



# Caracterització de les estructures granulars patològiques presents a l'hipocamp dels ratolins amb senescència accelerada SAMP8

Gemma Manich Raventós



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**



FACULTAT de FARMÀCIA  
DEPARTAMENT de FISIOLOGIA

**Caracterització de les estructures granulars  
patològiques presents a l'hipocamp dels  
ratolins amb senescència accelerada SAMP8**

GEMMA MANICH RAVENTÓS

2014





FACULTAT de FARMÀCIA  
DEPARTAMENT de FISIOLOGIA

Programa de doctorat:  
**Recerca, desenvolupament i control de medicaments**

**Caracterització de les estructures granulars  
patològiques presents a l'hipocamp dels ratolins  
amb senescència accelerada SAMP8**

Memòria presentada per Gemma Manich Raventós per optar al títol de doctor per la  
Universitat de Barcelona

Dr. Jordi Vilaplana i Hortensi  
(director)

Dra. Carme Pelegrí i Gabaldà  
(directora)

Gemma Manich Raventós  
(doctoranda)

GEMMA MANICH RAVENTÓS  
2014



“It is imperfection - not perfection - that is the end result of the program written into that formidably complex engine that is the human brain, and of the influences exerted upon us.”

“Above all, don't fear difficult moments. The best comes from them.”

*Rita Levi-Montalcini*



Als meus pares, Toni i Montse.  
A les meves germanes Anna i Marta.

A l'Eulàlia, que ens ensenya cada dia a  
somriure al futur.





Després de quatre anys llargs dedicats a realitzar la tesi i moltes, moltíssimes experiències viscudes durant aquest temps, ha arribat el moment de concloure aquest treball. Tancar una etapa permet mirar enrere i, a més a més de la sensació de vertigen després d'observar el camí recorregut, és impossible no adonar-me de l'absoluta i necessària implicació directa o indirecta de moltes persones sense les quals aquesta tesi no s'hagués realitzat. Per això, vull agrair a totes aquestes persones, i a moltes més que potser em deixo, el seu ajut:

Als directors d'aquesta tesi, la Dra. Carme Pelegrí i el Dr. Jordi Vilaplana, per animar-me a realitzar aquesta tesi, orientar-me en la seva realització i mostrar-me un suport incondicional. Moltes, moltíssimes gràcies.

Als companys de laboratori que han fet aquest camí més fàcil, agradable i senzill: Jaume, gràcies per obrir-me el camí; gràcies Quim, per estar sempre disponible per tenir converses interessants; gracias Itsaso por ser tan animada y darle tanta vida al laboratorio. Compartir és viure, i amb tots vosaltres he compartit i viscut intensament.

Als professors i professores del Departament de Fisiologia, que m'han acompanyat de més a prop o més lluny en les tasques docents o de recerca. Gràcies pels consells, paciència i interès. Gràcies per ajudar-me a créixer personalment i professionalment.

A totes i tots els becaris i estudiants del Departament de Fisiologia, amb qui compartim o hem compartit molt més que espais i aparells. Gràcies per les estones dels dinars, anècdotes, consells, ajudes, preocupacions i activitats extradepartamentals que fan que la tesi no hagi estat només treballar sinó que hagi estat com viure en família.

Gràcies David, Isabel, i Vanessa, que estan darrere el teló del Departament de Fisiologia i que fan que sigui possible la feina del dia a dia. Gràcies per fer la feina amb un somriure i fer que les coses difícils siguin fàcils.

Als becaris i estudiants predoctorals del Departament de Farmacologia, amb qui compartim àrea de recerca, model experimental, anticossos, consells, ajuts, i també bromes, preocupacions i riures. Ha estat una convivència molt enriquidora i interessant. Gràcies David, Christian, Luisa, Sergi, Aurelio, Nacho, Dimitri i molts altres que heu passat per "Fisio", o que m'heu vist passar per "Farmaco".

A la Dra. Carme Auladell i el Dr. Albert Martínez, del Departament de Biologia Cel·lular de la Facultat de Biologia, pels seus inestimables comentaris sobre els treballs de microscòpia electrònica. I would like to thank, as well, Prof. Pawel Liberski (University of Lodz) for his help and valuable comments about the electron microscopy studies performed in this thesis. A la Dra. Núria Llor i al Guillaume, del Departament de Química Orgànica, que m'han dedicat un inestimable temps i m'han acollit al seu laboratori, on

m'han ensenyat noves tècniques experimentals essencials per desenvolupar part del projecte d'aquesta tesi.

Als tècnics i caps de servei dels Serveis de Microscòpia Electrònica i els Serveis de Microscòpia Confocal de l'Hospital Clínic i del Parc Científic de Barcelona. Gràcies per la vostra implicació i esforç en el projecte i per ensenyar-me noves tècniques amb tanta dedicació i paciència.

A la Dra. Helena Mira i al Dr. Marçal Vilar, gràcies per oferir-me l'oportunitat de col·laborar en un projecte de recerca tant interessant i de treballar al vostre laboratori. A María, gracias por tu contagioso entusiasmo por la ciencia y por ser tan valiente, eres para mí un verdadero ejemplo de lo que se espera de un estudiante de doctorado! A todas las personas de la Unidad de Neurobiología Molecular del Instituto Carlos III, gracias por vuestra hospitalidad, fue un verdadero placer poder aprender de vosotros y trabajar unos días a vuestro lado.

I am very grateful to Prof. Jerry Turnbull and Dr. Álvaro Acosta-Serrano for hosting me in the University of Liverpool and the Liverpool School of Tropical Medicine. My PhD would have been very different without the research stay in your groups. Thank you for being open from the very first moment to collaborate with this research project, and for your help, advice and interest. I would like to thank also the warm welcome of the people from your groups. Thank you Ashley, Ed, Scott, Yassir, Rachel, Dada, Hannah, Sarah, Fiona and Rebecca for being so friendly, for your patience and help inside and outside the lab, you're so nice! To the tryp family, this crazy and funny group: thank you! Clair (and Ellie, of course), Francesca, Nicholas, Waleed, Karina, Brian, Samirah, Lee, Lucas, James, Dan and Aitor, it was a pleasure to share these months with you. I want to thank also many other people from the LSTM for their sincere interest and help during my stay: Gareth, Ben, Jessica, Pilar, Elena, Nelson and Glauber, among others, thank you so much!

During my PhD I have been able to discuss some of the results with other scientists that generously gave me advice, ideas and new approaches to the results and hypothesis of this thesis. I am grateful to Dr. Ed Yates, Prof. Michael Clague, Prof. Sylvie Urbé and Prof. Ian Prior (University of Liverpool) for their time, as well as Prof. Mathias Jucker (Hertie Institute for Clinical Brain Research) for his enthusiastic interest and encouraging discussion about the hippocampal granules.

Quiero agradecer también a Alejandra Espaliat por su ayuda con el diseño de la portada de la tesis, gracias, me encanta! I agraeixo també a l'Anna la seva fantàstica recomanació.

La recerca és una part molt important de la tesi, però la vida va, evidentment, més enllà del laboratori. Fora del departament hi ha moltes persones imprescindibles i increïbles

sense les quals no hagués pogut arribar a aquí. Amb molts de vosaltres em veig incapaç de concretar aquest agraïment, el silenci parlarà molt millor que qualsevol altra paraula:

Gràcies als meus pares, Toni i Montse.

Gràcies a les meves germanes, Anna i Marta. He tingut una sort immensa de tenir-vos com a germanes. A les noves incorporacions: l'Eulàlia, aquest petit miracle que té un somriure transparent, a l'Oriol, a l'Àlícia.

Al Mauro: gràcies per fer-me gaudir de la vida i pels moments compartits. *Mi estas tre dankema.*

A la família Manich i la família Raventós. Moltes, moltíssimes gràcies. Especialment a la Messe i el Joan, que s'han preocupat i entusiasmat amb mi en l'elaboració d'aquesta tesi.

A les amigues de sempre, les de Sarrià, l'esplai, la parròquia, el barri, el centre: gràcies Anna, Mar, Bruna, Carme, Eli, Maria, Lali, Gemma, Neus i Josep. És fantàstic haver compartit des de ben petites moltes vivències, la tesi és una de moltes altres aventures que espero poder compartir al vostre costat. A en Gerhard, company de beca i tribulacions, moltes gràcies. Herzlichen Gratulation zum Dokortitel, Dr. Landauer!

A la Gemma Mestre, o senzillament, la Gemma. Gràcies per ser una incondicional, per estar sempre al meu costat en els moments bons i els dolents. Som el millor equip!

A en Josep Cobo. No tinc paraules, Josep, el meu agraïment és infinit.

Als cuervins de Farmàcia, amb qui hem compartit la carrera, i tot el que comporta. A l'Edgar i la Gemma, una trobada amb vosaltres ho capgira tot, us admiro. A la Berta (i l'inseparable Otto!), espero que el temps ens regali berenars o esmorzars inacabables, aquí o a Alemanya, gràcies per totes les intenses estones compartides. He tingut molta sort de creuar-me amb vosaltres, sou excel·lents persones i professionals. A molts altres farmacèutics i biòlegs amb qui el destí ens ha portat a compartir part de la carrera o l'entusiasme per la recerca.

Al muequigrup, gràcies Miquel, Marta, Albert, Emili, Pineda, Marc i Robert. Compartir estones amb vosaltres és, a més a més de solucionar el món, assaborir la vida.

Vull agrair també a tantes altres persones que m'han cuidat, orientat, m'han donat oportunitats i han confiat en mi. Gràcies de tot cor.



Aquesta tesi ha estat finançada per:

**Generalitat de Catalunya**

Projecte 2009 SGR 853

Projecte 2014 SGR 525

**Ministerio de Ciencia e Innovación**

Proyecto BFU 2009/08532

Proyecto BFU 2010/22149

La doctoranda ha gaudit dels següents ajuts predoctorals durant la realització d'aquesta tesi:

**Beca d'Inici de Tesi (BIT 2010)**

Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona

**Ajuts destinats a universitats, centres de recerca i fundacions hospitalàries per a la contractació de personal investigador novell (FI-DGR 2011)**

Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca, Generalitat de Catalunya

**Ajut per a projectes i estudis fora de Catalunya 2013**

Fundació Agustí Pedro i Pons, Universitat de Barcelona



# **ÍNDEX:**

<b>I. INTRODUCCIÓ</b>	<b>1</b>
<b>1. Envelliment</b>	<b>1</b>
1.1. Definició i característiques generals de l'envelliment	1
1.2. Longevitat i fisiologia de l'envelliment	2
1.3. Característiques fisiològiques, cel·lulars i moleculars de l'envelliment	4
1.3.1. Inestabilitat genòmica	5
1.3.2. Esgurçament dels telòmers	5
1.3.3. Alteracions epigenètiques	6
1.3.4. Pèrdua de la proteòstasi	6
1.3.5. Desregulació de la detecció de nutrients	9
1.3.6. Disfunció mitocondrial	10
1.3.7. Senescència cel·lular	10
1.3.8. Esgotament de les cèl·lules mare	11
1.3.9. Comunicació intercel·lular alterada	11
1.4. Teories de l'envelliment	12
1.4.1. Teories genètiques o del desenvolupament	12
1.4.2. Teories estocàstiques	13
1.4.2.1. Teories estocàstiques genètiques i moleculars	14
1.4.2.2. Teories cel·lulars	14
1.5. Models d'envelliment	15
1.5.1. Síndromes d'envelliment accelerat en humans	15
1.5.2. Models de senescència cel·lular	16
1.5.3. Models animals d'envelliment	17
1.6. Envelliment cerebral	20
1.6.1. Canvis cognitius, motors i afectius	20
1.6.2. Canvis estructurals i funcionals	22
1.6.3. Canvis cel·lulars i morfològics	23
1.6.4. Canvis metabòlics i circulatoris	24
1.6.5. Alteracions bioquímiques i vies moleculars de l'envelliment cerebral	24
<b>2. Lesions cerebrals en l'envelliment i en malalties neurodegeneratives</b>	<b>31</b>
2.1. Constituents principals i secundaris de les lesions cerebrals	32
2.1.1. Pèptids de $\beta$ -amiloide	33
2.1.2. Proteïna tau	36
2.1.3. Alfa-sinucleïna	37
2.1.4. Proteïna priònica	38
2.1.5. Huntingtina	39
2.1.6. Proteïna TDP43	40



2.1.7. Proteïna FUS	41
2.1.8. Components secundaris de les lesions	41
2.2. Formació i propagació de les estructures amiloides i dels agregats proteics	42
2.3. Característiques histopatològiques de les lesions cerebrals a l'envelliment i les malalties neurodegeneratives	44
2.3.1. Plaques senils i dipòsits de $\beta$ -amiloide	44
2.3.2. Cabdells neurofibril·lars, filaments del neuropil i inclusions de tau	47
2.3.3. Cossos de Pick	49
2.3.4. Grànuls argirofílics	49
2.3.5. Cossos de Lewy	50
2.3.6. Inclusions gials i neuronals citoplasmàtiques	51
2.3.7. Inclusions intranuclears neuronals	51
2.3.8. Plaques de proteïna priònica	52
2.3.9. Inclusions de huntingtina	52
2.3.10. Dipòsits d'ubiquitina, TDP43 i FUS	53
2.3.11. Dipòsits de lipofuscina	54
2.3.12. Cossos de Hirano	55
2.3.13. Cossos granulovacuolars	56
2.3.14. <i>Corpora amilacea</i>	56
2.4. Principals malalties neurodegeneratives que presenten lesions cerebrals	57
2.4.1. Malaltia d'Alzheimer	57
2.4.2. Degeneració lobar frontotemporal i les taupaties	57
2.4.3. Malaltia de Parkinson	58
2.4.4. Esclerosi lateral amiotròfica	58
2.4.5. Malalties priòniques	58
2.4.6. Malaltia de Huntington i altres malalties poliglutamíniques	59
2.5. El solapament o <i>continuum</i> de les lesions cerebrals en les malalties neurodegeneratives	59
<b>3. Ratolí SAMP8</b>	<b>61</b>
3.1. Origen de la soca	61
3.2. El ratolí SAMP8 com a model d'envelliment	61
3.3. Disfuncions cognitives i del comportament associades a l'edat	63
3.3.1. Aprenentatge i memòria	63
3.3.2. Trastorns emocionals i del comportament	64
3.3.3. Ritme circadiari	65
3.4. Alteracions neuropatològiques i neuroquímiques	65
3.4.1. Alteracions neuronals	65
3.4.2. Degeneració espongiforme en el tronc cerebral	66
3.4.3. Alteracions neuroquímiques	67
3.4.4. Astrogliosi i reacció microglial	68

3.4.5. Degeneració oligodendrocítica	69
3.4.6. Disfunció de la barrera hematoencefàlica	69
3.4.7. Virus de la leucèmia murina	70
3.4.8. Estrès oxidatiu	70
3.4.9. Alteracions mitocondrials	71
3.4.10. Grànuls <i>Periodic Acid Schiff</i> i altres dipòsits	72
3.4.11. Fosforilació de la proteïna tau	73
3.4.12. Dipòsits de $\beta$ -amiloide	73
3.5. El ratolí SAMP8 com a model murí de la malaltia d'Alzheimer esporàdica	76
<b>4. Grànuls <i>Periodic Acid Schiff</i></b>	<b>77</b>
4.1. Definició i morfologia	77
4.2. Localització cerebral	77
4.3. Presència i cronologia en ratolins i d'altres animals	78
4.4. Composició i característiques histològiques	81
4.5. Ultraestructura	85
4.6. Origen cel·lular	85
4.7. Alteracions funcionals associades	87
4.8. Heretabilitat	87
4.9. Efecte de les manipulacions i tractaments	88
4.10. Significació fisiopatològica	89
<b>5. Antecedents</b>	<b>91</b>
<b>II. OBJECTIUS</b>	<b>93</b>
<b>III. RESULTATS</b>	<b>97</b>
1. <b>Article 1:</b> <i>Characterization of amyloid-<math>\beta</math> granules in the hippocampus of SAMP8 mice</i>	99
2. <b>Article 2:</b> <i>Presence of a neo-epitope and absence of amyloid-<math>\beta</math> and tau protein in degenerative hippocampal granules of SAMP8 mice</i>	117
3. <b>Article 3:</b> <i>Clustered granules present in the hippocampus of aged mice result from a degenerative process affecting astrocytic digitations and their surrounding neuropil</i>	139
<b>IV. DISCUSSION</b>	<b>169</b>
<b>V. CONCLUSIONS</b>	<b>197</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>201</b>



## ÍNDIX DE FIGURES

<b>Figura 1</b>	Percentatge de supervivència en humans en diferents èpoques de la història .....	3
<b>Figura 2</b>	Pèrdua de la proteòstasi.....	7
<b>Figura 3</b>	Representació global de l'eix somatotròpic .....	9
<b>Figura 4</b>	La senescència replicativa i la immortalització.....	17
<b>Figura 5</b>	Relació filogenètica dels organismes utilitzats com a models en la recerca sobre l'envelliment.....	18
<b>Figura 6</b>	Efectes diferencials de l'envelliment en diversos processos cognitius .....	21
<b>Figura 7</b>	Representació esquemàtica de la pèrdua progressiva de la superfície dendrítica en neurones.....	23
<b>Figura 8</b>	Metabolisme oxidatiu en els mitocondris .....	25
<b>Figura 9</b>	Desregulació de l'homeòstasi del calci observada en l'envelliment.....	30
<b>Figura 10</b>	Seqüències del pèptid $\beta$ -amiloide en diferents espècies i zones de trencament de la proteïna precursora de $\beta$ -amiloide .....	34
<b>Figura 11</b>	Vies proteolítiques de la proteïna precursora de la $\beta$ -amiloide.....	34
<b>Figura 12</b>	Representació esquemàtica de les sis isoformes de la proteïna tau humana presents en el cervell.....	36
<b>Figura 13</b>	Representació la proteïna $\alpha$ -sinucleïna.....	38
<b>Figura 14</b>	Estructures de les isoformes de les proteïnes priòniques Prp <sup>c</sup> i Prp <sup>sc</sup> .....	38
<b>Figura 15</b>	Respresentació de la proteïna huntingtina. ....	40
<b>Figura 16</b>	Definició de l'estructura amiloide. ....	43
<b>Figura 17</b>	Formació de l'estructura amiloide. ....	44
<b>Figura 18</b>	Tincions de diversos tipus de dipòsits cerebrals de $\beta$ -amiloide .....	46
<b>Figura 19</b>	Tincions de diversos tipus de dipòsits cerebrals. ....	50
<b>Figura 20</b>	Tincions d'hematoxilina-eosina realitzades en diversos tipus de dipòsits cerebrals presents en l'envelliment. ....	55
<b>Figura 21</b>	Distribució de les lesions patològiques més destacables en diferents malalties neurodegeneratives .....	60
<b>Figura 22</b>	Imatge d'un ratolí SAMR1 (superior) i un ratolí SAMP1 (inferior) de 12 mesos d'edat .....	61
<b>Figura 23</b>	Esquema de tests utilitzats per avaluar la memòria en rosegadors .....	64
<b>Figura 24</b>	Marcatge d'immunofluorescència amb l'anticòs 4G8 dirigit contra els aminoàcids 17-24 del pèptid $\beta$ -amiloide .....	75
<b>Figura 25</b>	Marcatge d'immunofluorescència dels agregats amiloides de l'hipocamp del ratolí SAMP8 amb anticòs dirigit contra pèptids $\beta$ -amiloide. ....	75
<b>Figura 26</b>	Clústers de grànuls tenyits amb <i>Periodic Acid Schiff</i> a l'hipocamp d'un ratolí ApoE-deficient .....	77
<b>Figura 27</b>	Esquema de la distribució topogràfica dels clústers de grànuls PAS en un cervell de ratolí C57BL/6 de 18 mesos d'edat .....	78
<b>Figura 28</b>	Gràfica de la quantificació de clústers de grànuls PAS de grànuls a l'hipocamp d'animals C57BL/6 d'edats entre els 2 i els 30 mesos.....	80
<b>Figura 29</b>	Reacció de Periodic Acid Schiff en una molècula d'hexosa.....	81

<b>Figura 30</b>	Presència de marcatge de $\beta$ -amiloide i d'heparan-sulfat proteoglicà en els grànuls hipocampals d'un ratolí SAMP8 de 6 mesos d'edat. ....	102
<b>Figura 31</b>	Presència de marcatge de tau i MAP2 en els grànuls hipocampals d'un ratolí SAMP8 de 6 mesos d'edat. ....	102
<b>Figura 32</b>	Marcatge immunohistoquímic dels grànuls de l'hipocamp d'un ratolí SAMP8 representatiu de 9 mesos d'edat. ....	120
<b>Figura 33</b>	Marcatge immunohistoquímic dels grànuls de l'hipocamp d'un ratolí SAMP8 representatiu de 9 mesos d'edat amb l'anticòs Tau5A. ....	121
<b>Figura 34</b>	Marcatge immunohistoquímic de talls criostàtics d'encèfal d'un ratolí APP-PS1 representatiu de 9 mesos d'edat amb l'anticòs 12F4 anti- $\beta$ -amiloide ....	122
<b>Figura 35</b>	Imatges de microscòpia electrònica de grànuls madurs de l'hipocamp de ratolins representatius SAMP8 de 14 mesos. ....	142
<b>Figura 36</b>	Imatge de microscòpia electrònica de grànuls immadurs de l'hipocamp d'un ratolí representatiu SAMP8 de 14 mesos. ....	143
<b>Figura 37</b>	Imatges de microscòpia electrònica de grànuls madurs de l'hipocamp de ratolins representatius SAMP8 de 14 mesos marcats amb anticossos IgM anti-neoepítóp... ..	144
<b>Figura 38</b>	<i>Human ABO(H) blood group determinants</i> .....	184
<b>Figura 39</b>	<i>Glial syncytia and intercellular gap junctions of astrocytes</i> .....	191
<b>Figura 40</b>	<i>Model suggested for the clustered granules composition and formation process in the hippocampus of aged mice</i> .....	194

## **ÍNDIX DE TAULES**

Taula 1	Malalties associades a l'envelliment humà i fenotip observat en persones envellides.....	5
Taula 2	Malalties neurodegeneratives principals, lesions distintives d'aquestes malalties i les seves molècules determinants o principals .....	32
Taula 3	Composició molecular de les principals lesions cerebrals associades a malalties neurodegeneratives. ....	42
Taula 4	Cronologia d'aparició de la neuropatologia característics de l'AD i els dèficits cognitius en diverses soques de ratolins transgènics models d'AD i en el ratolí SAMP8 .....	76
Taula 5	Resum de les soques transgèniques utilitzades en diversos estudis dels clústers de grànuls PAS .....	79
Taula 6	Tincions histoquímiques realitzades en clústers de grànuls PAS .....	82



## **ABREVIACIONS**

5-HT	5-hidroxitriptamina o serotonina	DJ-1	<i>PARK7</i> o <i>Parkinson's disease (autosomal recessive, early onset)-7 protein</i>
AD	<i>Alzheimer's disease</i> malaltia d'Alzheimer	DLB	<i>dementia of Lewy bodies</i> demència dels cossos de Lewy
ADAM	<i>A desintegrin and metalloproteinase</i>	DNA	àcid desoxirribonucleic, <i>deoxyribonucleic acid</i>
AGD	<i>argyrophilic grain disease</i> malaltia dels grànuls argirofíllics	DS	<i>Down's syndrome</i> síndrome de Down
AGE	<i>advanced glycation endproducts</i>	EAAT	<i>excitatory amino acid transporter</i> , transportador d'aminoàcids
AICD	<i>AβPP intracellular domain</i>	ERCC	<i>excision repair cross-complementation</i>
ALS	<i>Amyotrophic lateral sclerosis</i> Esclerosi lateral amiotròfica	Fc	<i>crystallizable fragment</i>
AMP	<i>5'-adenosine monophosphate-activated protein</i>	FDG-PET	<i>Fluoro-deoxyglucose positron emission tomography</i>
AMPK	<i>AMP kinase</i>	FOXO	<i>Forkhead box transcription factor</i>
AKT	<i>protein kinase B</i>	FTD	<i>frontotemporal dementia</i> Demència frontotemporal
APH-1	<i>anterior pharinx-defective-1</i>	FTLD	<i>frontotemporal lobar degeneration</i> Degeneració lobar frontotemporal
ApoE	apolipoproteïna E	FUS	<i>fused in sarcoma protein</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>	GABA	àcid γ-aminobutíric
Aβ	β-amiloide	GalNAc	N-acetilgalactosamina <i>Galactosamine N-acetyl</i>
AβPP	<i>β-amyloid precursor protein</i> proteïna precursora de la β-amiloide	GCI	<i>glial cytoplasmic inclusions</i> inclusions glials citoplasmàtiques
BACE	<i>β-site cleaving enzyme</i>	GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
BBB	<i>blood-brain barrier</i> barrera hematoencefàlica	GH	<i>growth hormone</i> hormona del creixement,
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>	GJ	<i>gap junction</i> unió de tipus gap
BRCA	<i>breast cancer</i>	GLUT1	transportador de glucosa tipus 1
CA	<i>Cornu Ammonis</i>	GnRH	hormona alliberadora de la gonadotropina
CoA	<i>corpora amylacea</i>	GSK3	<i>glycogen synthase kinase 3</i>
CAA	<i>cerebral amyloid angiopathy</i> angiopatia amiloide cerebral	GSS	<i>Gerstmann–Sträussler–Scheinker syndrome</i>
CBD	<i>corticobasal degeneration</i>	HD	malaltia de Huntington, <i>Huntington's disease</i>
CDK	<i>cyclin dependent kinase</i>	HDL	<i>high density lipoprotein</i>
CJD	<i>Creutzfeldt-Jakob disease</i>	HE	hematoxilina-eosina
CMA	<i>chaperone-mediated autophagy</i> autofàgia mitjançada per xaperones	HGPS	<i>Hutchinson-Guilford progeria syndrome</i>
CNP	<i>2', 3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase</i>	HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
CR	<i>caloric restriction</i> restricció calòrica	Hsc70	<i>heat shock cognate protein-70 kDa</i>
CREB	<i>cyclic AMP response element-binding protein</i>	Hsp	xaperones o <i>heat shock proteins</i>
CS	<i>Cockayne's syndrome</i>	HSPG	heparan-sulfat proteoglicà
CTF	<i>carboxyl terminal fragment</i>		
DA	dopamina		



IGF-1	<i>insulin growth factor-1</i>	p62	<i>sequestosome 1</i>
IgG	immunoglobulina G	PAS	<i>Periodic Acid Schiff</i>
IgM	immunoglobulina M	PB	<i>Pick's bodies</i>
IL	interleucina	PD	malaltia de Parkinson <i>Parkinson's disease</i>
IIS	<i>insulin and IGF-1 signalling pathway</i>	PDC	<i>parkinsonism-dementia complex</i>
KO	<i>knock-out</i>	PHF	<i>paired helical filaments</i>
Ku80	subunitat de 80-quilodaltons del complex Ku	PI3K	<i>phosphatidylinositide 3-kinases</i>
LAMP-2A	<i>lysosome-associated membrane protein 2A</i>	PINK132	<i>PTEN-induced putative kinase</i>
LB	<i>Lewy bodies</i> cossos de Lewy	PiD	<i>Pick's disease</i> malaltia de Pick
LC3	<i>microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3</i>	PKC	<i>phosphokinase C</i>
LCR	líquid cefal-loraquidi	Prp o Prp <sup>C</sup>	<i>cellular prion protein</i> proteïna priònica cel·lular
LDL	<i>low density lipoprotein</i> lipoproteïnes de baixa densitat	Prp <sup>Sc</sup>	<i>scrapie or resistant prion protein</i> proteïna priònica resistent
LMNA	<i>lamin A/C</i>	PRNP	<i>prion protein gene</i>
LPR	<i>lipoprotein receptor</i>	PSP	<i>progressive supranuclear palsy</i> paràlisi supranuclear progressiva
LTD	<i>long-term depression</i>	PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
LTP	<i>long-term potentiation</i>	PUFA	<i>poly-unsaturated fatty acids</i>
MAG	<i>mouse ascites Golgi</i>	ROI	<i>region of interest</i>
MAO-B	<i>monoamine-oxidase B</i>	ROS	<i>reactive oxygen species,</i> espècies reactives d'oxigen
MAP	<i>microtubule-associated protein</i>	RT-PCR	<i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i>
MBP	<i>myelin basic protein</i>	sAHP	<i>slow after hyperpolarization</i>
MDA	malondialdehid	SAM	<i>senescence-accelerated mouse</i>
mRNA	<i>ribonucleic acid messenger</i> àcid ribonucleic missatger	SAMP	<i>SAM-prone</i>
MSA	<i>multiple systemic atrophy</i>	SAMR	<i>SAM-resistant</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>	SIRT	sirtuïna
MuLV	<i>murine leukemia virus</i>	SIPS	<i>stress-induced premature senescence</i>
NAbs	<i>natural antibodies</i>	SNCA	<i>synuclein-<math>\alpha</math> non-A4 component of amyloid precursor</i>
NAC	<i>non-amyloid <math>\beta</math>-component</i>	SOD1	<i>superoxide dismutase 1</i>
NAD+	<i>aldehyde dehydrogenase</i>	SUMO	<i>Small ubiquitin-related modifier</i>
NCI	<i>neuronal cytoplasmic inclusions</i>	TARDBP	<i>transactive response DNA binding protein</i>
NeuN	<i>neuronal nuclei antigen,</i>	TDP43	<i>TAR binding protein 43</i>
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor-<math>\kappa</math>B</i>	Terc	<i>telomerase RNA complex</i>
NFT	<i>neurofibrillary tangles</i> Cabdells neurofibril·lars	Trp53	<i>transformation-related protein-53</i>
NGF	<i>nerve-growth factor</i>	TMB	Taxa metabòlica basal
NII	<i>neuronal intranuclear inclusions</i>	UPS	<i>ubiquitin proteasome system</i> sistema d'ubiquitina-proteasoma
NLRP3	<i>NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3</i>	WS	<i>Werner's syndrome</i>
NMDA	N-metil-D-aspartat	XPD	<i>xeroderma pigmentosum group D</i>
NMDAR	receptor d'NMDA	$\beta$ -LIGS	<i><math>\beta</math>-like immunoreactive granular structures</i>
NT	<i>neuropil threads</i>		
p16	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>		
p25	<i>cyclin-dependent kinase 5 activator 1</i>		
p53	<i>tumor protein p53</i>		

# I. INTRODUCCIÓ



## **1. ENVELLIMENT**

### **1.1. Definició i característiques generals de l'envelliment**

L'envelliment no disposa actualment d'una definició que sigui universalment acceptada, sinó que la seva explicació es troba oberta a diverses interpretacions evolutives, comparatives i ontogèniques (Carey i Zou, 2007). Diferents propostes de definicions generalistes afirmen que l'envelliment és qualsevol procés lligat al temps (Rai i Troen, 2011), i més concretament, un procés de creixement i de maduració independent de l'edat cronològica (Timiras, 2007). El gerontòleg americà Bernard Strehler defineix l'envelliment com un procés on es compleixen quatre criteris: és universal, intrínsec, progressiu i deleteri (Viña *et al.*, 2007). Segons Denham Harman, pare de la teoria de l'estrès oxidatiu, l'envelliment és el resultat d'una acumulació progressiva de canvis en el cos que esdevenen amb el pas del temps i que causen un augment de la probabilitat d'emmalaltir o de morir en l'individu (Viña *et al.*, 2007). En una línia similar, Kirkwood i Austad (2000) defineixen l'envelliment com la pèrdua progressiva de funcionalitat acompanyada per una disminució de la fertilitat i un augment de la mortalitat.

El concepte d'envelliment s'utilitza fàcilment com a sinònim de senescència, tot i tenir significats divergents. L'envelliment comprèn des de la concepció fins a la mort de l'individu. D'altra banda, la senescència es refereix als processos postmadurats que comporten una homeòstasi disminuïda i un increment de la vulnerabilitat de l'organisme (Rai i Troen, 2011). Els termes envelliment i senescència, però, s'utilitzen sovint com a sinònims, i així es farà a partir d'ara en aquest text.

L'Organització Mundial de la Salut (*World Health Organization*, 2004) classifica l'envelliment en tres etapes segons l'edat: els individus entre 60-74 anys són ancians-joves, entre 75-84 anys són ancians-vells, i les persones de més de 85 anys són ancians-ancians. Com s'esmentava anteriorment en una de les definicions, tot i que la senescència se sol definir exclusivament amb indicadors temporals o cronològics, la correspondència a nivell fisiològic és ambigua i difícil de determinar.

Aquesta elevada variabilitat o indeterminació és precisament un dels indicadors comuns de la senescència: l'heterogeneïtat entre individus de la mateixa edat es mostra en les respostes fisiològiques, en els nivells i la temporalitat dels canvis fisiològics, i en la susceptibilitat a modificacions específiques funcionals promogudes per factors externs o interns (Timiras, 2011). La variabilitat de manifestacions de l'envelliment ha donat lloc a una diferenciació del concepte d'envelliment saludable o exitós, en el qual no es manifesten discapacitats o disfuncionalitats fisiològiques, cognitives i socials; en contraposició a l'envelliment usual o habitual, que comprèn a més a més les malalties associades a les edats avançades (Rai i Troen, 2011).

D'altra banda, així com l'inici de l'envelliment és indefinit, el final d'aquesta etapa es troba invariablement marcat per un event únic: la mort. La relació entre l'envelliment i la mort és característica, però la mort no és pas exclusiva d'aquest procés. Tot i que l'envelliment es relaciona amb una major aparició de malalties, no s'accepta en si mateix com a causa natural de la mort (Timiras, 2007). En general, s'exclou la possibilitat que la mort i l'envelliment tinguin una causa comuna. Molt probablement l'envelliment i la mort es relacionen a través de nombroses i complexes interaccions a nivells genètic i ambiental (Austad, 1997; Harris, 2000; Kirkwood i Austad, 2000; Shostak, 2002; Sternberg i Timiras, 1999).

### **1.2. Longevitat i fisiologia de l'envelliment:**

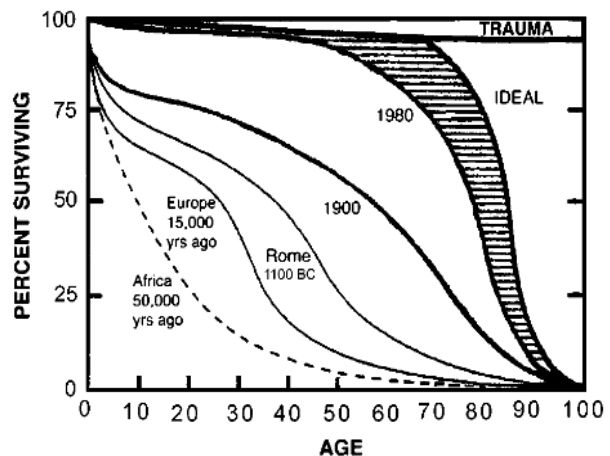
Donat que la finalització de l'envelliment coincideix també amb el final de la vida, els indicadors cronològics de la vida d'individus i espècies permeten estudiar comparativament les relacions que s'estableixen entre la fisiologia i la cronologia de l'envelliment. L'estudi comparatiu de l'envelliment entre les espècies que el presenten pretén no només determinar els trets comuns, sinó explicar-ne les grans diferències de longevitat.

Els indicadors habitualment usats en els estudis comparatius de l'envelliment entre espècies són la **longevitat màxima** o **esperança de vida màxima potencial**, que és l'edat màxima registrada de qualsevol individu d'una espècie; i la **longevitat mitjana**, és a dir, l'esperança de vida mitjana al naixement d'un individu d'una espècie concreta, o l'edat en què el 50% d'una població determinada sobreviu (Rai i Troen, 2011; Viña *et al.*, 1997).

La comparació entre la longevitat i diferents indicadors fisiològics ha permès observar una relació positiva i amb una elevada significació entre la longevitat i el pes corporal dels mamífers placentaris. La significació augmenta si correlacionem la longevitat amb el pes del cervell respecte el pes corporal de les espècies vertebrades (Harris, 2000). Aquestes correlacions semblen reforçar la importància del sistema nerviós en la regulació de les variables fisiològiques i el manteniment de l'homeòstasi (Timiras, 2007).

Una altra variable fisiològica que presenta una relació important amb la longevitat de les espècies és la taxa metabòlica basal (TMB). Com més elevada és la TMB més s'escurça la longevitat de l'espècie. La TMB expressa la quantitat d'energia alliberada per unitat de temps degut al procés del catabolisme i els processos fisiològics del cos. Per tant, una major eficiència energètica i una menor producció o acumulació de radicals lliures evitarien el malmetement cel·lular (Timiras, 2007). La relació entre la longevitat i la TMB és reforçada pels estudis amb intervencions ambientals realitzats en diferents espècies. Els estudis més significatius són sobre la restricció calòrica (CR, *caloric restriction*), els efectes dels quals s'esmenten més endavant (apartat 1.3.5).

Finalment, la fecunditat o la funció reproductiva, mesurada a través del nombre de naixements per any en l'etapa de maduresa d'un individu, es relaciona inversament a la longevitat de l'espècie. La durada del procés de creixement fins a la maduresa s'ha relacionat també amb aquesta variable (Timiras, 2007). La reducció o la modificació de la ingesta calòrica que han retardat l'assoliment de la maduresa en animals d'experimentació han demostrat un allargament de la longevitat, a més a més d'un manteniment de les funcions reproductives i la termoregulació fins a edats avançades (Timiras, 2007). La severitat i el nombre de les patologies associades a l'augment de l'edat també s'ha reduït en aquests animals (Segall *et al.*, 1983). En el cas de l'espècie humana, l'edat de la menopausa s'ha relacionat amb la longevitat, de manera que un inici de la menopausa anterior als 40 anys comporta el doble de probabilitats de defunció amb anterioritat que les dones que presenten la menopausa més enllà dels 50 anys (Snowden *et al.*, 1989; van der Schouw *et al.*, 1996). Així doncs, la funció reproductiva de les espècies influeix el fenomen de l'envelliment, i aquesta relació s'ha explicat des de les teories evolutives comentades a l'apartat 1.4.



**Figura 1. Percentatge de supervivència en humans en diferents èpoques de la història.** Els valors de la longevitat mitjana de la població han millorat, però la supervivència màxima potencial es manté igual (Troen, 2003).

Pel que fa als índexs de longevitat en humans s'ha pogut observar que els canvis socials i econòmics, el descobriment de les vacunes, l'augment de la higiene i de les intervencions en salut pública, han causat un augment exponencial de la longevitat mitjana, però no han modificat la longevitat màxima, que s'ha mantingut gairebé constant (Figura 1) (Viña *et al.*, 2007).

La recerca realitzada en animals dóna lloc a uns resultats similars als canvis que s'han observat en l'espècie humana. És a dir, s'ha pogut observar que la suplementació vitamínica o la pràctica d'exercici han augmentat la longevitat mitjana en rates, ratolins o *Drosophila*, però molt poques intervencions ambientals han aconseguit un augment de la longevitat màxima (Viña *et al.*, 2007). Actualment només hi ha tres factors àmpliament testats que han pogut allargar la longevitat màxima d'una espècie, els tres relacionats amb la modificació de la TMB. Un d'ells és la disminució de la temperatura ambiental o la reducció de l'exercici, que han resultat efectives en poiquiloderms (Sohal i Weindruch, 1996), un altre factor és la CR que, a nivell general, ha permès estendre la longevitat màxima en una gran diversitat d'espècies (Mair i Dillin, 2008; McCay *et al.* 1935). Recentment, una altra intervenció que ha demostrat

l'allargament de la longevitat en diferents soques de ratolins, a més a més d'invertebrats, és l'administració de rapamicina (Harrison *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2009). És la primera intervenció farmacològica efectiva que ha permès observar un allargament en la vida de les espècies. De totes maneres, l'efecte de la rapamicina es troba en discussió, ja que no està clar si l'actuació d'aquest fàrmac a nivell de les vies de senyalització mTOR augmenta la longevitat perquè actua modulant els efectes de l'envelliment a través d'aquesta via (Wilkinson *et al.*, 2012) o pel seu efecte anticancerígen (Neff *et al.*, 2013).

### **1.3. Característiques fisiològiques, cel·lulars i moleculars de l'envelliment**

Malgrat l'elevada variabilitat del procés de l'envelliment, al llarg dels estudis realitzats sobre la senescència s'han pogut determinar unes característiques comunes pròpies d'aquest procés en individus de diferents espècies de mamífers (Rai i Troen, 2011; Troen, 2003):

1. Augment de la mortalitat després de la maduració.
2. Canvis en la composició bioquímica dels teixits.
3. Disminució progressiva de les funcions fisiològiques.
4. Disminució de la capacitat d'adaptació de la resposta als factors ambientals.
5. Augment de la susceptibilitat i la vulnerabilitat a les malalties.

L'envelliment dona lloc a una pèrdua d'eficiència de les funcions fisiològiques, encara que aquest declivi és heterogeni en funció de l'òrgan. En general, es pot dir que l'envelliment implica una pèrdua de la capacitat de manteniment de l'homeòstasi quan l'individu s'enfronta a canvis exteriors, especialment en condicions extremes. Així doncs, durant la vellesa, per exemple, es pateixen més dificultats per adaptar-se als canvis de temperatura. La majoria d'òrgans vitals pateixen atròfia o degeneració, especialment els òrgans formats per cèl·lules postmitòtiques, com neurones, cèl·lules musculars o miocàrdiques. També s'observa una degradació de la matèria intercel·lular. Un altre fenomen associat a l'envelliment és l'augment de la susceptibilitat a lesions, infeccions i altres formes d'estrès, fets que es deuen principalment a una resposta immunitària deficient. A més a més, hi ha un increment notable en les incidències de càncer i malalties neurodegeneratives (Viña *et al.*, 2007). Les patologies i manifestacions més comunes de la vellesa es detallen a la Taula 1.

Malalties associades a l'envelliment		Canvis fenotípics associats a l'envelliment	
Malaltia d'Alzheimer	Infart cerebral	Pèrdua de cabell i coloració grisa	Augment del greix corporal
Degeneració macular associada a l'edat	Hiperplàsia benigna de pròstata	Problemes de les articulacions, disminució de la mobilitat	Davallada de funcions neurals: atenció, aprenentatge, memòria
Cataractes	Càncer	Sistema immune menys efectiu	
Malaltia de Parkinson	Aterosclerosi	Pèrdua de l'elasticitat de la pell	
Diabetis <i>mellitus</i> tipus 2	Neuropatia perifèrica	Pèrdua d'elasticitat dels pulmons	
Osteoporosi	Osteoartritis	Alteracions vasculars	

**Taula 1. Malalties associades a l'envelliment humà i fenotip observat en persones envellides.** L'envelliment és un factor de risc de primer ordre per a un conjunt de malalties humanes. A més a més, l'envelliment comporta alteracions en tots els òrgans, fet que dóna lloc a uns fenotips fisiopatològics generals (adaptat de Behl i Ziegler, 2014).

D'altra banda, López-Otín *et al.* (2013) han proposat recentment les que consideren nou característiques comunes a nivell cel·lular i molecular de l'envelliment de diferents organismes, principalment dels mamífers. En els propers apartats s'expliquen detalladament aquests elements comuns de l'envelliment descrits en aquest article: la inestabilitat genòmica, l'escurçament dels telòmers, les alteracions epigenètiques, la pèrdua de la proteòstasi, la desregulació dels nutrients, la disfunció mitocondrial, la senescència cel·lular, l'esgotament de les cèl·lules mare i la comunicació intercel·lular alterada.

### 1.3.1. Inestabilitat genòmica

L'acumulació del dany al DNA amb el pas del temps per l'actuació de diferents agents externs i interns dóna lloc a una gran diversitat de danys en el genoma. Aquests efectes s'observen en mutacions produïdes en el DNA nuclear i el DNA mitocondrial de les cèl·lules senescentes (Moskalev *et al.*, 2013, Park i Larsson, 2011), així com en les alteracions de l'arquitectura nuclear (Déchat *et al.*, 2008). En general, el dany del DNA nuclear és solventat pels mecanismes de reparació (Lord i Ashword, 2012), que disminueixen la seva eficiència amb l'augment de l'edat. L'envelliment prematur observat en les síndromes de Werner (WS, *Werner's syndrome*) (descriu a l'apartat 1.5.1) i de Bloom és conseqüència de l'acumulació del dany infligit al DNA (Burtner i Kennedy, 2010). Algunes laminopaties o defectes de l'arquitectura nuclear també poden donar lloc a síndromes progeroides (Worman, 2012).

### 1.3.2. Escurçament dels telòmers

La regió cromosòmica dels telòmers és especialment sensible al deteriorament associat a l'envelliment (Blackburn *et al.*, 2006). Només les telomerasen tenen la



capacitat de replicar els extrems terminals dels cromosomes o telòmers. Per això les cèl·lules somàtiques que no expressen la telomerasa, és a dir, la majoria de cèl·lules dels mamífers, pateixen una pèrdua progressiva dels telòmers a cada replicació del DNA. Aquest efecte s'ha pogut observar en ratolins envellits i en humans d'edat avançada (Blasco, 2007).

### 1.3.3. Alteracions epigenètiques

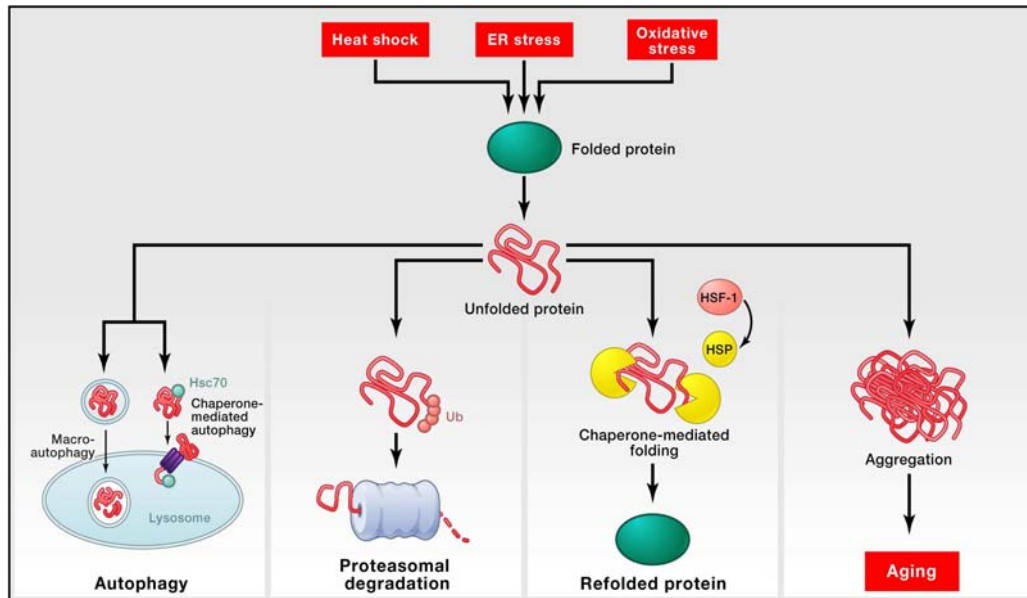
S'han observat alteracions epigenètiques en teixits i cèl·lules al llarg de la vida (Talens *et al.*, 2012). Entre aquestes, hi ha les alteracions en els patrons de metilació del DNA, les modificacions post-translacionals d'histones i la remodelació de la cromatina. Alguns exemples dels canvis de metilació del DNA són les hipometilacions i hipermetilacions observades en cèl·lules d'animals i pacients amb síndromes progeroides, que també es reproduïxen en l'envelliment normal (Osorio *et al.*, 2010; Shumaker *et al.*, 2006). La deacetilació de la histona H3 metilada a la lisina 9 del gen *SIRT6* (Zhong *et al.*, 2010) és una de les modificacions post-translacionals descrites que dona lloc a un augment de la longevitat (Maegawa *et al.*, 2010). Algunes de les proteïnes que afecten la remodelació de la cromatina, com l'heterocromatina 1 $\alpha$ , presenten nivells disminuïts en cèl·lules patològiques o envellides (Pegoraro *et al.*, 2009; Pollina i Brunet, 2011). A més a més, l'envelliment s'ha associat a un elevat soroll de fons transcripcional (Bahar *et al.*, 2006) i una producció abundant d'mRNA aberrants (Harries *et al.*, 2011; Nicholas *et al.*, 2010).

### 1.3.4. Pèrdua de la proteòstasi

L'envelliment i algunes malalties neurodegeneratives associades es relacionen amb una homeòstasi proteica disfuncional. Així doncs, l'expressió crònica de proteïnes amb un plegament erroni contribueix a diverses malalties, com és el cas de la malaltia d'Alzheimer (AD, *Alzheimer's disease*), la malaltia de Parkinson (PD, *Parkinson's disease*) o les cataractes (Powers *et al.*, 2009). L'alteració dels mecanismes d'estabilització del plegament de les proteïnes té com a conseqüència canvis en la proteòstasi amb l'envelliment (Koga *et al.*, 2011). Els principals mecanismes implicats en el manteniment de la proteòstasi són la família de les xaperones o *heat shock protein* (hsp), i els sistemes proteolítics intracel·lulars, és a dir, el sistema autofàgic-lisosomal i el sistema ubiquitina-proteasoma (Figura 2).

Les famílies de xaperones se situen en subcompartiments cel·lulars específics, com és el cas de les xaperones del reticle endoplasmàtic. Bona part d'aquestes molècules reconeixen motius força comuns de les proteïnes, tals com regions hidrofòbiques o modificacions post-translacionals, però part de les hsp controlen motius específics de proteïnes (Koga *et al.*, 2011). La disfunció del sistema de plegament de proteïnes a través de les xaperones moleculars augmenta amb l'increment de l'edat i en certes malalties neurodegeneratives (Calderwood *et al.*, 2009). Per exemple, s'ha descrit un

augment dels nivells de l'hsp27, una xaperona induïble present en el cervell humà, en les àrees degenerades de cervells de malalts d'AD (Renkawek *et al.*, 1993; Wilhemus *et al.*, 2006). A més a més, ratolins transgènics deficientes en coxaperones de la família *heat shock* presenten un fenotip d'envelliment accelerat, mentre que les soques de ratolins amb una longevitat elevada mostren una regulació a l'alça d'algunes hsp (Min *et al.*, 2008; Swindell *et al.*, 2009).



**Figura 2. Pèrdua de la proteòstasi.** L'estrès endògen i extern causen l'absència o l'anomalia del plegament de les proteïnes. Les proteïnes no plegades adopten la conformació correcta gràcies a les xaperones o es marquen per a la seva destrucció amb els sistemes ubiquitina-proteasoma o autofàgic-lisosomal. En el sistema autofàgic reconeix la proteïna no plegada mitjançant la xaperona hsc70 i es transloca a l'interior dels lisosomes (CMA) o es segresten les proteïnes i orgànuls malmesos (macroautofàgia). El fracàs del plegament o la degradació de la proteïna pot comportar l'acumulació i l'agregació, que causen efectes proteotòxics (López-Otín *et al.*, 2013).

En els sistemes proteolítics també s'han observat canvis associats a l'envelliment que contribueixen a una menor eficiència en aquests sistemes i, com a conseqüència, provoquen alteracions en la proteòstasi (Koga *et al.*, 2011). El sistema ubiquitina-proteasoma (UPS, *ubiquitin-proteasome system*) consisteix en el marcatge dels substrats per a la seva degradació i el posterior trencament proteolític, a través de la cascada de conjugació de l'ubiquitina i el proteasoma, respectivament (Martínez-Vicente *et al.*, 2005). L'UPS té un paper principal en l'homeòstasi cel·lular i el control de qualitat de les proteïnes, i contribueix a la degradació regulada de proteïnes intracel·lulars essencials implicades en la progressió del cicle i la divisió cel·lulars, i la transcripció i senyalització cel·lulars (Goldberg, 2007; Murata *et al.*, 2009; Navon i Ciechanover, 2009). Amb l'envelliment, l'eficiència del proteasoma disminueix a causa d'alteracions intrínseques a aquest complex i a factors extrínsecs que poden interferir en la seva funció. És el cas, per exemple, de l'efecte inhibitori directe observat en el proteasoma quan hi ha una oxidació massiva i un entrecreuament proteic dels seus

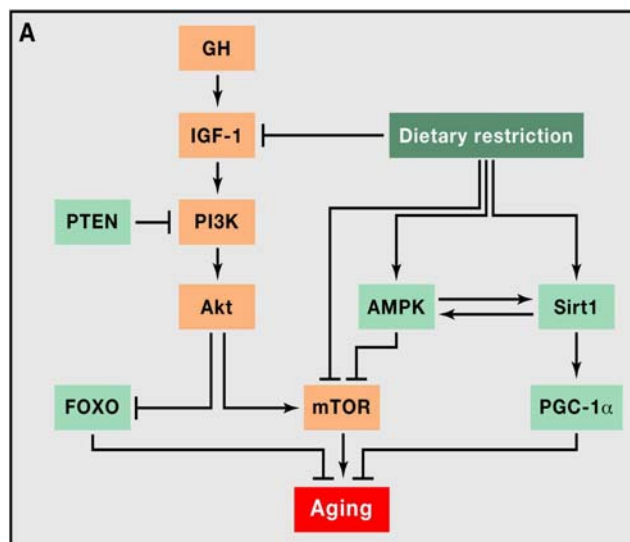
substrats (Bulteau *et al.*, 2001; Sitte *et al.*, 2000). El decreixement dels nivells d'ubiquitina o la regulació a la baixa de la lligasa E3 són alguns dels canvis del sistema de la ubiquitina observats en el procés de l'envelliment (Hawse *et al.*, 2004; Jahnge *et al.*, 1990). De fet, l'ubiquitina i d'altres proteïnes de l'UPS són components habituals dels agregats i inclusions de malalties neurodegeneratives (Martínez-Vicente *et al.*, 2005). Tot i així, la quantitat d'aquestes proteïnes és relativament petita, i per tant, les alteracions observades en l'activitat de l'UPS no poden ser exclusivament explicades per la retenció d'aquests components (Bennett *et al.*, 2005). És interessant el fet que algunes de les proteïnes mutades en aquestes patologies tenen també un efecte inhibitori directe en el proteasoma (Bennett *et al.*, 2005). A més a més, en algunes patologies com l'AD, l'alteració de l'activitat del proteasoma afavoreix la formació dels agregats de proteïnes (Flood *et al.*, 2005). Fins i tot s'han pogut detectar mutacions en alguns components de l'UPS en l'AD i la PD, com és el cas respectivament de la parkina i l'hidrolasa C-terminal de la ubiquitina-1, i els enzims E3 i deubiquitilasa que presenten mutacions en algunes formes de PD (Martínez-Vicente *et al.*, 2005). El decreixement de la funció de l'UPS amb l'envelliment, així com l'estat crònic d'inflamació associat a aquesta condició que contribueix al bloqueig de la seva activitat, donen lloc a una disfunció de la resposta neuronal davant l'estrès oxidatiu. Aquest fet pot tenir com a conseqüència directa l'acumulació de proteïnes i lípids oxidats en aquestes neurones (Keller *et al.*, 2004; Mishto *et al.*, 2003).

El sistema autofàgic-lisosomal consta de tres vies principals d'autofàgia: la macroautofàgia, la microautofàgia, de la qual se'n desconeix els mecanismes precisos en els mamífers, i l'autofàgia mitjançada per xaperones (CMA, *chaperone-mediated autophagy*). La macroautofàgia consisteix en la inclusió d'una àrea del citosol en vesícules de doble membrana, o autofagosomes, que s'uneixen posteriorment a lisosomes per a degradar-ne el seu contingut (He i Klionsky, 2009; Mizushima *et al.*, 2008). L'inducció dels processos de macroautofàgia mitjançant la inhibició de la via de senyalització de mTOR a través de l'administració de rapamicina ha permès observar un augment de la longevitat de ratolins (Blagosklonny, 2011; Harrison *et al.*, 2009). La macroautofàgia basal, i especialment la induïble, són essencials per al manteniment de l'homeòstasi cel·lular i el balanç energètic (Kuma *et al.*, 2004; Mizushima *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2009), per a la defensa enfront agressors externs i interns (Deretic, 2009) i per a la remodelació cel·lular (Tsukamoto *et al.*, 2008). El decreixement de la seva activitat s'ha descrit en el cervell humà envellit (Shibata *et al.*, 2006) i la seva disfunció s'ha associat també a malalties neurodegeneratives (He i Klionsky, 2009; Mizushima *et al.*, 2008). En la CMA, les proteïnes són translocades directament a través de la membrana lisosomal (Cuervo, 2010; Dice, 2007). Aquest fet es produeix mitjançant el reconeixement específic entre la proteïna i l'hsc70 (*heat shock cognate protein-70 kDa*); i posteriorment s'esdevé la interacció d'aquest complex amb el receptor proteïna tipus 2A associada a lisosoma (LAMP-2A, *lysosome-associated membrane protein-2A*). Experimentalment, s'ha descrit que ratolins transgènics que presenten

una còpia extra de LAMP2a no pateixen el declivi de l'activitat autofàgica associat a l'edat (Zhang i Cuervo, 2008). Les alteracions del CMA contribueixen també a la neuropatologia de malalties com el PD i algunes tauopaties (Cuervo *et al.*, 2004; Martínez-Vicente *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010).

### 1.3.5. Desregulació de la detecció de nutrients

L'eix somatotròpic en mamífers comprèn des de l'hormona de creixement (GH, *growth hormone*) fins al factor de creixement de la insulina-1 (IGF-1, *insulin growth factor-1*), que actua a nivell cel·lular, a través de la via de senyalització de la insulina i l'IGF-1 (IIS, *insulin and IGF signalling pathway*). Aquesta via és, d'entre les vies de control de l'envelliment, la més conservada a nivell evolutiu. Entre les seves dianes hi ha la família de factors de transcripció FOXO i els complexos mTOR, involucrats també en l'envelliment (Barzilai *et al.*, 2012). Les mutacions o els polimorfismes genètics que redueixen les funcions de la GH, el receptor d'IGF-1 i d'insulina, i les molècules efectores de la cascada de senyalització intracel·lular com AKT, mTOR i FOXO, s'han relacionat amb canvis en la longevitat en humans i amb models d'envelliment (Barzilai *et al.*, 2012; Fontana *et al.*, 2010; Kenyon *et al.*, 2010). La CR, implicada en aquestes vies, ha augmentat la longevitat en totes les espècies eucariotes investigades, incloent-hi primats no humans (Colman *et al.*, 2009; Fontana *et al.*, 2010; Mattison *et al.*, 2012). La modulació negativa de la via IIS mitjançant la sobreexpressió en ratolins de factors antitumorals com el PTEN, o els ratolins amb PI3K hipomòrfica mostren un augment de la longevitat (Foukas *et al.*, 2013; Ortega-Molina *et al.*, 2012). Paradoxalment, en l'envelliment normal s'observa una disminució dels nivells de GH i d'IGF-1 (Schumacher *et al.*, 2008). Per tant, l'envelliment comporta una disminució de l'activitat de l'IIS, però aquest efecte, modulad constitutivament, augmenta la longevitat. L'explicació a aquesta aparent contradicció és l'actuació d'una resposta defensiva dels mecanismes cel·lulars per minimitzar el creixement cel·lular i el metabolisme en un sistema ja danyat (Garinis *et al.*, 2008). La detecció de l'estat nutricional també es produeix per altres vies de senyalització, com s'ha esmentat anteriorment. Així doncs, les altes concentracions d'aminoàcids són detectades a través de la via de mTOR, mentre



**Figura 3. Representació global de l'eix somatotròpic.** Inclou l'hormona de creixement (GH), les vies de la insulina i el factor de creixement de la insulina (IGF-1) i la seva relació amb la restricció calòrica. Les molècules que afavoreixen l'envelliment s'emmarquen en color taronja, les que tenen propietats anti-envelliment es mostren en verd (López-Otín *et al.*, 2013).

que els estats energètics disminuïts són detectats mitjançant els nivells d'AMP i NAD<sup>+</sup>. La seva modulació es produeix a través de l'AMPK i les sirtuïnes, respectivament (Houtkooper *et al.*, 2010). A la Figura 3 s'il·lustren les vies de detecció de l'estat nutricional que intervenen en l'envelliment.

#### 1.3.6. Disfunció mitocondrial

L'envelliment de cèl·lules i organismes disminueix l'eficàcia de la cadena respiratòria dels mitocondris, augmentant la pèrdua d'electrons i reduint la generació d'ATP (Green *et al.*, 2011) i la disfunció mitocondrial pot accelerar els processos d'envelliment en mamífers (Kutjoh *et al.*, 2005; Trifunovic *et al.*, 2004; Vermulst *et al.*, 2008). Inicialment la teoria mitocondrial de les espècies reactives d'oxigen (ROS, *reactive oxygen species*), proposada per Harman (1965), permetia explicar l'augment de les ROS i el deteriorament dels mitocondris que a la llarga causa un dany cel·lular global. De totes maneres, evidències recents contradiuen aquesta teoria ja que s'ha observat, per exemple, que les ROS inicien cascades de senyalització intracel·lular de proliferació i supervivència en resposta a senyals fisiològiques i condicions d'estrès (Sena i Chandel, 2012). A més a més, s'ha descrit un augment de la longevitat en llevats i *C. elegans* quan hi ha un increment de les ROS (Doonan *et al.*, 2008; Mesquita *et al.*, 2010; Van Raamsdonk i Hekimi, 2009), i no s'observa envelliment accelerat en ratolins manipulats genèticament per augmentar el dany mitocondrial i la producció de ROS (Van Remmen *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2009). Totes aquestes evidències es poden explicar si les ROS s'observen com a senyals de supervivència a l'estrès (López-Otín *et al.*, 2013). Inicialment, doncs, les ROS activarien la resposta homeostàtica a través de sistemes de compensació. Amb l'augment de l'edat, i per tant de l'estrès i els danys cel·lulars, les ROS augmentarien fins a arribar a un llindar on, en comptes d'activar els mecanismes compensatoris, s'agreujaria el maldament cel·lular associat a l'edat (Hekimi *et al.*, 2011).

#### 1.3.7. Senescència cel·lular

El procés de senescència cel·lular consta d'una aturada del cicle cel·lular unit a un conjunt de canvis fenotípics estereotipats (apartat 1.5.2) (Campisi i d'Adda di Fagagna, 2007; Kuilman *et al.*, 2010). La inducció d'aquest procés s'ha pogut observar com a conseqüència del dany al DNA no telomèric i de la derepressió del locus INK4a/ARF (Collado *et al.*, 2007). Entre els marcadors de la senescència cel·lular hi ha la detecció del dany del DNA o la presència de  $\beta$ -galactosidasa associada a la senescència (Dimri *et al.*, 1995). Ambdós marcadors augmenten progressivament amb l'avenç de l'edat, tal i com s'ha observat en alguns teixits, tot i que no tots els òrgans presenten canvis en aquests marcadors (Wang *et al.*, 2009). L'augment de les cèl·lules senescentes sol classificar-se com a una contribució més al procés de l'envelliment, tot i que podria tractar-se d'un altre mecanisme de resposta compensatòria dels teixits per tal d'eliminar possibles cèl·lules malmeses o potencialment oncogèniques (López-Otín *et*

*al.*, 2013). De totes maneres, la pèrdua d'eficiència del reemplaçament cel·lular que implica l'eliminació de la cèl·lula senescent i la mobilització de cèl·lules progenitores es pot veure afectat amb l'edat, donant lloc a una acumulació de cèl·lules senescentes que contribueixin activament al procés de l'envelliment, per exemple a través de la secreció massiva de citoquines proinflamàtòries i metalloproteïnases (Kuilman *et al.*, 2010; Rodier i Campisi, 2011). Pel que fa al locus INK4a/ARF, s'ha observat que és el locus genòmic correlacionat amb més patologies associades a l'edat (Jeck *et al.*, 2012). Les vies de p16<sup>INK4a</sup>/Rb i p19<sup>ARF</sup>/p53 són les més importants (Gorgoulis i Halazonetis, 2010), ja que els nivells d'aquests factors es correlacionen amb l'edat cronològica dels teixits analitzats en ratolí i humans (Krishnamurthy *et al.*, 2004; Ressler *et al.*, 2006).

