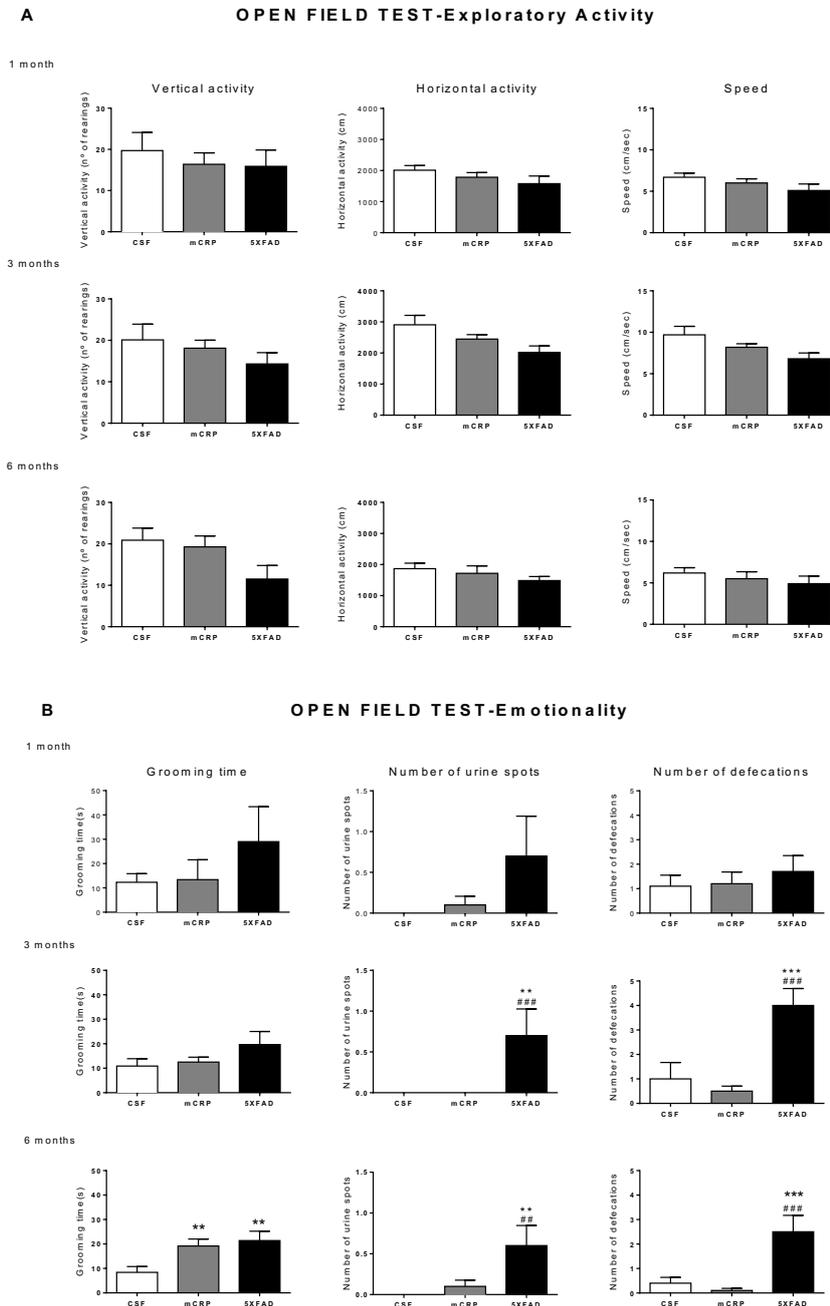


Figura 40. Ensayo de campo abierto (*Open field test*) para los estudios de 1, 3 y 6 meses. Se muestran los parámetros de actividad vertical, actividad horizontal y velocidad de la actividad horizontal como indicadores de la actividad exploratoria (**A**). Se muestra el tiempo de *grooming*, el número de orinas y defecaciones realizados durante el test como indicadores de emocionalidad (**B**). Todos los datos se

muestran como la media \pm SEM (n= 8-11) *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs CSF, #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 vs mCRP.

El modelo de EA tampoco mostró alteraciones para estos parámetros referentes a la actividad exploratoria (Fig. 40, A). Por el contrario, el tratamiento con mCRP produjo un incremento del estrés reflejado en el aumento significativo del *grooming*, parámetro elevado en casos de estrés, similar al modelo de EA [ANOVA de una vía; F (2, 30) = 6,259, P = 0,0058]. Los ratones 5XFAD aumentaron significativamente el número de defecaciones y orinas (parámetro relacionado con la emocionalidad) respecto a los controles y el modelo por mCRP. Mostrando una tendencia en el estudio de 1 mes de duración y de manera significativa en los estudios de 3 y 6 meses [Número de orinas: ANOVA de una vía; F (2, 26) = 9.473, P = 0.0008 para el estudio de 3 meses y F (2, 27) = 5,705, P = 0,0086 para el estudio de 6 meses. Número de defecaciones: ANOVA de una vía; F (2, 26) = 14.41, P < 0,0001 a 3 meses y F (2, 27) = 12,52, P = 0,0001 a 6 meses].

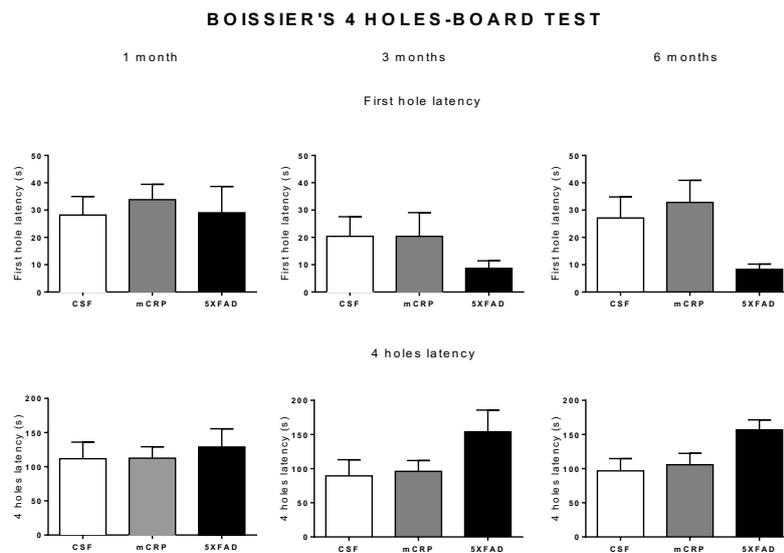


Figura 41. Ensayo de la tabla de cuatro agujeros de Boissier (*Boissier's 4 holes-board test*). Los parámetros representados para cada grupo para los diferentes estudios (1, 3 y 6 meses) son: la latencia de la primera exploración de cualquier agujero, y la latencia de exploración de los 4 agujeros del tablero. Todos los datos se muestran como la media \pm SEM (n= 8-11).

Esta ausencia de alteraciones en la actividad exploratoria de los grupos experimentales se confirmó con el Ensayo de la tabla de cuatro agujeros de Boissier (*Boissier's 4 holes-board*) (Fig. 41). Aquí, el tratamiento con mCRP no indujo diferencias significativas respecto a los controles. El modelo de EA mostró una disminución no significativa en la

RESULTADOS

latencia de exploración del primer agujero y un aumento de la latencia de exploración de los 4 agujeros, a 3 y 6 meses. Es decir, los ratones 5XFAD iniciaron antes la exploración, pero tardaron más en explorar los 4 agujeros.

De manera similar a las alteraciones en la emocionalidad observadas en el Ensayo del Campo Abierto, el análisis estadístico del Ensayo de la caja oscura/caja iluminada (Fig. 42) reveló un incremento significativo de la ansiedad para el modelo de mCRP en el estudio de 6 meses. Estos animales tardaron más tiempo en entrar a la zona iluminada (*latency to light area*), similar al modelo de EA, que mostró un aumento de la latencia de entrada en la zona iluminada a todos los tiempos [ANOVA de una vía; $F(2, 23) = 4.404, P = 0,0225$; $F(2, 26) = 4,282, P = 0,0247$; $F(2, 30) = 5,018, P = 0,0140$ a 1, 3 y 6 meses respectivamente] realizando a su vez, un menor número de entradas en la misma [ANOVA de una vía; $F(2, 23) = 4,74, P = 0,0184$; $F(2, 26) = 3,158, P = 0,0592$ y $F(2, 30) = 4,336, P = 0,0233$ a 1, 3 y 6 meses respectivamente]. Los ratones tratados con mCRP durante 6 meses, realizaron un menor número de entradas en la zona iluminada, acercándose a los valores del modelo 5XFAD con el que deja de diferenciarse significativamente.

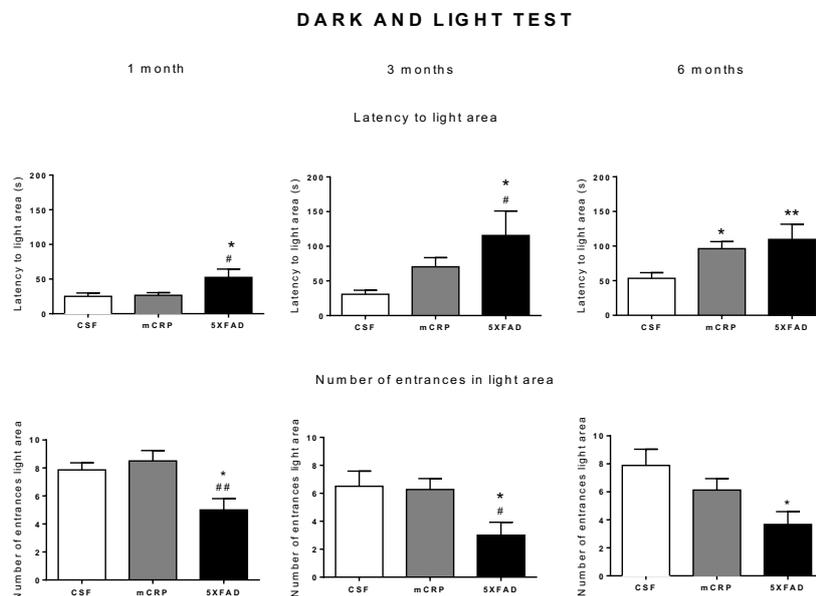


Figura 42. Ensayo de la caja oscura/caja iluminada (*Dark and light test*). Se muestra la latencia de entrada en la zona iluminada para todos los grupos estudiados, así como el número de entradas en la misma para cada grupo. Se muestran los datos para los estudios de 1, 3 y 6 meses de duración. Todos los datos se muestran como la media \pm SEM ($n = 8-11$) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs CSF, # $p < 0.05$, ### $p < 0.01$ vs mCRP.

Finalmente, tal y como se observa en el Ensayo de suspensión por la cola, el tratamiento con mCRP no generó signos de depresión asociada a la demencia ni a corto ni a largo plazo (Fig. 43). El modelo de EA, mostró una tendencia a mantenerse más tiempo inmóvil, sin luchar por escapar, a partir del estudio de 3 meses, lo que se considera un signo de depresión relacionado con la demencia. Esta tendencia, sin embargo, no fue significativa.

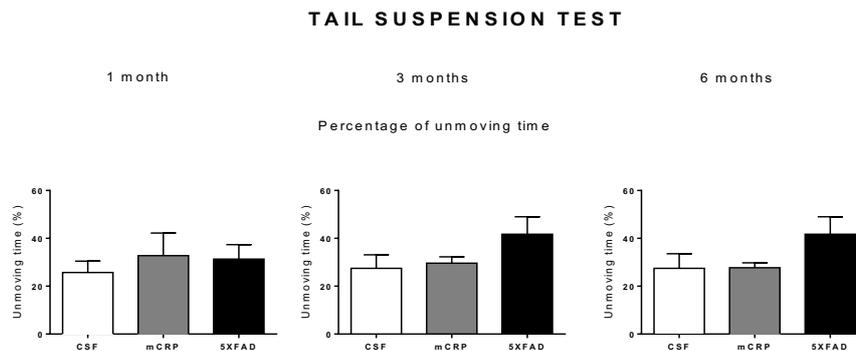


Figura 43. Ensayo de suspensión por la cola (*Tail suspension test*) en el que se muestra el porcentaje de tiempo que cada grupo permanece inmóvil para los tres tiempos de tratamiento (1, 3 y 6 meses). Todos los datos se muestran como la media \pm SEM (n= 8-11).

1.3 El tratamiento con mCRP indujo pérdida de la memoria espacial y de reconocimiento en los estudios de 1, 3 y 6 meses de duración, similar al modelo de EA.

La inyección intrahipocampal de mCRP indujo pérdida cognitiva, entendida como la memoria espacial y de reconocimiento, 1, 3 y 6 meses después de la inyección bilateral en el hipocampo, similar al modelo de EA, 5XFAD (Figs. 44 y 45).

En el Test de Reconocimiento de Objetos Nuevos (NORT), (Fig. 44) se analizó el índice de discriminación entre un objeto nuevo y uno familiar. El modelo de mCRP y el modelo de EA mostraron una disminución significativa en la memoria de reconocimiento respecto a los controles. Estos animales no fueron capaces de discernir cuando el objeto A (familiar) fue reemplazado por el objeto B (nuevo), dos horas (2h) después del entrenamiento (0h) [ANOVA de una vía; $F(2, 23) = 8,010$, $P = 0,0023$ a 1 mes; $F(2, 26) = 3,753$, $P = 0,0370$ a 3 meses y $F(2, 30) = 10,79$, $P = 0,0003$ a 6 meses] y por el C (nuevo), 24 horas más tarde (24h) [ANOVA de una vía; $F(2, 23) = 10,68$, $P = 0,0005$ a 1 mes, $F(2, 26) = 12,49$, $P = 0,0002$ a 3 meses y $F(2, 30) = 20,82$, $P <$

RESULTADOS

0,0001 a 6 meses]. Esta falta de memoria de reconocimiento inducida por mCRP se mantuvo presente a 1, 3 y 6 meses de tratamiento, igual que en el modelo de EA.

NOVEL OBJECT RECOGNITION TEST

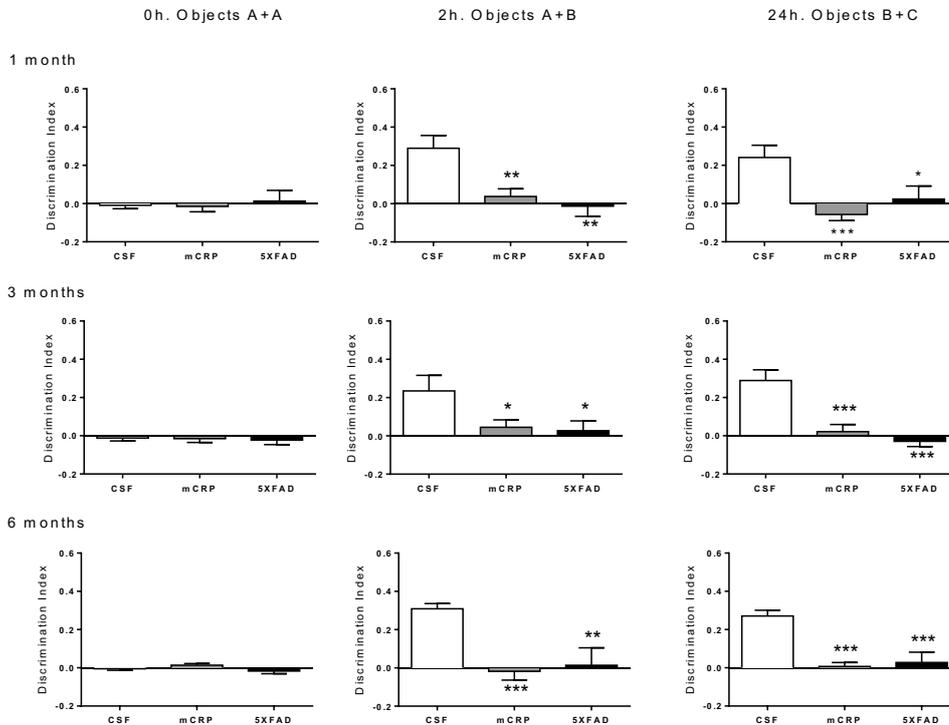


Figura 44. NORT. Ensayo de Reconocimiento de Nuevos Objetos (*Novel Object Recognition Test*) en los que se muestra el índice de discriminación de objetos para los diferentes grupos de animales en las diferentes fases del test, entrenamiento (0h), cambio de objeto 2 horas después del entrenamiento y cambio de objeto 24 horas después. Los índices de discriminación muestran la capacidad de los ratones para discernir entre el objeto con el que se familiarizan durante el entrenamiento y un objeto nuevo reemplazado 2 horas y 24 horas después del entrenamiento. Los resultados se muestran para los estudios de 1, 3 y 6 meses. Todos los datos se muestran como la media \pm SEM (n= 8-11) *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Asimismo, el tratamiento con mCRP indujo la falta de memoria espacial, similar al modelo de EA. El Test de Ubicación de Objetos (OLT), figura 45 mostró como el modelo por mCRP y el modelo de EA no fueron capaces de discriminar el objeto reubicado del que se mantuvo en la misma posición, dos horas después del entrenamiento, significativamente diferentes a los controles, que mantuvieron la memoria espacial. [ANOVA de una vía; F (2, 23) = 11,07, P = 0,0004 a 1 mes; F (2, 26) = 11,44, P = 0,0003 a 3 meses y F (2, 30) = 8,170, P = 0,0016 a 6 meses].

NOVEL OBJECT LOCATION TEST

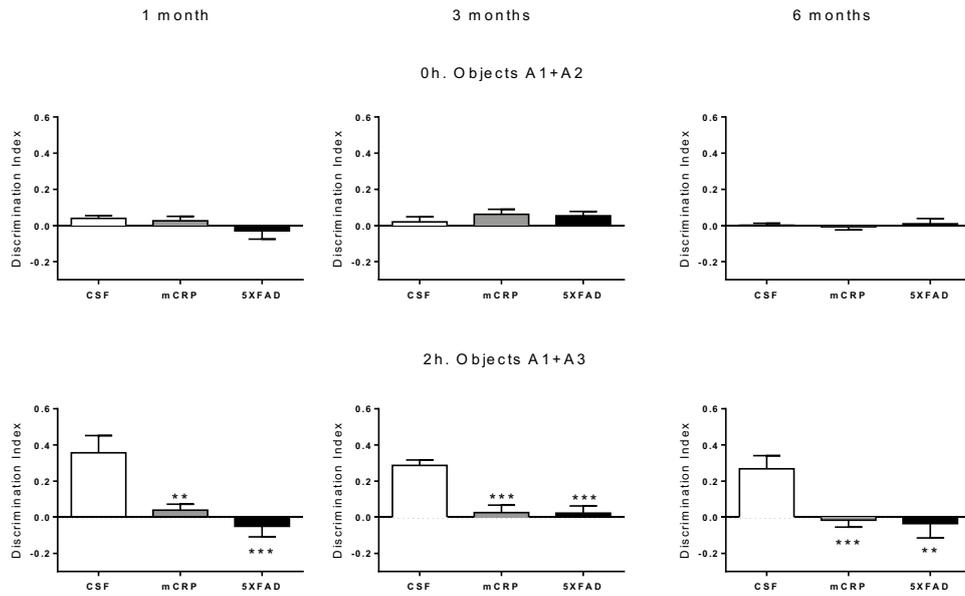


Figura 45. OLT. Ensayo de Nueva Ubicación de Objetos (*Novel Object Location Test*). Se muestra el índice de discriminación de la localización de objetos para los diferentes grupos de animales tanto en el entrenamiento, donde ambos objetos se sitúan equidistantes, como para el test realizado 2 horas después donde uno de los objetos ha sido reubicado. Los índices de discriminación muestran la capacidad de los ratones para discernir entre el objeto que se mantiene en la posición inicial y el que cambiamos de posición. Se muestran los resultados para los estudios de 1 mes, 3 meses y 6 meses. Todos los datos se muestran como la media \pm SEM (n= 8-11) *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

2. NEUROPATOLOGÍA INDUCIDA POR LA INYECCIÓN BILATERAL DE mCRP EN EL HIPOCAMPO DE RATON.

En este apartado se exponen los resultados obtenidos con el fin de responder al segundo objetivo planteado en esta tesis: caracterizar inmunohistoquímicamente, la distribución de mCRP tras la inyección intrahipocampal, así como los cambios neuropatológicos ligados a mCRP.

2.1 mCRP quedó depositada en CA1 después de su inyección en el hipocampo, diseminándose, en parte, hasta zonas más lejanas del cerebro como el hipotálamo.

Se evaluó la IHC del tejido cerebral de los ratones del estudio de 1 mes para estudiar la distribución de mCRP. La detección de mCRP, mediante el anticuerpo 8C10 sintetizado dentro del estudio, reveló que mCRP quedaba fuertemente depositada en el hipocampo, adyacente a la zona de inyección CA1 (Fig. 46, E). mCRP también se infiltró en la microvasculatura cortical como muestra la tinción positiva de mCRP de la imagen Figura 46 B; y los recuadros adyacentes, lo que indicó un posible mecanismo de diseminación de la proteína a lo largo del córtex y a otras zonas del cerebro.

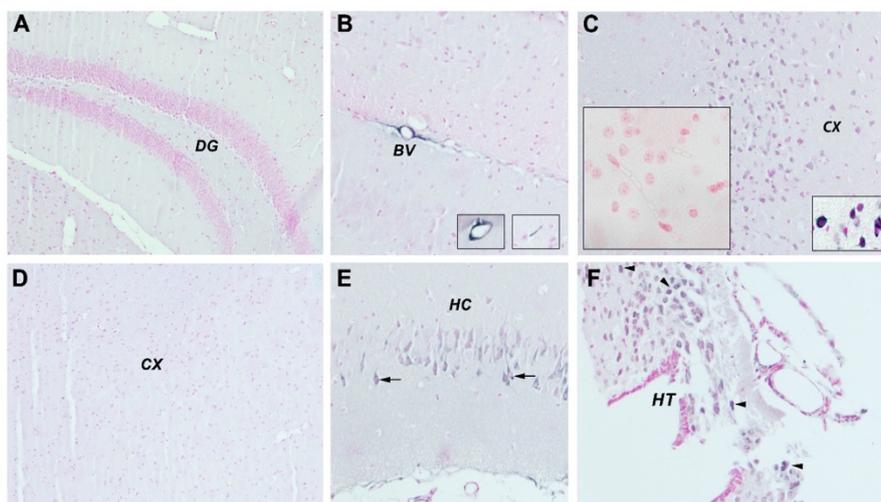


Figura 46. IHC del patrón de distribución de mCRP en el tejido cerebral de ratones 1 mes tras la inyección intrahipocampal. (A) Hipocampo y (D) córtex de animales controles inyectados con CSF con tinción negativa para mCRP. Aumentos: x4 (B) Tinción de mCRP en la microvasculatura cortical y detalles de la misma. Aumentos: x10 (C) Tinción positiva de mCRP en el córtex.y detalles de la misma (E) Tinción positiva de mCRP en las neuronas piramidales del hipocampo (indicadas con flechas) (F) Tinción positiva de mCRP en el hipotálamo donde señalan las flechas. (C, E y F). Aumentos x20. B, C, E y F representan imágenes del tejido de animales inyectados con mCRP.

Esta diseminación de la proteína se confirmó con la tinción positiva de mCRP en neuronas del córtex (Fig. 46, C) llegando hasta zonas distales del hipotálamo, donde mCRP apareció expresada en el citoplasma celular (Fig. 46, F). Asimismo, los ratones controles inyectados con líquido cefalorraquídeo, no mostraron tinción positiva para la proteína mCRP ni en el hipocampo (Fig. 46, A) ni en la corteza (Fig. 46, D).

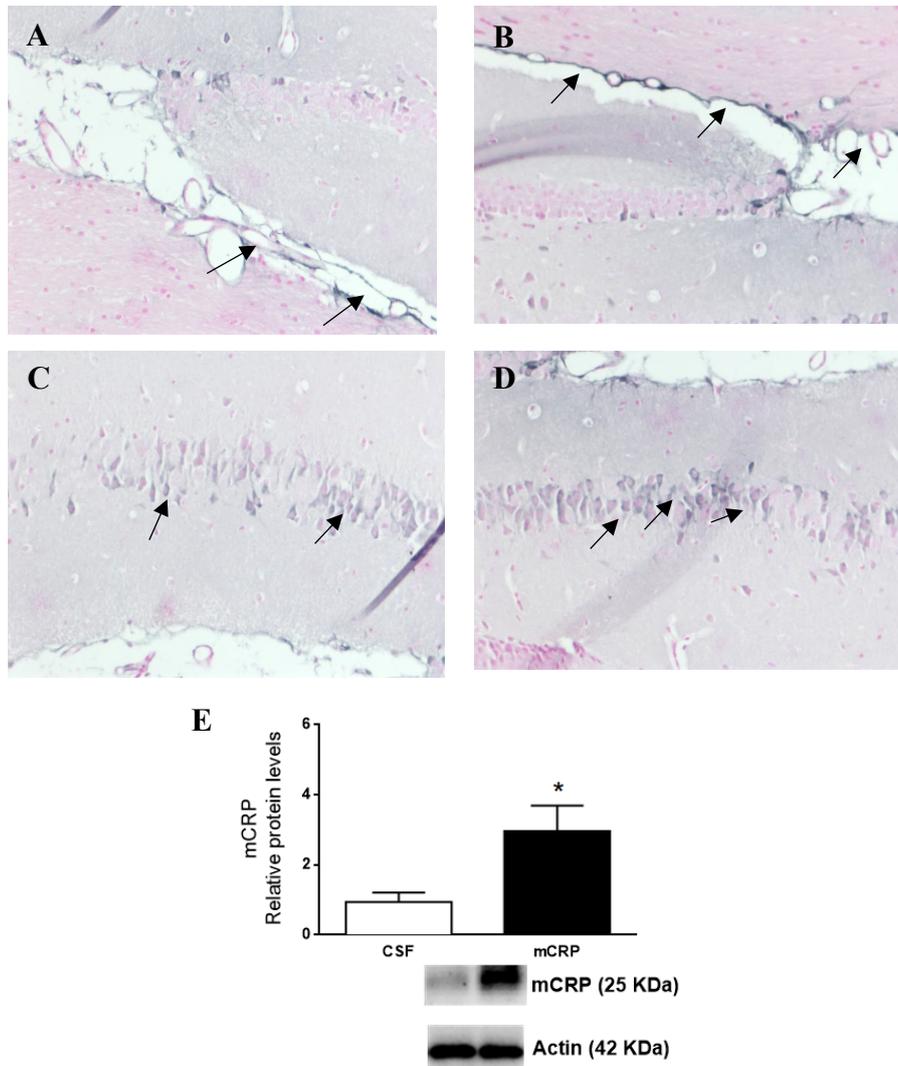


Figura 47. IHC y WB de la distribución de mCRP en el hipocampo 6 meses después de su administración en CA1. (A y B) Tinción positiva (marcada con flechas) de mCRP en zonas del hipocampo adyacentes a los plexos coroideos y al ventrículo lateral. **(C y D)** Células piramidales teñidas positivamente para mCRP en la zona CA1, donde se inyectó la proteína. Todas las imágenes pertenecen al tejido hipocampal, Aumentos x10 en A y B. Aumentos x20 en C y D. **(E)** Niveles de la proteína mCRP para los ratones inyectados con mCRP y CSF (Controles) La transferencia representativa de cada grupo experimental se muestra en el mismo orden que los valores del análisis densitométrico en el histograma. Los datos se muestran como la media \pm SEM (n=4) *p<0.05 respecto al control, CSF.

Con el fin de evaluar la permanencia de mCRP en la zona de inyección tras conocer su distribución a través de la microvasculatura, se analizó el tejido hipocampal 6 meses tras la inyección de mCRP.

Aquí el análisis inmunohistoquímico reveló que mCRP quedaba depositada en el tejido hipocampal incluso 6 meses después de su administración, como se muestra en la figura 47, C y D), donde se puede observar una fuerte tinción positiva para mCRP en las neuronas piramidales de la zona CA1 del hipocampo. mCRP también apareció diseminada en zonas más distales del hipocampo, próximas a los plexos coroideos y al ventrículo lateral (A y B). La deposición de mCRP en el tejido hipocampal 6 meses tras su administración se confirmó mediante Western-Blot, donde los ratones inyectados con mCRP mostraron niveles significativamente más altos de mCRP respecto a los controles [Test de Student, $t=2,611$, $df=6$, $p=0,0400$ CSF vs mCRP] (Fig. 47, E).

2.2 mCRP indujo inflamación en el córtex y en el hipocampo 3 y 6 meses después de su administración en CA1.

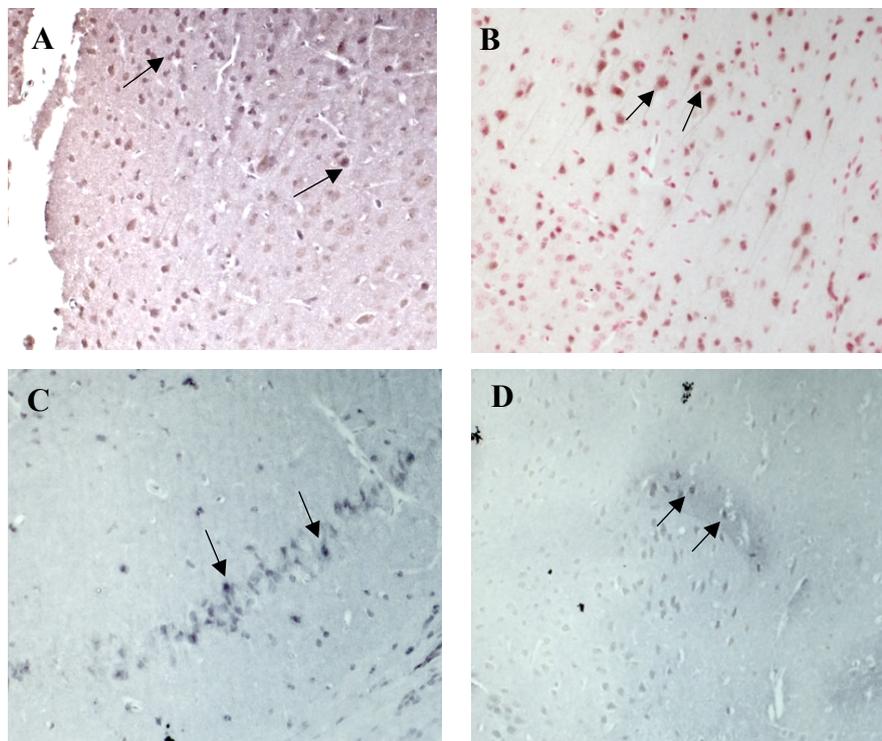


Figura 48. IHC de marcadores de TNF α , IL1-B y NF κ B en el córtex e hipocampo de animales inyectados con mCRP 3 y 6 meses después de su administración en CA1. (A) Tinción positiva de IL-1B en el córtex de un animal inyectado con mCRP a 3 meses de tratamiento. (B) Tinción positiva de

RESULTADOS

TNF α en el córtex 6 meses tras la administración de mCRP. (C) Tinción positiva de NF κ B en el hipocampo y (D) en el córtex, 6 meses tras la administración de mCRP. Aumentos: x20

Se analizó inmunohistoquímicamente si mCRP favorecía el aumento de marcadores relacionados con la inflamación 3 y 6 meses después de su administración en CA1. Para ello se evaluaron: TNF α , IL-1B, ampliamente implicados en procesos neuroinflamatorios observados en EA (Gu et al., 2017), así como NF κ B, que trasloca al núcleo para regular la transcripción del ADN en casos de inflamación (Lawrence, 2009).

En los cerebros de animales inyectados con mCRP se observó tinción positiva de la interleuquina IL1-B intraneuronalmente en el córtex, 3 meses después de la administración de mCRP (Fig. 48, A), como indican las flechas. TNF α también mostró tinción positiva en los núcleos de las neuronas del córtex, 6 meses tras la administración de mCRP (Fig. 48, B). NF κ B se observó tanto en los núcleos neuronales del córtex (Fig. 48, D) como del hipocampo (Fig. 48, C), 6 meses después de la administración de mCRP.

2.3 mCRP indujo la aparición del péptido A β en el cerebro 3 y 6 meses tras su administración en CA1.

Con el fin de estudiar la patología amiloide se evaluaron inmunohistoquímicamente el hipocampo y el córtex de ratones 3 y 6 meses después de la inyección estereotáxica de mCRP en la zona CA1 del hipocampo. Los resultados revelaron la tinción positiva del A β tanto en las neuronas piramidales de CA1 donde la proteína mCRP había sido inicialmente administrada (Fig. 49, A) como en el giro dentado (Fig. 49, B), 3 meses después de la administración de mCRP. La tinción positiva de A β se encontró en el citoplasma neuronal, rodeando al núcleo, como indican las flechas. También encontramos tinción positiva de A β en el córtex 6 meses después de la administración de mCRP (Fig. 49, C).

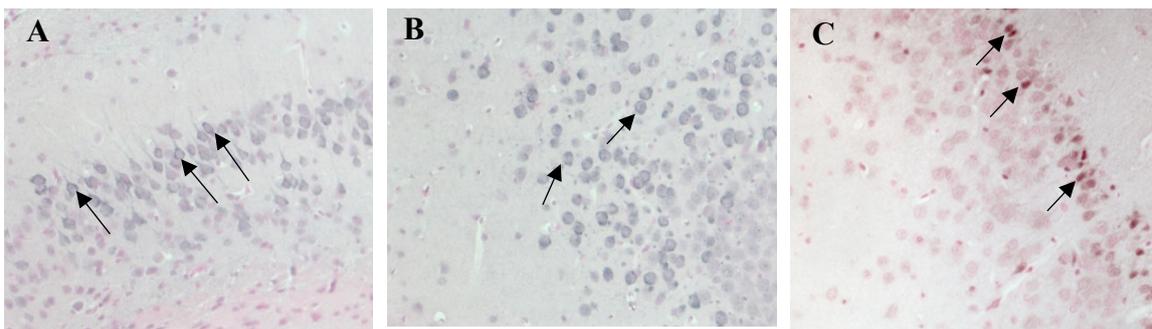


Figura 49. IHC de la tinción positiva del péptido A β en hipocampo y córtex, 3 y 6 meses después de la administración de mCRP en el hipocampo. (A) Tinción positiva de A β en las neuronas piramidales de CA1y (B) en el giro dentado, de un animal inyectado con mCRP a 3 meses de tratamiento. (C) Tinción positiva del péptido A β en el córtex 6 meses después de administrar mCRP. Aumentos: x2.

2.4 mCRP indujo la hiperfosforilación de tau en el cerebro de ratones 3 meses después de su administración en CA1.