### 1.3.8. Esgotament de les cèl·lules mare

La disminució del potencial de regeneració dels teixits en l'envelliment s'observa en l'hematopoesi (Shaw *et al.*, 2010) i en la majoria de compartiments de cèl·lules mare adultes, com el còrtex prefrontal del ratolí (Molofsky *et al.*, 2006), l'os (Gruber *et al.*, 2006) i les fibres musculars (Conboy i Rando, 2012). La disminució estudiada en cèl·lules mare hematopoètiques de ratolins envellits es correlaciona amb l'acumulació de dany del DNA (Rossi *et al.*, 2007) i amb la sobreexpressió de proteïnes inhibidores del cicle cel·lular, com és el cas de la proteïna p16<sup>INK4a</sup> (Janzen *et al.*, 2006). L'escurçament dels telòmers també és una altra causa de la disminució de les cèl·lules mare en múltiples teixits (Flores i Blasco, 2005; Sharpless i DePinho, 2007). A més a més, la proliferació excessiva de cèl·lules mare i progenitores pot exhaurir els nínxols amb antel·lació com s'ha observat, per exemple, en els ratolins p21 *null*, fet que afavoreix la senescència prematura en aquests ratolins (Cheng *et al.*, 2000; Kippin *et al.*, 2005). D'altres treballs apunten també a una importància dels factors cel·lulars secretats per les cèl·lules mare a través de la senyalització extrínseca, ja que el declivi de la funció en les cèl·lules mare neurals i musculars en ratolins envellits és revertit amb l'administració de factors sistèmics de ratolins joves (Conboy *et al.*, 2005; Villeda *et al.*, 2011).

### 1.3.9. Comunicació intercel·lular alterada

El procés de l'envelliment també altera la comunicació a nivell intercel·lular, ja sigui endocrina, neuroendocrina, o neuronal (Laplante i Sabatini, 2012; Rando i Chang, 2012; Russel i Kahn, 2007; Zhang *et al.*, 2013). L'augment dels processos d'inflamació, la disminució de la immunovigilància en contra de patògens i cèl·lules premalignes, i els canvis de composició dels ambients pericel·lulars i extracel·lulars desajusten la regulació de les vies de senyalització neurohormonals. El conjunt d'aquests processos proinflamatoris fenotípics característics de l'envelliment dels mamífers és conegut com a *inflammaging* (Salminen *et al.*, 2012). Entre els efectes de l'*inflammaging* s'ha observat l'augment de l'activació de l'inflamasoma NLRP3 i altres vies proinflamàtòries, que donen lloc a un augment de producció d'IL-1 $\beta$ , el factor de

necrosi tumoral i els interferons (Green *et al.*, 2011; Salminen *et al.*, 2012). De forma paral·lela a l'*inflammaging* hi ha una disminució de l'activitat del sistema adaptatiu immune (Deeks, 2011), fet que pot contribuir a agreujar el fenotip de l'envelliment a nivell sistèmic. El declivi dels nivells de l'hormona alliberadora de la gonadotropina (GnRH) contribueixen a canvis relacionats amb l'envelliment com la fragilitat òssia, la debilitat muscular, l'atròfia de la pell i la disminució de la neurogènesi (Zhang *et al.*, 2013). Aquests resultats suggereixen una regulació hipotalàmica de l'envelliment sistèmic a través de la integració de les vies inflamatòries i els efectes neuroendocrins mediat per GnRH. Les sirtuïnes també estan involucrades en els processos d'inflamació propis d'edats avançades (Kawahara *et al.*, 2009; Rothgiesser *et al.*, 2010). Més enllà dels processos inflamatoris, sembla que hi ha una possible propagació dels canvis relacionats amb l'envelliment d'un òrgan a un altre que explicaria la coordinació fenotípica interorgànica. Un exemple és la inducció del fenotip cel·lular entre cèl·lules col·lindants unides per unions gap en processos mediat per ROS (Nelson *et al.*, 2012).

#### **1.4. Teories de l'envelliment**

La teoria de l'envelliment dels organismes sexuals postulada per Bell (1988) es pot considerar un dels principis fonamentals de la biogerontologia. A nivell general, aquesta teoria contempla que la distinció entre la línia germinal i la línia somàtica cel·lular és el que determina la presència del procés de senescència en les diferents espècies vives (Kirkwood i Austad, 2000), encara que aquesta diferenciació coincideix en gran part amb espècies que tenen una reproducció sexual (Carey i Zou, 2007).

A partir de l'observació dels processos de senescència en diferents éssers vius s'han postulat un gran nombre de teories que expliquen el procés des d'un punt de vista desenvolupamental o genètic i estocàstic. A continuació s'explicaran només les teories més rellevants.

##### **1.4.1. Teories genètiques o del desenvolupament**

Les teories genètiques i del desenvolupament consideren que el procés de l'envelliment és part d'un control continu del desenvolupament i maduració programats genèticament. Aquesta observació parteix, per exemple, de les grans diferències evidents de longevitat entre espècies (Perls *et al.*, 2002).

El fet que les espècies en estat salvatge morin principalment per factors externs, i no per mort natural, descarta la selecció natural com a força principal per a la selecció positiva d'algun gen que accelerés la senescència (Kirkwood i Austad, 2000). De fet, tal i com explica la **teoria de l'acumulació de mutacions**, la poca presència d'individus envellits debilita la força de la selecció natural a edats avançades, i per tant, dels gens que estan involucrats en el procés de senescència (Charlesworth, 1994). La manca de selecció d'aquests gens afavoreix l'acumulació de gens amb efectes deleteris a llarg

termini i l'heterogeneïtat en el procés de senescència en una mateixa població (Kirkwood i Austad, 2000).

La **teoria de la pleiotropia antagonística** postulada per Williams (1957) suggereix que els gens amb efectes avantatjosos en etapes vitals inicials són afavorits per la selecció natural, tot i que aquests gens puguin tenir efectes negatius en edats més avançades. Així doncs, una petita diferència positiva en l'etapa inicial de desenvolupament d'un individu pot tenir un efecte compensatori molt més gran que un ampli desavantatge en etapes posteriors.

Aquest efecte compensatori és també un concepte important en la **teoria del soma d'un sol ús** (Kirkwood 1977, 1996), que postula la importància d'una compensació proporcionada dels recursos metabòlics entre el manteniment somàtic i la reproducció. El manteniment somàtic de les cèl·lules en un estat fisiològic òptim només és necessari per allargar la supervivència dels individus i afavorir la possibilitat de reproducció. Per tant, la inversió metabòlica dels recursos limitats dels organismes es realitzarà prioritaritzant l'homeòstasi i la reproducció dels individus, abans que la reparació del dany molecular.

Una de les teories desenvolupamentals és la **teoria neuroendocrina**, on es proposa la influència clau de la disminució funcional de les neurones i les hormones associades per al procés de l'envelliment (Frolkis, 1982; Mobbs, 1998). Entre les pèrdues funcionals que alterarien l'homeòstasi s'inclouen les dels òrgans reproductius i la de la fertilitat, la disminució de la força muscular, la menor capacitat de recuperació de les situacions d'estrès i la disfuncionalitat de l'activitat cardiovascular i respiratòria (Carey i Zou, 2007). D'altra banda, la **teoria immunològica** de l'envelliment es basa en dues observacions: la capacitat funcional del sistema immunitari disminueix amb l'edat, com s'evidencia amb la disminució de les respostes de les cèl·lules T als mitògens i la disminució de la resistència a les malalties infeccioses; i la resposta autoimmune augmenta amb l'edat, com es pot veure per l'augment dels nivells dels autoanticossos (Walford, 1974). La **teoria de la capacitat replicativa finita de les cèl·lules** (Hayflick i Moorhead, 1965) postula que l'envelliment és un fenomen cel·lular, així com també orgànic, i que la pèrdua de les capacitats funcionals dels individus reflecteix la suma de la pèrdua de capacitat funcional crítica de les cèl·lules individuals.

#### 1.4.2. Teories estocàstiques

Les teories estocàstiques es basen en l'acumulació fortuïta d'aconteixements perjudicials degut a l'exposició a factors exògens adversos. Aquí s'inclouen les teories genètiques i moleculars, i les teories cel·lulars.



#### 1.4.2.1. Teories estocàstiques genètiques i moleculars

De forma general, hi ha diverses teories que incideixen en punts diferents del procés de translació dels gens i la transcripció de l'mRNA, on es postula una acumulació de mutacions i errors. La **teoria de la restricció dels codons** (Strehler, 1977) es basa en la disfunció del procés de translació de l'mRNA als aminoàcids amb l'augment de l'edat. D'altra banda, la **teoria de la regulació dels gens**, (Kanungo, 1975) i la **teoria de la disdiferenciació** (Cutler, 1982) postulen que la senescència és el resultat dels canvis en l'expressió dels gens i de la regulació de l'activitat genòmica (Sharma *et al.*, 2006; Arking, 2006). La manca de regulació genòmica comportaria la síntesi de proteïnes impròpies de l'estat diferenciat de la cèl·lula concreta on es produeixen. La **teoria de l'error-catàstrofe** (Orgel, 1963) recull les idees de les teories anteriors i postula com a idea principal que els error en les proteïnes es poden produir en diferents estadis del seu procés de síntesi, fet que amplifica el nombre de proteïnes alterades. Finalment, la **teoria de la mutació somàtica i el malmetement del DNA** (Rai i Troen, 2011) proposa que l'acumulació de mutacions al DNA de les cèl·lules somàtiques causades per agents ambientals assoleix un nivell d'errors incompatible amb la vida cel·lular, i això provoca disfuncions associades a l'envelliment.

A nivell proteic, s'ha postulat la **teoria de la modificació de les proteïnes** (Levine i Stadman, 1996; Troen, 2003), on s'hipotetitza que l'acumulació de modificacions post-translacionals en les proteïnes alterades poden produir disfuncionalitats cel·lulars i orgàniques (Björkstén, 1974; Kohn, 1978), que comporten un guany o pèrdua de la funció de les proteïnes (Hall, 1976).

#### 1.4.2.2. Teories cel·lulars

La **teoria de l'acumulació dels productes de desfet** (coneguda com a *wear-and-tear*) suggereix que els efectes dels agents lesius ordinaris augmenten progressivament, provocant una pèrdua d'eficiència de l'organisme (Arking, 2006; Carey i Zou, 2007). Tot i així, la dilucidació de mecanismes de regulació de l'envelliment descarten aquesta teoria (Carey i Zou, 2007).

La **teoria de l'estrès oxidatiu o dels radicals lliures**, postulada per Harman (1965), proposa que els agents oxidants, és a dir els radicals lliures o les ROS endògenes produïdes a les cèl·lules, donen lloc a un patró de danys moleculars acumulatius que causen la majoria de canvis de l'envelliment. El metabolisme aeròbic genera espècies derivades de l'oxigen que reaccionen amb macromolècules, autopropagant-se i amplificant l'efecte inicial de les ROS i promovent un dany intracel·lular que dona lloc a la davallada fisiològica pròpia de l'envelliment (Arking, 2006; Sohal i Weindruch, 1996). Una ampliació d'aquesta teoria, anomenada **teoria del DNA mitocondrial**, hipotetitza que l'acumulació de dany al DNA mitocondrial comporta un defecte en la respiració cel·lular que, alhora, augmenta la formació de ROS, comportant un dany addicional del

DNA mitocondrial (Ozawa, 1997). Per tant, es combinen els fets estocàstics i el determinisme genètic de l'herència del DNA mitocondrial matern.

### **1.5. Models d'envelliment**

#### 1.5.1. Síndromes d'envelliment accelerat en humans

Tot i que no hi ha cap malaltia que tingui un fenotip exacte de l'envelliment normal en humans hi ha diverses malalties genètiques que exhibeixen síndromes progeroides o d'envelliment accelerat.

Entre aquestes malalties s'identifica la **síndrome progeroide de Hutchinson-Guildford** (HGPS, *Hutchinson-Guildford progeroid syndrome*), que és una malaltia autosòmica recessiva extremadament poc comuna, en la qual les característiques pròpies de l'envelliment es comencen a desenvolupar en els primers anys de vida (Brown, 1990). Algunes manifestacions inclouen la pell arrugada, l'encorbament, la pèrdua de cabell prematura i el retard del creixement. Els pacients d'HGPS pateixen aterosclerosi i infart de miocardi avançats, i la mort se sol produir al voltant dels 30 anys (Rai i Troen, 2011). L'HGPS és una laminopatia resultant d'una substitució d'un nucleòtid (*single-nucleotide substitution*) (1824 C>T) en el gen de la làmina A, que codifica dos components de l'embolcall nuclear (Meshorer i Gruenbaum, 2008). Aquesta mutació produeix una versió truncada del precursor prelàmina A, anomenada progerina, que causa la formació de lamina nuclear anòmala, un retard en l'ensamblatge del nucli, dany del DNA i anormalitats cromosòmiques (Scaffidi i Misteli, 2005).

La **síndrome de Werner** (WS) és una altra malaltia hereditària autosòmica recessiva (Brown, 1990) amb manifestacions d'envelliment accelerat en els pacients, com aterosclerosi prematura, intolerància a la glucosa, atròfia de la pell, hipogonadisme, osteoporosi i pèrdua i enblanquiment del cabells de forma prematura (Muftuoglu *et al.*, 2008). Tenen també una major predisposició a certs tipus de càncers, i presenten, a més a més, atròfia laríngea i ulceracions a cames i braços (Rai i Troen, 2011). La mort dels pacients sol ser abans dels 50 anys, normalment de càncer o infart de miocardi (Epstein, 1966; Goto, 1997). El gen responsable del WS és autosòmic recessiu, s'ha localitzat la mutació al cromosoma 8, i sembla correspondre a una helicasa (Yu, 1996). Les cèl·lules dels pacients presenten inestabilitat cromosòmica, escurçament dels telòmers, una mutació elevada de gens i recombinacions no homòlogues (Brosh i Bohr, 2002).

La **síndrome de Cockayne** (CS, *Cockayne's syndrome*) és una malaltia congènita autosòmica i recessiva caracteritzada per un retard en el creixement i nanisme, una sensibilitat extrema a la llum, retinopatia, sordesa, anormalitats del sistema nerviós i envelliment prematur (Stevnsner *et al.*, 2008). Aquesta malaltia es manifesta normalment a partir del primer any de vida i la mortalitat s'esdevé cap als 12 anys d'edat (Rai i Troen, 2011). La CS és el resultat de mutacions a les proteïnes de

reparació acoblades a la transcripció i al genoma global, ERCC6 i ERCC8, conegudes també com a CSA i CSB, respectivament (Henning *et al.*, 1995; Troelsta *et al.*, 1992).

Les persones amb **síndrome de Down** (DS, *Down's syndrome*) tenen una trisomia o translocació del cromosoma 21 (Brown, 1990; Turker *et al.*, 1999). Pateixen un inici primerenc de malalties vasculars, intolerància a la glucosa, pèrdua de cabell, degeneració òssia i de les articulacions, i un augment de la incidència de càncer (Troen, 2003). L'esperança de vida és entre 50-70 anys, i la demència és més freqüent i prèviament en aquests pacients respecte en la població sana (Troen, 2003). La presència del gen  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ , *amyloid  $\beta$* ) en el cromosoma 21 explica la similitud de canvis neuropatològics amb els observats a l'AD, com els dipòsits d'A $\beta$  i cabdells neurofibril·lars (NFT, *neurofibrillary tangles*) (Rai i Troen, 2011).

### 1.5.2. Models de senescència cel·lular

La senescència cel·lular va ser descrita per primer cop per Hayflick (1965) com el procés que limita la proliferació dels fibroblasts humans en cultiu cel·lular. Els fibroblasts humans solen créixer normalment quan es cultiven per primer cop, però van perdent paulatinament la capacitat de dividir-se després de quaranta o més doblaments de la població (Campisi, 2007). Tot i així, les cèl·lules romanen viables un cop assolit aquest estat, i metabolitzen RNA i proteïnes, però aturen el seu creixement en la fase G1 del cicle cel·lular i no inicien la replicació del DNA en resposta a agents mitògens fisiològics (Campisi, 1996; Cristofalo i Pignolo, 1993). Aquest fenomen és conegut com a **senescència replicativa o replicació cel·lular**, i les cèl·lules que pateixen aquest procés es diu que tenen una esperança de vida finita (Campisi, 2007).

En general, diversos tipus de cèl·lules tant d'organismes unicel·lulars com de cèl·lules de mamífer (Guarente i Kenyon, 2000) pateixen la senescència replicativa en cultiu (Campisi, 2001, 2007) i *in vivo* (Campisi, 1996; Stanulis-Praeger, 1987). Tot i així, el procés varia depenent del tipus de cèl·lula i l'espècie (Parrinello *et al.*, 2003; Sherr i DePinho, 2000; Wright i Shay, 2000). Les característiques generals que s'han pogut observar en aquest fenomen són: (1) les cèl·lules somàtiques no es divideixen de forma indefinida, i tenen diferents mecanismes per a limitar la replicació; (2) la línia germinal i les cèl·lules embrioniques primàries tenen un potencial il·limitat de divisió o són immortalment replicatives; (3) les cèl·lules canceroses comparteixen també la capacitat replicativa immortal; (4) la senescència replicativa és controlada per gens supressors de tumors, que poden ser inactivats per mutacions o canvis epigenètics en cèl·lules cancerígenes; (5) la senescència cel·lular està limitada en humans, i rarament s'immortalitzen les cèl·lules; (6) aquest fenomen és menor en el cas de les cèl·lules de rosegadors, que després d'un fenomen d'inestabilitat o crisi esdevenen immortals; i (7) la immortalització incrementa en gran manera la probabilitat de transformació maligna (Bringold i Serrano, 2004; Campisi, 2001; Cristofalo *et al.*, 2004; Hasty, 2001; Wright i Shay, 2002). Les característiques dels punts 6 i 7 s'il·lustren a la Figura 4.

El fenotip propi de les cèl·lules senescentes presenta com a característiques l'aturada del cicle cel·lular; en algunes cèl·lules, la resistència als senyals que causen l'apoptosi (Seluanov *et al.*, 2001), i canvis funcionals en les cèl·lules diferenciades degut a les modificacions en l'expressió gènica (Campisi i D'Adda di Fagnana, 2007).

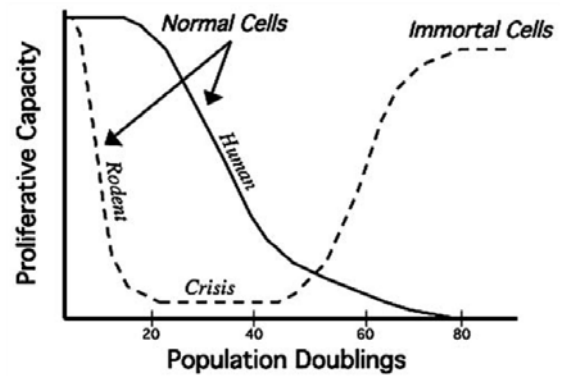
El cultiu cel·lular en condicions subòptimes o d'estrès ambiental pot afectar també negativament la replicació cel·lular. Aquesta pèrdua accelerada de la capacitat proliferativa és coneguda com a **senescència prematura o senescència prematura induïda per estrès** (SIPS, *stress-induced premature senescence*), un fenomen amb trets molt similars a la senescència replicativa (Campisi i D'Adda di Fagnana, 2007; Toussaint *et al.*, 2002).

### 1.5.3. Models animals d'envelliment

La recerca sobre l'envelliment realitzada en models animals té un llarg recorregut que ha acabat convergint en un estudi profund d'aquest procés en algunes espècies concretes. Així doncs, els models més utilitzats en biogerontologia són el llevat o *Saccharomyces cerevisiae*, el nemàtode *Caenorhabditis elegans*, la mosca del vinagre o *Drosophila melanogaster*, i el ratolí de laboratori *Mus musculus* (Buffenstein *et al.*, 2008). El fet que aquestes espècies es trobin a una distància considerable entre elles dins l'arbre filogenètic (Figura 5) ha facilitat l'estudi dels mecanismes d'envelliment conservats entre espècies (Buffenstein *et al.*, 2008). A més a més, l'estudi d'aquests models ha permès aprofundir en els mecanismes reguladors genètics, moleculars i bioquímics de la longevitat, i ha contribuït a una entesa general dels processos de senescència (Guarente i Kenyon, 2000; Liang *et al.*, 2003; Ricklefs i Finch, 1995; Tatar *et al.*, 1997).

Una de les febleses de l'ús estàndard d'aquests models és el fet que comparteixen una longevitat curta (Finch, 1990), i per tant, no són els animals més adequats per a l'estudi dels mecanismes protectors de l'envelliment ben desenvolupats en d'altres espècies. Per estudiar aquests mecanismes caldria aprofundir en l'estudi d'animals amb longevitat llarga.

Malgrat que no hi ha cap model de ratolí que mostri tot el fenotip de l'envelliment propi dels humans, aquesta espècie és valuosa per aprofundir en alguns mecanismes



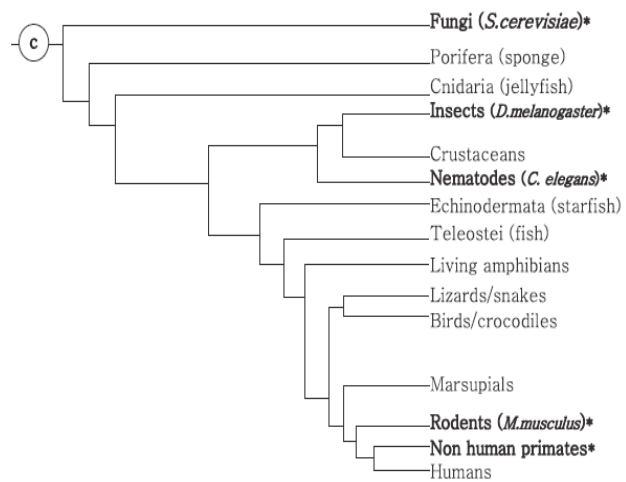
**Figura 4. La senescència replicativa i la immortalització.** La majoria de cèl·lules mitòticament normals proliferen a través d'un procés de senescència replicativa on s'esgota la capacitat proliferativa. Les cèl·lules de rata o ratolí poden immortalitzar-se després d'un període de crisi, però les cèl·lules humanes rarament s'immortalitzen (Campisi, 2007).

moleculares, donat que és ideal per provar tractaments a causa del seu cost reduït, té una vida curta i mostra certa facilitat per a la manipulació genètica (Hasty i Vigj, 2004).

L'estudi de l'envelliment en un ampli ventall de soques congènites de ratolins es realitza a través de la monitorització de diferents variables al llarg de la vida dels animals (Vanhooren i Libert, 2013), tenint en compte les variabilitats intrínseques entre soques. Aquestes diferències donen lloc a un ampli rang de valors en l'esperança de vida d'aquests animals, com mostra l'estudi realitzat pel *Jackson Aging Centre*, amb 31 soques de ratolins diferents amb una esperança de vida mitjana entre els 251 i els 964 dies. Aquesta variabilitat s'ha pogut relacionar, per exemple, amb els nivells d'IGF-1 en plasma, ja que presenten una relació inversa amb la vida mitjana d'aquests animals (Vanhooren i Libert, 2013). A més a més, es pot ampliar el coneixement de la base genètica de l'envelliment relacionant la càrrega genètica de les diverses soques de ratolins amb l'esperança de vida mitjana, o comparant ratolins recombinants congènits de soques diferents amb la soca original (Klebanov *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2002).

La caracterització fenotípica i genotípica de l'envelliment en les soques de ratolins s'ha ampliat a partir **d'intervencions** en aquests animals que n'allarguen la vida mitjana (Vanhooren i Libert, 2013). El model per excel·lència d'intervenció en ratolins és la CR (McCay *et al.*, 1935; Osborne *et al.*, 1917). Aquesta intervenció té com a resultat un rejuveniment de la fisiologia a través de l'alentiment dels canvis associats a l'edat i de l'activitat fisiològica en adults, però sense observar variacions en l'aparició d'aquests canvis (apartat 1.3.5). De forma similar, la restricció de la metionina, que s'ha relacionat amb la CR ha demostrat un augment de la longevitat màxima en ratolins (Miller *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2009). Aquests animals mostren un retard en canvis associats a l'envelliment, com l'aparició de cataractes o els nivells disminuïts d'insulina, glucosa, hormona tiroidea T4 i IGF-1 en el sèrum (Miller *et al.*, 2005).

Altres compostos administrats que han mostrat un efecte interessant en l'envelliment són, per exemple, el resveratrol, l'aspirina, l'àcid nordihidroguaiaretic i la rapamicina. Tot i que el resveratrol ha mostrat canvis transcripcionals similars als de la CR en cervell, cor i múscul esquelètic (Barger *et al.*, 2008), no està clar que tingui capacitat



**Figura 5. Relació filogenètica dels organismes utilitzats com a models en la recerca sobre l'envelliment.** Els organismes més utilitzats són el *S. cerevisiae*, *D. melanogaster*, *C. elegans* i *M. musculus* (Buffenstein *et al.*, 2008).

per allargar la vida dels ratolins (Bass *et al.*, 2007; Wood *et al.*, 2004). D'altra banda, l'aspirina i l'àcid nordihidroguaiarètic han demostrat un augment de l'esperança de vida en ratolins mascles (Strong *et al.*, 2008); i hi ha múltiples evidències de l'augment de l'esperança de vida en ratolins administrats amb rapamicina (Harrison *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2011) (apartat 1.3.4).

L'hipofisectomia, o resecció quirúrgica de la glàndula pituitària allarga també l'esperança de vida en ratolins mascles, que augmenta fins al 21% respecte els controls (Powers *et al.*, 2006). Aquesta intervenció redueix els nivells de GH, IGF-1 i hormones tiroidees entre d'altres i afecta, doncs, a vies de senyalització importants en l'envelliment (Vanhooren i Libert, 2013).

D'altra banda, les diferents modificacions genètiques que afecten l'esperança de vida dels ratolins ha ampliat les possibilitats per a l'estudi de l'envelliment a partir d'aquests models. Les mutacions puntuals que extenen la vida mitjana d'aquesta espècie són eïnes interessants per a explorar les bases moleculars dels canvis relacionats amb l'edat a nivell de la funció cel·lular i dels teixits. Dues soques de ratolins que pateixen un efecte en la longevitat gràcies a la mutació recessiva puntual són el ratolí nan Ames (Brown-Borg *et al.*, 1996; Schaible i Gowen, 1961) i el ratolí nan Snell o *Pou1f1dw* (Flurkey *et al.*, 2001; Snell, 1929). Les mutacions en aquests gens tenen com a resultat una diferenciació defectiva de les cèl·lules somatotròpiques, tirotròpiques i lactotròpiques de la pituitària (Li *et al.*, 1990). A nivell fenotípic, aquests ratolins es caracteritzen per un retard important del creixement, nivells sèrics indetectables de GH, hormona estimuladora de la tiroides i prolactina (Cheng *et al.*, 1983), i alteracions en la via de senyalització d'IIS (Bartke *et al.*, 1998), a més a més d'un metabolisme reduït (Hunter *et al.*, 1999). D'altres animals transgènics amb mutacions en les vies de la GH i la via d'IIS han mostrat també un allargament de la vida. Per exemple, s'han observat aquests efectes en els ratolins *knock-out* (KO) per a la GH (Aguiar-Oliveira *et al.*, 2010), o a les femelles del ratolí KO per al substrat del receptor de l'insulina-1, que incrementen en un 32% l'esperança de vida (Selman *et al.*, 2008), entre d'altres.

Un altre efecte propi d'algunes mutacions és la reducció de l'esperança de vida en ratolins, fet que se sol traduir també en un fenotip d'envelliment accelerat. En molts casos, però, aquest fenotip sol manifestar unes característiques segmentades de l'envelliment, i per això cal tenir en compte les característiques diferencials respecte l'envelliment normal (Vanhooren i Libert, 2013). Actualment hi ha fins a set soques diferents que compleixen els tres criteris que Hasty i Vijg (2004) consideren essencials per a establir que una soca de ratolins amb una sola mutació és plausible per l'estudi de l'envelliment. Aquests criteris són: la presentació de l'envelliment amb posterioritat al desenvolupament i maduració complets, una manifestació del fenotip demostrable

en poblacions control en un punt similar a la corba de supervivència, i la presència d'una acceleració del fenotip de l'envelliment en múltiples teixits.

Les soques de ratolins que actualment compleixen de forma general aquests criteris presenten mutacions al gen de la proteïna Ku80 (Lim *et al.*, 2000; Vogel *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 1996), el gens *XPD* (de Boer *et al.*, 1998, 2002), *LMNA* (Mounkes *et al.*, 2003), *BRCA1* (Cao *et al.*, 2003; Deng, 2001; Weaver *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2001), *TERC* (Blasco, 2002; Blasco *et al.*, 1997; Rudolph *et al.*, 1999), *TRP53* (Tyner *et al.*, 2002) o *Klotho* (Kuro-O *et al.*, 1997). Cal destacar que les mutacions *LMNA* i *Klotho* presenten signes d'envelliment abans d'assolir la maduresa reproductiva, mentre que les altres soques els presenten més endavant.

Finalment, les soques amb senescència accelerada o SAM (*senescence-accelerated mouse*) no tenen una mutació puntual causant del fenotip, sinó que contenen un fons multigenètic que s'ha relacionat amb una major inestabilitat genòmica amb l'edat, fet que suggereix una reparació defectuosa del DNA (Nisitani *et al.*, 1990; Odagiri *et al.*, 1998). En el capítol 3 s'aprofundeix sobre l'origen i les característiques d'aquesta soca.

## 1.6. Envelliment cerebral

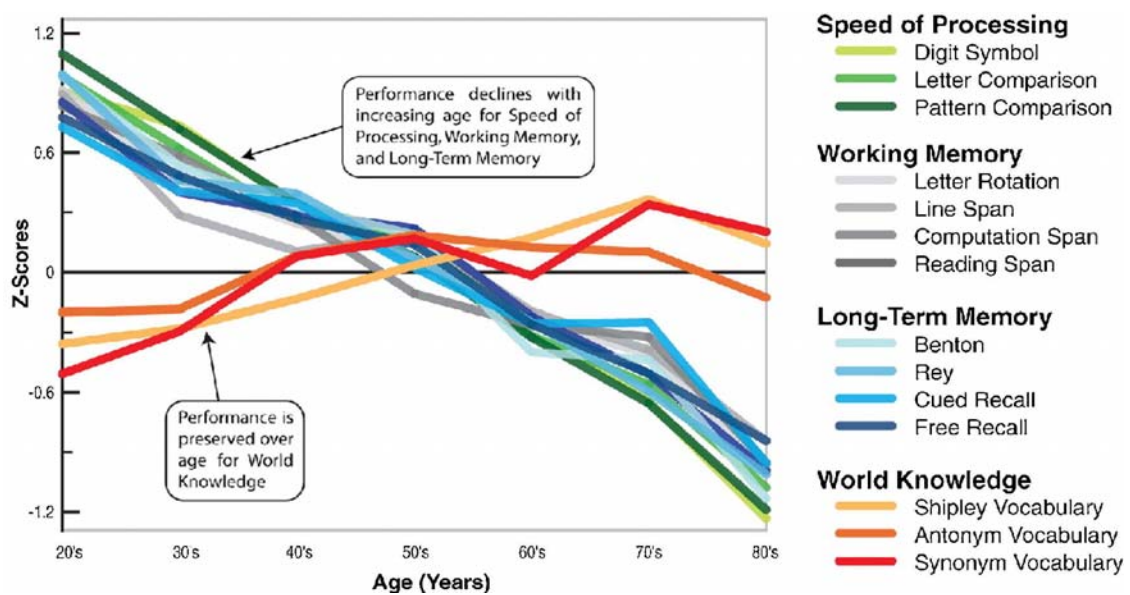
L'envelliment del cervell esdevé paral·lel al dels altres teixits perifèrics dels mamífers. Tot i així, els mecanismes de l'envelliment addicionals observats en aquest òrgan reflecteixen les característiques úniques del cervell i les cèl·lules postmitòtiques diferenciades que el constitueixen, és a dir, les neurones. Aquest fet s'observa, per exemple, amb l'elevat metabolisme del cervell, i per tant també en l'elevat consum d'oxigen, que dona lloc a una major afectació de les estructures degut a l'elevat nivell de ROS produïdes a les cèl·lules. A més a més, com que les neurones no es divideixen, el dany cel·lular infligit per l'estrès oxidatiu tendeix a acumular-se, provocant la disminució de la seva capacitat de reparació (Sibille, 2013).

La comparació entre el cervell d'un individu adult i un senescent amb o sense malalties neurològiques o psiquiàtriques associades a la vellesa, revelen canvis específics a nivell morfològic, bioquímic, metabòlic i funcional. Tot i que tradicionalment s'ha considerat que l'envelliment implica una pèrdua inexorable de les capacitats funcionals i un deteriorament de l'estructura i la bioquímica cerebrals, els estudis més recents han permès observar una bona persistència de les capacitats normals del cervell gràcies als mecanismes compensatoris, adaptatius i a la capacitat d'aprenentatge exercides al llarg de la vida (Timiras i Maletta, 2007).

### 1.6.1. Canvis cognitius, motors i afectius

Les funcions neurològiques de l'envelliment normal s'han estudiat extensament i els diversos estudis transversals i els metaanàlisis realitzats al llarg dels anys ofereixen resultats consistents. S'ha observat, doncs, que de forma general hi ha una disminució

d'entre el 40 i el 60% de la velocitat cognitiva en individus no dements de 80 anys comparat amb adults de 20 anys (Salthouse, 1982, 1996). El procés de l'envelliment afecta de forma diferenciada diverses capacitats (Figura 6) (Christensen, 2001; Ruffman *et al.*, 2008; Salthouse, 1982; Schaie, 1996). Per exemple, l'habilitat verbal, la velocitat de processament de la informació, la resolució de problemes, la funció inhibidòria, la memòria de treball, la memòria a llarg termini i l'habilitat espacial disminueixen amb l'edat (Park i Reutere-Lorenz, 2009; Salthouse, 1982, 1996), mentre que les habilitats relacionades amb el coneixement o l'expertesa, com el vocabulari, el coneixement del món, el coneixement general, la memòria implícita, l'entesa de proverbis i l'expertesa ocupacional es mantenen estables amb l'edat i poden, fins i tot, arribar a millorar (Christensen, 2001; Park i Reuter-Lorenz, 2009; Salthouse, 1982). Per tant, sembla que la pèrdua de volum de la matèria grisa, així com els canvis moleculars, poden ser la causa de la pèrdua d'habilitat cognitiva i els canvis funcionals (Park *et al.*, 2002).



**Figura 6. Efectes diferencials de l'envelliment en diversos processos cognitius.** L'eix y correspon a la distància respecte la mitjana en desviacions estàndard respecte l'habilitat cognitiva explicada al llistat (Sibille i Glorioso, 2011)

Una elevada varietat de funcions motores, com el temps de reacció, la velocitat del moviment, així com la coordinació mà i peu disminueixen de forma considerable amb l'edat (Era *et al.*, 1986; Fozard *et al.*, 1994; Kauranen i Vanharanta, 1996). Aquests efectes són mediatos per la davallada dels nivells de receptor de dopamina (DA) D2 (Volkow *et al.*, 1998), seguint un patró continu i progressiu (Fozard *et al.*, 1994).

També s'observen canvis en la percepció afectiva i de l'humor amb l'augment de l'edat. Les persones ancianes mostren major dificultat per identificar les emocions de tristesa o ràbia respecte els joves, però reconeixen de igual forma que el joves la



felicitat, i el disgust fins i tot millor que ells (Ruffman *et al.*, 2008). Generalment, les persones d'edat avançada mostren un biaix positiu en la memòria i l'atenció, es recuperen millor dels fets negatius i són menys propensos a involucrar-se en situacions interpersonals destructives (Mather i Carstensen, 2005). Tot i que hi ha estudis que afirmen una menor prevalença del diagnòstic de depressions greus a partir dels 40 anys (Hasin *et al.*, 2005), possiblement hi ha trastorns depressius en que es poden confondre amb estats de demència (Alexopoulos, 2005). Aquest biaix positiu és possiblement degut a l'adaptació i l'aprenentatge dels individus, ja que el control emocional disminueix de forma paral·lela a les funcions cognitives en el context d'estats degeneratius a causa de la coincidència entre les àrees necessàries per a les funcions cognitives i el control emocional (Glorioso i Sibille, 2011).

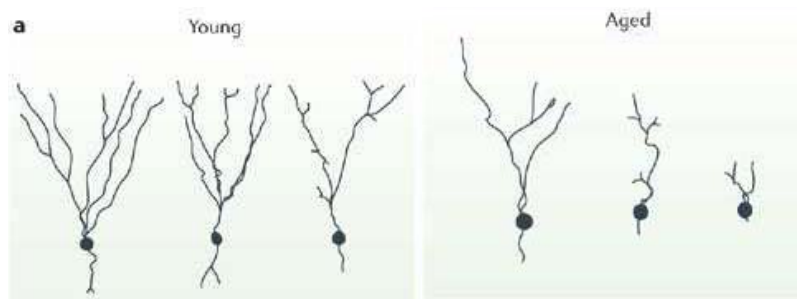
#### 1.6.2. Canvis estructurals i funcionals

A nivell macroscòpic, l'observació dels canvis del cervell amb l'envelliment ha permès determinar una disminució d'entre el 6% i l'11% en el pes del cervell, que no sembla donar lloc a alteracions importants o pèrdues de la capacitat mental. Més concretament, la pèrdua de pes del cervell se centra en la matèria grisa, i es produeix a una taxa d'entre 3,2 i 5,3 ml per any, tal i com mostren els estudis longitudinals i transversals de ressonància magnètica (Good *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2007; Tisserand *et al.*, 2002, 2004). Aquests canvis de la matèria grisa són específics segons l'àrea del cervell observada: així doncs s'ha observat àmpliament que el còrtex prefrontal, l'ínsula dreta i esquerra i el còrtex frontal inferior esquerre presenten pèrdues de volum amb l'augment de l'edat, mentre que l'hipocamp o l'amígdala mostren resultats variables o absència de canvis (Gianaros *et al.*, 2006; Good *et al.*, 2001; Resnick *et al.*, 2003; Seshadri *et al.*, 2004; Tisserand *et al.*, 2002, 2004).

De forma general, els estudis d'imatge funcional han descrit amb l'augment de l'edat una menor coordinació entre les regions que sostenen les funcions cognitives superiors, fet que dóna lloc a una resposta integral disminuïda (Andrews-Hanna *et al.*, 2007). També s'han detectat canvis en l'activitat cerebral en resposta a diferents tasques, com l'augment de la bilateralitat en tasques de memòria o una disminució de la resposta de l'hipocamp. La deslocalització de l'activitat cerebral observada amb l'envelliment enfront de tasques cognitives sembla respondre a un mecanisme compensatori (Cabeza, 2002; Cabeza *et al.*, 2002; Park i Reuter-Lorenz, 2009). Així doncs, els canvis estructurals i funcionals observats amb l'augment de l'edat concorden específicament amb els canvis cognitius associats a la vellesa (Park i Reuter-Lorenz, 2009; Glorioso i Sibille, 2011), per tant, totes aquestes observacions suggereixen que el cervell presenta alteracions significatives també en l'envelliment normal o saludable (Bishop *et al.*, 2010).

### 1.6.3. Canvis cel·lulars i morfològics

El nombre de neurones en un cervell adult és de  $10^{12}$  cèl·lules aproximadament. Tot i així, la pèrdua de neurones associada a l'edat és força reduïda (Gómez-Isla, 1997; Haug *et al.*, 1984), l'afectació és molt variable en funció de les àrees del cervell estudiades, i la variabilitat interindividual és elevada (Long *et al.*, 1999). Una estimació aproximada de la pèrdua neuronal afirma que es troba al voltant del 10% i es restringeix principalment a unes àrees concretes (Morrison i Hof, 1997). La disminució de volum de la matèria grisa sembla ser el resultat de la pèrdua de sinapsis i la retracció de l'arbre dendrític (de Brabander *et al.*, 1998; Scheibeil *et al.*, 1975), com s'observa, per exemple, en les cèl·lules piramidals del còrtex d'un individu ancià respecte un de jove (Figura 7) (Scheibel *et al.*, 1975).



**Figura 7. Representació esquemàtica de la pèrdua progressiva de la superfície dendrítica en neurones.** Aquesta representació correspon a cèl·lules humanes granulars del gir dentat i hipocampals del CA1 (Burke i Barnes, 2006).

A més a més, alguns estudis indiquen que durant l'envelliment hi ha un increment de les tincions dels marcadors glials que seria causat per un engruïment dels processos de les cèl·lules de la glia, és a dir, una distròfia glial, possiblement amb la finalitat de preservar l'intercanvi neurona-glia i, que es veuria amenaçat per l'augment de les distàncies a causa de la retracció dels processos neuronals (Conde i Streit, 2006; Finch, 2003; Unger, 1998).

D'altres signes patològics neuronals associats a l'envelliment normal són l'acumulació extracel·lular de proteïnes, per exemple, la lipofuscina (Pannese, 2011; Schulz, 1883); i també s'observen agregacions d'A $\beta$ , ubiquitina, proteïna tau hiperfosforilada i altres proteïnes o components anòmals. En el capítol 2 s'esmenten les característiques dels agregats presents l'envelliment i les malalties associades.

Les alteracions vasculars o ateroscleròtiques pròpies de l'envelliment poden induir hemorràgies o infarts a causa de la ruptura dels vasos o la seva obstrucció. Aquesta afectació sol ser restringida a certes àrees i en global la proporció de neurones afectades és petita, tret diferenciador respecte les malalties neurodegeneratives, on s'observen aquestes característiques patològiques de forma extremadament extensa (Lantos i Papp, 1994).

#### 1.6.4. Canvis metabòlics i circulatoris

Com que el cervell humà consumeix un 20% de l'energia total malgrat que representa un 2% del pes corporal total (Attwell i Laughlin, 2001), sembla clar que les alteracions de l'estat metabòlic associades a l'envelliment tenen un efecte important en aquest òrgan. Estudis transversals *in vivo* de  $^{18}\text{F}$ FDG-PET en persones amb un envelliment normal han mostrat una sòlida reducció del metabolisme de glucosa amb la disminució de l'edat, amb un efecte diferencial segons la regió cerebral explorada, i on el còrtex frontal presenta uns canvis més pronunciats (Garraux *et al.*, 1999; Herholz *et al.*, 2002; Hsieh *et al.*, 2012; Kalpouzos *et al.*, 2009; Moeller *et al.*, 1996; Petit-Taboué *et al.*, 1998; Zuendorf *et al.*, 2003).

La disponibilitat de glucosa i oxigen per al funcionament correcte del metabolisme cerebral depèn en gran mesura de la seva arribada eficient a través de la circulació sanguínia, ja que només el 15% del volum/minut del cor arriba a aquest òrgan en comparació a la taxa metabòlica del 20% (Kandel *et al.*, 2007). En el procés de l'envelliment tenen lloc diversos canvis funcionals i estructurals del sistema vascular que afecten la perfusió dels òrgans, especialment els més irrigats, com el cervell i el ronyó. L'afectació del sistema vascular inclou les artèries perifèriques i la microvasculatura, a més a més de la barrera hematoencefàlica (BBB, *blood-brain barrier*) (Oakley i Tharakan, 2014). A nivell cerebral, alguns canvis observats en l'envelliment són l'augment de la permeabilitat de la BBB en ratolins (Pelegrí *et al.*, 2007) i humans (Blau *et al.*, 2012), o la disminució de la funció vasodilatadora mitjançada per l'endoteli (Csiszar *et al.*, 2003). Patologies vasculars habitualment associades a l'envelliment, com l'isquèmia cerebrovascular o la hipertensió, poden agreujar les alteracions de la integritat de la BBB (Oakley i Tharakan, 2014).

#### 1.6.5. Alteracions bioquímiques i vies moleculars de l'envelliment cerebral

Entre els mecanismes generals propis de l'envelliment que afecten tant el cervell com d'altres òrgans perifèrics cal destacar les vies metabòliques afectades en la CR, així com el dany del DNA, la inflamació i el dany causat per les ROS (apartat 1.3). D'altres mecanismes generals presents en els teixits perifèrics però que tenen poca incidència en el cervell són l'escurçament dels telòmers i la depleció de cèl·lules precursoras, ja que la renovació cel·lular és molt limitada (Glorioso i Sibille, 2011). A nivell neuronal, les principals vies específiques de l'envelliment són l'augment del dany cel·lular, l'acumulació de ROS, la desregulació de l'homeòstasi del calci, la disfunció mitocondrial i els processos inflamatoris (Yankner *et al.*, 2008).

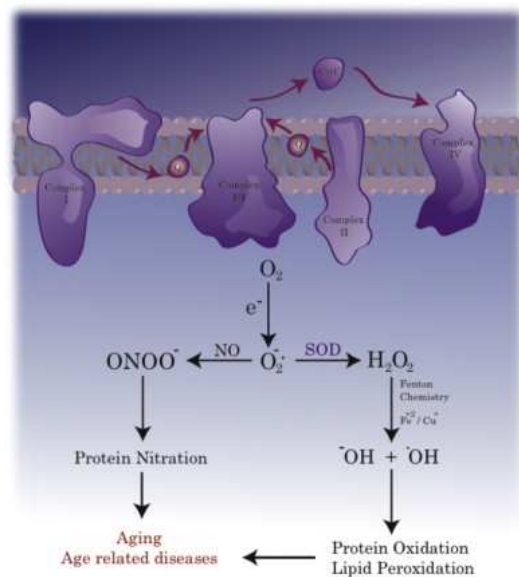
Com en d'altres sistemes d'òrgans, les cèl·lules del cervell contenen una càrrega acumulada d'estrès oxidatiu i metabòlic resultant de la **generació de ROS**, considerada una característica universal del procés d'envelliment (Mattson *et al.*, 2004). Les classes principals de molècules cel·lulars, incloent proteïnes, àcids nucleics i lípids, es

modifiquen oxidativament durant l'envelliment del cervell. Les modificacions de les proteïnes inclouen la formació de carbonils (Butterfield *et al.*, 1997; Cakatay *et al.*, 2001; Dubey *et al.*, 1996); la modificació covalent dels residus de cisteïna, lisina, i histidina mitjançada pel producte de la peroxidació de lípids 4-hidroxinonenal (Papaionnou *et al.*, 2001; Pedersen *et al.*, 1998, 2000), la nitració de residus de tirosina (Sloane *et al.*, 1999) i la glicació (Munch *et al.*, 1997). Entre els lípids, els àcids grassos poliinsaturats (PUFA, *poly-unsaturated fatty acids*) són dianes particulars de les ROS, i la seva oxidació dóna lloc a la generació de productes neurotòxics resultants de la peroxidació dels lípids tals com 4-hidroxil-2-nonenal i malondialdehid (MDA). Alguns PUFA, com ara l'àcid araquidònic i l'àcid docosahexanoic, són components importants de membranes neuronals i participen en moltes funcions, com ara la senyalització cel·lular, l'estructura de la membrana, l'expressió gènica i la producció d'energia (Perluigi *et al.*, 2010, 2012). Les neurones també s'han d'enfrontar a dèficits d'energia resultants d'alteracions en la vasculatura cerebral i de la funció mitocondrial (Hoyer, 1995). L'augment de l'estrès oxidatiu i l'acumulació de molècules malmeses promouen la disfunció de diverses vies metabòliques i de senyalització (Lebel i Bondy, 1992).

El cervell és especialment vulnerable als efectes de la generació dels nivells habituals o anormals de ROS degut a que presenta les següents característiques: (1) consumeix altes quantitats d'oxigen; (2) té relativament poca quantitat de sistemes generals de defensa antioxidants en comparació a d'altres teixits; (3) conté molts metalls de transició que poden ajudar en el cicle redox; i (4) conté alts nivells de PUFA (Perluigi *et al.*, 2014).

D'altra banda, donat que les neurones del cervell són majoritàriament post-mitòtiques, el dany produït per les ROS és generalment irreversible, i per tant, les neurones malmeses no es poden reemplaçar.

La degeneració progressiva i la **disfunció mitocondrial** contribueixen al procés d'envelliment i, en particular, a l'envelliment de teixits postmitòtics com ara el cervell i el múscul. En el cervell humà, la disminució de la funció mitocondrial pot afectar de forma selectiva poblacions neuronals amb grans demandes energètiques, com ara les neurones piramidals o les neurones de projecció de l'escorça cerebral. Per tant, la disminució de la funció mitocondrial pot contribuir a l'envelliment del cervell i a



**Figura 8. Metabolisme oxidatiu en els mitocondris.** Els mitocondris defectuosos poden donar lloc a una sobreproducció d'espècies reactives d'oxigen (ROS) que poden produir maldament lipídica, del DNA i les proteïnes (Perluigi *et al.*, 2014).

augmentar la vulnerabilitat de les neurones a les patologies depenents de l'edat (Bishop *et al.*, 2010; Yankner *et al.*, 2008).

Els dos llocs principalment afectats pel dany mitocondrial durant l'envelliment són els enzims de la cadena respiratòria i el DNA mitocondrial (Wallace, 2005). La ineficiència del transport d'electrons i el malmetement de les defenses antioxidants afavoreixen la producció de ROS, com l' $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 8). La interacció d' $\text{H}_2\text{O}_2$  amb metalls de transició dona lloc, mitjançant la reacció de Fenton, a  $\text{OH}^\cdot$  altament reactius i perjudicials. Els nivells elevats de ferro redox actiu que s'acumulen en l'envelliment cerebral normal i en diverses malalties neurodegeneratives (Zecca *et al.*, 2004) poden provenir parcialment de mitocondris degenerats, ja que aquest metall es troba en altes concentracions en aquests orgànuls. La disfunció de les vies autofàgiques, a través de les quals s'ha suggerit que s'eliminen i degraden els mitocondris disfuncionals (Brunk i Terman, 2002) pot produir una acumulació de mitocondris degenerats, que afavoriria l'augment de la generació de ROS i l'alliberament ferro de redox actiu (Yankner *et al.*, 2010). L'afectació del DNA mitocondrial pot ser produïda pel propi dany produït per les ROS, o per mutacions ja presents en el DNA (apartat 1.3).

La influència de les **vies metabòliques** en el procés de l'envelliment a nivell sistèmic, com mostra la relació entre la CR i la longevitat de les espècies, s'ha comprovat a nivell cerebral. Per exemple, la CR aplicada en primats va permetre observar un retard en l'atròfia del cervell (Colman *et al.*, 2009), i la CR a curt termini s'ha associat a una millora de la memòria en persones ancianes (Witte *et al.*, 2009). Alguns dels mediadors de les vies metabòliques relacionades amb la CR sembla que poden ser factors claus per a l'envelliment cerebral. És el cas de les sirtuïnes, que tenen efectes pleiotròpics anti-envelliment en neurones i glia, com l'aturada de la formació d'agregats proteics, l'acumulació de proteïnes malplegades, l'augment de la resposta a l'estrès, la millora de la reparació del DNA i la prevenció de la resposta inflamatòria mitjançada per la glia, la mort cel·lular i la disfunció mitocondrial (Gan i Mucke, 2008). A més a més, *SIRT1* ha mostrat efectes preventius respecte la degeneració axonal de tipus walleriana després d'una lesió (Araki *et al.*, 2004) i sembla ser un factor essencial per a la neurogènesi (Libert *et al.*, 2008).

D'altra banda, la insulina i l'IGF-1 tenen activitat neurotròfica i promouen la supervivència neuronal a través de la inhibició de l'apoptosi (van der Heide *et al.*, 2006). En els mamífers, els nivells d'IGF-1 disminueixen amb l'edat, i en el cas dels éssers humans aquest disminució comença relativament aviat, a la tercera dècada de la vida (Piriz *et al.*, 2011). L'administració d'IGF-1 ha demostrat àmpliament accions neuroprotectores en l'envelliment del cervell, com la millora l'aprenentatge i la memòria (Markowska *et al.*, 1998), la plasticitat sinàptica (Sonntag *et al.*, 2000) o el creixement vascular (Sonntag *et al.*, 1997); i disminueix l'estrès oxidatiu en el teixit cerebral (Puche *et al.*, 2008).

La via de senyalització de TOR intervé també en els efectes de la CR i de la detecció de nutrients (apartat 1.3.5) sobre l'envelliment a través de la modulació de la síntesi de proteïnes i l'autofàgia (Chen *et al.*, 2007; Hansen *et al.*, 2007; Kapahi *et al.*, 2004; Medvedík *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2007; Steffen *et al.*, 2008). Hi ha evidències indicatives que la senyalització de TOR i l'autofàgia poden modular l'agregació de proteïnes patològiques associades a malalties neurodegeneratives (Bishop *et al.*, 2010). Per exemple, l'administració de rapamicina ha mostrat una reducció de la formació d'agregats tòxics i de la progressió de la malaltia en models de la malaltia de Huntington (HD, *Huntington's disease*) i de tauopatia en ratolí i mosca mitjançant l'augment de l'autofàgia (Ravikumar *et al.*, 2004).

Una altra característica pròpia de l'envelliment del cervell és l'**acumulació del dany al DNA nuclear i mitocondrial**, com a resultat dels agents inductors d'estrès. Hi ha una àmplia evidència de la implicació del dany al DNA en els mecanismes moleculars de l'envelliment, com suggereix la neurodegeneració i l'acceleració de l'envelliment del cervell observats en els síndromes progeroides (Yankner *et al.*, 2008), descrits a l'apartat 1.5.1. Les modificacions d'una sola base, com ara la 8-oxoguanina, són el principal dany observat al DNA en el cervell i augmenten en models de rosegadors i en éssers humans amb l'envelliment (Hamilton *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2004; Mecocci *et al.*, 1993). La reducció de la transcripció de gens implicats en la funció sinàptica, el transport de proteïnes, i la funció mitocondrial es produeix possiblement com a resultat de l'acumulació del dany oxidatiu a promotors de gens regulats a la baixa a partir de mitjana edat (Lu *et al.*, 2004). A més a més, alguns estudis suggereixen que el malmetement del DNA es presenta en regions selectives del genoma que presenten més vulnerabilitat al dany oxidatiu (Ohno *et al.*, 2006). Com a resposta al dany oxidatiu produït en el DNA, es pot produir un silenciament de les regions malmeses del genoma a través de la repressió transcripcional, fet que permetria sobreviure en presència del DNA no reparat. Aquest mecanisme tindria avantatge sobre l'apoptosi cel·lular induïda a través de la via de p53, ja que les neurones, pel fet de ser postmitòtiques, són cèl·lules insubstituïbles i que no tindrien una predisposició a patir transformacions neoplàsiques (Yankner *et al.*, 2008).

A més a més de l'efecte dels mecanismes generals de l'envelliment en el cervell, hi ha diversos mecanismes moleculars específics del cervell, o amb una major predominància en aquest òrgan, que també intervenen en el procés de l'envelliment (Glorioso i Sibille, 2011).

D'una banda, s'ha vinculat la neurotrofina *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) al procés d'envelliment gràcies a la relació entre un polimorfisme del gen de BDNF humà, Val66Met (Egan *et al.*, 2003), que dóna lloc a una secreció deficient del factor, i a un envelliment del cervell en ratolins i éssers humans. S'han descrit evidències causals sobre aquest polimorfisme en soques de ratolins *knock-in* per a l'al·lel humà Val66Met,

que mostra dèficits de memòria, un volum hipocampal disminuït i un decreixement en la complexitat dendrítica (Chen *et al.*, 2006). A més a més, és un modulador lògic de l'envelliment molecular, ja que el BDNF es secreta en funció de l'activitat cerebral, que disminueix progressivament amb l'envelliment (Erraji-Benchekroun *et al.*, 2005). També és neuroprotector enfront d'una varietat d'insults, i és necessari per als canvis en la densitat dendrítica subjacents als sistemes de l'aprenentatge i de memòria (Tapia-Arancibia *et al.*, 2008). De fet, la infusió de BDNF pot restaurar el deteriorament de la potenciació a llarg termini (LTP, *long-term potentiation*) en rates d'edat mitjana (Rex *et al.*, 2006), és necessari per a la neurogènesi en ratolins i la seva expressió és induïda per l'exercici i la CR, moduladors de l'envelliment del cervell (revisat a Tapia-Arancibia *et al.*, 2008).

D'altres vies específiques del cervell que modulen els efectes de l'envelliment són les relacionades amb els **neurotransmissors**, especialment la serotonina (5-HT, 5-hidroxitriptamina), la DA i el glutamat. La 5-HT sembla que intervé en el procés de l'envelliment, ja que els seus nivells, i els de receptors seleccionats, estan regulats en funció de l'edat. D'altra banda, la 5-HT comparteix vies de senyalització amb d'altres molècules regulades també per l'edat, com el BDNF i l'IGF-1 (Mattson *et al.*, 2004), i els fàrmacs inhibidors selectius de la recaptació de 5-HT poden modular la neurogènesi (Dranovsky i Hen, 2006). A més a més, les mutacions en el procés de síntesi de la 5-HT o els seus receptors, i el seu bloqueig a través de l'administració de fàrmacs, retarden el fenotip relacionats amb l'edat i/o estenen la longevitat en *C. elegans* (Murakami *et al.*, 2008; Petrascheck *et al.*, 2007, 2009; Sze *et al.*, 2000). En els ratolins, la supressió del receptor de la 5-HT 1B dona lloc a canvis cognitius (Wolff *et al.*, 2003) i a fenotips moleculars i locomotors anticipats de l'envelliment cerebral (Sibille *et al.*, 2007), fet que proporciona evidència causal de la vinculació entre l'alteració genètica de la senyalització serotoninèrgica i l'envelliment (Sibille i Glorioso, 2011).

El glutamat, neurotransmissor excitatori predominant del cervell, és també un candidat probable per a la modulació d'envelliment del cervell, ja que facilita l'alliberament de BDNF i és essencial per a la LTP, la plasticitat sinàptica, la neurogènesi, la supervivència neuronal dependent de l'activitat i el desenvolupament nerviós (Mattson, 2008). A través de l'elevació de calci, els efectes sobre la CREB (*cyclic AMP-responsive element-binding protein*) intracel·lular i la senyalització de NF-KB, el glutamat modula a llarg termini els canvis ràpids en l'arquitectura dendrítica i els canvis transcripcionals en diversos gens, incloent les neurotrofines, fet que molt probablement contribueix als canvis morfològics relacionats amb l'edat (Mattson, 2008).

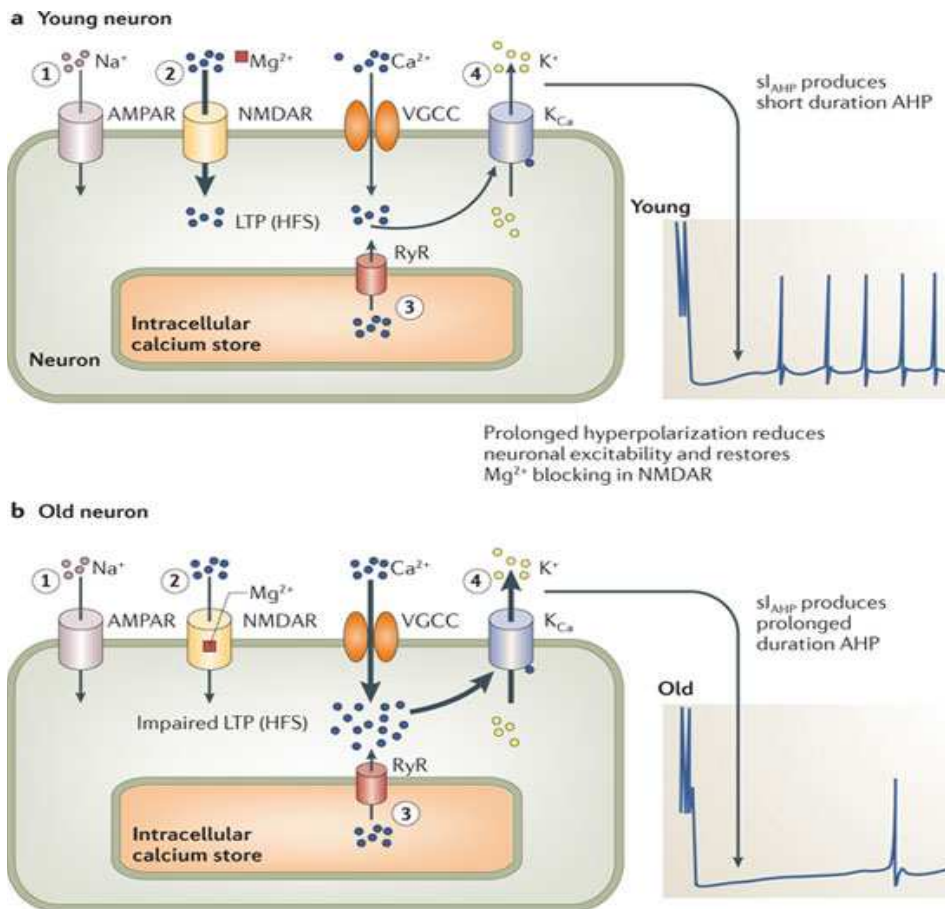
Hi ha certes evidències que descriuen que la DA pot ser un causant de modulació de l'envelliment en el cervell (Backman *et al.*, 2006). Aquest neurotransmissor està també implicat en diverses malalties relacionades amb l'edat, com el PD, l'HD, l'esquizofrènia

i el desordre bipolar. Alguns components del sistema dopaminèrgic disminueixen amb l'edat, incloent el transportador de DA, i els receptors D1 i D2 (Backman *et al.*, 2006). Els ratolins alimentats amb el precursor de la DA L-dopa extenen la seva esperança de vida fins al 50%, i presenten una millora de la fertilitat. Aquest efecte està mitjançat potencialment per la via de la CR, ja que els ratolins van mostrar una reducció del creixement tot i ingerir la mateixa quantitat d'aliments que els controls (Cotzias *et al.*, 1974, 1977). L'entrecreuament amb les vies de la CR s'ha corroborat a través d'estudis en ratolins KO per als receptors D2, que presenten una disminució dels nivells de GH i d'IGF-1 (Díaz-Torga *et al.*, 2002). Diversos estudis realitzats en humans relacionen la reducció dels nivells del receptor D2 amb la memòria (Backman *et al.*, 2000, 2006; Volkow *et al.*, 1998), suggerint doncs que els nivells de D2 poden ser parcialment responsables dels efectes de l'envelliment molecular sobre la funció cognitiva. La DA també interactua amb les vies de senyalització relacionades amb les ROS. Per exemple, la MAO-B, que inactiva la DA, augmenta exageradament amb l'edat (Erraji-Benchekroun *et al.*, 2005; Glorioso *et al.*, 2010) i contribueix a l'increment de les ROS observat amb l'edat (revisat a Luo i Roth, 2000). Finalment, la DA també regula les vies relacionades amb la distròfia glial a través dels nivells de NF- $\kappa$ B i GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) (Luo i Roth, 2000).

Un altre fenomen específic del cervell observat en l'envelliment és la **desregulació de l'homeòstasi del calci**. La desregulació de l'entrada de calci a les neurones pot alterar l'activitat sinàptica, i en condicions extremes, produir excitotoxicitat (Yeoman *et al.*, 2012). En condicions habituals, una lleugera elevació dels nivells de calci intracel·lulars es compensa amb un ràpid efecte tamponador a través de proteïnes del calci citosòliques, com la parvalbúmina, la calbindina, la calretinina, la calmodulina, o la hipocalcina, i la seva extrusió al reticle endoplasmàtic, als mitocondris o a l'espai extracel·lular a través d'intercanviadors de calci o sodi per ser segrestats (Murchison i Griffith, 2007; Ouda *et al.*, 2008). Una disminució de la capacitat de tamponació del calci dona lloc a un allargament de la seva resposta, fet que s'observa a les neurones envellides (Brewer *et al.*, 2006). L'envelliment afecta de forma important la capacitat de tamponació del calci tant en el reticle endoplasmàtic com en els mitocondris (Shankar, 2010). Un efecte concret de la desregulació de l'homeòstasi del calci que s'ha associat a l'envelliment és la reducció de l'excitabilitat de les neurones CA1 de l'hipocamp (Figura 9), a causa de l'augment de l'amplitud i la durada de l'efecte posthiperpolarització lenta (sAHP, *slow after hiperpolarization*) (Landfield i Pitler, 1984). En aquestes neurones s'observa una disminució de l'entrada de calci a través dels receptors de NMDA, un augment de l'entrada de calci a través de receptors de calci tipus L (Foster, 2007), i un augment de l'alliberament de calci dels magatzems sensibles a rianodina que activen el corrent sAHP (Kumar i Foster, 2005), fet que causa una hiperpolarització de la neurona postsinàptica. Els canvis en l'entrada de calci a través dels receptors són causats per una alteració de l'estat redox d'aquestes proteïnes (Bodhinathan *et al.*, 2010; Foster, 2007; Kumar i Foster, 2007; Steullet *et al.*,



2006). En última instància, aquestes alteracions provoquen un canvi en el llindar de la transició entre LTP-LTD (*long-term depression*) en els models de mamífers (Kumar i Foster, 2007). Aquest canvi en el llindar pot afectar la probabilitat de potenciació o depressió sinàptica en un moment donat, (Bear *et al.*, 1987; Bear i Malenka, 1994; Foster i Norris, 1997) i la dishomeòstasi del calci pot, per tant, alterar la inducció de LTP o LTD. Els canvis de la regulació del calci relacionats amb l'edat poden interferir en part en els dèficits de plasticitat observats en l'envelliment (Burke i Barnes, 2006).