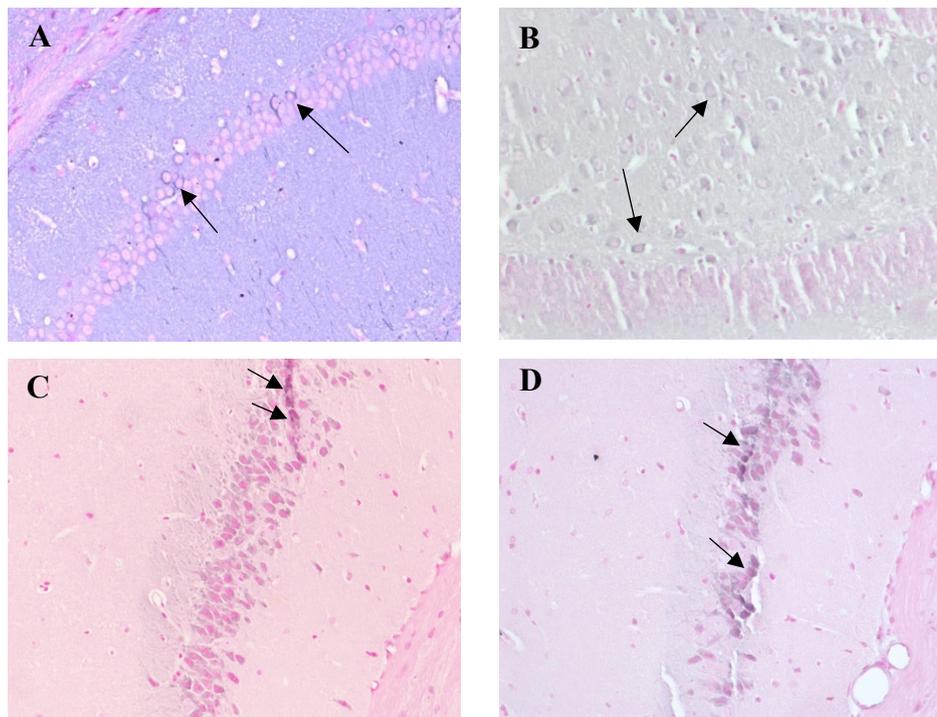


Figura 50. IHC de tau hiperfosforilada y proteínas implicadas en la fosforilación en la zona CA1 del hipocampo. (A) p-tau positiva en la zona de CA1. Aumentos: x10 (B) Tinción de p-tau positivas en las neuronas piramidales del hipocampo. (C y D) La imagen E representa neuronas piramidales de CA1 teñidas positivamente para ERK, y la imagen F neuronas de la capa piramidal del hipocampo teñidas positivamente para p-ERK. Aumentos: x20

La hiperfosforilación de tau y las vías relacionadas con ella se estudiaron 3 meses tras la inyección de mCRP en el hipocampo. Se estudió la fosforilación de tau mediante la proteína ERK y su forma fosforilada, p-ERK, previamente descrita como inductora de la hiperfosforilación de tau en nuestros estudios (M. Slevin et al., 2015) y otros que demuestran la fosforilación de tau mediante p-ERK en la Ser396 para la patología de EA (Kobayashi et al., 2020; Pourtalebi Jahromi et al., 2018; X. Wang et al., 2012; Xiang et al., 2019). Los resultados revelaron la presencia de tau hiperfosforilada en las neuronas piramidales de CA1 del hipocampo (Fig. 50, A) así como en las zonas adyacentes a CA1 (Fig. 50, B), tiñendo en ambos casos el citoplasma neuronal. ERK

RESULTADOS

(Fig. 50, C) y p-ERK (Fig. 50, D) se observaron positivamente marcadas en las neuronas piramidales de la zona CA1 del hipocampo, 3 meses tras la administración de mCRP.

3. COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA Y NIVELES DE PROTEÍNAS DEL MODELO DE RATON POR mCRP CON EL MODELO DE EA, 5XFAD.

La finalidad de este capítulo consistió en analizar los efectos en la expresión génica y los niveles de proteínas inducidos por mCRP a 6 meses de tratamiento. Se compararon las alteraciones de expresión génica y de niveles de proteínas de 5XFAD respecto a los WT de esta misma cepa. El análisis se llevó a cabo en el hipocampo de los ratones. La obtención y procesamiento del tejido hipocampal se realizó a los 9 meses de edad.

3.1 El modelo de demencia por mCRP no reprodujo el incremento en la inflamación encontrado en el modelo de EA.

Con el fin de evaluar si el tratamiento con mCRP inducía alteraciones en la expresión de genes y niveles de proteínas relacionados con la inflamación se estudiaron: (*TNF α*), la interleucina 6 (*Il-6*), la interleucina IL-1B (*Il-1B*) y la quimiocina del ligando 3 (*Ccl3*). Los primeros ampliamente implicados en procesos neuroinflamatorios observados en EA (Y. Gu et al., 2017) y *Ccl3* por ser un marcador de inflamación y gliosis normalmente sobre expresado en modelos de ratones de EA (Gu et al., 2017).

A pesar de haber encontrado marcadores inflamatorios al realizar el análisis histológico del hipocampo de los ratones inyectados con mCRP, al realizar el análisis del tejido homogenizado del hipocampo completo, no se detectó que mCRP indujera, a 6 meses de tratamiento; un incremento en la expresión de estos genes proinflamatorios (Fig x, A), ni en los niveles de la proteína IL-6 (Fig. 51, C). Lo que probablemente se deba a una menor sensibilidad de las técnicas de RT-PCR y Western-Blot para detectar alteraciones producidas a nivel local. A diferencia de lo observado en los ratones 5XFAD en los que, como era de esperar, se ve incrementada la expresión de genes y proteínas pro-inflamatorias en los ratones 5XFAD respecto a los wild type (WT) (Fig. 51, B). Los ratones 5XFAD mostraron diferencias significativas respecto a los WT para *TNF α* [Test de Student, $t=2,963$ $df=10$, $p= 0,0142$ 5XFAD vs WT], *IL1-B* [Test de Student, $t=8,266$ $df=10$, $p< 0,0001$ 5XFAD vs WT] y *Ccl3* [Test de Student, $t=6,382$ $df=12$, $p< 0,0001$ 5XFAD vs WT], (Fig. 51, B), y para los niveles de la proteína IL-6 [Test de Student, $t=2,598$ $df=12$, $p=0,0233$ 5XFAD vs WT] (Fig. 51, D)

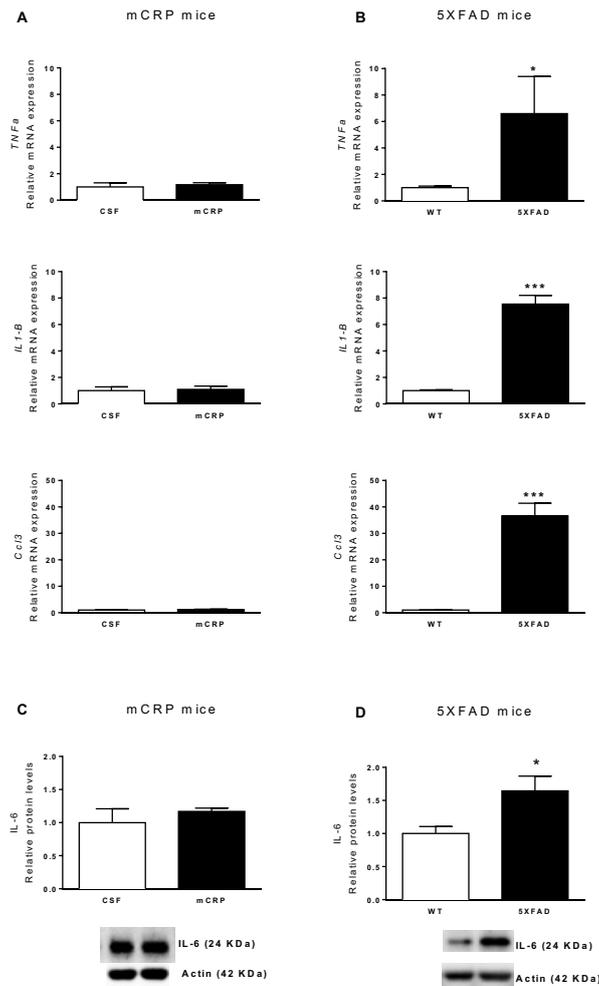


Figura 51. Representación gráfica de los niveles de expresión de los genes pro-inflamatorios: *Tnfa*, *Il1-B* y *Ccl3* y de los niveles de la proteína IL-6. (A) Se muestran los resultados de los niveles de expresión de mRNA en el hipocampo de ratones inyectados con CSF o mCRP y (B) para los ratones WT y 5XFAD. (C) Niveles de proteínas en el hipocampo de ratones inyectados con CSF y mCRP. (D) Niveles de proteínas para los ratones WT y 5XFAD. Las transferencias representativas de cada grupo experimental se muestran en el mismo orden que los valores del análisis densitométrico en los histogramas. Todos los datos se muestran como la media ± SEM (n=5-11) *p<0.05, *p<0.001 vs WT.**

3.2 El modelo de demencia por mCRP no reprodujo la gliosis encontrada en el modelo de EA.

Con el fin de estudiar si el tratamiento con mCRP inducía gliosis, se cuantificaron por RT-PCR los niveles de expresión de los genes: Quitinasa-like 3 (*Chil1*) un marcador de astroglia normalmente sobreexpresado en etapas preclínicas de la EA o tras lesiones cerebrales (Querol-Vilaseca et al., 2017). Y del Receptor de activación de células mieloides 2 (*Trem2*) sobreexpresado cerca de las placas amiloides en la EA con el fin de

suprimir la inflamación y promover la fagocitosis del péptido A β (Carmona et al., 2018; Jiang et al., 2013). Se analizaron mediante Western-Blot los niveles de GFAP, la proteína fibrilar acídica de la glía, una de las proteínas fibrosas que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto de células gliales, habitualmente sobreexpresada en la EA (Kamphuis et al., 2015).

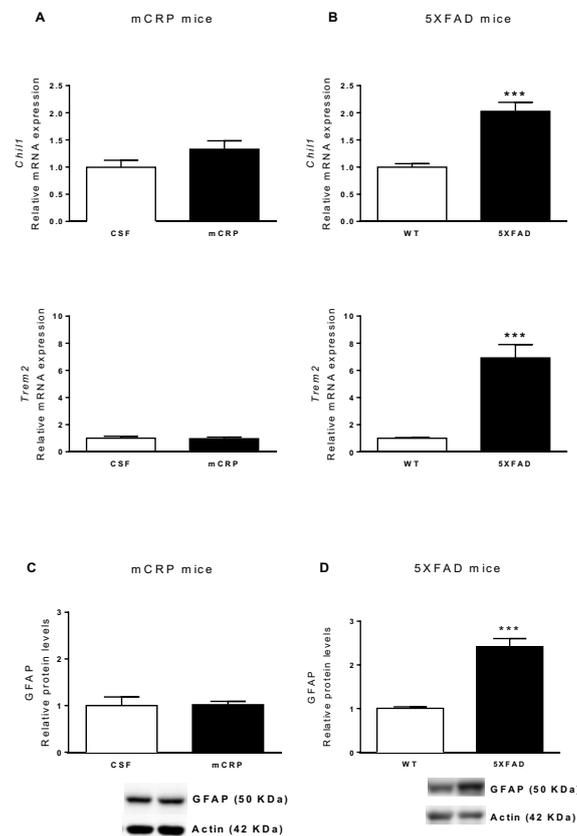


Figura 52.. Representación gráfica de los niveles de expresión de los genes y proteínas implicados en la gliosis: *Chill* y *Trem2* y GFAP. (A) Se muestran los resultados de los niveles de expresión de mRNA en el hipocampo de ratones inyectados con CSF o mCRP y **(B)** para los ratones WT y 5XFAD. **(C)** Niveles de proteínas en el hipocampo de ratones inyectados con CSF y mCRP. **(D)** Niveles de proteínas para los ratones WT y 5XFAD. Las transferencias representativas de cada grupo experimental se muestran en el mismo orden que los valores del análisis densitométrico en los histogramas. Todos los datos se muestran como la media \pm SEM (n=5-11) ***p<0.001 vs WT.

El tratamiento con mCRP, no alteró de manera significativa los niveles de expresión de los genes *Chill* ni *Trem2* (Fig. 52, A), ni aumentó de los niveles de la proteína GFAP (Fig. 52, C). Por el contrario, los ratones 5XFAD mostraron un aumento significativo en los niveles de expresión de los genes *Chil 1* [Test de Student, $t=4,813$ $df=18$, $p= 0,0001$ 5XFAD vs WT] y *Trem2* [Test de Student, $t=4,856$ $df=18$, $p= 0,0001$ 5XFAD vs WT] (Fig 52., B). Los niveles de la proteína GFAP también aumentaron significativamente

para los ratones 5XFAD respecto a los WT [Test de Student, $t=10,98$ $df=11$, $p=<0,0001$] 5XFAD vs WT (Fig 52., D) tal y como se ha descrito en este modelo de EA en el que la gliosis comienza alrededor de los 2 meses en paralelo con el depósito de placas amiloide (Oakley et al., 2006).

3.3 El tratamiento a 6 meses con mCRP no indujo estrés oxidativo, a diferencia del modelo de EA donde se vio aumentado.

Estudiamos si el tratamiento con mCRP inducía estrés oxidativo mediante la cuantificación de la expresión génica del glutatión peroxidasa 1 (*Gpx1*), implicada en procesos oxidativos, ya que en la EA suele haber una deficiencia del sistema antioxidante (Chen & Zhong, 2014). *Gpx1* es una de las enzimas citosólicas antioxidantes más comunes a nivel celular que suele aparecer sobreexpresada en el modelo 5XFAD como mecanismo compensatorio. El análisis de los niveles de expresión génica de *Gpx1* reveló que el tratamiento con mCRP no inducía cambios significativos respecto a los controles, CSF. (Fig. 53, A). Los niveles de expresión de este gen aumentaron significativamente en los ratones 5XFAD respecto a los WT [Test de Student, $t=2,127$ $df=18$, $p=0,0475$ 5XFAD vs WT] (Fig. 53, B).

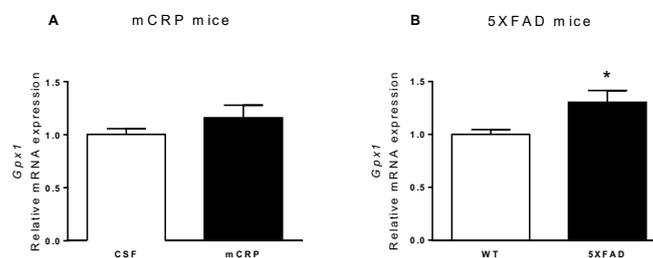


Figura 53. Representación gráfica de los niveles de expresión del gen implicado en procesos oxidativos: *Gpx1* (A) Se muestran los resultados de los niveles de expresión de mRNA en el hipocampo de ratones inyectados con CSF o mCRP y (B) para los ratones WT y 5XFAD. Todos los datos se muestran como la media \pm SEM (n=5-11) * $p<0.05$ vs WT.

3.4 El tratamiento con mCRP indujo cambios en la neuroplasticidad, similar al modelo de EA.

Para estudiar si el tratamiento a 6 meses con mCRP inducía cambios en procesos relacionados con la neuroplasticidad, se estudiaron los niveles de expresión génica de: El factor neurotrófico derivado del cerebro (*Bdnf*); normalmente disminuido en el deterioro cognitivo. Niveles bajos de *Bdnf* se correlacionan con la aparición de NFTs y

las placas amiloides de la EA, ya que actúa regulando la toxicidad inducida por A β *in vivo* e *in vitro* (Tanila, 2017).

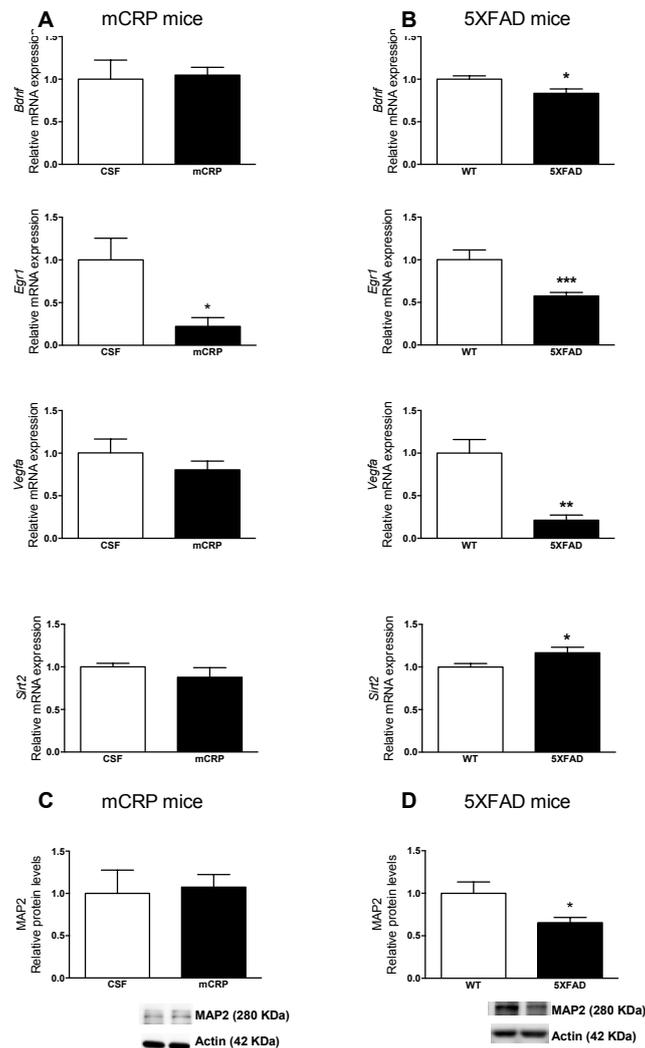


Figura 54. Representación gráfica de los niveles de expresión de los genes y proteínas implicados en procesos relacionados con la neuroplasticidad *Bdnf*, *Egr1*, *Vegfa*, *Sirt2* y MAP2. (A) Se muestran los resultados de los niveles de expresión de mRNA en el hipocampo de ratones inyectados con CSF o mCRP y (B) para los ratones WT y 5XFAD. (C) Niveles de proteínas en el hipocampo de ratones inyectados con CSF y mCRP. (D) Niveles de proteínas para los ratones WT y 5XFAD. Las transferencias representativas de cada grupo experimental se muestran en el mismo orden que los valores del análisis densitométrico en los histogramas. Todos los datos se muestran como la media \pm SEM (n=5-11) *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs WT.

La proteína de respuesta de crecimiento temprano 1 (*Egr1*). *Egr1* es un factor de transcripción relacionado con la plasticidad sináptica y la actividad neuronal cuya disminución, así como su sobreexpresión, se asocia a condiciones patológicas (Duclot & Kabbaj, 2017; Hu et al., 2019)

RESULTADOS

El factor de crecimiento endotelial vascular (*Vegfa*), ampliamente implicado en la angiogénesis y los procesos vasculares y normalmente alterado en la EA, ya que protege contra el deterioro cognitivo (Mahoney et al., 2019).

La Sirtuina 2 (*Sirt2*). *Sirt2* aparece sobreexpresada en los pacientes con EA correlacionándose con la desregulación de la macro-autofagia ya que actúa desacetilando la tubulina y aumentando, por lo tanto, la inestabilidad y la disociación de tau de los microtúbulos, favoreciendo su posterior hiperfosforilación en la Ser396 (Silva et al., 2017).

También se evaluaron los niveles de la proteína MAP2, presente en las dendritas neuronales, siendo un indicativo de la ramificación y la arborización neuronal. A mayores niveles de MAP2, mayor ramificación neuronal.

El análisis del tejido hipocampal reveló que, aunque mCRP no alteraba significativamente la expresión de *Bdnf*, *Vegfa*, *Sirt2* ni MAP2, sí que reducía significativamente la expresión de *Egr1* respecto a los controles CSF [Test de Student, $t=3,480$ $df=7$, $p= 0,0103$ mCRP vs CSF], afectando, por lo tanto, a la plasticidad sináptica. (Fig. 54). Lo mismo ocurrió al evaluar los niveles de expresión de *Egr1* para los ratones 5XFAD, cuya expresión también se vio significativamente disminuida [Test de Student, $t=4,112$, $df=18$, $p= 0,0007$ 5XFAD vs WT]. A diferencia de los animales tratados con mCRP donde sólo se encontró alterado *Egr1*, los 5XFAD mostraron alterados todos los marcadores utilizados para estudiar la neuroplasticidad. Así, se encontró alterada la expresión de *Bdnf*, [Test de Student, $t=2,536$ $df=14$, $p= 0,0237$ 5XFAD vs WT] *Vegfa* [Test de Student, $t=5,212$ $df=5$, $p= 0,0034$ 5XFAD vs WT] y la proteína MAP2 [Test de Student, $t=2,607$ $df=15$, $p=0,0198$ 5XFAD vs WT], que se vieron disminuidas. Por el contrario, *Sirt2*, [Test de Student, $t=2,189$ $df=14$, $p= 0,0460$ 5XFAD vs WT] (Fig. 54, B) apreció significativamente sobreexpresada, como era de esperar.

3.5 El modelo de demencia por mCRP no reprodujo los cambios del modelo de EA encontrados para la patología amiloide.

Con el fin de estudiar si la inyección de mCRP en el hipocampo provocaba, a 6 meses de tratamiento, alteraciones de los niveles de proteínas implicadas en la patología amiloide, como ocurre en el modelo de EA de 5XFAD.

Se analizaron los niveles de proteínas de: A β (clon 4G8), el péptido APP y su extremo C-terminal (CTF), así como de BACE 1. BACE-1 escinde APP en C99, que será escindida por la gamma-secretasa, produciendo el péptido A β . BACE-1 está, por lo tanto, implicada en la vía amiloidogénica apareciendo sobreexpresada en modelos de EA. Así, APP-CTF es el fragmento que se produce cuando la secretasa procesa la APP.

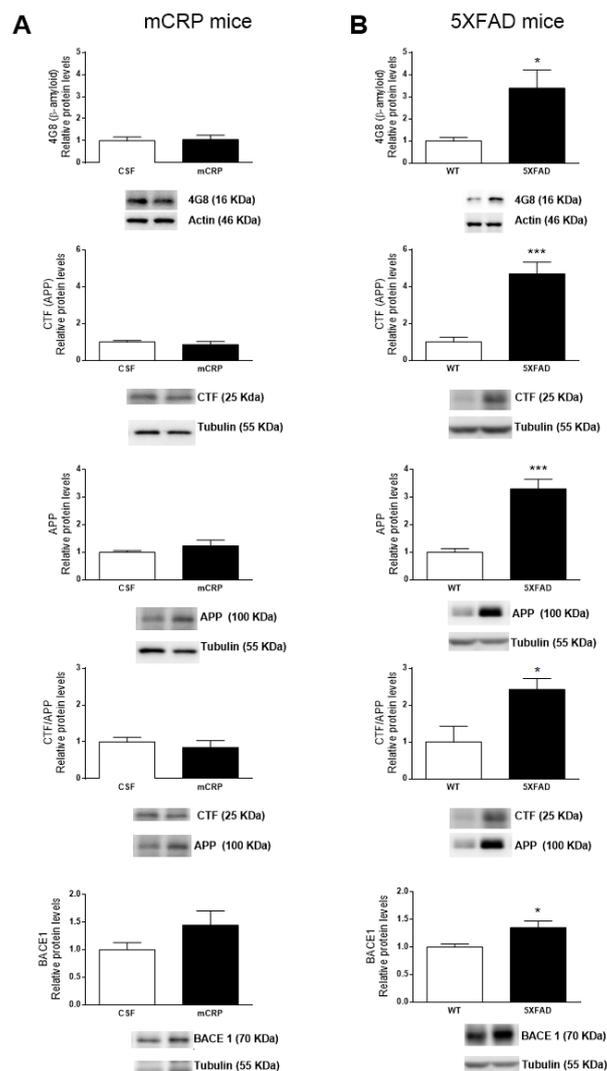


Figura 55. Representación gráfica de los niveles de proteínas implicadas en la patología amiloide: 4G8 (A β), CTF, APP, ratio CTF/APP y BACE 1. (A) Niveles de proteínas en el hipocampo de ratones inyectados con CSF y mCRP. (B) Niveles de proteínas para los ratones WT y 5XFAD. Las transferencias

RESULTADOS

representativas de cada grupo experimental se muestran en el mismo orden que los valores del análisis densitométrico en los histogramas. Todos los datos se muestran como la media \pm SEM (n=5-11) *p<0.05, ***p<0.001 vs WT.

A pesar de haber encontrado A β en el análisis histológico de los hipocampos de ratones inyectados con mCRP, no se detectaron cambios en los niveles de proteínas estudiadas para la patología amiloide, al analizar el hipocampo completo por Western-Blot, probablemente debido a la sensibilidad de la técnica para detectar cambios locales en el tejido. Por el contrario, los ratones 5XFAD mostraron un aumento significativo de los niveles de A β (4G8) [Test de Student, t=2,856 df=18, p= 0,0105 5XFAD vs WT], CTF [Test de Student, t=5,410 df=12, p=0,0002 5XFAD vs WT], APP [Test de Student, t=6,187 df=12, p< 0,0001 5XFAD vs WT], el ratio CTF/APP [Test de Student, t=2,877 df=8, p= 0,0206 5XFAD vs WT] y BACE 1 [Test de Student, t=2,805 df=11, p=0,0171 5XFAD vs WT], respecto a los animales WT, como era de esperar para este modelo de EA.

3.6 El tratamiento con mCRP durante 6 meses, indujo la hiperfosforilacion de tau, similar al modelo de EA.

Finalmente, se analizaron los niveles de la proteína tau hiperfosforilada mediante un anticuerpo dirigido a detectar la fosforilación de tau en la serina 396, comúnmente fosforilado en taupatías y en la EA (Tenreiro et al., 2014) También se analizaron los niveles totales de la proteína tau (HT7). Así, se estudió si la inyección con mCRP a 6 meses favorecía la hiperfosforilacion de tau, respecto a la tau total del tejido (ratio ser396/HT7). Lo mismo se analizó para los ratones 5XFAD. Los resultados obtenidos mediante Western-Blot revelaron que la deposición de mCRP en el tejido hipocampal durante 6 meses favorecía de manera significativa la hiperfosforilación de tau en el epítipo Ser396 [Test de Student, t=2,637 df=9, p=0,0310 mCRP vs CSF], así como un aumento del ratio de la tau hiperfosforilada (p-tau Ser396) respecto a los niveles de tau total (HT7) [Test de Student, t=2,731 df=6, p=0,0341 mCRP vs CSF]. Esta hiperfosforilación de tau también se encontró en los ratones 5XFAD, donde la tau fosforilada en la ser396 era significativamente mayor que en los WT [Test de Student, t=2,154 df=20, p=0,0436 5XFAD vs WT], así como la ratio entre la tau fosforilada y la tau total (ratio ser396/HT/) [Test de Student, t=2,548 df=14, p=0,0232 5XFAD vs WT]. La tau total del tejido hipocampal se mantuvo estable tanto para los ratones inyectados con mCRP como para los 5XFAD.

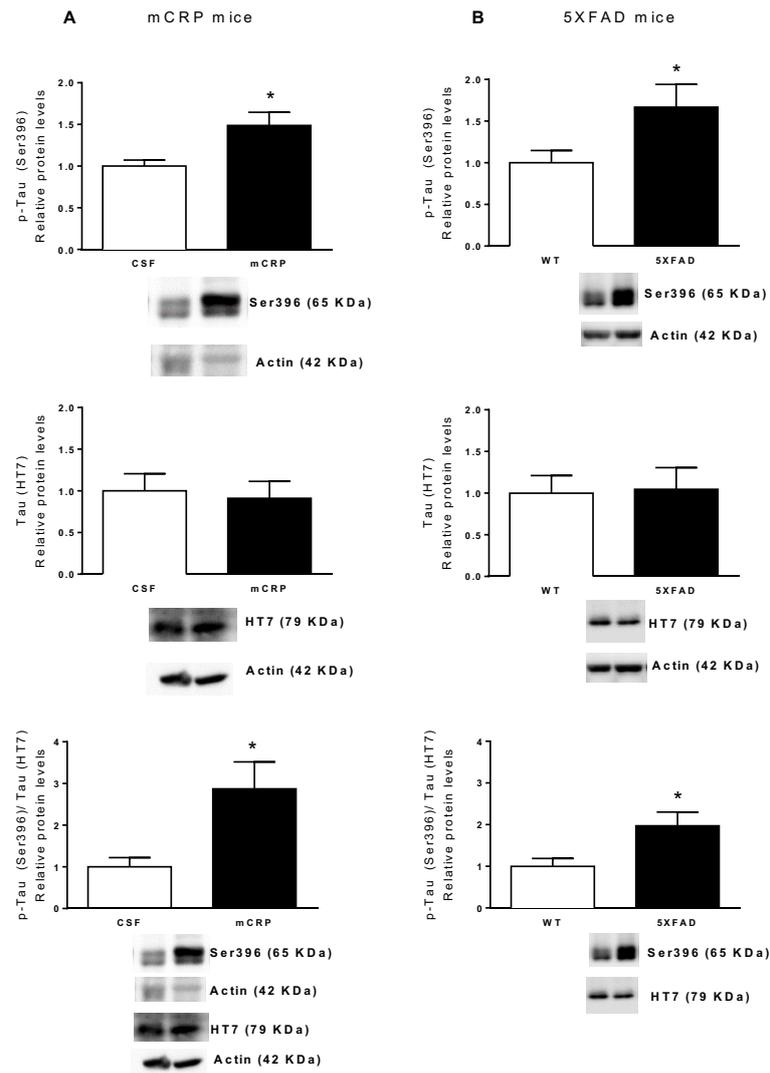


Figura 56. Representación gráfica de los procesos de hiperfosforilación producidos en la proteína tau. Se muestran los niveles de tau hiperfosforilada en la Ser 396, los niveles de tau total presentes en el tejido hipocámpal, y la ratio de tau hiperfosforilada respecto a la tau total. (A) Niveles de proteínas en el hipocampo de ratones inyectados con CSF y mCRP. (B) Niveles de proteínas para los ratones WT y 5XFAD. Las transferencias representativas de cada grupo experimental se muestran en el mismo orden que los valores del análisis densitométrico en los histogramas. Todos los datos se muestran como la media \pm SEM (n=5-11) *p<0.05, *p<0.001 vs WT.**

4. TERAPIA DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-mCRP EN EL MODELO DE DEMENCIA POR mCRP.

La finalidad de este capítulo consistió en evaluar si al inyectar un anticuerpo monoclonal (8C10) anti-mCRP, junto con mCRP, se podían bloquear los efectos neuropatológicos inducidos por mCRP, protegiendo así contra los BPSD y la pérdida cognitiva.

4.1 La inyección de mCRP y el anticuerpo 8C10 anti-mCRP, no alteraron el estado de salud sistémico de los ratones.

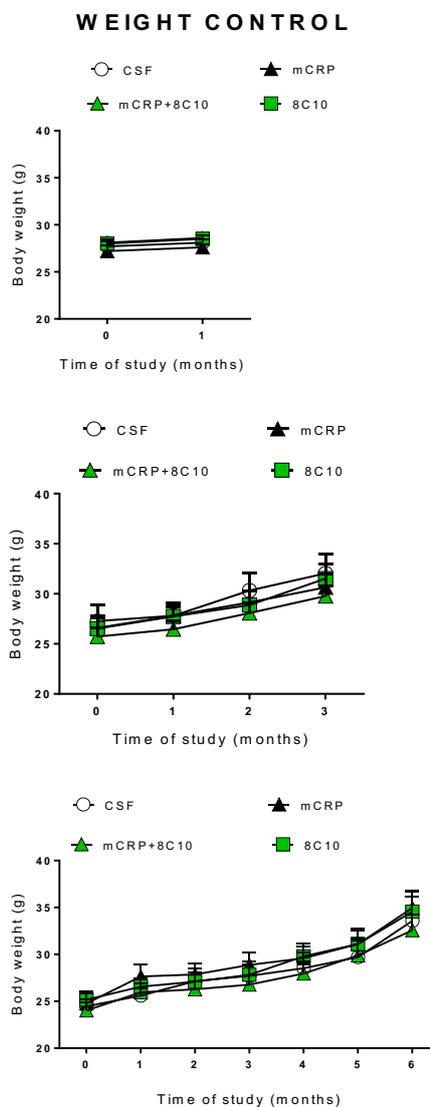


Figura 57. Control del peso corporal para los estudios de 1, 3 y 6 meses del tratamiento protector con el anticuerpo anti-mCRP, 8C10. Se muestra la progresión del peso corporal para los estudios de diferente duración y para los diferentes grupos experimentales utilizados en el estudio (CSF, mCRP; mCRP+8C10 y 8C10) Los valores se muestran como las medias \pm SEM (n= 8-12).

RESULTADOS

Todos los ratones incluidos en el estudio se inspeccionaron visualmente y se pesaron al comienzo y al final del tratamiento con el fin de controlar su estado de salud general. La terapia del anticuerpo 8C10 en el modelo de demencia por mCRP no indujo alteraciones en el peso de los animales. El peso corporal no cambió significativamente para ninguno de los grupos de tratamiento en el estudio de 1 mes, progresando de manera similar para todos los grupos de animales en los estudios de 3 y 6 meses de tratamiento (Fig. 57) [ANOVA de dos vías: efecto principal del tiempo de estudio; $F(3,116) = 9,959$, $P < 0,001$ y $F(6,203) = 17,79$, $P < 0,001$ para 3 y 6 meses con mCRP y 8C10 respectivamente].

La coordinación motora, la prensilidad y el equilibrio tampoco se vieron afectadas por el tratamiento, tal y como se muestra en el ensayo sensorimotor, donde no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales (Fig.58).

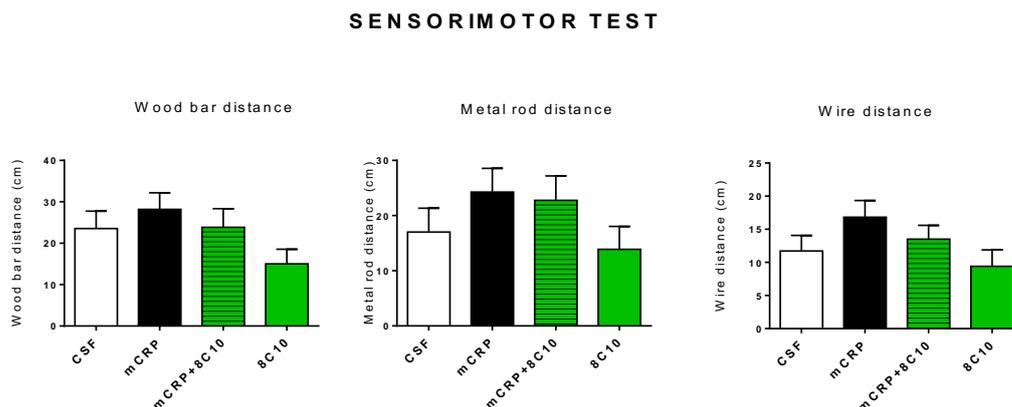


Figura 58. Habilidad sensoriomotora después de 6 meses de tratamientos con mCRP y 8C10. Se muestran las distancias recorridas en las diferentes pruebas del test sensorimotor; en la barra de madera, la barra de metal y el cable de metal. Los valores se muestran como las medias \pm SEM ($n = 8-12$).

4.2 El anticuerpo monoclonal anti-mCRP protegió contra la ansiedad y el estrés inducidos por mCRP a 6 meses de tratamiento.

Los tests no-cognitivos realizados para evaluar la protección del anticuerpo monoclonal 8C10 contra mCRP se presentan únicamente para el estudio 6 meses, tiempo al que se observaron BPSD en el modelo por mCRP previamente caracterizado.

Tal y como se observó al caracterizar el modelo de mCRP, no se detectaron alteraciones inducidas por mCRP para la neofobia (Fig. 59, A), la actividad exploratoria (Fig. 59, B)

y E), o la depresión (Fig. 59, D). El tratamiento protector con el anticuerpo monoclonal 8C10 tampoco indujo alteraciones en estos BPSD. La neofobia se evaluó en el Ensayo de las esquinas, donde se muestra el numero de esquinas visitadas (Fig. 59, A). La actividad exploratoria se analizó mediante el Ensayo de la tabla de cuatro agujeros de Boissier (Fig.59, B) donde se muestra la latencia de exploración de los 4 agujeros; y mediante el Ensayo de Campo abierto, donde se muestra la actividad vertical y horizontal (Fig. 59, E). La depresión se evaluó mediante el Ensayo de suspensión de la cola, donde se muestra el porcentaje de tiempo inmóvil (Fig. 59, D).