**Figura 9. Desregulació de l'homeòstasi del calci observada en l'envelliment.** Com a conseqüència de l'envelliment, la despolarització afavoreix l'entrada de calci a través dels canals voltatge depenent de calci (3) respecte als receptors de NMDA (2). Això comporta un augment de l'alliberament de calci induït per calci i, com a conseqüència, un increment de l'activitat dels canals de l'efecte posthiperpolarització lenta. Aquest fet provoca un decreixement de l'excitabilitat de les neurones hipocàmpals, restaura el bloqueig dels receptors de NMDA a través de magnesi i redueix l'entrada de calci a través de receptors de NMDA, provocant, per tant, un canvi en el llindar d'estimulació de l'LTP a freqüències més altes (Yeoman *et al.*, 2012).

## **2. LESIONS CEREBRALS EN L'ENVELLIMENT I EN MALALTIES NEURODEGENERATIVES**

Les lesions cerebrals que apareixen en l'envelliment i en malalties neurodegeneratives es caracteritzen generalment per l'acumulació d'agregats intracel·lulars o extracel·lulars formats majoritàriament per components de naturalesa proteica. La presència d'aquests agregats i la seva identificació és una part distintiva de cada procés o neuropatologia. De fet, el diagnòstic d'aquests trastorns s'ha desenvolupat des dels seus inicis en base a la combinació del perfil clínic del pacient i la presència o absència de lesions cerebrals distintives (Duckett i Stern, 1999; Forstl, 1999; Graeber *et al.*, 1997).

Les lesions se solen presentar en tres formes diferents segons la localització i morfologia. Així doncs, es poden distingir lesions extracel·lulars, com és el cas de les plaques neurítiques constituïdes per A $\beta$  en l'AD o el DS (Glennner *et al.*, 1984); inclusions cel·lulars filamentoses desenvolupades a l'interior de les cèl·lules neuronals o gials, per exemple els cossos de Lewy (LB, *Lewy bodies*) formats per l'agregació d' $\alpha$ -sinucleïna en la PD (McKeith *et al.*, 1996); i canvis cel·lulars morfològics, com els descrits en les neurones hipertròfiques i acromàtiques de la malaltia o demència de Pick (PiD, *Pick's disease*) (Armstrong *et al.*, 2005). En aquest capítol es comentaran les lesions més freqüents relacionades amb l'acumulació d'una o més molècules, generalment proteïnes.

La majoria de les lesions distintives de les malalties neurodegeneratives estan formades principalment per acumulacions d'una proteïna plegada de forma anòmala en una conformació alternativa estable, tal i com s'il·lustra a la Taula 2. Aquesta alteració conformacional dona lloc a l'agregació i acumulació de la proteïna en una forma fibril·lar ben organitzada anomenada estructura amiloide (Chiti i Dobson, 2006; Soto, 2003).

La presència de diverses característiques compartides entre les malalties neurodegeneratives ha permès plantejar la possibilitat que presentin un mecanisme molecular comú (Carrel i Lomas, 1997; Soto, 2003). A més a més, els defectes en el plegament de les proteïnes, l'agregació i la seva acumulació, que comporten dany cel·lular i disfunció tissular, poden ser el resultat d'alteracions en la proteòstasi (Cuanalo-Contreras *et al.*, 2013), explicades de forma més extensa a l'apartat 1.3. El declivi de la proteòstasi observat en l'envelliment, un dels factors de risc més importants de les malalties neurodegeneratives, podria ser una explicació plausible a la contribució d'aquest procés a les malalties neurodegeneratives conformacionals (Balch *et al.*, 2008).

**Table I.** Major neurodegenerative diseases, their molecular determinants, and 'signature' lesions

Disease	Abbreviation	'Signature' lesions	Major molecular determinant
Familial amyotrophic lateral sclerosis	FALS	NCI	FUS
Argyrophilic grain disease	AGD	NCI	4R tau
Alzheimer's disease	AD	SP NFT	$\beta$ -amyloid (A $\beta$ ) 3R/4R tau
Basophilic inclusion body disease	BIBD	GCI	FUS
Corticobasal degeneration	CBD	NCI, GCI	4R tau
Creutzfeldt-Jakob disease	CJD	PrP deposits	PrP <sup>sc</sup>
Dementia with Lewy bodies	DLB	NCI	$\alpha$ -synuclein
Down's syndrome	DS	SP NFT	A $\beta$
FTD with parkinsonism linked to chromosome 17	FTDP-17	NCI	3R/4R tau
Frontotemporal lobar degeneration with motor neuron disease	FTLD-MND	NCI	4R tau
Frontotemporal lobar degeneration with TDP proteinopathy	FTLD-TDP	NCI NII	TDP-43 TDP-43
Frontotemporal lobar degeneration with Ub inclusions (atypical)	aFTLD-U	NCI	FUS
Motor neuron disease with dementia	MND-D	GCI	tau
Multiple system atrophy	MSA	GCI	$\alpha$ -synuclein
Neuronal intermediate filament inclusion disease	NIFID	NCI	$\alpha$ -internexin, FUS
Parkinson's disease	PD	NFT	$\alpha$ -synuclein
Parkinsonian-dementia complex of Guam	Guam PDC	NCI	3R/4R tau
Pick's disease	PiD	PB	3R tau
Progressive supranuclear palsy	PSP	NCI, GCI	4R tau

FUS – 'fused in sarcoma', PB – pick bodies, SP – senile plaques, NFT – neurofibrillary tangles, NCI – neuronal cytoplasmic inclusions, NII – neuronal intranuclear inclusions, GCI – glial cytoplasmic inclusions, PrP – prion protein

**Taula 2.** Malalties neurodegeneratives principals, lesions distintives d'aquestes malalties i les seves molècules determinants o principals (adaptat d'Armstrong, 2012).

### **2.1. Constituents principals i secundaris de les lesions cerebrals**

Originàriament, la classificació de la majoria de malalties neurodegeneratives es va realitzar en dos grans grups, partint de la composició principal de les lesions distintives: les **taupaties**, on el constituent principal és la proteïna tau, i que inclouen l'AD, la PiD, la malaltia de grànuls argirofílics (AGD, *argyrophilic grain disease*), la degeneració corticobasal (CBD, *corticobasal degeneration*), la paràlisi supranuclear progressiva (PSP, *progressive supranuclear palsy*), i la demència frontotemporal (FTD, *frontotemporal dementia*); i les **sinucleïnopaties**, és a dir, trastorns que presenten agregació de l' $\alpha$ -sinucleïna, com és el cas de la PD, la demència de LB (DLB, *dementia*

*with Lewy bodies*), l'esclerosi lateral amiotròfica (ALS, *amyotrophic lateral sclerosis*) i l'atròfia múltiple sistèmica (MSA, *multiple system atrophy*). Més endavant, l'aparició de nous casos en els quals ambdues proteïnes eren absents va promoure la revisió de la classificació d'aquestes malalties. Finalment, es van ampliar els coneixements sobre la composició i l'origen de les lesions a nivell molecular i genètic, i això va obrir la possibilitat a noves classificacions en funció, per exemple, del component principal de cada lesió, o de les mutacions que donen lloc a les lesions en els casos de malalties familiars (Armstrong, 2012).

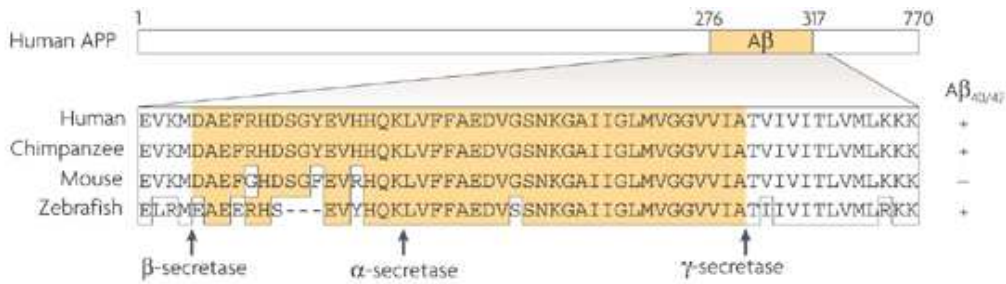
D'entre els components principals identificats en les lesions signatures, cal destacar els pèptids d'A $\beta$ , la proteïna priònica resistent a proteasa (PrP<sup>Sc</sup>), la proteïna tau amb tres o quatre repeticions (3R, 4R), l' $\alpha$ -sinucleïna, la proteïna TDP43 i la proteïna FUS (Armstrong, 2012). La principal dificultat que va presentar aquest procés d'identificació va ser la diferenciació entre els productes primaris de la lesió i els productes secundaris derivats del dany cel·lular o incorporats posteriorment (Armstrong *et al.*, 2008). El fet que la composició de les lesions es pot veure alterada amb el temps, i la manca d'estudis sobre l'evolució de la densitat de les lesions en el cervell dels pacients de les diferents neuropatologies compliquen la identificació dels compostos presents a les lesions (Armstrong, 2012).

Moltes de les lesions característiques de trastorns neurodegeneratius també s'identifiquen en certa mesura en cervells de persones d'edats avançades. Per exemple, a través de les vies de processament normals del cervell es generen els pèptids A $\beta$  (Mullan i Crawford, 1993), i aquests pèptids poden formar dipòsits també en els cervells de persones no dements d'edat avançada (Armstrong, 1995; Delaere *et al.*, 1993; Mann i Jones, 1990; Price *et al.*, 1991). De fet, els dipòsits d'A $\beta$  relacionats amb l'edat poden tenir lloc en d'altres demències diferents de l'AD, com per exemple, en el PD, la DLB, i la malaltia de Creutzfeldt-Jakob (CJD, *Creutzfeldt-Jakob disease*) (Hainfellner *et al.*, 1998; Mann i Jones, 1990; Ohgami *et al.*, 1991). De la mateixa manera, en l'envelliment es poden formar altres tipus de lesions en quantitats petites, incloent els cabdells neurofibril·lars (NFT, *neurofibrillary tangles*), els LB i els cossos de Pick (PB, *Pick's bodies*). A continuació s'esmenten les proteïnes que esdevenen components principals de les diferents lesions neurodegeneratives.

### 2.1.1. Pèptids de $\beta$ -amiloide

Els principals components de les plaques senils en l'AD (apartat 2.3.1), de les lesions presents en l'angiopatia amiloide cerebrovascular (CAA, *cerebrovascular amyloid angiopathy*), i d'altres lesions en algunes patologies són els pèptids A $\beta$  d'entre 39 i 43 aminoàcids, tal com mostra la Figura 10 (Glennner i Wong, 1984; Masters *et al.*, 1985). Els pèptids d'A $\beta$  es formen a partir de la proteïna precursora de  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ PP, *amyloid- $\beta$  precursor protein*), que és una proteïna transmembrana expressada àmpliament en neurones i en una àmplia ventall de cèl·lules no neuronals, també fora

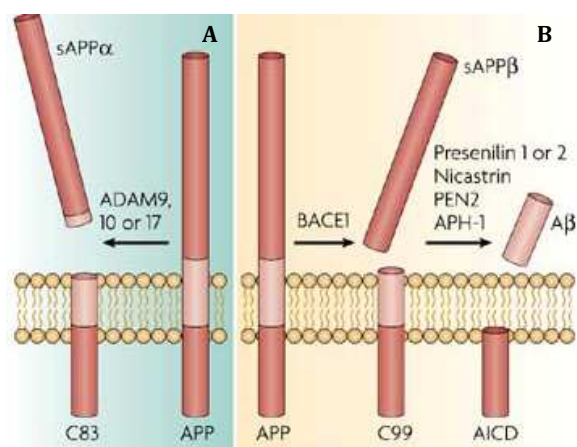
del sistema nerviós central (Ling *et al.*, 2003; Octave, 1995). Hi ha tres isoformes comunes de l'AβPP, que contenen 695, 751 i 770 aminoàcids, derivats d'alternatives d'*splicing* i que entronquen en un sol gen en el cromosoma 21 (Kang *et al.*, 1987). El gen de l'AβPP humà conté 19 exons, i el fragment Aβ deriva de la part corresponent als exons 16 i 17. La forma predominant en les neurones és l'AβPP<sub>695</sub> (Yoshikai *et al.*, 1990). Actualment s'ha postulat que l'AβPP pot actuar com a receptor de superfície cel·lular i que pot intervenir en l'adhesió cel·lular, encara que les seves funcions encara es troben en fase d'estudi (Lowe *et al.*, 2012).



**Figura 10.** Seqüències del pèptid β-amiloide en diferents espècies i zones de trencament de la proteïna precursora de la β-amiloide (Gotz i Ittner, 2008).

La via no amiloidogènica, metabòlica o secretora de l'AβPP, és la via de trencament predominant d'aquesta proteïna i és el resultat de l'acció seqüencial de les activitats de les proteases α-secretasa i γ-secretasa (Figura 11). La primera escissió produeix un fragment de l'ectodomini denominat sAPPα i un fragment del carboxil terminal (CTF, *carboxyl terminal fragment*) anomenat CTFα. El CTFα s'escindeix després en dos fragments, que inclou un residu hidròfob del domini de l'Aβ anomenat P3. El lloc d'escissió on actua l'α-secretasa és enmig de la seqüència d'Aβ, i per tant impedeix la producció d'Aβ. No obstant això, hi ha certa evidència que indica que el P3 es produeix i diposita en el teixit, en particular a plaques difuses (Gowing *et al.*, 1994). L'activitat α-secretasa probablement resideix en diverses proteases, incloent les que pertanyen a la família ADAM (*α desintegrin and metalloprotease*), com l'ADAM-10, o l'ADAM-17 i l'ADAM-9 (Allison *et al.*, 2003; Kojro i Fahrenholz, 2005). S'ha suggerit que el producte de l'ectodomini del trencament de l'AβPP per part de l'α-secretasa, sAPPα, pot ser neuroprotector (Turner *et al.*, 2003).

D'altra banda, l'activitat enzimàtica que es descriu com a γ-secretasa és el resultat d'un complex de proteïnes que inclou la presenilina, la nicastrina, l'*anterior pharinx-defective* fenotip 1



**Figura 11.** Vies proteolítiques de la proteïna precursora de la β-amiloide. Via no amiloidogènica (A) i amiloidogènica (B) (LaFerla *et al.*, 2007).

(APH-1) i el promotor de la presenilina 2 (Steiner, 2004). L'APH-1 i la nicastrina inicialment formen un complex que s'uneix posteriorment a la presenilina i a la proteïna potenciador de la presenilina-2. Aquesta unió confereix l'activitat de la proteasa, que genera un fragment que es transloca al nucli i actua com a factor de transducció. És possible, doncs, que una de les activitats fisiològiques de l'A $\beta$ PP i la seva proteòlisi sigui una via de senyalització del receptor cel·lular de superfície (Marambaud *et al.*, 2005; Russo *et al.*, 2005; Selkoe i Kopan, 2003). El fragment curt CTF, generat pel trencament d'A $\beta$ PP a partir de la  $\gamma$ -secretasa, és referit com a domini intracel·lular d'A $\beta$ PP (AICD, *A $\beta$ PP intracellular domain*) i s'ha suggerit que actua com un activador transcripcional (Turner *et al.*, 2003).

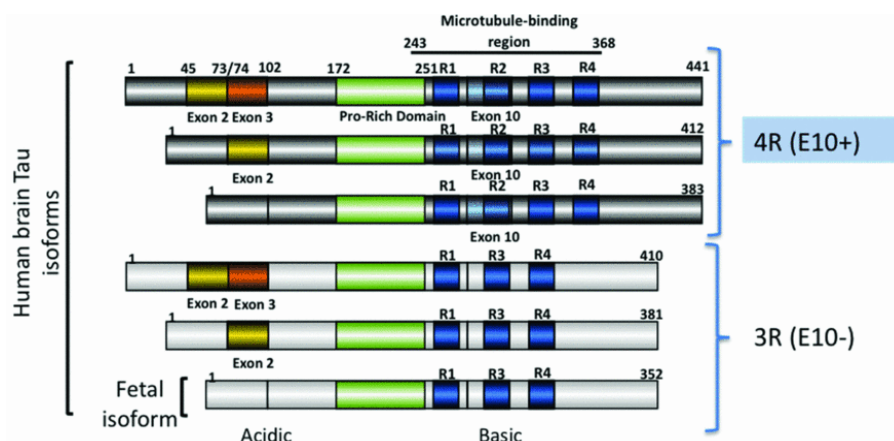
Una altra via secundària i minoritària de la proteòlisi de l'A $\beta$ PP és la via amiloidogènica, de la  $\beta$ -secretasa o via endosomal-lisosomal (Golde *et al.*, 1992). Aquesta via implica l'acció seqüencial de la  $\beta$ -secretasa i la  $\gamma$ -secretasa (Figura 11). L'activitat  $\beta$ -secretasa s'ha atribuït a una proteasa aspartil transmembrana, BACE ( *$\beta$ -site cleaving enzyme*), que està altament expressada en neurones (Vassar *et al.*, 1999). Hi ha dues proteïnes homòlogues de BACE derivades de gens diferents, BACE1 i BACE2, però només BACE1 s'expressa en el sistema nerviós. L'acció de BACE provoca el trencament de l'A $\beta$ PP per a generar sA $\beta$ PP i CTF $\beta$ , i la sA $\beta$ PP és al seu torn proteolitzada addicionalment pel complex  $\gamma$ -secretasa per produir A $\beta$  i AICD (Vassar, 2004). L'escissió d'A $\beta$ PP no es creu que sigui la funció principal del BACE, ja que té d'altres substrats proteïcs. Algunes de les mutacions en el gen de l'A $\beta$ PP proporcionen una conformació més favorable que la pròpia proteïna nativa per al trencament exercit pel BACE. El processament de l'A $\beta$ PP es dona principalment en els dominis de membrana rics en colesterol, coneguts com a *lipid rafts*, on s'acumula l'enzim BACE. L'escissió del CTF $\beta$  per part del complex  $\gamma$ -secretasa genera un nombre de diferents fragments de pèptids A $\beta$ , on les principals espècies són A $\beta$ <sub>40</sub> o A $\beta$ <sub>42</sub>, de 40 o 42 aminoàcids de llargada, respectivament (Steiner, 2004). Abans de formar dipòsits extracel·lulars, el pèptid A $\beta$  sembla acumular-se intracel·lularment en les neurones, un esdeveniment que podria ser crític en la fisiopatologia de la malaltia d'AD. En l'AD hi ha un augment en la proporció d'A $\beta$ <sub>42</sub> respecte A $\beta$ <sub>40</sub>, sent A $\beta$ <sub>42</sub> l'espècie més amiloidogènica.

La formació del pèptid A $\beta$  és un esdeveniment fisiològic que té lloc en el cervell, i posteriorment se n'esdevé la seva expulsió. El transport mitjançat per receptor permet eliminar el pèptid A $\beta$  a través de la BBB mitjançant el receptor de lipoproteïnes de baixa densitat (LPR, *lipoprotein receptor*) i el receptor dels *advanced glycation endproducts* (AGE) (Tanzi *et al.*, 2004). El pèptid A $\beta$  també pot ser degradat de forma proteolítica per diversos enzims, incloent l'enzim degradador de l'insulina (McDermott *et al.*, 1997; Qiu *et al.*, 1998) i la neprilisina (Iwata *et al.*, 2000). Altres enzims que poden degradar l'A $\beta$  inclouen l'enzim convertidor d'endotelina i la plasmina (Eckman i Eckman, 2005). El drenatge de líquid cefal·loraquídi (LCR) en el cervell és una via fisiològica que permet l'eliminació de molècules tòxiques com l'A $\beta$  des de l'espai

intersticial. Amb l'augment de l'edat, la producció del LCR és inferior, i existeix una major resistència al flux de sortida del LCR. S'ha proposat que la disfunció del drenatge del LCR amb l'edat permet l'augment de les concentracions locals dels pèptids amiloidogènics, fet que pot contribuir al desenvolupament de l'AD (Silverberg *et al.*, 2003; Weller *et al.*, 1998, 2000).

### 2.1.2. Proteïna tau

La proteïna tau és una de les principal proteïnes de la família de proteïnes associades als microtúbuls (MAP, *microtubule-associated protein*), que inclou les MAP estructurals i les MAP motores (Lowe *et al.*, 2008). La tau és la fosfoproteïna més abundant en els axons neuronals, i té la funció d'unir-se i estabilitzar els microtúbuls en el seu estat polimeritzat a través de la interacció amb la tubulina. El gen de la proteïna tau humana es troba localitzat a la regió cromosòmica 17q21 (Neve *et al.*, 1986), i té com a mínim 16 exons (Wang i Liu, 2008). Existeixen sis isoformes diferents generades en el cervell humà adult per formes alternatives d'*splicing* dels exons 2, 3 i 10 (Andreadis, 2005). Aquestes sis isoformes tenen entre 352 i 441 residus d'aminoàcids i un pes molecular d'entre 37 i 46 kDa (Wang i Liu, 2008). La seva estructura primària es pot subdividir en una regió N-terminal, seguida d'un domini ric en prolines, una sèrie de repeticions de llocs d'unió a microtúbuls, i l'extrem C-terminal (Buée *et al.*, 2010). Les isoformes de tau derivades de l'*splicing* de l'exó 10 donen lloc a dues formes majoritàries de tau: la proteïna tau amb 3 repeticions (3R) en el domini d'unió als microtúbuls i la proteïna tau amb 4 repeticions (4R) (Buee-Scherrer *et al.*, 1995). S'ha observat que aquestes dues isoformes tenen distribucions regionals específiques que difereixen en el cervell normal (Figura 12) (Bullmann *et al.*, 2007; Goedert *et al.*, 1989).



**Figura 12. Representació esquemàtica de les sis isoformes de la proteïna tau humana presents en el cervell.** L'*splicing* alternatiu de l'exó 10 dona lloc a tres isoformes amb 4 repeticions (4R) en el domini d'unió als microtúbuls i tres isoformes amb 3 repeticions (3R) (Buée *et al.*, 2010).

En les taupaties s'han observat alteracions de la proteïna tau, especialment degudes a modificacions post-transcripcionals anòmales com l'hiperfosforilació (Wang i Liu, 2008). A més a més, en condicions patològiques s'ha observat l'alteració de la solubilitat de tau i una conformació anòmala en forma de fulla  $\beta$ , fets que promouen la

formació d'agregats intracel·lulars en formes filamentoses i insolubles en neurones i glia. La detecció i identificació de les formes de tau anòmales en els homogenats de cervell permet classificar les principals taupaties en base a les característiques bioquímiques dels agregats (Buee-Scherrer *et al.*, 1995; Lee i Trojanowski, 1999; McKhann *et al.*, 2001).

Segons estudis realitzats per diferents autors, en els agregats proteics característics de les taupaties no es dipositaria la proteïna tau completa, sinó que mancarien els extrems N-terminal i C-terminal. Aquest procés de truncament està considerat un factor clau per al desenvolupament de les malalties neurodegeneratives en les quals la tau hi té un paper destacat (Hanger i Wray, 2010; Wang *et al.*, 2008).

### 2.1.3. Alfa-sinucleïna

L' $\alpha$ -sinucleïna és una proteïna de 140 aminoàcids codificada pel gen *SNCA* del cromosoma 4 (Wilson *et al.*, 2004), que es troba en abundància als terminals nerviosos presinàptics. És el principal component dels LB (apartat 2.3.5), agregats presents en els cervell dels pacients d'algunes demències i de la PD; i en molt poca quantitat, en el cervell de persones envellides. També es pot detectar la presència d'aquesta proteïna en les inclusions gials i neuronals citoplasmàtiques (apartat 2.3.6), presents en d'altres condicions neuropatològiques.

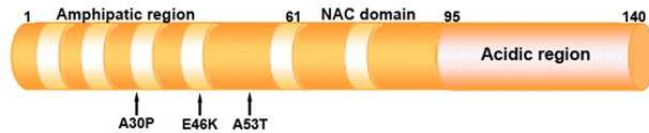
La mutació de sentit erroni A53T en el gen *SNCA* es va identificar com a causa de la PD autosòmica dominant (Polymeropoulos *et al.*, 1997), i posteriorment es va relacionar també amb aquesta malaltia la mutació A30P. Aquestes mutacions són poc freqüents (Farrer *et al.*, 2001; Vechio *et al.*, 1996) i no estan associades a la PD esporàdica. L'afectació d'aquest gen sembla ser també en aquests casos la causa de la patologia neurítica de l' $\alpha$ -sinucleïna (Duda *et al.*, 2002; Spira *et al.*, 2001). Les dades experimentals suggereixen que la mutació A53T promou la formació de fibril·les de l' $\alpha$ -sinucleïna, mentre que la mutació A30P facilita l'oligomerització d'aquesta proteïna (Frasier *et al.*, 2005; Giasson *et al.*, 2003; Kotzbauer *et al.*, 2004). La triplicació del gen de *SNCA* provoca, entre d'altres manifestacions patològiques, la formació de LB pleomòrfics a partir de l' $\alpha$ -sinucleïna, inclusions gials positives per a aquesta proteïna i una patologia neurítica generalitzada (Farrer *et al.*, 2004; Gwinn-Hardy *et al.*, 2000).

La funció de l' $\alpha$ -sinucleïna no s'ha pogut dilucidar, tot i que és probable que tingui un paper sinàptic (Cookson, 2005). Els ratolins KO simples i dobles de l' $\alpha$ -sinucleïna i el seu homòleg  $\beta$ -sinucleïna han permès observar l'absència d'un paper essencial per a la funcionalitat sinàptica, però s'ha descrit la seva importància per al manteniment dels nivells normals de DA en el sistema nigrostriatal (Abeliovich *et al.*, 2000; Chandra *et al.*, 2004).

L' $\alpha$ -sinucleïna en la seva forma nativa és un polímer no plegat o amb un plegament a l'atzar, però la seva conformació està subjecta a canvis dinàmics. S'ha especulat que els



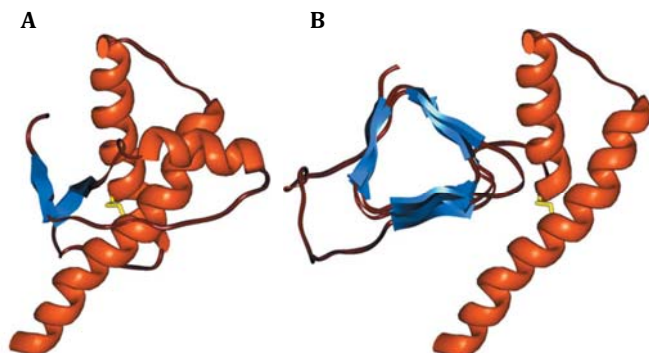
canvis conformacionals resultants de la seva interacció amb lípids o altres proteïnes són crítics per a la seva funció normal (Kim *et al.*, 2002). Hi ha diversos motius estructurals en l' $\alpha$ -sinucleïna, incloent una regió central hidròfoba que inclou la seqüència del component no amiloide (NAC, *non-amyloid  $\beta$  component*), formada pels aminoàcids 61-95, que és un component no amiloide de les plaques senils originalment aïllades de cervell d'AD (Figura 13) (Gerhard *et al.*, 2006). Aquesta regió ha demostrat ser crítica per a la formació de fibres (Dickson, 1999) i és també la regió que diferencia l' $\alpha$ -sinucleïna de les proteïnes homòlogues  $\beta$ -i  $\gamma$ -sinucleïna (Braak *et al.*, 1999), que no tenen el mateix potencial fibril·logènic i no s'han associat amb LB o d'altres estructures patològiques (David *et al.*, 1997). La forma fibril·lar de l' $\alpha$ -sinucleïna té una conformació de fulla  $\beta$  similar a d'altres proteïnes amiloides (Ben Hamida *et al.*, 1993).



**Figura 13. Representació la proteïna  $\alpha$ -sinucleïna.** Aquesta proteïna està formada per 140 aminoàcids. Conté una regió amfipàtica N-terminal formada per sis repeticions, una regió central que conté la regió NAC i una regió C-terminal àcida amb diversos llocs de fosforilació (Mandemakers *et al.*, 2007).

#### 2.1.4. Proteïna priònica

La proteïna priònica cel·lular o proteïna priònica ( $\text{Prp}^c$ ) és una glicoproteïna cel·lular d'unió al core fàcilment soluble en solucions detergents no desnaturalitzants i sensible a la digestió per proteïnasa K, que pot donar lloc a les malalties priòniques quan es produeixen alguns canvis en la seva conformació (Figura 14) (Prusiner *et al.*, 1998). La  $\text{Prp}^c$  es troba anclada a la cara externa de la membrana cel·lular a través d'un ancoratge de glicosilfosfatidilinositol en els microdominis dels *lipid rafts* (Harris *et al.*, 2004). S'expressa en una àmplia varietat de cèl·lules, però és especialment present en les neurones, on s'enriqueix a les sinapsis (Herms *et al.*, 1999). La funció normal de  $\text{Prp}^c$  no es coneix completament, encara que s'ha proposat la seva intervenció en funcions habituals de les cèl·lules, com ara l'activitat sinàptica, l'activació de limfòcits, la resistència a l'estrès i la senyalització cel·lular associada amb el creixement de neurites (Cashman *et al.*, 1990; McLennan *et al.*, 2004; Santuccion *et al.*, 2005). En els teixits infectats amb agents priònics, algunes proteïnes  $\text{Prp}^c$  solubles i sensibles a la proteasa K esdevenen patògens tipus *scrapie* o una isoforma o



**Figura 14. Estructures de les isoformes de les proteïnes priòniques  $\text{Prp}^c$  i  $\text{Prp}^{sc}$ .** A) La  $\text{Prp}^c$  conté principalment estructures hèlix- $\alpha$  i en menor quantitat, estructures de fulles  $\beta$ . B) En la conversió a la forma anòmala de la Prp s'observa un augment de les fulles  $\beta$  (Ironsides *et al.*, 2008).

isoformes resistent a proteïnasa K, anomenades PrP<sup>Sc</sup> o PrP<sup>res</sup>, que han estat implicats en la neurotoxicitat associada a la malaltia. La hipòtesi priònica proposa que l'agent infecciós o prió es compon únicament de PrP<sup>Sc</sup>, que quan s'introdueix en l'organisme indueix la conversió de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> (Prusiner *et al.*, 1998).

La noció que la PrP<sup>Sc</sup> és important en la patogènesi de la malaltia de prions es basa en les correlacions temporals i anatòmiques observades entre l'acumulació de PrP<sup>Sc</sup> i el desenvolupament de canvis patològics en el sistema nerviós central. No obstant això, els canvis neuropatològics observats en els diversos animals models de malalties priòniques poden desenvolupar-se en l'absència aparent de PrP<sup>Sc</sup> i, al revés, la PrP<sup>Sc</sup> pot acumular-se al cervell sense alteracions neuropatològiques o signes clínics de malalties (Chiesa i Harris, 2001).

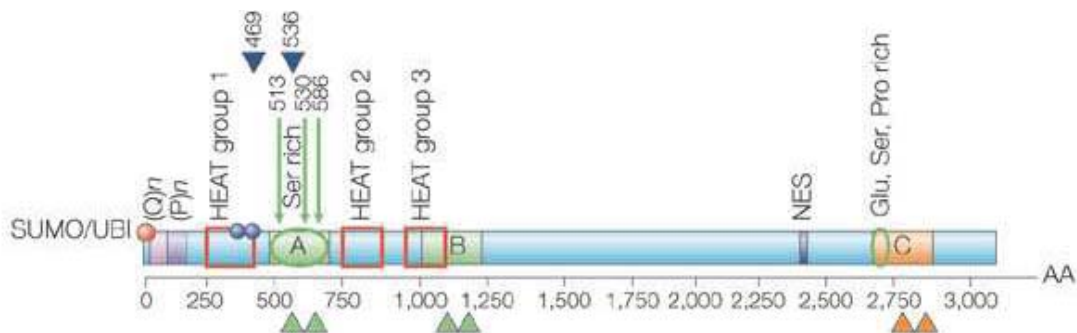
La forma més comuna de malaltia priònica humana és la CJD espontània. Aquesta malaltia es considera que sorgeix després de la conversió espontània de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> o d'una mutació somàtica en PrP que el fa susceptible a la conversió a PrP<sup>Sc</sup> (Prusiner *et al.*, 1998). S'ha proposat que les mutacions patògenes afavoreixen la conversió espontània de PrP<sup>C</sup> a la PrP<sup>Sc</sup> seguit per un procés de conversió autocatalítica. No obstant això, els experiments amb PrP no glicosilada recombinant suggereixen que les mutacions al gen *PRNP*, que codifica la Prp, no desestabilitzen la PrP<sup>C</sup> (Weissman, 2004).

#### 2.1.5. Huntingtina

La huntingtina és una proteïna intracel·lular soluble de 348 kDa formada per 3144 aminoàcids, àmpliament expressada en tots els teixits, però present en concentracions més elevades a les neurones del sistema nerviós central i els testicles (Cattaneo *et al.*, 2005; Trottier *et al.*, 1995). La seva localització neuronal és principalment en el compartiment somatodendrític, associada a diversos orgànuls, neurites i sinapsis (DiFiglia *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2003). El gen que codifica per a la huntingtina es localitza al cromosoma 4p16.3. En el cas dels individus afectats per l'HD (apartat 2.4.6), una de les malalties que presenta l'expressió de huntingtina, s'observa la tinció nuclear amb anticossos anti-huntingtina i la presència d'inclusions intranuclear positives per a aquesta immunotinció (apartat 2.3.9) (Sapp *et al.*, 1997). Estudis *in vitro* indiquen que la presència d'aquesta proteïna en el nucli es necessària per a poder observar l'efecte citotòxic (Saudou *et al.*, 1998).

A la seqüència primària de la huntingtina s'hi pot observar la regió poliglutamínica (Figura 15), que té una importància cabdal per a l'HD i d'altres malalties poliglutamíniques (Cattaneo *et al.*, 2001). L'expansió del triplet CAG és més elevada en el cos estriat, i té implicacions per a la vulnerabilitat selectiva de poblacions neuronals (Kennedy *et al.*, 2003). La regió poliglutamínica s'inicia al vuitè aminoàcid i en individus sans assoleix fins a 34 residus de glutamina (Cattaneo *et al.*, 2005). La regió poliprolina

que segueix a continuació pot ajudar a mantenir la solubilitat de la proteïna (Steffan *et al.*, 2004). També s'han identificat les repeticions HEAT, que consten de seqüències de 40 aminoàcids implicades en interaccions proteïna-proteïna (Andrade i Bork, 1995). La huntingtina conté, a més a més, una regió d'exportació de la senyal nuclear carboxi-terminal funcionalment activa i una senyal de localització nuclear, que poden indicar una implicació en la translocació de proteïnes del nucli al citoplasma (Xia *et al.*, 2003). La proteïna huntingtina normal i mutada s'escindeixen per caspases (Wellington *et al.*, 2002) i contenen quatre tipus de modificacions post-translacionals (Cattaneo *et al.*, 2005).



**Figura 15. Representació de la proteïna huntingtina.** En aquesta figura es poden identificar la regió poliglutamínica o (Q)<sub>n</sub>, la seqüència poliprolina (P)<sub>n</sub>, i les repeticions HEAT. Les fletxes indiquen els llocs de trencament per caspases (verd) i calpaïnes (blau). La regió B és proteolitzada principalment al còrtex, la regió C a l'estriat, i la regió A en ambdós. NES és la senyal d'exportació nuclear. Els cercles indiquen regions de modificacions post-translacionals (Cattaneo *et al.*, 2005).

La funció habitual de la huntingtina és desconeguda, però s'ha observat que és important durant l'embriogènesi. Tampoc es coneix la funció anòmala de la huntingtina mutant, però s'accepta que la toxicitat de la huntingtina mutant és deguda a un guany de funció tòxica, tot i que hi ha proves que la pèrdua de la funció normal també pot contribuir a la patogènesi (Dragatsis *et al.*, 2000). Estudis d'interaccions proteïna-proteïna entre la huntingtina mutant i la normal impliquen nombrosos mecanismes cel·lulars, que inclouen la degradació alterada del proteosoma, la senyalització intracel·lular, l'endocitosi, la regulació de la transcripció, l'apoptosi, i els mecanismes de transport axonal i morfogènesi (Harjes i Wanker, 2003).

#### 2.1.6. Proteïna TDP43

La TAR *binding protein-43* (TDP43) és una proteïna de 414 aminoàcids codificada pel gen *TARDBP* del cromosoma 1p36.2, que consisteix en 5 exons de codificació i un de no codificació. La identificació d'aquesta proteïna en inclusions ubiquitinades de l'ALS i la FTD va permetre relacionar-la amb aquestes patologies (Neumann *et al.*, 2006). La proteïna TDP43 està altament conservada i expressada, i predominantment localitzada al nucli (Buratti *et al.*, 2001; Mackenzie *et al.*, 2010).

La proteïna TDP43 pot fer contínuament de llançadora entre el nucli i el citoplasma. Aquest procés està regulat parcialment per senyals de localització i d'exportació

nuclear (Ayala *et al.*, 2008; Winton *et al.*, 2008). A més a més de les funcions ben caracteritzades de la TDP43 en la regulació de la transcripció i l'*splicing*, s'han proposat d'altres papers en altres processos cel·lulars, com el processament del microRNA, l'apoptosi, la divisió cel·lular i l'estabilització de l'mRNA (Buratti *et al.*, 2005; Fiesel *et al.*, 2010; Lagier-Tourenne *et al.*, 2010; Strong *et al.*, 2007). En el cervell, la redistribució transitòria al citoplasma podria ser una resposta al dany neuronal (Moisse *et al.*, 2009; Sato *et al.*, 2009). A més a més, alguns estudis han proposat algun paper de la TDP43 en la regulació de la plasticitat neuronal (Wang *et al.*, 2008b) i el manteniment de la integritat dendrítica (Luk *et al.*, 2009).

#### 2.1.7. Proteïna FUS

La proteïna fusionada al sarcoma (FUS, *fused in sarcoma protein*) és una proteïna formada per 526 aminoàcids i codificada a partir de 15 exons, que pertany a la família de FET/TET de proteïnes d'unió al DNA/RNA de múltiples funcions (Bertolotti *et al.*, 1996). Va ser originalment descoberta com a component de la fusió d'oncògens en càncers humans (Law *et al.*, 2006) i s'ha trobat en inclusions d'ubiquitina de l'ALS i la FTLD després del seu anàlisi bioquímic (Kwiatkowski *et al.*, 2009; Vance *et al.*, 2009).

La FUS és expressada de forma ubiqua tant en el nucli com en el citoplasma (Andersson *et al.*, 2008), on realitza contínuament una funció de llançadora entre aquestes dues localitzacions (Zinszer *et al.*, 1997). Està implicada en nombrosos processos cel·lulars, incloent la proliferació cel·lular, la reparació del DNA, la regulació de la transcripció, i el processament de microRNA i RNA (Janknecht, 2005; Lagier-Tourenne *et al.*, 2010; Law *et al.*, 2006), tot i que la seva funció concreta no està encara ben caracteritzada. Aquesta proteïna pot estar implicada en la plasticitat neuronal i el manteniment de la integritat dendrítica mitjançant el transport de mRNA a espines dendrítiques a través de la translació local (Fujii *et al.*, 2005 i 2005b).

#### 2.1.8. Components secundaris de les lesions

La unió de substàncies addicionals als principals components d'un agregat pot afavorir l'adquisició secundària de proteïnes per part d'aquestes estructures. És el cas de la tubulina, una proteïna que es pot associar a l' $\alpha$ -sinucleïna agregada (Alim *et al.*, 2002), o a les fibres dels filaments helicoïdals aparellats (PHF, *paired helical filaments*), que també poden incorporar diverses proteïnes en els agregats que formen (Wisniewski *et al.*, 1984), entre d'altres (Taula 3). Durant l'envelliment, les proteïnes amb una vida mitjana llarga acumulen modificacions post-traduccionals, generalment glicacions, procés a través del qual esdevenen productes de la reacció de Maillard. Aquestes alteracions afavoreixen la reticulació de les proteïnes, la disminució de la seva solubilitat, i l'augment de la resistència a les proteases (Armstrong *et al.*, 2008). Amb el temps, aquests canvis poden alterar la composició química d'una lesió i modificar les seves propietats d'unió (Smith *et al.*, 1994; Tabaton *et al.*, 1991).

Lesion	Primary constituent	Associated constituents
A $\beta$ deposit	A $\beta$ <sup>22,23</sup>	Apo E, <sup>24</sup> Apo D, <sup>25</sup> PrP <sup>sc</sup> , <sup>26</sup> Tau, <sup>27</sup> MAC, <sup>28</sup> Amyloid-P, <sup>29,30</sup> bFGF, <sup>31</sup> Complement (C3d, C1q, C5, C4p), <sup>32</sup> $\alpha$ -ACT, <sup>33</sup> IL-6, $\alpha_2$ -macroglobulin, <sup>33</sup> CAM1, <sup>33</sup> Clusterin, <sup>33</sup> Vibronectin, <sup>33</sup> HSPG, <sup>33</sup> Maillard reaction products, <sup>34,35</sup> PHF antigens, <sup>27</sup> NF protein, <sup>27</sup> Ubiquitin, <sup>36</sup> CgA, <sup>37</sup> ACHE, <sup>38</sup> Somatostatin, <sup>38</sup> GABA, <sup>38</sup> Neuropeptide-Y, <sup>38</sup> Catecholamine positive neurites, <sup>38</sup> Doppel, <sup>39</sup> Parvalbumin <sup>37</sup>
Prion protein deposits	PrP <sup>sc</sup> <sup>40,41</sup>	Apo E, <sup>42</sup> CgB, <sup>42</sup> A $\beta$ , <sup>43</sup> Complement (C1q, C3b), <sup>42</sup> Laminin, <sup>44</sup> Clusterin <sup>45</sup>
Neurofibrillary tangles	3R/4R Tau <sup>45,46</sup>	Apo E, <sup>47</sup> HSPG, <sup>48</sup> Ubiquitin, <sup>49</sup> NF protein, <sup>50</sup> Synaptophysin, <sup>50</sup> A $\beta$ , <sup>51</sup> MAC, <sup>52</sup> GFAP, <sup>53</sup> bFGF, <sup>48</sup> Amyloid-P, <sup>53</sup> Ubiquitin <sup>34</sup>
Lewy bodies	$\alpha$ -synuclein <sup>54,55</sup>	Tau, <sup>56</sup> Ubiquitin, <sup>57</sup> Tubulin, <sup>58</sup> MAP5, cdk5, <sup>59</sup> IF proteins, <sup>60</sup> $\alpha$ B-crystallin, <sup>61</sup> NF protein <sup>62</sup>
Pick bodies	3R Tau <sup>45,46</sup>	Apo E, <sup>63</sup> bFGF, Advanced glycation end-products, <sup>64</sup> CgB, <sup>65</sup> Complement (C1, C1q, C4, C2, C3, C5, C6, C8), <sup>66</sup> Clusterin, <sup>67</sup> CD59, <sup>67</sup> Clathrin, <sup>68</sup> NF protein, <sup>66</sup> Synaptophysin, <sup>66</sup> GFAP, <sup>69</sup> Ubiquitin <sup>69</sup>
CBD inclusions	4R Tau <sup>70,71</sup>	GFAP, <sup>72</sup> Leu-7 <sup>73</sup>
PSP inclusions	4R Tau <sup>45,46</sup>	GFAP, <sup>74</sup> PHF antigens, <sup>74</sup> Ubiquitin <sup>74</sup>
Glial cytoplasmic inclusions	$\alpha$ -synuclein <sup>54,55</sup>	Tau, <sup>75,76</sup> MAP2, <sup>77</sup> $\alpha$ B-crystallin, <sup>78,79</sup> tubulin, <sup>58</sup> Ubiquitin, <sup>78,79</sup> cdk5, <sup>68</sup> NAPK, <sup>68</sup> Rabaptin 5 <sup>77</sup>
NIFID inclusions	$\alpha$ -internexin <sup>80-84</sup>	Ubiquitin, <sup>80-84</sup> IF proteins <sup>80-84</sup>
Ubiquitin inclusions (FTLD-U, ALS)	TDP-43 <sup>85</sup>	Ubiquitin <sup>85</sup>

$\alpha$ ACT, Alpha antichymotrypsin; A  $\beta$ ,  $\beta$ -amyloid; ACHE, Acetylcholinesterase; ALS, Amyotrophic lateral sclerosis; Apo E, D, Apolipoproteins E and D; bFGF, Basic fibroblast growth factor; CAM1, Cell adhesion molecule 1; CD59, Membrane complement inhibition; cdk5, Cyclin-dependent kinase-5; CgA, CgB, Chromogranin A and B; FTL-D-U, Frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin inclusions; GABA,  $\gamma$  Aminobutyric acid; GFAP, Glial fibrillary acidic protein; HSPG, Heparan sulfate proteoglycan; IF, Intermediate filament; IL-6, Interleukin-6; Leu-7, Marker for killer lymphocytes; MAC, Membrane attack complex; MAP-2, MAP-5, Microtubule associated proteins; NAPK, Nitrogen-activated protein kinase; NF, neurofilament; NIFID, Neuronal intermediate filament inclusion disease; PHF, Paired helical filament; PrP, Prion protein; TDP-43, Product of the transcription repressor gene (*TARDP*).

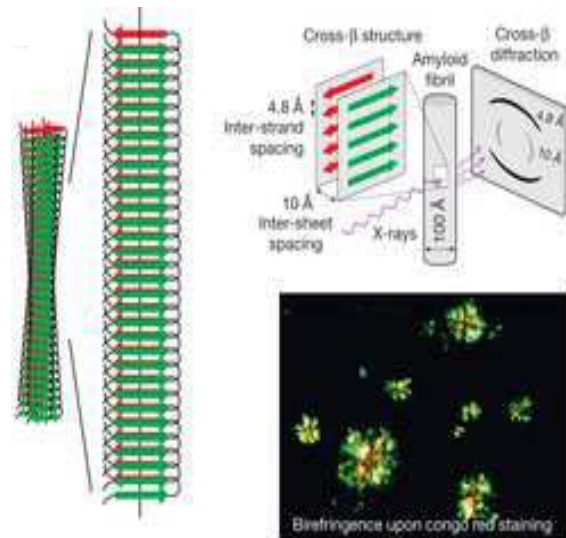
**Taula 3. Composició molecular de les principals lesions cerebrals associades a malalties neurodegeneratives.** La lesió consta del constituent principal i altres components secundaris de tipus molecular divers que també en formen part (adaptat d'Armstrong *et al.*, 2008).

## 2.2. Formació i propagació de les estructures amiloides i dels agregats proteics

Donat que l'estructura de les proteïnes determina la seva funció, els canvis en la seva seqüència o síntesi, com s'observa en algunes mutacions de malalties familiars, i la disminució de la proteòstasi (apartat 1.3.4), característica pròpia de l'envelliment, afavoreixen el plegament anòmal de proteïnes. L'alteració de l'estructura proteica té com a resultat el guany o la pèrdua de funció de la proteïna (Blancas-Mejía i Ramírez-Alvarado, 2013) i la formació d'agregats intracel·lulars o extracel·lulars, constituents de les lesions cerebrals de diverses malalties neurodegeneratives. En l'envelliment i en els trastorns conformacionals de les proteïnes, l'amiloide és l'estructura molecular més habitual.

L'**amiloide** es pot definir de forma general com a congregacions multimèriques de proteïnes amb característiques histoquímiques singulars en els teixits, i una estructura quaternària  $\beta$  creuada, com es pot determinar mitjançant l'anàlisi de les fibres per difracció amb raigs X (Figura 16) (Jucker i Walker, 2013). Mentre que des del punt de vista biofísic o molecular la definició d'amiloide es centra en el patró de difracció dels raigs X, observat per primer cop per Astbury (1935); la definició patològica és de tipus operacional, basada en l'observació de fibres no ramificades de proteïnes, normalment extracel·lulars i visualitzades en cèl·lules o teixits que, a més a més, mostren una birefringència verda sota llum polaritzada després de la tinció amb el vermell de Congo (Sipe *et al.*, 2010).

La proteïna en estat amiloide és termodinàmicament molt estable. Forma feixos de filaments no ramificats i trenats, i cada filament està format per fulles de fibres  $\beta$ . Les fulles  $\beta$  van paral·leles a l'eix del filament, i les fibres són quasi perpendiculars a l'eix vertical (Eisenberg i Jucker, 2012). En les amiloidosis més habituals, les fulles  $\beta$  consisteixen en fibres  $\beta$  paral·leles amb els esquelets units per ponts d'hidrogen. Les fulles  $\beta$  s'uneixen entre elles a partir de les cadenes laterals d'aminoàcids que s'interdigiten, en forma de cremallera (Figura 16). La proteïna formadora d'amiloide pot contribuir amb més d'un segment a l'esquelet amiloide de les fibres  $\beta$ .



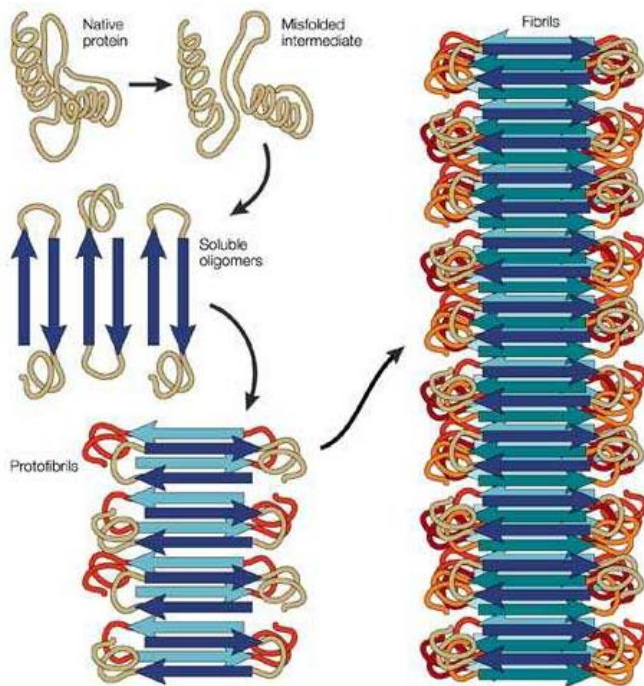
**Figura 16. Definició de l'estructura amiloide.** L'amiloide dona lloc a un patró de difracció dels raigs X o a una birefringència verda un cop tenyit amb vermell de Congo (Walker i Jucker, 2012).

A nivell molecular, els amiloides poden ser altament polimòrfics, és a dir, que un segment de fibres  $\beta$  pot formar una varietat diferent d'esquelets amiloides i estructures filamentoses. Aquestes variants conformacionals s'ha suggerit que poden ser la base de les "soques" d'amiloide, és a dir, amiloides formades per una proteïna en particular que tenen activitats biològiques concretes (Eisenberg i Jucker, 2012; Tanaka *et al.*, 2006).

Algunes condicions *in vivo* que promouen la formació d'amiloide són l'augment de la concentració de la proteïna afectada, l'exposició de segments que afavoreixen la formació d'amiloide a causa de mutacions que desestabilitzen la forma nativa o la generació de fragments per una proteòlisi de la proteïna o una translació aberrant, les condicions de desestabilització termodinàmica com canvis de pH o temperatura i el deteriorament cel·lular del control de la qualitat proteica (Balch *et al.*, 2008; Eisenberg i Jucker, 2012).

El procés de formació de l'amiloide, o l'**amiloidogènesi**, s'inicia amb una fase de lenta nucleació que consisteix en l'agregació de les proteïnes en una llavor que donarà lloc a una sèrie d'estats intermediaris fins que el segment de l'esquelet de l'amiloide es formi (Jarrett i Lansbury, 1993; Lee *et al.*, 2011). La nucleació és un event poc probable (Nelson *et al.*, 2005), però un cop iniciat no té aturador, ja que les estructures monomèriques i oligomèriques s'uneixen més endavant als extrems del factor inicial de l'amiloide a través de transformacions conformacionals. Aquest procés comporta també la formació d'estructures intermediàries d'unió, com les protofibril·les o els oligòmers, que poden ser tòxics per ells mateixos (Figura 17) (Mucke i Selkoe, 2012). Amb l'augment de la llargada, i depenent de l'estabilitat conformacional de l'esquelet

amiloide, les fibril·les creixents poden trencar-se espontàniament o també a través de processos cel·lulars. A través d'aquest mecanisme, l'amiloide esdevé un factor autopropagador, generant i esparcint noves llavors d'amiloide. La cinètica de formació de les estructures amiloides estan, doncs, en funció de les taxes de nucleació, creixement i fragmentació de la proteïna (Jarret i Lansbury, 1993; Knowles i Buehler, 2011).



**Figura 17. Formació de l'estructura amiloide.** Les proteïnes plegades adopten una conformació aleatòria d'hèlix- $\alpha$  o espiral. En l'envelliment, el primer pas implica la formació d'un intermediari amb elevada tendència a l'agregació. Així esdevé estabilitzat a través de la formació d'estructures oligomèriques de fulla  $\beta$ , que a través de la incorporació de monòmers dóna lloc a protofibril·les i finalment a fibril·les creuades de tipus  $\beta$ -amiloide (Soto, 2003).

### 2.3. Característiques histopatològiques de les lesions cerebrals a l'envelliment i les malalties neurodegeneratives

#### 2.3.1. Plaques senils i dipòsits de $\beta$ -amiloide

Un dels trets histològics propis de l'AD és la presència de dipòsits extracel·lulars d'A $\beta$  en forma de plaques senils. Mitjançant tècniques d'immunohistoquímica, s'han caracteritzat aquests dipòsits i això ha permès descriure'n un ampli ventall, més enllà de les plaques senils clàssiques observades a través d'impregnació de plata (Micheli *et al.*, 2004).

Les **plaques senils o dipòsits focals d'A $\beta$**  presenten una àmplia varietat morfològica, que es concreta amb una condensació central d'entre 20 i 50  $\mu$ m i una tinció intensa amb els reactius clàssics per a la detecció d'amiloide, tals com el vermell de Congo, la tioflavina S, impregnacions de plata com la tinció modificada de Bielchowsky (Figura 18 A). Aquestes tincions, però no permeten percebre els dipòsits d'A $\beta$  que tenen un patró petit i puntejat. La reactivitat de les plaques senils amb les tincions amiloides reflecteix l'estructura secundària de fulla  $\beta$  plegada dels pèptids amiloides, característica comuna a tots els tipus d'amiloide (apartat 2.2) (Lowe *et al.*, 2008).

D'entre els dipòsits focals d'A $\beta$ , els més coneguts són les plaques senils clàssiques o plaques neurítiques, que es caracteritzen per un nucli central d'amiloide envoltat per una perifèria menys compacte en forma d'halo (Figura 18 B i C). Aquestes dues zones solen estar separades del parènquima cerebral per una zona clara amb cèl·lules glials i processos neuronals distròfics que usualment presenten una forma distesa i estan orientats de forma radial. Aquests dipòsits solen contenir proteïna tau filamentosa similar a la present als NFT, així com una mescla variable d'òrgànuls i vesícules citoplasmàtiques degenerades o intactes. Algunes plaques tenen una orientació perivascular associada a la CAA. Els astròcits reactius i la micròglia solen envoltar la perifèria de la placa, especialment aquella amb nuclis densos d'amiloide. L'augment de l'expressió de GFAP es correlaciona amb el recompte de plaques neurítiques (Overmyer *et al.*, 1999). El marcatge immunohistoquímic amb anticossos dirigits contra formes específiques d'amiloide normalment mostra un nucli central enriquit amb A $\beta_{40}$  i una perifèria dominada per la presència d'A $\beta_{42}$  (Iwatsubo *et al.*, 1994).

La presència de plaques neurítiques sol tenir lloc als còrtexs d'associació multimodal, però són menys comuns en els còrtexs visuals i motor primari. Són especialment prominents a l'amígdala i el complex subicular hipocampal. L'ultraestructura de les plaques neurítiques conté uns nuclis amiloides amb agulles fibril·lars radials que poden estar presents i envoltades de processos astrocítics i neurites anormals (Kidd, 1964; Terry *et al.*, 1964). En d'altres casos les fibres amiloides que omplen l'espai extracel·lular formen un malla de fibres més laxa. L'A $\beta$  es pot detectar també al citoplasma d'astròcits (Kurt *et al.*, 1999) o neurones (Gouras *et al.*, 2005).

Les plaques immadures o primitives són dipòsits esfèrics d'amiloide dispersats uniformement sense cap estructura nuclear. Estan enriquides en pèptid A $\beta_{42}$  i sovint no presenten neurites distròfiques prominents (Figura 18 D i E). Aquestes plaques solen ser abundants en capes superficials del còrtex i a l'estriat (Lowe *et al.*, 2008).

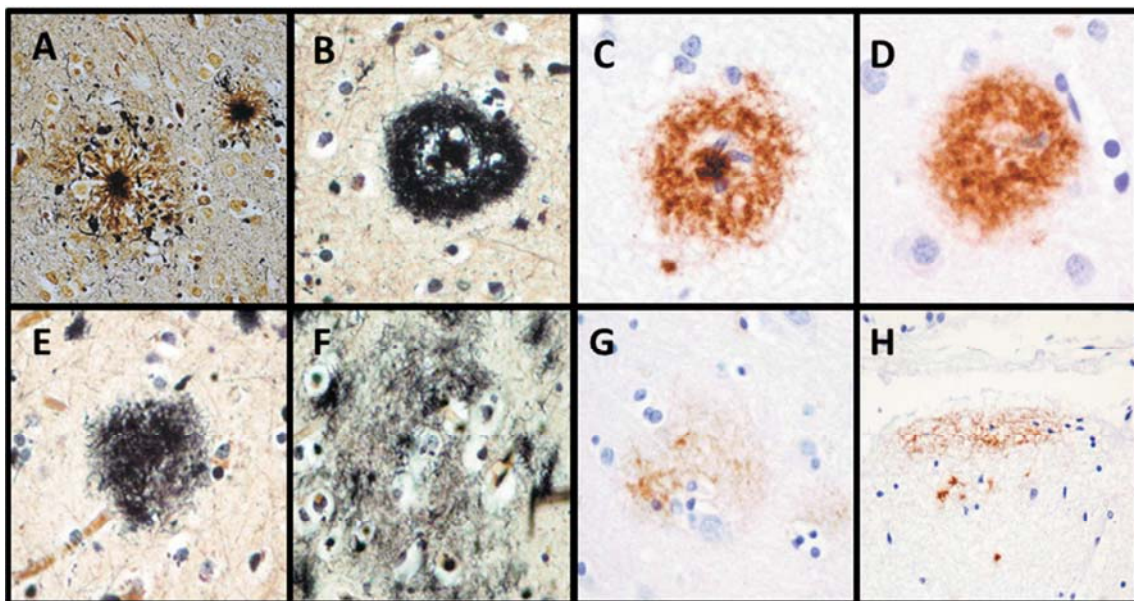
Les plaques compactes es caracteritzen per un nucli dens sense perifèria d'amiloide, i normalment no contenen neurites distròfiques o glia reactiva. Aquest tipus de placa és força comuna en les capes de cèl·lules granulars i de Purkinje, a més a més de ser el tipus de placa més freqüent en el globus pàl·lid. La seva presència també és comuna en els còrtexs primaris, mentre que les plaques neurítiques, primitives i difuses predominen a les àrees del lòbul límbic i d'associació multimodal (Lowe *et al.*, 2008).

Un altre tipus de placa són els dipòsits focals d'A $\beta$  d'aparença de cotó o llana, que es poden detectar fàcilment amb mètodes histològics rutinaris, però que es visualitzen amb dificultat amb les tincions amiloides. Són lesions esfèriques que estan principalment formades per A $\beta_{42}$ . Aquestes lesions es van descriure originalment en l'AD familiar amb deleció de l'exó 9 del gen de la presenilina 1 (Crook *et al.*, 1998) i s'han pogut observar ocasionalment en casos d'AD esporàdics (Atsumi *et al.*, 1980; Yokota *et al.*, 2003).



Els **dipòsits difusos d'A $\beta$**  presenten morfologies diverses. Són usualment estructures no esfèriques, i tenen contorns irregulars, aparença amorfa i manca de neurites distròfiques (Figura 18 F i G) (Ikeda *et al.*, 1989, 1990; Yamaguchi *et al.*, 1988), que poden assolir un diàmetre de fins a 200  $\mu$ m. En ocasions es fa referència a ells com a dipòsits pre-amiloïdes, donada la seva aparença i la presència d'un marcatge lleu amb les tincions clàssiques d'amiloïde, o fins i tot, absència de marcatge. Tot i així, es pot observar amb la impregnació de Bielchowsky, i amb la tinció immunohistoquímica del pèptid d'A $\beta$  (Lowe *et al.*, 2008). Contenen principalment A $\beta_{42}$ , a més a més de fragments modificats o truncats a l'extrem N-terminal d'aquest pèptid (Gowing *et al.*, 1994). Es troben quantitats important de dipòsits difusos d'A $\beta$  en els còrtex límbic i d'associació multimodals de pacients no dements o d'edat avançada, i són també un dels tipus de plaques més abundants en la DLB (Dickson *et al.*, 1988).

Un altre tipus de dipòsit difús d'A $\beta$  és l'anomenat dipòsit d'amiloïde semblant a llac o velló (*lake-like, fleece-like*) compostos per pèptids d'A $\beta$  disseminada que no es tenyeix amb les tincions pròpies d'amiloïde (Figura 18 H) (Thal *et al.*, 2000; Wisniewski *et al.*, 1998). La seva presència és comuna en la capa parvocel·lular del presubiculum. Els dipòsits amb localització subpial solen ser presents a la CAA i es correlacionen amb la seva severitat (Forno i Norville, 1976). Pel que fa a la composició, aquestes plaques semblen estar formades per A $\beta$  truncada en l'extrem N-terminal (Thal *et al.*, 1999).



**Figura 18. Tincions de diversos tipus de dipòsits cerebrals de  $\beta$ -amiloïde.** A) Placa senil clàssica tenyida amb la tinció de Bielchowsky. B i C) Placa senil clàssica; D i E) Placa senil difusa immadura; F i G) Placa senil difusa; H) Placa tipus llac. Les imatges B, D i F estan tenyides amb una impregnació amb plata. C, E, G i H estan tenyides per immunohistoquímica amb anticossos anti-  $\beta$ -amiloïde. Extretes de Lowe *et al.* (2008).

A més a més del component principal d'aquestes plaques, l'A $\beta$ , hi ha tot un ampli ventall de substàncies associades a les mateixes plaques o a les cèl·lules afectades per aquestes estructures. Entre aquestes substàncies s'inclou la proteïna tau (Wood *et al.*, 1986), l'A $\beta$ PP (Ishi *et al.*, 1989), la proteïna associada al creixement-43 (Masliah *et al.*, 1991), la proteïna cinasa C (Masliah *et al.*, 1990), la ubiquitina (Perry *et al.*, 1987), l'espectrina cerebral (Masliah *et al.*, 1990), els neurofilaments (Arai *et al.*, 1990), la sinaptofisina i la cromogranina (Brion *et al.*, 1991). A més a més alguns neurotransmissors com l'acetilcolina o la substància P també s'han identificat en les neurites (Armstrong *et al.*, 1985). D'altres molècules associades *per se* als dipòsits d'A $\beta$  són l'apolipoproteïna E (ApoE), el factor de complement 1q, els glicosaminoglicans, i la proteïna amiloide del sèrum (Dickson *et al.*, 1997; Morgan *et al.*, 2004). En general la presència d'aquestes molècules reflecteix la deposició de l'amiloide a l'espai extracel·lular, el dany a les cèl·lules adjacents, els elements de la resposta inflamatòria, i els relacionats amb l'agregació i la dispersació d'amiloide.

Encara que els dipòsits d'A $\beta$  caracteritzen la neuropatologia de l'AD, les plaques difuses són una troballa freqüent en persones d'edat avançada, i la seva acumulació no sembla ser consistent o progressiva (Crystal *et al.*, 1993; Mackenzie, 1994). En un estudi basat en vint centenaris (Delaere *et al.*, 1993), es va descriure la presència de dipòsits d'A $\beta$  com a una constant en aquests cervells.