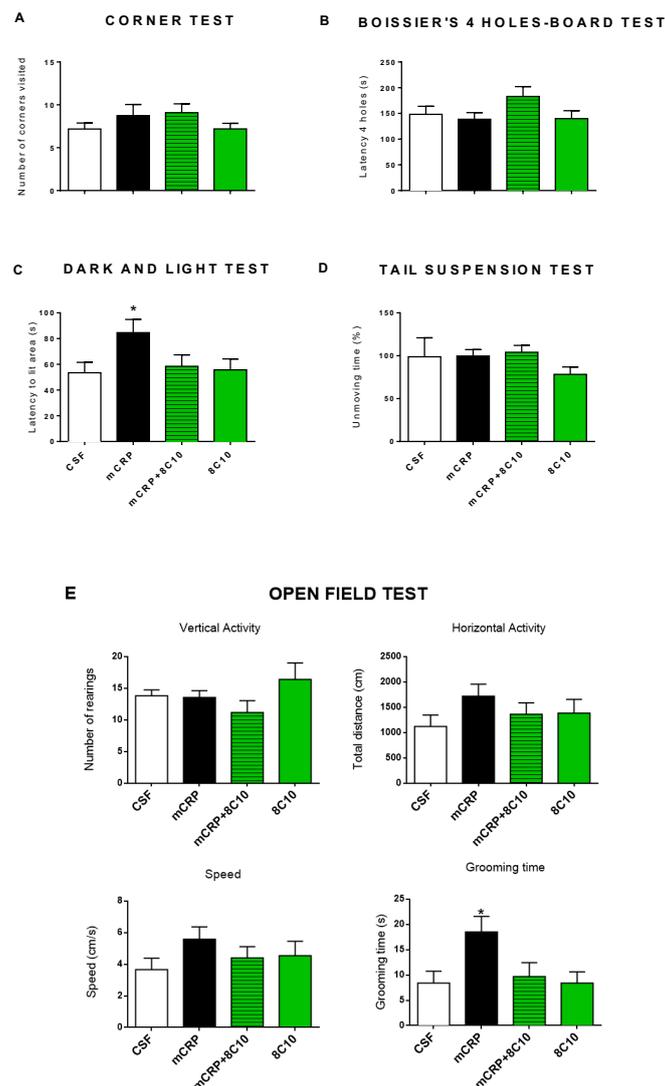


Figura 59. Resultados de evaluación de los BPSD. (A) Se muestra el numero de esquinas visitadas de los diferentes grupos experimentales para el ensayo de las esquinas (*Corner test*), (B) la latencia de exploración de los 4 agujeros en el ensayo de la tabla de cuatro agujeros de Boissier (*Boissier's 4 holes board*), (C) la latencia de entrada en la zona iluminada del Ensayo de la caja oscura/caja iluminada, (D) el porcentaje de tiempo inmóvil en el ensayo de suspensión de cola (*Tail suspension test*) y (E) la actividad

horizontal y vertical, la velocidad y el tiempo de grooming del Ensayo de campo abierto (*Open field test*) Los valores se muestran como las medias \pm SEM (N = 8-10). Estadísticas: *P <0,05 en comparación con el control, CSF.

Por el contrario, la inyección de mCRP en el hipocampo de ratones indujo síntomas de ansiedad y estrés a los 6 meses de tratamiento; observados como un aumento significativo de la latencia [ANOVA de una vía; $F(3, 40) = 3,349$, $P = 0,0283$] al entrar al área iluminada durante el Ensayo de la de caja oscura/caja iluminada (Fig. 59, C) y como un aumento significativo del tiempo *grooming* [$F(3, 40) = 3,499$, $P = 0,0240$] en el Ensayo del campo abierto (Fig. 59, E). Estos BPSD, relacionados con la ansiedad y el estrés no se observaron al realizar la inyección conjunta de mCRP con el anticuerpo 8C10, lo que indicó un efecto neuroprotector de 8C10 en lo referente a BPSD.

4.3 El anticuerpo monoclonal anti-mCRP protegió contra la pérdida de memoria espacial y de reconocimiento inducidas por mCRP a 1, 3 y 6 meses de tratamiento.

La inyección bilateral de mCRP en el hipocampo de ratones indujo la pérdida de memoria de reconocimiento a 1, 3 y 6 meses de edad, que fue revertida al tratar con el anticuerpo 8C10 junto con mCRP (Fig. 60). Así, en el NORT pudimos observar cómo, el grupo de ratones inyectados únicamente con mCRP no fue capaz de diferenciar un objeto nuevo frente a uno familiar, 2 horas y 24 horas después del entrenamiento (0h). Por el contrario, el grupo experimental tratado con mCRP más 8C10 realizó la prueba con índices de discriminación similares al grupo control (similares o superiores a 0,2), lo que indicó el reconocimiento de un objeto nuevo frente a uno familiar, 2 y 24 horas después del entrenamiento [ANOVA de una vía; Estudio de 1 mes $F(3,30) = 5,616$, $P = 0,004$ y $F(3,29) = 4,087$, $P = 0,016$, a las 2 h y 24 h de prueba respectivamente; Estudio de 3 meses $F(3,44) = 6,009$, $P = 0,002$, $F(3,44) = 4,680$, $P = 0,006$, a las 2 h y 24 h; y estudio de 6 meses $F(3,40) = 8,755$, $P <0,001$, $F(3,40) = 10,76$, $P <0,001$, a las 2 h y 24 h].

Para el análisis de la memoria espacial de los animales de este estudio se realizaron dos tests: El *Novel Object Location test* (OLT) y el Ensayo del laberinto acuático de Morris o *Morris Water Maze test* (MWM).

Aquí, los resultados del OLT mostraron la pérdida de la memoria espacial para los ratones inyectados con mCRP, que fue revertida en los ratones tratados con mCRP y el anticuerpo 8C10 (Fig. 61).

Los ratones tratados con mCRP durante 1 mes (Fig. 61) no discernieron entre el objeto que se mantuvo en la misma posición y un objeto relocalizado 2 h después del entrenamiento (0h) [ANOVA de una vía; $F(3, 29) = 4,139$, $P = 0,015$ en el estudio al mes; el factor ANOVA de una vía; no fue significativo en los estudios de 3 y 6 meses].

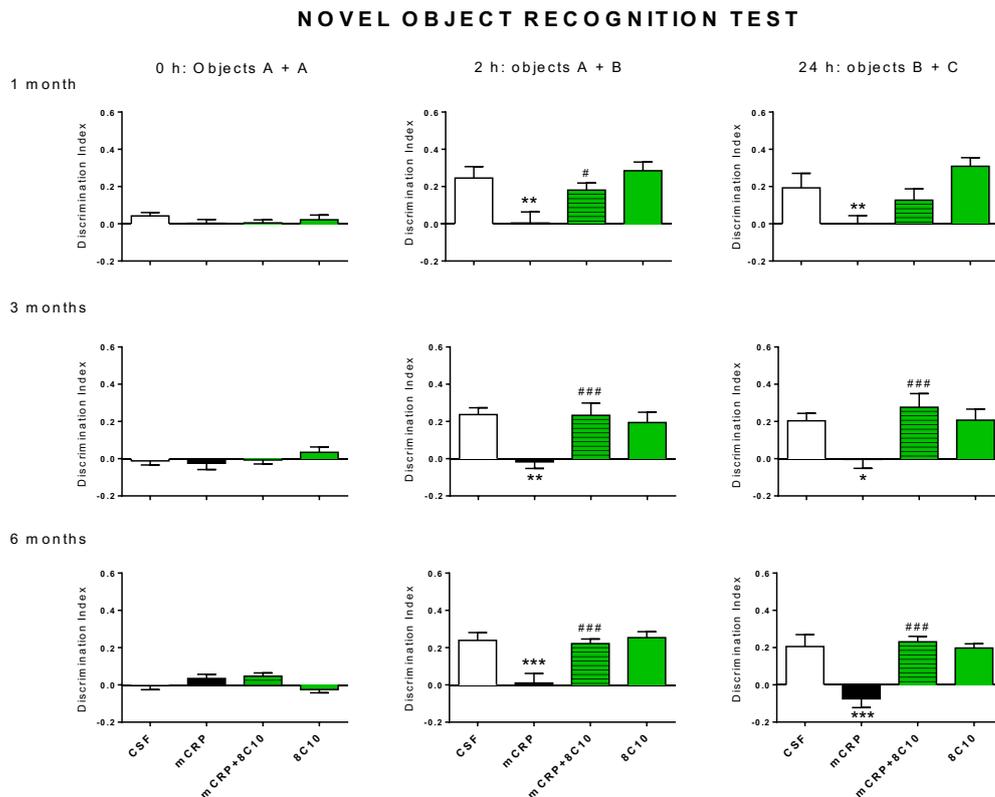


Figura 60. NORT. Ensayo de Reconocimiento de Objetos Nuevos (*Novel Object Recognition Test*) en los que se muestra el índice de discriminación de objetos para los diferentes grupos de animales en las diferentes fases del test; entrenamiento (0h), cambio de objeto 2 horas después del entrenamiento y cambio de objeto 24 horas después. Los índices de discriminación muestran la capacidad de los ratones para discernir entre el objeto con el que se familiarizan durante el entrenamiento y un objeto nuevo reemplazado 2 horas y 24 horas después del entrenamiento. Los valores se muestran como las medias \pm SEM (n= 8-12). Estadísticas: mCRP * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, en comparación con el grupo control; mCRP+8C10 # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$, en comparación con el grupo mCRP.

Por el contrario, el grupo experimental tratado con mCRP más 8C10 mostró índices de discriminación similares a los controles. Se observaron resultados similares después de

RESULTADOS

3 y 6 meses de tratamiento a pesar de la falta de significación. Aquí, los ratones inyectados con mCRP más el anticuerpo mostraron índices de discriminación $> 0,2$, similares a los controles, indicando la recuperación de la memoria espacial. Los animales tratados únicamente con mCRP mostraron índices de discriminación inferiores a $0,2$, indicando pérdida de la memoria espacial. (Fig. 61).

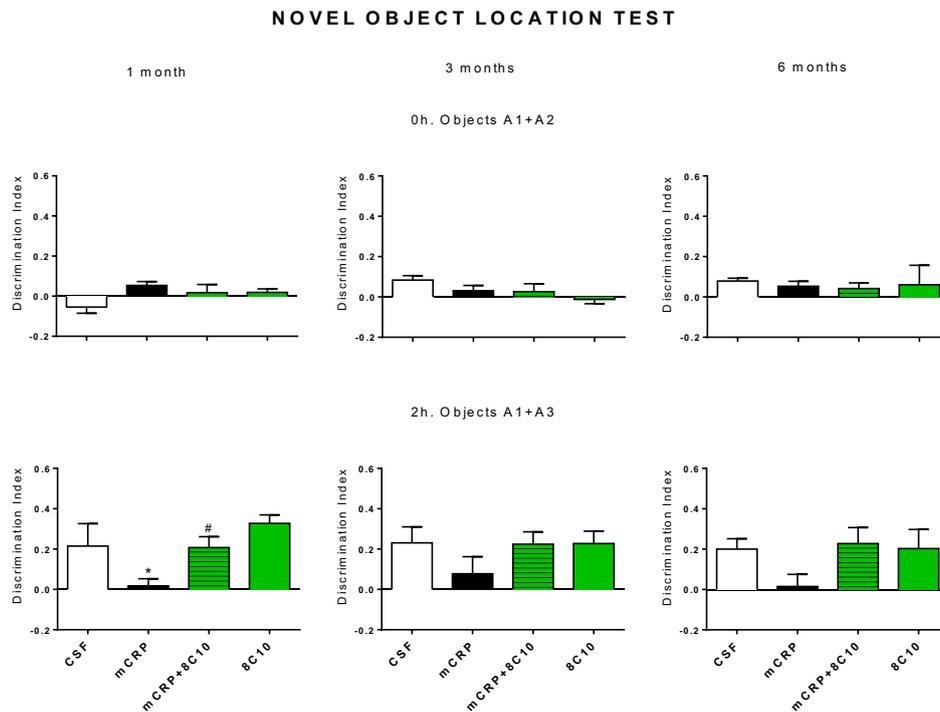


Figura 61. OLT. Ensayo de Nueva Ubicación de Objetos (*Novel Object Location Test*). Resultados de los índices de discriminación durante el entrenamiento y 2 horas después, cuando uno de los objetos fue relocalizado. Los índices de discriminación muestran la capacidad de los ratones para discernir entre el objeto que se mantiene en la posición inicial y el que cambiamos de posición. Se enseñan los resultados para los grupos CSF, mCRP, mCRP+8C10 y 8C10 a 3 y 6 meses de tratamiento. Los valores se muestran como las medias \pm SEM (n= 8-12). Estadísticas: mCRP * P $<0,05$ en comparación con el grupo control y mCRP+8C10 #P $<0,05$ en comparación con el grupo mCRP.

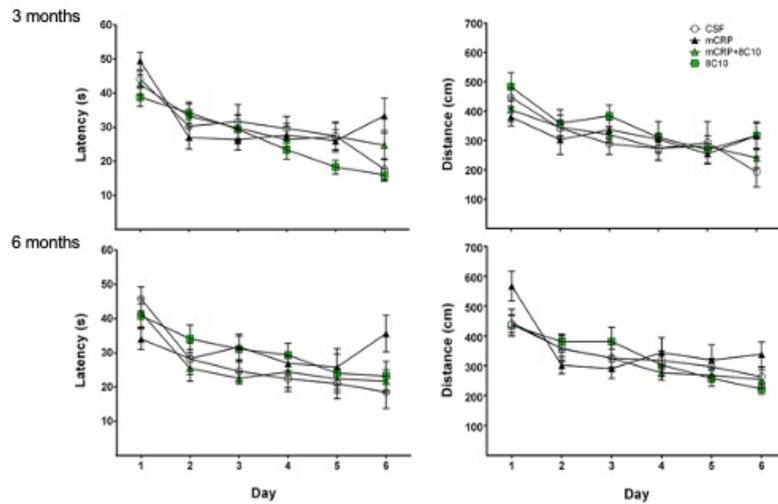
Con el fin de confirmar los efectos protectores de 8C10 para la memoria espacial a los 3 y 6 meses de tratamiento, se realizó la prueba MWM. Aquí se analizó la memoria espacial al quitar la plataforma de escape 6 días después del entrenamiento (Fig. 62), con el fin de estudiar si los ratones nadaban más en el cuadrante donde se situaba la plataforma. Es decir, si recordaban el cuadrante de escape de la piscina.

El análisis de las curvas de adquisición (Fig. 62, A), tanto del tiempo de latencia como la distancia de nado a la plataforma de escape, no mostró diferencias estadísticas entre

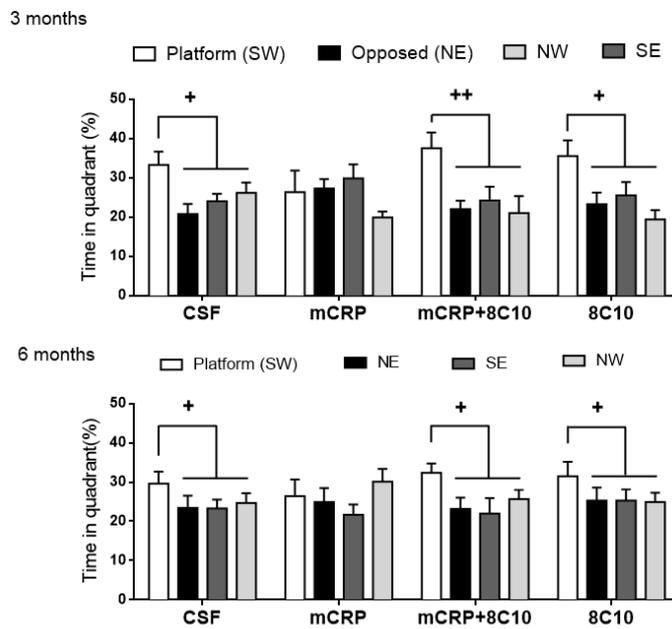
los grupos analizados mediante ANOVA de medidas repetidas, revelando cierta preservación de la memoria durante el aprendizaje, probablemente debido al entrenamiento intenso de 5 ensayos por día durante 6 días.

MORRIS WATER MAZE TEST

A Training Acquisition



B Probe trial-Percentage of time in each quadrant



C Probe trial-Representative tracks of each experimental group

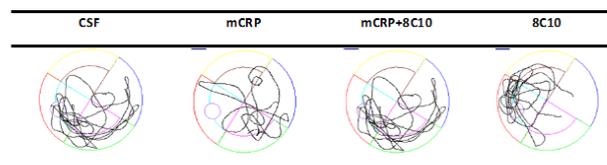


Figura 62. MWM. Resultados del Ensayo del laberinto acuático de Morris (Morris Water Maze test) (A) Adquisición de aprendizaje durante los 6 días de entrenamiento en la prueba Morris Water Maze después de 3 y 6 meses de tratamientos mCRP y 8C10. ANOVA mostró un efecto del día ($P < 0,001$) para todos los parámetros. (B) Se muestran los resultados para cada grupo experimental en la prueba de retención de memoria del MWM, en la que los ratones nadan por la piscina en busca de la plataforma de escape, tras retirar la plataforma oculta con la que han realizado el entrenamiento los días de adquisición del test. Se muestra el porcentaje del tiempo de nado en cada cuadrante para cada grupo experimental. Siendo el cuadrante SW en el que se situó la plataforma de escape durante los días de adquisición del aprendizaje. (C) Se muestran recorridos de nado representativos para cada grupo de animales durante la prueba de retención de memoria, obtenidos mediante programa Panlab Smart 3. Todos los valores se muestran como las medias \pm SEM ($n = 8-12$). Estadísticas: + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$, cuadrante plataforma comparado con el promedio de los otros cuadrantes.

Sin embargo, los resultados de la prueba de MWM al retirar la plataforma de escape para los estudios de 3 y 6 meses (Fig. 62, B y C), mostraron una pérdida de la memoria espacial para el grupo tratado con mCRP. El grupo tratado con mCRP más el anticuerpo 8C10, por el contrario, mostró una preservación total de la memoria [ANOVA de dos vías; efecto del porcentaje de tiempo nadado en cada cuadrante de la piscina durante la prueba de la sonda $F(3,149) = 3,779$ $P = 0,0119$ y $F(3,164) = 9,596$, $P < 0,001$ para el tratamiento de 3 meses y 6 meses respectivamente].

Así, los ratones del grupo de mCRP pasaron un tiempo aleatorio (alrededor del 25%) nadando en el cuadrante de la piscina donde se encontraba la plataforma de escape durante el entrenamiento de adquisición. Sin embargo, los ratones tratados con mCRP+8C10 mostraron una clara preferencia por nadar en el área del cuadrante donde se situaba la plataforma escondida durante la adquisición, lo que sugiere una memoria espacial preservada después de 24 h de entrenamiento. Finalmente, el grupo tratado sólo con 8C10 se comportó de manera similar al grupo de control (CSF) en esta y todas las pruebas conductuales y cognitivas anteriores.

4.4 El anticuerpo monoclonal 8C10 inhibió la hiperfosforilación de tau a los 6 meses de tratamiento.

Tras la caracterización molecular del modelo de mCRP, se analizó si el anticuerpo anti-mCRP inhibía las alteraciones encontradas respecto a la hiperfosforilación de la proteína tau y la disminución de la expresión del gen *Egr1* en el tejido hipocampal de 6 meses de tratamiento.

El análisis por Western-Blot del tejido hipocampal de los ratones tratados con mCRP mostró una hiperfosforilación de tau al analizar dos anticuerpos dirigidos a diferentes epítomos de tau asociados a la detección de la proteína tau patológica en la EA.

Los anticuerpos Ser202 / Thr305 (clon AT8) (Fig. 63, C) y p-tau Ser396 (Fig.63, D) mostraron un aumento aproximadamente dos veces superior de p-tau para el tejido hipocampal de ratones inyectados con mCRP respecto a la tau total (clon HT7). Por el contrario, el hipocampo de los ratones tratados con mCRP y 8C10 mostró niveles de p-tau y tau total similares a los controles. [ANOVA de una vía; $F(3,22) = 3,667$, $P = 0,028$ y $F(3,26) = 4,206$, $P = 0,015$ para las relaciones AT8 / HT7 y S396 / HT7, respectivamente]. El tratamiento con el anticuerpo 8C10 no interfirió con los niveles de p-tau, similar a los controles.

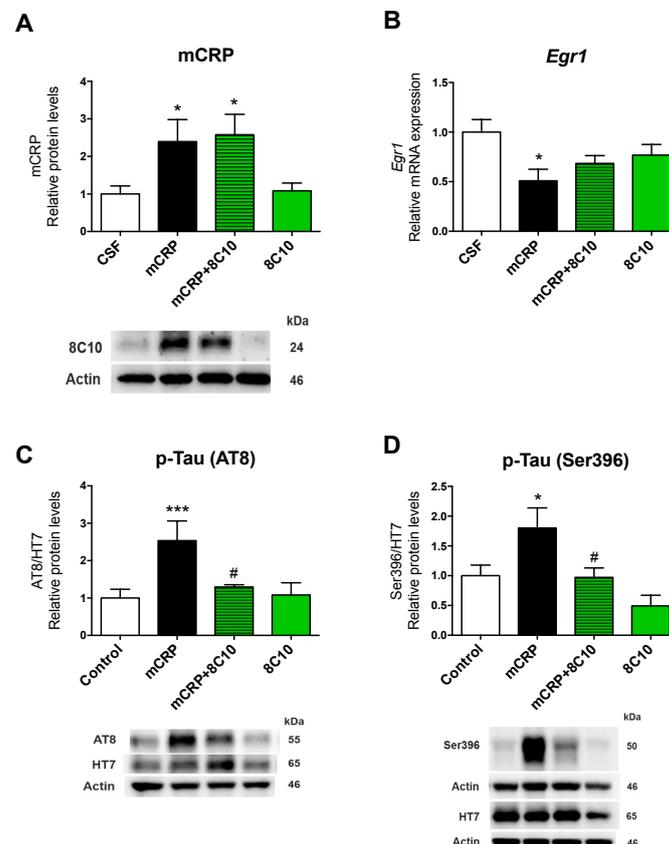


Figura 63: Análisis de la expresión génica y los niveles de proteínas del tejido hipocampal tratado durante 6 meses. (A) Se muestran los resultados de los niveles de proteína mCRP para cada grupo experimental. (B) Se muestran los niveles de expresión génica de *Egr1* para cada grupo experimental. (C) Se muestran las ratios de los niveles de tau hiperfosforilada en la Ser396 y en Ser202 / Thr305 (clon AT8) respecto a los niveles de tau total presentes en el tejido hipocampal. Los valores se enseñan como las medias \pm SEM (N = 5-10). Las transferencias representativas de cada grupo experimental se muestran en

RESULTADOS

el mismo orden que los valores del análisis densitométrico en los histogramas. Estadísticas: mCRP * P <0,05, *** P <0,001 en comparación con el grupo de control; mCRP+8C10 #P <0.05, ## P <0.01 comparado con el grupo mCRP. Los valores son medias \pm SEM (n= 5-8).

Asimismo, los resultados de Western-Blot confirmaron la presencia de mCRP en el tejido 6 meses después de la inyección (Fig. 63, A) [ANOVA de una vía; F (3,18) = 3,288, P = 0,045]. De igual manera, mCRP también se mostró significativamente presente en el tejido hipocampal de los animales que habían sido inyectados con mCRP + 8C10 frente a los niveles en el margen de detección de los animales control. Las proteínas se desnaturalizaron durante el procedimiento de transferencia Western; por lo tanto, se destruyó la unión previa de mCRP con 8C10, lo que permitió la detección de anticuerpos contra 8C10 nuevos.

Finalmente, se confirmó una disminución en la expresión génica de *Egr1* (Fig. 63, B) para el tratamiento con mCRP [ANOVA de una vía; F (3, 17) = 3,525, P = 0,0376]. Los ratones tratados con el anticuerpo monoclonal junto con mCRP mostraron resultados similares al grupo control, CSF, indicando una protección parcial respecto a la disminución de la expresión de este gen inducida por mCRP

5. EVALUACIÓN DE LA ACCIÓN NEUROPROTECTORA DEL AGENTE ANTI-INFLAMATORIO TPPU COMO TERAPIA CONTRA mCRP

La finalidad de este capítulo consistió en evaluar, en el modelo *in vivo* de mCRP y en el modelo *in vitro* de la línea celular murina de microglía BV2, si el agente antiinflamatorio TPPU, un inhibidor del enzima epóxido hidrolasa que favorece la acumulación de los EETs, podía proteger contra los efectos neuroinflamatorios inducidos por mCRP.

5.1 El tratamiento con TPPU no alteró el estado de salud sistémico ni el comportamiento general del modelo *in vivo* por mCRP.

Todos los ratones incluidos en el estudio se inspeccionaron visualmente y se pesaron al comienzo y al final del tratamiento con el fin de controlar su estado de salud general. El peso corporal de los animales no cambió significativamente para ninguno de los grupos de tratamiento en el estudio de 1 mes al evaluar la protección por TPPU (Fig. 64, A). Tampoco se observó deterioro físico de los animales.

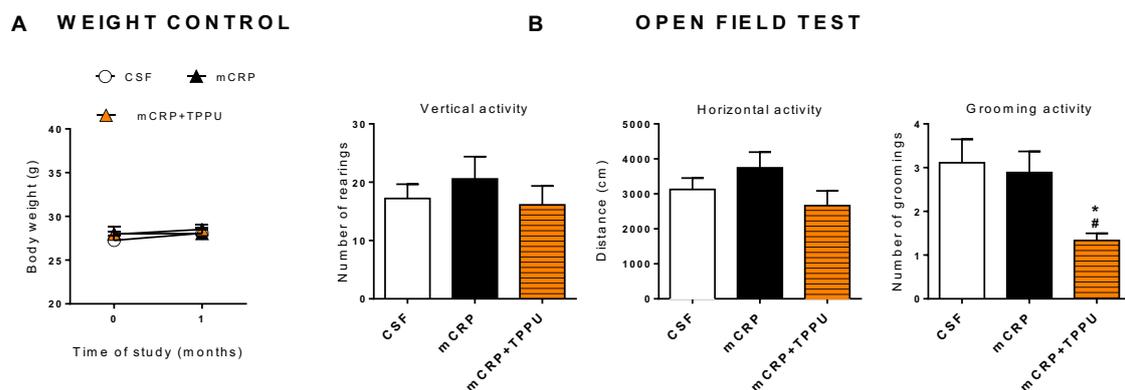


Figura 64. Control del peso para los animales empleados en el estudio y resultados del Ensayo de Campo Abierto (*Open field test*) del modelo de mCRP tratado con TPPU durante 1 mes. (A) Se muestran los pesos de los animales al principio y al final del estudio. (B) Se muestra la actividad vertical, la horizontal y la actividad de *grooming* para todos los grupos experimentales. Los valores se muestran como las medias \pm SEM ($n = 8-10$). Estadísticas: * $P < 0,05$ en comparación con el grupo control; # $P < 0,05$ en comparación con el grupo mCRP.

Tal y como revelaron los resultados del Ensayo de campo abierto, el tratamiento con mCRP no indujo diferencias significativas en la actividad exploratoria de los animales (*Vertical and Horizontal activity*) (Fig x) ni en el estrés (*grooming activity*). Por el contrario, el los animales tratados con TPPU, a pesar de no mostrar alterada la actividad exploratoria sí que mostraron una disminución significativa en la actividad de

grooming, realizando un número menor de *groomings* respecto a los controles y a los ratones inyectados con mCRP [ANOVA de una vía: $F(2, 24) = 5,095$, $P = 0,0143$ para la diferencia entre tratamientos.]

5.3 El agente TPPU protegió contra la pérdida de memoria espacial y de reconocimiento inducidas por mCRP durante 1 mes de tratamiento.

Con el fin de evaluar si el compuesto TPPU podía inducir una mejora cognitiva mediante sus efectos anti-inflamatorios en el modelo previamente caracterizado de mCRP, se realizaron los test del NORT y del OLT. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

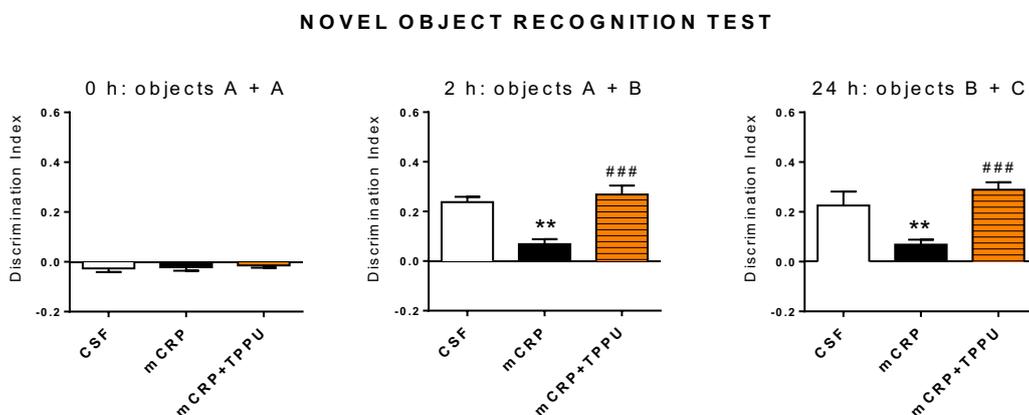


Figura 65. Resultados del Novel Object Recognition test (NORT). Se muestran los índices de discriminación del NORT para los ratones controles (CSF), mCRP y mCRP+TPPU durante el entrenamiento y al sustituir un objeto familiar por uno nuevo 2 horas y 24 horas después del mismo. Los valores se muestran como las medias \pm SEM ($n = 8-10$). Estadísticas: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, en comparación con el grupo de control; # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ en comparación con el grupo mCRP.

El compuesto antiinflamatorio TPPU mostró un efecto protector contra la pérdida de memoria de reconocimiento inducida por mCRP analizada mediante el NORT 1 mes después del tratamiento (Fig. 65) [ANOVA de una vía; $F(2,24) = 16,48$, $P < 0,0001$ y $F(2, 24) = 8,613$, $P = 0,0015$, a las 2 h y 24 h respectivamente]. Así, mientras que los ratones inyectados con mCRP no eran capaces de diferenciar un objeto nuevo de uno familiar 2 horas después de la primera exploración, ni 24 horas más tarde, los ratones tratados con TPPU, diferenciaron significativamente cuáles eran los objetos nuevos que habían reemplazado a los que les eran familiares, 2h y 24 horas después del entrenamiento.

El TPPU protegió contra la pérdida de memoria espacial inducida por mCRP a 1 mes de tratamiento como observamos mediante el test OLT (Fig. 66). Así, los ratones inyectados con mCRP y tratados con TPPU durante 1 mes, fueron capaces de reconocer el objeto reubicado de aquel cuya posición se mantuvo intacta, 2 h después de la exploración previa (entrenamiento). El índice de discriminación de los animales inyectados con mCRP y tratados oralmente con TPPU fue significativamente mayor que el de los animales tratados únicamente con mCRP, que no pudieron discriminar entre el objeto reubicado y el que se mantuvo en la misma posición [ANOVA de una vía: $F(2, 24) = 28,14, P < 0,001$].

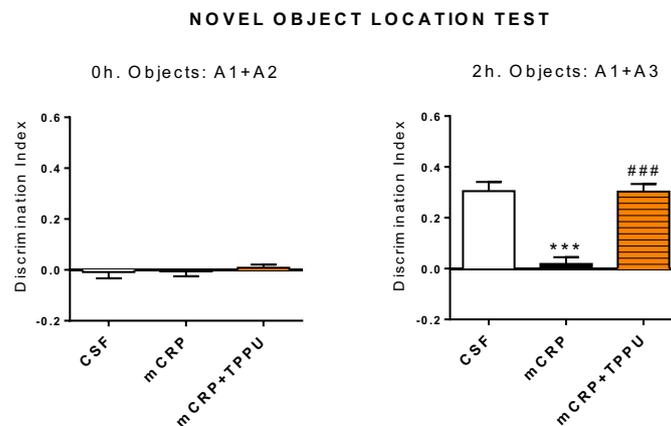


Figura 66. Resultados del Object Location test (OLT). Se muestran los índices de discriminación del OLT para los ratones controles (CSF), mCRP y mCRP+TPPU durante el entrenamiento y al relocalizar un objeto del entrenamiento dos horas después del mismo. Los valores se muestran como las medias ± SEM (n= 8-10). Estadísticas: *** $P < 0,001$, en comparación con el grupo de control; ### $P < 0,001$ en comparación con el grupo mCRP.

5.4 Determinación de la concentración de tratamiento del TPPU en la línea celular BV2.

Con el fin de estudiar la expresión a nivel endógeno de sEH en la línea celular de trabajo (células microgliales BV2), se evaluó mediante Western-Blot la presencia de la proteína, así como su expresión al tratar con TPPU. La expresión de sEH ya está descrita en células gliales, pero principalmente en oligodendrocitos y astrocitos (Sura et al., 2008). Nuestros resultados revelaron que la proteína sEH se encontraba de manera endógena en la línea celular murina BV2 y que el tratamiento con TPPU no inducía cambios significativos en su expresión (Fig 67, A).

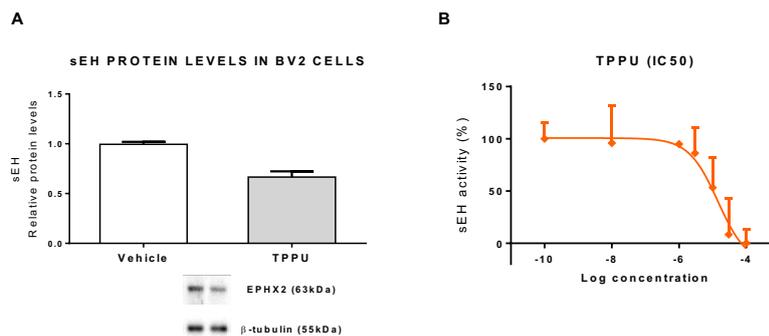


Figura 67. Niveles de proteína sEH en las células BV2 al tratar con TPPU y acción del TPPU para inhibir la actividad del enzima sEH. (A) Se muestran los resultados de los niveles de la proteína sEH en la línea celular BV2 al tratar con vehículo y con TPPU. Las transferencias representativas de cada grupo experimental se muestran en el mismo orden que los valores del análisis densitométrico en los histogramas. (n=4). **(B)** Se muestran los porcentajes de la actividad de sEH en las células BV2 al tratar con TPPU.

Tras probar la expresión de sEH en nuestra línea celular y, por lo tanto, la adecuación de esta línea para los tratamientos de nuestro estudio; se evaluó la actividad inhibidora de sEH del TPPU. Nuestros resultados revelaron que el agente TPPU inhibió totalmente la actividad del enzima sEH a la concentración logarítmica de -4 (Fig. 67, B), es decir a concentraciones por debajo de 100 μ M. El IC50 (Valor: 14,27 μ M, límites de confianza (2-101,7) se encontró en el rango entre 1-100 μ M, siendo este, el rango de concentraciones a utilizar para los tratamientos.

5.5 El agente TPPU inhibió la actividad inflamatoria inducida por el LPS.

El agente TPPU inhibió de manera significativa los niveles de óxido nítrico liberado por las células microgliales BV2 en respuesta al LPS. También disminuyó significativamente los niveles de iNOS (Óxido nítrico sintasa) y de la forma proinflamatoria de la interleuina IL-1 β , cuyos niveles aumentaron en respuesta al tratamiento con LPS.

Se realizó un análisis de la liberación de NO₂ mediante el ensayo de Griess, en el que se midieron los nitritos resultantes del óxido nítrico liberado por las células BV2. Se utilizó LPS como un agente típico para inducir inflamación y así poder evaluar la acción antiinflamatoria del TPPU a diferentes concentraciones. Se observó un aumento significativo de los nitritos al tratar con LPS 0,1 μ g / ml en comparación con los valores

basales en las células tratadas con el vehículo. El incremento de nitritos inducido por el LPS se redujo significativamente a tratar con TPPU tanto a 50 como a 100 μM [ANOVA de dos vías: Efecto del TPPU $F(2,87) = 18,80$, $P < 0.001$, efecto del LPS y efecto de la interacción entre los dos factores: $P < 0,001$] El análisis de nitritos se realizó a las 24 horas después del tratamiento.

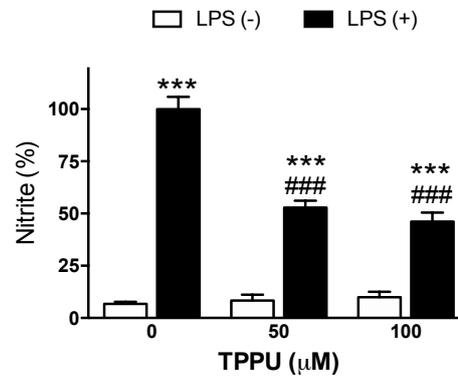


Figura 67. Análisis de nitritos detectados en las células BV2 tratadas con TPPU a diferentes concentraciones después de inducir inflamación con LPS. Los valores se muestran como las medias \pm SEM ($n=22-26$). *** $p < 0,001$ en comparación con el control y ### $P < 0.001$ en comparación con LPS (+).

Con el fin de elucidar los posibles mecanismos por los que el TPPU ejerza su acción antiinflamatoria, se evaluaron los niveles de proteínas de iNOS e IL-1 β , al tratar la línea celular BV2 con el agente pro-inflamatorio de referencia LPS a 0,1 $\mu\text{g} / \text{ml}$ y con TPPU a 100 μM . Así, los tratamientos fueron; con (+) y sin (-) LPS y con y sin TPPU. Todos los tratamientos se incubaron durante 24 horas.

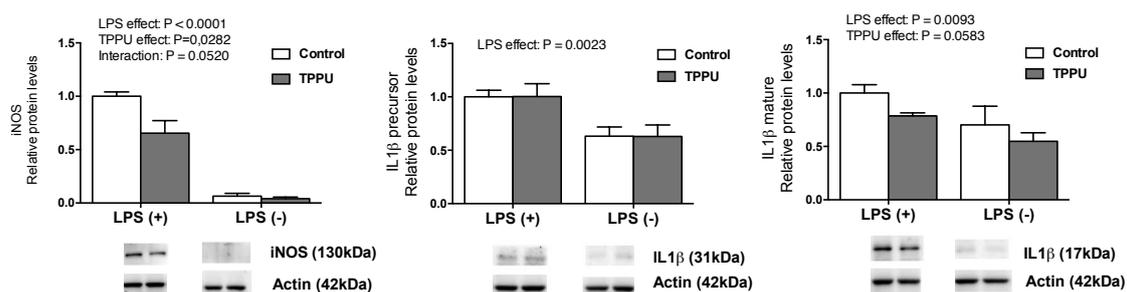


Figura 68. Cuantificación del nivel de proteínas relativo de iNOS e IL-1 β (maduro y precursor) en las células BV2 tratadas con TPPU después de inducir inflamación por LPS. Se aplicaron los tratamientos de LPS (0,1 $\mu\text{g} / \text{ml}$) y TPPU (100 μM). Las transferencias representativas de cada grupo experimental se muestran en el mismo orden que los valores del análisis densitométrico en los histogramas. Los resultados se muestran como las medias \pm SEM ($n=6-12$). Se especifican los efectos de los factores de ANOVA (LPS y TPPU) en el gráfico al no encontrar interacción mediante el análisis estadístico.

Los niveles de proteína iNOS, implicada en la generación de óxido nítrico como respuesta de activación microglial, aumentaron significativamente al tratar con LPS, (LPS(+)), respecto a la ausencia de tratamiento con LPS (LPS(-)), tal como esperábamos. El TPPU indujo una disminución significativa de los niveles de iNOS en el tratamiento LPS (+) [ANOVA de dos vías; Interacción: $F(1, 16) = 4,407$, $P = 0,0520$, LPS (+/-): $F(1, 16) = 102,6$, $P < 0,0001$; Tratamiento TPPU: $F(1, 16) = 5,823$, $P = 0,0282$].

Se evaluaron los niveles de proteínas de la forma precursora y la forma madura de IL-1 β . La forma madura de la interleuquina aparece mediante la escisión de la forma precursora por la caspasa citosólica 1, conformando la forma activa y pro-inflamatoria de la interleuquina. El tratamiento con LPS indujo de manera significativa un aumento en los niveles de ambas formas de la proteína IL-1 β [ANOVA de dos vías; LPS (+/-): $F(1, 16) = 13,05$, $P = 0,0023$ para la forma precursora y LPS (+/-): $F(1, 16) = 8,744$, $P = 0,0093$ para la forma madura]. El tratamiento con TPPU disminuyó de manera casi significativa ($P = 0,0583$) los niveles de IL-1 β madura en las células tratadas con LPS [ANOVA de dos vías. Interacción: $F(1, 16) = 0,1137$, $P = 0,7404$, Tratamiento TPPU: $F(1, 16) = 4,160$, $P = 0,0583$].

5.5 mCRP indujo inflamación en las células BV2 que fue inhibida por el TPPU

mCRP indujo inflamación en la microglía, favoreciendo la liberación de óxido nítrico y el aumento de los niveles de las proteínas iNOS e IL-1 β . CRP no favoreció la inflamación en la línea celular microglial. El agente TPPU, redujo la inflamación inducida por mCRP en las células BV2 inhibiendo la generación de óxido nítrico al regular la actividad de iNOS.

Estudios previos revelaron la actividad proinflamatoria de mCRP para activar monocitos (M. Slevin et al., 2015) Así, evaluamos la capacidad tanto de CRP como de mCRP para activar la microglía, con el fin de confirmar que mCRP es la forma activa y proinflamatoria de esta proteína y no el pentámero CRP. Se utilizaron diferentes concentraciones de mCRP y CRP para los tratamientos (1, 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$). Los nitritos se analizaron 24 horas después de tratar.

Nuestros resultados revelaron que mCRP aumentaba significativamente los niveles de nitritos al tratar a 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,0001$). CRP no mostró diferencias significativas respecto al control a ninguna de las concentraciones estudiadas. La inflamación inducida por mCRP también fue atenuada significativamente al tratar con TPPU a 100 μM en los tratamientos con mCRP tanto a 10 $\mu\text{g/ml}$, como a mCRP 100 $\mu\text{g/ml}$, restableciendo los niveles de nitritos en mCRP a la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ (no mostrando diferencias significativas respecto al control) y parcialmente en mCRP a la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ [ANOVA de dos vías: (Interacción [F (6,188) = 5,065; $p < 0,0001$]; TPPU [F (1,188) = 16,76; $p < 0,0001$]; mCRP / CRP [F (6,188) = 26,48; $p < 0,0001$]) (Fig. 68).

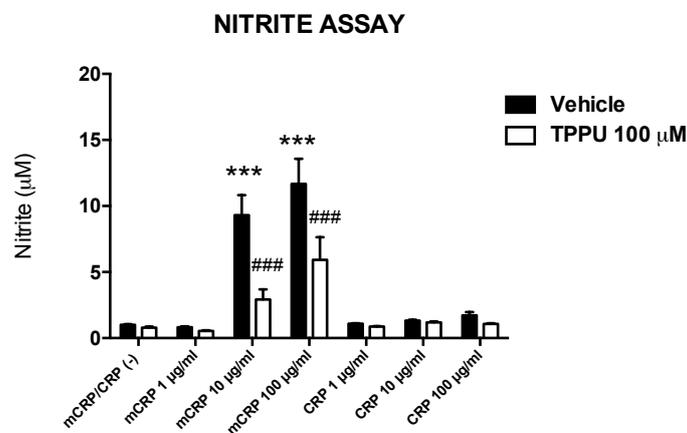


Figura 68. Análisis de nitritos mediante el ensayo de Griess para los tratamientos con CRP y mCRP a diferentes concentraciones y TPPU en la línea celular BV2. Análisis de nitritos de la respuesta inflamatoria de las células BV2. Se agregaron diferentes concentraciones de mCRP (1,10 y 100 $\mu\text{g/ml}$). Todas las condiciones también se trataron con TPPU 100 μM . Los resultados se muestran como las medias \pm SEM. *** $p < 0,0001$ en comparación con el vehículo (control) y ### $p < 0,0001$ en comparación con mCRP.

Con el fin de confirmar la actividad inflamatoria inducida por mCRP, así como las vías inflamatorias implicadas, se analizaron los niveles de proteínas iNOS, e IL-1 β (precursora y madura) al tratar con mCRP. Aquí, mCRP indujo un aumento significativo de los niveles de iNOS [Test de Student $t=2,206$ $df=13$, $p= 0,0460$ mCRP vs Control] y de los niveles de IL-1 β tanto en su forma precursora [Test de Student $t=2,387$ $df=24$, $p= < 0,0001$ mCRP vs Control] como madura [Test de Student $t=6,237$ $df=31$, $p= < 0,0001$ mCRP vs Control] (Fig. 69).

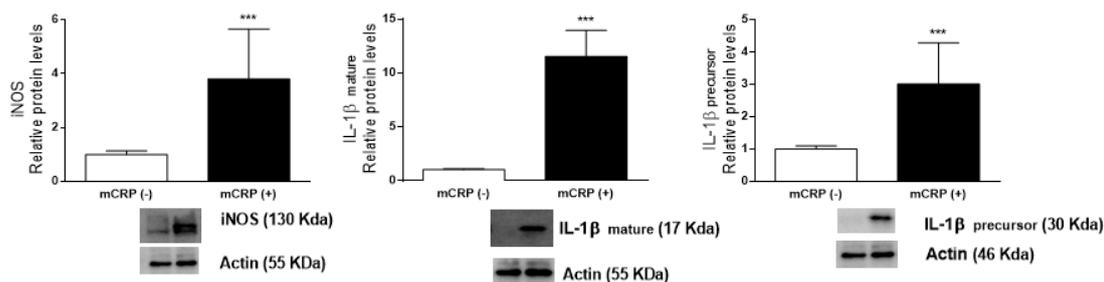


Figura 69. Cuantificación del nivel de proteínas relativo de iNOS e IL-1 β (maduro y precursor) en las células BV2 tratadas con mCRP. El tratamiento con mCRP se aplicó a 100 μ g/ml durante 24 horas. Las transferencias representativas de cada grupo experimental se muestran en el mismo orden que los valores del análisis densitométrico en los histogramas. Los resultados se muestran como las medias \pm SEM (n=6-12). *p <0.05 comparado con el control, # p <0.05 comparado con el control.

5.6 Comparación de diferentes terapias: mCRP indujo inflamación a diferencia de CRP y TPPU inhibió la inflamación inducida por mCRP de manera similar al anticuerpo monoclonal 8C10.

Finalmente, tras probar que el tratamiento con mCRP favorecía la liberación de óxido nítrico en la línea celular BV2 y que el TPPU la disminuía; se comparó la generación de óxido nítrico en las BV2 para los tratamientos con CRP, mCRP, mCRP+8C10, como control de referencia y mCRP+TPPU. En este ensayo, establecimos la concentración de 100 μ g/ml para mCRP y CRP, el anticuerpo 8C10 fue aplicado en relación (1:20) y el TPPU se administró a 100 μ M. Los nitritos se analizaron 24 horas después de aplicar los tratamientos.

El ensayo de nitritos confirmó que mCRP, a diferencia de CRP, produjo efectos pro-inflamatorios en las células BV2. El tratamiento de mCRP con TPPU disminuyó significativamente los niveles de nitritos, similar al tratamiento con mCRP y 8C10 utilizado como control de referencia para el tratamiento con TPPU (Fig. 70) [ANOVA de una vía: $F(4, 35) = 62,62, P < 0,001$]. Por lo tanto, mCRP mostró definitivamente un efecto pro-inflamatorio significativo que fue inhibido tanto por el anticuerpo monoclonal 8C10 como por el antiinflamatorio TPPU.

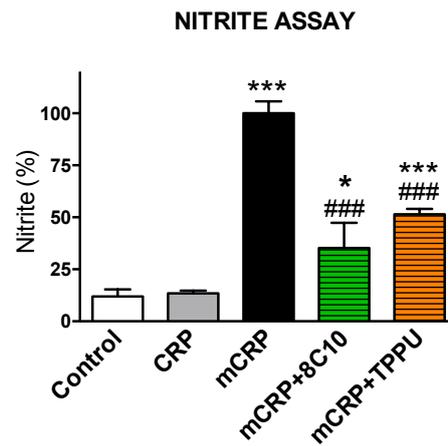


Figura 70. Comparación del análisis de nitritos mediante el ensayo de Griess para los tratamientos con CRP, mCRP, 8C10 y TPPU en la línea celular BV2. Se muestra el porcentaje de nitritos para cada tratamiento: CRP y mCRP, mCRP+8C10, mCRP+TPPU. Los valores son medias \pm SEM (N = 6-12). Estadísticas: * P <0,05, *** P <0,001 en comparación con el grupo control; ### P <0,001 en comparación con el grupo de mCRP.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN GENERAL

En esta tesis se confirma la implicación de mCRP en el desarrollo de demencia de tipo EA. A lo largo de los diferentes estudios que aquí se muestran, se pone de manifiesto cómo una sola inyección de mCRP en el hipocampo de ratones es capaz de inducir pérdida de la memoria espacial y de reconocimiento, así como la aparición de BPSD a los 6 meses de tratamiento. Tales alteraciones conductuales y cognitivas se correlacionaron, además, con la neuropatología característica de la EA; inflamación, alteración de la neuroplasticidad, presencia de A β , y, en especial con la hiperfosforilación de tau; altamente implicada en la evolución y aparición de la pérdida cognitiva y los BPSD (Khan et al., 2017; Mondragón-Rodríguez et al., 2013; Pooler et al., 2014). Asimismo, el bloqueo de mCRP con un anticuerpo específico, 8C10, demostró la recuperación de la pérdida cognitiva originada por mCRP y la neuropatología asociada. Por otra parte, el tratamiento con el antiinflamatorio TPPU favoreció tanto la recuperación cognitiva, como la inhibición del óxido nítrico inducida en la microglía *in vitro* por mCRP. Estos hallazgos, cobran especial relevancia por dos motivos: Por una parte, vinculan directamente a mCRP con la pérdida cognitiva y la patología característica de la EA, especialmente la patología de tau, a la que se asocia el desarrollo sintomatológico de la enfermedad. Por otra parte, el hecho de que mCRP, una molécula altamente inflamatoria, induzca el desarrollo de demencia, y que los efectos de esta sean inhibidos al bloquear la proteína o tratar con antiinflamatorios, pone la neuroinflamación en el centro de la patogenia de la EA, demostrando su alta implicación en la enfermedad.

EFECTOS COGNITIVOS Y DE BPSD'S INDUCIDOS POR mCRP

La inyección de la proteína mCRP en el hipocampo de ratones indujo la pérdida de la memoria espacial y de reconocimiento a 1, 3 y 6 meses de tratamiento.

Para evitar los efectos de la senescencia en la caracterización del modelo de demencia por mCRP, utilizamos animales jóvenes; sin embargo, podemos especular que la demencia inducida por mCRP se mantendrá a medida que avance la edad. El tiempo equivalente en humanos significaría que un solo episodio cerebrovascular o la alteración de la barrera hematoencefálica encontrada en la EA, que induzca el depósito local de

DISCUSIÓN

mCRP (Dutta & Sengupta, 2016) causaría lesiones que durarían más de 20 años (Dutta & Sengupta, 2016).

La inyección de mCRP se realizó en el hipocampo ya que esta es una de las principales áreas implicadas en la memoria, tanto en humanos como en roedores (Eichenbaum et al., 1992). Asimismo, es una de las primeras y principales áreas afectadas en la EA, cuya pérdida sináptica, atrofia neuronal de disminución de la producción de LTPs se correlaciona con la pérdida cognitiva y la memoria (Fjell et al., 2014; Jaroudi et al., 2017; Moodley & Chan, 2014; Elliott J. Mufson et al., 2008).

La alteración de la memoria inducida por mCRP se encontró al realizar los tests de NORT, OLT y MWM. Tanto el NORT como el OLT se basan en la preferencia de los roedores para explorar objetos o localizaciones nuevas respecto a otras que les sean familiares (Barnhart et al., 2015; Vorhees & Williams, 2006). El MWM, se basa en un estímulo externo negativo, como es nadar en el agua, para promover la memoria, reforzándola al buscar la plataforma de escape de ese estímulo negativo (Barnhart et al., 2015; Vorhees & Williams, 2006). Así, estos tres ensayos evalúan las funciones hipocampales de diferentes maneras:

En el NORT se estudia la memoria de reconocimiento ligada tanto al hipocampo como a otras regiones corticales adyacentes, como el córtex entorrinal, perirrinal y parahipocampal (Baxter, 2010) primeras áreas afectadas en la EA, y altamente implicadas en la memoria y la consolidación de la misma. Estas estructuras están muy integradas, pero mientras que la corteza perirrinal está involucrada en el reconocimiento de objetos después de breves intervalos de retención, el hipocampo es responsable del reconocimiento de objetos a largo plazo (Reger et al., 2009) tal y como se evalúa en el NORT (Antunes & Biala, 2012; Lueptow, 2017). La utilidad del NORT para demostrar lesiones intrínsecamente hipocampales es controvertida. Mientras que algunos estudios demuestran que una lesión en el hipocampo no es suficiente como para percibir alteraciones en la realización del NORT (Barker & Warburton, 2011; Hattiangady et al., 2014; Oliveira et al., 2010; Vogel-Ciernia & Wood, 2014) otros demuestran lo contrario (Cohen et al., 2013; Cohen & Stackman, 2015)

Tanto el OLT como el MWM evalúan la memoria espacial asociada intrínsecamente al hipocampo. Mientras que el MWM es un potente test en cuanto a la validación de modelos animales basados en lesiones hipocampales (Barnhart et al., 2015; Bromley-Brits et al., 2011; Vorhees & Williams, 2006) el OLT evita la posible variación inducida en el hipocampo ventral debido a estímulos de estrés como los presentes en el MWM (Denninger et al., 2018) Ya que, mientras que el hipocampo dorsal está implicado primordialmente en funciones cognitivas, la afectación del hipocampo ventral se asocia a cambios relacionados con la emocionalidad como el estrés que podrían estar inducidos durante la realización del MWM (Fanselow & Dong, 2010).

Esto queda confirmado en los resultados observados tanto en el Ensayo de campo abierto como en el Ensayo de la caja oscura/caja iluminada, donde se observó que la inyección intrahipocampal de mCRP inducía, a 6 meses de tratamiento, estrés y ansiedad. Tanto el estrés como la ansiedad forman parte de los BPSD encontrados en los enfermos de EA, en las etapas más avanzadas de la enfermedad. Esto se correlaciona con las alteraciones encontradas en los ratones tratados, donde la exposición más prolongada al tratamiento, 6 meses, pero no 1 ni 3 meses indujo la aparición de estos síntomas. Así, la inyección de mCRP podría estar afectando al hipocampo ventral y otras zonas del cerebro implicadas en la emocionalidad, induciendo la aparición de BPSD.

Los BPSD se asocian a diversas áreas cerebrales debido a su extensa alteración de los estados emocionales, generando irritabilidad, estrés, depresión, apatía, alteración de los ritmos circadianos etc. Así, algunas de las áreas implicadas en la aparición de BPSD suelen ser el córtex, los ganglios basales, el hipocampo, o el hipotálamo (Cerejeira, Lagarto, & Mukaetova-Ladinska, 2012; Dufort-Gervais et al., 2019; Kazui et al., 2016; Shin, 2005).

De esta forma, tanto la pérdida total de la memoria de reconocimiento y espacial a todos los tiempos de tratamiento, como la aparición de estrés y ansiedad a los 6 meses de tratamiento, confirman la implicación directa de mCRP en el desarrollo de demencia. Validando, a su vez, el modelo generado por la inyección de mCRP en el hipocampo como un modelo de demencia posible para estudiar futuras terapias. Por otra parte, los

DISCUSIÓN

animales inyectados con CSF no mostraron una disminución de sus capacidades cognitivas ni la aparición de BPSD.

Esto es de suma importancia teniendo en cuenta la implicación fundamental del hipocampo en las primeras etapas de la EA, donde prevenir la alteración de la neuroplasticidad y la neurogénesis de este, a diferentes niveles moleculares, puede ser determinante para la posterior progresión de la enfermedad (Mark Slevin et al., 2018). Asimismo, la aparición de BPSD en etapas más avanzadas de la EA suponen una gran pérdida de la calidad de vida de los pacientes, afectando igualmente a los cuidadores y a su entorno (Mark Slevin et al., 2018).

En conjunto, terapias que aborden el bloqueo o la inhibición de los efectos inducidos por mCRP después de un ACV, donde se ha demostrado su implicación (Mark Slevin et al., 2018), en la EA, donde las placas amiloides disocian CRP en mCRP (Baloyannis et al., 2015; Dufort-Gervais et al., 2019), o tras algún otro tipo de daño neurológico que favorezca su depósito, podría suponer una buena aproximación para reducir los daños inducidos por el depósito crónico de mCRP en el área afectada y la neurodegeneración que conlleva.

DISTRIBUCIÓN DE mCRP

Nuestros resultados revelaron que mCRP quedaba depositada en el hipocampo desde un mes tras su administración en el mismo, tal y como muestran los resultados del análisis de IHC, hasta 6 meses después de su administración, tal y como revela el análisis de proteínas en el hipocampo realizado por WB. En condiciones patológicas, mCRP se deposita en la ECM de tejidos dañados a partir de la CRP circulante. Así, nuestros resultados confirman la alta capacidad de deposición de mCRP para quedarse en la ECM, hasta 6 meses después de su administración. De esta forma, tras un accidente que favorezca la neuroinflamación, la alteración de la neurovasculatura o la ruptura de la BHE, puede inducir que la CRP circulante llegue al tejido dañado, transformándose en pCRP* que activará Cq1 y se unirá a las membranas del tejido dañado, favoreciendo su disociación a mCRP, que, gracias a su baja solubilidad quedará depositada en la zona afectada (Mark Slevin et al., 2018).

Por otra parte, los resultados del análisis de la IHC del tejido cerebral de ratones tratados durante 1 mes con mCRP también revelaron la infiltración parcial de mCRP en la microvasculatura cortical, indicando un posible mecanismo de diseminación de la proteína. Esta diseminación por parte de mCRP se confirmó al encontrar mCRP tanto en el córtex como en el hipotálamo de los animales tratados. Estudios previos han demostrado la fácil diseminación de mCRP (Baloyannis et al., 2015; Dufort-Gervais et al., 2019). Así, en esta tesis se demuestra como mCRP, se infiltra en la microvasculatura circundante de las zonas donde se deposita para diseminarse a áreas más distantes del lugar de administración.

La deposición de mCRP y la patología inducida por la misma en el hipocampo de ratones parece estar directamente relacionada con la pérdida cognitiva, asociada al hipocampo dorsal, y la emocionalidad, asociada al hipocampo ventral. Tanto la pérdida de la memoria espacial y de reconocimiento, como los BPSD relacionados con la emocionalidad fueron encontradas en nuestro modelo de demencia generado por la inyección de mCRP en el hipocampo.

Asimismo, la diseminación de mCRP al córtex y al hipotálamo podría estar directamente relacionada con la aparición de los BPSD y la pérdida de la memoria de reconocimiento (en el caso del córtex), encontrados en nuestro modelo de demencia. Esto queda confirmado por un estudio reciente publicado por nuestro grupo de investigación, en el que se demuestra como mCRP induce neuroinflamación y neurodegeneración en el hipotálamo en pacientes después de sufrir un ictus hemorrágico en el córtex (Baloyannis et al., 2015; Dufort-Gervais et al., 2019).

El hipotálamo se ha descrito como una de las zonas afectadas en etapas más avanzadas de la EA, tanto en pacientes como en modelos experimentales. Las alteraciones neuropatológicas del hipotálamo normalmente están relacionadas con el estrés, el apetito, los ritmos circadianos y la homeostasis energética, comúnmente alterados en las etapas avanzadas de la EA (Lucassen et al., 2014). Además, el estrés, también encontrado en nuestro modelo *in vivo* mediante el OF, es mediado, en parte, por la activación hipotalámica, junto a la amígdala, el hipocampo y otras estructuras, lo que resulta en un aumento sustancial de los niveles de glucocorticoides. Normalmente, en

DISCUSIÓN

los pacientes de EA, los niveles de GC se correlacionan con las tasas de deterioro cognitivo y el grado de remodelación neuronal (Lucassen et al., 2014).

También encontramos la diseminación de mCRP hasta zonas del córtex. La EA se caracteriza por cambios degenerativos en regiones corticales como los lóbulos temporal y parietal y el córtex prefrontal. Tales regiones pueden estar involucradas tanto en la cognición, como en la emocionalidad, suponiendo su degeneración, afectaciones normalmente encontradas en la EA y reproducidas en nuestro modelo por inyección intrahipocampal de mCRP (Wenk, 2003).

Así, la baja solubilidad de mCRP, su facilidad para unirse al tejido dañado y permanecer de forma crónica en la ECM, así como su capacidad parcial de diseminación, hacen de esta proteína un potencial factor a tratar en la EA y otras enfermedades neurodegenerativas. Además, mCRP, al permanecer en el tejido de manera crónica favorece un ambiente pro-inflamatorio con un subsecuente aumento de la neurodegeneración de la zona. Su diseminación parcial, a la vez, demuestra su facilidad para inducir la rápida afectación de zonas más distales del cerebro induciendo su neuropatología y sintomatologías asociadas. Así, según nuestros resultados, un mes es suficiente para detectar la presencia de p-tau en neuronas donde la mCRP inyectada se ha depositado.

De esta forma, la deposición de mCRP en el hipocampo, y su distribución a áreas del córtex y el hipotálamo, se relacionó con las alteraciones cognitivas y de BPSD encontradas en nuestro modelo de demencia. Así, la diseminación de mCRP y su asociación con la aparición sintomatológica en nuestro modelo *in vivo*, recuerda al patrón de deposición de p-tau asociado a la presentación sintomatológica de la EA descrito por Braak y Braak. (H. Braak & Braak, 1991; Heiko Braak et al., 2011; Heiko Braak & del Tredici, 2011, 2014; K. Jellinger et al., 1991; P. T. Nelson et al., 2012).

Esto es de especial relevancia considerando la posibilidad de analizar el patrón de diseminación de mCRP sugerido en nuestros resultados como un patrón no unidireccional al propagarse tanto al córtex, como al hipotálamo. Estos hallazgos confirman, que el mCRP podría diseminarse preferencialmente a través de la microvasculatura cuando se origine a partir del CRP plasmático. Todo ello cobra

especial relevancia en cuanto a estudios futuros que puedan evaluar si mCRP y tau siguen patrones de diseminación y distribución parecidos en la EA. Estudios previos reportaron que, en cerebros de pacientes con EA; a pesar de la colocalización de tau y mCRP de forma intraneuronal, ambas proteínas se encontraban presentes en regiones diferentes de las mismas neuronas (Mark Slevin et al., 2017).

NEUROINFLAMACIÓN

La neuroinflamación sostenida es un factor de riesgo de enfermedades relacionadas con la edad, incluidas las lesiones cerebrovasculares y la enfermedad de Alzheimer (EA) (Bolós et al., 2017; Cunningham et al., 2009; Sil & Ghosh, 2016; Singhal et al., 2014; Spychala et al., 2017). Las condiciones inflamatorias sistémicas pueden desencadenar o agravar una serie de enfermedades cardiovasculares y metabólicas que también contribuyen a la disfunción cerebral y la demencia (Furman et al., 2019; Lénárt et al., 2016). De hecho, los procesos inflamatorios se consideran cada vez más los culpables de la fragilidad y la enfermedad en los ancianos. Como resultado, se ha intensificado la búsqueda de biomarcadores inflamatorios fiables y objetivos de intervención para combatir la demencia y otras enfermedades discapacitantes.

Los mecanismos proinflamatorios de la mCRP no se conocen completamente, pero se sabe que causa la activación de plaquetas, leucocitos y células endoteliales y también del complemento a través de la unión de C1q (McFadyen et al., 2020) todo lo cual puede potencialmente conducir a una cascada de daño inflamatorio en la microvasculatura cerebral. Por ejemplo, se han detectado altos niveles de mCRP en la microvasculatura de AD positivos para el marcador de neovascularización CD105, lo que sugiere activación y posible potencial de angiogénesis aberrante (McFadyen et al., 2020). Además, la barrera hematoencefálica puede dañarse en las zonas infartadas, facilitando la infiltración de leucocitos activados y mCRP y promoviendo así la EA después de un ACV. Finalmente, una interacción sostenida entre la patología cerebral inducida por mCRP y la patología de la EA en sí misma activaría la neuroinflamación y la neurodegeneración asociada (McFadyen et al., 2020).

En la actualidad existe una creciente evidencia de que mCRP favorece la liberación de óxido nítrico (NO) y la producción de citocinas, en particular la IL-6 y TNF α (Hoesel & Schmid, 2013; Lawrence, 2009; McFadyen et al., 2020). A su vez, la producción

DISCUSIÓN

hepática de CRP está muy influenciada por IL-6 e IL-1 β . IL-6 parece jugar un papel más significativo en la regulación de la expresión de CRP, mientras que IL-1 β potencia los efectos de IL-6 sobre la producción de CRP. La traducción del gen CRP, ubicado en el brazo corto del cromosoma 1, está bajo el control de los factores de transcripción STAT3, C/EBP y NF- κ B (Hoesel & Schmid, 2013; Lawrence, 2009; McFadyen et al., 2020).

Nuestros resultados revelaron que la inyección de mCRP en el hipocampo de ratones, inducía, a 3 y 6 meses de tratamiento la inflamación tanto en la zona donde mCRP fue administrada, es decir en el hipocampo, como en las zonas donde se distribuyó de forma parcial, en el córtex. Así, el análisis por IHC reveló la presencia de IL-1 β y TNF α en el córtex de los ratones tratados, 3 y 6 meses respectivamente tras la inyección de mCRP. Tanto TNF α como IL-1 β son proteínas ampliamente descritas en procesos neuroinflamatorios observados en la EA (Hoesel & Schmid, 2013; Lawrence, 2009; McFadyen et al., 2020). Asimismo, nuestros resultados del análisis por IHC del tejido de los animales inyectados también revelaron la presencia de NF κ B tanto en el córtex como en el hipocampo. NF κ B trasloca al núcleo para regular la transcripción del ADN en casos de inflamación, induciendo a su vez la traducción de CRP (Y. Gu et al., 2017; Jorda et al., 2019)

De esta forma, podemos hipotetizar que mCRP puede inducir la neuroinflamación mediante diferentes mecanismos; mientras que en las neuronas piramidales mCRP generó inflamación relacionada con el aumento de NF κ B forma intracelular, la mCRP diseminada parcialmente al córtex indujo la activación tanto de NF κ B como de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β y TNF α que se detectaron también a nivel intraneuronal.

Por una parte, el hallazgo de NF κ B en las neuronas piramidales del hipocampo de ratones confirmó, no solo la capacidad proinflamatoria de mCRP sino su capacidad de cronificar la inflamación manteniéndola de manera sostenida en el tiempo, incluso 6 meses tras su administración. Por otra parte, el hallazgo de estas proteínas en el cortex 3 y 6 meses tras la administración de mCRP en el hipocampo, no sólo confirma las propiedades proinflamatorias de mCRP, sino que además revela su capacidad de generar una respuesta inflamatoria crónica tanto en las zonas donde se deposita

inicialmente como aquellas a las que se disemina. Así, la capacidad de mCRP para generar inflamación sostenida en el tiempo unida a su capacidad para diseminarse acentúan la importancia de la implicación de esta proteína en las enfermedades con un componente inflamatorio. Tales resultados plantean dos incógnitas en cuanto a la manera en que mCRP genera inflamación tanto en las zonas donde se deposita como en las áreas hasta las que se disemina. Estas serían; ¿se debe la inflamación encontrada en el córtex y en el hipocampo a la diseminación y depósito de mCRP en la ECM cortical, hasta 6 meses después de su administración en el hipocampo? O, por el contrario, ¿es mCRP capaz de inducir una respuesta inflamatoria a nivel generalizado?

Respondiendo a tales cuestiones, los resultados del análisis de extractos del tejido hipocampal completo, a 6 meses de tratamiento, no revelaron alteraciones en los niveles de expresión génica de *Tnfa*, *Il-1 β* , *Ccl3* ni en los niveles de la proteína IL-6, normalmente sobreexpresadas en la EA y en los modelos experimentales de EA (Y. Gu et al., 2017; Jorda et al., 2019). Asimismo, el tratamiento con mCRP durante 6 meses no indujo la alteración de los niveles de expresión génica de proteínas relacionadas con la gliosis como *Trem2*, *Chil1*, ni incrementó significativamente los niveles de GFAP. Proteínas normalmente sobreexpresadas en la EA debido a la gliosis comúnmente encontrada en el cortex y en el hipocampo, tanto en modelos de EA (Sakakibara et al., 2019) como en pacientes (Merluzzi et al., 2018). Trem2 se expresa principalmente en microglía y ha sido asociado recientemente a la aparición de la fosforilación de tau en la EA. Trem2 se une a DAP12 ejerciendo funciones antiinflamatorias. En la EA, Trem2 inicialmente se activa en la microglía como respuesta protectora especialmente cerca de las placas amiloides, para disminuir la inflamación y promover la fagocitosis del péptido A β (Carmona et al., 2018; Jiang et al., 2013). Asimismo, las enfermedades neurodegenerativas como la EA, se caracterizan por el estado inflamatorio activo de los astrocitos, que generalmente se describe como regulación positiva de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Siracusa et al., 2019). Por otra parte, Chil1 es un marcador de astrogliá que generalmente aparece regulado al alza en etapas preclínicas de la EA, como la etapa MCI, y se correlaciona con la proteína tau hiperfosforilada. Se expresa en astrocitos y microglía después de una lesión cerebral (Querol-Vilaseca et al., 2017).

Nuestros resultados respecto al análisis de los niveles de proteínas proninflamatorias en el hipocampo sugieren, por lo tanto, que mCRP actúa de manera local en los lugares

DISCUSIÓN

donde se deposita promoviendo un microambiente pro-inflamatorio en las zonas adyacentes, pero sin generar alteraciones más generalizadas a nivel hipocampal.

El tratamiento con mCRP a la línea microglial BV2 también indujo el aumento de los niveles de la proteína IL-1 β tanto en su forma precursora como madura. Que mCRP indujera *in vitro* el incremento de los niveles de la proteína IL-1 β , confirma la estrecha relación entre mCRP y IL-1 β como ha sido anteriormente descrito (Aldana, 2019). De esta forma se confirma que mCRP induce tanto los niveles de IL-1 β en su forma inactiva (IL-1 β precursora), como en su forma activa (IL-1 β madura). Es decir, probablemente mCRP actúe sobre IL-1 β aumentando los niveles de la proteína, aunque no necesariamente modulando su actividad.

Asimismo el tratamiento *in vitro* con mCRP en la línea BV2, reveló que mCRP inducía tanto la producción de óxido nítrico como el aumento de los niveles de la proteína iNOS, directamente implicada en la producción de óxido nítrico por parte de la microglía.

Las células de microglía son la defensa inmune de primera línea en el cerebro y son actores clave en los procesos neuroinflamatorios. La microglía activada aumenta su actividad fagocítica y libera especies de oxígeno y moléculas inflamatorias, al igual que los macrófagos. La activación directa de la microglía por mCRP no había sido demostrada previamente. Aunque estudios anteriores demostraron que mCRP puede detectarse en células de microglía junto con neuronas en áreas que rodean las regiones peri-infartadas del tejido en el ictus isquémico (Aldana, 2019). Aquí demostramos que mCRP, pero no CRP, activó la línea de células microgliales de ratón BV2, como se muestra por el aumento de la generación de óxido nítrico. También se ha demostrado que la mCRP aumenta los niveles de iNOS y la generación de NO en la línea de células de tipo macrófago humano U937 (Aldana, 2019). La iNOS sobreactivada está implicada en muchas patologías inflamatorias, incluida la EA (Wake & Fields, 2012). Es plausible, por lo tanto, que una activación sostenida de la microglía por mCRP pueda inducir una espiral de neuroinflamación y neurodegeneración (Aldana, 2019). Además, la microglía realiza una amplia gama de funciones fisiológicas en condiciones normales que contribuyen a la homeostasis cerebral y la funcionalidad neuronal (Wake & Fields, 2012). Por lo tanto, podemos especular que la activación de la microglía por mCRP

supone una contribución clave a la demencia post ACV y la EA. Así, la ausencia de gliosis encontrada en el análisis del tejido hipocampal de los animales tratados con mCRP durante 6 meses podría deberse a la actividad local que ejerce mCRP al depositarse en el tejido. Futuros estudios podrían elucidar si la activación microglial inducida por mCRP encontrada en nuestros estudios *in vitro* se reproduce de manera local en el tejido *in vivo* con el tratamiento de mCRP.

NEUROPLASTICIDAD

Una de las características fundamentales de la EA es la pérdida de la neuroplasticidad, así como la alteración de la neurogénesis hipocampal y del conectoma debido a la pérdida de sinapsis. La neuroplasticidad implica cambios moleculares en la estructura y función sinápticas del sistema nervioso central (SNC) y ha sido descrita incluso como precursora a la neurodegeneración encontrada en la EA. La remodelación sináptica funciona como mecanismo compensador de la patología de las primeras etapas de la EA, en un intento por mantener la función cerebral y la cognición durante la aparición de la demencia. El hipocampo, un componente crucial en la formación de la memoria, se ve afectado en las primeras fases de la EA, mostrando una remodelación sináptica e intraneuronal ante la deposición de A β y la formación intraneuronal de NFTs (E. J. Mufson et al., 2015). Así, incluso la hiperfosforilación de tau precedente a la formación de NFTs afecta a la plasticidad sináptica al promover la inestabilidad de los microtúbulos y por lo tanto del citoesqueleto neuronal, provocando neurotrofismo y pérdida sináptica. Por otra parte, la pérdida sináptica, y más concretamente la pérdida sináptica asociada al hipocampo está ampliamente implicada en la generación de LTP que inducen la consolidación de la memoria. La afectación sináptica a nivel hipocampal, por lo tanto, parece estar ampliamente implicada en los déficits cognitivos de la EA (Jones et al., 2001; Pang & Lu, 2004; Papaleonidopoulos & Papatheodoropoulos, 2018).