### 2.3.2. Cabdells neurofibril·lars, filaments del neuropil i inclusions de tau

Els **cabdells neurofibril·lars** o NFT són unes lesions intracel·lulars filamentoses que sovint ocupen tot el cos cel·lular de les neurones i s'estenen per la dendrita apical. Són una de les lesions característiques de l'AD, tot i que també es poden trobar en el cervell d'altres individus amb un envelliment normal i en diverses varietat de condicions, com per exemple la PSP, la malaltia de Niemann-Pick tipus C, el DS, la distròfia miotònica, el síndrome de Gerstmann–Straüssler–Scheinker (GSS, *Gerstmann–Straüssler–Scheinker syndrome*) i el CS entre d'altres (Lee *et al.*, 2001; Spillantini *et al.*, 1999; Wisniewski *et al.*, 1979). En el cas de l'AD, la densitat d'aquestes lesions és paral·lela a la durada de la malaltia i la severitat de la demència (Arriagada *et al.*, 1992; Bierer *et al.*, 1995; Nagy *et al.*, 1995) i, per tant, són un element diagnòstic clau (Hyman *et al.*, 1997).

Els NFT es detecten de forma òptima gràcies a les tècniques d'impregnació amb plata, com la tinció modificada de Bielchowsky, la tinció de Gallyas, la preparació de Sevier-Munger o de Bodian (Figura 19 A i B). També presenten una aparença lleugerament basofílica en la tinció clàssica d'hematoxilina-eosina (HE). El fet que el component majoritari sigui la proteïna tau hiperfosforilada (Brion *et al.*, 1985; Bu'ee *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001; Delacourte, 1994), permet la seva detecció a través de tècniques d'immunohistoquímica amb una bona visualització (Lee *et al.*, 1991). A més a més, als NFT també s'han pogut detectar la casein-cinasa II (Baum *et al.*, 1992), la nexin

proteasa I (Rosenblatt *et al.*, 1989), l'heparan-sulfat proteoglicà (HSPG) (Perry *et al.*, 1991b), el factor de creixement de fibroblasts (Siedlak *et al.*, 1991), la MAP5 (Leverenz *et al.*, 2002) i la ubiquitina (Morishima-Kawashima *et al.*, 1993).

La morfologia dels NFT és heterogènia, ja que depèn del tipus de neurona en la qual resideix, ja siguin les cèl·lules piramidals de l'hipocamp o les neurones multipolars del nucli basal de Meynert. L'ultraestructura dels NFT varia en funció de l'estat de desenvolupament de la lesió. En els estadis inicials, es produeixen agregats perinuclears de PHF de tau i d'altres filaments que formen un nucli compacte i dens de PHF intracel·lulars, situats en el soma i la dendrita apical de la cèl·lula des d'on s'estén cap al nucli i els orgànuls citoplasmàtics (Figura 19 C) (Lowe *et al.*, 2008). L'estructura dels NFT sembla estar formada per filaments helicoïdals de 10 nm, amb constriccions cada 80 nm, disposats en doble hèlix (Kidd, 1964; Ruben *et al.*, 1993; Terry, 1963; Wisniewski *et al.*, 1996). Alhora, els filaments estan constituïts per subestructures de quatre protofilaments, cadascun dels quals té un diàmetre de 3-5 nm (Wisniewski *et al.*, 1984). En algunes condicions, com és el cas de la PSP, el NFT estan formats principalment per filaments rectes (Shibayama *et al.*, 1978; Yagichita *et al.*, 1981).

El component majoritari dels NFT i les neurites distròfiques associades a les plaques senils és la proteïna tau fosforilada (Delacourte *et al.*, 1986; Kosik *et al.*, 1986; Wood *et al.*, 1986). Els NFT contenen epítops al llarg de la molècula de tau (Kosik *et al.*, 1988), on s'han identificat múltiples llocs de fosforilació (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986; Ikura *et al.*, 1998), a més a més d'una proteòlisi parcial de la proteïna tau (Wischik *et al.*, 1988).

La presència de NFT en ancians cognitivament normals es limita a l'escorça transentorrinal, o també pot implicar la subiculum i la zona CA1 de l'hipocamp, a part de l'escorça entorrinal i el nucli anterior olfatiu (Arriagada *et al.*, 1992; Braak i Braak, 1991, 1997; Hof *et al.*, 1995; Price *et al.*, 1992). En absència de demència, el neocòrtex i nuclis subcorticals contenen pocs NFT. La participació de les diferents poblacions de neurones en la formació dels NFT sembla seguir una seqüència topogràfica consistent, previsible durant l'envelliment "normal" que no es distingeix de la primera etapa presintomàtica a l'AD (Arriagada *et al.*, 1992; Braak i Braak, 1991, 1997). Els cabdells en l'AD es trobarien en un nombre superior a les àrees associatives de l'escorça temporal, l'amígdala, la formació hipocampal i el gir parahipocampal tal i com assenyalen diversos estudis sobre la distribució neuropatològica d'aquesta lesió (Arnold *et al.*, 1991; Brun i Gustafson, 1976; Hirano i Zimmerman, 1962).

Els **filaments del neuropil** (NT, *neuropil threads*) són estructures filamentoses situades en el neuropil i distribuïdes àmpliament per la matèria grisa a l'AD (McKee *et al.*, 1991; Perry *et al.*, 1991). La seva densitat es correlaciona amb la severitat de la demència (McKee *et al.*, 1991), així com amb els NFT (Masliah *et al.*, 1992). Bona part de l'escorça és ocupada pels NT, especialment a les làmines II i III (Markesbery *et al.*, 1993). Els NT sovint tenen una localització dendrítica (Yamaguchi *et al.*, 1990), com a

resultat de la progressió de canvis en el citoesquelet que s'estenen fins al cos cel·lular, amb la formació de NFT, segons Braak *et al.* (1994). S'associen freqüentment amb NFT extracel·lulars a l'hipocamp (Yamaguchi *et al.*, 1991a), i se situen a prop de dendrites de les neurones que contenen NFT (Braak i Braak, 1988), malgrat que també poden implicar dendrites distals o axons en l'amígdala o l'escorça entorrinal, en absència de cèl·lules que contenen NFT (Schmidt *et al.*, 1993). Els NT no són específics de l'AD i es poden observar en altres condicions, incloent el CDB (Ksiezak-Reding *et al.*, 1994), la MSA (Ince *et al.*, 2008), la PSP (Probst *et al.*, 1988), la PiD (Cochran *et al.*, 1994) i el complex de parkinsonisme-demència (PDC, *parkinsonism-dementia complex*) de Guam (Wakayama *et al.*, 1993). La seva distribució neuroanatómica és diferent en aquests altres trastorns (Wakayama *et al.*, 1993).

### 2.3.3. Cossos de Pick

Els cossos de Pick o PB són lesions característiques de la PiD, una tauopatia caracteritzada per demència progressiva i deteriorament de la personalitat amb signes d'inhibició frontal (Rossor *et al.*, 2001). Aquestes inclusions es caracteritzen per ser cossos citoplasmàtics intraneuronals i argirofílics situats habitualment en el còrtex límbic i paralímbic i en el lòbul temporal ventral (Figura 19 D). Els PB són normalment abundants a les neurones granulars de la fàscia dentada i a les neurones piramidals de l'hipocamp (Lowe *et al.*, 2008). Es poden detectar també en algunes zones de la matèria grisa, com els ganglis basals, l'hipotàlem, la matèria grisa periaqueductal, la substància grisa i el *locus ceruleus* (Lowe *et al.*, 2008).

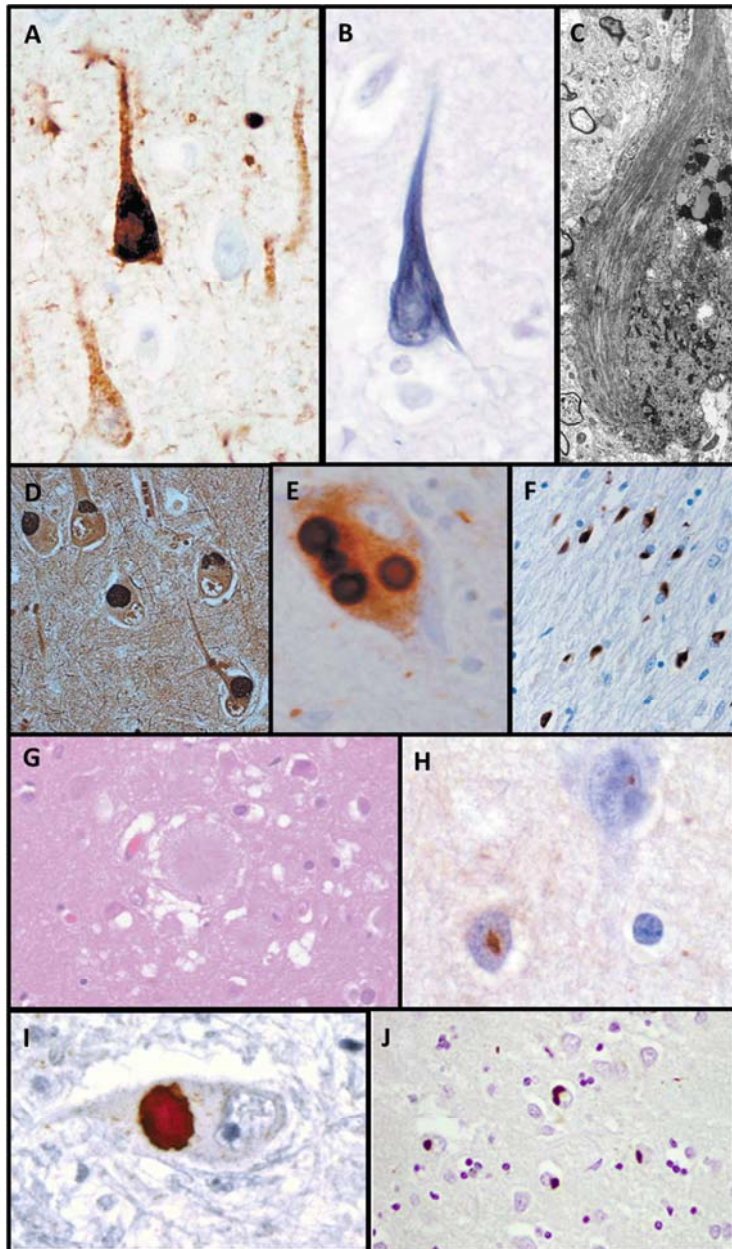
El component majoritari dels PB és la proteïna tau, concretament la forma amb 3R, que s'expressa en major proporció (De Silva *et al.*, 2003). A més a més, s'ha pogut detectar també la presència d'ubiquitina (Love *et al.*, 1988; Lowe *et al.*, 2008), cromogranina A i sinaptofisina (Weiler *et al.*, 1990; Yasuhara *et al.*, 1994).

### 2.3.4. Grànuls argirofílics

Els grànuls argirofílics van ser descrits per Braak i Braak (1987) en un pacient amb demència, però s'ha pogut observar posteriorment que es poden trobar en individus d'edat avançada, presentin o no demència (Ding *et al.*, 2006; Jicha *et al.*, 2006; Tolnay *et al.*, 1997). Les lesions de l'AGD són estructures argirofíliques que es tenyeixen especialment amb la impregnació de plata de Gallyas, formades per proteïna tau, i presents en les dendrites apicals de les neurones piramidals (Figura 19 D) (Tolnay *et al.*, 1998). Tenen forma de coma i contenen tau hiperfosforilada, principalment tau amb 4R (Togo *et al.*, 2002). A més a més, el marcatge amb anticossos dirigits contra la proteïna d'unió a ubiquitina p62 també permeten observar les lesions (Lowe *et al.*, 2008). Els grànuls se situen principalment al lòbul temporal anteromedial (Braak i Braak, 1998), però la neuropatologia de l'AGD és present també en alguns nuclis de l'hipotàlem i en el nucli *accumbens* (Lowe *et al.*, 2008).

### 2.3.5. Cossos de Lewy

Els cossos de Lewy o LB són inclusions hialíniques concèntriques de 8-30  $\mu\text{m}$  de diàmetre, amb una forma més o menys esfèrica i un nucli eosinòfil central dens envoltat d'un halus més pàl·lid (Figura 19 E) (Ince *et al.*, 2008). Una alteració neuronal relacionada són els cossos pàl·lids, que comparteixen reactivitat immunològica amb els LB (Dale *et al.*, 1992) però tenen una circumscripció més pobre. Ocasionalment alguns estudis s'han referit als cossos pàl·lids com a pre-LB, ja que s'ha suggerit que podrien ser les seves estructures precursors (Forno, 1996), a causa de la seva aparença.



**Figura 19. Tincions de diversos tipus de dipòsits cerebrals.** A) Cabdells neurofibril·lars (NFT) i filaments helicoidals aparellats (PHF) tenyits amb anticossos anti-tau; B) Tinció de Gallyas d'un NFT; C) Ultraestructura d'un NFT; D) grànuls argirofílics tenyits amb anti-tau; E) cossos de Lewy detectats amb anticossos anti-sinucleïna; F) Inclusions gials citoplasmàtiques; G) Placa de Kuru tenyida amb hematoxilina-eosina; H) Inclusions de huntingtina; I) Inclusió de TDP43 en un malalt d'esclerosi lateral amiotròfica; J) Inclusions FUS en un cas de demència lobar frontotemporal. A-H extretes de Lowe *et al.* (2008) i I i J extreta de Mackenzie *et al.* (2010).

Els LB se situen en el citoplasma neuronal, on s'hi poden observar diverses inclusions. Tot i que els LB clàssics van ser descrits originalment en neurones colinèrgiques i monoaminèrgiques del tronc cerebral, diencèfal i còrtex basal de malalts de PD, s'han

pogut observar també en neurones del còrtex, anomenats per tant LB corticals (Forno, 1996; Giasson *et al.*, 2001; Pollanen *et al.*, 1993). El principal constituent dels LB és l' $\alpha$ -sinucleïna (apartat 2.1.3) (Spillantini *et al.*, 1998; Wakabayashi *et al.*, 1997) i d'altres constituents inclouen les subunitats fosforilades de neurofilaments (Hill *et al.*, 1991), la ubiquitina (Love *et al.*, 1988), alguns epítops de proteïnes del complement (Yamada *et al.*, 1992), la proteïnasa multicatalítica (Masaki *et al.*, 1994), la cinasa dependent de ciclina 5 (Brion i Couck, 1995), i d'altres proteïnes diverses (Pollanen *et al.*, 1993).

Els LB corticals se situen en neurones petites o mitjanes en capes corticals del còrtex límbic, especialment en el gir cingulat i parahipocampal (Wakabayashi *et al.*, 1997), però també poden estar situats en processos neuronals del tronc cerebral i el còrtex basal, el nucli dorsal motor del vague i el nucli basal de Meynert (Lowe *et al.*, 2008).

Tot i que els LB es troben en densitats elevades en un gran nombre de malalties neurodegeneratives, com ara la PD, DLB i altres sinucleïnopaties, també es poden trobar de forma poc freqüent a la substància nigra i el *locus coeruleus* d'ancians neurològicament normals (Timiras i Maletta, 2007).

#### 2.3.6. Inclusions glials i neuronals citoplasmàtiques

Les **inclusions glials citoplasmàtiques** (GCI, *glial cytoplasmic inclusions*) de la MSA són els dipòsits més importants d'aquesta malaltia (Kato *et al.*, 1990; Nakazato *et al.*, 1990; Papp *et al.*, 1989, 1992) i es poden detectar gràcies a tincions de plata, com la tinció de Bodian, Gallyas o Bielchowsky. Les tincions immunohistoquímiques amb anticossos dirigits en contra de la ubiquitina i l' $\alpha$ -sinucleïna també permeten observar aquests dipòsits i la tinció d'HE mostra les GCI lleugerament basòfiles. Aquestes inclusions presenten una morfologia en forma de flama o falciformes, aparentment semblants als NFT (Figura 19 F) (Arima *et al.*, 1992, 1998; Dickson *et al.*, 1999a, 1999b).

Les **inclusions neuronals citoplasmàtiques** (NCI, *neuronal cytoplasmic inclusions*) es troben normalment a la base del pont i als nuclis olivars inferiors (Kato *et al.*, 1990; Nishie *et al.*, 2004; Yokoyama *et al.*, 2001). Són estructures argirofíliques, rodones i filamentoses presents en els cossos neuronals i immunoreactives per a l' $\alpha$ -sinucleïna. Es tenyeixen invariablement amb anticossos anti-ubiquitina i anti-neurofilaments. Ultraestructuralment, els NCIs presenten una xarxa de filaments semblant als GCI (Arima *et al.*, 1992; Kato *et al.*, 1990; Papp *et al.*, 1989; Yokoyama *et al.*, 2001).

#### 2.3.7. Inclusions intranuclears neuronals

Les **inclusions intranuclears neuronals** (NII, *nuclear intraneuronal inclusions*) són la característica histopatològica més destacada de la malaltia de les NII. Aquestes inclusions es troben presents al sistema nerviós central, i als sistemes nerviosos perifèric i autònom dels malalts afectats (Haltia *et al.*, 1984). Les estructures observades són punxegudes i eosinofíliques, i la seva mida és entre 2-6  $\mu$ m (Funata

*et al.*, 1990; Garen *et al.*, 1986; Haltia *et al.*, 1984). Les neurones viscerals i perifèriques també desenvolupen NII, com les dels ganglis de l'arrel dorsal i del plexe mesentèric, i les cèl·lules parenquimals de la medul·la adrenal (Funata *et al.*, 1990; McFadden *et al.*, 2005; Patel *et al.*, 1985; Tateishi *et al.*, 1984). Cèl·lules com els cardiomiòcits o els hepatòcits poden presentar també NII (McGeer *et al.*, 1988; Oyer *et al.*, 1991; Sloane *et al.*, 1994). Les tincions amb anticossos dirigits contra de la ubiquitina són positives, a més a més d'altres tincions contra components de l'UPS i contra l'hsp40. Les NII són immunoreactives per l'anticòs 1C2, que reconeix les expansions de glutamina (Pountney *et al.*, 2003; Takashi *et al.*, 2000, 2001), per les ataxines-1,-2 i -3 (Lieberman *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2001) i per a SUMO-1 (Marx, 2005; McFadden *et al.*, 2005; Pountney *et al.*, 2003, 2005), i es tenyeixen amb tioflavina S (Lieberman *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 2000).

### 2.3.8. Plaques de proteïna priònica

La formació de dipòsits de proteïnes amb estructura amiloide en malalties priòniques humanes no és una troballa neuropatològica freqüent i es produeix només en determinats subgrups de malalties com el CJD iatrogènic, esporàdic i variant i en el GSS. Les plaques contenen grans agregats fibril·lars de PrP<sup>Sc</sup> juntament amb d'altres components, com l'apolipoproteïna J i la proteïna P amiloide, que no són específics de les malalties priòniques. El primer tipus de placa identificada en una malaltia priònica humana va ser la placa fibril·lar arrodonida que es va trobar al kuru, particularment en el cerebel. El terme "**placa de kuru**" s'utilitza, doncs, per descriure les estructures similars que esdevenen en altres condicions, incloent certs subtipus de CJD esporàdica (Figura 19 G). S'ha descrit, a més a més, una àmplia gamma d'altres morfologies de placa en les malalties priòniques humanes, incloent **plaques multicèntriques**, que són característiques de la GSS. La forma de la placa identificada més recentment en una malaltia priònica humana és la **placa florida**, que ha resultat ser un component important i sorprenent de la neuropatologia de la variant de CJ (Ironsides *et al.*, 2002). Les plaques florides s'han identificat en petites quantitats en zones restringides del cervell d'altres malalties priòniques, incloent un subconjunt de casos de CJD iatrogènic en els receptors de la duramàter. La deposició d'AβPP pot tenir lloc, per exemple, al voltant de les plaques formades per PrP<sup>Sc</sup> en malalties priòniques humanes, freqüentment al voltant o a l'interior de processos neurítics (Bugiani *et al.*, 1993).

### 2.3.9. Inclusions de huntingtina

Les inclusions intranuclears neuronals de huntingtina agregada són una característica histopatològica útil per al diagnòstic de l'HD. La seva detecció es pot realitzar a partir d'anticossos anti-huntingtina, especialment aquells que van dirigits a la regió N-terminal, anti-ubiquitina, o anti-fragments de poliglutamina (Figura 19 H). No totes les inclusions, però, són positives per a ubiquitina. La presència d'aquests dipòsits és

notable en el còrtex cerebral i l'hipocamp, i amb menys extensió, al neocòrtex, l'amígdala i els nuclis dentat i vermell (Gourfinkel-An *et al.*, 1997; Sapp *et al.*, 1997).

#### 2.3.10. Dipòsits d'ubiquitina, de TDP43 i FUS

Durant l'envelliment normal, alguns axons del sistema nerviós central tendeixen a patir canvis distròfics desenvolupant protuberàncies argirofíliques locals, on s'acumulen lisosomes, mitocondris, cossos membranosos i neurofilaments. Els anticossos dirigits contra la ubiquitina reaccionen de forma positiva amb els axons distròfics, i també amb d'altres estructures puntiformes a la substància blanca i el còrtex cerebral de persones envellides (Dickson, 1999). Els cossos ubiquitinats corresponen a neurites distròfiques (Dickson, 1999; Dickson *et al.*, 1992; Migheli *et al.*, 1993; Yasuhara *et al.*, 1994) i focus de degeneració granular en beines de mielina de la substància blanca (Dickson, 1999; Dickson *et al.*, 1992; Migheli *et al.*, 1993). Les tincions de microscòpia immunoelectrònica revelen que hi ha focus de degeneració mielínica localitzats també en cèl·lules gials, en expansions de lamel·les mielíniques i en oligodendròcits (Lowe *et al.*, 2008). Algunes de les localitzacions més habituals són els nuclis gràcil i cuneat, la substància nigra, el globus pàl·lid i les banyes anteriors de la medul·la espinal. La densitat d'aquestes estructures puntiformes augmenta amb l'edat i són especialment prominents a partir dels 60 anys (Dickson, 1999). Tot i que la degeneració granular és una conseqüència inevitable de l'edat en animals i humans, la significància biològica d'aquests dipòsits roman desconeguda (Lowe *et al.*, 2008).

Anteriorment, la ubiquitina també tenia utilitat diagnòstica en l'ALS i la FTLD amb presència d'inclusions positives per al marcatge immunohistoquímic d'aquesta proteïna. Així doncs, bona part dels casos de FTLD en els quals es podien observar inclusions negatives per a tau tenien la presència de la proteïna ubiquitina. I de la mateixa manera, una majoria de casos d'ALS que no presentaven inclusions positives per a superòxid dismutasa 1 (SOD1, *superoxide dismutase 1*) contenien la proteïna ubiquitina. Recentment, el descobriment de les proteïnes TDP43 (apartat 2.1.6) i FUS (apartat 2.1.7) ha permès establir una nova classificació molecular per al diagnòstic d'aquestes malalties (Mackenzie *et al.*, 2010). Així, la majoria de casos corresponents a FTLD-U es va confirmar que contenien la proteïna TDP43 (Arai *et al.*, 2006; Neumann *et al.*, 2006), renombrant-se doncs FTLD-TDP (Mackenzie *et al.*, 2010b), i bona part dels casos SOD1-negatius van ser identificats com a ALS-TDP (Mackenzie *et al.*, 2007; Neumann *et al.*, 2006). La detecció de mutacions del cromosoma 16 en alguns casos familiars d'ALS va permetre la identificació d'alteracions en la proteïna FUS, constituint l'ALS-FUS, de tipus TDP43-negatiu i SOD1-negatiu (Kwiatkowski *et al.*, 2009; Vance *et al.*, 2009). De la mateixa manera, la majoria dels casos de FTLD identificats com a subtipus TDP43 negatiu i tau-negatiu van ser tipificats com a FTLD-FUS (Mackenzie *et al.*, 2010).

Els anticossos dirigits contra la TDP43 s'uneixen de forma consistent a les inclusions de



FTLD-TDP i ALS-TDP, però no s'observa marcatge en les incusions d'ubiquitina d'altres malalties neurodegeneratives (Arai *et al.*, 2006; Cairns *et al.*, 2007; Davidson *et al.*, 2007). Algunes patologies que presenten incusions negatives per a ubiquitina són reconegudes també pels anticossos TDP43, com les GCI (Neumann *et al.*, 2007), neurones amb tinció granular citoplasmàtica o preincusions (Brandmeir *et al.*, 2008) i neurites en la regió del CA1 (Hatanpaa *et al.*, 2008). La patologia de FTLD-TDP es subdivideix en quatre morfologies diferents: NCI compactes i neurites curtes; neurites llargues; incusions citoplasmàtiques granulats i compactes i nombroses NII (Figura 19 I) (Mackenzie *et al.*, 2010). La tinció nuclear és absent en les cèl·lules que contenen les incusions (Neumann *et al.*, 2009).

En els casos d'ALS-FUS familiar que presenten la mutació Arg521Cys, s'observen NCI immunoreactives amb morfologia filamentosa o granular, a més a més de GCI (Figura 19 I) (Mackenzie *et al.*, 2010). La localització d'aquestes incusions se centra principalment en les neurones motores inferiors, però també es pot trobar en regions externes al sistema motor piramidal, com el nucli motor del tronc cerebral, l'estriat, el tàlem i la substància nigra (Mackenzie *et al.*, 2010).

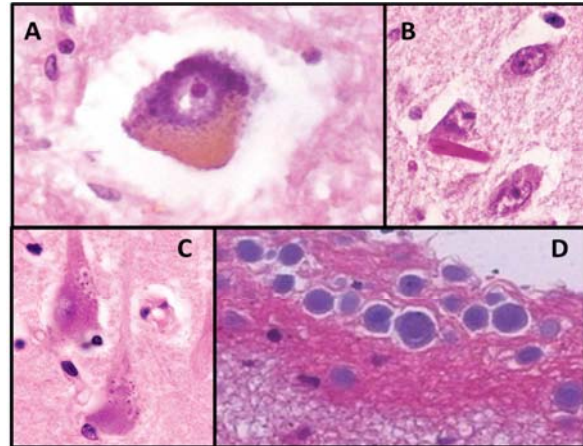
En les FTLD-FUS es poden distingir fins a tres entitats patològiques a partir de la morfologia de les incusions. En la FTLD-U atípica es poden observar incusions citoplasmàtiques immunoreactives per a FUS a l'hipocamp i al còrtex frontal especialment, però també a l'estriat, tàlem i tronc cerebral dels pacients afectats (Mackenzie *et al.*, 2008; Neumann *et al.*, 2009; Roeber *et al.*, 2008; Seelaar *et al.*, 2010). Les incusions intranuclears estan formades per filaments vermiformes, corbats o rectes, o també en forma d'estructura anular a la perifèria de l'hipocamp (Figura 19 J) (Neumann *et al.*, 2009). En segon lloc, en la malaltia dels cossos inclusius basofílics, que s'inclou com a entitat patològica dins les FTLD, es poden observar nombroses incusions citoplasmàtiques immunoreactives per a FUS amb una morfologia variable localitzades a les neurones i la glia del còrtex frontal, ganglis basals, tronc cerebral, cerebel i medul·la espinal (Mackenzie *et al.*, 2010). En aquesta patologia, les incusions intranuclears són normalment absents (Muñoz *et al.*, 2009). Finalment, la malaltia de les incusions neuronals de filaments intermedis presenta bona part de les incusions descrites només per a la proteïna FUS, a més a més d'estar associada en ocasions a proteïnes dels filaments intermedis com ara l' $\alpha$ -internexina (Neumann *et al.*, 2009b).

#### 2.3.11. Dipòsits de lipofuscina

La lipofuscina és un pigment produït per l'oxidació dels lípids i les lipoproteïnes que s'acumula en forma de grànuls amb l'augment de l'edat. Aquest producte de la peroxidació lipídica és creu que s'acumula en cossos residuals derivats del sistema lisosomal, com a resultat d'un procés d'autofàgia cel·lular. Els grànuls de lipofuscina presenten formes irregulars, i es tenyeixen de color marró clar a groc amb les preparacions habituals d'HE (Figura 20 A) (Lowe *et al.*, 2008). A més a més, es poden

observar amb claredat en les tincions “acid-fast” o del *Periodic-Acid Schiff* (PAS), i són sudanofílics i autofluorescents sota llum ultraviolada (Love, 2006). Estudis de microscòpia electrònica mostren que els grànuls contenen material electrodens i homogeni i una moderada quantitat de material electrotranslúcid, envoltat tot d’una sola membrana. També se sap que aquests grànuls se situen escampats pel citoplasma o en forma de clúster al voltant del nucli (Lowe *et al.*, 2008).

La lipofuscina s’acumula de forma variable en neurones i glia en funció de la regió cerebral (Markesbery *et al.*, 1993). Les neurones dels nuclis olivars inferiors tendeixen a acumular una gran quantitat de lipofuscina en els primers estadis de l’edat adulta. Amb l’augment de l’edat, la lipofuscina també s’acumula en el nucli dentat del cerebel, les neurones piramidals del còrtex cerebral i l’hipocamp (Brody, 1960), les neurones de l’amígdala, al tàlem i l’hipotàlem, i les neurones motores de la medulla espinal i el tronc cerebral (Love, 2006). Aquestes acumulacions de lipofuscina també es poden observar en d’altres cèl·lules que no formen part del sistema nerviós, com cèl·lules cardíques, macròfags o cèl·lules intersticials (Timiras i Maletta, 2007).



**Figura 20. Tincions d'hematoxilina-eosina realitzades en diversos tipus de dipòsits cerebrals presents en l'envelliment.** A) Lipofuscina; B) Cossos de Hirano; C) Cossos granulovacuolars; D) *Corpora amilacea*. A-C extretes de Lowe *et al.* (2008), D correspon a

No està clara la funcionalitat de la lipofuscina, ni tampoc si interfereix en les funcions intracel·lulars. En qualsevol cas, les neurones afectades per l’acumulació abundant de la lipofuscina no coincideixen amb la pèrdua neuronal associada a l’edat (Lowe *et al.*, 2008). No s’ha observat un augment de la lipofuscina en el cervell de persones d’edat avançada afectades per l’AD, el DS, la progèria i d’altres malalties degeneratives en comparació amb persones de la mateixa edat que no pateixen aquestes malalties (Timiras i Maletta, 2007).

### 2.3.12. Cossos de Hirano

Els cossos de Hirano són inclusions citoplasmàtiques eosinofíliques refractants, amb forma arrodonida i oval, i ocasionalment, fusiforme. Van ser descrits per primera vegada a l’hipocamp de pacients de PDC de Guam (Hirano *et al.*, 1968). La seva observació per microscòpia electrònica mostra estructures intracel·lulars en processos neuronals amb una estructura cristal·loide fina i característica semblant a una espiga (Figura 20 B). Aquests cossos es troben de forma més nombrosa a la regió del CA1 de

l'hipocamp, principalment a la capa *stratum lacunosum*, però també poden trobar-se a d'altres zones del sistema nerviós central, i ocasionalment es poden observar a les cèl·lules de Schwann dels sistema nerviós perifèric (Atsumi *et al.*, 1980). La seva presència és habitual en persones d'edat avançada (Gibson i Tomlinson, 1977) o en adults de mitjana edat (Ogata *et al.*, 1972). Algunes situacions que provoquen una expressió freqüent d'aquests cossos són l'AD o la PiD (Hirano, 1994), a més a més de l'alcoholisme crònic (Laas and Hagel, 1994).

#### 2.3.13. Cossos granulovacuolars

La degeneració granulovacuolar consisteix en una o més vacuoles d'entre 3 i 5 µm de diàmetre on s'hi acumulen cossos densos, petits i arrodonits en el citoplasma neuronal que poden coexistir amb els NFT o els cossos de Hirano (Figura 20 C) (Lowe *et al.*, 2008; Simchowicz, 1911). Ultraestructuralment, es poden observar incusions unides a membrana i nuclis granulars electrodensos amb una matriu translúcida (Hirano *et al.*, 1968). La tinció amb HE en permet l'observació i són, a més a més, grànuls argirofílics (Lowe *et al.*, 2008). Aquests cossos estan ubiquitinats (Dickson *et al.*, 1993; Love *et al.*, 1988) i reaccionen amb anticossos d'alguns epítops de la proteïna tau (Dickson *et al.*, 1993). Aquestes dades donen lloc a la interpretació d'estructures autofàgiques lisosomals on es produeix la degradació parcial de proteïnes citoesquelètiques (Lowe *et al.*, 2008).

En el cas de l'AD, la degeneració granulovacuolar es presenta tardanament però augmenta de forma pronunciada (Peress *et al.*, 1973; Xu *et al.*, 1992). Les neurones de la regió CA1 estan severament afectades i, en menor grau, les neurones del prosubiculum, el CA2, CA3 i CA4 (Xu *et al.*, 1992). En l'envelliment normal la degeneració vacuolar es troba confinada a l'hipocamp (Ball i Lo, 1977; Ball i Vis, 1978; Xu *et al.*, 1992). Aquest fenomen és més sever en els pacients d'AD i pot implicar a d'altres neurones en nuclis subcorticals i l'hipocamp (Xu *et al.*, 1992). Aquestes estructures també s'han pogut observar en el DS (Ball i Nuttal, 1981), PCD de Guam (Hirano *et al.*, 1968), la PSP (Steele *et al.*, 1964) i la PiD (Hirano *et al.*, 1968).

#### 2.3.14. *Corpora amilacea*

Els *corpora amilacea* (CoA) són estructures esfèriques, entre basòfiles i eosinòfiles i d'una mida d'entre 2-20 µm de diàmetre aproximadament (Cavanagh, 1999). Normalment s'hi observen patrons de làmines concèntriques i el centre sol presentar un marcatge més dens que la perifèria (Figura 20 D). La seva superfície té una aparença llisa i regular, però ocasionalment poden presentar una perifèria rugosa. S'han identificat tant a l'interior d'astròcits com en cèl·lules neuronals (Ramsey, 1965; Woodford i Tso, 1980).

Els CoA es troben dins de processos astrocítics al voltant dels vasos sanguinis i en els espais subependimals (Munch *et al.*, 1998), en neurites terminals o axons del còrtex, i també a l'estriat i la matèria grisa de la banya espinal anterior (Averback, 1981; Lehesjoki *et al.*, 1991; Agari i Nakamura, 1975). La seva presència és habitual en totes les àrees del cervell d'individus d'edat avançada, però la distribució no és uniforme (Lowe *et al.*, 2008).

La tinció de CoA és especialment positiva amb el PAS, la qual cosa reflecteix el seu elevat contingut en poliglucosans (Lowe *et al.*, 2008). També es tenyeixen fortament amb el Carmí de Best, i el mètode de plata i metenamina de Gomori, i presenta una reacció positiva amb el reactiu de potassi-nitrat ferricianida que detecta els grups fosfats (Roukema i Odorkerk, 1970; Sakai *et al.*, 1969; Stam i Roukema, 1973; Steele i Kinley, 1952).

## **2.4. Principals malalties neurodegeneratives que presenten lesions cerebrals**

### 2.4.1. Malaltia d'Alzheimer

L'AD és una demència d'inici tardà, amb pèrdua progressiva de la memòria, de l'execució de tasques, la parla i el reconeixement de persones i objectes. La degeneració de les neurones, especialment en el zona basal anterior i l'hipocamp, i la patologia sinàptica i neuronal de l'alteració de les connexions (Hardy i Selkoe, 2002; Selkoe, 2002) són elements importants per a la patogènesi de la malaltia. L'AD implica dos tipus principals d'agregats de proteïnes: els agregats extracel·lulars d'A $\beta$  o plaques neurítiques (apartat 2.3.1) i els agregats intracel·lulars de la proteïna tau o NFT (apartat 2.3.2). La patogènesi de l'AD s'ha anat coneixent en gran mesura per la identificació de mutacions genètiques responsables de formes familiars o rares de la malaltia. Aquestes mutacions tenen lloc en el gen de l'A $\beta$ PP i també en els gens de les presenilines, enzims involucrats en el trencament de l'A $\beta$ PP (Citron, 2002; Esler i Wolfe, 2001).

### 2.4.2. Degeneració lobar frontotemporal i taupaties

Les FTLD és el terme clínic utilitzat per a descriure un conjunt de malalties neurodegeneratives heterogènies que tenen en comú unes característiques clíniques i patològiques on hi ha una implicació principal dels lòbuls temporals i frontals i la matèria grisa subcortical, exceptuant l'AD (Lowe *et al.*, 2008). Donat el desconeixement que hi ha sobre les relacions entre aquestes patologies i les seves característiques clíniques, la seva classificació encara està poc definida (Neary *et al.*, 2005), com demostra la recent classificació de l'ALS i la FTLD associada a inclusions d'ubiquitina (Mackenzie *et al.*, 2010). Així doncs, en aquest grup es troben malalties com la FTDP-TDP43 o FUS i les taupaties, entre les quals hi ha la PSP, la CBD, l'AGD, la FTDP-17t o la PiD. Els síndromes clínics principals associats a la FTLD són els canvis de

conducta personal i social, així com la pèrdua del control del comportament, l'afàsia progressiva o la demència semàntica. A més a més, es poden presentar desordres del moviment, com parkinsonisme. Els signes histopatològics principals són les inclusions de TDP43 o de FUS (apartat 2.3.10), generalment associades a ubiquitina; o en a les taupaties, la presència d'inclusions de la proteïna tau a les neurones o a la glia (apartat 2.3.2-2.3.4 i 2.3.6) (Lowe *et al.*, 2008).

#### 2.4.3. Malaltia de Parkinson

La PD es caracteritza per la tremolor en repòs, la rigidesa, la lentitud de moviments i altres característiques com ara inestabilitat postural. Aquesta malaltia és causada per la degeneració de les neurones dopaminèrgiques en la substància nigra del mesencèfal i altres neurones monoaminèrgiques del tronc cerebral (Forno, 1996). El descobriment de les mutacions de diversos gens en el quals es causen les formes primerenques de la PD ha accelerat enormement el coneixement de la malaltia (Dawson i Dawson, 2003). Les mutacions puntuals o l'augment de la dosi del gen de l' $\alpha$ -sinucleïna causa la PD autosòmica dominant a través d'un mecanisme de guany de funció. La PD recessiva d'aparició primerenca pot ser causada per mutacions en els gens que codifiquen per la parkina, la DJ-1 o la PINK132 (Valente *et al.*, 2004), presumiblement per un mecanisme de pèrdua de funció (Ross i Poirier, 2004). La característica patològica d'inici del PD adult són els LB, una inclusió perinuclear que es troba al citoplasma de les neurones principalment de la substància nigra (apartat 2.3.5). També hi ha agregats en les neurites, que es coneixen com a neurites de Lewy. Un constituent important dels LB és la proteïna  $\alpha$ -sinucleïna agregada (apartat 2.1.3).

#### 2.4.4. Esclerosi lateral amiotròfica

L'ALS és una malaltia mortal progressiva causada per la degeneració de les neurones motores inferiors en la banya lateral de la medul·la espinal i les neurones motores superiors de l'escorça cerebral, fet que resulta en debilitat motora progressiva (Cleveland i Rothstein, 2001). Algunes formes familiars rares d'aparició primerenca de la malaltia poden ser causades per mutacions al gen de la SOD1 però la patologia no sembla ser deguda a l'alteració de l'activitat d'aquest enzim. Els agregats d'ubiquitinats (apartat 2.3.10), que poden contenir les proteïnes TDP43 i FUS, són presents en els cervells dels pacients, tot i que SOD1 no es detecta generalment en casos esporàdics, i SOD1 no sol formar estructures fibril·lars *in vitro* (Ross i Poirier, 2004).

#### 2.4.5. Malaltia priòniques

Les malalties neurodegeneratives causades per prions poden ser esporàdiques o poden ser adquirides ja sigui per transmissió ambiental o per mutacions genètiques (Prusiner, 2001). Algunes vies ambientals poden incloure la ingesta de partícules priòniques derivades de teixit cerebral infectat o la implantació quirúrgica a través

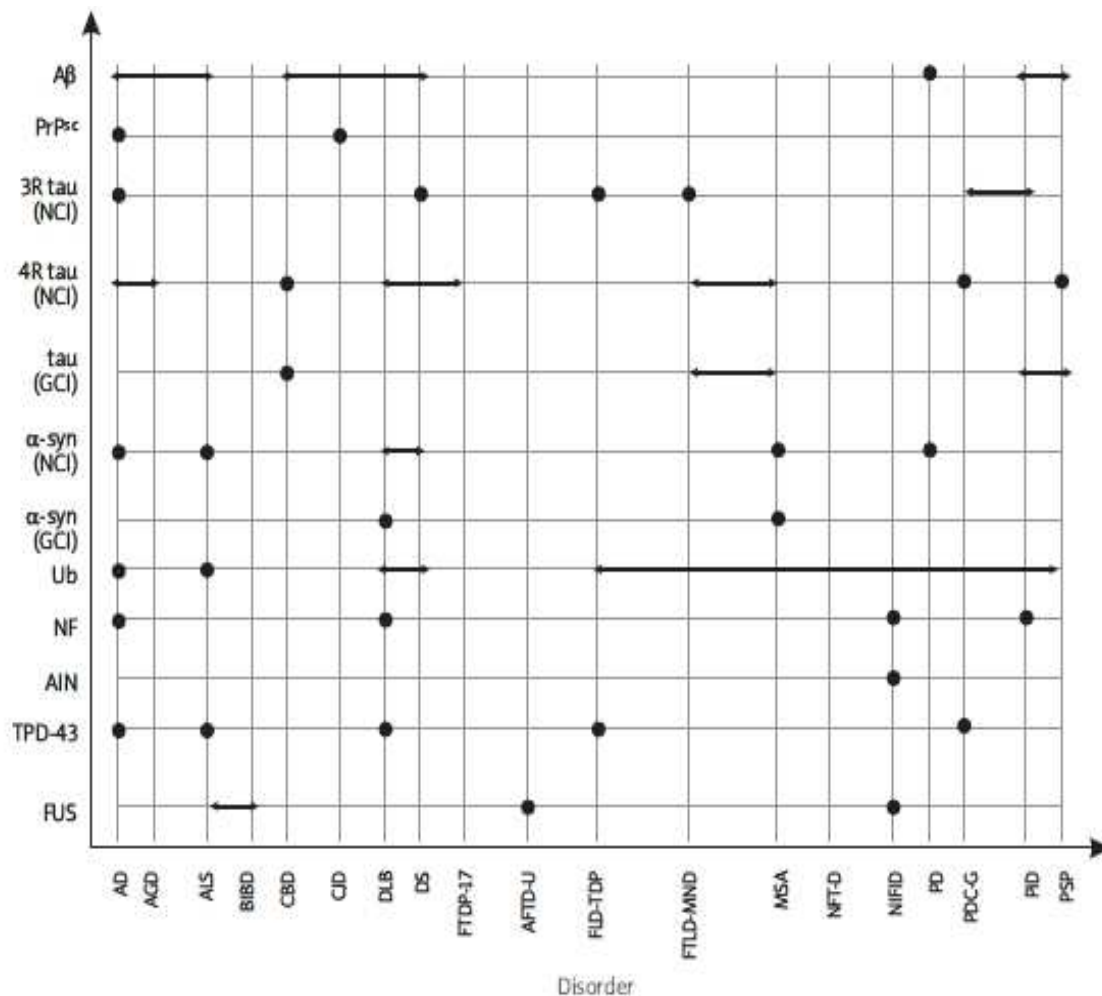
d'instruments infectats. La malaltia priònica també pot ser causada per mutacions puntuals en el gen *PRNP*, que codifica per la Prp (apartat 2.1.4) i hi produeix alteracions (Ross i Poirier, 2004). La patologia pot incloure plaques amiloides que semblen similars a les d'AD i que es poden marcar amb anticossos anti-Prp (apartat 2.3.8). La malaltia priònica és una malaltia conformacional típica de la proteïna ja que és causada per proteïnes priòniques plegades anormalment i aquesta agregació priònica pot tenir lloc tant extracel·lularment com intracel·lularment (Ma *et al.*, 2002, 2002b).

#### 2.4.6. Malaltia de Huntington i altres malalties poliglutamíniques

L'HD és un trastorn neurodegeneratiu progressiu causat per la mutació en el gen de la proteïna huntingtina (apartat 2.1.5), concretament en l'expansió de la repetició CAG que codifica per a les poliglutamines, a l'extrem N-terminal. Hi ha un efecte de llindar notable ja que a partir de l'expansió 36 de la poliglutamina de la proteïna huntingtina es produeix la malaltia. L'augment del nombre d'expansions de poliglutamina causa un inici més primerenc de la malaltia. Les inclusions que contenen huntingtina (apartat 2.3.9) es troben presents en regions del cervell que degeneren. No obstant això, la densitat d'inclusions en les neurones no correspon exactament a les neurones que degeneren, com és el cas del cos estriat, la zona majoritàriament afectada (Vonsattel *et al.*, 1985). També s'observa una bona correlació entre la longitud de la repetició de CAG i la densitat d'inclusions (Becher *et al.*, 1998; Gutekunst *et al.*, 1999; Kuemmerle *et al.*, 1999; Myers *et al.*, 1988; Vonsattel *et al.*, 1985).

### **2.5. El solapament o *continuum* de les lesions cerebrals en les malalties neurodegeneratives**

Tot i que hi ha uns criteris consensuats per al diagnòstic histopatològic de les malalties neurodegeneratives, s'ha detectat la coexistència de lesions pròpies de diverses malalties neuropatològiques en un sol pacient i heterogeneïtat en els diversos casos (Figura 21). Això suggereix un possible solapament entre alguns d'aquests trastorns (Armstrong, 2012; Feany *et al.*, 1996; Forstl, 1999; Hainfeller *et al.*, 1998), fet que desdibuixa les fronteres entre malalties i obre la possibilitat a reconsiderar les entitats nosològiques presents i l'actual classificació de les malalties neurodegeneratives (Drouet *et al.*, 2000; Forstl, 1998). Un exemple és la histopatologia de l'AD, observada de forma habitual en d'altres formes de demència (Friedland, 1993), o l'observació de canvis histopatològics suficients per al diagnòstic de l'AD en pacients no dementats amb un envelliment normal (Dickson *et al.*, 1992).



AGD – argyrophilic grain disease, AD – Alzheimer’s disease, ALS – amyotrophic lateral sclerosis, BIBD – basophilic inclusion body disease, CBD – corticobasal degeneration, CJD – Creutzfeldt-Jakob disease, DLB – dementia with Lewy bodies, DS – Down’s syndrome, FTDP-17 – fronto-temporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17, FTLD-MND – fronto-temporal lobar degeneration with motor neuron disease, AFTD-U – atypical fronto-temporal lobar degeneration with ubiquitin positive inclusions, FRLD-TDP – fronto-temporal lobar degeneration with TDP-43 proteinopathy, FTLD-MND – fronto-temporal lobar degeneration with motor neuron disease, MSA – multiple system atrophy, NFT-D – neurofibrillary tangle dementia, NIFID – neuronal intermediate filament inclusion disease, PDC-G – Parkinsonian dementia complex of Guam, PiD – Pick’s disease, PD – Parkinson’s disease, PSP – progressive supranuclear palsy.

**Figura 21. Distribució de les lesions patològiques més destacables en diferents malalties neurodegeneratives.** En aquest diagrama es pot observar la fidelitat de les lesions distintives a les respectives malalties en els cervells dels malalts (Armstrong, 2012).

### **3. LA SOCA DE RATOLINS SAMP8**

#### **3.1. Origen de la soca de ratolins SAM**

Els ratolins SAM deriven originàriament de la soca de ratolins AKR/J i van ser descrits per primer cop per Takeda *et al.* (1981). Inicialment, es va observar que els ratolins descendents del creuament consanguini d'aquests animals desenvolupaven signes propis de l'envelliment de forma prematura, com pèrdua d'activitat, pèrdua i manca de lluentor del pèl, lesions perioftàlmiques, un augment de la lordocifosi i mort prematura. Malgrat això, no es va evidenciar retard en el creixement, malformació, paràlisi de les extremitats o altres signes neurològics tals com tremolors o convulsions (Takeda *et al.*, 2013). L'any 1975 es van seleccionar alguns ratolins amb les característiques esmentades com a progenitors de les sèries propensos a la senescència (*prone*) o P, i alguns animals amb signes d'envelliment normal com a progenitors de les sèries resistents a la senescència o R (Takeda, 2009). Les soques originals d'animals P mostraven com a característica general comuna un envelliment accelerat, és a dir, un inici prematur de la senescència de forma irreversible després d'un període normal de desenvolupament (Hosokawa *et al.*, 1984).

L'any 1991, d'acord amb les normes internacionals de nomenclatura de soques de ratolins consanguinis, es van establir els termes SAMP (*senescence-accelerated mice prone*) i SAMR (*senescence-accelerated mice resistant*) per a les soques sensibles i resistents a la senescència accelerada respectivament. L'esperança de vida mitjana dels animals SAMP era de 9,7 mesos, un 40% més curta que la dels animals SAMR, de 16,3 mesos (Figura 22) (Takeda *et al.*, 1991, 1994, 2013).

A més a més de la senescència accelerada manifestada en totes aquestes soques, els ratolins SAMP i SAMR desenvolupen diversos fenotips patobiològics que són suficientment característics per diferenciar les soques entre elles. Per exemple a la soca SAMP8 s'observen dèficits de memòria i aprenentatge, alteracions emocionals i disfunció de la resposta immunitària.



**Figura 22. Imatge d'un ratolí SAMR1 (superior) i un ratolí SAMP1 (inferior) de 12 mesos d'edat.** Els ratolins de les soques SAMP presenten un envelliment accelerat (Takeda, 2013).

#### **3.2. El ratolí SAMP8 com a model d'envelliment**

Els ratolins SAM reuneixen els criteris proposats per als estudis biogerontològics amb models mamífers, com per exemple una esperança de vida curta i patologies associades a l'envelliment (Masoro, 1990). De fet, si es revisen les evidències



experimentals sobre la soca de ratolins SAMP8 es poden identificar, de forma general, les nou característiques cel·lulars principals de l'envelliment proposades per López-Otín *et al.* (2013) i descrites a l'apartat 1.3. Així doncs, a nivell genètic, s'ha observat inestabilitat genòmica a causa de la fallada dels mecanismes de reparació, com demostra l'increment dels trencaments d'una sola cadena de DNA a l'hipocamp i el còrtex cerebral dels ratolins SAMP8 de 12 mesos respecte els de 9 mesos d'edat (Tobita *et al.*, 1994). S'han detectat també fins a set modificacions post-translacionals d'histones en el cervell entre ratolins SAMP8 de 3 i 12 mesos d'edat (Wang *et al.*, 2010) i canvis epigenètics a l'hipocamp entre ratolins SAMP8 i SAMR1 de 8 mesos d'edat (Cosín-Tomas *et al.*, 2014), que confirmen alteracions epigenètiques en l'envelliment. L'escurçament dels telòmers en mamífers amb longevitat llarga, com els humans, i curta, com els rosegadors, es regula per mecanismes biològics diferents, que impedeixen la comparació d'aquests processos (Hornsby, 2002). Tot i així, Banks *et al.* (2010) han descrit un augment en l'activitat de l'enzim telomerasa en ratolins SAMP8 de 10 mesos administrats periòdicament amb un antagonista del receptor de GH respecte el grup control no administrat, a més a més d'observar millores cognitives, entre d'altres efectes. La pèrdua de la proteòstasi en els ratolins SAMP8 s'ha observat a través de fenòmens com l'augment de l'autofàgia, tal i com mostra la major presència de vacúols autofàgics en ratolins SAMP8 de 7 i 12 mesos, a més a més de les inclusions d'ubiquitina o canvis en l'expressió de LC3 II i beclina-1 (Ma *et al.*, 2011); o l'augment de l'oxidació de lípids i proteïnes, que s'explica amb més detall més endavant (apartat 3.4.8). L'aplicació de règims de CR en els ratolins SAMP8 ha augmentat la seva esperança de vida en un 30%, i s'han observat canvis metabòlics i neuroquímics (Choi i Kim, 2000; Kim i Choi, 2000). De la mateixa manera, l'administració de compostos que activen vies relacionades amb la CR, com és el cas del resveratrol, han millorat els dèficits cognitius i de l'aprenentatge en aquests animals (Komatsu *et al.*, 2008; Porquet *et al.*, 2013). Aquests fets suggereixen un efecte de la desregulació dels nutrients en els mecanismes de la senescència accelerada i les disfuncions cognitives d'aquests animals. Una altra característica de l'envelliment cel·lular en aquests rosegadors és la disfunció mitocondrial, observada de forma àmplia en els ratolins SAMP8 i que intervé en bona part com a factor causal dels alts nivells d'estrès oxidatiu presents a les edats primerenques (apartat 3.4.8). El ratolí SAMP8 també exhibeix signes de senescència cel·lular i comunicació intercel·lular alterada. En un estudi recent, Sousa-Victor *et al.* (2014) va descriure una pèrdua de quiescència de les cèl·lules mare musculars en els ratolins SAMP8 en comparació a SAMR1, i una aturada irreversible del cicle cel·lular a través de la via de p16<sup>INK4a</sup>, que en presència de factors de creixement afavoria la seva conversió a cèl·lules senescentes. L'estat de senescència cel·lular de les cèl·lules mare musculars té com a resultat la disminució de la seva capacitat regenerativa. De fet, l'esgotament prematur de les cèl·lules mare s'ha observat també en d'altres compartiments com els nínxols neurals dels ratolins SAMP8 (Díaz-Moreno *et al.*, 2013; Gang *et al.*, 2011), on la neurogènesi es

produeix amb anterioritat als ratolins SAMR1 i té una capacitat limitada en els ratolins SAMP8 d'edats avançades. Finalment, tot i que no hi ha estudis on s'aprofundeixi en l'alteració de la comunicació intercel·lular en els SAMP8, hi ha una àmplia evidència del fenomen d'*inflammaging*. Per exemple, s'ha descrit un augment significatiu d'IL-1 $\beta$  a l'hipocamp i hipotàlem, així com l'increment del factor de necrosi tumoral i l'IL-6 a l'hipocamp i còrtex en SAMP8 en comparació als ratolins SAMR1 (Tha *et al.*, 2000). Als SAMP8 també s'observa una activació de la micròglia (apartat 3.4.4) i un declivi prematur en la senyalització en l'eix hipotàlem-pituitària-ovàric (Yuan *et al.*, 2005).

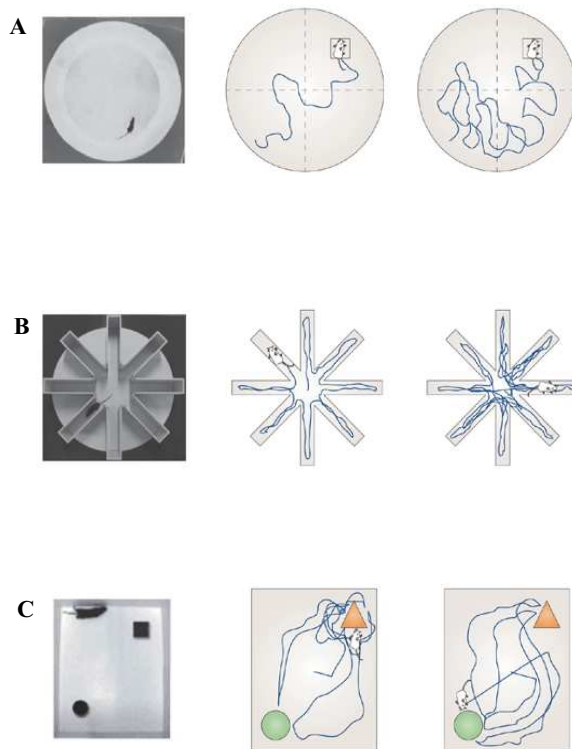
### **3.3. Disfuncions cognitives i del comportament associades a l'edat**

Els efectes deleteris de l'envelliment accelerat dels ratolins SAMP8 es manifesten entre d'altres en les capacitats cognitives i comportamentals d'aquests animals. Els dèficits de l'aprenentatge i la memòria, i els trastorns de tipus emocional s'observen de forma prematura en aquests animals respecte a la soca control SAMR1, com mostren els resultats dels diversos tests. Tot i així, és interessant observar que la soca SAMR1 mostra també les mateixes deficiències a edats més avançades, fet que confirma que les alteracions comportamentals observades deriven principalment de l'envelliment accelerat dels ratolins SAMP8 (Miyamoto, 2013). Les alteracions funcionals detectades en les neurones glutamatèrgiques (Fujiwara *et al.*, 2004; Kitamura *et al.*, 1992), noradrenèrgiques (Tanaka *et al.*, 1982) i colinèrgiques (Kitamura *et al.*, 1989; Strong *et al.*, 2003) podrien ser un dels factors causals rellevants en els desordres esmentats a continuació (Miyamoto, 2013).

#### 3.3.1. Aprenentatge i memòria

Les capacitats d'aprenentatge i memòria en els ratolins SAMP8 s'han avaluat amb diversos tests que estudien la seva associació a regions específiques del cervell. Així doncs, els tests d'aprenentatge espacial i memòria, com ara el test del laberint aquàtic de Morris, el laberint aquàtic de braços radials, el laberint aquàtic en forma de T o el laberint dels braços radials (Figura 23), mesuren la memòria responsable d'emmagatzemar informació relativa a l'entorn i l'orientació espacial, que depèn de la funció hipocampal (Cheng *et al.*, 2014; Maguire *et al.*, 2003). Alguns d'aquests estudis experimentals, com el laberint de Morris i el laberint en T de múltiples tasques mostren dèficits d'aquestes capacitats en els ratolins SAMP8 (Chen *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2008; Flood *et al.*, 1998; Ikegami *et al.*, 1992; Miyamoto *et al.*, 1986, 1992; Takeda *et al.*, 1991). Tot i així, les diferències entre les distàncies recorregudes per les soques SAMP8 i SAMR1 en el laberint aquàtic de Morris no són tant destacades com les obtingudes en d'altres tests, malgrat que el SAMP8 presenta un allargament del temps de latència per a trobar la plataforma en ambdues tasques. Una explicació raonable parteix de la manca d'apreciació de l'aigua com a una situació aversiva i la manca de motivació per a escapar-ne (Miyamoto *et al.*, 1997, 1998). A més a més, en les tasques espacials per a la cerca de menjar, els ratolins SAMP8 cometen un major

nombre d'errors de memòria i de treball en comparació als ratolins control SAMR1 (Miyamoto *et al.*, 1997).



**Figura 23. Esquema de tests utilitzats per avaluar la memòria en rosegadors.** A l'esquerra es mostra una imatge de la instal·lació utilitzada per al test. Al centre i a la dreta es mostren exemples d'un ratolí amb bones capacitats de memòria i aprenentatge, o amb deficiències, respectivament (adaptat de Götz i Ittner, 2008). A) En el test del laberint aquàtic de Morris s'entrena el ratolí per assolir una plataforma i poder escapar de l'aigua. Es mesura la memòria i l'aprenentatge espaials, i la retenció de la informació apresada. B) En el laberint de braços radials se situa menjar o beguda en un dels braços i s'avalua la capacitat del ratolí de trobar-ho. S'observa la memòria espacial, la memòria de referència a llarg termini i la memòria de treball a curt termini. C) El test de reconeixement d'objectes permet l'avaluació de la memòria declarativa dependent del còrtex. L'avaluació es fa a través de la mesura del temps d'exploració de l'objecte nou respecte el total (Cheng *et al.*, 2014).

Els **tests de la capacitat de resposta a l'evitació** es basen en les preferències dels animals a evitar activament o passiva un estímul desagradable o, fins i tot, dolorós. En general, els ratolins SAMP8 mostren deficiències en l'adquisició i la retenció de la resposta en els diversos estudis realitzats amb tests d'evitació passiva ja des dels 2 mesos d'edat (Miyamoto *et al.*, 1986; Yagi *et al.*, 1988), així com també en els resultats dels diversos tests d'evitació activa en comparació als resultats obtinguts pels ratolins SAMR1 (Flood *et al.*, 1993; Miyamoto *et al.*, 1986, 1997; Ohta *et al.*, 1989).

El **test de reconeixement d'objectes** permet l'avaluació de la memòria sense agents estressors que puguin influir en els resultats (Figura 23) (Cheng *et al.*, 2014). A més a més, permet l'avaluació de la memòria declarativa dependent del còrtex, contràriament a d'altres tests on es realitzen tasques de reconeixement no espaials (Winters *et al.*, 2008). En el ratolí SAMP8 s'ha descrit una disminució significativa del temps d'exploració dels objectes nous per part dels ratolins SAMP8 en la memòria a curt i/o a llarg termini (Matsui *et al.*, 2009; Takanashi *et al.*, 2004) tan als 5 mesos (López-Ramos *et al.*, 2012) com als 9,5 mesos en comparació a la soca SAMR1 (Dobarro *et al.*, 2013).

### 3.3.2. Trastorns emocionals i del comportament

Els resultats de diversos tests per avaluar trastorns emocionals realitzats en ratolins SAMP8 mostren que aquests animals presenten una disminució de la conducta de l'ansietat en el laberint en T alçat, en la neofòbia al menjar o en els test amb xocs

elèctrics davant la privació de la beguda (Miyamoto *et al.*, 1992, 1997). Aquesta reducció de l'ansietat és depenent de l'edat en els ratolins SAMP8 i SAMR1, però és més elevada que en els ratolins SAMR1 (Miyamoto *et al.*, 1992).

Pel que fa a la conducta depressiva, els ratolins SAMP8 no presenten diferències respecte les soques control SAMR1 i ICR-CD1 en l'estudi realitzat en el test de suspensió per la cua. Tot i així, en un treball recent de Pérez-Caceres *et al.* (2013) s'han descrit diferències entre SAMP8 i SAMR1 als 9 mesos d'edat en el test de natació forçada o el test de supressió per dexametasona.

### 3.3.3. Ritme circadiari

Una de les característiques pròpies de l'envelliment és la pèrdua dels ritmes circadiaris degut a canvis en les fases i a la disminució de la seva amplitud (Froy, 2011). Les alteracions dels ritmes circadiaris en ratolins SAMR1 i SAMP8 s'han descrit a partir de la mesura de l'activitat motora espontània. Els estudis realitzats a diverses edats mostren que els ratolins SAMP8 presenten un augment diürn significatiu de l'activitat motora espontània des dels 2 mesos, mentre que en SAMR1 es detecta a partir dels 12 mesos, edat a partir de la qual ja no s'observen diferències entre ambdues soques (Miyamoto *et al.*, 1997, 1998). L'increment de la intensitat lumínica de 40 a 200 lux provoca la desaparició de l'activitat motora espontània dels ratolins SAMP8 i incrementa l'activitat nocturna (Miyamoto, 1998). La resincronització del cicle circadiari des d'un cicle de fosc-fosc a un cicle de llum-fosc és més ràpida en els ratolins SAMP8 que en els ratolins SAMR1, fet que també s'observa amb l'avançament de 6 hores del cicle de llum (Miyamoto, 2013; Sánchez-Barceló *et al.*, 1997). Tot i que no se saben les causes concretes que causen les alteracions dels cicles circadiaris, es considera que possiblement les alteracions observades en alguns neurotransmissors, com és el cas de la disminució de la neurotransmissió monoaminèrgica (Penev *et al.*, 1993), o la menor sensibilitat del ratolí SAMP8 a l'estimulació fòtica intervinguin en aquestes alteracions (Miyamoto, 2013).

## **3.4. Alteracions neuropatològiques i neuroquímiques**

### 3.4.1. Alteracions neuronals

L'estudi de les alteracions neuronals amb l'envelliment dels ratolins SAMP8 ha donat lloc a l'observació de la reducció de neurones colinèrgiques del nucli tegmental laterodorsal a partir dels 2 mesos amb l'increment de l'edat (Kawamata *et al.*, 1990). També s'han descrit alteracions d'aquestes neurones en el *septum* medial i la banda diagonal de Broca (Tooyama *et al.*, 1997). A nivell dendrític, l'estudi amb tècniques de Golgi de neurones piramidals de l'hipocamp en ratolins SAMP8 i SAMR1 de 8 mesos d'edat va mostrar una reducció d'entre el 6 i el 23% de la densitat dendrítica (Sugiyama *et al.*, 1987) i s'ha observat una reducció de la connectivitat sinàptica i de

les dendrites relacionada amb els dèficits cognitius mostrats en l'envelliment (Del Valle *et al.*, 2012; Kawaguchi *et al.*, 1995). En aquest procés s'ha postulat com a possible causa rellevant l'alteració de la membrana neuronal com a resultat dels processos oxidatius que tenen lloc en el cervell d'aquests animals (Akiguchi i Kawamata, 2013), explicats detalladament a l'apartat 3.4.8. Una altra alteració observada amb l'augment de l'edat a la soca SAMP8 és l'atròfia axonal esferoide en el nucli gràcil en comparació als ratolins SAMR1 i DDD (Kawamata *et al.*, 1994). Així, s'han observat fibres allargades i varicositats a la columna dorsal en algunes tincions histoquímiques realitzades.