Con el fin de estudiar si mCRP provocaba cambios en la plasticidad sináptica tras su inyección en el hipocampo, se analizó el tejido hipocampal tratado durante 6 meses con mCRP mediante RT-PCR y Western-Blot. El análisis de proteínas y expresión génica reveló que la inyección de mCRP no afectaba significativamente a la expresión de los genes: *Bdnf*, *Vegfa*, *Sirt2* ni a los niveles de la proteína MAP2.

DISCUSIÓN

Niveles bajos de Bdnf se correlacionan con los NFTs y las placas amiloides de la EA, ya que actúa regulando la toxicidad inducida por A β *in vivo* e *in vitro* (Tanila, 2017). *Vegfa* está ampliamente implicado en la angiogénesis y los procesos vasculares y suele encontrarse normalmente alterado en la EA, ya que su actividad neurotrófica protege contra el deterioro cognitivo (Mahoney et al., 2019). *Sirt2* aparece sobreexpresada en los pacientes con EA co-relacionándose con la desregulación de la macro-autofagia ya que actúa desacetilando la tubulina y aumentando, por lo tanto, la inestabilidad y la disociación de tau de los microtúbulos, favoreciendo su posterior hiperfosforilación en la Ser396 (Silva et al., 2017)MAP2, presente en las dendritas neuronales, es un indicativo de la ramificación y la arborización neuronal. A mayores niveles de MAP2, mayor ramificación neuronal. El tratamiento con mCRP no indujo cambios significativos en los niveles de esta proteína.

Sin embargo, nuestros resultados revelaron que el tratamiento con mCRP durante 6 meses en el hipocampo, disminuía significativamente la expresión del gen *Egr1*.

Egr1 es un gen de respuesta temprana crítico en la consolidación de la memoria (Hendrickx et al., 2014) EGR1 es un miembro de la familia de factores de transcripción de dedos de zinc de respuesta de crecimiento temprano, ampliamente estudiado por su papel en la reconsolidación de la memoria y su capacidad para establecer memorias de localización espacial a largo plazo. Así, EGR1 se ha descrito como uno de los genes de respuesta temprana alterados en la EA (Hendrickx et al., 2014). En ratón, EGR1 es necesario para el LTP de fase tardía, participa en la formación de la memoria a largo plazo y controla la función neuronal en el hipocampo. El LTP hipocampal se considera un sello molecular de la formación de memoria espacial (Hendrickx et al., 2014). EGR1 se ha descrito como un factor de transcripción implicado en la persistencia del LTP, no en su inducción (Jones et al., 2001).

Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos, podemos afirmar que mCRP afecta a uno de los genes críticos en la consolidación de la memoria, inhibiendo su expresión, lo que confirma, a su vez, el vínculo entre mCRP, la neuroplasticidad hipocampal y la pérdida cognitiva.

PATOLOGÍAS AMILOIDE Y TAU

El hipocampo es una de las primeras estructuras cerebrales en desarrollar cambios neurodegenerativos en la EA, experimentando una acumulación profusa de NFTs y un depósito menor de patología amiloide en las primeras etapas de la EA (H. Braak & Braak, 1991; Heiko Braak et al., 2011; Heiko Braak & del Tredici, 2011, 2014; K. Jellinger et al., 1991; P. T. Nelson et al., 2012), siendo estas, dos de las principales características que definen la EA. La patología de tau y la formación de NFTs muestran una correlación muy significativa con el deterioro cognitivo en la EA (H. Braak & Braak, 1991) y la aparición de BPSD. Esto ha sido ampliamente confirmado en nuestros estudios, donde la inyección de mCRP en el hipocampo de ratones indujo una marcada hiperfosforilación de tau, detectable en el hipocampo por técnicas de WB, 6 meses tras el tratamiento. Y concentradamente, de forma intraneuronal mediante IHC. Lo que a su vez se correlacionó con la pérdida cognitiva y la aparición de BPSD de los animales tratados. Nuestro modelo experimental, por lo tanto, concuerda con la hipótesis de Braak y Braak en la que se asocia la patología de tau a la progresión de la sintomatología de la EA (H. Braak & Braak, 1991; Heiko Braak et al., 2011; Heiko Braak & del Tredici, 2011, 2014; K. Jellinger et al., 1991; P. T. Nelson et al., 2012). Tales estudios, además describen la presencia de tau hiperfosforilada en las neuronas noaradrenérgicas del LC, durante décadas, antes de que se desarrolle la patología. Tales cúmulos pueden desembocar, o no, en el desarrollo de la EA, indicando una posible diana terapéutica preventiva. Por lo tanto, si en esta tesis hemos encontrado una clara relación entre mCRP y la hiperfosforilación de tau, tratar mCRP tras eventos proinflamatorios que faciliten su deposición y la posterior hiperfosforilación de tau, por ejemplo, en las neuronas del LC, podría suponer una buena diana terapéutica.

Estudios previos de nuestro grupo revelaron un incremento en la inmunotinción de p-tau en neuronas del tejido cerebral 4 semanas después de la inyección intrahipocampal de mCRP. Curiosamente, las neuronas cultivadas y las células endoteliales aórticas bovinas incubadas con mCRP también mostraron niveles aumentados de p-tau (M. Slevin et al., 2015a), lo que apunta a una implicación directa de mCRP para la hiperfosforilación de tau. Nuestros estudios confirmaron esta hipótesis ya que los resultados de la IHC revelaron la presencia de p-tau, 3 meses tras el tratamiento con mCRP, que a su vez se correlacionó con la presencia de ERK fosforilado. La fosforilación de ERK se ha

DISCUSIÓN

descrito como una de las vías inductoras de la fosforilación de tau en presencia de mCRP (M. Slevin et al., 2015a; Mark Slevin et al., 2010b). Estudios previos también han descrito el aumento de la fosforilación patológica de tau al tratar con mCRP, mediante la vía p38 MAPK como un efector de citotoxicidad de mCRP, que ha sido identificado en células endoteliales de arterias coronarias humanas (Khreiss et al., 2004; D. Li & Yu, 2017; Y. Zhang & Cao, 2020) y macrófagos humanos U937 (Sproston et al., 2018b). La activación de p38 MAPK está implicada en la fosforilación de tau y en los cambios patológicos en la EA (Colié et al., 2017).

Además, nuestros resultados demostraron que el tratamiento con mCRP durante 6 meses, inducía la fosforilación de tau en la Ser396 y la Ser202/Thr305 (clon AT8), epítomos comúnmente fosforilados en la EA (Šimić et al., 2016; Tenreiro et al., 2014). Todo ello confirma a mCRP como una molécula inductora de la hiperfosforilación de tau en residuos asociados a la EA.

La co-localización y aparición de mCRP en zonas con placas amiloides ha sido previamente descrita, así, se demostró como las placas amiloides *in vitro* disociaban CRP a mCRP (Strang et al., 2012). A su vez, los niveles elevados de CRP circulante también se asocian con el desarrollo de demencia, el inicio del deterioro cognitivo y el desarrollo de otras enfermedades neurodegenerativas (Biffi et al., 2016; Garcia et al., 2013; Rasmussen et al., 2018; Romero et al., 2017).

Por otra parte, los resultados del análisis inmunohistoquímico de los hipocampos de animales tratados con mCRP durante 3 y 6 meses, revelaron que mCRP inducía la presencia de A β de forma intraneuronal. Lo que reafirma la asociación anteriormente descrita (M. Slevin et al., 2015; Mark Slevin et al., 2017, 2020; Strang et al., 2012) entre A β y mCRP. De esta forma, se confirma que mCRP no solamente afecta a la patogenia de la EA en los casos donde se produce un daño cerebrovascular o un evento neuroinflamatorio previo, sino que la proteína también puede estar directamente implicada en el desarrollo de la EA. Los resultados del análisis de los niveles de proteínas obtenidos mediante WB, sin embargo, no revelaron cambios significativos entre los animales control y los tratados con mCRP durante 6 meses, al analizar los niveles de APP, el extremo C-terminal del APP, el clon 4G8 de A β , ni BACE-1,

implicada en la vía amiloidogénica en la enfermedad de EA (Devraj et al., 2016; J. Sun & Roy, 2018) confirmando los efectos locales generados por mCRP.

En conjunto, nuestros estudios confirmaron que mCRP induce de manera local la neuroinflamación y la aparición de A β , actuando a nivel tanto local como generalizado en la hiperfosforilación de tau y la disminución de la neuroplasticidad. De esta forma, mCRP parece promover varias vías neurotóxicas y neurodegenerativas en nuestro modelo de EA. 1. mCRP promueve la fosforilación de tau y la deposición de A β , ambos, ambas moléculas descritas por su marcada neurotoxicidad frente a sus cúmulos de mayor tamaño como son los NFTs y las placas amiloides. 2. mCRP es capaz de inducir la inflamación sostenida y local debido a su depósito en la ECM. 3. Tanto el incremento de la neuroinflamación como la pérdida de la neuroplasticidad también pueden estar asociadas a la desestabilización de los microtúbulos debido a la fosforilación de tau inducida por mCRP, y a la neurotoxicidad generada por los depósitos de A β intraneuronal y p-tau.

Finalmente, debido a la marcada patología de tau, la pérdida de la neuroplasticidad, la neuroinflamación y la presencia de A β encontradas en el cerebro de nuestro modelo de ratón; el modelo de demencia generado por la inyección de mCRP en el hipocampo de ratones puede ser clasificado como un modelo de demencia de tipo EA.

COMPARACIÓN DEL MODELO DE DEMENCIA POR mCRP CON EL MODELO DE EA, 5XFAD

La inyección estereotáxica intrahipocampal de mCRP indujo una pérdida total de memoria que se detectó hasta los 6 meses después del tratamiento con mCRP. Por lo tanto, que la administración de mCRP en el hipocampo de ratones indujera pérdida cognitiva a todos los tiempos de estudio, así como BPSD relacionados con la emocionalidad a los 6 meses de tratamiento, nos llevó a comparar el modelo de mCRP con un modelo establecido de EA. La inyección intrahipocampal de mCRP reprodujo la pérdida cognitiva encontrada en los animales 5XFAD (Oakley et al., 2006), y los BPSD descritos en este modelo a partir de los 9 meses de edad (Flanigan et al., 2014). La aparición de BPSD relacionados con la emocionalidad y la discapacidad motora, encontrados en el modelo de EA, 5XFAD, en nuestros estudios a partir de los 4 meses de edad, suponen una novedad en cuanto a estudios previos que reportan controversia

DISCUSIÓN

en cuanto a la edad de aparición de la discapacidad motora y la alteración de la emocionalidad de los animales 5XFAD a diferentes edades (Devi & Ohno, 2010; Flanigan et al., 2014). Así, nuestros estudios revelaron que tales cambios pueden encontrarse en este modelo a partir de los 4 meses de edad y que los animales 5XFAD también pueden mostrar un aumento de BPSD como la ansiedad, contrario a otros estudios que describen la disminución de la ansiedad en este modelo (Jawhar et al., 2012).

La hiperfosforilación de tau y la disminución de la expresión del gen *Egr1* se encontraron tanto en el modelo por mCRP como en el modelo de EA, el cual a pesar de no ser un modelo que se caracterice por presentar NFTs (Oakley et al., 2006) puede mostrar tau hiperfosforilada (Griñán-Ferré et al., 2016; Kanno et al., 2014; Wirths & Zampar, 2020).

El modelo de demencia por mCRP se diferenció del modelo de EA al analizar las alteraciones en los niveles de proteínas y expresión génica a los 6 meses de tratamiento con mCRP, correspondientes a 9 meses de edad en los animales. El modelo de demencia por mCRP se diferenció del modelo de EA, en cuanto a la inflamación, la gliosis, el estrés oxidativo, algunos marcadores de neuroplasticidad y la aparición de A β , lo que era de esperar, ya que el modelo 5XFAD desarrolla rápidamente patología amiloide grave y una marcada neuroinflamación. Estos ratones acumulan altos niveles de A β , comenzando alrededor de los 1,5 meses de edad seguido de una rápida formación de abundantes placas amiloides en corteza cerebral e hipocampo (Oakley et al., 2006). Sin embargo, en base a nuestros resultados, podemos hipotetizar que la neuropatología inducida por mCRP, se genera a nivel local donde la proteína se deposita, induciendo cambios más localizados. En este sentido hemos detectado mediante IHC amiloide intraneuronal en neuronas de hipocampo y corteza de estos ratones.

Además, las discordancias entre el modelo de ratón 5XFAD y el modelo de demencia por mCRP pueden ser causadas por varios factores que deben tenerse en cuenta: 1) 5XFAD es un modelo bien establecido, ha sido claramente descrito y caracterizado, mientras que el modelo de demencia por mCRP es más reciente y por lo tanto nuestros estudios abren el camino hacia su caracterización. 2) 5XFAD es un ratón diseñado

genéticamente, con cinco mutaciones seleccionadas que aseguran la neurodegeneración y confieren al modelo una mayor replicabilidad, estabilidad y confiabilidad; el modelo de mCRP desarrolla demencia debido a la inyección intrahipocampal de una proteína y por lo tanto puede presentar una mayor variabilidad en cuanto a la neuropatología y la alteración cognitiva y comportamental. 3) Como las vías de señalización de mCRP todavía están en estudio, nuestro objetivo fue hacer un cribado de varias proteínas y genes que pudieran estar implicados, seleccionados a partir de las características de la EA, la neuroinflamación, los modelos de EA etc, por lo que podría ser que algunos de los genes y proteínas seleccionados no estén contribuyendo directamente al proceso patológico, que estén contribuyendo de una manera diferente, o que las vías alteradas sean otras todavía por definir

Los animales 5XFAD fueron elegidos como control de EA por su marcada neuroinflamación, previamente descrita (Ardestani et al., 2017; Couturier et al., 2016; Griñán-Ferré et al., 2020) con el fin de compararlos con el modelo de mCRP, debido a las propiedades pro-inflamatorias de esta molécula (Caprio et al., 2018; Mullane & Williams, 2019; Song et al., 2015). Así, era esperable el incremento de la neuroinflamación y la gliosis encontrados en este modelo en cuanto al aumento de la expresión de los genes de *Tnfa*, *Il-1 β* , *Ccl3* y el aumento de los niveles de la proteína IL-6 relacionados con la inflamación. De igual manera, estudios previos han descrito un claro aumento de la gliosis en este modelo de EA (Giannoni et al., 2016; Griñán-Ferré et al., 2020; Oakley et al., 2006; W. M. Song et al., 2018) lo que concordó con nuestros resultados donde se vio aumentada la expresión de los genes *Chil-1* y *Trem-2* y los niveles de la proteína GFAP. Estudios previos han descrito la alteración del estrés oxidativo del modelo 5XFAD (Griñán-Ferré et al., 2020), donde, curiosamente, no se encontró un aumento significativo de los niveles de la proteína GPX1 en animales 5XFAD de 8 meses de edad. Sin embargo, nuestros resultados, donde se analizaron los hipocampos de ratones 5XFAD de 9 meses de edad, revelaron el aumento de la expresión génica de *Gpx1*. Lo que puede deberse al mes de diferencia de edad de los animales entre ambos estudios o a alteraciones ocurridas a nivel transcripcional, que no se traducen a proteínas.

Por otra parte, nuestros resultados confirmaron la pérdida de la neuroplasticidad descrita previamente en el modelo 5XFAD (Crowe & Ellis-Davies, 2014; L. Gu et al., 2018;

DISCUSIÓN

Jawhar et al., 2012; Wu et al., 2018). Aportando la alteración de nuevas moléculas que no se habían encontrado alteradas previamente en este modelo (Griñán-Ferré et al., 2020) tales como la disminución de la expresión génica de *Vegfa*, *Bdnf*, *Sirt2* y *Egr1* y de los niveles de la proteína MAP2.

Finalmente, los resultados del análisis molecular de la patología amiloide del modelo 5XFAD, como la relación entre el APP y su extremo C-terminal, el clon 4G8 del péptido β -amiloide, y la activación de la vía amiloidogénica BACE-1, apoyaron la clara caracterización de este modelo de EA previamente descrita (Griñán-Ferré et al., 2016; Oakley et al., 2006).

TERAPIAS CONTRA mCRP

Si se considera que mCRP contribuye de manera significativa al desencadenamiento de la EA, tanto intrínsecamente como después de un ACV (M. Slevin et al., 2015a; Mark Slevin et al., 2017) tratamientos eficaces contra mCRP podrían reducir los casos de EA después de accidentes cerebrovasculares o enfermedades que impliquen la activación de la CRP. Por ello investigamos los posibles efectos protectores de un anticuerpo monoclonal anti-mCRP (8C10) y del antiinflamatorio TPPU.

En esta tesis encontramos que el anticuerpo contra mCRP, 8C10, protegió contra la pérdida de memoria inducida por mCRP en los tres períodos de tratamiento hasta un máximo de 6 meses de exposición. Tanto la memoria espacial como la memoria de reconocimiento fueron preservadas al tratar con 8C10. Así los ratones tratados con mCRP y 8C10 mostraron el mismo nivel cognitivo que los ratones control a pesar de la administración de mCRP. El anticuerpo monoclonal 8C10 también inhibió la ansiedad y el estrés encontrados en los ratones mCRP, lo que indica que 8C10 protegió contra la propagación de mCRP desde el hipocampo a las áreas cerebrales conectadas o, que a pesar de su diseminación mCRP permaneció bloqueada. De hecho, la proteína mCRP se detectó en el hipocampo de los ratones inyectados con mCRP, pero también en los inyectados con mCRP y el anticuerpo 8C10. Por lo tanto, es probable que el anticuerpo bloquee la región activa de la molécula de mCRP y que esto sea suficiente para proteger contra cualquier daño infligido por mCRP. Se sabe que el 8C10 se une a la parte N-terminal de la mCRP a través de los aa 22-45, y que esto puede evitar que la mCRP se una a las membranas del tejido dañado a través de los aa 35-47, evitando así el anclaje

de la mCRP a los microdominios lipídicos, considerados su mecanismo de interacción celular (Jia et al., 2018; Sproston et al., 2018).

Por otra parte, la patología de tau en el hipocampo de ratones inyectados con mCRP se evitó con 8C10. Por lo tanto, esto apoya nuestros resultados *in vivo* e *in vitro* previos que sugieren que la prevención de la interacción de mCRP con la membrana celular por parte del anticuerpo evita la activación posterior de los sistemas de cascada celular que conducen a la neurodegeneración reflejada por la patología de tau. La patología tau es un sello distintivo de la EA y otros tipos de demencia y su progresión se correlaciona con las etapas de la EA y la gravedad de la demencia (Malpas et al., 2020). Así, que el uso de este anticuerpo monoclonal pueda inhibirla supone una terapia prometedora contra la patología de la EA en presencia de mCRP.

Asimismo, el anticuerpo 8C10 protegió de manera parcial en cuanto a la disminución de la expresión génica de *Egr1* inducida por mCRP, aumentando la expresión del mismo, lo que puede indicar una mejora de la neuroplasticidad disminuida por mCRP.

Además, el anticuerpo 8C10 bloqueó el aumento de óxido nítrico inducido por mCRP en la línea celular de microglía BV2, evitando así la activación de la vía inducible de óxido nítrico sintasa (iNOS). Esto supone un avance en cuanto al bloqueo de la activación microglial inducida por los efectos pro-inflamatorios de mCRP. Así, nuevos estudios que evalúen la efectividad del anticuerpo 8C10 *in vivo* para inhibir la activación microglial de mCRP, podrían ser prometedores para el tratamiento de la EA.

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que una posible prevención mediante anticuerpos monoclonales de mCRP con las membranas celulares, como ha sido previamente sugerido en otros estudios (Mark Slevin et al., 2018) evitaría la activación posterior de los sistemas que conducen a la neurodegeneración mediada por mCRP.

Así, en esta tesis queda confirmada la efectividad del uso de anticuerpos monoclonales contra los efectos neurodegenerativos inducidos por mCRP. Esto abre la puerta a nuevas terapias preventivas que, por una parte, se centren en características patológicas diferentes a la acumulación proteica de tau y A β . Y, por otra, prueba la posible efectividad de terapias basadas en anticuerpos monoclonales más allá de los dirigidos

DISCUSIÓN

contra A β . Esto es de suma importancia teniendo en cuenta la baja efectividad de los tratamientos actuales en la EA que se han focalizado únicamente en las patologías amiloide y tau y la necesidad de nuevas terapias que aborden, además de la pérdida cognitiva, la aparición de BPSD que disminuyen gravemente, la calidad de vida de los pacientes, como de sus cuidadores. Por lo tanto, nuevos estudios que investiguen posibles vías de administración de anticuerpos monoclonales contra mCRP en las etapas tempranas de la EA, y que puedan atravesar la BHE (en el caso de no presentar ya aumentada su permeabilidad debido a la patología) bloqueando mCRP o su deposición, podrían suponer importantes dianas terapéuticas contra el avance de la demencia.

Estudios previos han demostrado que el agente TPPU actúa como neuroprotector en modelos experimentales de hipoperfusión crónica (Aldana, 2019), reperfusión después de isquemia focal (Tu et al., 2018) y EA (Griñán-Ferré et al., 2020).

La neuroprotección inducida por TPPU contra la pérdida de memoria encontrada en animales inyectados con mCRP confirma la presencia de neuroinflamación y procesos neurodegenerativos en el modelo de demencia de ratón por mCRP. Por otra parte, estos hallazgos confirman el tratamiento con TPPU como una terapia válida contra los efectos neuropatológicos inducidos por mCRP.

La inhibición de sEH con el fin de detener la hidrólisis de los EETs beneficiosos por sus metabolitos correspondientes, es un enfoque novedoso contra las patologías neuroinflamatorias (Kodani & Morisseau, 2019). El bloqueo de este enzima por otro fármaco experimental ha demostrado reducir la activación de la microglía *in vivo*, inducida por lesión cerebral traumática experimental, e *in vitro*, probado en células BV2 lesionadas con LPS (Hung & Fu, 2017). De acuerdo con estos hallazgos, en esta tesis demostramos que el agente TPPU protege contra el aumento de óxido nítrico inducido por el agente inflamatorio LPS en las células microgliales BV2. También demostramos que el antiinflamatorio TPPU redujo la activación de la vía proinflamatoria implicada en la activación del óxido nítrico inducida tras la incubación de la línea celular de microglía BV2 con mCRP. Por lo tanto, el tratamiento con TPPU se sitúa entre una de las terapias antiinflamatorias que actualmente están emergiendo con el fin de tratar la neuroinflamación encontrada en la EA.

Como ventaja respecto al uso de anticuerpos monoclonales, el agente TPPU es un inhibidor del enzima epóxido-hidrolasa soluble bien caracterizado, de alta disponibilidad, cuya vía de administración no es invasiva, ya que es oral, y que puede cruzar fácilmente la BHE. Todo ello, hace de este sEHi una terapia prometedora contra el avance de la EA al actuar sobre la neuroinflamación característica de esta enfermedad. Nuevos estudios que investiguen el efecto del TPPU sobre los BPSD descritos en la EA además de la cognición, supondrían la posibilidad de investigar el tratamiento de afectaciones todavía no resueltas, ni demasiado investigadas en cuanto a las terapias actuales de la EA.

RESUMEN DE LA DISCUSIÓN

En conclusión, en esta tesis se demuestran los efectos deletéreos inducidos a largo plazo por mCRP tras su deposición en el hipocampo de ratones. Confirmamos la implicación de la molécula de mCRP en el desarrollo de la demencia con rasgos de EA debido, tanto a la pérdida cognitiva, como a la aparición de BPSD relacionados con la emocionalidad y a la neuropatología inducida por la proteína. Así, mCRP indujo procesos neurodegenerativos característicos de la EA, hasta 6 meses después de su administración, como la patología amiloide y la neuroinflamación encontradas de forma local *in vivo*, tanto en las zonas donde la proteína se depositó como en las zonas donde se diseminó de forma parcial. mCRP también indujo procesos característicos de la EA como la hiperfosforilación de tau y la disminución de *Egr1* de forma marcada y a nivel generalizado en el hipocampo. Debido al claro vínculo entre mCRP y su diseminación desde el hipocampo hacia el córtex y el hipotálamo, la hiperfosforilación de tau, la pérdida sináptica, la correlación con la pérdida cognitiva y la aparición de BPSD, podemos hipotetizar que la fosforilación de tau esta ampliamente relacionada con mCRP y que la diseminación y depósito de mCRP se correlaciona a su vez con la sintomatología observada en nuestro modelo de demencia de tipo EA. Esto constituye un evento prometedor en cuanto al estudio de mCRP en la EA con el fin de conocer si su distribución está asociada a la patología de tau o viceversa, así como a la afectación cognitiva y conductual.

Asimismo, la acción pro-inflamatoria inducida por mCRP se confirmó en nuestros estudios *in vitro* al observar la activación de las células microgliales BV2 en presencia

DISCUSIÓN

de mCRP, confirmando *in vivo* su capacidad para sostener de manera crónica la inflamación.

En esta tesis, definimos, por lo tanto, el modelo por inyección intrahipocampal de mCRP como un modelo de demencia con rasgos de EA, que por otra parte presentó diferencias con el modelo transgénico de EA, 5XFAD, cuya patología cerebral amiloide y procesos asociados es más marcada.

Finalmente, demostramos que tratamientos que bloqueen directamente a mCRP o su actividad proinflamatoria, pueden ser prometedores en el tratamiento de la EA, tanto en su sintomatología como en la neuropatología que la induce. Además, el uso del agente TPPU confirmó que las vías proinflamatorias son uno de los principales inductores de la neurodegeneración por mCRP. La inducción de la demencia con rasgos de EA por mCRP confirma el vínculo entre la lesión cerebrovascular y la EA, que afecta a una gran parte de la población anciana, e identifica la mCRP como un objetivo terapéutico y un posible biomarcador de demencia en etapas tempranas de la misma o después de sufrir un ACV.

Asimismo, futuros estudios que aborden las diferencias sexuales presentadas en cuanto a los niveles de mCRP y su implicación en el desarrollo de la EA y el ACV, ambas enfermedades más prevalentes en mujeres (Pike, 2017; Spsychala et al., 2017), serían de gran ayuda, suponiendo un avance tanto para la comunidad científica como a nivel social.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El modelo establecido mediante la inyección bilateral de mCRP en el hipocampo de ratones es un modelo de demencia a largo plazo, ya que presentó pérdida cognitiva a todos los tiempos de tratamiento y BPSD a los 6 meses de tratamiento.
2. El modelo de demencia por mCRP presentó pérdida de la memoria espacial y de reconocimiento a todos los tiempos de tratamiento como el modelo de EA, 5XFAD. Tanto el modelo de demencia por mCRP como el modelo de EA presentaron BPSD relacionados con la emocionalidad. El modelo de demencia por mCRP se diferenció del modelo de EA en el tiempo de aparición de BPSD, que aparecieron antes en el modelo de EA.
3. mCRP permanece en el lugar de administración, diseminándose, parcialmente, a través de la microvasculatura a zonas más distantes del cerebro como el hipotálamo o el córtex.
4. El modelo de demencia por mCRP es un modelo de demencia con rasgos de EA ya que induce inflamación, incremento del péptido amiloide y de proteína tau hiperfosforilada en las neuronas de las zonas cerebrales afectadas por mCRP, en hipocampo y corteza cerebral.
5. El modelo de demencia por mCRP mostró una disminución de la neuroplasticidad y una marcada hiperfosforilación de tau, similar al modelo de EA, 5XFAD. Mientras que mCRP indujo cambios locales que no se detectaron mediante RT-PCR o Western-Blot, el modelo 5XFAD mostró un claro incremento de los marcadores de patología amiloide, inflamación y estrés oxidativo.
6. El anticuerpo monoclonal 8C10 protegió de la neuropatología inducida por mCRP y de las alteraciones cognitivas y comportamentales que conlleva. El uso de anticuerpos que bloqueen específicamente la isoforma mCRP puede tener aplicaciones terapéuticas.
7. El agente antiinflamatorio TPPU protegió de la pérdida cognitiva inducida por mCRP a 1 mes de tratamiento y de la inflamación inducida por mCRP en la línea celular de microglía BV2. El uso de inhibidores del enzima epóxido hidrolasa soluble como el TPPU representa una terapia prometedora para la demencia con rasgos de EA inducida por mCRP.

BIBLIOGRAFÍA

- Adaikkan, C., Middleton, S. J., Marco, A., Pao, P. C., Mathys, H., Kim, D. N. W., Gao, F., Young, J. Z., Suk, H. J., Boyden, E. S., McHugh, T. J., & Tsai, L. H. (2019). Gamma Entrainment Binds Higher-Order Brain Regions and Offers Neuroprotection. *Neuron*, *102*(5), 929-943.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.04.011>
- Aisen, P. S., Cummings, J., Jack, C. R., Morris, J. C., Sperling, R., Frölich, L., Jones, R. W., Dowsett, S. A., Matthews, B. R., Raskin, J., Scheltens, P., & Dubois, B. (2017). On the path to 2025: Understanding the Alzheimer's disease continuum. In *Alzheimer's Research and Therapy* (Vol. 9, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13195-017-0283-5>
- Aldana, B. I. (2019). Microglia-Specific Metabolic Changes in Neurodegeneration. In *Journal of Molecular Biology* (Vol. 431, Issue 9, pp. 1830–1842). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.03.006>
- Alves, G., Carvalho, A., Carvalho, L., Sudo, F., Siqueira-Neto, J., Oertel-Knochel, V., Jurcoane, A., Knochel, C., Boecker, H., Laks, J., & Pantel, J. (2016). Neuroimaging Findings Related to Behavioral Disturbances in Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *Current Alzheimer Research*, *14*(1), 61–75. <https://doi.org/10.2174/1567205013666160603010203>
- Anacker, C., & Hen, R. (2017). Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility-linking memory and mood. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 18, Issue 6, pp. 335–346). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.45>
- Anderson, A. J., Su, J. H., & Cotman, C. W. (1996). DNA damage and apoptosis in Alzheimer's disease: Colocalization with c-Jun immunoreactivity, relationship to brain area, and effect of postmortem delay. *Journal of Neuroscience*, *16*(5), 1710–1719. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.16-05-01710.1996>
- Anstey, K. J., Cherbuin, N., Budge, M., & Young, J. (2011). Body mass index in midlife and late-life as a risk factor for dementia: A meta-analysis of prospective studies. *Obesity Reviews*, *12*(5). <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2010.00825.x>
- Anstey, Kaarin J., von Sanden, C., Salim, A., & O'Kearney, R. (2007). Smoking as a risk factor for dementia and cognitive decline: A meta-analysis of prospective studies. *American Journal of Epidemiology*, *166*(4), 367–378. <https://doi.org/10.1093/aje/kwm116>

- Antunes, M., & Biala, G. (2012). The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. In *Cognitive Processing* (Vol. 13, Issue 2, pp. 93–110). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10339-011-0430-z>
- Arboleda-Velasquez, J. F., Lopera, F., O'Hare, M., Delgado-Tirado, S., Marino, C., Chmielewska, N., Saez-Torres, K. L., Amarnani, D., Schultz, A. P., Sperling, R. A., Leyton-Cifuentes, D., Chen, K., Baena, A., Aguillon, D., Rios-Romenets, S., Giraldo, M., Guzmán-Vélez, E., Norton, D. J., Pardilla-Delgado, E., ... Quiroz, Y. T. (2019). Resistance to autosomal dominant Alzheimer's disease in an APOE3 Christchurch homozygote: a case report. *Nature Medicine*, *25*(11), 1680–1683. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0611-3>
- Ardestani, P. M., Evans, A. K., Yi, B., Nguyen, T., Coutellier, L., & Shamloo, M. (2017). Modulation of neuroinflammation and pathology in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease using a biased and selective beta-1 adrenergic receptor partial agonist. *Neuropharmacology*, *116*, 371–386. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.01.010>
- Areosa Sastre, A., Sherriff, F., & McShane, R. (2005). Memantine for dementia. In *Cochrane Database of Systematic Reviews* (Issue 3). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd003154.pub4>
- Arnaud, L., Chen, S., Liu, F., Li, B., Khatoon, S., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (2011). Mechanism of inhibition of PP2A activity and abnormal hyperphosphorylation of tau by I2PP2A/SET. *FEBS Letters*, *585*(17), 2653–2659. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.07.020>
- Atri, A. (2019). Current and Future Treatments in Alzheimer's Disease. *Seminars in Neurology*, *39*(2), 227–240. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1678581>
- Atri, A., Molinuevo, J. L., Lemming, O., Wirth, Y., Pulte, I., & Wilkinson, D. (2013). Memantine in patients with Alzheimer's disease receiving donepezil: New analyses of efficacy and safety for combination therapy. *Alzheimer's Research and Therapy*, *5*(1). <https://doi.org/10.1186/alzrt160>
- Bachiller, S., Jiménez-Ferrer, I., Paulus, A., Yang, Y., Swanberg, M., Deierborg, T., & Boza-Serrano, A. (2018). Microglia in neurological diseases: A road map to brain-disease dependent-inflammatory response. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00488>
- Bacigalupo, I., Mayer, F., Lacorte, E., di Pucchio, A., Marzolini, F., Canevelli, M., di Fiandra, T., & Vanacore, N. (2018). A Systematic Review and Meta-Analysis on

- the Prevalence of Dementia in Europe: Estimates from the Highest-Quality Studies Adopting the DSM IV Diagnostic Criteria. *Journal of Alzheimer's Disease*, 66(4), 1471–1481. <https://doi.org/10.3233/JAD-180416>
- Baeta-Corral, R., Johansson, B., & Giménez-Llort, L. (2018). Long-term treatment with low-dose caffeine worsens BPSD-Like profile in 3xTg-AD mice model of Alzheimer's disease and affects mice with normal aging. *Frontiers in Pharmacology*, 9(FEB). <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00079>
- Baloyannis, S. J., Mavroudis, I., Mitilneos, D., Baloyannis, I. S., & Costa, V. G. (2015). The Hypothalamus in Alzheimer's Disease: A Golgi and Electron Microscope Study. *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias*, 30(5), 478–487. <https://doi.org/10.1177/1533317514556876>
- Barker, G. R. I., & Warburton, E. C. (2011). When is the hippocampus involved in recognition memory? *Journal of Neuroscience*, 31(29), 10721–10731. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6413-10.2011>
- Barnes, D. E., Kaup, A., Kirby, K. A., Byers, A. L., Diaz-Arrastia, R., & Yaffe, K. (2014). Traumatic brain injury and risk of dementia in older veterans. *Neurology*, 83(4), 312–319. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000616>
- Barnhart, C. D., Yang, D., & Lein, P. J. (2015). Using the Morris water maze to assess spatial learning and memory in weanling mice. *PLoS ONE*, 10(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124521>
- Baxter, M. G. (2010). "I've seen it all before" Explaining age-related impairments in object recognition. Theoretical comment on Burke et al. (2010). In *Behavioral Neuroscience* (Vol. 124, Issue 5, pp. 706–709). Behav Neurosci. <https://doi.org/10.1037/a0021029>
- Belfiore, R., Rodin, A., Ferreira, E., Velazquez, R., Branca, C., Caccamo, A., & Oddo, S. (2019). Temporal and regional progression of Alzheimer's disease-like pathology in 3xTg-AD mice. *Ageing Cell*, 18(1). <https://doi.org/10.1111/acel.12873>
- Bello, V. M. E., & Schultz, R. R. (2011). Prevalência de demências potencialmente reversíveis: Estudo em um ambulatório de demência. *Dementia e Neuropsychologia*, 5(1), 44–47. <https://doi.org/10.1590/S1980-57642011DN05010008>
- Benzinger, T. L. S., Blazey, T., Jack, C. R., Koeppe, R. A., Su, Y., Xiong, C., Raichle, M. E., Snyder, A. Z., Ances, B. M., Bateman, R. J., Cairns, N. J., Fagan, A. M.,