L'augment de l'expressió del transportador de glucosa es va observar *in vitro*, i posteriorment *in vivo* en el còrtex cerebral de ratolins SAMP8 d'entre 4 i 8 setmanes (Sato *et al.*, 1994). Sembla, doncs, que hi ha un augment prematur del metabolisme de la glucosa que és evident a dels 2 mesos d'edat, com indiquen els resultats de la monitorització del consum de [<sup>14</sup>C]desoxiglucosa en el cervell, i continuen presents amb el temps (Fujibayashi *et al.*, 1994).

#### 3.4.2. Degeneració espongiforme en el tronc cerebral

La primera alteració neuropatològica descrita en els ratolins SAMP8 és la degeneració espongiforme del tronc cerebral (Yagi *et al.*, 1989). La degeneració espongiforme es caracteritza per la presència de vacúols de mida diferent en el neuropil de la formació reticular del tronc de l'encèfal. Aquesta alteració es localitza a la formació reticular magnocel·lular, al nucli reticular pontí i al nucli reticular gigantocel·lular, s'inicia al primer mes d'edat i assoleix un màxim al voltant dels 4-8 mesos. A nivell ultraestructural es poden diferenciar dos tipus de vacúols: els que se situen en el compartiment postsinàptic i els formats per la separació de les beines de mielina en la línia densa major dels oligodendròcits. Els vacúols situats al compartiment postsinàptic podria iniciar-se a partir d'una lleugera inflamació dendrítica al primer mes d'edat, que més endavant dona lloc a una inflamació postsinàptica i a un augment de les estructures membranoses de les dendrites als 2 mesos. Als 5 mesos d'edat, ja es poden observar làmines membranoses de tipus mielínic envoltant grans vacúols. El segon tipus d'alteració, consistent en la separació de les beines de mielina, s'inicia als 2 mesos d'edat i és força prominent als 5 mesos. Es postula que podria ser el resultat d'una disminució de la quantitat total de gangliòsids en el tronc cerebral dels ratolins SAMP8 respecte SAMR1 (Ohsawa i Shumiya, 1991). En edats posteriors es va observar en aquestes zones un fenomen de remielinització que explica l'aparença normal del tronc encefàlic dels ratolins SAMP8 a l'edat de 8 mesos. La severitat de les lesions descrites a la formació magnoreticular, especialment a la part dorsomedial, s'ha correlacionat amb el deteriorament de la memòria i l'aprenentatge d'aquests animals (Ohsawa i Shumiya, 1991).

#### 3.4.3. Alteracions neuroquímiques

Diversos estudis realitzats en els ratolins SAMP8 mostren alteracions dels receptors de neurotransmissors i deteriorament de les membranes neuronals en el cervell d'aquests ratolins. Així doncs, s'han observat canvis relacionats amb l'edat en els receptors de NDMA, acetilcolina, 5-HT, DA, opioides, benzodiazepínics i l'àcid  $\gamma$ -aminobutíric (GABA), així com en els adrenoreceptors de tipus  $\alpha$  (Flood *et al.*, 1992, 1993; Kitamura *et al.*, 1989, 1992; Liu i Mori, 1993; Nomura i Okuma, 1999; Zhao i Nomura, 1990; Zhao *et al.*, 1992). Els continguts de glutamat i glutamina són més alts en el cervell del ratolins SAMP8 respecte els ratolins SAMR1, i contràriament, es va observar un descens del contingut d'aspartat i alanina (Kitamura *et al.*, 1992). Pel que fa a l'acetilcolina, s'ha detectat un descens del seu contingut a l'hipocamp en els ratolins SAMP8 de 15 mesos respecte als 7 mesos (Ikegami *et al.*, 1992). En el ratolí SAMP8 s'ha observat, per exemple, una reducció de l'alliberament de glutamat causat per estímuls despolaritzants respecte SAMR1; però alhora s'ha descrit un augment de l'alliberament de neurotransmissors com el glutamat, l'aspartat o GABA, i compostos associats, com l'alanina, la taurina o la glutamina, amb l'envelliment d'aquests ratolins (Kitamura *et al.*, 1992). Tots aquests resultats suggereixen un deteriorament funcional de la neurotransmissió glutamatèrgica, colinèrgica i noradrenèrgica en el ratolí SAMP8 (Zhao i Nomura, 1990; Zhao *et al.*, 1992). Flood *et al.* (1993), a partir de l'agrupació de tots aquests resultats, van proposar un model d'alteracions neuroquímiques a la via septo-hipocampal que explicaria les alteracions cognitives observades en aquests animals. Breument, aquest model proposa que la depleció de la 5-HT en el nucli rafe mitjà que projecta al *septum* donaria lloc a la desinhibició de la inhibició de GABA en aquesta regió, fet que provocaria un augment d'aquest neurotransmissor i, com a resultat, una disminució dels nivells d'acetilcolina a l'hipocamp.

L'expressió de factors de creixement, com el factor de creixement neural (NGF, *nerve-growth factor*) o el BDNF, es troba disminuïda en els primers estadis del desenvolupament dels ratolins SAMP8, com mostren els nivells de NGF i l'mRNA de BDNF (Kawamata *et al.*, 1997).

Una de les alteracions pròpies de l'envelliment és l'alteració dels canals de calci (apartat 1.6.5), que modifiquen la LTP a l'hipocamp. La determinació de la densitat dels receptors antagonistes dels canals de calci de tipus L i N en el ratolí SAMP8 va mostrar una reducció amb l'edat (Yamada *et al.*, 1996), i es va observar una elevació de calci depenent de l'edat. Ambdós resultats suggereixen una alteració de l'homeòstasi del calci en el cervell dels animals SAMP8 d'edat avançada (Kawamata *et al.*, 1998). De la mateixa manera, s'ha descrit una alteració de la fosforilació del CREB en activitats d'aprenentatge en ratolins SAMP8 de 2 mesos d'edat respecte els ratolins SAMR1 (Tomobe *et al.*, 2007). Aquesta proteïna és essencial per a mantenir la LTP de fase tardana, i intervé per tant en la formació d'espines i l'expressió gènica que promouen la plasticitat sinàptica i la memòria a llarg termini (Bitto *et al.*, 1996; Impey *et al.*, 1996;

Luscher *et al.*, 2000). De fet, els canvis de la fosforilació de CREB en els SAMP8 van mostrar una absència de LTP de la fase inicial i un decrement de LTP de la fase tardana.

#### 3.4.4. Astrogliosi i reacció microglial

L'astrogliosi en els ratolins SAMP8 s'ha observat a través de l'increment dels marcadors de proliferació glial GFAP i PK-11195 (Nomura *et al.*, 1996). Entre les zones on s'ha descrit un augment de GFAP s'inclou l'hipocamp, el còrtex piriforme, la matèria blanca i el tronc cerebral. En aquesta última regió, la presència de GFAP s'ha relacionat amb la vacuolització resultant de l'expressió del virus de la leucèmia murina (MuLV, *murine leukemia virus*) (Yagi *et al.*, 1989), retrovirus present en el genoma d'aquests rosegadors i explicat més extensament a l'apartat 3.4.7. En el còrtex cerebral s'ha pogut observar algun clúster astrocític dispers, ocasionalment associat als vasos sanguinis (Kawamata *et al.*, 1998). De fet, als 5 mesos d'edat, els ratolins SAMP8 mostren una marcada astrogliosi i microgliosi en comparació amb ratolins SAMR1 de la mateixa edat (Sureda *et al.*, 2006) i els ratolins envellits SAMP8 presenten una elevació de marcadors glials com l'enzim monoaminoxidasa-B (MAO-B, *monoamine-oxidase B*) respecte els controls SAMR1 (Kato-Semba i Kato, 1993; Nomura *et al.*, 1989), a més a més de canvis morfològics com hipertròfia astrocítica (Wu *et al.*, 2005). Un dels fets més destacats de l'astrogliosi és l'augment de la síntesi d'mRNA i proteïnes GFAP, que s'ha observat també amb marcatges immunohistoquímics, *western-blot* i RT-PCR a l'hipocamp dels ratolins SAMP8 en funció de l'edat (Díaz-Moreno *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2005). L'estudi de les alteracions d'astròcits *in vitro* dels ratolins SAMP8 respecte SAMR1 han permès l'observació d'una major fosforilació de tau en els astròcits, un augment de la generació de ROS, una disminució del potencial de membrana mitocondrial i una reducció de la captació de glutamat (García-Matas *et al.*, 2005). Totes aquestes observacions suggereixen un paper important d'aquestes cèl·lules en els mecanismes neurodegeneratius del procés de l'envelliment observats en aquests animals (García-Matas *et al.*, 2008). Aquests resultats s'han reforçat amb d'altres estudis proteòmics realitzats també en astròcits d'ambdues soques d'animals, on s'han observat canvis en l'expressió de proteïnes implicades en el manteniment de la proteòstasi, el metabolisme energètic, especialment a nivell mitocondrial, els filaments intracel·lulars i la resposta a l'estrès entre d'altres (Díez-Vives *et al.*, 2009).

Així mateix, s'ha descrit una marcada acumulació de cèl·lules microglials reactives i amb un increment d'expressió de catepsines E i D en cervells de ratolins SAMP8 (Amano *et al.*, 1995). La microglia agrupada en forma de clústers també s'ha associat a les lesions espongiformes del tronc cerebral dels ratolins SAMP8 (Kawamata *et al.*, 1998). D'altres zones on s'ha observat proliferació microglial inclouen l'hipocamp i el còrtex. Aquesta proliferació augmenta amb l'envelliment, com s'ha observat especialment a la zona CA1 de l'hipocamp dels ratolins SAMP8, però no en els ratolins SAMR1 (Akiguchi i Kawamata, 2013). Així doncs, sembla que en el cervell d'aquests

animals té lloc una inflamació o resposta immune crònica, possiblement dirigida per l'activació microglial (Akiguchi i Kawamata, 2013).

#### 3.4.5. Degeneració oligodendrocítica

Per tal d'estudiar les alteracions oligodendrocítiques dels ratolins SAMP8 de 10 mesos d'edat es van realitzar marcatges immunohistoquímics de l'enzim 2',3'-nucleòtid cíclic 3'-fosfodiesterasa (CNP, *2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase*) i la proteïna bàsica de la mielina (MBP, *myelin basic protein*) (Tanaka *et al.*, 2005). Els animals SAMP8 van presentar una disminució del marcatge de la MBP i el CNP a la regió del CA1 de l'hipocamp en comparació a animals SAMR1. Tot i així, les diferències observades en els marcadors oligodendrocítics no es van poder apreciar a nivell de l'escorça cerebral o el tracte òptic. La mesura de l'immunoreactivitat per MBP a la zona CA1 de l'hipocamp va permetre detectar una davallada progressiva del marcatge amb l'edat en els ratolins SAMP8 en comparació amb els animals SAMR1. Aquests resultats van demostrar, doncs, una degeneració dels oligodendrocits a l'hipocamp dels ratolins de la soca SAMP8 depenent de l'edat.

#### 3.4.6. Disfunció de la barrera hematoencefàlica

En diversos estudis realitzats en SAMP8 s'ha observat una disfunció de la BBB i dèficits microvasculars en el cervell. Estudis preliminars van detectar que la taxa de transferència cerebral d'albumina sèrica administrada prèviament en ratolins SAMP8 és més gran que en animals SAMR1 de la mateixa edat (Ueno *et al.*, 1993; Hosokawa i Ueno, 1999). Així mateix, aquesta taxa de transferència augmenta a mesura que els animals SAMP8 envelleixen. A l'hipocamp d'animals SAMP8 també s'ha observat un increment en l'extravassació d'albumina sèrica endògena (Hosokawa i Ueno, 1999) i d'immunoglobulina G (Pelegrí *et al.*, 2007) mitjançant marcatges immunohistoquímics, i s'ha detectat HRP en el parènquima cerebral després de la seva administració, així com un increment de cèl·lules endotelials tenyides per HRP (Ueno *et al.*, 2001a). En altre estudi, Del Valle *et al.* (2009) va descriure alteracions de la BBB utilitzant com a traçadors el blau d'Evans i Hoechst. Els resultats van mostrar diferències significatives en els ratolins SAMP8 i SAMR1 a partir dels 12 i 15 mesos respectivament, en comparació amb els controls ICR-CD1. Aquesta disfunció observada a la BBB és el resultat d'alteracions microvasculars observades en animals SAMP8 vells, que consisteixen principalment en un citoplasma irregularment gruixut i dens de les cèl·lules endotelials de les àrees adjacents a les zones periventriculars, així com inclusions de la membrana a la làmina basal (Ueno *et al.*, 2001b). Aquests fets indiquen un malmetement dels pericits i les cèl·lules endotelials d'aquestes zones que afecten l'estructura de la BBB (Del Valle, 2010).



#### 3.4.7. Virus de la leucèmia murina

Donat que els ratolins SAMP8 provenen de la soca AKR, que conté el retrovirus MuLV en el seu genoma, s'han realitzat estudis sobre la càrrega vírica d'aquest retrovirus en els ratolins SAMP8 i SAMR1. Així doncs, es va analitzar l'expressió dels virus ecotròpic (E-MuLVs), xenòtròpic i politròpic MuLVs al cervell de ratolins SAMP8 i SAMR1, i els resultats van mostrar l'absència d'mRNA ecotròpic en SAMR1 i només va ser detectat mRNA ecotròpic de tipus Akv en ratolins SAMP8 (Jeong *et al.*, 2002). Els nivells d'mRNA corresponents als MuLV politròpic i xenotròpic van ser equivalents per a SAMP8 i SAMR1 i, a més, no es va detectar cap indicatiu de cap altre virus patològic.

Estudis immunohistoquímics i de microscòpia electrònica per detectar la localització cel·lular de l'expressió d'Akv en SAMP8 van detectar l'antigen de la càpside de l'E-MuLV en neurones, oligodendròcits i cèl·lules endotelials de l'estriat, tronc de l'encèfal, hipocamp i cerebel d'aquests ratolins. A més a més, es van detectar una forta activació i vacuolització astrocítica adjacents a les neurones amb expressió d'Akv, obrint una nova porta a explicar els mecanismes patogènics de la degeneració espongiforme en aquests animals (Del Valle, 2010).

#### 3.4.8. Estrès oxidatiu

Una de les fonts de la disfunció cel·lular en l'envelliment és la generació de ROS, que dona lloc a alteracions en el DNA, les proteïnes, les membranes lipídiques i d'altres molècules. En el ratolí SAMP8 s'ha descrit una gran quantitat d'alteracions que provoquen la presència d'un elevat estrès oxidatiu en aquest animal a edats primerenques. De fet, l'augment de la peroxidació lipídica en aquesta soca s'ha detectat tan aviat com els 2 mesos d'edat (Yasui *et al.*, 2003), tot i que aquests canvis no es van detectar en òrgans com el cervell i el fetge. També als 5 mesos s'han detectat nivells més elevats del dany dels carbonils i de la peroxidació lipídica en SAMP8 respecte als SAMR1, a més a més de la disminució de l'activitat SOD (Álvarez-García *et al.*, 2006; Petursdóttir *et al.*, 2007). L'estudi dels mecanismes de defensa de les ROS va detectar una disminució dels enzims manganès SOD (Kurokawa *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 1996) i glutatió peroxidasa (Okatani *et al.*, 2002) en els ratolins SAMP8 respecte als controls SAMR1.

També en edats avançades, entre els 11 i 12 mesos d'edat, s'observa una quantitat significativament més elevada d'MDA i d'activitat MAO-B en cervell i fetge dels ratolins SAMP8 en comparació als ratolins SAMR1. Tanmateix, en un altre estudi amb ratolins SAMP8 de 3 i 11 mesos, es va descriure un augment dependent de l'edat de l'activitat de SOD i la reactivitat de l'àcid tiobarbitúric, que equival al contingut de MDA, en el fetge i en cervell, respectivament (Liu i Mori, 1993). En aquest mateix estudi, es va detectar una disminució dels nivells de glutatió en cervell i fetge en relació amb l'edat (Liu i Mori, 1993).

D'altra banda, el tractament amb compostos antioxidants, com ara l'administració crònica de N-tert-fenil-butilnitrona a animals SAMP8 a partir dels tres mesos d'edat va incrementar l'esperança de vida en un 33% d'aquests animals (Edamatsu *et al.*, 1995). Aquest resultat suggereix la importància de les ROS en el procés d'envelliment dels animals SAMP8.

L'evolució de l'estrès oxidatiu en el cervell es va monitoritzar de forma més detallada en uns estudis realitzats per Sato *et al.* (1996a, 1996b). Els canvis en l'estrès oxidatiu relacionats amb l'edat es van avaluar en ratolins SAMP8 i SAMR1 a les 2, 4-8, 20-28 i 40-56 setmanes d'edat. Els nivells de ROS, així com els nivells de peròxids lipídics i de grups carbonil, van augmentar amb l'edat dels animals SAMP8. Pel que fa als mecanismes de defensa davant les ROS, es va detectar una disminució progressiva amb l'edat. L'augment dels peròxids lipídics en el cervell dels ratolins SAMP8 es va produir de forma transitòria entre les 4-8 setmanes, tot i que aquest canvi només es va observar en l'escorça cerebral i no en d'altres regions cerebrals. Aquest canvi en els nivells de peròxids lipídics anava acompanyat d'una disminució de l'enzim antioxidant glutamina sintetasa també a l'escorça cerebral dels ratolins SAMP8 a les 4-8 setmanes d'edat. L'augment de l'estat oxidatiu en els ratolins SAMP8 d'entre 4 i 8 setmanes d'edat precedeix els dèficits en la memòria i l'aprenentatge, fet que n'ha suggerit una possible causalitat (Sato *et al.*, 1996a). L'observació en un estudi posterior de canvis en l'activitat de catalasa i oxidasa acil-coenzim A s'ha proposat també com a factor causal de l'increment precoç de l'estrès oxidatiu en l'escorça cerebral dels ratolins SAMP8 de 4-8 setmanes d'edat (Sato *et al.*, 1996b).

D'altra banda, en un estudi similar on es va determinar la concentració de peròxids lipídics en diversos òrgans de ratolins SAMP8 i SAMR1 de 3, 6 i 9 mesos d'edat es va veure que els nivells de peròxids lipídics determinats en teixits com el cor i el fetge van augmentar amb l'increment de l'edat en ambdues soques estudiades (Matsugo *et al.*, 2000). En canvi, en el cervell, els nivells de peròxids lipídics es van mantenir.

Les contradiccions observades en aquests estudis poden ser degudes, molt probablement, a qüestions referents a les diferències de gènere, dels mètodes, o les condicions d'estabulació dels animals (Lau *et al.*, 2013). En qualsevol cas, el conjunt d'aquests resultats suggereix que l'estrès oxidatiu en el cervell i d'altres teixits perifèrics poden comportar dèficits cognitius i disfuncions associades a l'envelliment en el ratolí SAMP8 (Sultana *et al.*, 2013).

#### 3.4.9. Alteracions mitocondrials

Tal i com s'ha explicat anteriorment, la disfunció mitocondrial és també una de les característiques essencials de l'envelliment (apartat 1.3.6), a més a més de contribuir a l'augment de l'estrès oxidatiu propi d'aquest procés. L'estudi de l'estat dels mitocondris en els animals SAMP8 es va realitzar mitjançant la fosforilació oxidativa

d'aquests orgànuls presents en el fetge de ratolins de 6, 12 i 18 mesos d'edat. La disminució de la ràtio de control respiratori era progressiva amb l'augment de l'edat, i el valor detectat als 18 mesos es va considerar insuficient per a la síntesi d'ATP necessària per a un metabolisme cel·lular normal (Nakahara *et al.*, 1998). La caracterització d'aquesta disfunció mitocondrial a edats inicials es va realitzar mitjançant la determinació del seu estat redox i la seva fosforilació oxidativa en el cervell de ratolins SAMP8 i SAMR1 de 2 mesos d'edat. Els mitocondris cerebrals d'animals SAMP8 van mostrar un major estat redox i una major activitat de la respiració mitocondrial amb una ràtio menor de control respiratori que els mitocondris de ratolins SAMR1. Aquests resultats suggereixen un estat hiperactiu ineficient en el sistema de transport electrònic mitocondrial que posteriorment donaria lloc a una disfunció mitocondrial relacionada amb l'edat en els ratolins SAMP8 (Nishikawa *et al.*, 1998).

L'anàlisi del DNA mitocondrial del cervell de ratolins SAMP8 mostra, a més a més, múltiples delecions. Les supressions en el DNA s'observen a les 4-8 setmanes d'edat en més quantitat en comparació a les soques control SAMR1 o ddY (Fujibayashi *et al.*, 1998). A més a més, s'observa també una davallada de l'activitat enzimàtica dels complexos I i III. Segons els autors d'aquest estudi, aquestes alteracions del transport d'electrons en els mitocondris del cervell de ratolins SAMP8 pot provocar un augment de la producció de ROS i un estat d'estrès oxidatiu crònic, que acabi donant lloc en últim terme a un procés neurodegeneratiu.

#### 3.4.10. Grànuls *Periodic Acid Schiff* i altres dipòsits

La presència de clústers anòmals formats per grànuls que es tenyeixen amb PAS s'ha descrit en els ratolins SAMP8 (Akiyama *et al.*, 1986). Aquestes estructures s'han identificat a les zones CA1, CA2 i CA3 de l'hipocamp i, ocasionalment en d'altres zones del cervell. Els clústers de grànuls s'inicien als tres mesos d'edat i augmenten progressivament fins als sis mesos i més enllà d'aquesta edat (Kuo *et al.*, 1996). Els ratolins control SAMR1 en presenten molt poca quantitat i només a edats força avançades. S'ha establert una relació estreta amb els astròcits marcats amb GFAP i s'ha descrit també la presència d'activitat enzimàtica MAO-B en alguns astròcits i en els grànuls (Nakamura *et al.*, 1995). L'observació d'aquestes estructures granulars en d'altres soques de ratolins s'ha relacionat també amb l'envelliment, i s'han realitzat diversos estudis per a aprofundir en el coneixement i el significat funcional d'aquestes estructures, avui dia encara per establir. La informació que es disposa fins a l'actualitat dels grànuls PAS s'explica amb detall al capítol 4.

Un altre tipus de dipòsits que s'han observat en el cervell dels ratolins SAMP8 són les inclusions en neurones talàmiques (Akiguchi *et al.*, 1988). Aquestes inclusions són eosinofíliques, intracel·lulars, i s'han descrit tant en ratolins envellits com en humans d'edat avançada (Takeda, 2009). A més a més, s'ha identificat lipofuscinosis en les

cèl·lules d'aquests animals (Akiguchi *et al.*, 1988; Akiyama *et al.*, 1986). Així doncs, els ratolins SAMP8 desenvolupen també aquesta característica fenotípica corresponent al seu procés d'envelliment accelerat.

#### 3.4.11. Fosforilació de la proteïna tau

L'agregació i la fosforilació de la proteïna tau mitjançant diversos enzims com GSK3 $\beta$ , CDK5 i PKC és un fet propi de diverses malalties neurodegeneratives (apartat 2.1.2) (Ferrer *et al.*, 2005; Iqbal *et al.*, 2005). En el cas dels ratolins SAMP8, un estudi primerenc va observar una elevada fosforilació de tau en ratolins SAMP8 als 11 mesos en comparació als controls SAMR1 (Wei *et al.*, 1999). Estudis més amplis han determinat un augment de la hiperfosforilació tant aviat com als 5 mesos d'edat (Álvarez-Garcia *et al.*, 2006) que dona lloc a diverses formes de tau hiperfosforilada en comparació als ratolins control SAMR1 (Caballero *et al.*, 2008; Canudas *et al.*, 2005). També s'ha observat que l'increment en la fosforilació de la proteïna tau és el resultat de l'augment de l'expressió de CDK5 i de l'activitat del complex CDK5/p25 (Canudas *et al.*, 2005). Tractaments realitzats en ratolins SAMP8 amb melatonina (Gutiérrez-Cuesta *et al.*, 2007) o clorur de liti (Tajes *et al.*, 2008), que redueixen l'activació de CDK5 i GSK3 $\beta$  a través de la via CDK5/p25, van provocar la reducció de la hiperfosforilació de tau. Cal remarcar que l'activació d'aquestes vies de senyalització es produeix també en l'AD, malaltia on s'observa una elevada fosforilació de tau i la formació dels NFT (Castellani *et al.*, 2006).

#### 3.4.12. Dipòsits de $\beta$ -amiloide

Els pèptids d'A $\beta$  (apartat 2.1.1) intervenen de forma destacada en la formació de dipòsits com les plaques senils o d'altres morfologies (apartat 2.3.1) tant en l'envelliment com en l'AD. L'estudi d'aquesta proteïna en els animals SAMP8 va mostrar un augment dels pèptids A $\beta_{40}$  i A $\beta_{42}$  en el teixit cerebral en comparació als animals controls SAMR1 (Fukunari *et al.*, 1994; Takemura *et al.*, 1993) especialment a la zona de l'hipocamp. Aquests resultats concorden amb d'altres observacions, com la detecció d'un augment d'mRNA de l'A $\beta$ PP i la proteïna A $\beta$ PP associat amb l'edat (Flood i Morley, 1998; Kumar *et al.*, 2000; Morley *et al.*, 2000; Nomura *et al.*, 1996; Tha *et al.*, 2000), o l'increment de la quantitat d'A $\beta$  (Takemura *et al.*, 1993). A més a més, l'ús d'anticossos i oligonucleòtids anti-sentit dirigits contra l'A $\beta$  en ratolins SAMP8 han revertit parcialment els dèficits de memòria i aprenentatge d'aquests animals (Banks *et al.*, 2007; Butterfield i Poon, 2005; Zhang *et al.*, 2011). També l'administració de catequines de tè verd en períodes llargs va prevenir les disfuncions cognitives observades en aquests animals a través de la reducció dels oligòmers d'A $\beta_{42}$  i la regulació a l'alça de proteïnes sinàptiques relacionades amb la plasticitat presents a l'hipocamp (Li *et al.*, 2009). L'augment de l'expressió de presenilina-1 a l'hipocamp dels ratolins SAMP8 respecte els controls ICR-CD1 s'ha descrit també amb l'increment de

l'edat, fet que podria augmentar la presència de l'enzim  $\gamma$ -secretasa, que intervé en el trencament proteolític de l'A $\beta$ PP (Lau *et al.*, 2013).

Pel que fa a l'agregació de l'A $\beta$  en ratolins els SAMP8, s'han aportat informacions diverses i controvertides que donen lloc a diferents interpretacions. La primera descripció de l'acumulació d'A $\beta$  va ser realitzada per Takemura *et al.* (1993), i en aquest estudi es van descriure unes estructures granulars immunoreactives de tipus proteic  $\beta$ /A4, anomenades posteriorment dipòsits  $\beta$ -LIGS ( *$\beta$ -like immunoreactive granular structures*). Aquests dipòsits s'inicien als 2 mesos d'edat i augmenten progressivament (Fukunari *et al.*, 1994; Takemura *et al.*, 1993). D'altra banda, Morley *et al.* (2000), va descriure també un altre tipus de dipòsits detectats amb anticossos anti-A $\beta$  que s'observen en ratolins de 16-18 mesos d'edat. En un estudi posterior realitzat per Del Valle *et al.* (2010), es va identificar la presència d'estructures reactives per a anticossos dirigits contra l'A $\beta$ PP, l'A $\beta$ <sub>40</sub> i l'A $\beta$ <sub>42</sub> mitjançant marcatges immunohistoquímics contra aquests pèptids i proteïnes. Aquests marcatges van mostrar una presència de major a menor grau d'A $\beta$ <sub>42</sub>, d'A $\beta$ <sub>40</sub> i d'A $\beta$ PP (Figura 24). Els agregats amiloides s'iniciaven a la zona CA1 de l'hipocamp als 3 mesos d'edat, i formaven clústers que es desenvolupaven posteriorment a les zones CA2 i CA3 de l'hipocamp a mesura que s'incrementava l'edat. A les soques control SAMR1 i ICR-CD1 també es va poder observar la presència de clusters, però el seu inici era molt posterior, i la quantitat assolida als 15 mesos d'edat era menor (Figura 25).

Actualment, hi ha estudis que han avaluat l'efecte de diversos tractaments o manipulacions experimentals en aquests agregats amiloides. És el cas, per exemple, de l'administració d'una dieta suplementada amb resveratrol, un component amb activitat antioxidant, en ratolins SAMP8 (Porquet *et al.*, 2013). A més a més de l'augment de l'esperança de vida en aquests animals i la millora significativa de la memòria en el test de reconeixement d'objectes dels animals tractats respecte el grup control, es va observar una reducció significativa del nombre de clústers d'agregats amiloides a l'hipocamp dels ratolins respecte els controls administrats amb aquesta dieta. En un altre estudi es va observar una reducció dels dipòsits amiloides dels ratolins SAMP8 de 10 mesos després de l'administració d'un compost químic derivat de l'azaindolinona, el ZSET1446/ST101, en comparació amb els animals no administrats (Yamaguchi *et al.*, 2012). D'altra banda, un estudi realitzat per Lou *et al.* (2012) descriu la presència de plaques difuses a l'hipocamp i el còrtex dels ratolins SAMP8 de 9 mesos d'edat mitjançant el marcatge immunohistoquímic amb un anticòs anti-A $\beta$ <sub>42</sub>. La morfologia de les plaques és diferent als grànuls observats per Del Valle *et al.* (2010), i la seva presència es veu atenuada en els animals tractats amb l'administració d'un factor de creixement del fibroblast acídic humà. Aquest tractament va tenir múltiples efectes en els ratolins SAMP8, com la millora de les habilitats d'aprenentatge i memòria, de la funció colinèrgica i la disminució dels nivells solubles de pèptids d'anti-A $\beta$ PP.

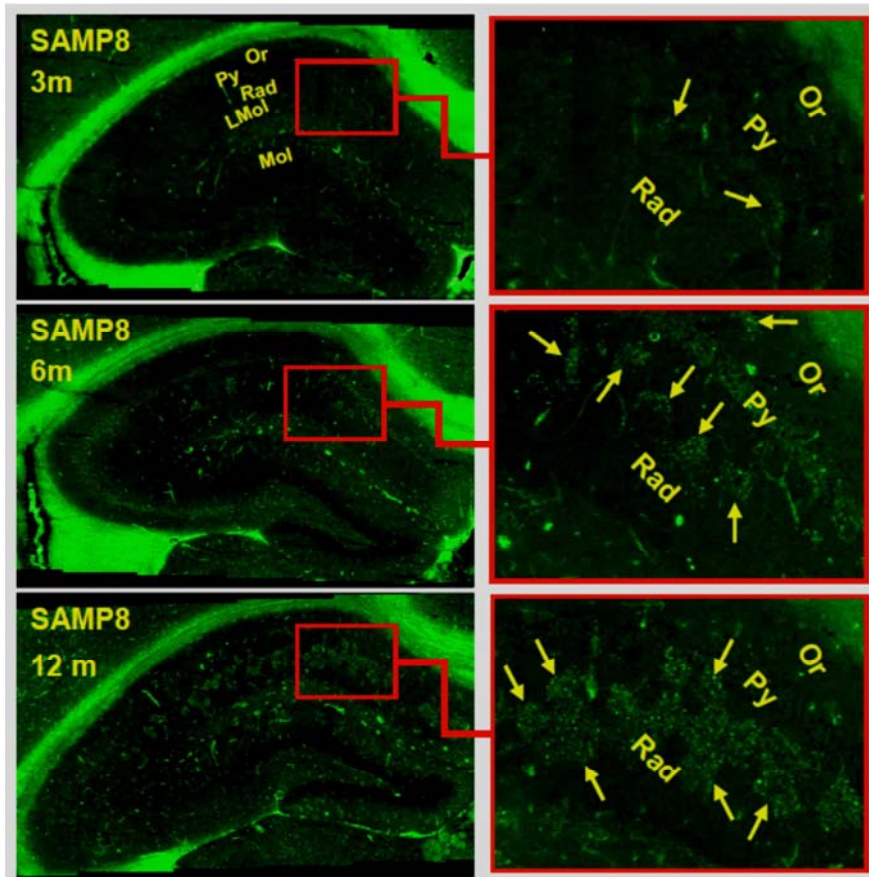


Figura 24. Marcatge d'immunofluorescència amb l'anticòs 4G8 dirigit contra els aminoàcids 17-24 del pèptid  $\beta$ -amiloide. S'observen els clusters amiloides de la zona CA1 de l'hipocamp del ratolí SAMP8 de 3, 6 i 12 mesos d'edat (Del Valle *et al.*, 2010).

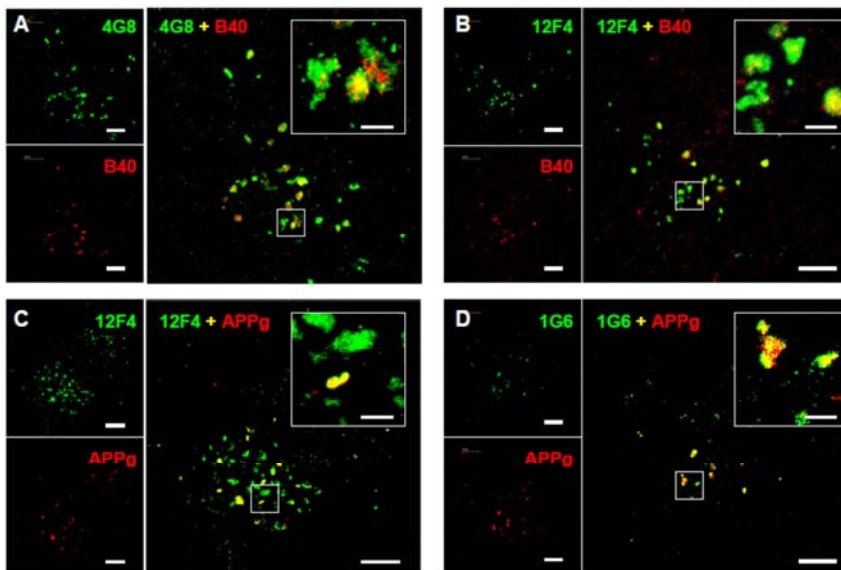


Figura 25. Marcatge d'immunofluorescència dels agregats amiloides de l'hipocamp del ratolí SAMP8 amb anticossos dirigits contra pèptids  $\beta$ -amiloide. A) Marcatge amb l'anticòs 4G8 (aminoàcids 17-24 del pèptid  $A\beta$ ) i l'anticòs anti- $A\beta_{40}$ ; B) marcatge amb l'anticòs 4G8 i l'anticòs 12F4 (anti- $A\beta_{42}$ ); C) marcatge amb l'anticòs 12F4 i l'anticòs anti- $A\beta_{PP}$ ; D) marcatge amb l'anticòs anti- $A\beta_{PP}$  i l'anticòs 1G6 (dirigit contra els aminoàcids 573-596 de l' $A\beta_{PP_{695}}$ ). (Del Valle *et al.*, 2010).

### 3.5. El ratolí SAMP8 com a model murí de la malaltia d'Alzheimer esporàdica

El ratolí SAMP8 és una soca ben establerta com a model de senescència, però des de fa un temps s'ha proposat com a possible model per a l'AD (Morley, 2002). Actualment, la recerca sobre l'AD es basa en models murins transgènics obtinguts a partir de mutacions en els gens dels pacients de l'AD familiar (Cheng *et al.*, 2014). Tot i així, només el 5% dels individus que pateixen l'AD tenen una malaltia de tipus familiar, enfront el 95% que presenten un inici esporàdic i tardà d'aquesta malaltia neurodegenerativa (Jonsson *et al.*, 2013). L'etiologia de l'AD esporàdica és complexa i encara desconeguda; i sembla ser fruit d'interaccions complexes entre factors genètics, epigenètics i ambientals (Cheng *et al.*, 2014).

Els ratolins SAMP8 mostren els principals trets histopatològics distintius de l'AD, com ara alteracions en el processament dels pèptids d'A $\beta$ , hiperfosforilació de tau, augment de l'estrès oxidatiu i gliosi, tot i que la cronologia de la seva aparició no s'ha establert formalment i hi ha certes controvèrsies respecte la adequació de la soca SAMR1 com a animals control (Pallàs *et al.*, 2008). Malgrat això, la comparació amb els ratolins transgènics (Taula 4) permet observar que els ratolins SAMP8 tenen una cronologia similar a aquests animals. Per tant, la soca espontània SAMP8 sembla ser un model avantatjós enfront els models transgènics, ja que presenta fenotips similars als símptomes que s'observen en l'AD esporàdic i d'inici tardà (Pallàs *et al.*, 2008). S'ha suggerit que aquest ratolí pot representar de forma més propera la complexitat de l'AD (Morley *et al.*, 2012; Pallàs, 2012; Pang *et al.*, 2006; Tomobe i Nomura, 2009). Per això s'ha suggerit com a un model ideal per a l'estudi de la transició entre l'envelliment normal i l'AD (Pallàs *et al.*, 2008), ja que de fet l'envelliment és el factor de risc més important per a desenvolupar l'AD esporàdic. Així doncs, l'aprofundiment en l'estudi dels trets patològics propis de l'AD en aquest animal i l'establiment d'una cronologia formal per a aquests fets pot facilitar l'ús d'aquesta soca per a l'estudi dels primers factors relacionats amb l'AD esporàdic.

AD-like phenotypes	2 Months	4 Months	6 Months	8 Months	10 Months	12 Months	12+ Months
Cognitive Deficits (Hippocampal)		APP23 JNPL3 TauP301L 3xTg-AD	PDAPP CRND8 SAMP8		Tg 2576	PSAPP	hPS1-2 Tg
Oxidative Stress	PSAPP SAMP8 (3M)			Tg 2576	APP23	PDAPP	
Amyloid- $\beta$		CRND8 3xTg-AD PSAPP	APP23		Tg 2576 hPS1-2 Tg	PDAPP	SAMP8 <sup>#</sup>
Tau phosphorylation		JNPL3 TauP301L 3xTg-AD	SAMP8 (5M)			APP23	PDAPP Tg 2576
Gliosis				SAMP8			Tg 2576

<sup>#</sup> Amyloid- $\beta$  plaques occur around 18 months. Increased levels of soluble amyloid- $\beta$  are detected at 8 months.

**Taula 4.** Cronologia d'aparició de la neuropatologia característica de l'AD i els dèficits cognitius en diverses soques de ratolins transgènics models d'AD i en el ratolí SAMP8 (Pallàs *et al.*, 2008).

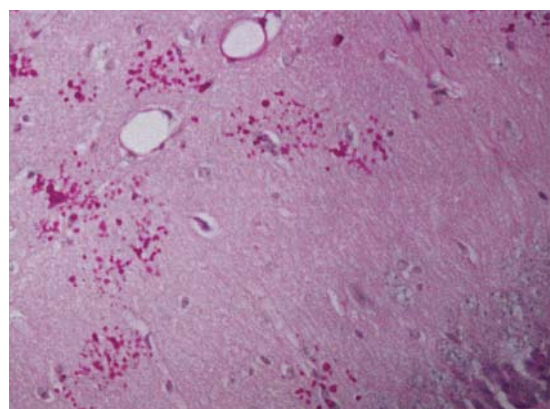
## **4. GRÀNULS PERIODIC ACID SCHIFF**

### **4.1. Definició i morfologia**

Els grànuls que es tenyeixen amb l'àcid periòdic de Schiff (PAS, *Periodic Acid-Schiff*), o els grànuls PAS, són estructures homogènies arrodonides o ovoides, agrupades en forma de clústers, que van ser descrites inicialment per Lamar *et al.* (1976) a l'hipocamp de ratolins C57BL/6 envellits. La presència dels clústers s'ha observat extensivament a l'hipocamp de diverses soques de ratolins, i aquestes estructures s'han atribuït a un fenomen propi de l'envelliment en aquests animals (Akiyama *et al.*, 1986; Doehner *et al.*, 2012; Jucker *et al.*, 1994a; Kuo *et al.*, 1996).

Els clústers de grànuls PAS poden contenir entre 40 i 50 grànuls cadascun, i tenen un diàmetre d'aproximadament 50 µm (Akiyama *et al.*, 1986; Jucker *et al.*, 1994a; Kuo *et al.*, 1996; Ye *et al.*, 2004). Cada grànul medeix uns 5 µm de diàmetre i l'edat pot augmentar la mida d'aquests grànuls, i especialment el nombre de grànuls que formen un clúster, arribant a assolir el centenar de grànuls (Jucker *et al.*, 1992; Robertson *et al.*, 2000).

Els grànuls inicien el seu desenvolupament a la capa *stratum radiatum* de la regió CA1 de l'hipocamp, i augmenten progressivament en nombre i extensió a mesura que avança l'edat (Akiyama *et al.*, 1986; Jucker *et al.*, 1994a). La seva expansió es produeix cap a les àrees CA2, CA3 i al gir dentat de l'hipocamp. S'ha observat també una major presència d'aquestes estructures a l'hipocamp ventral respecte l'hipocamp dorsal (Knuesel *et al.*, 2009).



**Figura 26.** Clústers de grànuls tenyits amb *Periodic Acid Schiff* a l'hipocamp d'un ratolí ApoE-deficient (extret de Robertson *et al.*, 1998).

### **4.2. Localització cerebral**

Tot i que els grànuls es desenvolupen de forma destacada a l'hipocamp, cal tenir en compte que també es poden trobar a d'altres àrees cerebrals (Jucker *et al.*, 1992). La distribució topogràfica dels grànuls en els cervell de ratolins s'ha estudiat amb profunditat a les soques de ratolins C57BL/6 (Figura 27) i SAMP8, entre d'altres (Akiyama *et al.*, 1986; Jucker *et al.*, 1994a).

Els ratolins SAMP8 i C57BL/6 envellits presenten grànuls PAS a totes les capes de l'hipocamp, tot i que la concentració més elevada de grànuls es detecta a les capes *stratum radiatum* i *lacunosum moleculare*, i també s'observen aquestes estructures a les àrees CA1, CA2, CA3 i al gir dentat d'aquesta regió (Nakamura *et al.*, 1995). A banda de l'hipocamp, el còrtex piriforme i el bulb olfactori a la part anterior del cervell, i el



cerebel i el cos trapezoide a la zona posterior també presenten estructures PAS positives (Figura 27) (Akiyama *et al.*, 1986; Doehner *et al.*, 2010; Jucker *et al.*, 1994a, 1994b; Knuesel *et al.*, 2009; Mitsuno *et al.*, 1999; Robertson *et al.*, 1998; Soontornniyomkij *et al.*, 2012). Els clústers observats en el cerebel es diferencien lleugerament dels de l'hipocamp i el còrtex piriforme per la seva aparença més difusa i una menor quantitat de grànuls. Ocasionalment, en edats avançades, s'han observat grànuls al diencèfal, el cos estriat i l'amígdala (Jucker *et al.*, 1994a; Knuesel *et al.*, 2009). Cal destacar que l'augment del nombre de clústers es produeix de forma paral·lela en totes aquestes zones a mesura que l'edat augmenta.



**Figura 27.** Esquema de la distribució topogràfica dels clústers de grànuls PAS en un cervell de ratolí C57BL/6 de 18 mesos d'edat (Jucker *et al.*, 1994a).

En general, els resultats dels diversos estudis realitzats sobre la distribució i progressió dels clústers de grànuls mostren un mateix patró que es desenvolupa de la mateixa manera a totes les soques de ratolins. De fet, l'edat d'inici de la presència dels grànuls PAS i la rapidesa de proliferació dels clústers de grànuls és el fet que diferencia les diverses soques de ratolins entre elles, més que no pas la possible diferència en l'estructura o morfologia dels grànuls.

### **4.3. Presència i cronologia en ratolins i d'altres animals**

Els grànuls PAS s'han descrit principalment en ratolins envellits de diverses soques *wild-type* i transgèniques. Malgrat que la majoria de treballs sobre aquestes estructures s'han realitzat en els ratolins C57BL/6 (Lamar *et al.*, 1976; Jucker *et al.*, 1992, 1994; Soontornniyomkij *et al.*, 2012), els grànuls PAS també s'han descrit a les soques AKR (Mitsuno *et al.*, 1999), la soca DDD (Akiyama *et al.*, 1986), els ratolins SAMP8 i SAMR1 (Akiyama *et al.*, 1986; Jucker *et al.*, 1994a; Kuo *et al.*, 1996), la soca 129sv (Jucker *et al.*, 1994a) i els ratolins atòmics (Mandybur *et al.*, 1989). A més a més, aquests grànuls s'han pogut observar en algunes soques de ratolins transgènics amb rerefons genètic de la soca C57BL/6 (Taula 5).

DENOMINACIÓ	MUTACIÓ	SOCA ORIGINAL	PUBLICACIONS
ApoE-deficients	ApoE <sup>tm1Unc</sup>	C57BL6	Robertson <i>et al.</i> , 1998, 2000; Veurink <i>et al.</i> , 2003
ApoE humana 2, 3, 4	ApoE <sup>tm1Unc</sup> ApoEε2; ApoEε3; ApoEε4	C57BL6	Robertson <i>et al.</i> , 2000
SynGap <sup>+/-</sup>	SynGap <sup>+/-</sup> ( <i>synaptic Ras-GTPase activating protein</i> )	C57BL6	Knuesel <i>et al.</i> , 2009
3xTgAD	APP <sub>Swe</sub> Tau <sub>P301L</sub> PS1 <sub>M146V</sub>	129/C57BL6J	Knuesel <i>et al.</i> , 2009; Oddo <i>et al.</i> , 2003
AD11	αD11 (anti-NGF antibody)	C57BL/6 × SJLF2	Corsetti <i>et al.</i> , 2008
ArcAβ	APP <sub>Swe, Arc</sub>	C57BL6	Doehner <i>et al.</i> , 2010
Reeler	Reln <sup>rl/+</sup>	B6C3	Kocherhans <i>et al.</i> , 2009
Reeler orleans	Reeler <sup>rl-orl</sup>	BALB/C	Knuesel <i>et al.</i> , 2009
Tsn65Dn	Ts(17 <sup>16</sup> )65Dn	C57BL6	Kern <i>et al.</i> , 2011; Rachubinski <i>et al.</i> , 2012.

**Taula 5.** Resum de les soques de ratolins transgènics utilitzats en diversos estudis sobre els clústers de grànuls PAS.

Malgrat això, el desenvolupament dels clústers a l'hipocamp dels ratolins envellits no és un fenomen universal d'aquest rosegador sinó que algunes soques de ratolins no desenvolupen aquests grànuls durant el procés d'envelliment. És el cas de les soques BALB/c, DBA/2, A i CBA, on no s'han observat estructures granulars comparables als dipòsits PAS; i la soca C3H/He, on s'ha observat alguna estructura granular només en alguns casos, que presumiblement es manifesta a edats molt avançades (Jucker *et al.*, 1992, 1994a).

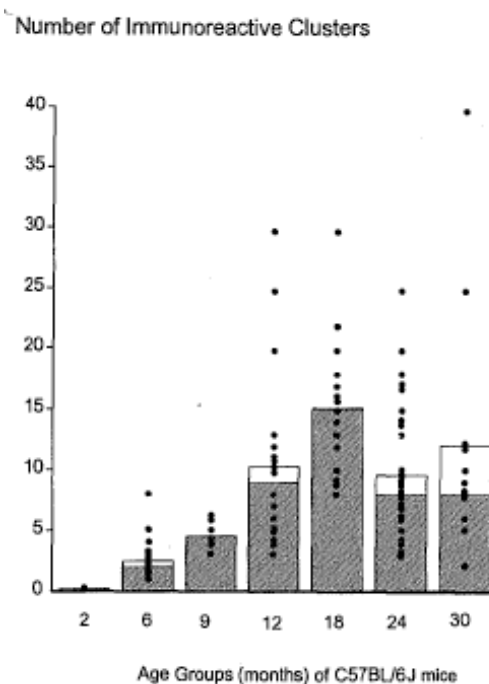
En general, la presència de grànuls sembla ser més prevalent en les femelles que en els mascles de la soca C57BL/6, com es descriu en bona part de les observacions qualitatives (Jucker *et al.*, 1992; Knuesel *et al.*, 2009; Lamar *et al.*, 1976) i quantitatives de diversos estudis on s'han emprat ambdós sexes (Jucker *et al.*, 1994b). La divergència entre el nombre de clústers en mascles i femelles ha permès hipotetitzar una possible influència de les hormones esteroides en la formació dels grànuls a l'hipocamp, així com una relació amb els canvis de l'eix neuroendocrí associats a l'edat (Jucker *et al.*, 1994b). Algun estudi qualitatiu realitzat amb ratolins de la soca SAMP8, però, contradiu les diferències observades entre ambdós sexes (Akiyama *et al.*, 1986).

A nivell cronològic, l'increment progressiu dels grànuls a l'hipocamp, al còrtex entorrinal i al còrtex piriforme s'ha associat de forma estadísticament significativa al procés de l'envelliment (Madhusudan *et al.*, 2009). Tot i així, a partir de certes edats es trenca la tendència acumulativa d'aquestes estructures i en edats avançades els estudis mostren un estancament del nombre de clústers, a més a més d'una elevada dispersió de la quantitat de clústers en alguns animals (Figura 28) (Jucker *et al.*, 1992, 1994a). En aquests animals també apareix un nombre superior de grànuls de mida gran, molt probablement a causa de la unió entre diversos grànuls més petits (Jucker *et al.*, 1994a; Robertson *et al.*, 1998), tal i com mostra la interconnectivitat observada entre alguns grànuls en estudis ultraestructurals (Doehner *et al.*, 2012).

L'edat d'inici d'aparició dels clústers de grànuls PAS difereix en funció de la soca. Cal destacar l'inici precoç d'aquestes estructures en els ratolins SAMP8, al voltant dels 3 mesos d'edat, i el seu augment significatiu amb l'edat (Kuo *et al.*, 1996), o els ratolins heterozigots *reeler*, que comencen a desenvolupar grànuls també als 3 mesos però que presenten uns nivells normals de clústers als 9 mesos d'edat respecte els controls C57BL/6 (Kocherhans *et al.*, 2009). Els animals amb un inici més primerenc són els ratolins transgènics ApoE-deficients, que desenvolupen els grànuls PAS a partir de les 4-6 setmanes d'edat (Robertson *et al.*, 1998, 2000).

D'altra banda, en edats avançades també s'ha descrit certa variabilitat entre les soques de ratolins. Per exemple, en els ratolins transgènics *SynGap*<sup>+/-</sup> de 12 mesos d'edat, que desenvolupen un menor nombre d'interneurons gabaèrgiques, s'observa una reducció del nombre de clústers de grànuls PAS respecte la soca control, i en el cas dels clústers situats a la zona ventral aquesta diferència és significativa (Knuesel *et al.*, 2009). En el cas dels ratolins 3xTg-AD la quantitat de clústers de grànuls PAS observada als 12 mesos d'edat (Oddo *et al.*, 2003) va resultar ser significativament superior en comparació als controls d'aquesta soca, de rerefons genètic C57BL/6 (Knuesel *et al.*, 2009). Un variació similar en el nombre d'estructures granulars s'ha observat en la soca dels ratolins trisòmics Ts65Dn, que presenten una quantitat significativament més elevada respecte els controls disòmics de la mateixa soca (Kern *et al.*, 2011; Rachubinski *et al.*, 2012).

Tot i que la presència de clústers PAS està àmpliament documentada en ratolins, no hi ha gaires evidències d'estructures similars identificades en d'altres espècies. Així, Kuo *et al.* (1996) destaquen la identificació d'estructures similars en rosegadors del gènere *Peromyscus*; i en el treball de Knuesel *et al.* (2009) es van detectar a través d'immunomarcats amb l'anticòs anti-reelina uns dipòsits d'aparença similar als grànuls PAS a l'hipocamp de rates Wistar de 20 mesos d'edat i a l'hipocamp de primats del gènere *Callithrix jacchus* d'1 i de 10 anys d'edat.



**Figura 28.** Gràfica de la quantificació de clústers de grànuls a l'hipocamp d'animals C57BL/6 d'edats entre els 2 i els 30 mesos. Les barres representen la mitjana, les barres ombrejades la mediana, i els punts són valors individuals (Jucker *et al.*, 1994a).

#### 4.4. Composició i característiques histològiques

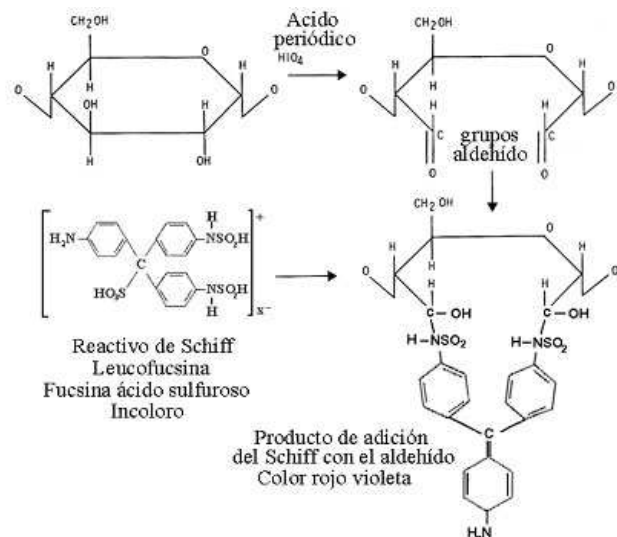
Per conèixer els components principals dels grànuls PAS-positius s'ha estudiat un ampli ventall de tincions histoquímiques on, a partir de les reaccions químiques dels compostos, s'ha pogut saber alguns aspectes de la naturalesa dels productes que formen els grànuls. I també s'han utilitzat força quantitat d'anticossos dirigits contra proteïnes específiques en els estudis immunohistoquímics per a detectar la seva possible presència en els grànuls. A la Taula 6 es resumeixen els resultats obtinguts en diversos estudis.

La tinció histoquímica de PAS defineix les estructures granulars hipocampals en totes les soques de ratolins on s'han observat. Aquesta tinció es basa en la l'oxidació mitjançant l'àcid periòdic dels grups 1,2-glicols, és a dir, els grups hidroxil units a dos àtoms de carboni adjacents, habitualment de molècules de carbohidrats (Figura 29). Aquesta reacció dona lloc a dos grups aldehid i al trencament dels enllaços entre els carbonis. La condensació del reactiu de Schiff amb els aldehids té com a resultat la coloració magenta característica d'aquesta tinció (Myers *et al.*, 2002).

En general, la tinció PAS s'utilitza per a detectar glucògen o macromolècules que contenen glicans, com glicoproteïnes, proteoglicans i glicolípidis (Spicer i Schulte, 1992), tot i que d'altres molècules com proteïnes amb terminacions de serina i treonina podrien reaccionar de forma positiva però en menor grau per a aquesta tinció (Spicer, 1961).

D'altres tincions que provoquen un marcatge positiu per als grànuls PAS són la tinció amb iodina (Mitsuno *et al.*, 1999) o modificacions de la tinció PAS, com la tinció de Gomori de metenamina de plata (Akiyama *et al.*, 1986; Jucker *et al.*, 1994). La digestió prèvia dels talls amb l'enzim  $\alpha$ -amilasa permet l'observació d'una lleugera disminució de la intensitat de la tinció de PAS en els grànuls (Akiyama *et al.*, 1986).

El marcatge PAS-positiu després de la digestió amb diastasa descarta una elevada quantitat de glicogen en aquestes estructures (Lamar *et al.*, 1976; Mitsuno *et al.*, 1999). El conjunt d'aquestes tincions positives observades, però especialment la positivitat per a la reacció de PAS, destaca una quantitat important de polisacàrids com a constituents dels grànuls.



**Figura 29.** Reacció de *Periodic Acid Schiff* en una molècula d'hexosa (Aldana Marcos, 2001).

STAINING	REFERENCES
Alcian's Blue	- Akiyama <i>et al.</i> , 1986
$\alpha$ -amylase	d Akiyama <i>et al.</i> , 1986
$\beta$ -amylase	- Akiyama <i>et al.</i> , 1986
Bodian Silver impregnation/B. Protargol	w Akiyama <i>et al.</i> , 1986; Mandybur <i>et al.</i> , 1989
Bulmer-PAS-dimedione	+ Akiyama <i>et al.</i> , 1986
Chrom-Alum Haematoxylin	- Robertson <i>et al.</i> , 1998
Congo Red (Askanas/Alkalyne)	+ Robertson <i>et al.</i> , 1998, 2000
Congo Red (Alkalyne)	- Akiyama <i>et al.</i> , 1986; Mandybur <i>et al.</i> , 1989; Jucker <i>et al.</i> , 1992, 1994b; Takemura <i>et al.</i> , 1993; Mitsuno <i>et al.</i> , 1999
Cresyl violet	- Jucker <i>et al.</i> , 1992; Knuesel <i>et al.</i> , 2009; Kern <i>et al.</i> , 2011
PAS with Diastase	w Lamar <i>et al.</i> , 1976; Mitsuno <i>et al.</i> , 1999
Gomori Aldehyde Fuchsin	- Robertson <i>et al.</i> , 1998
Gomori's methenamine silver (Grocott's)	+ Jucker <i>et al.</i> , 1992; Jucker <i>et al.</i> , 1994
Haematoxylin & Eosin	- Akiyama <i>et al.</i> , 1986; Jucker <i>et al.</i> , 1992; Mandybur <i>et al.</i> , 1989; Mitsuno <i>et al.</i> , 1999; Robertson <i>et al.</i> , 1998, 2000; Takemura <i>et al.</i> , 1993; Ye <i>et al.</i> , 2004
Iodine	+ Mitsuno <i>et al.</i> , 1999
Iodine	w Akiyama <i>et al.</i> , 1986
Kluver-Barrera (luxol fast blue+cresyl violete)	- Akiyama <i>et al.</i> , 1986; Mandybur <i>et al.</i> , 1989
Luxol fast blue	- Jucker <i>et al.</i> , 1992
Millon Schiff	- Akiyama <i>et al.</i> , 1986
Neutral Red	- Takemura <i>et al.</i> , 1993
Ninhydrin-Schiff	- Akiyama <i>et al.</i> , 1986
Nissl staining	- Mandybur <i>et al.</i> , 1989
Oil red O	- Akiyama <i>et al.</i> , 1986
PAS, periodic acid-schiff	+ Akiyama <i>et al.</i> , 1986; Jucker <i>et al.</i> , 1992; Kern <i>et al.</i> , 2011; Kuo <i>et al.</i> , 1996; Lamar <i>et al.</i> , 1976; Mandybur <i>et al.</i> , 1989; Mitsuno <i>et al.</i> , 1999; Nakamura <i>et al.</i> , 1995; Robertson <i>et al.</i> , 1998, 2000; Takemura <i>et al.</i> , 1993; Veurink <i>et al.</i> , 2003; Ye <i>et al.</i> , 2004
Perl's Prussian Blue reaction	- Robertson <i>et al.</i> , 1998
Schiff	- Akiyama <i>et al.</i> , 1986
Okamoto alpha-naphtol	- Akiyama <i>et al.</i> , 1986
Silver staining	+ Doehner <i>et al.</i> , 2012
Sudan Black B	- Akiyama <i>et al.</i> , 1986
Thioflavine S	+ Jucker <i>et al.</i> , 1992, 1994; Doehner <i>et al.</i> , 2010
Thioflavine S	- Mandybur <i>et al.</i> , 1989; Takemura <i>et al.</i> , 1993
Thionin	- Jucker <i>et al.</i> , 1992
Toluidine blue	- Akiyama <i>et al.</i> , 1986; Robertson <i>et al.</i> , 1998

**Taula 6. Tincions histoquímiques realitzades en clústers de grànuls PAS.** A la columna central s'indica si el marcatge realitzat va resultar positiu (+), negatiu (-), lleugerament positiu (w) o va disminuir després d'un tractament enzimàtic (d).

D'altra banda, hi ha certa controversia respecte als resultats de la tinció de tioflavina S en els grànuls. Tot i que alguns estudis mostren positivitat per a alguns dels grànuls constituents dels clústers (Doehner *et al.*, 2010; Jucker *et al.*, 1992, 1994a, 1994b; Kocherhans *et al.*, 2010), hi ha d'altres estudis on no s'ha aconseguit reproduir aquests resultats (Mandybur *et al.*, 1989; Takemura *et al.*, 1993). És interessant el fet que en els treballs on s'ha observat grànuls positius per a la tioflavina S la tinció no s'observa en tots els grànuls del clúster, sinó que és només parcial. Un cas similar s'observa amb la tinció vermella de Congo, ja que tot i que en algun estudi s'ha observat una reacció positiva d'alguns dels grànuls que formen els clústers (Robertson *et al.*, 1998); hi ha un elevat nombre d'estudis on la tinció de vermell de Congo no tenyeix els grànuls PAS (Akiyama *et al.*, 1986; Jucker *et al.*, 1992, 1994b; Mandybur *et al.*, 1989; Takemura *et al.*, 1993). Ambdues tincions permeten detectar la presència d'estructures amiloides en el teixit, i per tant, la naturalesa amiloidea dels grànuls PAS de l'hipocamp sembla dubtosa.

Apart d'aquestes tincions histoquímiques, s'ha analitzat també l'activitat enzimàtica de MAO-B en els grànuls dels clústers de l'hipocamp de ratolins envellits SAMP8 (Nakamura *et al.*, 1995). És interessant el fet que els grànuls mostren una reactivitat positiva específica per a MAO-B, un enzim del qual se n'ha descrit la seva presència a la membrana mitocondrial externa de les neurones serotoninèrgiques i histaminèrgiques i de les cèl·lules glials (Shih *et al.*, 1999).

Els marcatges immunohistoquímics en talls histològics i seccions ultrafines han estat àmpliament utilitzats per a descriure la presència de molècules concretes en els grànuls PAS positius. Així doncs, en corcondança amb la reactivitat PAS positiva, s'han detectat glicoproteïnes i proteoglicans (Akiyama *et al.*, 1986; Kuo *et al.*, 1996; Takemura *et al.*, 1993), a més a més de proteïnes de matriu extracel·lular, com l'HSPG, les proteïnes d'unió a la laminina (Jucker *et al.*, 1992, 1994; Kuo *et al.*, 1996) o la reelina (Knuesel *et al.*, 2009). L'anticòs KM279, generat a partir dels poliglucosans de CoA humans, va reaccionar intensament amb els grànuls de l'hipocamp de ratolins AKR envellits (Mitsuno *et al.*, 1999).

La reactivitat positiva per als grànuls PAS també s'ha observat amb anticossos dirigits contra algunes proteïnes intracel·lulars pròpies de malalties neurodegeneratives. És el cas dels pèptids o formes protofibril·lars d'A $\beta$  (Doehner *et al.*, 2010; Knuesel *et al.*, 2009; Oddo *et al.*, 2003; Robertson *et al.*, 1998, 2000; Wirak *et al.*, 1991), la ubiquitina (Robertson *et al.*, 1998; Soontornniyomkij *et al.*, 2012), l' $\alpha$ -sinucleïna (Krass *et al.*, 2003), la tubulina (Corsetti *et al.*, 2011) o la proteïna tau (Kern *et al.*, 2011; Rachubinski *et al.*, 2012). En algunes descripcions s'ha pogut apreciar una distribució diferenciada en els mateixos grànuls dels epítops marcats pels anticossos. Per exemple, l'HSPG s'uneix a la perifèria dels grànuls, mentre que els anticossos dirigits contra la proteïna d'unió a la laminina s'emmarquen en una situació principalment central (Kuo *et al.*,

1996). Malgrat que en general s'accepta que els grànuls són intracel·lulars, no només per la detecció dels components d'aquest origen, sinó també pels estudis ultraestructurals, hi ha alguns articles que assenyalen aquests dipòsits com a extracel·lulars, especialment en els clústers corresponents al cerebel (Doehner *et al.*, 2010; Kern *et al.*, 2011; Knuesel *et al.*, 2009; Mitsuno *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2004). Els resultats referents a la composició a partir d'aquests marcatges immunohistoquímics ha afavorit la comparació d'aquestes lesions a les observades en neuropatologies humanes, per exemple, plaques senils, o lesions de tauopaties. Tot i així, hi ha diverses interpretacions sobre la possible significància fisiopatològica dels grànuls a partir de la seva composició, com s'exposa a l'apartat 4.10.