- Goate, A., Marcus, D. S., Aisen, P. S., Christensen, J. J., Ercole, L., Hornbeck, R. C., Farrar, A. M., ... Morris, J. C. (2013). Regional variability of imaging biomarkers in autosomal dominant Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(47). <https://doi.org/10.1073/pnas.1317918110>
- Berger-Sweeney, J. (2003). The cholinergic basal forebrain system during development and its influence on cognitive processes: Important questions and potential answers. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27(4), 401–411. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(03\)00070-8](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(03)00070-8)
- Beydoun, M. A., Beydoun, H. A., & Wang, Y. (2008). Obesity and central obesity as risk factors for incident dementia and its subtypes: A systematic review and meta-analysis. In *Obesity Reviews* (Vol. 9, Issue 3, pp. 204–218). *Obes Rev.* <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2008.00473.x>
- Bi, B. T., Lin, H. B., Cheng, Y. F., Zhou, H., Lin, T., Zhang, M. Z., Li, T. J., & Xu, J. P. (2012a). Promotion of β -amyloid production by C-reactive protein and its implications in the early pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, 60(3), 257–266. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.12.007>
- Bi, B. T., Lin, H. B., Cheng, Y. F., Zhou, H., Lin, T., Zhang, M. Z., Li, T. J., & Xu, J. P. (2012b). Promotion of β -amyloid production by C-reactive protein and its implications in the early pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, 60(3), 257–266. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.12.007>
- Biessels, G. J., Staekenborg, S., Brunner, E., Brayne, C., & Scheltens, P. (2006). Risk of dementia in diabetes mellitus: A systematic review. In *Lancet Neurology* (Vol. 5, Issue 1, pp. 64–74). *Lancet Neurol.* [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(05\)70284-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(05)70284-2)
- Biffi, A., Bailey, D., Anderson, C. D., Ayres, A. M., Gurol, E. M., Greenberg, S. M., Rosand, J., & Viswanathan, A. (2016). Risk factors associated with early vs delayed dementia after intracerebral hemorrhage. *JAMA Neurology*, 73(8), 969–976. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.0955>
- Boada, M., López, O., Núñez, L., Szczepiorkowski, Z. M., Torres, M., Grifols, C., & Páez, A. (2019). Plasma exchange for Alzheimer's disease Management by Albumin Replacement (AMBAR) trial: Study design and progress. *Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions*, 5, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2019.01.001>

- Bolós, M., Perea, J. R., & Avila, J. (2017). Alzheimer's disease as an inflammatory disease. In *Biomolecular Concepts* (Vol. 8, Issue 1, pp. 37–43). Walter de Gruyter GmbH. <https://doi.org/10.1515/bmc-2016-0029>
- Bondi, M. W., Edmonds, E. C., & Salmon, D. P. (2017). Alzheimer's disease: Past, present, and future. In *Journal of the International Neuropsychological Society* (Vol. 23, Issues 9-10 Special Issue, pp. 818–831). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/S135561771700100X>
- Borsini, F., Podhorna, J., & Marazziti, D. (2002). Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? In *Psychopharmacology* (Vol. 163, Issue 2, pp. 121–141). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00213-002-1155-6>
- Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. In *Acta Neuropathologica* (Vol. 82, Issue 4, pp. 239–259). Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/BF00308809>
- Braak, Heiko, & del Tredici, K. (2011). The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty. *Acta Neuropathologica*, *121*(2), 171–181. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0789-4>
- Braak, Heiko, & del Tredici, K. (2014). Are cases with tau pathology occurring in the absence of A β deposits part of the AD-related pathological process? In *Acta Neuropathologica* (Vol. 128, Issue 6, pp. 767–772). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1356-1>
- Braak, Heiko, Thal, D. R., Ghebremedhin, E., & del Tredici, K. (2011). Stages of the pathologic process in Alzheimer disease: Age categories from 1 to 100 years. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *70*(11), 960–969. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e318232a379>
- Braidy, N., Poljak, A., Jayasena, T., Mansour, H., Inestrosa, N. C., & Sachdev, P. S. (2015). Accelerating Alzheimer's research through 'natural' animal models. *Current Opinion in Psychiatry*, *28*(2), 155–164. <https://doi.org/10.1097/YCO.0000000000000137>
- Briggs, R., Kennelly, S. P., & O'Neill, D. (2016). Drug treatments in Alzheimer's disease. *Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians of London*, *16*(3), 247–253. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.16-3-247>

- Bromley-Brits, K., Deng, Y., & Song, W. (2011). Morris Water Maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice. *Journal of Visualized Experiments*, 53, 2920. <https://doi.org/10.3791/2920>
- Brouwers, N., Slegers, K., & van Broeckhoven, C. (2008). Molecular genetics of Alzheimer's disease: An update. In *Annals of Medicine* (Vol. 40, Issue 8, pp. 562–583). Ann Med. <https://doi.org/10.1080/07853890802186905>
- Cagnin, A., di Lorenzo, R., Marra, C., Bonanni, L., Cupidi, C., Laganà, V., Rubino, E., Vacca, A., Provero, P., Isella, V., Vanacore, N., Agosta, F., Appollonio, I., Caffarra, P., Pettenuzzo, I., Sambati, R., Quaranta, D., Guglielmi, V., Logroscino, G., ... Bruni, A. C. (2020). Behavioral and psychological effects of coronavirus disease-19 quarantine in patients with dementia. *Frontiers in Psychiatry*, 11, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2020.578015>
- Cai, Z., Hussain, M. D., & Yan, L. J. (2014). Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. In *International Journal of Neuroscience* (Vol. 124, Issue 5, pp. 307–321). Informa Healthcare. <https://doi.org/10.3109/00207454.2013.833510>
- Calsolaro, V., & Edison, P. (2016). Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. In *Alzheimer's and Dementia* (Vol. 12, Issue 6, pp. 719–732). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.02.010>
- Cameron, H. A., & Glover, L. R. (2015). Adult neurogenesis: Beyond learning and memory*. *Annual Review of Psychology*, 66, 53–81. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-010814-015006>
- Campioni, S., Mannini, B., Zampagni, M., Pensalfini, A., Parrini, C., Evangelisti, E., Relini, A., Stefani, M., Dobson, C. M., Cecchi, C., & Chiti, F. (2010). A causative link between the structure of aberrant protein oligomers and their toxicity. *Nature Chemical Biology*, 6(2), 140–147. <https://doi.org/10.1038/nchembio.283>
- Camus, S., Ko, W. K. D., Pioli, E., & Bezard, E. (2015). Why bother using non-human primate models of cognitive disorders in translational research? In *Neurobiology of Learning and Memory* (Vol. 124, pp. 123–129). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.06.012>
- Canevelli, M., Valletta, M., Toccaceli Blasi, M., Remoli, G., Sarti, G., Nuti, F., Sciancalepore, F., Ruberti, E., Cesari, M., & Bruno, G. (2020). Facing Dementia During the COVID-19 Outbreak. In *Journal of the American Geriatrics Society*

- (Vol. 68, Issue 8, pp. 1673–1676). Blackwell Publishing Inc.
<https://doi.org/10.1111/jgs.16644>
- Caprio, V., Badimon, L., di Napoli, M., Fang, W. H., Ferris, G. R., Guo, B., Iemma, R. S., Liu, D., Zeinolabediny, Y., & Slevin, M. (2018). pCRP-mCRP dissociation mechanisms as potential targets for the development of small-molecule anti-inflammatory chemotherapeutics. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 9, Issue MAY). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01089>
- Carmona, S., Zahs, K., Wu, E., Dakin, K., Bras, J., & Guerreiro, R. (2018). The role of TREM2 in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. In *The Lancet Neurology* (Vol. 17, Issue 8, pp. 721–730). Lancet Publishing Group.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30232-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30232-1)
- Castillo-Mariqueo, L., & Giménez-Llort, L. (2020). Indexes for flotation and circling, two non-search behaviors in the water maze, sensitive to D-galactose-induced accelerated aging and Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*, 377.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112229>
- Castro-Alvarez, J. F., Uribe-Arias, S. A., Mejía-Raigosa, D., & Cardona-Gómez, G. P. (2014). Cyclin-dependent kinase 5, a node protein in diminished tauopathy: a systems biology approach. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6(AUG), 232.
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00232>
- Cattaud, V., Bezzina, C., Rey, C. C., Lejards, C., Dahan, L., & Verret, L. (2018). Early disruption of parvalbumin expression and perineuronal nets in the hippocampus of the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease can be rescued by enriched environment. *Neurobiology of Aging*, 72, 147–158.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.08.024>
- Cerejeira, J., Lagarto, L., & Mukaetova-Ladinska, E. B. (2012). Behavioral and psychological symptoms of dementia. *Frontiers in Neurology*, MAY.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2012.00073>
- Cerejeira, J., Lagarto, L., Mukaetova-Ladinska, E. B., Agosta, F., & San, V.-S. (2012). *Behavioral and psychological symptoms of dementia*.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2012.00073>
- Chai, C. K. (2007). The genetics of Alzheimer's disease. *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias*, 22(1), 37–41.
<https://doi.org/10.1177/1533317506295655>

- Chalermphanupap, T., Weinshenker, D., & Rorabaugh, J. M. (2017). Down but Not Out: The Consequences of Pretangle Tau in the Locus Coeruleus. In *Neural Plasticity* (Vol. 2017). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2017/7829507>
- Chen, Z., & Zhong, C. (2014). Oxidative stress in Alzheimer's disease. In *Neuroscience Bulletin* (Vol. 30, Issue 2, pp. 271–281). Science Press. <https://doi.org/10.1007/s12264-013-1423-y>
- Cheng, G., Huang, C., Deng, H., & Wang, H. (2012). Diabetes as a risk factor for dementia and mild cognitive impairment: A meta-analysis of longitudinal studies. In *Internal Medicine Journal* (Vol. 42, Issue 5, pp. 484–491). Intern Med J. <https://doi.org/10.1111/j.1445-5994.2012.02758.x>
- Clavaguera, F., Bolmont, T., Crowther, R. A., Abramowski, D., Frank, S., Probst, A., Fraser, G., Stalder, A. K., Beibel, M., Staufenbiel, M., Jucker, M., Goedert, M., & Tolnay, M. (2009). Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nature Cell Biology*, *11*(7), 909–913. <https://doi.org/10.1038/ncb1901>
- Cloak, N., & al Khalili, Y. (2020). Behavioral And Psychological Symptoms In Dementia. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31855379>
- Cobar, L. F., Yuan, L., & Tashiro, A. (2017). Place cells and long-term potentiation in the hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory*, *138*, 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.10.010>
- Cohen, S. J., Munchow, A. H., Rios, L. M., Zhang, G., Ásgeirsdóttir, H. N., & Stackman, R. W. (2013). The rodent hippocampus is essential for nonspatial object memory. *Current Biology*, *23*(17), 1685–1690. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.07.002>
- Cohen, S. J., & Stackman, R. W. (2015). Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. *Behavioural Brain Research*, *285*, 105–117. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.002>
- Colié, S., Sarroca, S., Palenzuela, R., Garcia, I., Matheu, A., Corpas, R., Dotti, C. G., Esteban, J. A., Sanfeliu, C., & Nebreda, A. R. (2017). Neuronal p38 α mediates synaptic and cognitive dysfunction in an Alzheimer's mouse model by controlling β -amyloid production. *Scientific Reports*, *7*. <https://doi.org/10.1038/srep45306>
- Cooper, C., Sommerlad, A., Lyketsos, C. G., & Livingston, G. (2015). Modifiable predictors of dementia in mild cognitive impairment: A systematic review and

- meta-analysis. In *American Journal of Psychiatry* (Vol. 172, Issue 4, pp. 323–334). American Psychiatric Association. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2014.14070878>
- Corpas, R., Griñán-Ferré, C., Palomera-Ávalos, V., Porquet, D., García de Frutos, P., Franciscato Cozzolino, S. M., Rodríguez-Farré, E., Pallàs, M., Sanfeliu, C., & Cardoso, B. R. (2018). Melatonin induces mechanisms of brain resilience against neurodegeneration. *Journal of Pineal Research*, *65*(4). <https://doi.org/10.1111/jpi.12515>
- Corpas, R., Griñán-Ferré, C., Rodríguez-Farré, E., Pallàs, M., & Sanfeliu, C. (2019). Resveratrol Induces Brain Resilience Against Alzheimer Neurodegeneration Through Proteostasis Enhancement. *Molecular Neurobiology*, *56*(2), 1502–1516. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1157-y>
- Corpas, R., Solana, E., de la Rosa, A., Sarroca, S., Griñán-Ferré, C., Oriol, M., Corbella, E., Rodríguez-Farré, E., Vina, J., Pallàs, M., Bartrés-Faz, D., Gomez-Cabrera, M. C., & Sanfeliu, C. (2019). Peripheral Maintenance of the Axis SIRT1-SIRT3 at Youth Level May Contribute to Brain Resilience in Middle-Aged Amateur Rugby Players. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00352>
- Coughlan, G., Laczó, J., Hort, J., Minihane, A. M., & Hornberger, M. (2018). Spatial navigation deficits — Overlooked cognitive marker for preclinical Alzheimer disease? In *Nature Reviews Neurology* (Vol. 14, Issue 8, pp. 496–506). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0031-x>
- Couturier, J., Stancu, I. C., Schakman, O., Pierrot, N., Huaux, F., Kienlen-Campard, P., Dewachter, I., & Octave, J. N. (2016). Activation of phagocytic activity in astrocytes by reduced expression of the inflammasome component ASC and its implication in a mouse model of Alzheimer disease. *Journal of Neuroinflammation*, *13*(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0477-y>
- Crous-Bou, M., Minguillón, C., Gramunt, N., & Molinuevo, J. L. (2017). Alzheimer's disease prevention: From risk factors to early intervention. In *Alzheimer's Research and Therapy* (Vol. 9, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13195-017-0297-z>
- Crowe, S. E., & Ellis-Davies, G. C. R. (2014). Spine pruning in 5xFAD mice starts on basal dendrites of layer 5 pyramidal neurons. *Brain Structure and Function*, *219*(2), 571–580. <https://doi.org/10.1007/s00429-013-0518-6>

- Cruchaga, C., Kauwe, J. S. K., Harari, O., Jin, S. C., Cai, Y., Karch, C. M., Benitez, B. A., Jeng, A. T., Skorupa, T., Carrell, D., Bertelsen, S., Bailey, M., McKean, D., Shulman, J. M., de Jager, P. L., Chibnik, L., Bennett, D. A., Arnold, S. E., Harold, D., ... Goate, A. M. (2013). GWAS of cerebrospinal fluid tau levels identifies risk variants for alzheimer's disease. *Neuron*, 78(2), 256–268.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.02.026>
- Cruz, J. C., & Tsai, L. H. (2004). Cdk5 deregulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. In *Trends in Molecular Medicine* (Vol. 10, Issue 9, pp. 452–458). Trends Mol Med. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.07.001>
- Cryan, J. F., & Holmes, A. (2005). Model organisms: The ascent of mouse: Advances in modelling human depression and anxiety. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 4, Issue 9, pp. 775–790). Nat Rev Drug Discov.
<https://doi.org/10.1038/nrd1825>
- Cuberas-Borrós, G., Roca, I., Boada, M., Tárraga, L., Hernández, I., Buendia, M., Rubio, L., Torres, G., Bittini, Á., Guzmán-De-Villoria, J. A., Pujadas, F., Torres, M., Núñez, L., Castell, J., & Páez, A. (2018). Longitudinal Neuroimaging Analysis in Mild-Moderate Alzheimer's Disease Patients Treated with Plasma Exchange with 5 Human Albumin. *Journal of Alzheimer's Disease*, 61(1), 321–332.
<https://doi.org/10.3233/JAD-170693>
- Cummings, J. L., Morstorf, T., & Zhong, K. (2014). Alzheimer's disease drug-development pipeline: Few candidates, frequent failures. *Alzheimer's Research and Therapy*, 6(4). <https://doi.org/10.1186/alzrt269>
- Cunningham, C., Campion, S., Lunnon, K., Murray, C. L., Woods, J. F. C., Deacon, R. M. J., Rawlins, J. N. P., & Perry, V. H. (2009). Systemic Inflammation Induces Acute Behavioral and Cognitive Changes and Accelerates Neurodegenerative Disease. *Biological Psychiatry*, 65(4), 304–312.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.07.024>
- Day, G. S., Cruchaga, C., Wingo, T., Schindler, S. E., Coble, D., & Morris, J. C. (2019). Association of Acquired and Heritable Factors With Intergenerational Differences in Age at Symptomatic Onset of Alzheimer Disease Between Offspring and Parents With Dementia. *JAMA Network Open*, 2(10), e1913491.
<https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2019.13491>

- Denninger, J. K., Smith, B. M., & Kirby, E. D. (2018). Novel object recognition and object location behavioral testing in mice on a budget. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(141). <https://doi.org/10.3791/58593>
- Devi, L., & Ohno, M. (2010). Phospho-eIF2 α level is important for determining abilities of BACE1 reduction to rescue cholinergic neurodegeneration and memory defects in 5XFAD mice. *PLoS ONE*, 5(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012974>
- Devraj, K., Poznanovic, S., Spahn, C., Schwall, G., Harter, P. N., Mittelbronn, M., Antoniello, K., Paganetti, P., Muhs, A., Heilemann, M., Hawkins, R. A., Schrattenholz, A., & Liebner, S. (2016). BACE-1 is expressed in the blood-brain barrier endothelium and is upregulated in a murine model of Alzheimer's disease. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 36(7), 1281–1294. <https://doi.org/10.1177/0271678X15606463>
- di Napoli, M., Slevin, M., Popa-Wagner, A., Singh, P., Lattanzi, S., & Divani, A. A. (2018). Monomeric C-reactive protein and cerebral hemorrhage: From bench to bedside. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 9, Issue SEP). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01921>
- Diniz, B. S., Butters, M. A., Albert, S. M., Dew, M. A., & Reynolds, C. F. (2013). Late-life depression and risk of vascular dementia and Alzheimer's disease: Systematic review and meta-analysis of community-based cohort studies. In *British Journal of Psychiatry* (Vol. 202, Issue 5, pp. 329–335). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.112.118307>
- Do, J., Kim, J. I., Bakes, J., Lee, K., & Kaang, B. K. (2013). Functional roles of neurotransmitters and neuromodulators in the dorsal striatum. In *Learning and Memory* (Vol. 20, Issue 1, pp. 21–28). Learn Mem. <https://doi.org/10.1101/lm.025015.111>
- Drummond, E., & Wisniewski, T. (2017). Alzheimer's disease: experimental models and reality. In *Acta Neuropathologica* (Vol. 133, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1662-x>
- DuBoff, B., Götz, J., & Feany, M. B. (2012). Tau Promotes Neurodegeneration via DRP1 Mislocalization In Vivo. *Neuron*, 75(4), 618–632. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.026>
- Dubois, B., Feldman, H. H., Jacova, C., DeKosky, S. T., Barberger-Gateau, P., Cummings, J., Delacourte, A., Galasko, D., Gauthier, S., Jicha, G., Meguro, K.,

- O'Brien, J., Pasquier, F., Robert, P., Rossor, M., Salloway, S., Stern, Y., Visser, P. J., & Scheltens, P. (2007). Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. In *Lancet Neurology* (Vol. 6, Issue 8, pp. 734–746). Lancet Neurol. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(07\)70178-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70178-3)
- Duclot, F., & Kabbaj, M. (2017). The role of early growth response 1 (EGR1) in brain plasticity and neuropsychiatric disorders. In *Frontiers in Behavioral Neuroscience* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00035>
- Dufort-Gervais, J., Mongrain, V., & Brouillette, J. (2019). Bidirectional relationships between sleep and amyloid-beta in the hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory*, *160*, 108–117. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.06.009>
- Dutta, S., & Sengupta, P. (2016). Men and mice: Relating their ages. *Life Sciences*, *152*, 244–248. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.10.025>
- Egan, M. F., Kost, J., Tariot, P. N., Aisen, P. S., Cummings, J. L., Vellas, B., Sur, C., Mukai, Y., Voss, T., Furtek, C., Mahoney, E., Mozley, L. H., Vandenberghe, R., Mo, Y., & Michelson, D. (2018). Randomized trial of verubecestat for mild-to-moderate Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, *378*(18), 1691–1703. <https://doi.org/10.1056/NEJMoal706441>
- Eichenbaum, H., Otto, T., & Cohen, N. J. (1992). The hippocampus-what does it do? In *Behavioral and Neural Biology* (Vol. 57, Issue 1, pp. 2–36). Behav Neural Biol. [https://doi.org/10.1016/0163-1047\(92\)90724-I](https://doi.org/10.1016/0163-1047(92)90724-I)
- Eskici, G., & Axelsen, P. H. (2012). Copper and oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry*, *51*(32), 6289–6311. <https://doi.org/10.1021/bi3006169>
- Fanny M. Elahi and Bruce L. Miller. (2017). A clinicopathological approach to the diagnosis of dementia. *Nat Rev Neurol*, *13*, 457–476.
- Fanselow, M. S., & Dong, H. W. (2010). Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? In *Neuron* (Vol. 65, Issue 1, pp. 7–19). Neuron. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.031>
- Fernández, M., Gobartt, A. L., & Balañá, M. (2010). Behavioural symptoms in patients with Alzheimer's disease and their association with cognitive impairment. *BMC Neurology*, *10*. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-10-87>
- Fernández-Cabello, S., Kronbichler, M., van Dijk, K. R. A., Goodman, J. A., Nathan Spreng, R., & Schmitz, T. W. (2020). Basal forebrain volume reliably predicts the

- cortical spread of Alzheimer's degeneration. *Brain*, 143(3), 993–1009.
<https://doi.org/10.1093/brain/awaa012>
- Ferrer, M. D., Sureda, A., Mestre, A., Tur, J. A., & Pons, A. (2010). The double edge of reactive oxygen species as damaging and signaling molecules in HL60 cell culture. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 25(2–3), 241–252.
<https://doi.org/10.1159/000276558>
- Fjell, A. M., McEvoy, L., Holland, D., Dale, A. M., & Walhovd, K. B. (2014). What is normal in normal aging? Effects of aging, amyloid and Alzheimer's disease on the cerebral cortex and the hippocampus. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 117, pp. 20–40). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2014.02.004>
- Flanigan, T. J., Xue, Y., Rao, S. K., Dhanushkodi, A., & McDonald, M. P. (2014). Abnormal vibrissa-related behavior and loss of barrel field inhibitory neurons in 5xFAD transgenics. *Genes, Brain and Behavior*, 13(5), 488–500.
<https://doi.org/10.1111/gbb.12133>
- Fleisher, A. S., Chen, K., Quiroz, Y. T., Jakimovich, L. J., Gutierrez Gomez, M., Langois, C. M., Langbaum, J. B. S., Roontiva, A., Thiyyagura, P., Lee, W., Ayutyanont, N., Lopez, L., Moreno, S., Muñoz, C., Tirado, V., Acosta-Baena, N., Fagan, A. M., Giraldo, M., Garcia, G., ... Reiman, E. M. (2015). Associations between biomarkers and age in the presenilin 1 E280A autosomal dominant Alzheimer disease kindred: A cross-sectional study. *JAMA Neurology*, 72(3), 316–324. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.3314>
- Forner, S., Baglietto-Vargas, D., Martini, A. C., Trujillo-Estrada, L., & LaFerla, F. M. (2017). Synaptic Impairment in Alzheimer's Disease: A Dysregulated Symphony. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 40, Issue 6, pp. 347–357). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.04.002>
- Franco Bocanegra, D. K., Nicoll, J. A. R., & Boche, D. (2018). Innate immunity in Alzheimer's disease: the relevance of animal models? In *Journal of Neural Transmission* (Vol. 125, Issue 5, pp. 827–846). Springer-Verlag Wien.
<https://doi.org/10.1007/s00702-017-1729-4>
- Frost, B., Jacks, R. L., & Diamond, M. I. (2009). Propagation of Tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *Journal of Biological Chemistry*, 284(19), 12845–12852. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808759200>

- Furman, D., Campisi, J., Verdin, E., Carrera-Bastos, P., Targ, S., Franceschi, C., Ferrucci, L., Gilroy, D. W., Fasano, A., Miller, G. W., Miller, A. H., Mantovani, A., Weyand, C. M., Barzilai, N., Goronzy, J. J., Rando, T. A., Effros, R. B., Lucia, A., Kleinstreuer, N., & Slavich, G. M. (2019). Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nature Medicine*, *25*(12), 1822–1832. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0675-0>
- Gabin, J. M., Saltvedt, I., Tambs, K., & Holmen, J. (2018). The association of high sensitivity C-reactive protein and incident Alzheimer disease in patients 60 years and older: The HUNT study, Norway. *Immunity and Ageing*, *15*(1). <https://doi.org/10.1186/s12979-017-0106-3>
- Gal-Ben-Ari, S., & Rosenblum, K. (2012). Molecular mechanisms underlying memory consolidation of taste information in the cortex. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *5*(JANUARY 2012). <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2011.00087>
- Gale, S. A., Acar, D., & Daffner, K. R. (2018). Dementia. In *American Journal of Medicine* (Vol. 131, Issue 10, pp. 1161–1169). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2018.01.022>
- Gao, Y., Tan, L., Yu, J.-T., & Tan, L. (2018). Tau in Alzheimer's Disease: Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Current Alzheimer Research*, *15*(3). <https://doi.org/10.2174/1567205014666170417111859>
- Garcia, P. Y., Roussel, M., Bugnicourt, J. M., Lamy, C., Canaple, S., Peltier, J., Loas, G., Deramond, H., & Godefroy, O. (2013). Cognitive impairment and dementia after intracerebral hemorrhage: A cross-sectional study of a hospital-based series. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, *22*(1), 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2011.06.013>
- García-Mesa, Y., Colie, S., Corpas, R., Cristòfol, R., Comellas, F., Nebreda, A. R., Gim'Nez-Llort, L., & Sanfeliu, C. (2015). Oxidative Stress Is a Central Target for Physical Exercise Neuroprotection Against Pathological Brain Aging. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, *71*(1), 40–49. <https://doi.org/10.1093/gerona/glv005>
- García-Mesa, Y., López-Ramos, J. C., Giménez-Llort, L., Revilla, S., Guerra, R., Gruart, A., Laferla, F. M., Cristòfol, R., Delgado-García, J. M., & Sanfeliu, C. (2011). Physical exercise protects against Alzheimer's disease in 3xTg-AD mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, *24*(3), 421–454. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-101635>

- Gardner, R. C., & Yaffe, K. (2014). Traumatic brain injury may increase risk of young onset dementia. *Annals of Neurology*, *75*(3), 339–341.
<https://doi.org/10.1002/ana.24121>
- Garre-Olmo, J. (2018). Epidemiology of alzheimer's disease and other dementias. In *Revista de Neurologia* (Vol. 66, Issue 11, pp. 377–386). Revista de Neurologia.
<https://doi.org/10.33588/rn.6611.2017519>
- Garre-Olmo, J., Flaqué, M., Gich, J., Pulido, T. O., Turbau, J., Vallmajo, N., Viñas, M., López-Pousa, S., Castellanos, M., Genís, D., Meléndez, R., Molins, A., Ramió, L., Serena, J., Silva, Y., Hernández, M., Lax, C., Lozano, M., Pericot, I., ... Casas, I. (2009). A clinical registry of dementia based on the principle of epidemiological surveillance. *BMC Neurology*, *9*. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-9-5>
- Geng, J., Zhao, C., Ren, J., & Qu, X. (2010). Alzheimer's disease amyloid beta converting left-handed Z-DNA back to right-handed B-form. *Chemical Communications*, *46*(38), 7187–7189. <https://doi.org/10.1039/c0cc02049d>
- Ghosh, A., Torraville, S. E., Mukherjee, B., Walling, S. G., Martin, G. M., Harley, C. W., & Yuan, Q. (2019). An experimental model of Braak's pretangle proposal for the origin of Alzheimer's disease: The role of locus coeruleus in early symptom development. *Alzheimer's Research and Therapy*, *11*(1).
<https://doi.org/10.1186/s13195-019-0511-2>
- Ghosh, S., Wu, M. D., Shaftel, S. S., Kyrkanides, S., LaFerla, F. M., Olschowka, J. A., & Kerry O'Banion, M. (2013). Sustained interleukin-1 β overexpression exacerbates tau pathology despite reduced amyloid burden in an alzheimer's mouse model. *Journal of Neuroscience*, *33*(11), 5053–5064.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4361-12.2013>
- Giannoni, P., Arango-Lievano, M., Neves, I. das, Rousset, M. C., Baranger, K., Rivera, S., Jeanneteau, F., Claeysen, S., & Marchi, N. (2016). Cerebrovascular pathology during the progression of experimental Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, *88*, 107–117. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.01.001>
- Giménez-Llort, L., Blázquez, G., Cañete, T., Johansson, B., Oddo, S., Tobeña, A., LaFerla, F. M., & Fernández-Teruel, A. (2007). Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer's disease in mice: A role for intraneuronal amyloid. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 31, Issue 1, pp. 125–147). Neurosci Biobehav Rev. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2006.07.007>

- Goedert, M., Wischik, C. M., Crowther, R. A., Walker, J. E., & Klug, A. (1988). Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: Identification as the microtubule-associated protein tau. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(11), 4051–4055. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.11.4051>
- Goedert, Michel, & Spillantini, M. G. (2017). Propagation of Tau aggregates Tim Bliss. In *Molecular Brain* (Vol. 10, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13041-017-0298-7>
- Gómez-Isla, T., Hollister, R., West, H., Mui, S., Growdon, J. H., Petersen, R. C., Parisi, J. E., & Hyman, B. T. (1997). Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 41(1), 17–24. <https://doi.org/10.1002/ana.410410106>
- Greenough, M. A., Camakaris, J., & Bush, A. I. (2013). Metal dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease. In *Neurochemistry International* (Vol. 62, Issue 5, pp. 540–555). Neurochem Int. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.08.014>
- Gresa-Arribas, N., Viéitez, C., Dentesano, G., Serratos, J., Saura, J., & Solà, C. (2012). Modelling Neuroinflammation In Vitro: A Tool to Test the Potential Neuroprotective Effect of Anti-Inflammatory Agents. *PLoS ONE*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045227>
- Griñán-Ferré, C., Codony, S., Pujol, E., Yang, J., Leiva, R., Escolano, C., Puigoriol-Illamola, D., Companys-Aleman, J., Corpas, R., Sanfeliu, C., Pérez, B., Loza, M. I., Brea, J., Morisseau, C., Hammock, B. D., Vázquez, S., Pallàs, M., & Galdeano, C. (2020). Pharmacological Inhibition of Soluble Epoxide Hydrolase as a New Therapy for Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics*, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s13311-020-00854-1>
- Griñán-Ferré, C., Corpas, R., Puigoriol-Illamola, D., Palomera-Ávalos, V., Sanfeliu, C., & Pallàs, M. (2018). Understanding Epigenetics in the Neurodegeneration of Alzheimer's Disease: SAMP8 Mouse Model. In *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 62, Issue 3, pp. 943–963). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/JAD-170664>
- Griñán-Ferré, C., Sarroca, S., Ivanova, A., Puigoriol-Illamola, D., Aguado, F., Camins, A., Sanfeliu, C., & Pallàs, M. (2016). Epigenetic mechanisms underlying cognitive impairment and Alzheimer disease hallmarks in 5XFAD mice. *Aging*, 8(4), 664–684. <https://doi.org/10.18632/aging.100906>

- Grossberg, G. T., Manes, F., Allegri, R. F., Gutiérrez-Robledo, L. M., Gloger, S., Xie, L., Jia, X. D., Pejović, V., Miller, M. L., Perhach, J. L., & Graham, S. M. (2013). The safety, tolerability, and efficacy of once-daily memantine (28 mg): A multinational, randomized, double-blind, placebo-controlled trial in patients with moderate-to-severe alzheimer's disease taking cholinesterase inhibitors. *CNS Drugs*, 27(6), 469–478. <https://doi.org/10.1007/s40263-013-0077-7>
- Gu, L., Wu, D., Tang, X., Qi, X., Li, X., Bai, F., Chen, X., Ren, Q., & Zhang, Z. (2018). Myelin changes at the early stage of 5XFAD mice. *Brain Research Bulletin*, 137, 285–293. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.12.013>
- Gu, Y., Vorburger, R., Scarmeas, N., Luchsinger, J. A., Manly, J. J., Schupf, N., Mayeux, R., & Brickman, A. M. (2017). Circulating inflammatory biomarkers in relation to brain structural measurements in a non-demented elderly population. *Brain, Behavior, and Immunity*, 65, 150–160. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.04.022>
- Guo, S., & Lo, E. H. (2009). Dysfunctional cell-cell signaling in the neurovascular unit as a paradigm for central nervous system disease. *Stroke*, 40(3 SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.534388>
- Gupta, A., & Iadecola, C. (2015). Impaired A β clearance: A potential link between atherosclerosis and Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7(MAY). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00115>
- Gustafson, D. R., Bäckman, K., Joas, E., Waern, M., Östling, S., Guo, X., & Skoog, I. (2012). 37 years of body mass index and dementia: Observations from the prospective population study of women in Gothenburg, Sweden. *Journal of Alzheimer's Disease*, 28(1), 163–171. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-110917>
- H. Ferreira-Vieira, T., M. Guimaraes, I., R. Silva, F., & M. Ribeiro, F. (2016). Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Current Neuropharmacology*, 14(1), 101–115. <https://doi.org/10.2174/1570159x13666150716165726>
- Hachinski, V. (2018). The convergence of stroke and dementia. In *Arquivos de Neuro-Psiquiatria* (Vol. 76, Issue 12, pp. 849–852). Associacao Arquivos de Neuro-Psiquiatria. <https://doi.org/10.1590/0004-282x20180148>
- Hane, F., Drolle, E., Gaikwad, R., Faught, E., & Leonenko, Z. (2011). Amyloid- β aggregation on model lipid membranes: An atomic force microscopy study.