Tot i que la composició proteica dels grànuls s'ha estudiat amb força profunditat, hi ha diverses contradiccions entre els resultats dels estudis immunohistoquímics. És el cas de Wirak *et al.* (1991), que van descriure la presència de dipòsits d'A $\beta$  a l'hipocamp de ratolins transgènics que expressaven A $\beta$  humana a partir de la immunotinció amb anticossos anti-A $\beta$ , tot i que posteriorment, Jucker *et al.* (1992) van mostrar que aquests dipòsits corresponien molt probablement als grànuls PAS positius presents també en els ratolins envellits C57BL/6, soca del rerefons genètic dels animals transgènics A $\beta$ . La preadsorció dels anticossos policlonals dirigits contra A $\beta$  amb els pèptids sintètics corresponents va confirmar la inespecificitat dels marcatges immunohistoquímics amb aquests anticossos policlonals. Com a resultat d'aquestes inespecificitats, els grànuls PAS s'anomenen també cossos de Wirak. Aquestes observacions sobre els falsos marcatges es van repetir també en d'altres anticossos policlonals que detectaven somatostatina i neurotensina (Jucker *et al.*, 1992). Cal destacar que la purificació per afinitat de l'anticòs dirigit contra la proteïna d'unió a laminina, utilitzat prèviament per al marcatge dels grànuls, va disminuir el marcatge observat en els grànuls d'aquests animals (Jucker *et al.*, 1992). La inespecificitat del marcatge dels anticossos va ser confirmada més endavant quan es va observar la tinció dels grànuls PAS amb diversos antisèrums i amb sèrum preimmune de conill (Takemura *et al.*, 1993), tot i que en aquest últim cas Knuesel *et al.* (2009) no van observar reactivitat dels grànuls PAS.

Malgrat la detecció d'aquestes inespecificitats, hi ha algun estudi realitzat en ratolins ApoE-deficients on s'ha descrit la detecció immunohistoquímica específica de pèptids A $\beta$  amb anticossos dirigits contra els residus 17-24 i 35-43, comprovada amb la preadsorció dels pèptids corresponents i amb controls positius de seccions de cervell de malalts d'AD, tot i que no es va observar reactivitat per als anticossos dirigits contra els aminoàcids 1-16 (Robertson *et al.*, 1998). També en el treball de Doehner *et al.* (2010) es va determinar l'especificitat del marcatge de la reelina en els grànuls PAS d'algunes soques de ratolins a partir de la immunotinció de mostres dels ratolins *reeler* *orleans*. Els resultats per a aquests animals transgènics van ser negatius.

#### **4.5. Ultraestructura**

L'estudi de l'ultraestructura dels grànuls PAS a través de microscòpia electrònica de transmissió ha facilitat la comprensió de l'estructura fina dels grànuls i ha permès aprofundir en la seva composició. Els grànuls PAS estan constituïts d'una estructura central fibril·lar envoltada per una regió translúcida o halo. Aquesta regió és delimitada per membranes plasmàtiques discontinües, que suggereixen un origen intracel·lular dels grànuls. El centre del grànuls té forma arrodonida o ovoide i contorns rugosos, i les estructures que el formen estan agregades de forma desordenada. La seva aparença és membranosa, i no és similar a cap orgànul cel·lular. Els filaments que formen els grànuls poden estar ocasionalment ramificats, i tenen un diàmetre d'entre 5 i 8 nm, però una llargada indeterminada (Robertson *et al.*, 2000). A la regió de l'halo es poden identificar alguns orgànuls en procés de degeneració. En ocasions, la membrana discontinüa que envolta els grànuls presenta contactes especials amb les estructures col·lindants, semblants a una unió estreta (Kuo *et al.*, 1996; Robertson *et al.*, 1998; Mitsuno *et al.*, 1999; Doehner *et al.*, 2010).

La localització prominent dels grànuls a l'hipocamp dels animals envellits ha facilitat la seva identificació en els estudis de microscòpia electrònica, però la particularitat de la seva estructura fa difícil la comprensió del procés de formació a nivell ultraestructural així com la identificació de l'origen cel·lular, tal i com s'explica en el proper apartat.

#### **4.6. Origen cel·lular**

Una de les controvèrsies més importants pel que fa als grànuls PAS positius és el seu origen cel·lular, ja sigui neuronal o astrocític. Cal assenyalar que l'estat de degeneració del citoplasma que envolta els grànuls ha dificultat força la identificació de les cèl·lules que contenen aquestes estructures (Kuo *et al.*, 1996; Mitsuno *et al.*, 1999). Nakamura *et al.* (1995) proposa la possibilitat que la degeneració observada sigui el resultat de l'elevada activitat enzimàtica de MAO-B observada en els clústers, ja que d'aquesta activitat se'n deriven metabòlits tòxics que poden afavorir una degeneració cel·lular.

L'origen neuronal dels grànuls PAS s'ha hipotetitzat en base a l'observació de possibles vesícules i contactes sinàptics amb la membrana plasmàtica dels grànuls (Mitsuno *et al.*, 1999), així com la localització dels grànuls en terminals presinàptics o postsinàptics anòmals (Iriño *et al.*, 1994), o la seva presència i connectivitat en processos neuronals identificats com a dendrites (Wirak *et al.*, 1991; Doehner *et al.*, 2012). És interessant la relació significativa observada entre el nombre de clústers de reelina i les varicositats axonals de neurones colinèrgiques hipocampals, fet que suggereix una relació específica amb les neurones colinèrgiques (Madhusudan *et al.*, 2009). La presència dels clústers formats per grànuls sembla produir una pèrdua de neurones del còrtex basal de tipus gabaèrgic i colinèrgic (Madhusudan *et al.*, 2009). També en els animals amb una disfunció prenatal immunitària, que presenten una elevada quantitat de grànuls,



s'ha observat una associació entre els grànuls marcats amb anti-reelina i la MBP, observant reactivitat en el compartiment intraaxonal (Doehner *et al.*, 2012). A més a més, la descripció d'alguns components d'origen neuronal com a constituents dels grànuls, tals com els pèptids  $\beta$ -amiloide (Robertson *et al.*, 1998; Knuesel *et al.*, 2009), la proteïna tau (Kern *et al.*, 2011; Rachubinski *et al.*, 2012), el receptor 2 de l'ApoE, la proteïna Dab1 o Fe65, o la reelina (Knuesel *et al.*, 2009), assenyalen l'origen neuronal, o si més no, la participació d'aquestes cèl·lules en la formació de les estructures granulars. En alguns treballs, els grànuls s'han interpretat com a neurites distròfiques (Corsetti *et al.*, 2011) o com a autofagosomes presents en neurones (Soontornniyomkij *et al.*, 2012) principalment a causa dels components identificats en els marcatges immunohistoquímics.

Tot i així, és evident l'estreta relació entre els grànuls i els astròcits observada de forma transversal. En estudis de microscòpia electrònica s'ha observat la presència de grànuls en cossos cel·lulars i especialment en processos d'astròcits protoplasmàtics expandits, i amb un contingut citoplasmàtic força diluït (Robertson *et al.*, 1998). A més a més s'han observat alguns gliofilaments a la perifèria de grànuls, així com processos astrocítics al seu voltant. També s'ha detectat la presència d'aquestes estructures en el citoplasma i el soma de les cèl·lules glials, o en estreta associació amb la micròglia i els astròcits (Doehner *et al.*, 2012). Els grànuls s'han associat amb processos d'astròcits GFAP-positius en treballs realitzats amb microscopi òptic i confocal, on s'ha pogut quantificar una associació entre els clústers i els elements glials d'entre un 60 i un 80% (Akiyama *et al.*, 1986; Jucker *et al.*, 1994a, 1994b; Knuesel *et al.*, 2009; Madhusudan *et al.*, 2009; Nakamura *et al.*, 1995), i en ocasions s'ha pogut associar directament un astròcit GFAP-positiu amb un clúster, fins i tot amb una situació astrocítica del nucli central respecte el clúster de grànuls PAS (Jucker *et al.*, 1994a; Nakamura *et al.*, 1995). L'activitat enzimàtica específica de MAO-B observada en els grànuls s'ha observat també en astròcits hipocampals independentment de la seva associació a clústers (Nakamura *et al.*, 1995). La presència dels grànuls en cèl·lules perivasculars (Lamar *et al.*, 1976; Mandybur *et al.*, 1989), així com l'estreta associació d'alguns clústers amb els capil·lars sanguinis (Ye *et al.*, 2004) ha facilitat l'associació d'aquestes estructures amb els peus d'astròcits que envolten els capil·lars cerebrals, observades també en preparacions ultraestructurals (Doehner *et al.*, 2010; Robertson *et al.*, 1998). S'ha proposat, doncs, que la relació entre els grànuls i els astròcits podria ser un producte neuronal fagocitat pels astròcits (Kuo *et al.*, 1996; Madhusudan *et al.*, 2009) o bé una estructura produïda per aquestes mateixes cèl·lules (Kuo *et al.*, 1996). Recentment, s'ha proposat que la formació dels grànuls de l'hipocamp seria el resultat d'una estratègia protectiva enfront de la disfuncionalitat del sistema de degradació proteosomal-lisosomal de les neurones, incapaç de fer front a la digestió dels grànuls. L'acumulació de proteïnes malmeses o malplegades formaria cossos d'extrusió que serien posteriorment fagocitats per la glia (Doehner *et al.*, 2012).

#### **4.7. Alteracions funcionals associades**

L'abundant nombre de grànuls PAS descrit a l'hipocamp de ratolins d'edats avançades, així com l'alteració observada a l'entorn proper d'aquests grànuls en els estudis ultraestructurals, són factors que s'han postulat com a possibles causants d'algunes disfuncionalitats pròpies de l'envelliment. Donat que l'hipocamp té un paper essencial en la memòria, una de les alteracions més estudiades en aquests ratolins a través de diversos tests (apartat 3.3.1) és la seva disfunció.

En una avaluació de la memòria mitjançant el laberint de Morris a ratolins C57BL/6 de 24 mesos d'edat no es va trobar una relació significativa entre el nombre de clústers de l'hipocamp i els resultats d'aquest test (Jucker *et al.*, 1994a).

El test del laberint de braços és un altre test realitzat en diferents grups d'edat de ratolins C57BL/6 (Knuesel *et al.*, 2009). En aquest estudi és van voler avaluar els efectes deleteris de l'envelliment en l'expressió de la reelina i la seva relació amb la memòria. La presència de reelina es va expressar amb una ratio entre el nombre de cèl·lules positives per a la tinció de reelina i el nombre de clústers de reelina. La correlació entre aquesta ratio i els resultats observats en el test del laberint radial en els grups de 4-5 mesos així com en el grup de ratolins envellits de 20-23 mesos va suggerir una disfunció de memòria relacionada amb els canvis observats en la reelina, entre ells l'augment dels clústers de l'hipocamp.

Els dèficits de la memòria d'episodis recents, una altra característica de l'envelliment, i la presència de clústers de grànuls s'han estudiat a través del test de reconeixement d'objectes (Soontornniyomkij *et al.*, 2012). Els resultats van mostrar una relació significativa inversa entre el temps de discriminació dels objectes i la presència de clústers tenyits amb LC3 o p62, ambdues proteïnes relacionades amb processos d'autofàgia. Malgrat això, no es va observar aquesta correlació amb els marcatges immunohistoquímics dels clústers MAP2 o ubiquitina.

Donat que els grànuls PAS es desenvolupen també en el cerebel, regió associada a l'activitat motora, s'ha avaluat la relació entre la seva presència a les soques de ratolins SAMP8, SAMR1 i C57BL/6 als 6, 9 i 15 mesos i l'activitat memorística i motora als 3, 7 i 13 mesos d'edat. No s'han pogut trobar relacions significatives entre la presència de grànuls i les activitats avaluades amb el test del camp obert, la corda fluixa i el test de Morris (Ingram *et al.*, 1994).

#### **4.8. Heretabilitat**

Per tal d'analitzar l'heretabilitat dels grànuls en els ratolins s'han realitzat estudis de creuaments entre soques que no desenvolupen aquestes estructures, com les soques DBA, C3H i BALB/C, i la soca C57BL/6, que desenvolupa grànuls PAS a l'hipocamp (Jucker *et al.*, 1994a, 1994b). L'anàlisi de la presència de grànuls PAS hipocampals a la

generació F1 de les soques híbrides B6D2, B6C3 i CB6, que corresponen respectivament a les soques DBA, C3H i BALB/C, revelen una aparent heretabilitat dominant de la presència d'aquests dipòsits (Jucker *et al.*, 1994a, 1994b).

L'herència del desenvolupament dels clústers es va analitzar amb més profunditat a partir de l'estudi dels possibles locus genètics que podien transmetre aquest caràcter fenotípic. Per això, es van quantificar els clústers de l'hipocamp a la generació F2 del creuament entre les soques C57BL/6 i DBA/2J i es van analitzar els locus genètics d'aquesta generació (Krass *et al.*, 2003). Els resultats van determinar la influència significativa de locus situats de forma molt propera al marcador D7Mit91, a la regió proximal del cromosoma 7, i amb menor puntuació uns altres locus situat al cromosoma 10, propers als marcadors D10Mit15 i D10Mit10 (Krass *et al.*, 2003). En els tres locus, l'al·lel B tenia un efecte dominant que conferia una major densitat de lesions. Malgrat que s'han pogut determinar els locus que participen en l'heretabilitat dels grànuls, no s'han arribat a especificar els gens que intervenen directament en aquest procés. Les especulacions que s'han fet sobre possibles gens situats en aquests locus parteixen principalment dels resultats dels estudis dels marcatges immunohistoquímics que, d'altra banda, resulten contradictoris.

#### **4.9. Efecte de manipulacions i tractaments**

Les manipulacions dietètiques són un dels tipus de tractaments més estudiats. L'administració *ad libitum* d'una dieta normal, greixosa, i una dieta greixosa suplementada amb antioxidants durant 3 mesos en un grup de ratolins ApoE-deficients de 12 mesos d'edat va mostrar una reducció interessant de la quantitat de clústers de l'hipocamp en els ratolins que van rebre una dieta greixosa suplementada amb antioxidants (Veurink *et al.*, 2003). En el grup de la dieta greixosa amb antioxidants es va reduir de forma significativa i fins a deu vegades la presència de clústers de grànuls PAS respecte la dieta normal. D'altra banda, no es van observar diferències en els ratolins ApoE-deficients entre el grup alimentat amb una dieta normal i una dieta greixosa. Segons els autors d'aquest estudi, els resultats mostren la implicació de mecanismes oxidatius no només en la formació, però possiblement també en el procés de manteniment d'aquestes inclusions en el parènquima cerebral. A més a més, aquests estudis suggereixen la importància dels lípids oxidats en la formació dels clústers de grànuls PAS. En qualsevol cas, aquests resultats donen suport a una contribució important de l'estrés oxidatiu en la neuropatologia observada en aquesta soca.

Els efectes de la dieta greixosa sobre els clústers de l'hipocamp van ser diferents en un altre treball en el qual es va administrar aquesta dieta durant 15 setmanes a ratolins BXD de 12 mesos d'edat, que representen la primera generació d'un creuament de la soca C57BL/6 amb la soca DBA/2 (Krass *et al.*, 2003). El grup administrat amb la dieta greixosa va mostrar una elevació de la ratio de colesterol LDL/VLDL i una disminució de

l'HDL, triglicèrids i àcids grassos lliures significatives respecte el grup administrat amb dieta normal (Colinayo *et al.*, 2003; Krass *et al.*, 2003). D'aquestes variables, només els nivells plasmàtics d'HDL es van correlacionar positivament en ambdós grups amb el nombre de clústers de grànuls PAS de l'hipocamp (Krass *et al.*, 2003).

D'altres tractaments han mostrat canvis també en el nombre de clusters de l'hipocamp. Per exemple, la substitució de la medul·la òssia en ratolins ApoE-deficients va mostrar una disminució significativa del nombre de clústers presents a l'hipocamp d'aquests ratolins en comparació als ratolins no tractats (Robertson *et al.*, 2000). A més a més, la inducció d'una neuroinflamació crònica (Meyer *et al.*, 2006) va provocar un augment significatiu del nombre d'aquestes estructures respecte el grup control (Doehner *et al.*, 2012; Knuesel *et al.*, 2009). Finalment, la implantació de cèl·lules mare neurals en ratolins trisòmics Ts65Dn va mostrar un descens significatiu de la presència de clústers a l'àrea CA1 de l'hipocamp d'ambdós genotips (Kern *et al.*, 2011).

#### **4.10. Significació fisiopatològica**

Malgrat que s'ha realitzat un ampli estudi dels grànuls PAS i el seu desenvolupament en la formació hipocampal dels ratolins de diverses soques, les diferents interpretacions sobre el significat fisiopatològic d'aquestes estructures són quasi tan nombroses com els treballs que les estudien.

Així doncs, hi ha nombrosos treballs que assenyalen la seva similitud amb els CoA, estructures presents en el cervell humà i associades a l'envelliment, que a més a més es tenyeixen positivament per a la tinció PAS i poden ser presents en astròcits i en neurones (apartat 4.6). Tot i que aquestes i d'altres característiques dels CoA suggereixen una possible similitud amb els grànuls PAS (Mitsuno *et al.*, 1999), hi ha també diferències importants que ressalten la disparitat d'ambdues estructures (Akiyama *et al.*, 1986; Jucker *et al.*, 1994a, 1994b; Robertson *et al.*, 2000), com per exemple, la resposta dels grànuls PAS a la digestió amb diastasa, les reaccions a diverses tincions histoquímiques, la relació ocasional amb els vasos sanguinis i la focalització important dels grànuls PAS a l'hipocamp, divergents de les característiques dels CoA (Cavanagh *et al.*, 1999; Robertson *et al.*, 1998).

En múltiples ocasions els grànuls s'han interpretat com a plaques senils o dipòsits no fibril·lars de pèptids A $\beta$  a causa de la seva tinció positiva per a vermell de Congo, tioflavina S o el marcatge amb anticossos monoclonals dirigits contra fragments del pèptid A $\beta$  (Doehner *et al.*, 2010; Robertson *et al.*, 2000; Wirak *et al.*, 1991). Tal com s'indicava amb anterioritat, però, hi ha diversos estudis que no han estat capaços de reproduir els resultats o que han trobat inespecificitats en els marcatges immunohistoquímics (Jucker *et al.*, 1992; Kern *et al.*, 2011; Krass *et al.*, 2003). Malgrat l'evident aparença fibril·lar de l'ultraestructura dels grànuls PAS, s'ha indicat també que

hi ha diferències respecte l'organització de l'estructura amiloide observada habitualment en plaques senils (Jucker *et al.*, 1994a).

D'altra banda, la reactivitat dels grànuls PAS amb marcatges immunohistoquímics realitzats amb anticossos dirigits contra filaments intracel·lulars i la proteïna tau ha afavorit la interpretació dels grànuls PAS com a lesions pròpies de les tauopaties (Krass *et al.*, 2003; Kern *et al.*, 2011).

En una línia diferent a l'observada en la resta de treballs, Soontornniyomkij *et al.* (2012), a partir dels marcatges immunohistoquímics realitzats amb diversos marcadors d'autofàgia com la ubiquitina, la LC3 i la p62, va concloure que les estructures hipocampals observades en els ratolins ICR-CD1 envellits corresponen a autofagosomes formats com a conseqüència d'una ineficiència en l'aclariment de les acumulacions proteiques i l'alteració de la proteòstasi associada a l'augment de l'edat.

Finalment, cal destacar que Knuesel *et al.* (2009) van identificar els grànuls PAS en marcatges immunohistoquímics amb un anticòs dirigit contra la reelina. El declivi de l'expressió d'aquesta glicoproteïna en un subgrup de neurones es va associar a un procés paral·lel al desenvolupament dels grànuls hipocampals marcats amb anticossos anti-reelina. Així doncs, com a resultat de diversos estudis (Knuesel *et al.*, 2009; Madhuhusan *et al.*, 2009; Doehner *et al.*, 2010; Kocherhans *et al.*, 2010) s'ha postulat la hipòtesi que els grànuls PAS poden ser cossos d'extrusió resultants de l'acumulació anòmala de proteïnes en neurones, com a resultat de la fallada dels sistemes d'eliminació del proteasoma i l'autofagosoma. L'observació ultrastructural dels grànuls evidencia una elevada quantitat de debris cel·lulars, vacuoles, neurofilaments dispersos i mitocondris desintegrats entre d'altres estructures de difícil identificació (Doehner *et al.*, 2012). Aquestes cossos serien fagocitats posteriorment per cèl·lules glials, ja sigui micròglia o astròcits, per tal d'afavorir la seva eliminació i evitar una neurodegeneració progressiva com a resultat de l'acumulació de proteïnes a nivell intracel·lular. Segons els autors, aquest fenomen seria una estratègia protectora de les neurones enfront de l'acumulació intracel·lular de proteïnes associada a l'augment de l'edat, que podria ser agreujada per la prolongada exposició a moduladors inflamatoris i la disfunció de l'homeostasi lipídica i del colesterol associades a l'envelliment (Doehner *et al.*, 2012).

La varietat de les possibles hipòtesis exposades en aquest apartat sobre la significança fisiopatològica dels grànuls PAS desenvolupats a l'hipocamp dels ratolins envellits evidencien la necessitat d'aprofundir en l'estudi d'aquestes estructures per a dilucidar el seu paper en l'envelliment del cervell i les malalties neurodegeneratives.

## **5. ANTECEDENTS:**

Els ratolins SAMP8 són un model ben establert de senescència, i el seu ús per a l'estudi de l'AD s'ha estès a causa de la manifestació espontània dels trets histopatològics distintius d'aquesta malaltia. Així doncs, les alteracions en l'expressió dels pèptids d'A $\beta$ , la hiperfosforilació de tau, l'augment de l'estrès oxidatiu i la gliosi el fan un model atractiu per a l'estudi dels primers estadis de l'AD esporàdica i la seva relació amb l'envelliment (Pallàs *et al.*, 2008). És per això que els ratolins SAMP8 s'estan utilitzant per a caracteritzar les conseqüències fisiològiques i comportamentals de l'AD i per a investigacions bàsiques i terapèutiques d'aquesta malaltia (Cheng *et al.*, 2014). Tot i així, la cronologia d'aparició de les característiques fisiopatològiques dels ratolins SAMP8 no s'ha establert formalment (Pallàs *et al.*, 2008), i hi ha certes controvèrsies en alguns estudis realitzats en aquests ratolins, que qüestionen l'utilitat d'aquest rosegador com a model d'estrès oxidatiu i d'inflamació (Schiborr *et al.*, 2013).

En estudis recents del nostre grup es va identificar la presència de grànuls amiloides agrupats en forma clústers a l'hipocamp ratolins SAMP8 mitjançant marcatges immunohistoquímics amb anticossos dirigits contra l'A $\beta$ <sub>40</sub>, l'A $\beta$ <sub>42</sub> i l'A $\beta$ PP (Del Valle *et al.*, 2010). Aquests clústers amiloides s'inicien a la zona CA1 de l'hipocamp al voltant dels tres mesos d'edat, i augmenten progressivament en nombre i extensió (apartat 3.4.12). La cronologia d'aparició i la morfologia dels clústers d'agregats exposades en aquest treball són molt similars a les descrites anteriorment per als grànuls PAS, presents en aquesta mateixa soca (Akiyama *et al.*, 1986; Kuo *et al.*, 1996). Tot i així, no s'ha estudiat la coincidència o associació entre ambdues estructures.

Els grànuls PAS estan constituïts per una elevada proporció de macromolècules de carbohidrats, glicoproteïnes i proteoglicans, com indica la seva reacció positiva per a la tinció PAS (Spicer i Schulte, 1992). Entre elles, s'ha detectat la presència d'HSPG a través d'immunomarcats de seccions ultrafines (Jucker *et al.*, 1992). A més a més, els grànuls PAS s'han descrit també en d'altres soques de ratolins (Jucker *et al.*, 1994a, 1994b; Knuesel *et al.*, 2009); però hi ha certa controvèrsia sobre el paper fisiopatològic d'aquestes estructures i la presència d'alguns components, entre ells els pèptids d'A $\beta$  (Jucker *et al.*, 1992).

D'altra banda, les lesions cerebrals de les malalties neurodegeneratives contenen un elevat nombre de components secundaris (Armstrong *et al.*, 2008), i de fet s'ha detectat l'HSPG en les plaques senils de malalts d'AD (Eikelenboom *et al.*, 1994). De la mateixa manera, però, tant l'HSPG com l'A $\beta$  són també components secundaris de lesions cerebrals com els NFT (Yamaguchi *et al.*, 1991), i els pèptids d'A $\beta$  s'han detectat ocasionalment a les plaques constituïdes per Prp (Freixes *et al.*, 2004). La identificació de la proteïna patològica principal d'una lesió és difícil quan hi ha d'altres constituents presents, com ara productes cel·lulars derivats i compostos adquirits posteriorment a partir de la unió d'altres proteïnes (Armstrong, 2012). També cal tenir

en compte que la composició química d'una lesió pot variar en funció de l'edat, i en ocasions l'activitat de la proteïna principal podria disminuir o patir alteracions substancials (Armstrong *et al.*, 2008). Sembla adequat, doncs, ampliar l'estudi de la presència d'altres components dels clústers d'agregats amiloides de l'hipocamp dels ratolins SAMP8 per tal d'identificar-ne la composició.

Finalment, cal assenyalar el desconeixement dels mecanismes fisiopatològics que intervenen en la formació dels clústers d'agregats dels ratolins SAMP8. Tot i que s'han suggerit entre les possibles causes de la formació dels agregats el trencament de l'A $\beta$ PP per la via amiloidogènica, l'estrès oxidatiu o la inflamació, es requereixen més estudis per clarificar els possibles mecanismes que originen els agregats presents a l'hipocamp del ratolí SAMP8 (Cheng *et al.*, 2014).

## II. OBJECTIUS





L'objectiu principal d'aquesta tesi és estudiar la composició, l'origen i el desenvolupament dels grànuls que apareixen amb l'edat a l'hipocamp dels ratolins amb senescència accelerada SAMP8. En aquest estudi es pretén aprofundir en el coneixement de la neuropatologia d'aquests ratolins amb la finalitat d'aportar nova informació per al seu ús com a model murí de la malaltia d'Alzheimer.

Els objectius concrets que se'n deriven són els següents:

1. Estudiar la composició dels grànuls de l'hipocamp dels ratolins SAMP8 i determinar quin és el component principal.
2. Descriure l'ordre d'aparició dels components descrits en els grànuls de l'hipocamp dels ratolins SAMP8.
3. Determinar les similituds i la possible coincidència entre els grànuls detectats amb anticossos dirigits contra els pèptids d'A $\beta$  dels ratolins SAMP8 i els grànuls PAS presents a l'hipocamp de ratolins envellits de diverses soques.
4. Estudiar la morfologia i la ultraestructura dels grànuls presents a l'hipocamp dels ratolins SAMP8.
5. Determinar la localització extracel·lular o intracel·lular dels grànuls de l'hipocamp dels ratolins SAMP8 i, en aquest últim cas, el tipus cel·lular i el compartiment cel·lular on es situen.
6. Estudiar els diversos estadis del procés de formació dels grànuls a l'hipocamp de la soca de ratolins SAMP8.
7. Establir analogies entre els grànuls de l'hipocamp dels ratolins SAMP8 i les lesions cerebrals presents a les malalties neurodegeneratives humanes.



## III. RESULTATS



## **1. ARTICLE 1**

### **CHARACTERIZATION OF AMYLOID- $\beta$ GRANULES IN THE HIPPOCAMPUS OF SAMP8 MICE**

Gemma Manich, Clara Mercader, Jaume del Valle, Joaquim Duran-Vilaregut,  
Antoni Camins, Mercè Pallàs, Jordi Vilaplana i Carme Pelegrí

Journal of Alzheimer's Disease 2011; 25: 535–546



## RESUM

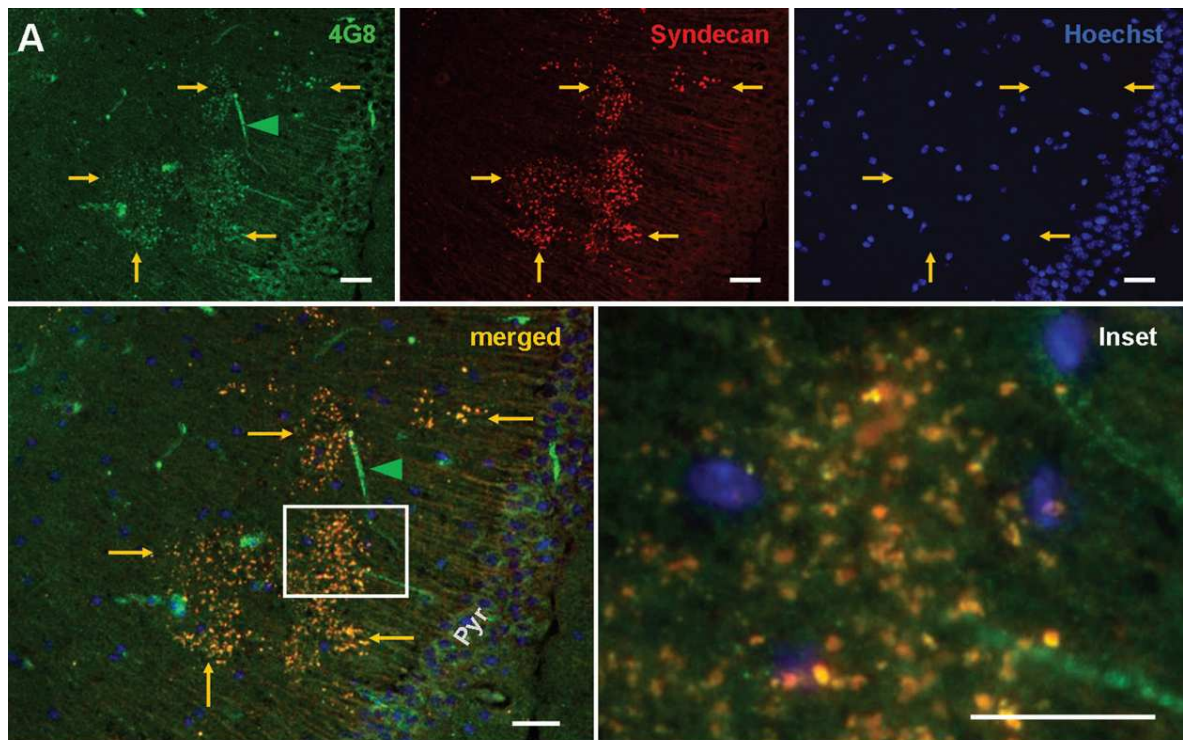
*Objectius:* En aquest treball es pretén determinar si els grànuls amiloides presents a l'hipocamp dels ratolins SAMP8 contenen d'altres proteïnes característiques dels agregats neuropatològics, com la proteïna tau, la MAP2 o l' $\alpha$ -sinucleïna. A més a més, es vol conèixer si aquests agregats corresponen als grànuls PAS, positius per a l'HSPG, ja descrits anteriorment en aquest model animal.

*Material i mètodes:* Es van utilitzar ratolins SAMP8 mascles de 3, 6 i 12 mesos d'edat. Els animals es van anestesiar, es van perfondre amb sèrum fisiològic i es va procedir a l'extracció del seu encèfal, que es va congelar en isopentà i es va guardar a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Es van realitzar seccions criostàtiques de la zona central de l'hipocamp i es van aplicar tècniques immunohistoquímiques, emprant anticossos primaris dirigits contra  $A\beta$ , tau, *syndecan-2* i perlecan -ambdós diferents tipus d'HSPG-, MAP-2, laminina, GFAP, AKT-1,  $\alpha$ -sinucleïna i NeuN (*neuronal nuclei protein*). Les mostres es van analitzar per microscòpia de fluorescència i confocal.

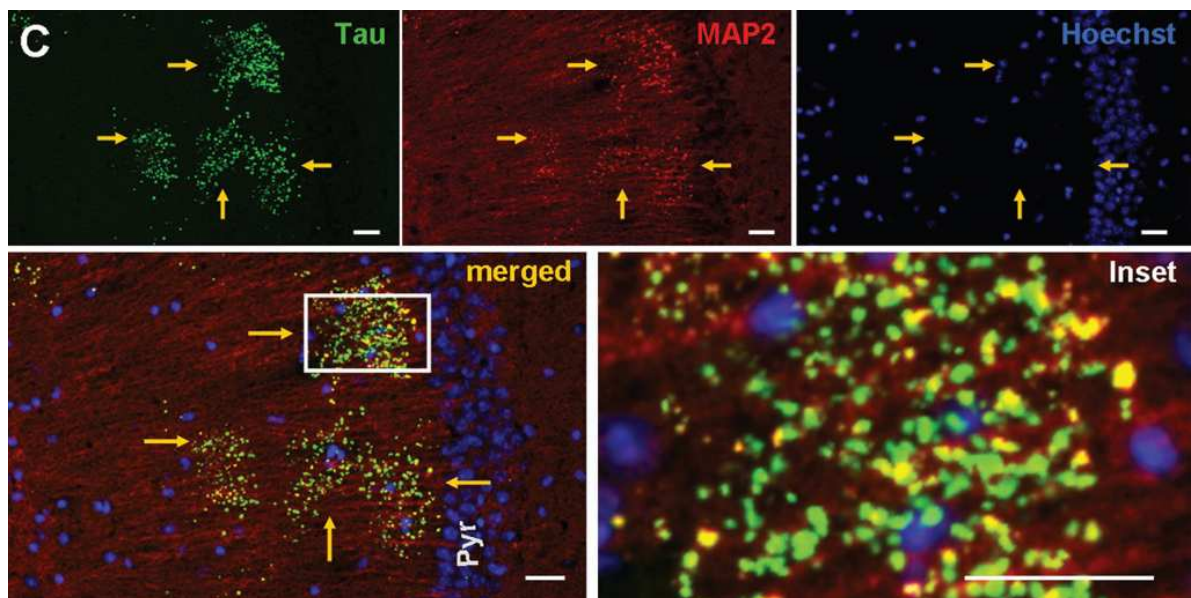
*Resultats:* Els grànuls amiloides de l'hipocamp dels ratolins SAMP8 corresponen a les estructures *Periodic Acid Schiff* positives per a HSPG, com es pot veure per la coincidència de marcatge amb anticossos anti- $A\beta$  i anti-*syndecan-2*, un tipus de glicoproteïna d'HSPG implicada en la remodelació de les espines dendrítiques (Figura 30).

També es va trobar positivitat en els grànuls respecte als marcatges de proteïna tau i MAP2, indicant la seva presència en aquestes estructures (Figura 31), però no en quant a l' $\alpha$ -sinucleïna ni la laminina. El marcatge amb NeuN, proteïna del nucli neuronal que es localitza al nucli i soma, va resultar positiu en els grànuls. Els grànuls es mostraven ocasionalment envoltats per les digitacions d'astròcits, però no tots els clústers de grànuls estaven associats a aquestes cèl·lules.





**Figura 30. Presència de marcatge de  $\beta$ -amiloide i d'heparan-sulfat proteoglicà en els grànuls hipocàmpals d'un ratolí SAMP8 de 6 mesos d'edat.** Marcatge amb 4G8, anticòs anti- $\beta$ -amiloide, en verd, marcatge amb anticòs anti-syndecan-2 en vermell, i tinció de nuclis cel·lulars amb Hoechst en blau. La colocalització del verd i el vermell dona lloc al groc. Les fletxes indiquen clústers de grànuls. Els caps de fletxa indiquen vasos sanguinis. Barra d'escala: 50  $\mu$ m. Pyr: capa piramidal



**Figura 31. Presència de marcatge de tau i MAP2 en els grànuls hipocàmpals d'un ratolí SAMP8 de 6 mesos d'edat.** Marcatge amb l'anticòs anti-tau en verd, marcatge amb l'anticòs anti-MAP2 en vermell i tinció de nuclis cel·lulars amb Hoechst en blau. La colocalització del verd i el vermell dona lloc al groc. Les fletxes indiquen els clústers de grànuls. Barra d'escala: 50  $\mu$ m. Pyr: capa piramidal.

*Conclusions:* La presència de tau, MAP2 i NeuN als grànuls suggereix un origen neuronal. La proteïna tau és el component majoritari i que apareix en primer lloc. A més a més, la presència de *syndecan-2*, indica que aquestes estructures corresponen als grànuls tenyits amb PAS, descrits prèviament en els ratolins SAMP8. Donat que els components identificats estan presents en els agregats d'algunes malalties neurodegeneratives, el model SAMP8 sembla apropiat per estudiar els processos fisiopatològics involucrats en aquestes malalties.



# Characterization of Amyloid- $\beta$ Granules in the Hippocampus of SAMP8 Mice

Gemma Manich<sup>a</sup>, Clara Mercader<sup>a</sup>, Jaume del Valle<sup>a,c</sup>, Joaquim Duran-Vilaregut<sup>a,c</sup>, Antoni Camins<sup>b,c</sup>, Mercè Pallàs<sup>b,c</sup>, Jordi Vilaplana<sup>a,c,1,\*</sup> and Carme Pelegrí<sup>a,c,1</sup>

<sup>a</sup>*Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain*

<sup>b</sup>*Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain*

<sup>c</sup>*CIBERNED Centros de Biomedicina en Red de Enfermedades Neurodegenerativas, Spain*

Accepted 26 February 2011

**Abstract.** The senescence accelerated mouse-prone 8 (SAMP8) strain of mice is an experimental model of accelerated senescence that has also been proposed as a model of Alzheimer's disease as it shares several features with this dementia. We have recently reported amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) granules in the hippocampus of SAMP8 mice, which contain A $\beta$ <sub>42</sub> and A $\beta$ <sub>40</sub> peptides and other amyloid- $\beta$  protein precursor fragments. These granules appear clustered mainly in the *stratum radiatum* of the CA1 region and increase in number and size with age. Here we performed several studies to examine whether the A $\beta$  granules in the hippocampus of SAMP8 mice contain other proteins characteristic of neuropathological aggregates, such as tau, MAP2, and  $\alpha$ -synuclein. Moreover, we examined whether the A $\beta$  granules in the hippocampus correspond to heparan sulphate proteoglycan (HSPG) positive granules previously described in this animal model. The results showed that A $\beta$  granules correspond to the HSPG granular structures, being syndecan-2, a protein involved in the remodeling of dendritic spines, the type of HSPG found. Tau and MAP2, but not  $\alpha$ -synuclein depositions, were also found in A $\beta$  aggregates. Granules do not appear to have an astrocytic origin, since although some A $\beta$  clusters are associated with astrocyte processes, most clusters are not. On the other hand, the presence of tau, MAP2, and NeuN in A $\beta$  granules suggests a neuronal origin. As the components identified in A $\beta$  granules are characteristic of the aggregates present in some neurodegenerative diseases, the SAMP8 model seems to be appropriate for the study of the processes involved in these pathologies.

Keywords: Alzheimer's disease, amyloid- $\beta$ , hippocampus, HSPG, MAP2, SAMP8, syndecan, tau

## INTRODUCTION

The senescence accelerated mouse prone 8 (SAMP8) is a strain of mice with a characteristic accelerated aging process and reduced lifespan. At few months of age, SAMP8 mice share similar characteristics with aged humans, such as lordosis, hair loss, and reduced physical activity [1, 2]. It has recently been proposed as a neurodegeneration model [3] due to impairments in learning tasks, as well as altered

emotions and abnormality of the circadian rhythm [4], spongy degeneration [5], neuronal cell loss [6], and gliosis [7] in the brain. Notably, SAMP8 also show other characteristics seen in Alzheimer's disease (AD) patients, such as learning and memory deficits [7, 8], brain microvessel defects [9], blood-brain barrier dysfunction [10, 11], alteration of the cholinergic system [12], and other neurotransmitter changes [13–15]. Treatment of SAMP8 mice with antisense oligonucleotides directed to the amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) region of amyloid- $\beta$  protein precursor (A $\beta$ PP) decrease the expression of A $\beta$ PP and reverses the deficits in learning and memory that appear in aged SAMP8 mice [16]. This reversion can be mediated by decreasing the free radical-mediated oxidative stress [17].

<sup>1</sup> Contributed equally to this study

\*Correspondence to: Jordi Vilaplana, Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Av. Joan XXIII s/n. 08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 4024505; Fax: +34 93 4035901; E-mail: vilaplana@ub.edu.

Deficits in learning and memory can also be reduced by immunotherapy with antibodies to A $\beta$  protein [18, 19], and it has been demonstrated that this therapy induce acetylcholine increases in the hippocampus of aged SAMP8 [20]. Given such characteristics, it is perhaps not surprising that SAMP8 have also been proposed as an animal model of AD [21, 22].

In a recent study, we reported that SAMP8 animals show A $\beta$  depositions in the hippocampus that increase in number and extent with age, while ICR-CD1 mice only showed an increase of these depositions from 12 months of age onwards [23]. The A $\beta$  deposits are composed of clustered granules that contain A $\beta$ <sub>42</sub>, A $\beta$ <sub>40</sub>, and other A $\beta$  protein precursor fragments. A $\beta$  deposition observed in the hippocampus of SAMP8 animals emulates granular structures previously described in this strain, which stain with periodic acid Schiff (PAS) [24]. PAS staining is mainly used to label structures containing a high proportion of carbohydrate macromolecules such as glycogen, glycoprotein and proteoglycans. The PAS granular structures (PGS) present in SAMP8 mice show this positive staining due to the presence of heparan sulfate proteoglycan (HSPG), because these granules can be immunostained with antibodies against HSPG [25]. Temporal and spatial evolution of A $\beta$  granules and PGS are similar. Both appear at early ages, around 3 months, and increase with age. Their distribution in clusters and their localization, mainly in the *stratum radiatum* of CA1, are also coincident. Either A $\beta$  granules or PGS can also be found in healthy control animals, but at older ages.

HSPG and A $\beta$  proteins are characteristic constituents of various abnormal protein aggregates present in neurodegenerative diseases, e.g., senile plaques and neurofibrillary tangles in AD. The presence of proteins or peptides that can organize in fibrillar structures and form insoluble aggregates, like A $\beta$ , is a distinctive feature of most non-infectious neurodegenerative diseases [26]. The main constituents of these aggregates are A $\beta$  peptide, tau, or synuclein proteins, although these components can coexist in these structures, and the aggregate composition is complex due to the secondary addition of other proteins or molecules [27].

Tau protein is a microtubule associated protein (MAP). While normal tau promotes assembly and stabilizes microtubules, abnormally hyperphosphorylated tau sequesters normal tau, MAP1 and MAP2, and disrupts microtubules. The abnormal hyperphosphorylation of tau promotes its misfolding, decrease in turnover and self-assembly into tangles of paired helical, and/or straight filaments. Disrup-

tion of microtubules by the non-fibrillized abnormally hyperphosphorylated tau, as well as its aggregation as neurofibrillary tangles, probably impairs axoplasmic flow and leads to slow progressive retrograde degeneration and loss of connectivity of the affected neurons. The abnormal hyperphosphorylation of tau is seen as neurofibrillary tangles in neuropil threads and dystrophic neurites and is apparently required for the clinical expression of AD. In related tauopathies this abnormal hyperphosphorylation leads to dementia in the absence of amyloid plaques [28].

Alpha-synuclein is predominantly a neuronal protein, but it is also found in glial cells. In neurons,  $\alpha$ -synuclein localizes mainly in the presynaptic terminals, significantly interacts with tubulin [29] and may act as a potential microtubule-associated protein like tau [30]. There is growing evidence that  $\alpha$ -synuclein is involved in the functioning of the neuronal Golgi apparatus and vesicle trafficking [31]. In pathological conditions  $\alpha$ -synuclein can aggregate to form insoluble fibrils, which are the main component of the Lewy bodies seen in brains from patients with Parkinson's disease and dementia patients. Tubulin, MAP5 and neurofibrillary proteins can also contribute to the formation of these structures. On the other hand,  $\alpha$ -synuclein is also the main component of the glial cytoplasmic inclusions, which can also contain tau and MAP2 as accompanying proteins, among others [32].

The origin and functional significance of PGS in SAMP8 animals remains unclear and, although some degenerative process is suggested by the ultrastructural characteristics, neither the mechanism of this degenerative process nor the cellular compartment where it occurs are known yet. At light-microscopic level, a close anatomical relationship between granules and astrocytes has been established [33]. However, the fibrillar material may be a byproduct of neuronal phagocytosis by astrocytes. Although neuronal phagocytosis is primarily undertaken by microglia, astroglial proliferation and phagocytosis of debris have been reported in the degenerating brain. Studies at the electron microscope revealed that only 5% of the granules were associated with filament bundles [25], what challenges their astrocyte origin. Moreover, it has been reported that similar granules can represent enlarged presynaptic terminals or elements postsynaptic to axon terminals [34], supporting the idea of neuronal origin.

One aim of the present study was to examine whether A $\beta$  clusters in the hippocampus of SAMP8 mice correspond to HSPG positive granules. As the most predominant HSPGs in the central nervous system are

syndecan-2 and perlecan, the former related to the maturation of dendritic spines and the latter to the basal membranes of the brain blood vessels, the presence of these two components was examined. Moreover, we also explored the possible presence of tau, MAP2 and  $\alpha$ -synuclein in these aggregated structures at three different time-points. Finally, we studied the spatial relationship between the amyloid granules in the hippocampus of SAMP8 mice and both astrocytes and neurons.

## MATERIAL AND METHODS

### Animals

Male SAMP8 mice aged 3, 6, and 12 months were used. They were kept in standard conditions of temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and 12:12-h light-dark cycles (300 lux/0 lux). Throughout the study, they had access to food and water *ad libitum*. Studies were performed in accordance with the institutional guidelines for the care and use of laboratory animals established by the Ethical Committee for Animal Experimentation at the University of Barcelona.

### Brain processing

The animals were anaesthetized (i.p.) with 80 mg/Kg of sodium pentobarbital. The thoracic cavity was opened and the animals received an intracardiac gravity-dependent perfusion of 50 mL of phosphate buffered saline (PBS, pH=7.2). After perfusion, brains were dissected, frozen by immersion in isopentane chilled in dry ice and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until sectioning. Thereafter, frozen brains were embedded in OCT cryostat-embedding compound (Tissue-Tek, Torrance, CA), cut into 20- $\mu\text{m}$ -thick sections on a cryostat (Leyca Microsystems, Germany) at  $-22^\circ\text{C}$ , and placed on slides. Sections of the central zone of the hippocampus (at about bregma  $-2.30$ ) were selected according to a mouse brain atlas [35]. Slides containing brain sections were fixed with acetone for 10 min at  $4^\circ\text{C}$ , allowed to dry at room temperature and then stored at  $-20^\circ\text{C}$  until staining.

### Immunohistochemistry

Slides were brought to room temperature before being rehydrated with PBS for 5 min. Sections were then blocked and permeabilized with PBS containing 1% BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich,

Madrid, Spain) and 0.1% Triton-X-100 (Sigma-Aldrich) for 20 min. After two 5-min washes in PBS, brain sections were incubated with the primary antibody (see below) overnight in the dark at room temperature. Slides were washed again and then incubated for 1 h at room temperature in the dark with the secondary antibody (see below). After washing again, nuclear staining was performed by incubating slides in Hoechst (H-33258, Fluka, Madrid, Spain) at  $2 \mu\text{g/ml}$  in PBS for 10 min at room temperature in the dark. Finally, slides were washed and coverslipped with Prolong Gold antifade reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). Staining controls were performed by incubating with PBS instead of the primary antibody or both primary and secondary antibodies. In double stainings, controls for cross reactivity of the antibodies were also performed.

Several primary antibodies were used: mouse monoclonal antibody 4G8, directed against human A $\beta$  (amino acid residues 17–24 of the A $\beta$  peptides, Sigma-Aldrich); mouse monoclonal antibody against tau protein (Millipore, Billeica, MA), which detects all phosphorylated and non-phosphorylated isoforms of tau; polyclonal antibody goat anti-syndecan-2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); rat monoclonal antibody to Heparan Sulphate Proteoglycan or perlecan (Abcam, Cambridge, UK); rabbit polyclonal antibody against MAP2 (Millipore); rabbit monoclonal antibody to laminin (Sigma-Aldrich); chicken polyclonal antibody to glial fibrillary acidic protein or GFAP (Millipore), which was used to localize astrocytes; rabbit polyclonal antibody to AKT1 (Abcam); sheep polyclonal antibody to  $\alpha$ -synuclein (Abcam); and mouse monoclonal antibody raised against a protein called neuronal nuclei protein (NeuN, Millipore).

AlexaFluor 555 donkey anti-goat IgG, AlexaFluor 488, 555 or 660 donkey anti-mouse IgG, AlexaFluor 555 donkey anti-rabbit IgG, AlexaFluor 555 donkey anti-rat IgG and AlexaFluor 488 goat anti-chicken IgG (Invitrogen) were used as secondary antibodies.

### Image acquisition

Images of fluorescence were taken with a fluorescence laser microscope (BX41, Olympus, Germany) and stored in tif format. All images for each set of experiments were acquired with the same microscope, laser and software settings. Some images for fine colocalization analysis were obtained with a confocal scanning laser microscope (TCS/SP2, Leica Microsystems, Germany). Image treatment and analysis were performed by means of the Image J program (National Institute of Health, USA).

## RESULTS

### *Amyloid 4G8<sup>+</sup> granules stain with syndecan-2 but not with perlecan*

In order to discern whether the previously described granules containing A $\beta$  and different fragments of its precursor protein correspond to the HSPG positive granules described by Kuo et al. [25], double immunohistochemical stainings on brains from 6-month-old SAMP8 mice were performed with the 4G8 antibody, which recognizes the 17–24 amino acid residues of A $\beta$  peptides, and antibodies to perlecan or syndecan-2, which are the main HSPG in brain.

Some representative images from these stainings can be observed in Fig. 1. Staining with 4G8 shows the presence of clustered granules in the hippocampus of SAMP8 mice, with the characteristics already published [23]. The staining also shows the neuronal cell bodies and some blood vessels, the walls of which can also contain A $\beta$  accumulation.

Some representative images from these stainings can be observed in Fig. 1. Staining with 4G8 shows the presence of clustered granules in the hippocampus of SAMP8 mice, with the characteristics already published [23]. The staining also shows the neuronal cell bodies and some blood vessels, the walls of which can also contain A $\beta$  accumulation.

Clustered granular structures can also be observed when staining with antibodies to syndecan-2, and the 4G8 and syndecan-2 double staining shows a good granular colocalization (Fig. 1A), thus indicating that the granules contain both components and that A $\beta$  granules correspond to HSPG positive granules. When staining with 4G8 and perlecan, different results were obtained. The antibodies against perlecan label blood vessels, which is not surprising as perlecan is a component of the basal lamina of vessel wall, but amyloid granules are not stained (Fig. 1B). Thus, this 4G8-perlecan combination of antibodies shows clustered granules stained with 4G8 and blood vessels stained by perlecan. In some cases, blood vessels also stained with 4G8, but perlecan staining did not appear in amyloid granules. On the other hand, this double staining shows that there is no direct relationship between the localization of blood vessels and clusters, because the latter can be found both proximal and distal to blood vessels.

Control staining performed using only secondary antibodies or those of cross reactivity did not show any staining of these structures, thus confirming the specificity of the stainings.

### *Amyloid granules contain tau and MAP2 proteins*

In a second set of experiments performed on brains from 6 month old SAMP8 mice, we examined the presence of other characteristic components of insoluble

aggregates that appear in brains that present neurodegenerative pathology.

The presence of tau in amyloid granules was analyzed by double staining with antibodies to tau and syndecan-2. This double staining shows that all syndecan-2 positive granules are also positive for tau antibodies, thus demonstrating that the tau protein is present in amyloid granules (Fig. 2A). On the other hand, not all tau positive granules are stained with the antibodies against syndecan-2 (Fig. 2A inset), but only the largest granules.

In order to determine the presence of MAP2 in the granules, double staining with antibodies directed against this protein and 4G8 was performed. In the hippocampal regions where there are clusters of 4G8-positive granules, there is also granular staining for MAP2 (Fig. 2B). More detailed examination of these stainings, however, indicates that the colocalization of the two proteins is not complete. Although some granules, generally the largest ones, are labeled with both antibodies, MAP2 staining predominates in some and 4G8 prevails in others. Moreover, some granules are only stained with 4G8 or the antibodies to MAP2 (Fig. 2B Inset).

When combining MAP2 and tau staining, tau protein seems to be predominant in the granules, as already seen when double-staining with syndecan-2 and tau (Fig. 2C). Almost all the granules that are labeled with MAP2 are also positive for tau, while some tau<sup>+</sup> granules are not stained with MAP2 (Fig. 2C Inset). Colocalization studies with tau and MAP2 show that there are more granules stained with tau than with MAP2, and that all granules stained with MAP2 are also positive for the tau staining (Fig. 2C).

Laminin staining gave no positive label in the granular aggregates, although the antibody clearly labeled blood vessels, as expected as it stained the basal lamina. On the other hand, antibodies against  $\alpha$ -synuclein did not stain granules or other structures in the hippocampus of SAMP8 mice (data not shown).

The staining of tau, syndecan, 4G8 and MAP2 has also been studied in the hippocampus of SAMP8 mice aged 3 and 12 months. As can be observed in Fig. 3A and 3B, and according to what has been already published about A $\beta$  staining in this strain [22], at 3 months of age there are few clusters and those contain only some granules, while at 12 months the number of clusters is markedly higher than at younger ages, these clusters contain numerous granules and they extend throughout the hippocampus. At 3 months of age double staining with tau and syndecan-2 (Fig. 3A) and tau and MAP2 (Fig. 3E) show that there are some

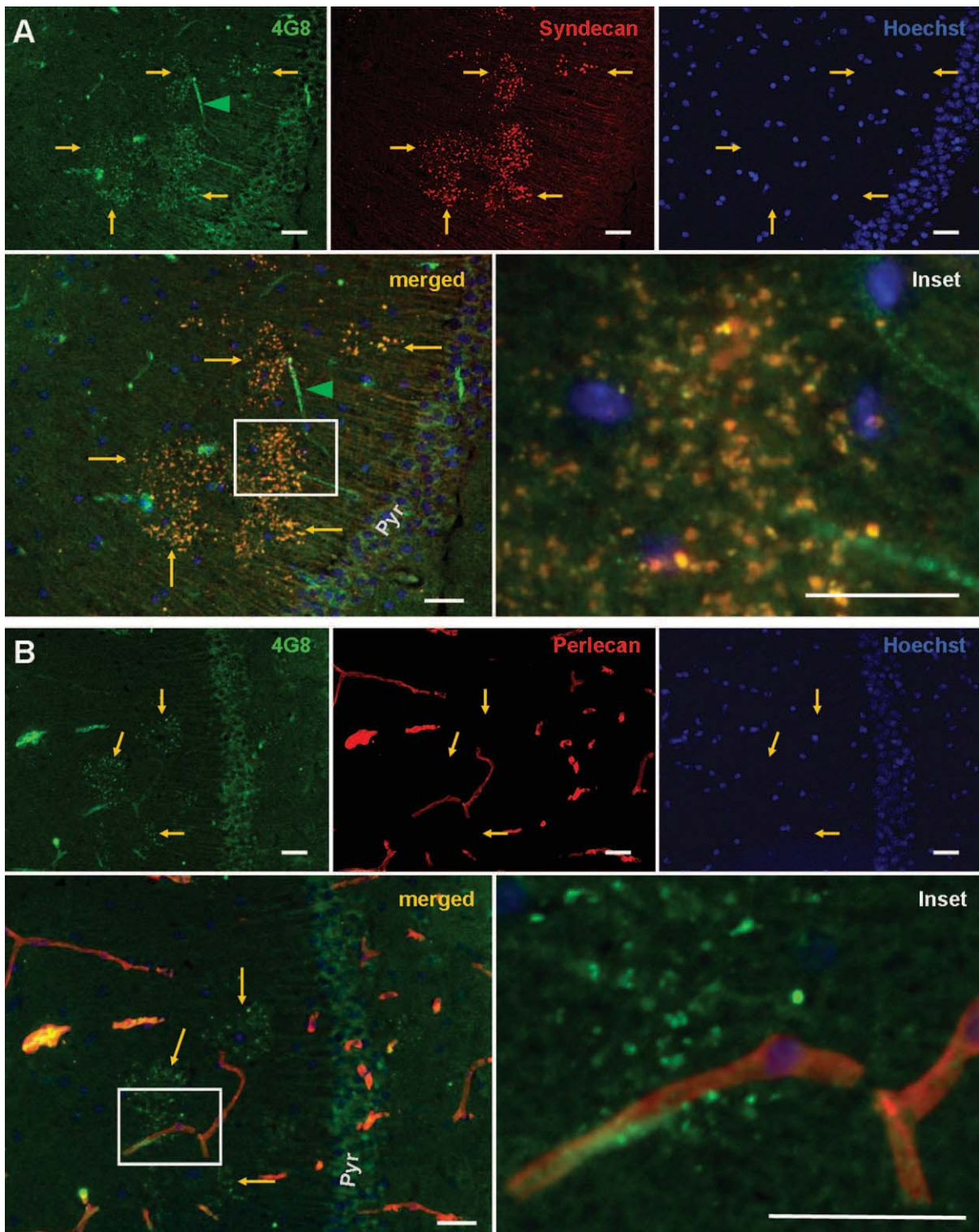


Fig. 1. Presence of A $\beta$  and HSPG in hippocampal granules of 6-month-old SAMP8 mice. A) Staining with 4G8 (A $\beta$ , green) and syndecan-2 (red). B) Staining with 4G8 (green) and perlecan (red). Hoechst staining (blue) corresponds to cellular nuclei. Colocalization of green and red corresponds to yellow color. Colocalization occurs between A $\beta$  and syndecan-2, but not between A $\beta$  and perlecan. Arrows indicate clusters of granules. Arrowheads indicate blood vessels. Scale bars: 50  $\mu$ m. Pyr: pyramidal layer.



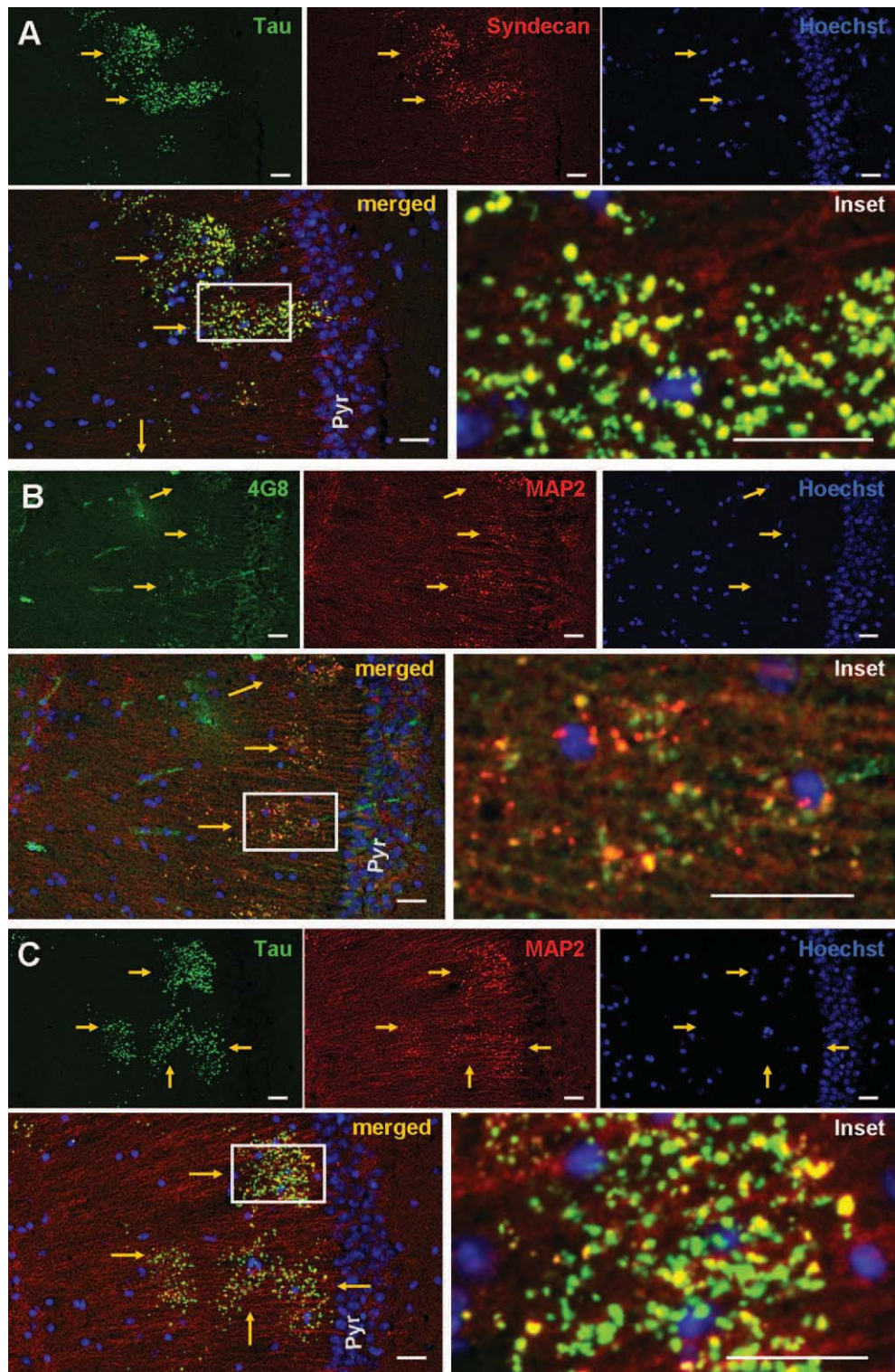


Fig. 2. Protein composition of hippocampal granules of 6-month-old SAMP8 mice. A) Staining with tau (green) and syndecan-2 (red). B) Staining with 4G8 (green) and MAP2 (red). C) Staining with tau (green) and MAP2 (red). Hoechst staining (blue) corresponds to cellular nuclei. Colocalization of green and red corresponds to yellow color. Arrows indicate clusters of granules. Scale bars: 50  $\mu$ m. Pyr: pyramidal layer.

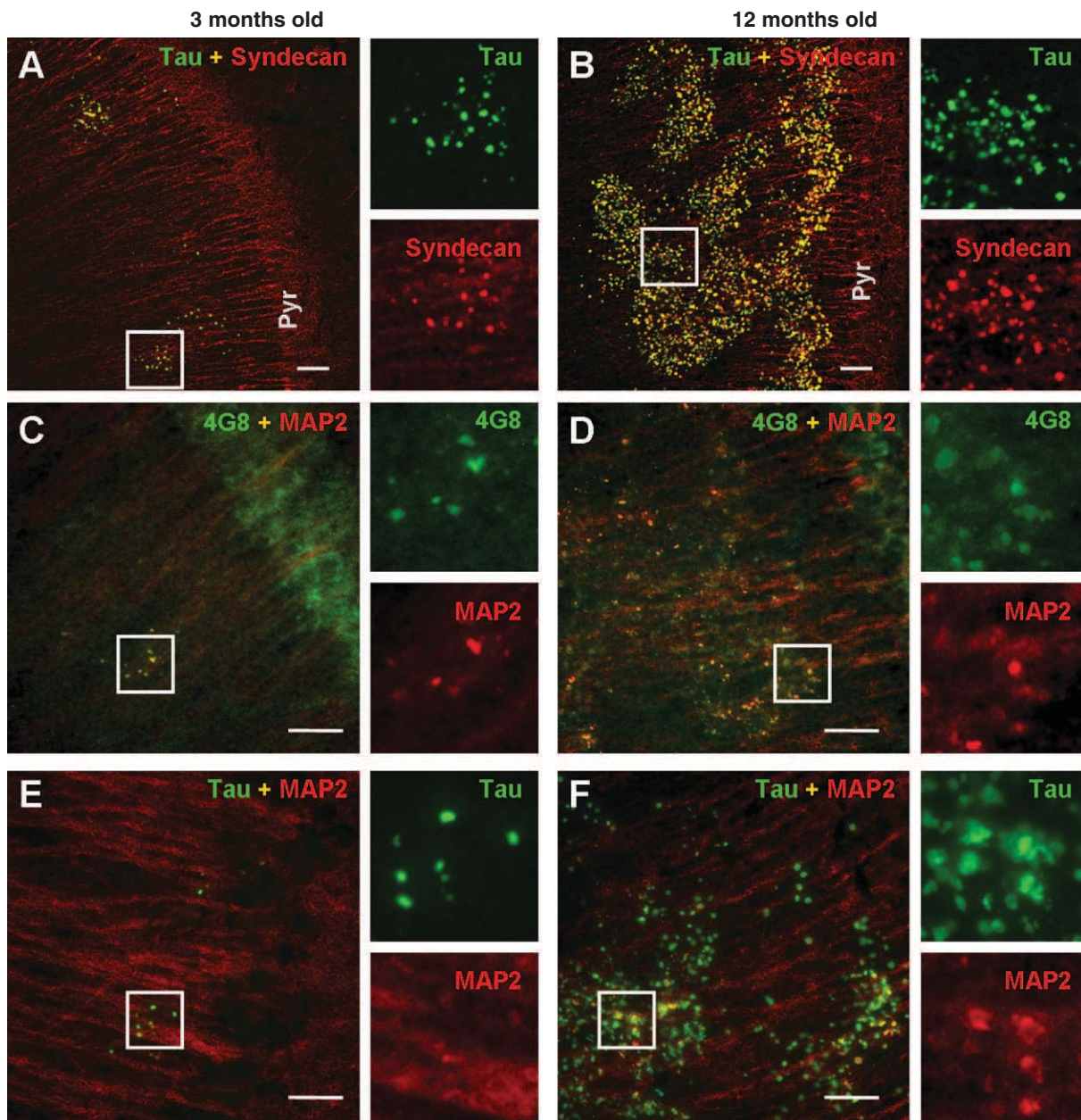


Fig. 3. Protein composition of hippocampal granules of 3- and 12-month-old SAMP8 mice. A and B) Staining with tau (green) and syndecan-2 (red). C and D) Staining with 4G8 (green) and MAP2 (red). E and F) Staining with tau (green) and MAP2 (red). Colocalization of green and red corresponds to yellow color. A, C and E: 3-month old; B, D and F) 12-month old. Scale bars: 50  $\mu$ m. Pyr: pyramidal layer.

double-stained granules and other granules that are only stained with tau, but there are not granules only stained with syndecan-2 or MAP2. In the 4G8 and MAP2 double staining (Fig. 3C) some granules are only stained with one of the two components, MAP2 or 4G8, and others are double stained. At 12 months of age we also observed that some granules double stained with syndecan-2 and tau and other granules double

stained with MAP2 and tau, while some granules only stains with tau (Fig. 3B, 3F). Moreover, when staining with 4G8 and MAP2, we also observed that some granules are only stained with one of the two components, MAP2 or 4G8, and others are double stained (Fig. 3D). Thus, in all the studied ages, a predominance of tau protein is observed over the other stained proteins.

### *Cellular types related with the amyloid granules*

In the last set of studies performed on brains from 6-month-old SAMP8 mice, the relationship between amyloid granules and astrocytes or some constitutive parts of hippocampal neurons was explored.

Double staining of amyloid aggregates with antibodies against MAP2 and GFAP, a constitutive protein present in reactive astrocytes, showed several cases of clusters stained with MAP2 located in regions where no GFAP reactivity was found (Fig. 4A). In some other cases, however, an astrocyte is placed near or overlapping the deposits (Fig. 4B). In these latter situations, there is some spatial relationship between amyloid granules and the astrocyte processes. Although colocalization of GFAP and amyloid staining is minimal, most of the granules in the cluster seem to be adhered to the astrocyte processes (Fig. 4C). In some cases, a ring of GFAP staining can be observed around amyloid granules, which suggest that the astrocyte processes encompass the granule (Fig. 4C, arrowhead, single labeling in C1 and C2).

When combining MAP2 and NeuN staining, a neuronal marker apparently restricted to neuronal nuclei, perikarya and some proximal neuronal processes in both fetal and adult brain, a clear NeuN staining can be observed in the hippocampus pyramidal region, in which the cell bodies of pyramidal neurons are located (Fig. 4D). Granular clusters stained with both NeuN and MAP2 can also be observed (Fig. 4D, single labeling in D1 and D2). Detailed visualization of the granules indicates that they contain different proportions of both constituents. In some granules there is double staining, but in others MAP2 or NeuN staining clearly predominates.

Finally, amyloid granule staining was also combined with the labeling of AKT protein, which allows visualization of some neurites, i.e., axons and dendrites, from neurons in the hippocampus of SAMP8 animals. This double staining revealed 4G8<sup>+</sup> amyloid granules and part of the neuronal network in the neuropil of the hippocampus (Fig. 4E). Detailed visualization of this staining does not reveal any relationship between axons or dendrites stained with AKT and the presence of amyloid granules (Fig. 4F).

## **DISCUSSION**

Besides the A $\beta$  components already described [23], the granules in the hippocampus of SAMP8 mice contain tau, MAP2, and syndecan-2. All these components are characteristic of the aggregates of some neurode-

generative diseases. The coexistence of A $\beta$  peptides and tau protein is frequently observed in neurodegenerative diseases [36]. A $\beta$  can also interact with syndecan-2, related with the formation of synaptic contacts [37], and both can be found in amyloid plaques of AD patients [38]. Moreover, tau and MAP2, which in physiological conditions stabilize the neurofilaments of axons and dendrites, have been found together in neurofibrillary tangles [28]. The presence of these components, as well as that of NeuN, a characteristic protein of neurons, suggests a neuronal origin for the granules and some neurodegenerative process for its formation.

The staining with antibodies against  $\alpha$ -synuclein demonstrated no positivity in the aggregates found in the hippocampus of SAMP8 animals. This protein is present in Lewy body disease [39, 40], Parkinson's disease [32], and other  $\alpha$ -synucleinopathies [41]. The absence of  $\alpha$ -synuclein in SAMP8 aggregates and the presence of tau and A $\beta$  suggest that these granules are closer to the depositions of tauopathies and amyloidopathies rather than those of  $\alpha$ -synucleinopathies. However, an increase in  $\alpha$ -synuclein levels has been reported in SAMP8 animals aged 5 and 10 months, although these results were obtained using homogenized brain tissue and Western-blot techniques [42, 43].

We also determined here the presence of both A $\beta$  and tau in granular structures. Considering that both proteins can be the main components of the aggregates in neurodegenerative diseases, there is a need for a deeper study of these two components in these amyloid granules from SAMP8 animals, in order to determine whether this model support the A $\beta$  cascade hypothesis, the tau hypothesis, both, or neither. It has been described that A $\beta$  initiates the hyperphosphorylation of tau, but other studies indicated that hyperphosphorylated tau is the element that initiates the pathological process [36]. Our results indicate, already at three months of age, that the granules show a predominance of tau over A $\beta$  and all other components tested. At 6 and 12 months of age, the number of clusters and the number of granules in the clusters increase, but remains the predominance of tau over all the other components tested. These facts point out that tau protein has an important role in the formation of the granules and its presence could be related with the subjacent neurodegenerative process. However, it has to be taken into account that current thinking on AD pathology includes the concept that hallmark lesions may be non-toxic and may represent a host response to an upstream pathophysiological process [44], and thus the observed

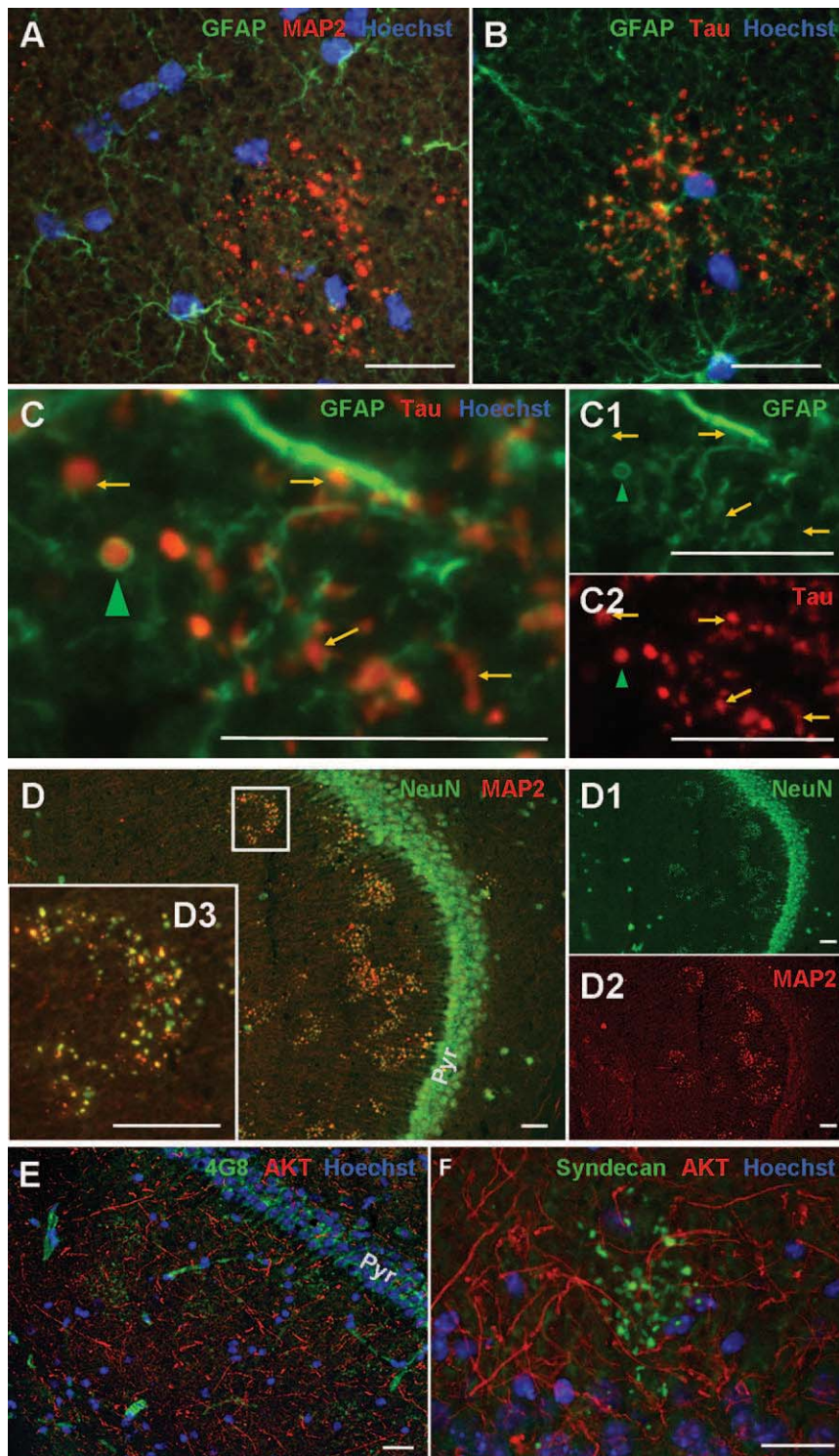


Fig. 4. Relationship of cellular types and hippocampal aggregates from 6-month-old SAMP8 mice. A) Staining with GFAP (green) and MAP2 (red). B) Staining with GFAP (green) and tau (red). C) Staining with GFAP (green) and tau (red). Single labellings are shown in C1 and C2. D) Staining with NeuN (green) and MAP2 (red). Single labellings are shown in D1 and D2. D3) Magnification of inset in D. E) Staining with 4G8 (green) and AKT-1 (red). F) Staining with syndecan-2 (green) and AKT-1 (red). Hoechst staining (blue) corresponds to cellular nuclei. Colocalization of green and red corresponds to yellow color. Arrows indicate clusters of granules. Scale bars: 50  $\mu$ m. Pyr: pyramidal layer.

granules and the presence of tau could represent only a final stage but not the responsible of the pathological processes that are being produced.

Here we have studied tau protein as total tau and it would be interesting to ascertain which types of tau are present in the granules, as hyperphosphorylated tau is involved in multiple neurodegenerative diseases, ultimately promoting the degeneration of affected neurons [45]. Indeed, the increase in hyperphosphorylated tau protein in SAMP8 mice has been found in the hippocampus by Western-blot techniques [46]. The abnormal tau protein can sequester, among others, MAP2 protein [47], which may explain the presence of MAP2 in the granules of the hippocampus of SAMP8 mice.

Although the components found in the granules of SAMP8 mice seem to indicate a neuronal origin, we have also observed in some cases that the region occupied by a cluster of granules is also occupied by a determinate astrocyte. However, not all the aggregates are close to reactive astrocytes, thus a reactive astrocyte is not essential for the presence of these clusters. Moreover, when clusters and astrocytes are close, the astrocyte processes are adjacent to the granules, even surrounding them, but the granules do not appear to constitute a part of the astrocyte process. The presence of reactive astrocytes close to amyloid aggregates could thus be related to a reactive process, in which astrogliosis is induced in response to injury, like an alteration of synaptic transmission and cytotoxicity or extracellular accumulation of fibrillar material [48].

Our results also indicate that amyloid granules present in the hippocampus of SAMP8 mice correspond to the PAS granular structures that contain HSPG described previously by Kuo et al. [25], being syndecan-2 the HSPG. Kuo and colleagues, in ultrastructural studies of the PGS stained with HSPG antibodies, detected some deformed cellular organules and remains of cellular membranes surrounding the PGS. Although it is not yet established, these membranes could correspond to residual degenerative parts of neurons.

Although we could not relate the granules with AKT-1 staining, it has to be pointed out that AKT-1 staining only shows a minor part of the neuropil, and recent studies suggest that activation of AKT inhibits toxicity of A $\beta$  and formation of neurofibrillary tangles, leading to protection of neurons against apoptosis [49].

In summary, we conclude that SAMP8 mice present complex aggregates formed by multiple proteins that are distinctive of neurodegenerative diseases. The presence of MAP2, syndecan-2, NeuN, and especially tau

protein and A $\beta$  peptides, points to SAMP8 mice as a potential animal model in which to study the process of senescence and neurodegenerative diseases.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants BFU2009-08352, BFU2010-22149 and SAF2009-13093 from Spain's "Ministerio de Educación y Ciencia"; PI080400 from the Spain's "Instituto de Salud Carlos III" (FEDERFOUND); and 610RT0405 from the "Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo" (CYTED). We would like to thank the "Generalitat de Catalunya" for supporting the research group (2009/SGR00853).

Authors' disclosures available online (<http://www.j-alz.com/disclosures/view.php?id=799>).

## REFERENCES

- [1] Hamamoto H, Honma A, Irino M, Matsushita T, Toda K, Matsumura M, Takeda T (1984) Grading score system: A method for evaluation of the degree of senescence in senescence accelerated mouse (SAM). *Mech Ageing Dev* **26**, 91-102.
- [2] Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K (1994) Senescence accelerated mouse (SAM), a novel murine model of aging. In *The SAM Model of Senescence*, Takeda T, ed. Elsevier, Amsterdam, pp. 15-22.
- [3] Takeda T (2009) Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice. *Neurochem Res* **34**, 639-659.
- [4] Miyamoto M (1997) Characteristics of age-related behavioural changes in senescence-accelerated mouse SAMP8 and SAMP10. *Exp Gerontol* **32**, 139-148.
- [5] Yagi H, Irino M, Matsushita T, Katoh S, Umezawa M, Tsuboyama T, Hosokawa M, Akiguchi I, Tokunaga R, Takeda T (1989) Spontaneous spongy degeneration of the brain stem in SAM-P/8 mice, a newly developed memory-deficient strain. *J Neuropathol Exp Neurol* **48**, 577-590.
- [6] Kawamata T, Akiguchi I, Yagi H, Irino M, Sugiyama H, Akiyama H, Shimada A, Takemura M, Ueno M, Kitabayashi T, Ohnishi K, Seriu N, Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T (1997) Neuropathological studies on strains of senescence accelerated mice (SAM) with age-related deficits in learning and memory. *Exp Gerontol* **32**, 161-170.
- [7] Nomura Y, Okuma Y (1999) Age-related defects in lifespan and learning ability in SAMP8 mice. *Neurobiol Aging* **20**, 111-115.
- [8] Spangler EL, Patel N, Speer D, Hyman M, Hengemihle J, Markowska A, Ingram DK (2002) Passive avoidance and complex maze learning in the senescence accelerated mouse (SAM): Age and strain comparisons of SAM P8 and R1. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **57**, 61-68.
- [9] Ueno M, Sakamoto H, Kanenishi K, Onodera M, Akiguchi I, Hosokawa M (2001) Ultrastructural and permeability features of microvessels in the hippocampus, cerebellum and pons of senescence-accelerated mice (SAM). *Neurobiol Aging* **22**, 469-478.

- [10] Pelegrí C, Canudas AM, del Valle J, Casadesús G, Smith MA, Camins A, Pallás M, Vilaplana J (2007) Increased permeability of blood-brain barrier on the hippocampus of a murine model of senescence. *Mech Ageing Dev* **128**, 522-528.
- [11] Del Valle J, Duran-Vilaregut J, Manich G, Camins A, Pallás M, Vilaplana J, Pelegrí C (2009) Time-course of blood-brain barrier disruption in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice. *Int J Dev Neurosci* **27**, 47-52.
- [12] Onozuka M, Watanabe K, Fujita M, Tomida M, Ozono S (2002) Changes in the septohippocampal cholinergic system following removal of molar teeth in the aged SAMP8 mouse. *Behav Brain Res* **133**, 197-204.
- [13] Flood JF, Farr SA, Uezu K, Morley JE (1998) Age-related changes in septal serotonergic, GABAergic and glutamatergic facilitation of retention in SAMP8 mice. *Mech Ageing Dev* **105**, 173-188.
- [14] Kondziella D, Bidar A, Urfjell B, Sletvold O, Sonnewald U (2002) The pentylenetetrazole-kindling model of epilepsy in SAMP8 mice: behaviour and metabolism. *Neurochem Int* **40**, 413-418.
- [15] Nomura Y, Kitamura Y, Ohnuki T, Arima Y, Yamanaka Y, Sasaki K, Oonuma Y (1997) Alterations in acetylcholine, NMDA, benzodiazepine receptors and protein kinase C in the brain of the senescence-accelerated mouse: an animal model useful for studies on cognitive enhances. *Behav Brain Res* **83**, 51-55.
- [16] Kumar VB, Farr SA, Flood JF, Kamlesh V, Franko M, Banks WA, Morley JE (2000) Site-directed antisense oligonucleotide decreases the expression of amyloid precursor protein and reverses deficits in learning and memory in aged SAMP8 mice. *Peptides* **21**, 1769-1775.
- [17] Poon HF, Joshi G, Sultana R, Farr SA, Banks WA, Morley JE, Calabrese V, Butterfield DA (2004) Antisense directed at the A $\beta$  region of APP decreases brain oxidative markers in aged senescence accelerated mice. *Brain Res* **1018**, 86-96.
- [18] Morley JE, Kumar VB, Bernardo AE, Farr SA, Uezu K, Tumosa N, Flood JF (2000)  $\beta$ -Amyloid precursor polypeptide in SAMP8 mice affects learning and memory. *Peptides* **21**, 1761-1767.
- [19] Morley JE, Farr SA, Flood JF (2002) Antibody to amyloid  $\beta$  protein alleviates impaired acquisition, retention, and memory processing in SAMP8 mice. *Neurobiol Learn Mem* **78**, 125-138.
- [20] Farr SA, Banks WA, Uezu K, Sano A, Gaskin FS, Morley JE (2003) Antibody to  $\beta$ -amyloid protein increases acetylcholine in the hippocampus of 12 month SAMP8 male mice. *Life Sci* **73**, 555-562.
- [21] Morley JE, Banks WA, Kumar VB, Farr SA (2004) The SAMP8 mouse as a model for Alzheimer disease: Studies from Saint Louis University. *Int Congr Ser* **1260**, 23-28.
- [22] Pallás M, Camins A, Smith MA, Perry G, Lee H, Casadesús G (2008) From aging to Alzheimer's disease: Unveiling "the switch" with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8). *J Alzheimers Dis* **15**, 615-624.
- [23] Del Valle J, Duran-Vilaregut J, Manich G, Casadesús G, Smith MA, Camins A, Pallás M, Pelegrí C, Vilaplana J (2010) Early amyloid accumulation in the hippocampus of SAMP8 mice. *J Alzheimers Dis* **19**, 1303-1315.
- [24] Akiyama H, Kameyama M, Akiguchi I, Sugiyama H, Kawamata T, Fukuyama H, Kimura H, Matsushita M, Takeda T (1986) Periodic acid-Schiff (PAS)-positive, granular structures increase in the brain of senescence accelerated mouse (SAM). *Acta Neuropathol* **72**, 124-129.
- [25] Kuo H, Ingram DK, Walker LC, Tian M, Hengemihle JM, Juckers M (1996) Similarities in the age-related hippocampal deposition of periodic acid-Schiff -Positive granules in the senescence-accelerated mouse P8 and C57BL/6 mouse strains. *Neurosci* **74**, 733-740.
- [26] Chiti F, Dobson C (2004) Protein misfolding, functional amyloid and human disease. *Annu Rev Biochem* **75**, 333-366.
- [27] Frost B, Diamond MI (2010) Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* **11**, 155-159.
- [28] Iqbal K, Liu F, Gong CX, Alonso Adel C, Grundke-Iqbal I (2009) Mechanisms of tau induced neurodegeneration. *Acta Neuropathol* **118**, 53-69.
- [29] Alim MA, Hossain MS, Arima K, Takeda K, Izumiyama Y, Nakamura M, Kaji H, Shinoda T, Hisanaga S, Uéda K (2002) Tubulin seeds alpha-synuclein fibril formation. *J Biol Chem* **277**, 2112-2117.
- [30] Alim MA, Ma QL, Takeda K, Aizawa T, Matsubara M, Nakamura M, Asada A, Saito T, Kaji H, Yoshii M, Hisanaga S, Uéda K (2004) Demonstration of a role for alpha-synuclein as a functional microtubule-associated protein. *J Alzheimers Dis* **6**, 435-442.
- [31] Cooper AA, Gitler AD, Cashikar A, Haynes CM, Hill KJ, Bhullar B, Liu K, Xu K, Strathern KE, Liu F, Cao S, Caldwell KA, Caldwell GA, Marsischky G, Kolodner RD, Labaer J, Rochet JC, Bonini NM, Lindquist S (2006) Alpha-synuclein blocks ER-golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science* **313**, 324-328.
- [32] Armstrong RA, Lantos PL, Cairns NJ (2008) What determines the molecular composition of abnormal protein aggregates in neurodegenerative disease? *Neuropathology* **28**, 351-365.
- [33] Jucker M, Walker LC, Schwarb P, Hengemihle J, Kuo H, Snow AD, Bamert F, Ingram DK (1994) Age-related deposition of glia-associated fibrillar material in brains of C57BL/6 mice. *Neuroscience* **60**, 875-889.
- [34] Irino M, Akiguchi I, Takeda T (1994) Ultrastructural study of PAS-positive granular structures (PGS) in brains of SAMP8. In *The SAM Model of Senescence*, Takeda T, ed. Excerpta Medica, Tokyo, pp. 371-374.
- [35] Paxinos G, Franklin KBJ (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, London.
- [36] Huang HC, Jiang ZF (2009) Accumulated amyloid-beta peptide and hyperphosphorylated tau protein: Relationship and links in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **16**, 15-27.
- [37] Lucido AL, Suarez-Sanchez F, Thostrup P, Kwiatkowski AV, Leal-Ortiz S, Gopalakrishnan G, Liazoghli D, Belkaid W, Lennox RB, Grutter P, Garner CC, Colman DR (2009) Rapid assembly of functional presynaptic boutons triggered by adhesive contacts. *J Neurosci* **29**, 12449-12466.
- [38] Shimizu K, Toh H (2009) Interaction between intrinsically disordered proteins frequently occurs in a human protein-protein interaction network. *J Mol Biol* **392**, 1253-1265.
- [39] Trojanowski JQ, Goedert M, Iwatsubo T, Lee VM (1998) Fatal attractions: abnormal protein aggregation and neuron death in Parkinson's disease and Lewy body dementia. *Cell Death Differ* **5**, 832-837.
- [40] Hashimoto M, Masliah E (1999) Alpha-synuclein in Lewy body disease and Alzheimer's disease. *Brain Pathol* **9**, 707-720.
- [41] Jellinger KA (2009) Recent advances in our understanding of neurodegeneration. *J Neural Transm* **116**, 1111-1162.
- [42] Caballero B, Vega-Naredo I, Sierra V, Huidobro-Fernández C, Soria-Valles C, De Gonzalo-Calvo D, Tolivia D, Gutierrez-Cuesta J, Pallas M, Camins A, Rodríguez-Colunga MJ, Coto-Montes A (2008) Favorable effects of a prolonged treatment with melatonin on the level of oxidative damage and

- neurodegeneration in senescence-accelerated mice. *J Pineal Res* **45**, 302-311.
- [43] Alvarez-García O, Vega-Naredo I, Sierra V, Caballero B, Tomás-Zapico C, Camins A, García JJ, Pallás M, Coto-Montes A (2006) Elevated oxidative stress in the brain of senescence-accelerated mice at 5 months of age. *Biogerontology* **7**, 43-52.
- [44] Castellani RJ, Lee HG, Zhu X, Perry G, Smith MA (2008) Alzheimer's disease pathology as a host response. *Neuropathol Exp Neurol* **67**, 523-531.
- [45] Brion JP (2006) Immunological demonstration of tau protein in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **9**, 177-185.
- [46] Canudas AM, Gutierrez-Cuesta J, Rodriguez MI, Acuña-Castroviejo D, Sureda FX, Camins A, Pallás M (2005) Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau in senescence-accelerated mouse (SAM). *Mech Ageing Dev* **126**, 1300-1304.
- [47] Alonso AD, Grundke-Iqbal I, Barra HS, Iqbal K (1997) Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 298-303.
- [48] Ho GJ, Drego R, Hakimian E, Masliah E (2005) Mechanisms of cell signaling and inflammation in Alzheimer's Disease. *Curr Targets Inflamm Allergy* **4**, 247-256.
- [49] Nakagami Y (2004) Inhibitors beta-amyloid-induced toxicity by modulating the Akt signaling pathway. *Drug News Perspect* **17**, 655-660.

## **2. ARTICLE 2**

**PRESENCE OF A NEO-EPILOPE AND ABSENCE OF AMYLOID- $\beta$   
AND TAU PROTEIN IN DEGENERATIVE HIPPOCAMPAL GRANULES  
OF AGED MICE**

Gemma Manich, Jaume del Valle, Itsaso Cabezón, Antoni Camins,  
Mercè Pallàs, Carme Pelegrí i Jordi Vilaplana

Age 2014; 36: 151–165





## RESUM

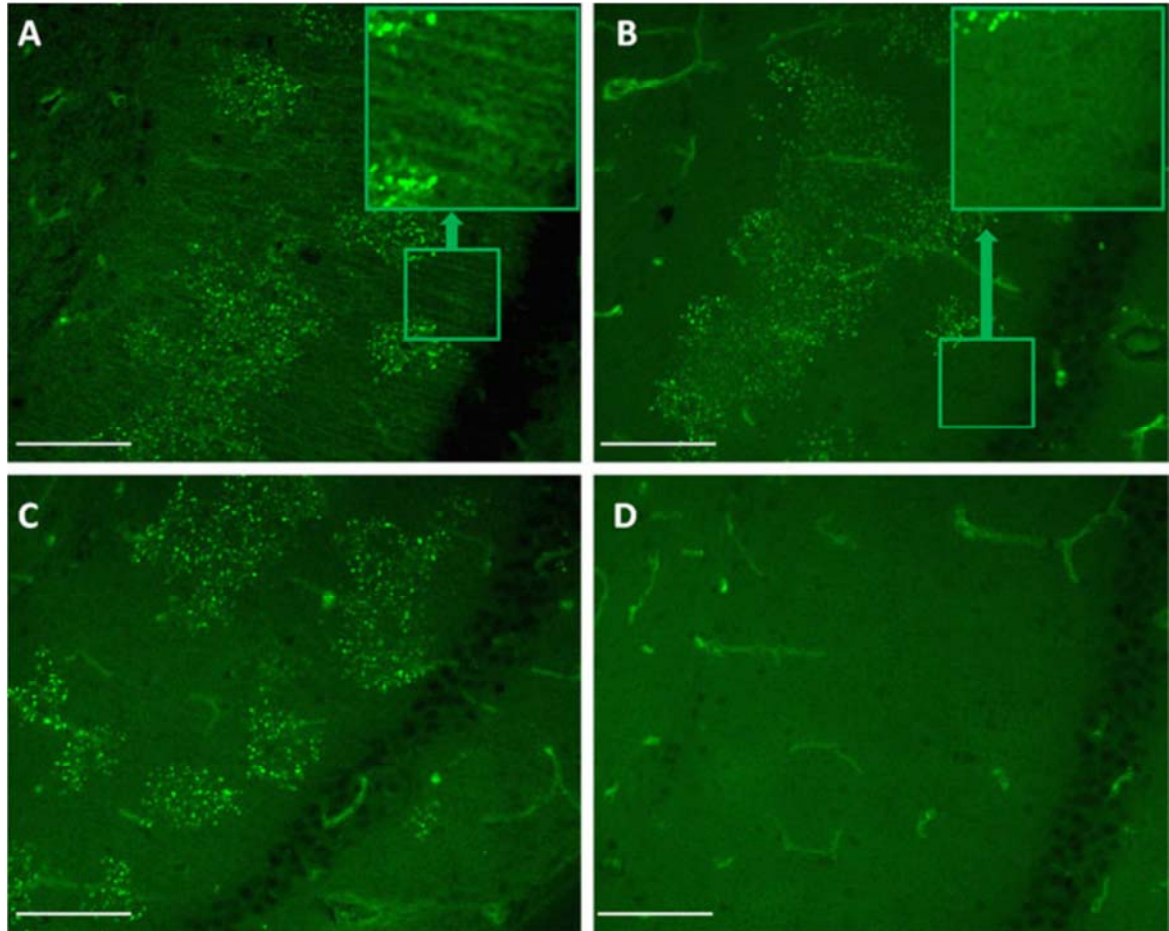
*Objectius:* Inicialment, amb l'objectiu d'aprofundir en la presència de la proteïna tau en els agregats, es van realitzar diferents estudis que donaven lloc a resultats contradictoris, fet que va posar en dubte l'especificitat dels marcatges. Per tant, en aquest treball es va avaluar l'especificitat dels marcatges immunohistoquímics realitzats per conèixer la composició dels grànuls patològics presents a l'hipocamp dels ratolins d'edat avançada.

*Material i mètodes:* Es van utilitzar ratolins SAMP8 mascles de 9 a 14 mesos d'edat i ratolins APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>ΔE9</sup> de 9 a 17 mesos d'edat. Després d'anestesiàr els animals, es va perfondre un primer grup d'animals amb sèrum fisiològic, i un segon grup amb sèrum fisiològic seguit de paraformaldehid al 4% en PBS. Es van extreure els encèfals i es van processar de forma diferent segons el tipus de perfusió. En ambdós grups d'encèfals es van aplicar tècniques immunohistoquímiques emprant un ampli ventall d'anticossos primaris dirigits contra possibles components dels grànuls de l'hipocamp. Alguns d'aquests anticossos eren comercials i d'altres no, i la seva procedència era d'ascites, de sèrum i alguns eren purificats. Per detectar el pèptid A $\beta$  es van utilitzar la tinció amb tioflavina S i la sonda d'A $\beta$  conjugada a fluorescència Hilyte; i per a la detecció de glicoconjugats es van emprar lectines. A més a més es va realitzar una preadsorció de l'anticòs anti-tau amb carbohidrats, i un test d'hemaglutinació per detectar, en els anticossos comercials, la presència d'anticossos dirigits contra de l'antigen A dels eritròcits humans i que podien donar reactivitat positiva en els agregats. Un tercer grup d'animals es va anestesiàr, perfondre amb sèrum fisiològic seguit de paraformaldehid al 2% en PBS i després es va extreure el seu encèfal i es va processar per al seu anàlisi per microscopia electrònica.

*Resultats:* La preadsorció de l'anticòs anti-tau tau5A amb proteïna tau va fer desaparèixer el marcatge de les dendrites del *stratum radiatum* de l'hipocamp dels ratolins SAMP8 mentre que va mantenir el marcatge dels grànuls (Figura 32 A i B). D'altra banda, l'anticòs JJ319, dirigit contra el CD28 de rata i sense reactivitat en cervell de ratolí, va marcar els grànuls de l'hipocamp quan era obtingut d'ascites sense purificar, en canvi no va marcar aquestes estructures després de la seva purificació per columna de proteïna A, (Figura 32 C i D). Cal destacar que, en tots els casos, els anticossos secundaris utilitzats van ser anti-IgG marcats amb fluorescència. Aquests resultats van permetre establir que hi havia un component en els anticossos usats que reaccionava amb els grànuls i era detectat per l'anticòs secundari anti-IgG.

Els anticossos contaminants anti-MAG (*mouse ascites Golgi*) estan presents en l'ascites de ratolí i es caracteritzen per hemaglutinar directament els eritròcits de tipus A humà. En els resultats del test d'hemaglutinació amb l'anticòs tau5A es va mostrar una

aglutinació positiva amb sang del grup A Rh+, mentre que no va aglutinar amb sang dels grups 0 o B. Aquest fet suggereix la presència d'anticossos anti-MAG a l'anticòs anti-tau i també que aquests anticossos siguin de tipus IgM, ja que l'hemaglutinació es va produir sense la incubació d'un anticòs secundari.

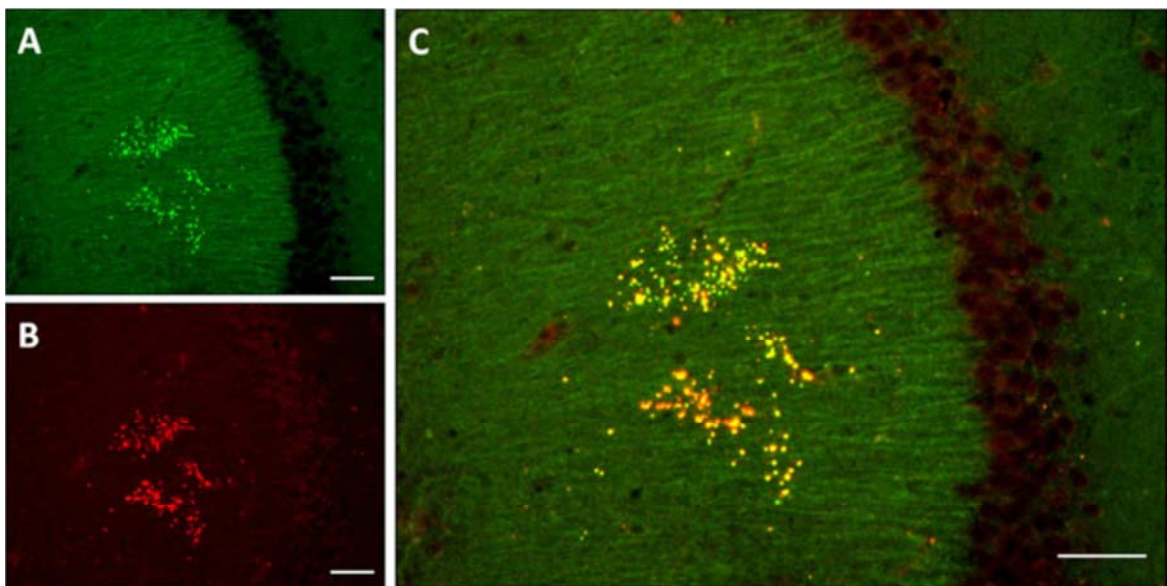


**Figura 32. Marcatge immunohistoquímic dels grànuls de l'hipocamp d'un ratolí SAMP8 representatiu de 9 mesos d'edat.** A) Marcatge amb l'anticòs anti-tau obtingut en ascites (a l'ampliació es pot observar el marcatge de dendrites). B) Marcatge amb l'anticòs anti-tau preadsorbit amb proteïna tau (a l'ampliació es pot observar que no es marquen les dendrites). C) Marcatge amb l'anticòs JJ319A, obtingut en ascites i no purificat. D) Marcatge amb l'anticòs JJ319P, obtingut en ascites i purificat per proteïna A. Barra d'escala: 100  $\mu$ m.

Per demostrar que l'anticòs tau5A contenia anticossos tipus IgM es va realitzar un marcatge emprant anticossos anti-IgM com a secundaris. Aquest marcatge va mostrar positivitat als grànuls de l'hipocamp (Figura 33 B) i una absència del marcatge de les dendrites típic de tau, indicant que els anticossos de tipus IgM presents a l'anticòs anti-tau no reaccionen contra la proteïna tau. Amb l'anticòs secundari anti-IgG es marquen ambdues estructures, grànuls i dendrites (Figura 33 A), ja que aquest anticòs detecta tant les IgG com les IgM.

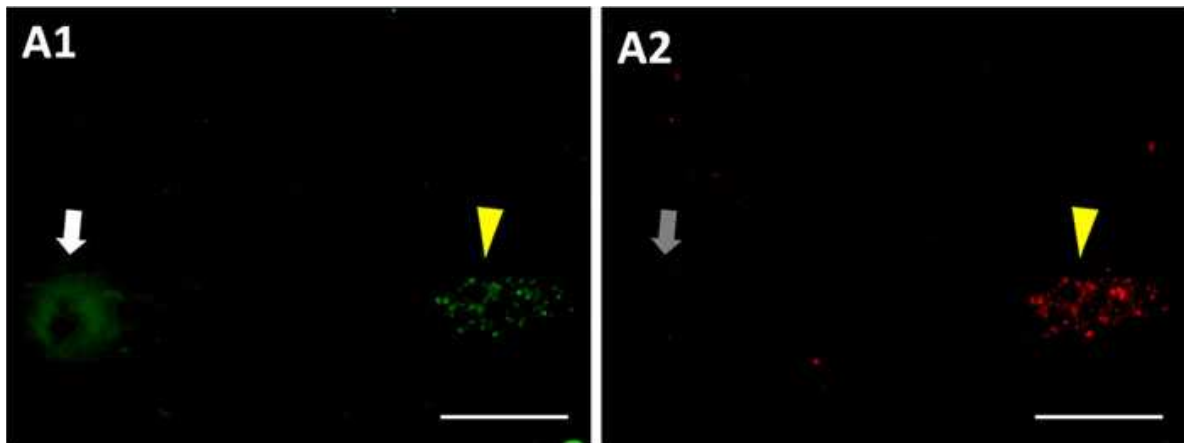
El marcatge dels grànuls amb diferents lectines que detecten epítops relacionats amb el grup sanguini humà de tipus A, que conté una cadena glucídica que es diferencia en

el seu extrem pel carbohidrat GalNAc, no va mostrar positivitats en els grànuls. Tampoc ho van fer anticossos dirigits contra epítops sanguinis dels grups A1, A2 i A3. La incubació de l'anticòs tau5a amb una barreja de carbohidrats a diferents concentracions va provocar una disminució del marcatge obtingut amb anticossos secundaris anti-IgM inversament proporcional a la concentració de carbohidrats. A més a més, si el teixit s'incubava prèviament amb la barreja de carbohidrats, el marcatge amb anti-IgM no es modificava. Per tant, aquests resultats indiquen que hi ha un epítop als grànuls amb una estructura parcialment glucídica i que no coincideix amb el grup sanguini A humà que és reconeguda pels anticossos IgM contaminants.



**Figura 33. Marcatge immunohistoquímic dels grànuls de l'hipocamp d'un ratolí SAMP8 representatiu de 9 mesos d'edat amb l'anticòs Tau5A. A) Anticòs secundari anti-IgG. B) Anticòs secundari anti-IgM. C) Colocalització d'ambdós marcatges en groc. Barra d'escala: 100  $\mu$ m.**

La majoria dels dinou anticossos comercials emprats en aquest estudi que marcaven de forma positiva els grànuls contenien anticossos anti-IgM contaminants. Malgrat que alguns d'ells havien estat sotmesos a un procés de purificació per part dels proveïdors, els anticossos contenien quantitats variables d'IgM contaminant. Alguns lots dels diferents anticossos dirigits contra l'A $\beta$  utilitzats marcaven els grànuls mentre que d'altres no. Es va comprovar que els lots que no marcaven els grànuls no contenien anticossos contaminants tipus IgM. A més a més, l'anticòs 12F4a anti-A $\beta$  marcava positivament les plaques amiloides i els grànuls dels ratolins APP/PS1 de nou mesos d'edat quan l'anticòs secundari utilitzat era de tipus anti-IgG (Figura 34 A1), mentre que només marcava els grànuls si l'anticòs secundari era de tipus IgM (Figura 34 A2). També, el Hilyte-AF488 o la tioflavina-S, marcadors d'A $\beta$ , van marcar positivament les plaques d'aquests ratolins però no els grànuls.



**Figura 34. Marcatge immunohistoquímic de talls criostàtics d'encèfal d'un ratolí APP-PS1 representatiu de 9 mesos d'edat amb l'anticòs 12F4 anti- $\beta$ -amiloide.** A1) Anticòs secundari anti-IgG. A2) Anticòs secundari anti-IgM. Barra d'escala: 50  $\mu$ m. Fletxa blanca: placa amiloide. Fletxa grisa: Localització de placa amiloide no marcada. Punta de fletxa groga: clúster de grànuls. Barra d'escala: 50  $\mu$ m.

*Conclusions:* En els agregats de l'hipocamp dels ratolins amb envelliment accelerat SAMP8 hi apareix un epítop de naturalesa glucídica, que no es troba en d'altres regions cerebrals i que es tracta, per tant, un neo-epítop. Aquest neo-epítop constitueix un marcador d'aquestes estructures. és reconegut per les IgM contaminants presents en diversos anticossos obtinguts en ascites i sèrum de ratolí. L'estudi de la composició dels grànuls de l'hipocamp tenint en compte aquest factor mostra que aquestes estructures no contenen A $\beta$  ni tau. Aquests fets mostren la necessitat de revisar l'alt nombre de components descrits en els grànuls de l'hipocamp dels ratolins envellits, ja que en treballs publicats sobre aquestes estructures en diversos grups s'han detectat compostos diferents que han donat lloc a interpretacions contraposades sobre la significació fisiopatològica dels grànuls.

## Presence of a neo-epitope and absence of amyloid beta and tau protein in degenerative hippocampal granules of aged mice

Gemma Manich · Jaume del Valle · Itsaso Cabezón · Antoni Camins · Mercè Pallàs · Carme Pelegrí · Jordi Vilaplana

Received: 4 April 2013 / Accepted: 1 July 2013 / Published online: 19 July 2013  
© American Aging Association 2013

**Abstract** Clustered pathological granules related to a degenerative process appear and increase progressively with age in the hippocampus of numerous mouse strains. We describe herein the presence of a neo-epitope of carbohydrate nature in these granules, which is not present in other brain areas and thus constitutes a new marker of these degenerative structures. We also found that this epitope is recognised by a contaminant IgM present in several antibodies obtained from mouse ascites and from both mouse and rabbit sera. These findings entail the need to revise the high number of components that are thought to be present in the granules, such as the controversial  $\beta$ -amyloid peptides described in the granules of senescence-accelerated mouse prone-8 (SAMP8) mice. Characterisation of the composition of SAMP8 granules, taking into ac-

count the presence of the neo-epitope and the contaminant IgM, showed that granules do not contain either  $\beta$ -amyloid peptides or tau protein. The presence of the neo-epitope in the granules but not in other brain areas opens up a new direction in the study of the neurodegenerative processes associated with age. The SAMP8 strain, in which the progression of the granules is enhanced, may be a useful model for this purpose.

**Keywords** Aging · SAMP8 · Hippocampus · Mouse ascites Golgi · IgM · Periodic acid-Schiff ·  $\beta$ -Amyloid

### Introduction

Aging in mice involves several associated changes, some of which might be considered to result from a pathological process. One such change is the appearance of clustered pathological granular structures that are mainly located in the hippocampus. These clustered granules have been extensively described in the brain of several strains of aged mice, including C57BL/6 (Lamar et al. 1976; Jucker et al. 1994; Soontornniyomkij et al. 2012), ICR-CD1 (Del Valle et al. 2010), AKR (Mitsuno et al. 1999) and senescence-accelerated mouse prone mouse 8 (SAMP8; Akiyama et al. 1986; Kuo et al. 1996; Del Valle et al. 2010). In all strains, these granules start their development in the stratum radiatum of CA1, and thereafter, the number of clusters increases and they spread throughout the hippocampus (Akiyama et al. 1986; Del Valle et al. 2010). These granules, measuring up to 3  $\mu$ m

---

Carme Pelegrí and Jordi Vilaplana contributed equally to this study.

---

G. Manich · J. del Valle · I. Cabezón · C. Pelegrí · J. Vilaplana (✉)  
Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia,  
Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028  
Barcelona, Spain  
e-mail: vilaplana@ub.edu

A. Camins · M. Pallàs  
Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia,  
Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Av.  
Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

J. del Valle · A. Camins · M. Pallàs · C. Pelegrí · J. Vilaplana  
CIBERNED, Centros de Biomedicina en Red de  
Enfermedades Neurodegenerativas, Barcelona, Spain

in size, are clustered in groups of 40–50 (Akiyama et al. 1986; Del Valle et al. 2010; Kuo et al. 1996).

The main histochemical feature of the granules is their positive reaction for periodic acid-Schiff staining, which indicates a high proportion of carbohydrate macromolecules. In fact, they have been found to contain glycogen, glycoproteins and proteoglycans (Akiyama et al. 1986; Kuo et al. 1996; Manich et al. 2011; Takemura et al. 1993). Extracellular matrix-related proteins such as heparan sulphate proteoglycan, laminin (Jucker et al. 1994; Kuo et al. 1996) and reelin (Knuesel et al. 2009) have been detected in C57BL/6 granules, and polyglucosans have been described as the major components of granules in the AKR strain (Mitsuno et al. 1999).

Despite extensive studies of granule composition, several contradictions have emerged from the results, especially from those obtained by immunohistochemical procedures. As early as 1992, Jucker et al. observed that both normal rabbit sera and polyclonal sera antibodies, even preadsorbed ones, occasionally stained the C57BL/6 granules in a non-specific manner, and that this staining could lead to misinterpretation. The observations regarding rabbit pre-immune sera were later confirmed by Takemura et al. (1993).

False-positive stainings related to antibodies have been widely observed in several cases of immunohistochemistry procedures. In 1982, Gooi and Feizi detected natural antibodies against glycoproteins in mouse hybridoma-induced ascites (Gooi and Feizi 1982). Later, an anti-mouse ascites Golgi (MAG) antibody that stained Golgi apparatus was described as a contaminant in antibodies produced in mouse ascites fluid or sera and rabbit sera (Kliman et al. 1995; Shaw 1986; Spicer et al. 1994). The anti-MAG antibody stains are structures that contain large amounts of mucins or glycoproteins (Finstad et al. 1991; Kliman et al. 1995; Spicer et al. 1994). One important feature of anti-MAG antibodies is the haemagglutination of human blood group A erythrocytes (Finstad et al. 1991; Kliman et al. 1995). In nervous tissue, slight staining with anti-MAG antibody was encountered in perivascular astrocytes from human samples (Kliman et al. 1995), and A1 blood group individuals presented staining in the Golgi zone of some neurons (Ouwendijk et al. 2012). In experimental animals, MAG reactivity has only been described in rat pancreatic acinar cells, several rat glandular epithelial tissues and in gerbil intestine, oviduct and prostate (Spicer et al. 1994).

In the present work on the specificity of the immunostainings of granules, we mainly used the

senescence-accelerated SAMP8 strain. These mice present granules as early as 3 months of age, earlier than other mouse strains, and the number of clusters and granules increases more rapidly than in other strains, thus facilitating their study.

The SAMP8 mouse strain was developed spontaneously from selective breeding of AKR/J mice (Takeda et al. 1981). These animals exhibit early onset and irreversible advance of senescence, as demonstrated by the loss of normal behaviour, the appearance of skin lesions, increased lordokyphosis and a shortened lifespan (Takeda, 2009). Moreover, the SAMP8 strain manifests learning and memory deficits (Miyamoto 1997), neuronal cell loss (Kawamata et al. 1997), gliosis (Nomura and Okuma 1999), a reduction in the release of neurotransmitters in the brain (Kitamura et al. 1992) and increased oxidative stress (Zhang et al. 2008). Several studies have described an increase in both amyloid  $\beta$  precursor protein (A $\beta$ PP) and derived  $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ) peptides in the brain of SAMP8 mice, as well as the presence of A $\beta$  plaques or deposits (Kumar et al. 2000; Morley et al. 2000; Takemura et al. 1993). The presence of A $\beta$  has also been described in the granular structures of the hippocampus (Del Valle et al. 2010; Fukunari et al. 1994; Currais et al. 2012; Porquet et al. 2013; Yamaguchi et al. 2012). Furthermore, increased levels of hyperphosphorylated tau protein and tau deposits have also been described (Canudas et al. 2005; Manich et al. 2011; Wei et al. 1999). SAMP8 mice are thus used as a model of senescence but have also been proposed as a suitable model for studying Alzheimer's disease.

The present study of the specificity of the stainings of the pathological hippocampal granules revealed the presence of an epitope that is a neo-epitope of carbohydrate nature with characteristics similar to the MAG antigen. We also found that several commercial antibodies persistently contained an IgM contaminant antibody directed against this neo-epitope. Taking into account this possible contamination, the granule composition of SAMP8 mice was re-characterised, focusing in particular on the presence of  $\beta$ -amyloid peptide and tau protein.

## Materials and methods

### Mice

Male SAMP8 mice (9–14 months) and APP<sup>swe</sup>/PS1 $\delta$ E9 (9–17 months) were used. They were kept in standard

temperature conditions ( $22 \pm 2$  °C) and 12:12-h light–dark cycles (300/0 lx). Throughout the study, they had access to food and water ad libitum. All experimental procedures were reviewed and approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation of the University of Barcelona (DAAM 6459).

#### Brain processing, immunohistochemistry and histochemical staining

Animals were anaesthetised i.p with sodium pentobarbital (80 mg/kg). A first group of animals received an intracardiac gravity-dependent perfusion of 50 mL of saline solution. Brains were dissected and frozen by immersion in isopentane and chilled in dry ice. Then, frozen brains were cut into 20- $\mu$ m-thick sections on a cryostat (Leica Microsystems, Germany) at  $-22$  °C and placed on slides. Sections were fixed with acetone for 10 min at 4 °C and frozen at  $-20$  °C. A second group of animals was perfused with 50 mL of phosphate-buffered saline (PBS) followed by 50 mL of paraformaldehyde (PF, Scharlab, Barcelona) 4 % in PBS. Brains were post-fixed in 4 % PF in PBS for 4 h, cryoprotected in PBS with 30 % sucrose (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) for 24 h and frozen in isopentane. Brain sections were cut and collected on Superfrost slides (Thermo Scientific, Alcobendas, Spain).

Immunohistochemistry for acetone and PF-fixed sections was performed as follows. Sections were rehydrated with PBS and then blocked and permeabilised with 1 % bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) and 0.1 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in PBS for 20 min. They were washed with PBS and incubated with the primary antibody (see Table 1) either overnight or for 1 h and 30 min. Slides were washed and incubated for 1 h at room temperature (RT) with the secondary antibody. Nuclear staining was performed with Hoechst (H-33258, Fluka, Madrid, Spain) and slides were washed and coverslipped with Prolong Gold antifade reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA). Staining controls were performed by incubating with PBS instead of the primary antibody or both primary and secondary antibodies. In double stainings, antibody cross-reactivity controls were also performed.

Some antibody stainings required an antigen retrieval procedure for PF slices. Thus, slides were immersed in sodium citrate buffer (10 mM, pH=6.0) heated to 95 °C for 40 min and then cooled to RT for 20 min. The slides were washed before the permeabilisation step.

The following antibodies were used as secondary antibodies: Alexa Fluor 555 donkey anti-goat IgG, AF488 donkey anti-mouse IgG, AF546 goat anti-mouse IgG, AF555 goat anti-mouse IgM, AF555 donkey anti-rabbit IgG, AF555 donkey anti-rat IgG and IgM (Life Technologies), goat anti-rabbit IgM-fluorescein isothiocyanate (FITC) and rabbit anti-goat IgM-FITC (Abcam, Cambridge, UK).

Various lectins were used on brain slices for histochemical procedures: *Helix pomatia*-AF488, *Dolichos biflorus* agglutinin-FITC, soybean agglutinin-FITC and *Vicia villosa*-FITC, which selectively bind to *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) residues; peanut agglutinin-FITC, which binds to  $\beta$ -galactose-3-GalNAc; concanavalin A-FITC, which binds to  $\alpha$ -glucose and  $\alpha$ -mannose; *Ricinus communis* agglutinin I-FITC, which binds to D-galactose (D-Gal); *Ulex europaeus* agglutinin I-FITC, which binds to  $\alpha$ -fucose; and wheat germ agglutinin-FITC, which binds to *N*-acetylglucosamine. *H. pomatia*-AF488 was purchased from Life Technologies; the rest were obtained from Vector Laboratories (Burlingame, CA). All lectin stainings were performed on acetone-fixed brain slices.

Thioflavin S staining was used to detect A $\beta$  in mouse brain tissue. Acetone-fixed slides were rehydrated in PBS for 5 min and then incubated in 1 % Thioflavin S (T-1892, Sigma-Aldrich) for 10 min while protected from light. Brain slices were washed twice in 80 % ethanol for 3 min and a third time in 95 % ethanol for 3 min. Slides were washed three times with PBS and mounted in Prolong Gold (Life Technologies).

Detection of A $\beta$  in mouse brain tissue was also attempted with HiLyte-AF488 (Anaspec). This staining was combined with the immunohistochemical procedures and was performed by adding HiLyte-AF488 (at 400 ng/mL) to the secondary antibodies.

#### Purification of antibodies obtained from ascites fluid

The JJ319 antibody obtained from ascitic fluid was purified using a protein A column in order to separate this IgG from other proteins and Ig, and its concentration was quantified spectrophotometrically.

#### Tau5A antibody preadsorption with tau protein

Preadsorption controls for the Tau5A immunostaining were performed by incubating the antibody overnight at 4 °C with mild agitation with a 10 molar-fold



**Table 1** Antibodies used for the experimental procedures of this study

Antibody (name referred as)	Target	Manufacturer (reference number)
Tau, clone Tau-5 (Tau5A)	Tau protein (210-241 aa)	Millipore (MAB361)
Tau, clone 46.1 (Tau 46.1)	Tau protein (315-352 aa)	Upstate, Millipore (05-838)
Tau, clone Tau-5 (Tau5P)	Tau protein	Biosource, Life Technologies (AHB0042)
Tau, paired235 (TauS235)	Tau protein (Ser 235)	Anaspec (55461)
JJ319	Rat CD 28	Given by Prof. T. Hünig
6E10 (6E10a)	Amyloid $\beta$ 1-16 aa	Chemicon (MAB 1560; batch LV1375915)
6E10 (6E10b)	Amyloid $\beta$ 1-16 aa	Covance (SIG-39320), batch unknown)
4G8 (4G8a)	Amyloid $\beta$ 17-24 aa	Sigma (A1349; batch 116K1552)
4G8 (4G8b)	Amyloid $\beta$ 17-24 aa	Covance (SIGNET-39220; batch 10BC00211)
12F4 (12F4a)	Amyloid $\beta$ 42	Covance (SIG-39142; batch 08EC00916)
12F4 (12F4b)	Amyloid $\beta$ 42	Covance (SIG-39142); batch 10CC00480)
Syndecan-2, clone T-17 (Syndecan-2)	Syndecan-2	Santa Cruz Biotechnology (sc-9494)
NeuN	NeuN protein	Millipore (MAB377)
MAP2	Microtubule associated protein -2	Millipore (AB5622)
Prp	Prion protein (Prp, 25–44 aa)	Abcam (ab703)
MMP2	Matrix metalloproteinase-2	Millipore (AB19167)
Calretinin	Calretinin	Schwann (PV25)
Calbindin	Calbindin	Schwann (CB-38a)
Parvalbumin	Parvalbumin	Schwann (7699/3H)
Novaclone A blood group IgM antibody	A1 and A2 human blood groups	Dominion Biologicals (0170-M100)
Novaclone B blood group IgM antibody	B human blood group	Dominion Biologicals (0175-M100)
A1, A2, A3 blood groups IgM, clone Z2-B1	A1, A2 and A3 human blood groups	Santa Cruz Biotechnology (sc-52367)
A blood group IgM, clone Z2A	A1 and A2 human blood groups	Santa Cruz Biotechnology (sc-69951)

concentration of Tau protein (Millipore). The solution obtained was incubated on the slides instead of the primary antibody in the immunohistochemical procedures.

#### Tau5A antibody preadsorption with carbohydrates

The Tau5A antibody containing IgM was preadsorbed with four different solutions of carbohydrates (D-galactose, L-fucose, GalNAc, D-mannose and D-glucose (Sigma-Aldrich)), dissolved in PBS at concentrations of 0.05, 0.1, 0.2 or 0.4 M. The Tau5A antibody was incubated with the solutions overnight at 4 °C with mild agitation. Each mixture was then used on different brain sections instead of the primary antibody in the immunohistochemistry procedures.

#### Haemagglutination test

The haemagglutination test was performed as described in Finstad et al. (1991). Briefly, Tau5A was incubated in

a microtitre plate alone or with goat anti-mouse IgG (Life Technologies) for 1 h at RT. Human erythrocytes (3 %) from blood types A Rh<sup>+</sup>, O Rh<sup>+</sup>, B Rh<sup>+</sup> and B Rh<sup>-</sup> obtained from the *Banc de Sang i Teixits* (Barcelona) were washed in PBS and added to the microtitre plate. The haemagglutination reaction was evaluated by light microscopy after 1 h of incubation. Positive controls were performed with Novaclone blood grouping reagents for A and B blood groups (Dominion Biologicals, Canada), and negative controls consisted of replacing the primary antibody or both primary and secondary antibodies with PBS when incubating human erythrocytes.

#### Brain processing for transmission electron microscopy

The animals were anaesthetised i.p. with 80 mg/kg of sodium pentobarbital and perfused intracardially with 50 mL of saline solution followed by 50 mL of PBS with PF at 2 %. Coronal sections of 100  $\mu$ m thickness were obtained using a vibratome. Sections were post-

fixed with 2 % glutaraldehyde in PBS (Sigma-Aldrich). The samples were treated with osmium tetroxide (1 %) containing potassium ferricyanide for 1 h at 4 °C, dehydrated in acetone at 4 °C and finally embedded in Spurr resin. Semi-thin sections (1 µm thick) were obtained, and after methylene blue staining, hippocampal CA1 regions were localised. Ultra-thin sections (55 nm thick) were obtained using a Reichert-Jung Ultracut E ultramicrotome and a diamond knife (Diatome, Switzerland), and the sections were then placed on gold grids and post-stained with uranyl acetate and lead citrate.

#### Immunostaining for transmission electron microscopy

Ultra-thin sections were treated with hydrogen peroxide at 5 % in order to eliminate the osmium tetroxide and were then labelled at RT with nanogold particles as follows: incubation with 1 % BSA in 0.01 M PBS for 30 min, then incubation with Tau5A antibody at dilutions of 1/50 for 2 h, followed by gold conjugated (10-nm particles) rat anti-mouse IgG for 1 h. After washing in PBS, rinsing in distilled water and drying, the sections were stained with uranyl acetate and lead citrate.

#### Image acquisition

Images were taken with a fluorescence laser and optic microscope (BX41, Olympus, Germany) and stored in tiff format. All images were acquired using the same microscope, laser and software settings. Image treatment and analysis were performed by means of the ImageJ programme (National Institute of Health, USA).

Ultra-thin sections were examined using a Jeol 1010 transmission electron microscope operated at an accelerating voltage of 80 kV. The images were obtained using a Bioscan 792 camera (Gatan, CA).

## Results

### Failure of specific immunostaining of the SAMP8 hippocampal granules

Several commercial antibodies were used to stain brain slices from SAMP8 animals. Most of the antibodies obtained from mouse ascites or mouse and rabbit sera stained the hippocampal granules (Table 2). These antibodies were monoclonal or polyclonal and purified

or not purified. A representative image of these positive stainings is presented in Fig. 1a, in which the staining achieved using the Tau5A antibody shows the clusters of granules in the CA1 hippocampal region of a 9-month-old SAMP8 mouse. Although the commercial antibodies shown in Table 2 target antigens present in the nervous system, and some of them are monoclonal and purified antibodies, the large number of antibodies that stained the granules induced us to test for the presence of anti-mouse IgG Fc receptors in the granules. To test this hypothesis, normal mouse serum was incubated in brain sections of SAMP8 mice as a primary antibody, and AF488 anti-mouse IgG was used as a secondary antibody. In this case, no staining was observed, thus excluding the presence of the Fc receptor in the granules (data not shown). Moreover, the presence of endogenous IgG in the granules was also ruled out because incubation with only secondary antibodies directed against mouse IgG did not stain the granules (data not shown).

We then attempted to determine antibody specificity in granule staining. Two antibodies obtained from ascites fluid were used: (a) the Tau5A mouse IgG antibody directed against total tau protein and (b) the JJ319 mouse IgG directed against rat CD28 surface antigen in lymphocytes, with no reactivity in the brain. These antibodies were tested on consecutive brain slices using AF488 anti-mouse IgG as the secondary antibody. When the brain section was stained with Tau5A, we observed the presence of the granules (Fig. 1a) and the well-orientated dendrites of the stratum radiatum (inset in Fig. 1a). After preadsorption of Tau5A with tau protein, the staining of the hippocampal granules remained (Fig. 1b) but that of dendrites disappeared (inset in Fig. 1b), indicating that the first staining was not due to the anti-tau antibody. On the other hand, granules were also observed when the brain section was stained with the JJ319 antibody, although this antibody is not directed against brain structures (Fig. 1c). However, when this IgG antibody was purified by protein A, staining of the hippocampal granules disappeared (Fig. 1d). It should be noted that after protein A purification, JJ319 continued to stain positive control tissues such as T lymphocytes in peripheral blood (data not shown). Therefore, it can be inferred that the ascites fluid of JJ319 antibody without protein A purification contained a contaminant that was responsible for staining the granules. This contaminant should be susceptible to recognition by secondary anti-mouse IgG antibodies.

**Table 2** List of antibodies which stained hippocampal granules from SAMP8 mice

Antibody	Host	Monoclonal/polyclonal	Source	Purification	Dilution	Granules staining	IgM
Tau5A	Mouse	Monoclonal	Ascites	Non-purified	1/100	+	+
Tau46.1	Mouse	Monoclonal	Ascites	Non-purified	1/100	+	+
Tau5P	Mouse	Monoclonal	Ascites	Purified <sup>a, b</sup>	1/100 <sup>e</sup>	+	+
JJ319	Mouse	Polyclonal	Ascites	Non-purified	1/50	+	+
JJ319	Mouse	Polyclonal	Ascites	Purified <sup>a</sup>	1/50	–	–
6E10a	Mouse	Monoclonal		Purified	1/100	+	?
6E10b	Mouse	Monoclonal		Purified <sup>b</sup>	1/100	–	–
4G8a	Mouse	Monoclonal		Purified <sup>b</sup>	1/100	+	?
4G8b	Mouse	Monoclonal		Purified <sup>b</sup>	1/100	–	–
12F4a	Mouse	Monoclonal		Purified <sup>b</sup>	1/100	+	+
12F4b	Mouse	Monoclonal		Purified <sup>b</sup>	1/100	–	–
Syndecan-2	Goat	Polyclonal		Purified <sup>c</sup>	1/100	+	+
NeuN	Mouse	Monoclonal	Serum	Non-purified	1/200	+	+
MAP2	Rabbit	Polyclonal		Purified <sup>d</sup>	1/100	+	+
Prp	Rabbit	Polyclonal	Serum	Non-purified	1/100	+	+
MMP2	Rabbit	Polyclonal		Purified <sup>a</sup>	1/200	+	–
Calretinin	Rabbit	Polyclonal	Serum	Non-purified	1/50 <sup>f</sup>	+	+
Calbindin	Rabbit	Polyclonal	Serum	Non-purified	1/50 <sup>f</sup>	+	+
Parvalbumin	Rabbit	Polyclonal	Serum	Non-purified	1/50 <sup>f</sup>	+	+

In the granule staining column, absence of staining (–), presence of staining (+) or not available for testing (?) is indicated. In the last column, the presence (+) or absence (–) of contaminant IgM or not available for testing (?) is shown. Immunostainings have been performed in acetone-fixed fresh frozen tissue except in IHC procedures on PFA and IHC procedures on PFA and previous antigen retrieval

<sup>a</sup>Protein A chromatography, <sup>b</sup>Protein G chromatography, <sup>c</sup>Affinity purification method, <sup>d</sup>Ammonium sulphate precipitation, <sup>e</sup>IHC procedures on PFA, <sup>f</sup>IHC procedures on PFA and previous antigen retrieval

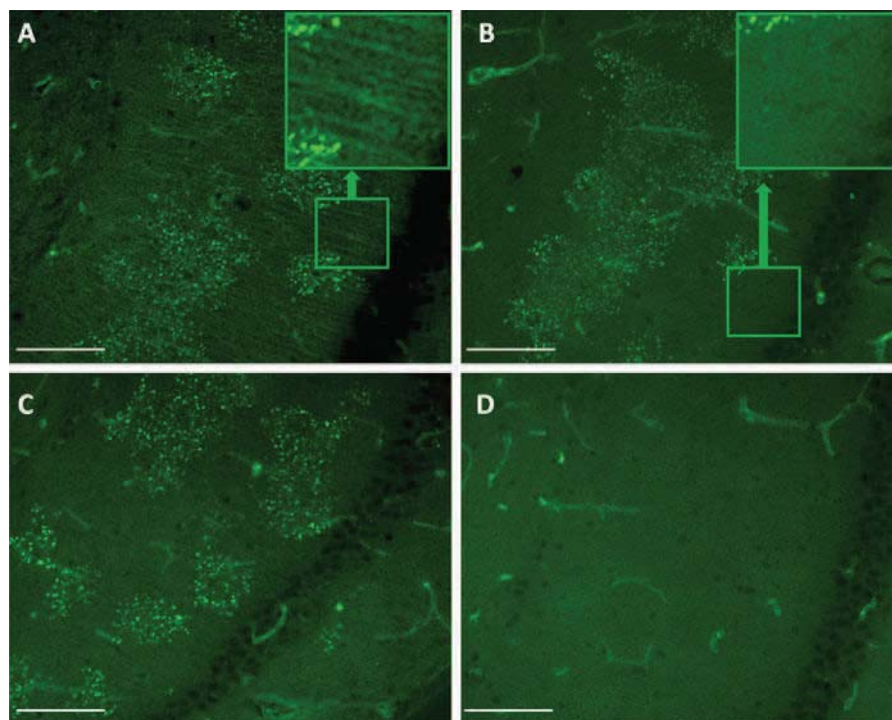
### Tau5A stains membranous structures in the granules

A more precise characterisation of Tau5A staining of the granules was performed using transmission electron microscopy. As shown in Fig. 2a, the granules are dense-core deposits of haphazardly membranous structures surrounded by a peripheral translucent space containing degenerated mitochondria and other organelles. A discontinuous membrane was apparent around all these structures. The granules measured up to 3 µm in diameter, while the dense core measured between 0.5 and 2 µm. When staining with Tau5A with the respective nanogold-conjugated secondary antibody, gold particles appeared in the granule cores (Fig. 2b), mainly staining membranous-like components (Fig. 2c). The membranous staining on the granules is consistent with the MAG epitope, which is located in the cellular membranes of the Golgi compartment and in derivative membranous structures.