- Journal of Alzheimer's Disease*, 26(3), 485–494. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-102112>
- Hardy, J., & Allsop, D. (1991). Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. In *Trends in Pharmacological Sciences* (Vol. 12, Issue C, pp. 383–388). Trends Pharmacol Sci. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(91\)90609-V](https://doi.org/10.1016/0165-6147(91)90609-V)
- Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Gerrish, A., Hamshere, M. L., Pahwa, J. S., Moskvin, V., Dowzell, K., Williams, A., Jones, N., Thomas, C., Stretton, A., Morgan, A. R., Lovestone, S., Powell, J., Proitsi, P., Lupton, M. K., Brayne, C., ... Williams, J. (2009). Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *PICALM* associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, 41(10), 1088–1093. <https://doi.org/10.1038/ng.440>
- Hattiangady, B., Mishra, V., Kodali, M., Shuai, B., Rao, X., & Shetty, A. K. (2014). Object location and object recognition memory impairments, motivation deficits and depression in a model of Gulf War illness. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8(MAR). <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00078>
- Hebert, L. E., Weuve, J., Scherr, P. A., & Evans, D. A. (2013). Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. *Neurology*, 80(19), 1778–1783. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31828726f5>
- Hendrickx, A., Pierrot, N., Tasiaux, B., Schakman, O., Kienlen-Campard, P., de Smet, C., & Octave, J. N. (2014). Epigenetic regulations of immediate early genes expression involved in memory formation by the amyloid precursor protein of Alzheimer disease. *PLoS ONE*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099467>
- Heneka, M. T., Carson, M. J., Khoury, J. el, Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., ... Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. In *The Lancet Neurology* (Vol. 14, Issue 4, pp. 388–405). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5)
- Henneman, W. J. P., Sluimer, J. D., Barnes, J., van der Flier, W. M., Sluimer, I. C., Fox, N. C., Scheltens, P., Vrenken, H., & Barkhof, F. (2009). Hippocampal atrophy rates in Alzheimer disease: Added value over whole brain volume measures. *Neurology*, 72(11), 999–1007. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000344568.09360.31>

- Heuer, E., F. Rosen, R., Cintron, A., & C. Walker, L. (2012). Nonhuman Primate Models of Alzheimer-Like Cerebral Proteopathy. *Current Pharmaceutical Design*, 18(8), 1159–1169. <https://doi.org/10.2174/138161212799315885>
- Hoesel, B., & Schmid, J. A. (2013). The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer. In *Molecular Cancer* (Vol. 12, Issue 1). Mol Cancer. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-86>
- Hollingworth, P., Harold, D., Sims, R., Gerrish, A., Lambert, J. C., Carrasquillo, M. M., Abraham, R., Hamshere, M. L., Pahwa, J. S., Moskvin, V., Dowzell, K., Jones, N., Stretton, A., Thomas, C., Richards, A., Ivanov, D., Widdowson, C., Chapman, J., Lovestone, S., ... Williams, J. (2011). Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, 43(5), 429–436. <https://doi.org/10.1038/ng.803>
- Hoover, B. R., Reed, M. N., Su, J., Penrod, R. D., Kotilinek, L. A., Grant, M. K., Pitstick, R., Carlson, G. A., Lanier, L. M., Yuan, L. L., Ashe, K. H., & Liao, D. (2010). Tau Mislocalization to Dendritic Spines Mediates Synaptic Dysfunction Independently of Neurodegeneration. *Neuron*, 68(6), 1067–1081. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.030>
- Howard, R., McShane, R., Lindesay, J., Ritchie, C., Baldwin, A., Barber, R., Burns, A., Dening, T., Findlay, D., Holmes, C., Hughes, A., Jacoby, R., Jones, R., Jones, R., McKeith, I., Macharouthu, A., O'Brien, J., Passmore, P., Sheehan, B., ... Phillips, P. (2012). Donepezil and Memantine for Moderate-to-Severe Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*, 366(10), 893–903. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1106668>
- Hsiao, K. K., Borchelt, D. R., Olson, K., Johannsdottir, R., Kitt, C., Yunis, W., Xu, S., Eckman, C., Younkin, S., Price, D., Ladecola, C., Brent Clark, H., & Carlson, G. (2003). Age-Related CNS Disorder and Early Death in Transgenic FVB/N Mice Overexpressing Alzheimer Amyloid Precursor Proteins. In *Neuron* (Vol. 15).
- Hu, Y. T., Chen, X. L., Huang, S. H., Zhu, Q. bin, Yu, S. Y., Shen, Y., Sluiter, A., Verhaagen, J., Zhao, J., Swaab, D., & Bao, A. M. (2019). Early growth response-1 regulates acetylcholinesterase and its relation with the course of Alzheimer's disease. *Brain Pathology*, 29(4), 502–512. <https://doi.org/10.1111/bpa.12688>

- Huang, Y. M., Shen, J., & Zhao, H. L. (2019). Major Clinical Trials Failed the Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease. *Journal of the American Geriatrics Society*, 67(4), 841–844. <https://doi.org/10.1111/jgs.15830>
- Hung, S. Y., & Fu, W. M. (2017). Drug candidates in clinical trials for Alzheimer's disease. In *Journal of Biomedical Science* (Vol. 24, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0355-7>
- Iadecola, C. (2013). The Pathobiology of Vascular Dementia. In *Neuron* (Vol. 80, Issue 4, pp. 844–866). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.008>
- Iba, M., Guo, J. L., McBride, J. D., Zhang, B., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2013). Synthetic tau fibrils mediate transmission of neurofibrillary tangles in a transgenic mouse model of alzheimer's-like tauopathy. *Journal of Neuroscience*, 33(3), 1024–1037. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2642-12.2013>
- Imbimbo, B. pietro, Ippati, S., & Watling, M. (2020). Should drug discovery scientists still embrace the amyloid hypothesis for Alzheimer's disease or should they be looking elsewhere? *Expert Opinion on Drug Discovery*, 15(11), 1–11. <https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1793755>
- Jack, C. R., Knopman, D. S., Jagust, W. J., Shaw, L. M., Aisen, P. S., Weiner, M. W., Petersen, R. C., & Trojanowski, J. Q. (2010). Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. In *The Lancet Neurology* (Vol. 9, Issue 1, pp. 119–128). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70299-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70299-6)
- Jacquin, A., Binquet, C., Rouaud, O., Graule-Petot, A., Daubail, B., Osseby, G. V., Bonithon-Kopp, C., Giroud, M., & Béjot, Y. (2014). Post-stroke cognitive impairment: High prevalence and determining factors in a cohort of mild stroke. *Journal of Alzheimer's Disease*, 40(4), 1029–1038. <https://doi.org/10.3233/JAD-131580>
- Jaroudi, W., Garami, J., Garrido, S., Hornberger, M., Keri, S., & Moustafa, A. A. (2017). Factors underlying cognitive decline in old age and Alzheimer's disease: The role of the hippocampus. *Reviews in the Neurosciences*, 28(7), 705–714. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2016-0086>
- Jawhar, S., Trawicka, A., Jenneckens, C., Bayer, T. A., & Wirths, O. (2012). Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal A β aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease.

- Neurobiology of Aging*, 33(1), 196.e29-196.e40.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.05.027>
- Jellinger, K. A. (2011). Interaction between α -synuclein and other proteins in neurodegenerative disorders. *TheScientificWorldJournal*, 11, 1893–1907.
<https://doi.org/10.1100/2011/371893>
- Jellinger, K., Braak, H., Braak, E., & Fischer, P. (1991). Alzheimer lesions in the entorhinal region and isocortex in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 640, 203–209. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1991.tb00218.x>
- Jia, Z. K., Li, H. Y., Liang, Y. L., Potempa, L. A., Ji, S. R., & Wu, Y. (2018). Monomeric C-reactive protein binds and neutralizes receptor activator of NF- κ B ligand-induced osteoclast differentiation. *Frontiers in Immunology*, 9(FEB).
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00234>
- Jiang, T., Yu, J. T., Zhu, X. C., & Tan, L. (2013). TREM2 in Alzheimer's disease. In *Molecular Neurobiology* (Vol. 48, Issue 1, pp. 180–185). Humana Press Inc.
<https://doi.org/10.1007/s12035-013-8424-8>
- Johns, I., Moschonas, K. E., Medina, J., Ossei-Gerning, N., Kassianos, G., & Halcox, J. P. (2018). Risk classification in primary prevention of CVD according to QRISK2 and JBS3 - '€- heart age', and prevalence of elevated high-sensitivity C reactive protein in the UK cohort of the EURIKA study. *Open Heart*, 5(2), 1–7.
<https://doi.org/10.1136/openhrt-2018-000849>
- Johnson, E. C. B., Ho, K., Yu, G. Q., Das, M., Sanchez, P. E., Djukic, B., Lopez, I., Yu, X., Gill, M., Zhang, W., Paz, J. T., Palop, J. J., & Mucke, L. (2020). Behavioral and neural network abnormalities in human APP transgenic mice resemble those of App knock-in mice and are modulated by familial Alzheimer's disease mutations but not by inhibition of BACE1. *Molecular Neurodegeneration*, 15(1).
<https://doi.org/10.1186/s13024-020-00393-5>
- Jones, M. W., Errington, M. L., French, P. J., Fine, A., Bliss, T. V. P., Garel, S., Charnay, P., Bozon, B., Laroche, S., & Davis, S. (2001). A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. *Nature Neuroscience*, 4(3), 289–296. <https://doi.org/10.1038/85138>
- Jorda, A., Cauli, O., Santonja, J. M., Aldasoro, M., Aldasoro, C., Obrador, E., Vila, J. M., Mauricio, M. D., Iradi, A., Guerra-Ojeda, S., Marchio, P., & Valles, S. L.

- (2019). Changes in chemokines and chemokine receptors expression in a mouse model of Alzheimer's disease. *International Journal of Biological Sciences*, 15(2), 453–463. <https://doi.org/10.7150/ijbs.26703>
- Kalaria, R. N., Akinyemi, R., & Ihara, M. (2016). Stroke injury, cognitive impairment and vascular dementia. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1862(5), 915–925. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.01.015>
- Kametani, F., & Hasegawa, M. (2018). Reconsideration of amyloid hypothesis and tau hypothesis in Alzheimer's disease. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 12, Issue JAN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00025>
- Kamphuis, W., Kooijman, L., Orre, M., Stassen, O., Pekny, M., & Hol, E. M. (2015). GFAP and vimentin deficiency alters gene expression in astrocytes and microglia in wild-type mice and changes the transcriptional response of reactive glia in mouse model for Alzheimer's disease. *GLIA*, 63(6), 1036–1056. <https://doi.org/10.1002/glia.22800>
- Kandimalla, R., & Reddy, P. H. (2017). Therapeutics of Neurotransmitters in Alzheimer's Disease. In *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 57, Issue 4). <https://doi.org/10.3233/JAD-161118>
- Kaneshwaran, K., Olah, M., Tasaki, S., Yu, L., Bradshaw, E. M., Schneider, J. A., Buchman, A. S., Bennett, D. A., de Jager, P. L., & Lim, A. S. P. (2019). Sleep fragmentation, microglial aging, and cognitive impairment in adults with and without Alzheimer's dementia. *Science Advances*, 5(12). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax7331>
- Kang, S. H., Park, Y. H., Lee, D., Kim, J. P., Chin, J., Ahn, Y., Park, S. B., Kim, H. J., Jang, H., Jung, Y. H., Kim, J., Lee, J., Kim, J.-S., Cheon, B. K., Hahn, A., Lee, H., Na, D. L., Kim, Y. J., & Seo, S. W. (2019). The Cortical Neuroanatomy Related to Specific Neuropsychological Deficits in Alzheimer's Continuum. *Dementia and Neurocognitive Disorders*, 18(3), 77. <https://doi.org/10.12779/dnd.2019.18.3.77>
- Kanno, T., Tsuchiya, A., & Nishizaki, T. (2014). Hyperphosphorylation of Tau at Ser396 occurs in the much earlier stage than appearance of learning and memory disorders in 5XFAD mice. *Behavioural Brain Research*, 274, 302–306. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.034>
- Karch, C. M., & Goate, A. M. (2015). Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. In *Biological Psychiatry* (Vol. 77, Issue 1, pp. 43–51). Elsevier USA. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.05.006>

- Kazui, H., Yoshiyama, K., Kanemoto, H., Suzuki, Y., Sato, S., Hashimoto, M., Ikeda, M., Tanaka, H., Hatada, Y., Matsushita, M., Nishio, Y., Mori, E., Tanimukai, S., Komori, K., Yoshida, T., Shimizu, H., Matsumoto, T., Mori, T., Kashibayashi, T., ... Tanaka, T. (2016). Differences of behavioral and psychological symptoms of dementia in disease severity in four major dementias. *PLoS ONE*, *11*(8).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161092>
- Kellett, K. A. B., & Hooper, N. M. (2009). Prion protein and Alzheimer disease. *Prion*, *3*(4), 190. <https://doi.org/10.4161/pri.3.4.9980>
- Kempermann, G., Song, H., & Gage, F. H. (2015). Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *7*(9).
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018812>
- Khan, A., Corbett, A., & Ballard, C. (2017). Emerging treatments for Alzheimer's disease for non-amyloid and non-tau targets. In *Expert Review of Neurotherapeutics* (Vol. 17, Issue 7, pp. 683–695). Taylor and Francis Ltd.
<https://doi.org/10.1080/14737175.2017.1326818>
- Khreiss, T., József, L., Potempa, L. A., & Filep, J. G. (2004). Conformational Rearrangement in C-Reactive Protein Is Required for Proinflammatory Actions on Human Endothelial Cells. *Circulation*, *109*(16), 2016–2022.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000125527.41598.68>
- Kim, Y. S., Lee, K. J., & Kim, H. (2017). Serum tumour necrosis factor- α and interleukin-6 levels in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Psychogeriatrics*, *17*(4), 224–230. <https://doi.org/10.1111/psyg.12218>
- Kinney, J. W., Bemiller, S. M., Murtishaw, A. S., Leisgang, A. M., Salazar, A. M., & Lamb, B. T. (2018). Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, *4*(1), 575–590. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2018.06.014>
- Kitagishi, Y., Nakanishi, A., Ogura, Y., & Matsuda, S. (2014). Dietary regulation of PI3K/AKT/GSK-3 β pathway in Alzheimer's disease. In *Alzheimer's Research and Therapy* (Vol. 6, Issue 3, p. 35). BioMed Central Ltd.
<https://doi.org/10.1186/alzrt265>
- Kivipelto, M., & Solomon, A. (2006). Cholesterol as a risk factor for Alzheimer's disease - epidemiological evidence. *Acta Neurologica Scandinavica*, *114*(s185), 50–57. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2006.00685.x>

- Knierim, J. J. (2015). The hippocampus. In *Current Biology* (Vol. 25, Issue 23, pp. R1116–R1121). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.049>
- Kobayashi, K., Liu, Y., Ichikawa, H., Takemura, S., & Minamiyama, Y. (2020). Effects of bisphenol a on oxidative stress in the rat brain. *Antioxidants*, *9*(3), 1–11. <https://doi.org/10.3390/antiox9030240>
- Kodani, S. D., & Morisseau, C. (2019). Role of epoxy-fatty acids and epoxide hydrolases in the pathology of neuro-inflammation. *Biochimie*, *159*, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.01.020>
- Koffie, R. M., Meyer-Luehmann, M., Hashimoto, T., Adams, K. W., Mielke, M. L., Garcia-Alloza, M., Micheva, K. D., Smith, S. J., Kim, M. L., Lee, V. M., Hyman, B. T., & Spires-Jones, T. L. (2009). Oligomeric amyloid β associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(10), 4012–4017. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811698106>
- Köles, L., Kató, E., Hanuska, A., Zádori, Z. S., Al-Khrasani, M., Zelles, T., Rubini, P., & Illes, P. (2016). Modulation of excitatory neurotransmission by neuronal/glial signalling molecules: interplay between purinergic and glutamatergic systems. *Purinergic Signalling*, *12*(1), 1–24. <https://doi.org/10.1007/s11302-015-9480-5>
- Korczyn, A. D. (2020). Dementia in the COVID-19 Period. *Journal of Alzheimer's Disease*, *75*(4), 1253–1261. <https://doi.org/10.3233/JAD-200609>
- Kudo, T., Imaizumi, K., Tanimukai, H., Katayama, T., Sato, N., Nakamura, Y., Tanaka, T., Kashiwagi, Y., Jinno, Y., Tohyama, M., & Takeda, M. (2000). Are cerebrovascular factors involved in Alzheimer's disease? *Neurobiology of Aging*, *21*(2), 215–224. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(00\)00129-9](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(00)00129-9)
- Kumar, P., Jha, N. K., Jha, S. K., Ramani, K., & Ambasta, R. K. (2015). Tau phosphorylation, molecular chaperones, and ubiquitin E3 Ligase: Clinical relevance in Alzheimer's disease. In *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 43, Issue 2, pp. 341–361). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/JAD-140933>
- Kummer, M. P., Hammerschmidt, T., Martinez, A., Terwel, D., Eichele, G., Witten, A., Figura, S., Stoll, M., Schwartz, S., Pape, H. C., Schultze, J. L., Weinshenker, D., & Heneka, M. T. (2014). Ear2 deletion causes early memory and learning deficits in APP/PS1 mice. *Journal of Neuroscience*, *34*(26), 8845–8854. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4027-13.2014>

- Kuruppu, D. K., & Matthews, B. R. (2013). Young-onset dementia. *Seminars in Neurology*, *33*(4), 365–385. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1359320>
- Lamb, B. T., Bardel, K. A., Kulnane, L. S., Anderson, J. J., Holtz, G., Wagner, S. L., Sisodia, S. S., & Hoeger, E. J. (1999). *Amyloid production and deposition in mutant amyloid precursor protein and presenilin-1 yeast artificial chromosome transgenic mice*. <http://neurosci.nature.com>
- Lambert, J. C., Heath, S., Even, G., Campion, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., Combarros, O., Zelenika, D., Bullido, M. J., Tavernier, B., Letenneur, L., Bettens, K., Berr, C., Pasquier, F., Fiévet, N., Barberger-Gateau, P., Engelborghs, S., de Deyn, P., Mateo, I., ... Amouyel, P. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, *41*(10), 1094–1099. <https://doi.org/10.1038/ng.439>
- Lambert, J. C., Ibrahim-Verbaas, C. A., Harold, D., Naj, A. C., Sims, R., Bellenguez, C., Jun, G., DeStefano, A. L., Bis, J. C., Beecham, G. W., Grenier-Boley, B., Russo, G., Thornton-Wells, T. A., Jones, N., Smith, A. v., Chouraki, V., Thomas, C., Ikram, M. A., Zelenika, D., ... Seshadri, S. (2013). Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, *45*(12), 1452–1458. <https://doi.org/10.1038/ng.2802>
- Lanoiselée, H.-M., Nicolas, G., Wallon, D., Rovelet-Lecrux, A., Lacour, M., Rousseau, S., Richard, A.-C., Pasquier, F., Rollin-Sillaire, A., Martinaud, O., Quillard-Muraine, M., de la Sayette, V., Boutoleau-Bretonniere, C., Etcharry-Bouyx, F., Chauviré, V., Sarazin, M., le Ber, I., Epelbaum, S., Jonveaux, T., ... Campion, D. (2017). APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. *PLOS Medicine*, *14*(3), e1002270. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002270>
- Lawrence, T. (2009). The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. In *Cold Spring Harbor perspectives in biology* (Vol. 1, Issue 6). Cold Spring Harb Perspect Biol. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001651>
- Lee, D. H., Kim, M., Kim, M., Lee, Y. J., Yoo, H. J., Lee, S. H., & Lee, J. H. (2017). Age-dependent alterations in serum cytokines, peripheral blood mononuclear cell cytokine production, natural killer cell activity, and prostaglandin F2 α . *Immunologic Research*, *65*(5), 1009–1016. <https://doi.org/10.1007/s12026-017-8940-0>

- Lénárt, N., Brough, D., & Dénes, Á. (2016). Inflammasomes link vascular disease with neuroinflammation and brain disorders. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 36(10), 1668–1685. <https://doi.org/10.1177/0271678X16662043>
- Lewis, J., McGowan, E., Rockwood, J., Melrose, H., Nacharaju, P., van Slegtenhorst, M., Gwinn-Hardy, K., Murphy, M. P., Baker, M., Yu, X., Duff, K., Hardy, J., Corral, A., Lin, W.-L., Yen, S.-H., Dickson, D. W., Davies, P., & Hutton, M. (2000). *Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein*. <http://genetics.nature.com>
- Leys, D., & Pasquier, F. (2012). Poststroke dementia. *Stroke Syndromes: Third Edition*, 245–254. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139093286.021>
- Li, D., & Yu, F. (2017). Peripheral inflammatory biomarkers and cognitive decline in older adults with and without Alzheimer's disease: A systematic review. In *Journal of Gerontological Nursing* (Vol. 43, Issue 12, pp. 53–60). Slack Incorporated. <https://doi.org/10.3928/00989134-20170519-01>
- Li, K., Li, J., Zheng, J., & Qin, S. (2019). Reactive Astrocytes in Neurodegenerative Diseases. *Aging and Disease*, 10(3), 664. <https://doi.org/10.14336/ad.2018.0720>
- Lim, A. S. P., Kowgier, M., Yu, L., Buchman, A. S., & Bennett, D. A. (2013). Sleep Fragmentation and the Risk of Incident Alzheimer's Disease and Cognitive Decline in Older Persons. *Sleep*, 36(7), 1027–1032. <https://doi.org/10.5665/sleep.2802>
- Lin, H. B., Yang, X. M., Li, T. J., Cheng, Y. F., Zhang, H. T., & Xu, J. P. (2009). Memory deficits and neurochemical changes induced by C-reactive protein in rats: Implication in Alzheimer's disease. *Psychopharmacology*, 204(4), 705–714. <https://doi.org/10.1007/s00213-009-1499-2>
- LIN, H., BHATIA, R., & LAL, R. (2001). Amyloid β protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology. *The FASEB Journal*, 15(13), 2433–2444. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0377com>
- Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., & Gong, C. X. (2002). Involvement of aberrant glycosylation in phosphorylation of tau by cdk5 and GSK-3 β . *FEBS Letters*, 530(1–3), 209–214. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03487-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03487-7)
- Liu, R., Zhou, X. W., Tanila, H., Bjorkdahl, C., Wang, J. Z., Guan, Z. Z., Cao, Y., Gustafsson, J. Å., Winblad, B., & Pei, J. J. (2008). Phosphorylated PP2A (tyrosine 307) is associated with Alzheimer neurofibrillary pathology: In Focus. *Journal of*

- Cellular and Molecular Medicine*, 12(1), 241–257. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00249.x>
- Ljubenkov, P. A., & Geschwind, M. D. (2016). Dementia. *Semin Neurol*, 36, 397–404. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1585096>
- Locascio, J. J., Fukumoto, H., Liang Yap, , Bottiglieri, T., Growdon, J. H., Hyman, B. T., & Irizarry, M. C. (2012). *Plasma Amyloid-Protein and C-reactive Protein in Relation to the Rate of Progression of Alzheimer Disease*. www.archneurol.comDownloadedfrom
- Lord, A., Kalimo, H., Eckman, C., Zhang, X. Q., Lannfelt, L., & Nilsson, L. N. G. (2006). The Arctic Alzheimer mutation facilitates early intraneuronal A β aggregation and senile plaque formation in transgenic mice. *Neurobiology of Aging*, 27(1), 67–77. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2004.12.007>
- Love, S., & Miners, J. S. (2016). Cerebrovascular disease in ageing and Alzheimer's disease. In *Acta Neuropathologica* (Vol. 131, Issue 5, pp. 645–658). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1522-0>
- Lovell, M. A., Xie, C., & Markesbery, W. R. (2001). Acrolein is increased in Alzheimer's disease brain and is toxic to primary hippocampal cultures. *Neurobiology of Aging*, 22(2), 187–194. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(00\)00235-9](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(00)00235-9)
- Lu, F. P., Lin, K. P., & Kuo, H. K. (2009). Diabetes and the risk of multi-system aging phenotypes: A systematic review and meta-analysis. In *PLoS ONE* (Vol. 4, Issue 1). PLoS One. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004144>
- Lu, J. X., Qiang, W., Yau, W. M., Schwieters, C. D., Meredith, S. C., & Tycko, R. (2013). X-Molecular structure of β -amyloid fibrils in alzheimer's disease brain tissue. *Cell*, 154(6), 1257. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.035>
- Luan, Y. Y., & Yao, Y. M. (2018). The clinical significance and potential role of C-reactive protein in chronic inflammatory and neurodegenerative diseases. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 9, Issue JUN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01302>
- Lucassen, P. J., Pruessner, J., Sousa, N., Almeida, O. F. X., van Dam, A. M., Rajkowska, G., Swaab, D. F., & Czéh, B. (2014). Neuropathology of stress. In *Acta Neuropathologica* (Vol. 127, Issue 1, pp. 109–135). Acta Neuropathol. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1223-5>

- Lueptow, L. M. (2017). Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice. *Journal of Visualized Experiments*, 2017(126), 55718. <https://doi.org/10.3791/55718>
- Mahoney, E. R., Dumitrescu, L., Moore, A. M., Cambroner, F. E., de Jager, P. L., Koran, M. E. I., Petyuk, V. A., Robinson, R. A. S., Goyal, S., Schneider, J. A., Bennett, D. A., Jefferson, A. L., & Hohman, T. J. (2019). Brain expression of the vascular endothelial growth factor gene family in cognitive aging and alzheimer's disease. *Molecular Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0458-5>
- Malpas, C. B., Sharmin, S., & Kalincik, T. (2020). The histopathological staging of tau, but not amyloid, corresponds to antemortem cognitive status, dementia stage, functional abilities and neuropsychiatric symptoms. *International Journal of Neuroscience*, 1–21. <https://doi.org/10.1080/00207454.2020.1758087>
- Manji, Z., Rojas, A., Wang, W., Dingleline, R., Varvel, N. H., & Ganesh, T. (2019). 5xFAD Mice Display Sex-Dependent Inflammatory Gene Induction During the Prodromal Stage of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 70(4), 1259–1274. <https://doi.org/10.3233/JAD-180678>
- Maphis, N., Xu, G., Kokiko-Cochran, O. N., Jiang, S., Cardona, A., Ransohoff, R. M., Lamb, B. T., & Bhaskar, K. (2015). Reactive microglia drive tau pathology and contribute to the spreading of pathological tau in the brain. *Brain*, 138(6), 1738–1755. <https://doi.org/10.1093/brain/awv081>
- Marcus, D. L., Thomas, C., Rodriguez, C., Simberkoff, K., Tsai, J. S., Strafaci, J. A., & Freedman, M. L. (1998). Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. *Experimental Neurology*, 150(1), 40–44. <https://doi.org/10.1006/exnr.1997.6750>
- Masliah, E., Hansen, L., Albright, T., Mallory, M., & Terry, R. D. (1991). Immunoelectron microscopic study of synaptic pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 81(4), 428–433. <https://doi.org/10.1007/BF00293464>
- Masters, C. L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C. C., Sperling, R. A., & Cummings, J. L. (2015). Alzheimer's disease. In *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 1). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.56>
- McDonald, A. J., & Mott, D. D. (2017). Functional neuroanatomy of amygdalohippocampal interconnections and their role in learning and memory. In *Journal of Neuroscience Research* (Vol. 95, Issue 3, pp. 797–820). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jnr.23709>

- McFadyen, J. D., Kiefer, J., Braig, D., Loseff-Silver, J., Potempa, L. A., Eisenhardt, S. U., & Peter, K. (2018a). Dissociation of C-reactive protein localizes and amplifies inflammation: Evidence for a direct biological role of C-reactive protein and its conformational changes. *Frontiers in Immunology*, *9*(JUN).
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01351>
- McFadyen, J. D., Kiefer, J., Braig, D., Loseff-Silver, J., Potempa, L. A., Eisenhardt, S. U., & Peter, K. (2018b). Dissociation of C-reactive protein localizes and amplifies inflammation: Evidence for a direct biological role of C-reactive protein and its conformational changes. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 9, Issue JUN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01351>
- McFadyen, J. D., Zeller, J., Potempa, L. A., Pietersz, G. A., Eisenhardt, S. U., & Peter, K. (2020). C-Reactive Protein and Its Structural Isoforms: An Evolutionary Conserved Marker and Central Player in Inflammatory Diseases and Beyond. In *Subcellular Biochemistry* (Vol. 94, pp. 499–520). Springer.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-41769-7_20
- McGuinness, B., Todd, S., Passmore, P., & Bullock, R. (2009). Blood pressure lowering in patients without prior cerebrovascular disease for prevention of cognitive impairment and dementia. In *Cochrane Database of Systematic Reviews* (Issue 4). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004034.pub3>
- McKhann, G. M., Knopman, D. S., Chertkow, H., Hyman, B. T., Jack, C. R., Kawas, C. H., Klunk, W. E., Koroshetz, W. J., Manly, J. J., Mayeux, R., Mohs, R. C., Morris, J. C., Rossor, M. N., Scheltens, P., Carrillo, M. C., Thies, B., Weintraub, S., & Phelps, C. H. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*, *7*(3), 263–269. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.005>
- Medeiros, R., & LaFerla, F. M. (2013). Astrocytes: Conductors of the Alzheimer disease neuroinflammatory symphony. In *Experimental Neurology* (Vol. 239, Issue 1, pp. 133–138). Exp Neurol. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.10.007>
- Merluzzi, A. P., Carlsson, C. M., Johnson, S. C., Schindler, S. E., Asthana, S., Blennow, K., Zetterberg, H., & Bendlin, B. B. (2018). Neurodegeneration, synaptic dysfunction, and gliosis are phenotypic of Alzheimer dementia. *Neurology*, *91*(5), E436–E443. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000005901>

- Mijajlović, M. D., Pavlović, A., Brainin, M., Heiss, W. D., Quinn, T. J., Ihle-Hansen, H. B., Hermann, D. M., Assayag, E. ben, Richard, E., Thiel, A., Kliper, E., Shin, Y. il, Kim, Y. H., Choi, S. H., Jung, S., Lee, Y. B., Sinanović, O., Levine, D. A., Schlesinger, I., ... Bornstein, N. M. (2017). Post-stroke dementia - a comprehensive review. In *BMC Medicine* (Vol. 15, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12916-017-0779-7>
- Molins, B., Romero-Vázquez, S., Fuentes-Prior, P., Adan, A., & Dick, A. D. (2018). C-reactive protein as a therapeutic target in age-related macular degeneration. *Frontiers in Immunology*, 9(APR), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00808>
- Mondragón-Rodríguez, S., Perry, G., Zhu, X., Moreira, P. I., Acevedo-Aquino, M. C., & Williams, S. (2013). Phosphorylation of Tau Protein as the Link between Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Connectivity Failure: Implications for Alzheimer's Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/940603>
- Moodley, K. K., & Chan, D. (2014). The hippocampus in neurodegenerative disease. In *The Hippocampus in Clinical Neuroscience* (Vol. 34, pp. 95–108). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000356430>
- Morgan, G. A., Guo, Q., Chan, S. L., Gary, D. S., Osborne, B. A., & Mattson, M. P. (2007). Defects of immune regulation in the presenilin-1 mutant knockin mouse. *NeuroMolecular Medicine*, 9(1), 35–45. <https://doi.org/10.1385/NMM:9:1:35>
- Morisseau, C., & Hammock, B. D. (2013). Impact of soluble epoxide hydrolase and epoxyeicosanoids on human health. In *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* (Vol. 53, pp. 37–58). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140244>
- Morris, J. C., Roe, C. M., Xiong, C., Fagan, A. M., Goate, A. M., Holtzman, D. M., & Mintun, M. A. (2010). APOE predicts amyloid-beta but not tau Alzheimer pathology in cognitively normal aging. *Annals of Neurology*, 67(1), 122–131. <https://doi.org/10.1002/ana.21843>
- Moser, M. B., & Moser, E. I. (1998). Functional differentiation in the hippocampus. In *Hippocampus* (Vol. 8, Issue 6, pp. 608–619). Hippocampus. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1998\)8:6<608::AID-HIPO3>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1998)8:6<608::AID-HIPO3>3.0.CO;2-7)
- Moskowitz, M. A., Lo, E. H., & Iadecola, C. (2010). The science of stroke: Mechanisms in search of treatments. In *Neuron* (Vol. 67, Issue 2, pp. 181–198). Neuron. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.07.002>

- Mucke, L., Masliah, E., Yu, G.-Q., Mallory, M., Rockenstein, E. M., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Johnson-Wood, K., & McConlogue, L. (2000). *High-Level Neuronal Expression of A 1-42 in Wild-Type Human Amyloid Protein Precursor Transgenic Mice: Synaptotoxicity without Plaque Formation*.
- Mueller, S. G., Schuff, N., Yaffe, K., Madison, C., Miller, B., & Weiner, M. W. (2010). Hippocampal atrophy patterns in mild cognitive impairment and alzheimer's disease. *Human Brain Mapping, 31*(9), 1339–1347.
<https://doi.org/10.1002/hbm.20934>
- Mufson, E. J., Mahady, L., Waters, D., Counts, S. E., Perez, S. E., DeKosky, S. T., Ginsberg, S. D., Ikonovic, M. D., Scheff, S. W., & Binder, L. I. (2015). Hippocampal plasticity during the progression of Alzheimer's disease. *Neuroscience, 309*, 51–67. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.03.006>
- Mufson, Elliott J., Counts, S. E., Perez, S. E., & Ginsberg, S. D. (2008). Cholinergic system during the progression of Alzheimer's disease: Therapeutic implications. In *Expert Review of Neurotherapeutics* (Vol. 8, Issue 11, pp. 1703–1718). Expert Rev Neurother. <https://doi.org/10.1586/14737175.8.11.1703>
- Mullane, K., & Williams, M. (2019). Preclinical Models of Alzheimer's Disease: Relevance and Translational Validity. *Current Protocols in Pharmacology, 84*(1). <https://doi.org/10.1002/cpph.57>
- Mutisya, E. M., Bowling, A. C., & Beal, M. F. (1994). Cortical Cytochrome Oxidase Activity Is Reduced in Alzheimer's Disease. *Journal of Neurochemistry, 63*(6), 2179–2184. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.63062179.x>
- Naj, A. C., Jun, G., Beecham, G. W., Wang, L. S., Vardarajan, B. N., Buross, J., Gallins, P. J., Buxbaum, J. D., Jarvik, G. P., Crane, P. K., Larson, E. B., Bird, T. D., Boeve, B. F., Graff-Radford, N. R., de Jager, P. L., Evans, D., Schneider, J. A., Carrasquillo, M. M., Ertekin-Taner, N., ... Schellenberg, G. D. (2011). Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nature Genetics, 43*(5), 436–443.
<https://doi.org/10.1038/ng.801>
- Nalivaeva, N. N., & Turner, A. J. (2013). The amyloid precursor protein: A biochemical enigma in brain development, function and disease. In *FEBS Letters* (Vol. 587, Issue 13, pp. 2046–2054). FEBS Lett. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.05.010>

- Nathan, C., Calingasan, N., Nezezon, J., Ding, A., Lucia, M. S., la Perle, K., Fuortes, M., Lin, M., Ehrt, S., Nyoun, S. K., Chen, J., Vodovotz, Y., Kipiani, K., & Beal, M. F. (2005). Protection from Alzheimer's-like disease in the mouse by genetic ablation of inducible nitric oxide synthase. *Journal of Experimental Medicine*, 202(9), 1163–1169. <https://doi.org/10.1084/jem.20051529>
- Neafsey, E. J., & Collins, M. A. (2011). Moderate alcohol consumption and cognitive risk. In *Neuropsychiatric Disease and Treatment* (Vol. 7, Issue 1, pp. 465–484). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/ndt.s23159>
- Nelson, A. R., Sweeney, M. D., Sagare, A. P., & Zlokovic, B. v. (2016). Neurovascular dysfunction and neurodegeneration in dementia and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1862(5), 887–900. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.12.016>
- Nelson, P. T., Alafuzoff, I., Bigio, E. H., Bouras, C., Braak, H., Cairns, N. J., Castellani, R. J., Crain, B. J., Davies, P., Tredici, K. del, Duyckaerts, C., Frosch, M. P., Haroutunian, V., Hof, P. R., Hulette, C. M., Hyman, B. T., Iwatsubo, T., Jellinger, K. A., Jicha, G. A., ... Beach, T. G. (2012). Correlation of alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: A review of the literature. In *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* (Vol. 71, Issue 5, pp. 362–381). <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31825018f7>
- Noble, W., Hanger, D. P., Miller, C. C. J., & Lovestone, S. (2013). The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases. In *Frontiers in Neurology: Vol. 4 JUL* (p. 83). Frontiers. <https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00083>
- Noble, W., Olm, V., Takata, K., Casey, E., Mary, O., Meyerson, J., Gaynor, K., LaFrancois, J., Wang, L., Kondo, T., Davies, P., Burns, M., Veeranna, Nixon, R., Dickson, D., Matsuoka, Y., Ahlijanian, M., Lau, L. F., & Duff, K. (2003). Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo. *Neuron*, 38(4), 555–565. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00259-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00259-9)
- Nonaka, T., Watanabe, S. T., Iwatsubo, T., & Hasegawa, M. (2010). Seeded aggregation and toxicity of α -synuclein and tau: Cellular models of neurodegenerative diseases. *Journal of Biological Chemistry*, 285(45), 34885–34898. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.148460>
- Nunomura, A., Perry, G., Aliev, G., Hirai, K., Takeda, A., Balraj, E. K., Jones, P. K., Ghanbari, H., Wataya, T., Shimohama, S., Chiba, S., Atwood, C. S., Petersen, R. B., & Smith, M. A. (2001). Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer

- disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 60(8), 759–767.
<https://doi.org/10.1093/jnen/60.8.759>
- Oakley, H., Cole, S. L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J., van Eldik, L., Berry, R., & Vassar, R. (2006). Intraneuronal β -amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: Potential factors in amyloid plaque formation. *Journal of Neuroscience*, 26(40), 10129–10140.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006>
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M. P., Akbari, Y., & LaFerla, F. M. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's Disease with plaques and tangles: Intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39(3), 409–421.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00434-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00434-3)
- Ojala, J., Alafuzoff, I., Herukka, S. K., van Groen, T., Tanila, H., & Pirttilä, T. (2009). Expression of interleukin-18 is increased in the brains of Alzheimer's disease patients. *Neurobiology of Aging*, 30(2), 198–209.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.06.006>
- Okamoto, S. ichi, Nakamura, T., Cieplak, P., Chan, S. F., Kalashnikova, E., Liao, L., Saleem, S., Han, X., Clemente, A., Nutter, A., Sances, S., Brechtel, C., Haus, D., Haun, F., Sanz-Blasco, S., Huang, X., Li, H., Zaremba, J. D., Cui, J., ... Lipton, S. A. (2014). S-nitrosylation-mediated redox transcriptional switch modulates neurogenesis and neuronal cell death. *Cell Reports*, 8(1), 217–228.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.005>
- Okamura, N., & Yanai, K. (2017). Brain imaging: Applications of tau PET imaging. In *Nature reviews. Neurology* (Vol. 13, Issue 4, pp. 197–198). NLM (Medline).
<https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.38>
- Olabarria, M., Noristani, H. N., Verkhratsky, A., & Rodríguez, J. J. (2010). Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *GLIA*, 58(7), 831–838. <https://doi.org/10.1002/glia.20967>
- Oliveira, A. M. M., Hawk, J. D., Abel, T., & Havekes, R. (2010). Post-training reversible inactivation of the hippocampus enhances novel object recognition memory. *Learning and Memory*, 17(3), 155–160.
<https://doi.org/10.1101/lm.1625310>

- Omar, R. A., Chyan, Y. J., Andorn, A. C., Poeggeler, B., Robakis, N. K., & Pappolla, M. A. (1999). Increased expression but reduced activity of antioxidant enzymes in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *1*(3), 139–145.
<https://doi.org/10.3233/JAD-1999-1301>
- Ono, K., Condrón, M. M., & Teplow, D. B. (2009). Structure-neurotoxicity relationships of amyloid β -protein oligomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(35), 14745–14750.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0905127106>
- Osorio, R. S., Gumb, T., Pirraglia, E., Varga, A. W., Lu, S. E., Lim, J., Wohlleber, M. E., Ducca, E. L., Koushyk, V., Glodzik, L., Mosconi, L., Ayappa, I., Rapoport, D. M., & de Leon, M. J. (2015). Sleep-disordered breathing advances cognitive decline in the elderly. *Neurology*, *84*(19), 1964–1971.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001566>
- Ostermann, A. I., Herbers, J., Willenberg, I., Chen, R., Hwang, S. H., Greite, R., Morisseau, C., Gueler, F., Hammock, B. D., & Schebb, N. H. (2015). Oral treatment of rodents with soluble epoxide hydrolase inhibitor 1-(1-propanoylpiperidin-4-yl)-3-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]urea (TPPU): Resulting drug levels and modulation of oxylipin pattern. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, *121*(Pt A), 131–137.
<https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2015.06.005>
- Overk, C. R., & Masliah, E. (2014). Pathogenesis of synaptic degeneration in Alzheimer's disease and Lewy body disease. In *Biochemical Pharmacology* (Vol. 88, Issue 4, pp. 508–516). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.01.015>
- Ownby, R. L., Crocco, E., Acevedo, A., John, V., & Loewenstein, D. (2006). Depression and risk for Alzheimer disease: Systematic review, meta-analysis, and metaregression analysis. *Archives of General Psychiatry*, *63*(5), 530–538.
<https://doi.org/10.1001/archpsyc.63.5.530>
- Pallas, M., Camins, A., Smith, M. A., Perry, G., Lee, H. G., & Casadesus, G. (2008). From aging to Alzheimer's disease: Unveiling “The switch” with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8). In *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 15, Issue 4, pp. 615–624). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/JAD-2008-15408>
- Palop, J. J., Chin, J., & Mucke, L. (2006). A network dysfunction perspective on neurodegenerative diseases. In *Nature* (Vol. 443, Issue 7113, pp. 768–773). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature05289>

- Pang, P. T., & Lu, B. (2004). Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: Role of secreted proteins tPA and BDNF. In *Ageing Research Reviews* (Vol. 3, Issue 4, pp. 407–430). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2004.07.002>
- Papaleonidopoulos, V., & Papatheodoropoulos, C. (2018). β -adrenergic receptors reduce the threshold for induction and stabilization of LTP and enhance its magnitude via multiple mechanisms in the ventral but not the dorsal hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory*, *151*, 71–84. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.04.010>
- Pike, C. J. (2017). Sex and the development of Alzheimer's disease. In *Journal of Neuroscience Research* (Vol. 95, Issues 1–2, pp. 671–680). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jnr.23827>
- Plassman, B. L., Williams, J. W., Burke, J. R., Holsinger, T., & Benjamin, S. (2010). Systematic review: Factors associated with risk for and possible prevention of cognitive decline in later life. *Annals of Internal Medicine*, *153*(3), 182–193. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-153-3-201008030-00258>
- Pooler, A. M., Noble, W., & Hanger, D. P. (2014). A role for tau at the synapse in Alzheimer's disease pathogenesis. In *Neuropharmacology* (Vol. 76, Issue PART A, pp. 1–8). Neuropharmacology. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.09.018>
- Potempa, L. A., Maldonado, B. A., Laurent, P., Zemel, E. S., & Gewurz, H. (1983). Antigenic, electrophoretic and binding alterations of human C-reactive protein modified selectively in the absence of calcium. *Molecular Immunology*, *20*(11), 1165–1175. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(83\)90140-2](https://doi.org/10.1016/0161-5890(83)90140-2)
- Potempa, L. A., Yao, Z.-Y., Ji, S.-R., Filep, J. G., & Wu, Y. (2015a). Solubilization and purification of recombinant modified C-reactive protein from inclusion bodies using reversible anhydride modification. *Biophysics Reports*, *1*(1), 18–33. <https://doi.org/10.1007/s41048-015-0003-2>
- Potempa, L. A., Yao, Z.-Y., Ji, S.-R., Filep, J. G., & Wu, Y. (2015b). Solubilization and purification of recombinant modified C-reactive protein from inclusion bodies using reversible anhydride modification. *Biophysics Reports*, *1*(1), 18–33. <https://doi.org/10.1007/s41048-015-0003-2>

- Potvin, O., Lorrain, D., Forget, H., Dubé, M., Grenier, S., Préville, M., & Hudon, C. (2012). Sleep Quality and 1-Year Incident Cognitive Impairment in Community-Dwelling Older Adults. *Sleep*, 35(4), 491–499. <https://doi.org/10.5665/sleep.1732>
- Pourtalebi Jahromi, L., Sasanipour, Z., & Azadi, A. (2018). Promising horizon to alleviate Alzheimer's disease pathological hallmarks via inhibiting mTOR signaling pathway: A new application for a commonplace analgesic. *Medical Hypotheses*, 110(December 2017), 120–124. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2017.12.007>
- Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W., & Ferri, C. P. (2013). The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. In *Alzheimer's and Dementia* (Vol. 9, Issue 1, pp. 63-75.e2). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.11.007>
- Prinz, M., & Priller, J. (2014). Microglia and brain macrophages in the molecular age: From origin to neuropsychiatric disease. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 15, Issue 5, pp. 300–312). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrn3722>
- Profenno, L. A., Porsteinsson, A. P., & Faraone, S. v. (2010). Meta-Analysis of Alzheimer's Disease Risk with Obesity, Diabetes, and Related Disorders. *Biological Psychiatry*, 67(6), 505–512. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.02.013>
- Puzzo, D., Gulisano, W., Palmeri, A., & Arancio, O. (2015). Rodent models for Alzheimer's disease drug discovery. In *Expert Opinion on Drug Discovery* (Vol. 10, Issue 7, pp. 703–711). Informa Healthcare. <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1041913>
- Querol-Vilaseca, M., Colom-Cadena, M., Pegueroles, J., San Martín-Paniello, C., Clarimon, J., Belbin, O., Fortea, J., & Lleó, A. (2017). YKL-40 (Chitinase 3-like I) is expressed in a subset of astrocytes in Alzheimer's disease and other tauopathies. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0893-7>
- Rangaraju, S., Dammer, E. B., Raza, S. A., Rathakrishnan, P., Xiao, H., Gao, T., Duong, D. M., Pennington, M. W., Lah, J. J., Seyfried, N. T., & Levey, A. I. (2018). Identification and therapeutic modulation of a pro-inflammatory subset of disease-associated-microglia in Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13024-018-0254-8>

- Rasmussen, M. K., Mestre, H., & Nedergaard, M. (2018). The glymphatic pathway in neurological disorders. In *The Lancet Neurology* (Vol. 17, Issue 11, pp. 1016–1024). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30318-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30318-1)
- Ray, B., Maloney, B., Sambamurti, K., Karnati, H. K., Nelson, P. T., Greig, N. H., & Lahiri, D. K. (2020). Correction: Rivastigmine modifies the α -secretase pathway and potentially early Alzheimer's disease (*Translational Psychiatry*, (2020), 10, 1, (47), 10.1038/s41398-020-0709-x). In *Translational Psychiatry* (Vol. 10, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-0757-2>
- Raz, L., Knoefel, J., & Bhaskar, K. (2016). The neuropathology and cerebrovascular mechanisms of dementia. In *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* (Vol. 36, Issue 1, pp. 172–186). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.164>
- Recent Perspective About the Amyloid Cascade Hypothesis and Stem Cell-Based Therapy in the Treatment of Alzheimer's Disease. (2016). In *Frontiers in Clinical Drug Research - Alzheimer Disorders* (pp. 144–174). BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS. <https://doi.org/10.2174/9781681082318116050006>
- Reger, M. L., Hovda, D. A., & Giza, C. C. (2009). Ontogeny of rat recognition memory measured by the novel object recognition task. *Developmental Psychobiology*, 51(8), 672–678. <https://doi.org/10.1002/dev.20402>
- Revilla, S., Suñol, C., García-Mesa, Y., Giménez-Llort, L., Sanfeliu, C., & Cristòfol, R. (2014). Physical exercise improves synaptic dysfunction and recovers the loss of survival factors in 3xTg-AD mouse brain. *Neuropharmacology*, 81, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.01.037>
- Rezazadeh, M., Hosseinzadeh, H., Moradi, M., Salek Esfahani, B., Talebian, S., Parvin, S., & Gharesouran, J. (2019). Genetic discoveries and advances in late-onset Alzheimer's disease. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 234, Issue 10, pp. 16873–16884). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/jcp.28372>
- Richard, B. C., Kurdakova, A., Baches, S., Bayer, T. A., Weggen, S., & Wirths, O. (2015). Gene dosage dependent aggravation of the neurological phenotype in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 45(4), 1223–1236. <https://doi.org/10.3233/JAD-143120>

- Rissman, R. A., de Blas, A. L., & Armstrong, D. M. (2007). GABAA receptors in aging and Alzheimer's disease. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 103, Issue 4, pp. 1285–1292). J Neurochem. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04832.x>
- Roberson, E. D., Scearce-Levie, K., Palop, J. J., Yan, F., Cheng, I. H., Wu, T., Gerstein, H., Yu, G. Q., & Mucke, L. (2007). Reducing endogenous tau ameliorates amyloid β -induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science*, *316*(5825), 750–754. <https://doi.org/10.1126/science.1141736>
- Robinson, D. M., & Keating, G. M. (2006). Memantine: A review of its use in Alzheimer's disease. In *Drugs* (Vol. 66, Issue 11, pp. 1515–1534). Drugs. <https://doi.org/10.2165/00003495-200666110-00015>
- Rolls, E. T. (2019). The cingulate cortex and limbic systems for emotion, action, and memory. In *Brain Structure and Function* (Vol. 224, Issue 9, pp. 3001–3018). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00429-019-01945-2>
- Romero, J. R., Beiser, A., Himali, J. J., Shoamanesh, A., DeCarli, C., & Seshadri, S. (2017). Cerebral microbleeds and risk of incident dementia: the Framingham Heart Study. *Neurobiology of Aging*, *54*, 94–99. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.02.018>
- Rosenberg, R. N., & Lambracht-Washington, D. (2020). Active Immunotherapy to Prevent Alzheimer Disease - A DNA Amyloid β 1-42 Trimer Vaccine. In *JAMA Neurology* (Vol. 77, Issue 3, pp. 289–290). American Medical Association. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2019.4182>
- Rouch, L., Cestac, P., Hanon, O., Cool, C., Helmer, C., Bouhanick, B., Chamontin, B., Dartigues, J. F., Vellas, B., & Andrieu, S. (2015). Antihypertensive drugs, prevention of cognitive decline and dementia: A systematic review of observational studies, randomized controlled trials and meta-analyses, with discussion of potential mechanisms. In *CNS Drugs* (Vol. 29, Issue 2, pp. 113–130). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/s40263-015-0230-6>
- Roxo, M. R., Franceschini, P. R., Zubaran, C., Kleber, F. D., & Sander, J. W. (2011). The limbic system conception and its historical evolution. *TheScientificWorldJournal*, *11*, 2427–2440. <https://doi.org/10.1100/2011/157150>
- Sacuiu, S. F. (2016). Dementias. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 138, pp. 123–151). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802973-2.00008-2>

- Sadleir, K. R., Popovic, J., & Vassar, R. (2018). ER stress is not elevated in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Biological Chemistry*, 293(48), 18434–18443. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005769>
- Saito, T., Matsuba, Y., Mihira, N., Takano, J., Nilsson, P., Itohara, S., Iwata, N., & Saido, T. C. (2014). Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*, 17(5), 661–663. <https://doi.org/10.1038/nn.3697>
- Sakakibara, Y., Sekiya, M., Saito, T., Saido, T. C., & Iijima, K. M. (2019). Amyloid- β plaque formation and reactive gliosis are required for induction of cognitive deficits in App knock-in mouse models of Alzheimer's disease. *BMC Neuroscience*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12868-019-0496-6>
- Salazar, C., Valdivia, G., Ardiles, álvaro O., Ewer, J., & Palacios, A. G. (2016). Genetic variants associated with neurodegenerative Alzheimer disease in natural models. In *Biological Research* (Vol. 49, Issue 1, p. 14). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40659-016-0072-9>
- Sarroca, S., Molina-Martínez, P., Aresté, C., Etzrodt, M., García de Frutos, P., Gasa, R., Antonell, A., Molinuevo, J. L., Sánchez-Valle, R., Saura, C. A., Lladó, A., & Sanfeliu, C. (2016). Preservation of cell-survival mechanisms by the presenilin-1 K239N mutation may cause its milder clinical phenotype. *Neurobiology of Aging*, 46, 169–179. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.07.002>
- Sawikr, Y., Yarla, N. S., Peluso, I., Kamal, M. A., Aliev, G., & Bishayee, A. (2017). Neuroinflammation in Alzheimer's Disease: The Preventive and Therapeutic Potential of Polyphenolic Nutraceuticals. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (Vol. 108, pp. 33–57). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2017.02.001>
- Scheff, S. W., Price, D. A., Schmitt, F. A., & Mufson, E. J. (2006). Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiology of Aging*, 27(10), 1372–1384. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.012>
- Scheff, S. W., Price, D. A., Schmitt, F. A., Scheff, M. A., & Mufson, E. J. (2011). Synaptic loss in the inferior temporal gyrus in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 24(3), 547–557. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-101782>

- Schmidt, F., Boltze, J., Jäger, C., Hofmann, S., Willems, N., Seeger, J., Härtig, W., & Stolzing, A. (2015). Detection and Quantification of β -Amyloid, Pyroglutamyl A β , and Tau in Aged Canines. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 74(9), 912–923. <https://doi.org/10.1097/NEN.0000000000000230>
- Schütt, T., Helboe, L., Pedersen, L. Ø., 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. *Journal of Alzheimer's Disease*, 52(2), 433–449. <https://doi.org/10.3233/JAD-151085>
- Seeley, W. W., Crawford, R. K., Zhou, J., Miller, B. L., & Greicius, M. D. (2009). Neurodegenerative Diseases Target Large-Scale Human Brain Networks. *Neuron*, 62(1), 42–52. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.03.024>
- Selkoe, D. J., & Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine*, 8(6), 595–608. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606210>
- Sellbom, K. S., & Gunstad, J. (2012). Cognitive function and decline in obesity. In *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 30, Issue SUPPL.2). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-111073>
- Sharp, S. I., Aarsland, D., Day, S., Sønnesyn, H., & Ballard, C. (2011). Hypertension is a potential risk factor for vascular dementia: Systematic review. In *International Journal of Geriatric Psychiatry* (Vol. 26, Issue 7, pp. 661–669). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/gps.2572>
- Shin, I.-S. (2005). Neuropsychiatric Symptoms and Quality of Life in Alzheimer Disease. *American Journal of Geriatric Psychiatry*, 13(6), 469–474. <https://doi.org/10.1176/appi.ajgp.13.6.469>
- Shinosaki, K., Nishikawa, T., & Takeda, M. (2000). Neurobiological basis of behavioral and psychological symptoms in dementia of the Alzheimer type. In *Psychiatry and Clinical Neurosciences* (Vol. 54, Issue 6, pp. 611–620). Psychiatry Clin Neurosci. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1819.2000.00773.x>
- Shukla, V., Skuntz, S., & Pant, H. C. (2012). Deregulated Cdk5 Activity Is Involved in Inducing Alzheimer's Disease. In *Archives of Medical Research* (Vol. 43, Issue 8, pp. 655–662). Arch Med Res. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2012.10.015>
- Sil, S., & Ghosh, T. (2016). Role of cox-2 mediated neuroinflammation on the neurodegeneration and cognitive impairments in colchicine induced rat model of

- Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroimmunology*, 291, 115–124.
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.12.003>
- Silva, D. F., Esteves, A. R., Oliveira, C. R., & Cardoso, S. M. (2017). Mitochondrial Metabolism Power SIRT2-Dependent Deficient Traffic Causing Alzheimer's-Disease Related Pathology. *Molecular Neurobiology*, 54(6), 4021–4040.
<https://doi.org/10.1007/s12035-016-9951-x>
- Simats, A., García-Berrocoso, T., & Montaner, J. (2016). Neuroinflammatory biomarkers: From stroke diagnosis and prognosis to therapy. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1862(3), 411–424.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.10.025>
- Šimić, G., Babić Leko, M., Wray, S., Harrington, C., Delalle, I., Jovanov-Milošević, N., Bažadona, D., Buée, L., de Silva, R., Giovanni, G. di, Wischik, C., & Hof, P. R. (2016). Tau protein hyperphosphorylation and aggregation in alzheimer's disease and other tauopathies, and possible neuroprotective strategies. In *Biomolecules* (Vol. 6, Issue 1, pp. 2–28). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biom6010006>
- Singhal, G., Jaehne, E. J., Corrigan, F., Toben, C., & Baune, B. T. (2014). Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: A focused review. *Frontiers in Neuroscience*, 8(SEP), 1–22.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00315>
- Siracusa, R., Fusco, R., & Cuzzocrea, S. (2019). Astrocytes: Role and functions in brain pathologies. *Frontiers in Pharmacology*, 10(SEP).
<https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01114>
- Slevin, M., Matou, S., Zeinolabediny, Y., Corpas, R., Weston, R., Liu, D., Boras, E., di Napoli, M., Petcu, E., Sarroca, S., Popa-Wagner, A., Love, S., Font, M. A., Potempa, L. A., Al-Baradie, R., Sanfeliu, C., Revilla, S., Badimon, L., & Krupinski, J. (2015). Monomeric C-reactive protein - A key molecule driving development of Alzheimer's disease associated with brain ischaemia? *Scientific Reports*, 5(December 2014), 1–21. <https://doi.org/10.1038/srep13281>
- Slevin, Mark, E. G.-L., Capitanescu, B., Sanfeliu, C., Zeinolabediny, Y., AlBaradie, R., Olah, P., Guo, B., Pirici, D., Napoli, M. di, & Popa-Wagner, A. (2020). Monomeric C-Reactive Protein Aggravates Secondary Degeneration after Intracerebral Haemorrhagic Stroke and May Function as a Sensor for Systemic

- Inflammation. *Journal of Clinical Medicine*, 9(9), 3053.
<https://doi.org/10.3390/jcm9093053>
- Slevin, Mark, Iemma, R. S., Zeinolabediny, Y., Liu, D., Ferris, G. R., Caprio, V., Phillips, N., di Napoli, M., Guo, B., Zeng, X., AlBaradie, R., Binsaleh, N. K., McDowell, G., & Fang, W. H. (2018). Acetylcholine Inhibits Monomeric C-Reactive Protein Induced Inflammation, Endothelial Cell Adhesion, and Platelet Aggregation; A Potential Therapeutic? *Frontiers in Immunology*, 9(September), 2124. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02124>
- Slevin, Mark, Liu, D., Ferris, G., Al-Hsinawi, M., Al-Baradie, R., & Krupinski, J. (2017). Expression of monomeric C-reactive protein in infarcted brain tissue from patients with Alzheimer's disease. *Turk Patoloji Dergisi*, 33(1), 25–29.
<https://doi.org/10.5146/tjpath.2016.01374>
- Slevin, Mark, Matou-Nasri, S., Turu, M., Luque, A., Rovira, N., Badimon, L., Boluda, S., Potempa, L., Sanfeliu, C., de Vera, N., & Krupinski, J. (2010). Modified c-reactive protein is expressed by stroke neovessels and is a potent activator of angiogenesis in vitro. *Brain Pathology*, 20(1), 151–165.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2008.00256.x>
- Slevin, Mark, & Molins, B. (2018). Editorial: C-reactive protein in age-related disorders. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 9, Issue NOV). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02745>
- Snyder, S. H., & Innis, R. B. (1979). Peptide neurotransmitters. In *Annual Review of Biochemistry: Vol. Vol. 48* (pp. 755–782). Annu Rev Biochem.
<https://doi.org/10.1146/annurev.bi.48.070179.003543>
- Sofroniew, M. v. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 32, Issue 12, pp. 638–647). Trends Neurosci. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.08.002>
- Sofroniew, M. v., & Vinters, H. v. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. In *Acta Neuropathologica* (Vol. 119, Issue 1, pp. 7–35). Acta Neuropathol.
<https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
- Sokolov, Y., Kozak, J. A., Kaye, R., Chanturiya, A., Glabe, C., & Hall, J. E. (2006). Soluble amyloid oligomers increase bilayer conductance by altering dielectric structure. *Journal of General Physiology*, 128(6), 637–647.
<https://doi.org/10.1085/jgp.200609533>

- Song, I. U., Chung, S. W., Kim, Y. do, & Maeng, L. S. (2015). Relationship between the hs-CRP as non-specific biomarker and Alzheimer's disease according to aging process. *International Journal of Medical Sciences*, *12*(8), 613–617.
<https://doi.org/10.7150/ijms.12742>
- Spector, A. A., & Norris, A. W. (2007). Action of epoxyeicosatrienoic acids on cellular function. In *American Journal of Physiology - Cell Physiology* (Vol. 292, Issue 3). Am J Physiol Cell Physiol. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00402.2006>
- Sproston, N. R., & Ashworth, J. J. (2018). Role of C-reactive protein at sites of inflammation and infection. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 9, Issue APR, p. 754). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00754>
- Sproston, N. R., el Mohtadi, M., Slevin, M., Gilmore, W., & Ashworth, J. J. (2018). The effect of C-reactive protein isoforms on nitric oxide production by U937 monocytes/macrophages. *Frontiers in Immunology*, *9*(JUL).
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01500>
- Spychala, M. S., Honarpisheh, P., & McCullough, L. D. (2017). Sex differences in neuroinflammation and neuroprotection in ischemic stroke. *Journal of Neuroscience Research*, *95*(1–2), 462–471. <https://doi.org/10.1002/jnr.23962>
- Squire, L. R., Genzel, L., Wixted, J. T., & Morris, R. G. (2015). Memory consolidation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *7*(8).
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021766>
- Steffen, J., Krohn, M., Paarmann, K., Schwitlick, C., Brüning, T., Marreiros, R., Müller-Schiffmann, A., Korth, C., Braun, K., & Pahnke, J. (2016). Revisiting rodent models: Octodon degus as Alzheimer's disease model? *Acta Neuropathologica Communications*, *4*(1), 91. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0363-y>
- Steinhilb, M. L., Dias-Santagata, D., Fulga, T. A., Felch, D. L., & Feany, M. B. (2007). Tau phosphorylation sites work in concert to promote neurotoxicity in vivo. *Molecular Biology of the Cell*, *18*(12), 5060–5068.
<https://doi.org/10.1091/mbc.E07-04-0327>
- Stephan, Y., Sutin, A. R., & Terracciano, A. (2015). Younger subjective age is associated with lower C-reactive protein among older adults. *Brain, Behavior, and Immunity*, *43*, 33–36. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.07.019>

- Sterniczuk, R., Theou, O., Rusak, B., & Rockwood, K. (2013). Sleep Disturbance is Associated with Incident Dementia and Mortality. *Current Alzheimer Research*, 10(7), 767–775. <https://doi.org/10.2174/15672050113109990134>
- Strang, F., Scheichl, A., Chen, Y. C., Wang, X., Htun, N. M., Bassler, N., Eisenhardt, S. U., Habersberger, J., & Peter, K. (2012). Amyloid plaques dissociate pentameric to monomeric C-reactive protein: A novel pathomechanism driving cortical inflammation in Alzheimer's disease? *Brain Pathology*, 22(3), 337–346. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2011.00539.x>
- Sun, J., & Roy, S. (2018). The physical approximation of APP and BACE-1: A key event in alzheimer's disease pathogenesis. In *Developmental Neurobiology* (Vol. 78, Issue 3, pp. 340–347). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/dneu.22556>
- Sun, X., Chen, W. D., & Wang, Y. D. (2015). β -Amyloid: The key peptide in the pathogenesis of Alzheimer's disease. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 6, Issue SEP, p. 221). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00221>
- Swerdlow, R. H. (2011). Brain aging, Alzheimer's disease, and mitochondria. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1812, Issue 12, pp. 1630–1639). Biochim Biophys Acta. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.08.012>
- Tang, M., Taghibiglou, C., & Liu, J. (2017). The Mechanisms of Action of Curcumin in Alzheimer's Disease. In *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 58, Issue 4, pp. 1003–1016). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/JAD-170188>
- Tanila, H. (2017). The role of BDNF in Alzheimer's disease. In *Neurobiology of Disease* (Vol. 97, Issue Pt B, pp. 114–118). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.05.008>
- Tenreiro, S., Eckermann, K., & Outeiro, T. F. (2014). Protein phosphorylation in neurodegeneration: Friend or foe? In *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Vol. 7, Issue MAY). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00042>
- Tillett, W. S., & Francis, T. (1930). Serological reactions in pneumonia with a nonprotein somatic fraction of pneumococcus. *Journal of Experimental Medicine*, 52(4), 561–571. <https://doi.org/10.1084/jem.52.4.561>
- Toda, T., Parylak, S. L., Linker, S. B., & Gage, F. H. (2019). The role of adult hippocampal neurogenesis in brain health and disease. In *Molecular Psychiatry*

- (Vol. 24, Issue 1, pp. 67–87). Nature Publishing Group.
<https://doi.org/10.1038/s41380-018-0036-2>
- Torres-Lista, V., López-Pousa, S., & Giménez-Llort, L. (2019). Impact of chronic risperidone use on behavior and survival of 3xTg-AD mice model of Alzheimer's disease and mice with normal aging. *Frontiers in Pharmacology*, *10*(SEP), 1061. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01061>
- Tu, R., Armstrong, J., Lee, K. S. S., Hammock, B. D., Sapirstein, A., & Koehler, R. C. (2018). Soluble epoxide hydrolase inhibition decreases reperfusion injury after focal cerebral ischemia. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23504-1>
- Tzakis, N., & Holahan, M. R. (2019). Social Memory and the Role of the Hippocampal CA2 Region. In *Frontiers in Behavioral Neuroscience* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00233>
- van der Jeugd, A., Parra-Damas, A., Baeta-Corral, R., Soto-Faguás, C. M., Ahmed, T., Laferla, F. M., Giménez-Llort, L., D'Hooge, R., & Saura, C. A. (2018). Reversal of memory and neuropsychiatric symptoms and reduced tau pathology by selenium in 3xTg-AD mice. *Scientific Reports*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24741-0>
- Venkateshappa, C., Harish, G., Mahadevan, A., Srinivas Bharath, M. M., & Shankar, S. K. (2012). Elevated oxidative stress and decreased antioxidant function in the human hippocampus and frontal cortex with increasing age: Implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochemical Research*, *37*(8), 1601–1614. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0755-8>
- Verdier, Y., & Penke, B. (2005). Binding Sites of Amyloid β -Peptide in Cell Plasma Membrane and Implications for Alzheimers Disease. *Current Protein & Peptide Science*, *5*(1), 19–31. <https://doi.org/10.2174/1389203043486937>
- Vermeiren, Y., le Bastard, N., van Hemelrijck, A., Drinkenburg, W. H., Engelborghs, S., & de Deyn, P. P. (2013). Behavioral correlates of cerebrospinal fluid amino acid and biogenic amine neurotransmitter alterations in dementia. *Alzheimer's and Dementia*, *9*(5), 488–498. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.06.010>
- Vijayan, M., & Reddy, P. H. (2016). Stroke, Vascular Dementia, and Alzheimer's Disease: Molecular Links. In *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 54, Issue 2, pp. 427–443). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/JAD-160527>

- Vodovotz, Y., Lucia, M. S., Flanders, K. C., Chesler, L., Xie, Q. W., Smith, T. W., Weidner, J., Mumford, R., Webber, R., Nathan, C., Roberts, A. B., Lipka, C. F., & Sporn, M. B. (1996). Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease. *Journal of Experimental Medicine*, *184*(4), 1425–1433. <https://doi.org/10.1084/jem.184.4.1425>
- Vogel-Ciernia, A., & Wood, M. A. (2014). Examining object location and object recognition memory in mice. *Current Protocols in Neuroscience*, *2014*, 8.31.1-8.31.17. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0831s69>
- Vorhees, C. v., & Williams, M. T. (2006). Morris water maze: Procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature Protocols*, *1*(2), 848–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.116>
- Wagner, K. M., McReynolds, C. B., Schmidt, W. K., & Hammock, B. D. (2017). Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for pain, inflammatory and neurodegenerative diseases. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 180, pp. 62–76). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.06.006>
- Wake, H., & Fields, R. D. (2012). Physiological function of microglia. In *Neuron Glia Biology* (Vol. 7, Issue 1, pp. 1–3). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1017/S1740925X12000166>
- Wang, Q., Walsh, D. M., Rowan, M. J., Selkoe, D. J., & Anwyl, R. (2004). Block of Long-Term Potentiation by Naturally Secreted and Synthetic Amyloid β -Peptide in Hippocampal Slices Is Mediated via Activation of the Kinases c-Jun N-Terminal Kinase, Cyclin-Dependent Kinase 5, and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase as well as Metabotropic Glutamate Receptor Type 5. *Journal of Neuroscience*, *24*(13), 3370–3378. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1633-03.2004>
- Wang, X., Chen, Q., & Xing, D. (2012). Supplementary Data Focal Adhesion Kinase Activates NF- κ B via the ERK1/2 and p38MAPK Pathways in Amyloid-25-35-Induced Apoptosis in PC12 Cells. In *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 32). IOS Press 1.
- Wenk, G. L. (2003). Neuropathologic changes in Alzheimer's disease. In *Journal of Clinical Psychiatry* (Vol. 64, Issue SUPPL. 9, pp. 7–10). J Clin Psychiatry. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12934968/>
- Williams, T. I., Lynn, B. C., Markesbery, W. R., & Lovell, M. A. (2006). Increased levels of 4-hydroxynonenal and acrolein, neurotoxic markers of lipid peroxidation, in the brain in Mild Cognitive Impairment and early Alzheimer's disease.

- Neurobiology of Aging*, 27(8), 1094–1099.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.06.004>
- Winovich, Di. T., Longstreth, W. T., Arnold, A. M., Varadhan, R., Zeki Al Hazzouri, A., Cushman, M., Newman, A. B., & Odden, M. C. (2017). Factors Associated with Ischemic Stroke Survival and Recovery in Older Adults. *Stroke*, 48(7), 1818–1826. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.016726>
- Wirhth, O., & Zampar, S. (2020). Neuron Loss in Alzheimer's Disease: Translation in Transgenic Mouse Models. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 8144. <https://doi.org/10.3390/ijms21218144>
- Wisniewski, T., & Goñi, F. (2015). Immunotherapeutic Approaches for Alzheimer's Disease. In *Neuron* (Vol. 85, Issue 6, pp. 1162–1176). Cell Press.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.064>
- Wisniewski, T., & Sigurdsson, E. M. (2010). Murine models of Alzheimer's disease and their use in developing immunotherapies. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1802, Issue 10, pp. 847–859). Biochim Biophys Acta. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.05.004>
- Wood, J. A., Wood, P. L., Ryan, R., Graff-Radford, N. R., Pilapil, C., Robitaille, Y., & Quirion, R. (1993). Cytokine indices in Alzheimer's temporal cortex: no changes in mature IL-1 β or IL-1RA but increases in the associated acute phase proteins IL-6, α 2-macroglobulin and C-reactive protein. *Brain Research*, 629(2), 245–252. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)91327-O](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)91327-O)
- Wosiski-Kuhn, M., & Stranahan, A. M. (2012). Transient increases in dendritic spine density contribute to dentate gyrus long-term potentiation. *Synapse*, 66(7), 661–664. <https://doi.org/10.1002/syn.21545>
- Wu, D., Tang, X., Gu, L. H., Li, X. L., Qi, X. Y., Bai, F., Chen, X. C., Wang, J. Z., Ren, Q. G., & Zhang, Z. J. (2018). LINGO-1 antibody ameliorates myelin impairment and spatial memory deficits in the early stage of 5XFAD mice. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 24(5), 381–393. <https://doi.org/10.1111/cns.12809>
- Xiang, X. J., Song, L., Deng, X. J., Tang, Y., Min, Z., Luo, B., Wen, Q. X., Li, K. Y., Chen, J., Ma, Y. L., Zhu, B. L., Yan, Z., & Chen, G. J. (2019). Mitochondrial methionine sulfoxide reductase B2 links oxidative stress to Alzheimer's disease-like pathology. *Experimental Neurology*, 318(April), 145–156. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.05.006>

- Xu, W., Tan, C. C., Zou, J. J., Cao, X. P., & Tan, L. (2019). Sleep problems and risk of all-cause cognitive decline or dementia: An updated systematic review and meta-Analysis. In *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* (Vol. 91, Issue 3). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2019-321896>
- Yasojima, K., Schwab, C., McGeer, E. G., & McGeer, P. L. (2000). Human neurons generate C-reactive protein and amyloid P: Upregulation in Alzheimer's disease. *Brain Research*, 887(1), 80–89. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02970-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02970-X)
- Yassa, M. A., & Stark, C. E. L. (2011). Pattern separation in the hippocampus. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 34, Issue 10, pp. 515–525). Trends Neurosci. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.06.006>
- Yiannopoulou, K. G., & Papageorgiou, S. G. (2020). Current and Future Treatments in Alzheimer Disease: An Update. *Journal of Central Nervous System Disease*, 12, 117957352090739. <https://doi.org/10.1177/1179573520907397>
- Zarriello, S., Tuazon, J. P., Corey, S., Schimmel, S., Rajani, M., Gorsky, A., Incontri, D., Hammock, B. D., & Borlongan, C. v. (2019). Humble beginnings with big goals: Small molecule soluble epoxide hydrolase inhibitors for treating CNS disorders. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 172, pp. 23–39). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.11.001>
- Zhang, L., Xu, S., Wu, X., Muse, F. M., Chen, J., Cao, Y., Yan, J., Cheng, Z., Yi, X., & Han, Z. (2020). Protective Effects of the Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitor 1-Trifluoromethoxyphenyl-3-(1-Propionylpiperidin-4-yl) Urea in a Rat Model of Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00182>
- Zhang, Y., & Cao, H. (2020). Monomeric C-reactive protein affects cell injury and apoptosis through activation of p38 MAPK in human coronary artery endothelial cells. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 8601(December 2019), 1–22. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2020.4711>
- Zhong, G., Wang, Y., Zhang, Y., Guo, J. J., & Zhao, Y. (2015). Smoking Is Associated with an Increased Risk of Dementia: A Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies with Investigation of Potential Effect Modifiers. *PLOS ONE*, 10(3), e0118333. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118333>
- Zlokovic, B. v. (2008). The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. In *Neuron* (Vol. 57, Issue 2, pp. 178–201). Neuron. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.003>

- Zlokovic, B. v. (2011). Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 12, Issue 12). Nat Rev Neurosci. <https://doi.org/10.1038/nrn3114>
- Zolezzi, J. M., Bastías-Candia, S., Santos, M. J., Inestrosa, N. C., Marr, R., Franklin, R., & Popa-Wagner, A. (2014). *AGING NEUROSCIENCE REVIEW ARTICLE Alzheimer's disease: relevant molecular and physiopathological events affecting amyloid- β brain balance and the putative role of PPARs*. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00176>
- Zubenko, G. S., Moossy, J., Martinez, A. J., Rao, G., Claassen, D., Rosen, J., & Kopp, U. (1991). Neuropathologic and Neurochemical Correlates of Psychosis in Primary Dementia. *Archives of Neurology*, 48(6), 619–624. <https://doi.org/10.1001/archneur.1991.00530180075020>