The large number of antibodies that stained granules, the non-disappearance of Tau5A staining on granules when the antibody was preadsorbed with tau protein, the capacity of Tau5A to stain membranous structures in the dense core of the granules and the presence of a contaminant in the JJ319 antibody ascites fluid prompted us to study the possible presence of an anti-MAG antibody as a possible ubiquitous contaminant responsible for such staining.

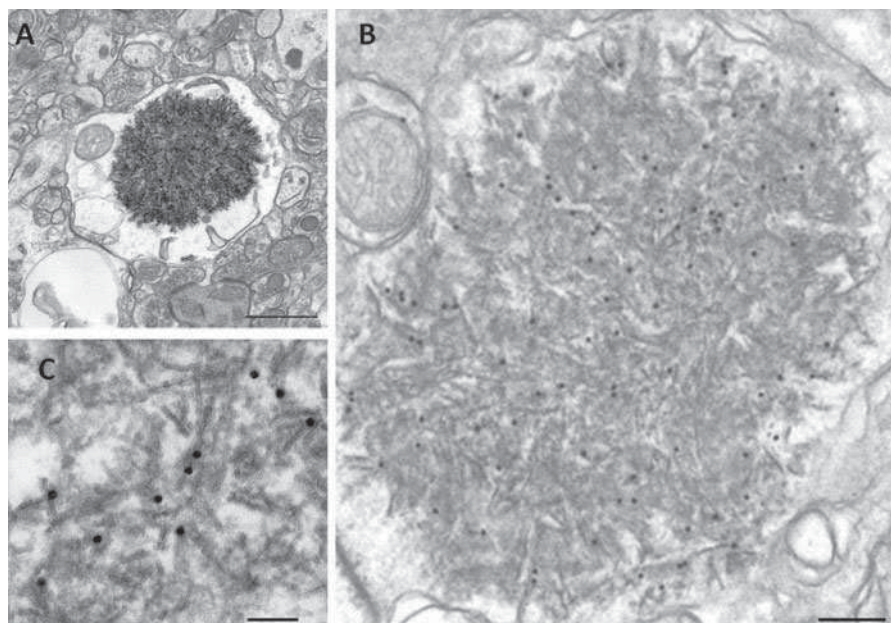
### Presence of antibodies against MAG antigen in the Tau5A ascites fluid

In view of the reported reactivity of anti-MAG antibodies against erythrocytes from blood group A, a haemagglutination test was performed. Human A, B and O Rh<sup>+</sup> and B Rh<sup>–</sup> blood group erythrocytes were incubated with Tau5A antibody with or without a secondary anti-mouse IgG antibody. Positive controls



**Fig. 1** Immunohistochemical detection of SAMP8 CA1 hippocampal granules with antibodies obtained in ascites fluid: **a** anti-Tau5A antibody (in **a** inset: dendrites on stratum radiatum can be observed);

**b** anti-Tau5A antibody preadsorbed with tau protein (in **b** inset: dendrites on stratum radiatum are not stained); **c** JJ319A antibody; and **d** JJ319P antibody purified by protein A. Scale bar 100  $\mu\text{m}$



**Fig. 2** **a** Immunoelectron microscopy image of a SAMP8 hippocampal granule. **b** A granule stained with Tau5A antibody and 10 nm nanogold-labelled secondary antibody. The brightness has

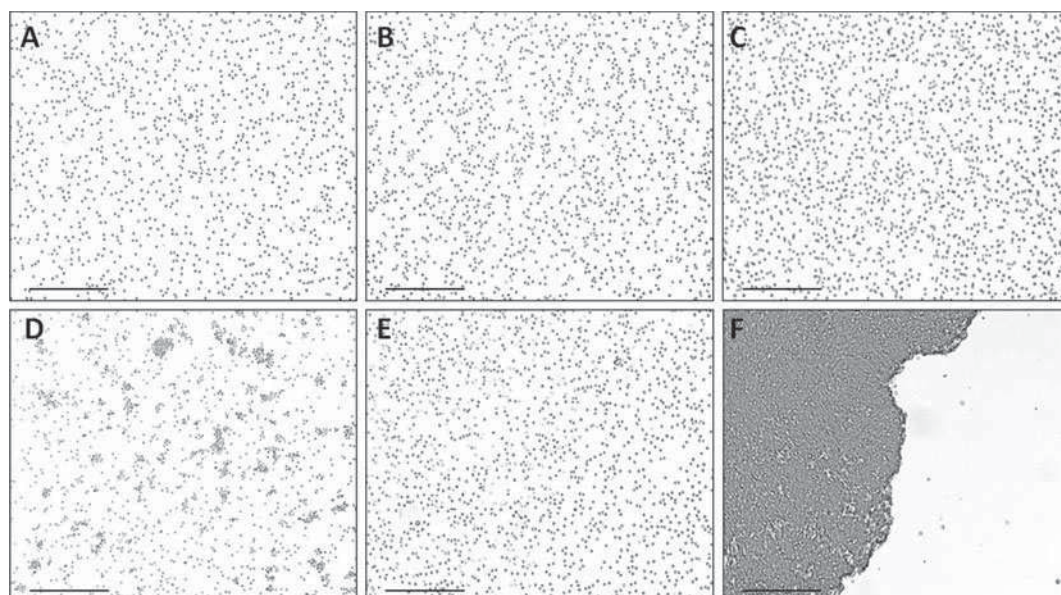
been modified to enhance the visualisation of the nanogold particles. **c** Nanogold particles located in membranous-like components of the granules. Scale bar: **a** 1  $\mu\text{m}$ , **b** 0.2  $\mu\text{m}$ , **c** 0.1  $\mu\text{m}$

were performed using haemagglutination antibody reagents against human blood groups A and B. The results for incubations with Tau5A carried out without the secondary antibody showed no agglutination of O or B group erythrocytes (Fig. 3a–c), whereas a positive haemagglutination of erythrocytes was observed for the A Rh<sup>+</sup> group (Fig. 3d). Although this agglutination was not as strong as that obtained for the positive control (Fig. 3f), it was clearly evident when compared with the absence of agglutination found in B and O erythrocytes or in the negative control of type A blood group (Fig. 3e). When the process was repeated with the secondary antibody, the same results were obtained, with group A being the only one in which Tau5A produced agglutination (data not shown). The capacity of Tau5A to directly agglutinate blood group A erythrocytes supports the presence of an anti-MAG antibody in the ascites fluid and also suggests that this antibody may be of the IgM type.

Antibodies directed against MAG in Tau5A antibody are of IgM type

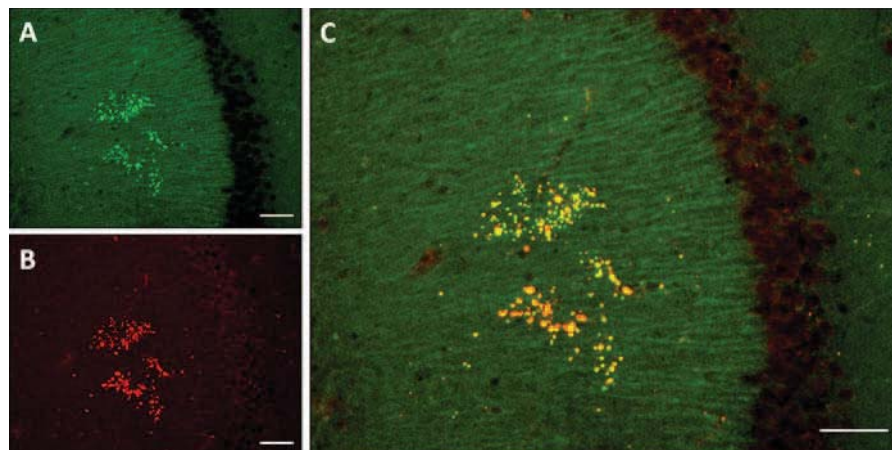
To ascertain whether Tau5A contained a contaminant antibody of IgM type, stainings with Tau5A were performed in SAMP8 hippocampal sections using a

secondary antibody directed specifically against the  $\mu$  chain, which is only present in IgM antibodies, and labelled with AF555. The granules were positively stained, indicating the presence of an IgM antibody that recognised the granules (Fig. 4b). Moreover, the absence of the dendritic staining typical of tau indicated that this IgM antibody does not react against tau protein. The section shown in Fig. 4 was incubated with Tau5A as primary antibody and with both anti-IgM AF55 and anti-IgG AF488. The green channel (AF488) shows the presence of the granules and the dendrites (Fig. 4a). Dendritic staining revealed that, as expected, Tau5A contains an IgG directed against tau protein. However, the presence of granular staining when using the secondary anti-IgG antibody does not indicate the presence of tau in the granules because this anti-IgG recognises not only the  $\gamma$  chain of the IgG but also the light chains of both the IgG and the IgM. As indicated previously, preadsorption with tau protein blocked the dendritic but not the granular staining. Taken together, these results indicate that granular staining with Tau5A was due to the presence of anti-MAG IgM. The merged images obtained from anti-IgG and anti-IgM enabled visualisation of a high colocalisation of both stainings in the granules (Fig. 4c).



**Fig. 3** Haemagglutination test of Tau5A antibody and different human blood group erythrocytes: **a** Group O Rh<sup>+</sup> incubated with Tau5A, **b** group B Rh<sup>+</sup> incubated with Tau5A, **c** group B Rh<sup>-</sup> incubated with Tau5A, **d** group A Rh<sup>+</sup> incubated with Tau5A, **e**

group A Rh<sup>+</sup> incubated with PBS (negative control) and **f** group A Rh<sup>+</sup> incubated with the Novaclone A blood group IgM antibody (positive control). Scale bar 100  $\mu$ m



**Fig. 4** Immunohistochemical staining of the brain sections from SAMP8 mice with Tau5A antibody. **a** Secondary antibody against IgG. **b** Secondary antibody against IgM.

**c** Merging of **a** and **b**. *Yellow* corresponds to colocalisation of both stainings. *Scale bar* 100  $\mu$ m

Tau is not present in the granules of SAMP8 mice

Immunohistochemical stainings were also performed with TauS235 antibody directed against the surrounding Ser235 region of tau protein, equivalent to the epitope region recognised by the Tau5A antibody. TauS235, which does not contain IgM antibodies, stained the hippocampal dendrites with a similar pattern to Tau5A, but did not stain the hippocampal granules (data not shown). These results confirmed that the granules do not contain tau protein.

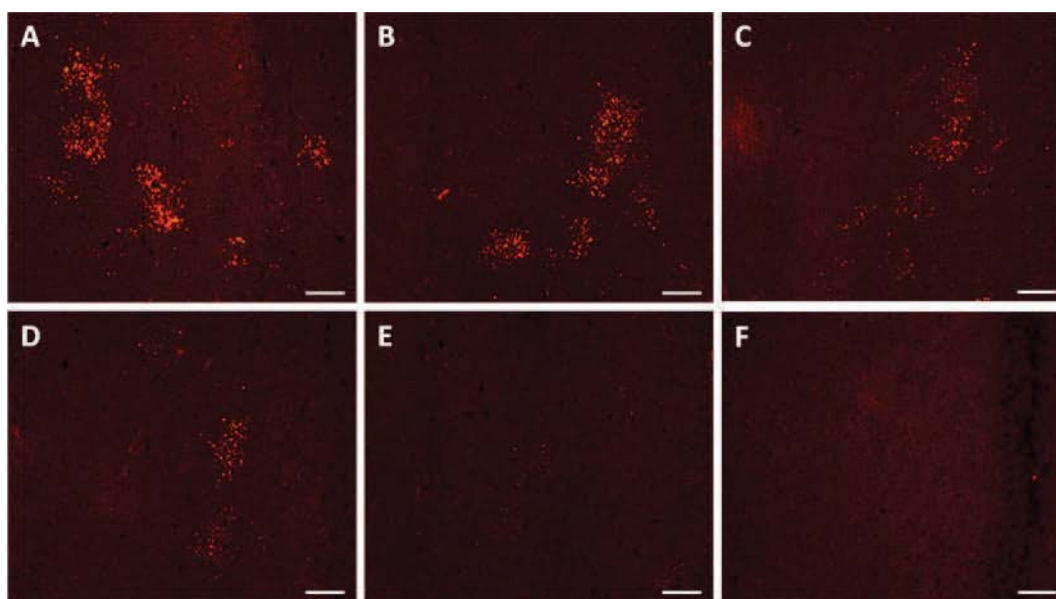
The epitope recognised by the IgM does not correspond exactly to type A blood group epitope, but carbohydrates are determinant in their antigenicity

As the IgM contaminant antibody produced a slight but persistent haemagglutination with human type A blood group antigen, several lectins and antibodies were tested in order to obtain more information about the MAG-like epitope present in the hippocampal granules. We focused on lectins that recognise carbohydrates containing GalNAc, which differentiates the A blood group from the others. None of the lectins tested (see ‘Materials and methods’ section) gave positive staining of the granules. Moreover, antibodies against A1, A2 and A3 blood group epitopes in the brain sections of SAMP8 mice did not stain the granules either (data not shown). Thus, the MAG-like epitope present in the granules does not exactly correspond to the epitope present in the A blood group antigen.

After incubating the Tau5A antibody together with the carbohydrate mixtures at different concentrations, we observed that the granular staining with anti-IgM labelled with AF555 showed a decrease that was inversely proportional to the carbohydrate concentrations (Fig. 5). This inhibition was specific for IgM staining, as the IgG labelling of hippocampal dendrites was not affected by the addition of carbohydrates. Moreover, this inhibition was due to the interaction of IgM with carbohydrates and not to that of carbohydrates with granules because the staining of granules with anti-IgM was not altered when the tissue was previously incubated with any of the carbohydrate mixtures. These results confirm that carbohydrates are at least part of the epitope recognised by IgM contaminant antibodies.

The JJ319 antibody also contains an IgM contaminant antibody that stains the granules

To evaluate the presence of IgM in the mouse ascites fluid of non-purified JJ319, staining with JJ319 was performed in brain sections of aged SAMP8 using the secondary antibody directed against mouse IgM. Observation of the stained hippocampal granules revealed that, as with Tau5A, an IgM antibody that stains granules was present in JJ319 (data not shown). We also observed that, as expected, IgM staining of the granules disappeared after purification of JJ319 with A protein (data not shown). This result also explained the previous findings, in which



**Fig. 5** Immunohistochemical staining of the brain sections from SAMP8 mice with Tau5A after the incubation of the antibody with a mixture of carbohydrates (see text) at the following concentrations: 0 M (**a**, positive control); 0.05 M (**b**); 0.1 M

(**c**); 0.2 M (**d**); 0.4 M (**e**); 0 M and PBS instead of Tau5A (**f**, negative control). In all cases, secondary antibody is anti-IgM. Scale bar 50  $\mu$ m

JJ319 with anti-IgG as a secondary antibody only stained granules when not purified.

IgM antibody against MAG-like epitope is present in most of the antibodies that stain SAMP8 hippocampal granules

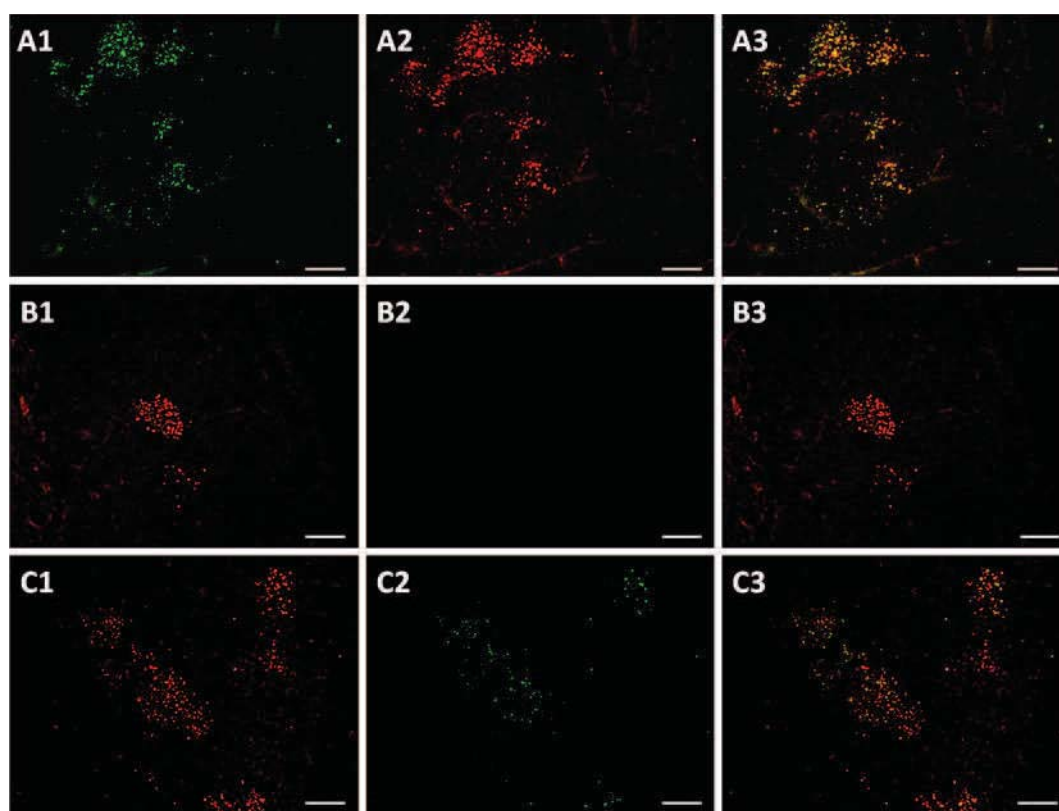
Immunohistochemical procedures performed on the brains of old SAMP8 mice using anti-IgM secondary antibodies enabled us to determine if IgM was responsible, at least in part, for these positive stainings. The results obtained with these antibodies are shown in Table 2. A large number of mouse and rabbit antibodies obtained from either sera or ascites contained IgM antibodies that stained the granules. Some of these antibodies were supplied following purification using A or G protein columns, but also contained a quantity of contaminant IgM that was sufficient to produce artefact stainings. As an example, 12F4a stained the granules with the anti-IgG as secondary antibody but also with the anti-IgM (Fig. 6(a1–a3)).

Among the tested antibodies, we observed two exceptions to the association between the presence of IgM and granule staining. First, the MMP2 antibody stained the granules when using an anti-IgG secondary

antibody but did not stain them when using an anti-IgM, thus indicating that it did not contain contaminating IgM (Fig. 6(b1–b3)). Second, the syndecan-2 antibody stained the granules more intensely when using an anti-IgG as a secondary antibody than when using an anti-IgM (Fig. 6(c1–c3)). In the first case, the possibility that granule staining was due to the presence of an IgM in the MMP2 antibody was therefore excluded, and in the second case, although IgM was present to some extent, it seems that some specific staining was also due to the syndecan-2 antibody.

$\beta$ -Amyloid peptides are absent from SAMP8 hippocampal granules

As shown in Table 2, some batches of 6E10, 4G8 and 12F4 antibodies, directed against A $\beta$  peptides, stained SAMP8 granules when using a secondary anti-IgG antibody, whereas other batches did not. We observed that all batches that did not stain the granules (i.e. 6E10b, 4G8b and 12F4b) had no IgM contamination. As indicated previously and shown in Fig. 6(a1–a3), 12F4a stained the granules with the anti-IgG as secondary antibody but also with the anti-IgM, indicating the presence of the IgM contaminant. The presence of IgM in the 6E10a



**Fig. 6** Double immunohistochemical staining of SAMP8 hippocampal granules performed with a primary antibody and anti-IgG and anti-IgM as secondary antibodies. *A1* 12F4a with anti-IgG. *A2* 12F4a with anti-IgM. *A3* Merging of *A1* and *A2*. *B1*

*MMP2* with anti-IgG. *B2* *MMP2* with anti-IgM. *B3* Merging of *B1* and *B2*. *C1* Syndecan-2 with anti-IgG. *C2* Syndecan-2 with anti-IgM. *C3* Merging of *C1* and *C2*. Scale bar 50  $\mu$ m

and 4G8a batches could not be tested as there was no further stock in our laboratory. These results seem to indicate the absence of A $\beta$  peptides from the hippocampal granules. Given the importance of these findings, further immunohistochemical stainings were performed on brain sections of APP/PS1 mice, which have amyloid plaques that can be used as a positive control for A $\beta$  staining.

#### $\beta$ -Amyloid peptides are absent from APP/PS1 hippocampal granules

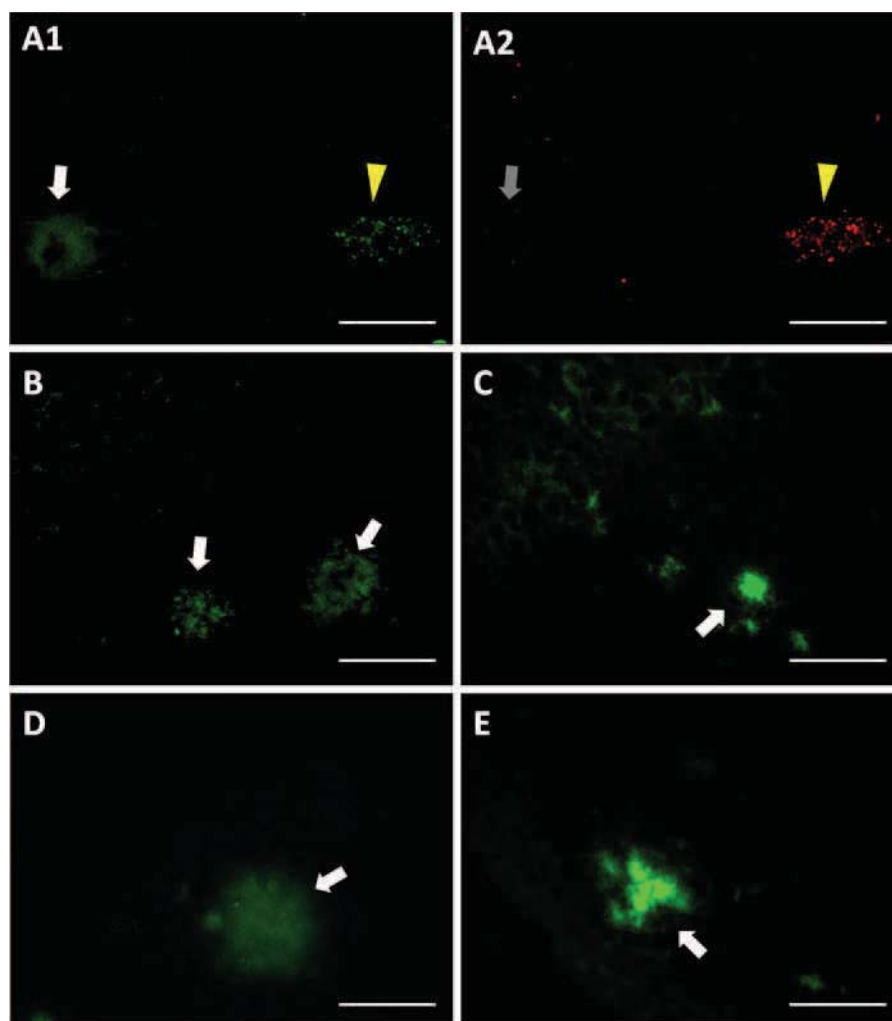
When the hippocampus of 9-month-old APP/PS1 mice was stained with the 12F4a antibody and anti-IgG was used as a secondary antibody, both A $\beta$  plaques and hippocampal granules were stained (Fig. 7(a1)). When staining with a secondary antibody against the IgM, only the staining of the hippocampal granules remained positive, whereas A $\beta$  plaques were not stained (Fig. 7(a2)). Stainings with 12F4b, 6E10b and 4G8b,

which did not contain IgM, showed positive results for A $\beta$  plaques but not for granules when an anti-IgG was used as the secondary antibody (Fig. 7(b, c)). Moreover, Hylite-AF488 and Thioflavin S did not stain granules, but they did stain the A $\beta$  plaques present in the cortex and hippocampus of APP/PS1 mice (Fig. 7(d, e)). Given the findings described thus far, the results indicate that hippocampal granules from both SAMP8 and APP/PS1 do not contain A $\beta$  peptides. It should also be borne in mind that 9-month-old APP/PS1 mice have fewer granules and clusters of granules than SAMP8 mice of the same age (Figs. 6(a1) and 7(a1)).

#### Discussion

In the present study, we describe the presence of a neopeptide of glycosidic nature in the pathological





**Fig. 7** Stainings of brain sections from APP-PS1 mice. Staining with 12F4a antibody and both anti-IgG (*A1*) and anti-IgM (*A2*). *B* Staining with 4G8b antibody and anti-IgG. *C* Staining with 6E10b and anti-IgG. *D* Staining with Hylite-AF488. *E* Staining

with Thioflavin S. *White arrow* amyloid plaque. *Grey arrow* localisation of amyloid plaque that is not stained. *Yellow arrow-head* cluster of granules. *Scale bar* 50  $\mu$ m

hippocampal granules of aged mice. This epitope is present in the granular structures, but not in the other hippocampal or healthy brain regions. We also found that this epitope is recognised by a contaminant IgM present in several antibodies obtained from mouse ascites and both mouse and rabbit sera.

A range of findings indicates that the neo-epitope is constituted, at least in part, by carbohydrates. On one hand, the IgM that recognises the epitope provoked a certain level of agglutination of human type A erythrocytes, but not of the other human blood types, with the main difference between them being the presence of a GalNAc group. On the other

hand, preincubation of the antibodies with carbohydrates blocked the IgM staining.

Neo-epitopes related to carbohydrates have been described in several situations. For instance, in aging processes, there is an increase in the generation of advanced glycation end products (AGE) (Goldin et al. 2006), which are formed by modifications of proteins or lipids that become non-enzymatically glycosylated and oxidised (Schmidt et al. 1994; Singh et al. 2001). Early glycation and oxidation processes result in the formation of Schiff bases and Amadori products that finally lead to the generation of AGEs (Schmidt et al. 1994). On the other hand, neo-epitopes of carbohydrates have also been

described in malignant tumour cells (Vollmers and Brändelin 2006). In this case, the epitopes are post-transcriptional modifications of carbohydrate residues on cell surface glycolipids and glycoproteins (Cobb and Kasper 2005). These carbohydrate antigens are prominent targets of immune surveillance and natural IgM antibodies (Brändelin et al. 2003; Vollmers and Brändelin 2006). Natural IgM antibodies can be present from birth without external antigenic exposure and there is mounting evidence to suggest that they contribute to critical innate immune functions involved in the maintenance of tissue homeostasis (Grönwall et al. 2012). Natural IgM antibodies frequently present cross-reactivity, which is a required feature associated with their function in the first line of defence (Vollmers and Brändelin 2006). Hence, it is conceivable that the new carbohydrate epitope that appeared in the hippocampus granules of mice could be recognised by natural antibodies of IgM type present in ubiquitous form in the ascites or sera of mice or even other species.

The ubiquity and the cross-reactivity of these IgM antibodies may be an important source of misunderstanding in studies on granules. The presence of this contaminant IgM in many commercial and non-commercial antibodies, and even in some batches of purified antibodies, has produced false-positive results. In this study, we re-evaluated the presence of some components previously described in the hippocampal granules of SAMP8 mice, such as A $\beta$  peptides and tau protein, and found that their reported presence is a misunderstanding generated by the presence of the contaminant IgM. It should be noted that as early as 1992, Jucker et al. stated that hippocampal granules in C57BL/6 aged mice do not contain A $\beta$  and that the previously reported A $\beta$  immunoreactivity of these granules was a staining artefact (Jucker et al. 1992).

Moreover, Jucker et al. (1994) later reported that based on distribution, morphology, staining properties and association with glial cells, it would appear that the deposits in C57BL/6 and SAMP8 are identical; this was confirmed by other studies that compared both strains (Kuo et al. 1996). Our results are consistent with all these observations and indicate that the granules present in SAMP8 and APP/PS1 mice do not contain A $\beta$  peptides. Together, the results obtained to date indicate that the granules present in the hippocampus of different mouse strains do not contain A $\beta$  peptides.

Due to IgM contamination, it may be necessary to test for the presence of the other reported granule components, especially in studies where the results are based

on immunohistochemical stainings. Among the 19 antibodies tested in the present study, the MMP2 antibody was the only one that did not contain IgM contaminant but stained the hippocampal granules. Moreover, the syndecan-2 antibody showed just faint IgM staining of the granules, suggesting that most of the staining was due to the genuine presence of syndecan-2.

Studies on the deposition of A $\beta$  peptides in SAMP8 mouse brain have produced controversial results. The deposits described have included, among others,  $\beta$ /A4 protein-like immunoreactivity granular structures ( $\beta$ -LIGS) (Takemura et al. 1993), amyloid  $\beta$ -peptide-like immunoreactivity deposits (A $\beta$ -LI) (Fukunari et al. 1994), reelin deposits that contained A $\beta$  (Knuesel et al. 2009) and the hippocampal granules containing A $\beta$ (1-40) and A $\beta$ (1-42) (Del Valle et al. 2010; Currais et al. 2012; Porquet et al. 2013; Yamaguchi et al. 2012). Morley et al. (2000) found A $\beta$  plaques that were not discernible before 16 months of age and became more prevalent at 22 months of age. However, Nomura et al. (1996) found no evidence of deposits or granular structures in SAMP8 brain although they reported an increase in APP-like immunoreactivity. From their description, the A $\beta$ -LI and reelin deposits containing A $\beta$  reported by Knuesel et al. (2009) would appear to be the pathological granules that we have investigated further in the present study. Given that we found that they do not stain with Thioflavin S or with Hylite-AF488, and that A $\beta$ -staining is a mistake due to the presence of the contaminant IgM, we conclude that there is no deposition of A $\beta$  in these granular structures. It should be noted that Doehner et al. (2010) reported that these granules stained with Thioflavin S, but we did not observe this positivity either in granules from SAMP8 mice or in those from APP/PS1 mice. In the latter, amyloid plaques were used as a positive control for Thioflavin S staining. Thus, the only structures that can be considered as A $\beta$  deposits are the  $\beta$ -LIGS (Takemura et al. 1993) and the A $\beta$  plaques that appear at advanced ages in SAMP8 animals, as described by the Morley group, although neither of these results has been confirmed by other authors or in other strains of mice. Given the above, the use of SAMP8 animals as a model of AD needs to be based not on amyloid deposition, but on other facts. In this regard, several authors have observed an increase with age of A $\beta$ PP and its mRNA in the hippocampus of SAMP8 (Morley et al. 2000; Kumar et al. 2000). On the other hand, abnormal levels of phosphorylated tau protein

have also been described in 11-month-old SAMP8 mice (Wei et al. 1999) and there are higher levels of various forms of hyperphosphorylated tau in SAMP8 compared to SAMR1 (Canudas et al. 2005).

On the other hand, it can be deduced from this study that A $\beta$  peptide levels do not influence the production of pathological granules in the hippocampus. In APP/PS1 animals, overexpression of A $\beta$ PP and overproduction of A $\beta$  peptides cause the formation of amyloid plaques at very early ages. However, at 9 months of age, the number of granules in APP/PS1 transgenic mice is lower than in SAMP8 animals. Thus, an increase in A $\beta$  does not correlate with an increase in granule formation, and the accelerated formation of these granules in SAMP8 must be caused by other pathological mechanisms. Among these, we propose the increase in oxidative stress, as SAMP8 animals treated with resveratrol (Porquet et al. 2013) or ApoE-deficient mice fed with an antioxidant diet (Veurink et al. 2003) show a decrease in the number of hippocampal granules.

In conclusion, we have described the presence of a new neo-epitope of glycosidic nature in the pathological granules of the hippocampus of several strains of mice. This epitope is recognised by contaminant IgM antibodies present ubiquitously in antibodies obtained from mouse ascites and both mouse and rabbit sera and may be a new marker of the pathological process that takes place in the formation of these structures.

**Acknowledgments** This study was funded by grants BFU2010-22149, SAF2011-23631 and SAF2012-39852 from Spain's *Ministerio de Ciencia e Innovación* and *Centros de Investigación Biomédica en Red* from the *Instituto de Salud Carlos III*. We would like to thank the *Generalitat de Catalunya* for funding the research group (2009/SGR00853) and for awarding a predoctoral fellowship to G. Manich (FI-DGR 2011).

## References

- Akiyama H, Kameyama M, Akiguchi I, Sugiyama H, Kawamata T, Fukuyama H, Kimura H, Matsushita M, Takeda T (1986) Periodic acid-Schiff (PAS)-positive, granular structures increase in the brain of senescence accelerated mouse (SAM). *Acta Neuropathol* 72:124–129
- Brändlein S, Pohle T, Ruoff N, Wozniak E, Müller-Hermelink HK, Vollmers HP (2003) Natural IgM antibodies and immunosurveillance mechanisms against epithelial cancer cells in humans. *Cancer Res* 63:7995–8005
- Canudas AM, Gutiérrez-Cuesta J, Rodríguez MI, Acuña-Castroviejo D, Sureda FX, Camins A, Pallàs M (2005) Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau in senescence-accelerated mouse (SAM). *Mech Ageing Dev* 126:1300–1304
- Cobb BA, Kasper DL (2005) Coming of age: carbohydrates and immunity. *Eur J Immunol* 35:352–356
- Currais A, Prior M, Lo D, Jolival C, Schubert D, Maher P (2012) Diabetes exacerbates amyloid and neurovascular pathology in aging-accelerated mice. *Aging Cell* 11:1017–1026
- Del Valle J, Duran-Vilaregut J, Manich G, Casadesús G, Smith MA, Camins A, Pallàs M, Pelegrí C, Vilaplana J (2010) Early amyloid accumulation in the hippocampus of SAMP8 mice. *J Alzheimers Dis* 19:1303–1315
- Doehner J, Madhusudan A, Konietzko U, Fritschy JM, Knuesel I (2010) Co-localization of Reelin and proteolytic AbetaPP fragments in hippocampal plaques in aged wild-type mice. *J Alzheimers Dis* 19:1339–1357
- Finstad CL, Yin BW, Gordon CM, Federici MG, Welt S, Lloyd KO (1991) Some monoclonal antibody reagents (C219 and JSB-1) to P-glycoprotein contain antibodies to blood group A carbohydrate determinants: a problem of quality control for immunohistochemical analysis. *J Histochem Cytochem* 39:1603–1610
- Fukunari A, Kato A, Sakai Y, Yoshimoto T, Ishiura S, Suzuki K, Nakajima T (1994) Colocalization of prolyl endopeptidase and amyloid P-peptide in brains of senescence-accelerated mouse. *Neurosci Lett* 176:201–204
- Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA (2006) Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 114:597–605
- Gooi HC, Feizi T (1982) Natural antibodies as contaminants of hybridoma products. *Biochem Biophys Res Commun* 106:539–545
- Grönwall C, Vas J, Silverman GJ (2012) Protective roles of natural IgM antibodies. *Front Immunol* 3:66
- Jucker M, Walker L, Martin L, Kitt C, Kleinman H, Ingram DK, Price D (1992) Age-associated inclusions in normal and transgenic mouse brain. *Science* 255:1445
- Jucker M, Walker LC, Schwarb P, Hengemihle J, Kuo H, Snow D, Bamert F, Ingram DK (1994) Age-related deposition of glia-associated fibrillar material in brains of C57BL/6 mice. *Neuroscience* 60:875–89
- Kawamata T, Akiguchi I, Yagi H, Irino M, Sugiyama H, Akiyama H, Shimada A, Takemura M, Ueno M, Kitabayashi T, Ohnishi K, Seriu N, Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T (1997) Neuropathological studies on strains of senescence-accelerated mice (SAM) with age-related deficits in learning and memory. *Exp Gerontol* 32:161–169
- Kitamura Y, Zhao XH, Ohnuki T, Takei M, Nomura Y (1992) Age-related changes in transmitter glutamate and NMDA receptor/channels in the brain of senescence-accelerated mouse. *Neurosci Lett* 137:169–172
- Kliman HJ, Feinberg RF, Schwartz LB, Feinman M, Lavi E, Meaddough EL (1995) A mucin-like glycoprotein identified by MAG (mouse ascites Golgi) antibodies. Menstrual cycle-dependent localization in human endometrium. *Am J Pathol* 146:166–181
- Knuesel I, Nyffeler M, Monmède C, Muhia M, Meyer U, Pietropaolo S, Yee BK, Pryce CR, LaFerla FM, Marighetto A, Feldon J (2009) Age-related accumulation of Reelin in amyloid-like deposits. *Neurobiol Aging* 30:697–716
- Kumar VB, Farr SA, Flood JF, Kamlesh V, Franko M, Banks WA, Morley JE (2000) Site-directed antisense oligonucleotide decreases the expression of amyloid precursor protein

- and reverses deficits in learning and memory in aged SAMP8 mice. *Peptides* 21:1769–1775
- Kuo H, Ingram DK, Walker LC, Tian M, Hengemihle JM, Jucker M (1996) Similarities in the age-related hippocampal deposition of periodic acid-Schiff-positive granules in the senescence-accelerated mouse P8 and C57BL/6 mouse strains. *Neuroscience* 74:733–740
- Lamar CH, Hinsman EJ, Henrikson CK (1976) Alterations in the hippocampus of aged mice. *Acta Neuropathol* 36:387–391
- Manich G, Mercader C, Del Valle J, Duran-Vilaregut J, Camins A, Pallàs M, Vilaplana J, Pelegrí C (2011) Characterization of amyloid- $\beta$  granules in the hippocampus of SAMP8 mice. *J Alzheimers Dis* 25:535–546
- Mitsuno S, Takahashi M, Gondo T, Hoshii Y, Hanai N, Ishihara T, Yamada M (1999) Immunohistochemical, conventional and immunoelectron microscopical characteristics of periodic acid-Schiff-positive granules in the mouse brain. *Acta Neuropathol* 98:31–38
- Miyamoto M (1997) Characteristics of age-related behavioral changes in senescence-accelerated mouse SAMP8 and SAMP10. *Exp Gerontol* 32(1–2):139–148
- Morley JE, Kumar VB, Bernardo AE, Farr SA, Uezu K, Tumosa N, Flood JF (2000) Beta-amyloid precursor polypeptide in SAMP8 mice affects learning and memory. *Peptides* 21:1761–1767
- Nomura Y, Okuma Y (1999) Age-related defects in lifespan and learning ability in SAMP8 mice. *Neurobiol Aging* 20:111–115
- Nomura Y, Yamanaka Y, Kitamura Y, Arima T, Ohnuki T, Oomura Y, Sasaki K, Nagashima K, Ihara Y (1996) Senescence-accelerated mouse. *Neurochemical studies on aging*. *Ann N Y Acad Sci* 786:410–418
- Ouwendijk WJD, Flowerdew SE, Wick D, Horn AK, Sinicina I, Strupp M, Osterhaus AD, Verjans GM, Hüfner K (2012) Immunohistochemical detection of intra-neuronal VZV proteins in snap-frozen human ganglia is confounded by antibodies directed against blood group A1-associated antigens. *J Neurovirol* 18:172–180
- Porquet D, Casadesús G, Bayod S, Vicente A, Canudas AM, Vilaplana J, Pelegrí C, Sanfeliu C, Camins A, Pallàs M, Del Valle J (2013) Dietary resveratrol prevents Alzheimer's markers and increases life span in SAMP8. *Age (Dordr)*. In press. doi:10.1007/s11357-012-9489-4
- Schmidt AM, Hori O, Brett J, Yan SD, Wautier JL, Stern D (1994) Cellular receptors for advanced glycation end products: implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. *Arterioscler Thromb* 14:1521–1528
- Shaw MA (1986) Inherent anti-A in mouse ascites fluid. *Med Lab Sci* 43:194–195
- Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L (2001) Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 44:129–146
- Soontornniyomkij V, Risbrough VB, Young JW, Soontornniyomkij B, Jeste DV, Achim CL (2012) Increased hippocampal accumulation of autophagosomes predicts short-term recognition memory impairment in aged mice. *Age* 34:305–316
- Spicer SS, Spivey M, Ito M, Schulte B (1994) Some ascites monoclonal antibody preparations contain contaminants that bind to selected Golgi zones or mast cells. *J Histochem Cytochem* 42:213–221
- Takeda T (2009) Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice. *Neurochem Res* 34:639–659
- Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S, Irino M, Higuchi K, Matsushita T, Tomita Y, Yasuhira K, Hamamoto H, Shimizu K, Ishii M, Yamamuro T (1981) A new murine model of accelerated senescence. *Mech Ageing Dev* 17:183–194
- Takemura M, Nakamura S, Akiguchi I, Ueno M, Oka N, Ishikawa S, Shimada A, Kimura J, Takeda T (1993) Beta/A4 proteinlike immunoreactive granular structures in the brain of senescence-accelerated mouse. *Am J Pathol* 142:1887–1897
- Veurink G, Liu D, Taddei K, Perry G, Smith MA, Robertson TA, Hone E, Groth DM, Atwood CS, Martins RN (2003) Reduction of inclusion body pathology in ApoE-deficient mice fed a combination of antioxidants. *Free Radic Biol Med* 34:1070–1077
- Vollmers HP, Brändlein S (2006) Natural IgM antibodies: the orphaned molecules in immune surveillance. *Adv Drug Deliv Rev* 58:755–765
- Wei X, Zhang Y, Zhou J (1999) Differential display and cloning of the hippocampal gene mRNAs in senescence accelerated mouse. *Neurosci Lett* 275:17–20
- Yamaguchi Y, Saito K, Matsuno T, Takeda K, Hino M (2012) Effects of ZSET1446/ST101 on cognitive deficits and amyloid  $\beta$  deposition in the senescence accelerated prone mouse brain. *J Pharmacol Sci* 119:160–166
- Zhang G, Zhang B, Fu X, Tomozawa H, Matsumoto K, Higuchi K, Mori M (2008) Senescence-accelerated mouse (SAM) strains have a spontaneous mutation in the Abcb1a gene. *Exp Anim* 57:413–417



### **3. ARTICLE 3**

**CLUSTERED GRANULES PRESENT IN THE HIPPOCAMPUS OF AGED  
MICE RESULT FROM A DEGENERATIVE PROCESS AFFECTING  
ASTROCYTIC DIGITATIONS AND THEIR  
SURROUNDING NEUROPIL**

Gemma Manich, Itsaso Cabezón, Antoni Camins, Mercè Pallàs,  
Pawel P. Liberski, Jordi Vilaplana i Carme Pelegrí

Age (Acceptat)

Doi: 10.1007/s11357-014-9690-8



## RESUM

*Objectius:* En aquest treball es pretén estudiar la ultraestructura dels grànuls de l'hipocamp dels ratolins SAMP8, especialment en les seves etapes de formació, i investigar la presència i localització del neo-epítot descrit en el treball anterior. També es vol conèixer si els grànuls són extracel·lulars o intracel·lulars i, en aquest cas, en quin tipus cel·lular es formen.

*Material i mètodes:* Es van utilitzar ratolins SAMP8 mascles de 9 i 14 mesos d'edat. Un grup d'animals es va anestesiar, es va perfondre amb sèrum fisiològic seguit de paraformaldehid al 2% en PBS i després es va extreure el seu encèfal. En alguns encèfals d'aquest grup es van realitzar seccions de 100 µm de gruix amb un vibràtom i es van postfixar en glutaraldehid al 2% en PBS. Després d'incloure les mostres en Spurr es van realitzar talls semifins, després talls ultrafins de la zona CA1 de l'hipocamp i es van observar al microscopi electrònic. Algunes reixetes obtingudes per aquest procés es van tractar per a poder realitzar el marcatge immunohistoquímic amb anticossos IgM anti-neo-epítot presents a l'anticòs anti-tau i també es van observar per microscopia electrònica. Els altres encèfals d'aquest grup es van sotmetre a un procés *freeze-substitution* per realitzar immunomarcadges de més qualitat, tot i perdre l'òptima visualització de l'ultraestructura. Els marcadges es van realitzar amb l'anticòs anti-tau que conté IgM anti-neo-epítot, i amb un anticòs anti-GFAP, per marcar els astròcits.

Un segon grup d'animals es van perfondre només amb sèrum fisiològic i els seus encèfals es van extreure, congelar en isopentà i conservar a -80°C fins a la realització de la immunohistoquímica, que es va dur a terme per mètodes convencionals i es va observar per microscopia de fluorescència i confocal. Els anticossos primaris emprats aquí van ser l'anti-GFAP i l'anti-tau.

Un tercer grup d'animals es va perfondre amb sèrum fisiològic i paraformaldehid al 4% en PBS, es van extreure els encèfals, es van processar adequadament i es van aplicar marcadges immunohistoquímics emprant anticossos anti-CD11b, dirigits contra micròglia, i anticossos anti-CNP, dirigits contra oligodendròcits, a més de l'anticòs anti-*syndecan-2* per marcar els grànuls.

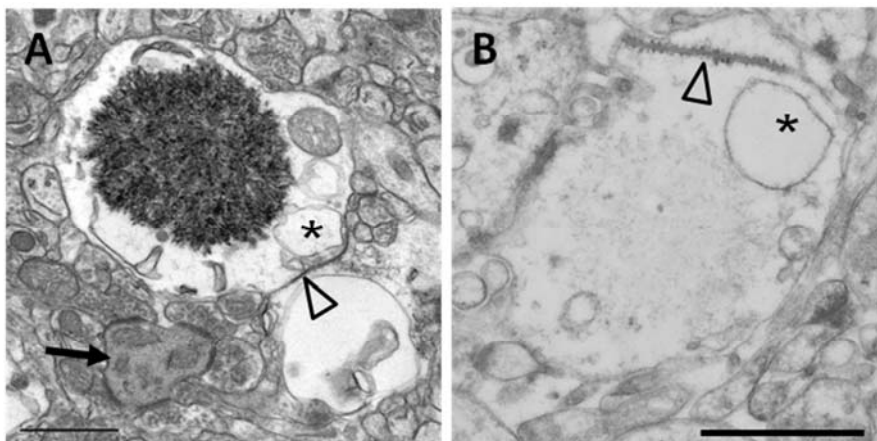
Els diàmetres dels astròcits GFAP-positius i els dels clústers de grànuls es van mesurar utilitzant el programa Image J en imatges obtingudes a 20x, definint la regió d'interès (ROI) i traçant de manera manual el contorn de l'àrea d'influència de cada astròcit i clúster. Per a cada ROI, es va calcular el diàmetre de Feret (la distància més llarga entre dos punts del contorn).

*Resultats:* Els grànuls madurs de l'hipocamp de ratolins SAMP8 presenten una mida de fins a 3 µm de diàmetre i mostren una zona central o core formada per una malla electrodensa



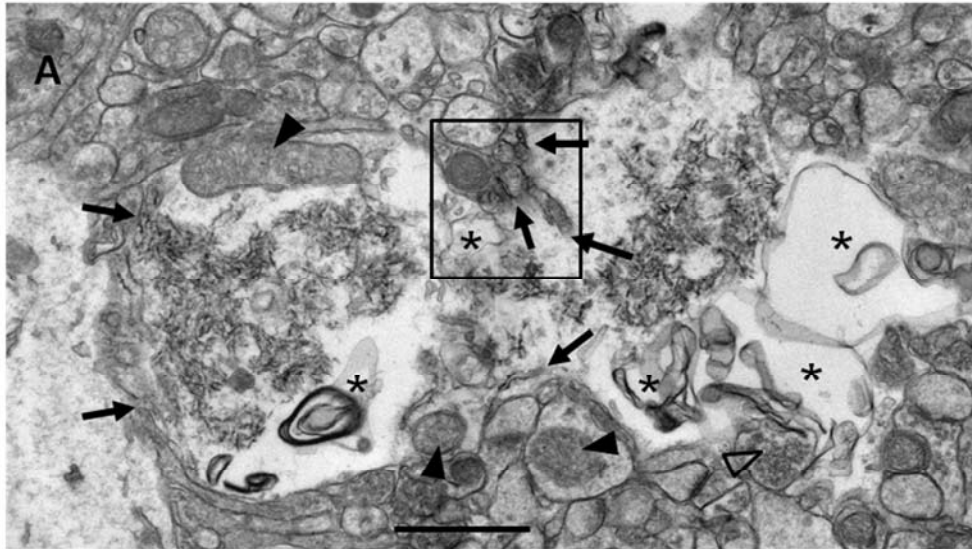
d'estructures membranoses, quan els teixits estan inclosos en Spurr i tractats amb  $\text{OsO}_4$ . Aquesta zona està envoltada per una zona translúcida o halo, i l'halo es troba envoltat per una membrana plasmàtica (Figura 35 A). En aquesta zona es poden observar *blebs* o cisternes. En les seccions incloses en Lowicryl, sense  $\text{OsO}_4$ , els grànuls apareixen pràcticament translúcids (Figura 35 B).

En els dos tipus d'inclusió, es poden observar unions entre cèl·lules característiques de les unions entre astròcits. També es poden observar algunes dendrites en estat de degeneració al voltant dels grànuls.



**Figura 35. Imatges de microscòpia electrònica de grànuls madurs de l'hipocamp de ratolins representatius SAMP8 de 14 mesos.** A) Teixit inclòs en Spurr. B) Teixit inclòs en Lowicryl. Es poden observar *blebs* o cisternes (\*), unions entre cèl·lules adjacents (punta de fletxa buida) i dendrites en estat de degeneració en zones properes (fletxa plena). Barra d'escala: 1  $\mu\text{m}$ .

En tots els animals estudiats es van trobar grànuls immadurs o en procés de formació (Figura 36). Aquests presenten estructures membranoses disperses enlloc d'una zona central compacta o core. Al voltant d'aquestes estructures apareixen blebs o cisternes i mitocondris en estat de degeneració. La membrana plasmàtica dels grànuls i les membranes de les estructures adjacents mostren inestabilitat i fragmentacions.

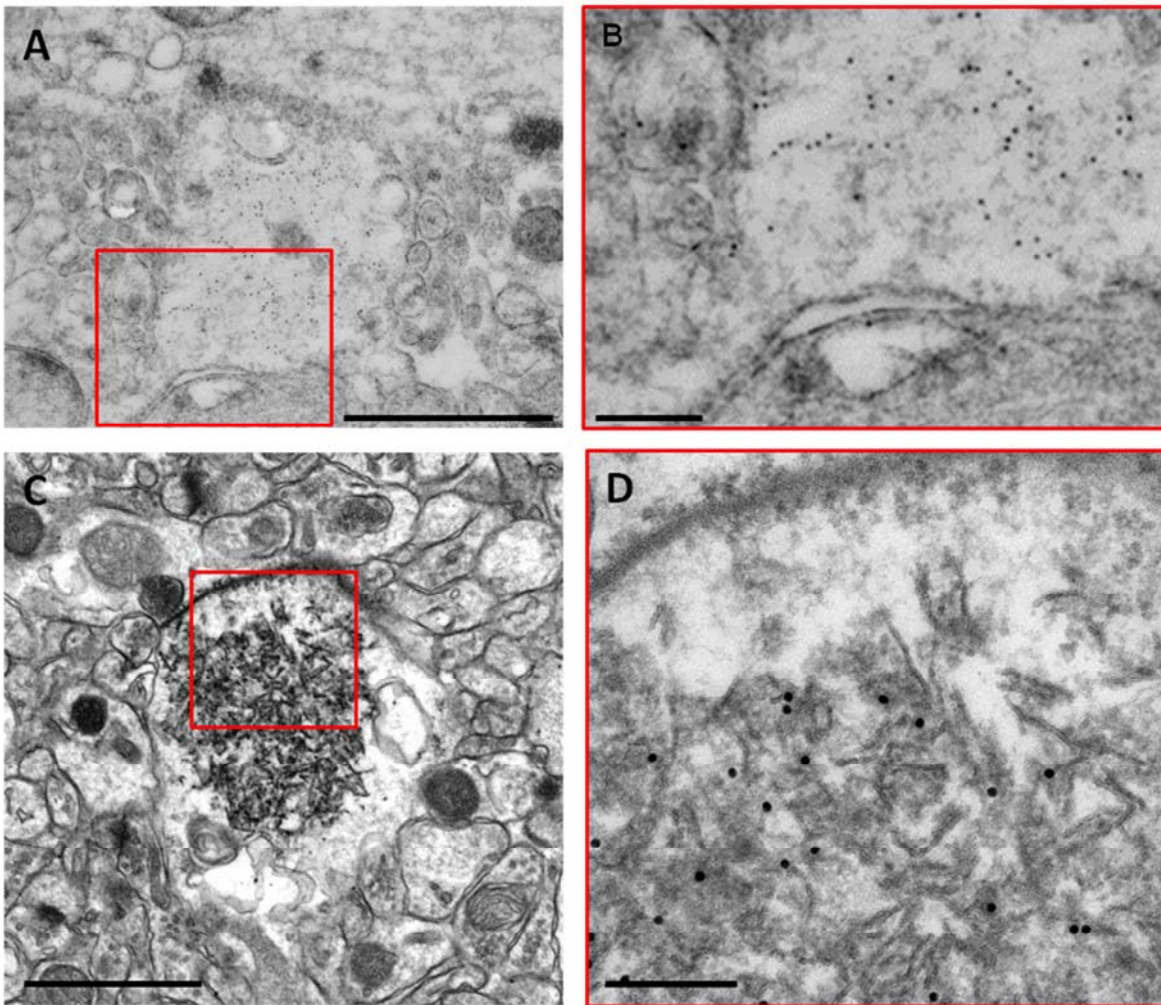


**Figura 36. Imatge de microscòpia electrònica de grànuls immadurs de l'hipocamp d'un ratolí representatiu SAMP8 de 14 mesos.** Es poden observar blebs o cisternes (\*) i mitocondris en estat de degeneració (puntes de fletxa plenes) als voltants dels grànuls. La membrana plasmàtica i les membranes de les estructures adjacents mostren inestabilitat i fragmentacions (fletxes plenes). Barra d'escala: 1  $\mu$ m.

Algunes seccions ultrafines es van processar per mètodes immunohistoquímics amb anticossos anti-GFAP i es van trobar filaments gials marcats positivament a la regió translúcida dels grànuls immadurs, a prop del *core* en formació.

El marcatge immunohistoquímic per fluorescència amb anticossos IgM anti-neo-epítot, presents a l'anticòs anti-tau, i anticossos anti-GFAP va permetre visualitzar els grànuls i els astròcits conjuntament. En la majoria dels casos, no hi ha una clara relació entre ells, però algunes vegades la regió ocupada per un astròcit coincideix plenament amb el clúster de grànuls. En aquests casos, tots els grànuls del clúster tenien una posició molt propera als processus astrocítics i l'àrea dels clústers era similar a l'àrea de l'astròcit. L'estudi morfomètric va determinar una correlació positiva entre ambdós diàmetres. També es van realitzar marcatges amb anticossos dirigits en contra la micròglia i els oligodendròcits i no es va obtenir cap relació entre aquestes poblacions cel·lulars i els grànuls de l'hipocamp.

El marcatge dels grànuls en seccions ultrafines amb anticossos IgM dirigits contra el neo-epítot va mostrar un intens marcatge positiu dels grànuls, sobretot a la zona central o *core* (Figura 38 A i B). A més a més, en les seccions incloses en Spurr es va poder observar que el marcatge positiu està localitzat específicament en els fragments de les estructures membranoses que formen el *core* del grànul, o que l'acabaran constituint (Figura 37 C i D).



**Figura 37. Imatges de microscòpia electrònica de grànuls madurs de l'hipocamp de ratolins representatius SAMP8 de 14 mesos marcats amb anticossos IgM anti-neoepítóp.** A) Teixit inclòs en Lowicryl, el marcatge s'acumula al *core* del grànul. B) Ampliació d'una part d'A. C) Teixit inclòs en Spurr. D) Ampliació d'una part de C. Es pot observar que el marcatge positiu està localitzat a les restes que formen la zona central del grànul però no a l'halus. Barra d'escala d'A i C: 1  $\mu$ m. Barra d'escala de B i D: 200 nm.

*Conclusions:* El present treball mostra que els grànuls que apareixen amb l'envelliment a l'hipocamp dels ratolins són el resultat d'un procés degeneratiu que té lloc sobretot als astròcits, tot i que també poden resultar afectades algunes estructures adjacents. Quan es forma un grànul en un astròcit, d'altres grànuls es formen també als processos del mateix astròcit, formant un clúster. Durant la formació dels grànuls es formen fragments membranosos que constituïran part del core del grànul. El neo-epítóp es troba localitzat en els fragments membranosos que es troben en el *core* dels grànuls madurs o els residus que l'acabaran formant, i es genera durant la formació d'aquests fragments.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
**Clustered granules present in the hippocampus of aged mice result from  
a degenerative process affecting astrocytic digitations and their  
surrounding neuropil**

7  
8  
9  
10  
**Authors:** Gemma Manich<sup>a</sup>, Itsaso Cabezón<sup>a</sup>, Antoni Camins<sup>b,c</sup>, Mercè Pallàs<sup>b,c</sup>, Pawel P. Liberski<sup>d</sup>, Jordi Vilaplana<sup>a,c†</sup>, Carme Pelegrí<sup>a,c†\*</sup>.

11  
12  
13  
14  
† Contributed equally to this study

15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
**Affiliations:** <sup>a</sup> Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n., 08028 Barcelona, Spain. <sup>b</sup> Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n., 08028 Barcelona, Spain. <sup>c</sup> CIBERNED Centros de Biomedicina en Red de Enfermedades Neurodegenerativas. Spain. <sup>d</sup> Department of Molecular Pathology and Neuropathology, Medical University of Lodz, Poland.

25  
26  
27  
28  
29  
30  
\* **Corresponding author:** Carme Pelegrí, Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Av. Joan XXIII s/n. 08028 Barcelona, Spain. Tel. (+34) 93 4024505. Fax. (+34) 93 4035901. E-mail: [carmepelegri@ub.edu](mailto:carmepelegri@ub.edu)

31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
**Running title:** Hippocampal granules in aged mice

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## ABSTRACT

Clusters of pathological granular structures appear and progressively increase in number with age in the hippocampus of several mice strains, markedly in the senescence-accelerated mouse prone 8 mice. In the present work we performed an ultrastructural study of these granules paying special attention to the first stages of their formation, which have not been previously explored. The analysis of the immature granules allowed concluding that granules are not simple accumulations of molecular waste but the result of a degenerative process involving principally astrocytic processes, although nearby neuronal structures can be also affected. The granule generation includes the instability of the plasmatic membranes and the appearance of abnormal membranous structures that form intracellular bubbles or blebs of variable sizes and irregular shapes. These structures and some organelles degenerate producing some membranous fragments, and an assembly process of the resulting fragments generates the dense-core nucleus of the mature granule. Moreover, we found out that the neo-epitope recently described in the mature granules and localised abundantly in the membranous fragments of their dense-core nucleus emerges in the first stages of the granule formation. On the other hand, with this study we increase the evidences that each cluster of granules is formed by the granules comprised in one astrocyte. A better knowledge of the causes of the granule formation and the function of the neo-epitope will help in both the interpretation of the physiological significance of the granules and their contribution to the degenerating processes in aging brain.

**Keywords:** Aging, hippocampus, astrocyte, granules, neo-epitope, Periodic Acid Schiff, SAMP8.

## INTRODUCTION

1  
2  
3 Aging in mice, as well as in other species, involves several associated morphological and  
4 functional changes that can be considered the result of some abnormal or pathological  
5 processes. Among others, pathological granular structures appear and progressively increase  
6 in number with age in the hippocampus of several mice strains. The positive reaction to the  
7 Periodic Acid Schiff stain is their main histochemical feature. The granules, sized up to 3  $\mu\text{m}$  of  
8 diameter, appear first in the *stratum radiatum* of CA1 region and they progressively extend to  
9 other hippocampal regions. They do not usually appear isolated but they tend to form clusters  
10 of about 80  $\mu\text{m}$  in diameter each containing approximately 40-50 granules. These clustered  
11 granules have been reported, among others, in the brain of aged C57BL/6 mice (Lamar *et al.*,  
12 1976; Jucker *et al.*, 1992), senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice (Akiyama *et al.*,  
13 1986), AKR mice (Mitsuno *et al.*, 1999) and ICR-CD1 mice (Del Valle *et al.*, 2010). In SAMP8  
14 mice, which present an accelerated process of aging, the granules appear as early as 3 months  
15 of age, earlier than in the other reported mice strains, and the number of clusters and granules  
16 increases and spreads faster than in the other strains (Jucker *et al.*, 1994; Del Valle *et al.*,  
17 2010).

18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27 Ultrastructural studies revealed that granules have a central core of electron-dense crystalline-  
28 like fibrillar deposition generally surrounded by a halo or electron-lucent region. The halo is  
29 delimited externally by a plasma membrane which suggests a cellular location, although  
30 appears discontinuous in some regions. The central core is round to ovoid in shape, and the  
31 membrane-like structures contained in it are haphazardly aggregated and do not resemble any  
32 cell organelle. Moreover, organelles cannot be observed in this centre. On the contrary,  
33 cytoplasmic organelles like endoplasmic reticulum, polyribosomes, intermediate filaments,  
34 multivesicular bodies or mitochondria have been occasionally described in the halo region  
35 (Kuo *et al.*, 1996; Robertson *et al.*, 1998; Mitsuno *et al.*, 1999; Doehner *et al.*, 2010; Manich *et al.*,  
36 2014). Although it can be considered that the material stored in the centre of the granules  
37 is just an accumulation of molecular waste, the successive ultrastructural changes from the  
38 exterior to the interior of the granules suggested to some authors that the pathological  
39 process is initiated in the outside of the granules and that the degenerative structures migrate  
40 inward (Kuo *et al.*, 1996). It must be pointed out that all ultrastructural studies performed until  
41 now are based on the observations of mature granules, and immature granules or granules in  
42 the first stages of their formation have never been observed. As early as 1999, Mitsuno and co-  
43 workers indicated that in order to clarify whether different cells are involved in granule  
44 formation, electron microscope studies of the early phase of granules formation were needed  
45 (Mitsuno *et al.* 1999). These observations will allow to precise the mechanisms underlying their  
46 formation and to unveil their origin.

47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60 Whether the origin of the granules is neuronal or astrocytic has not been clarified yet. A

1 neuronal origin has been suggested based on the presence of synaptic contacts to the plasma  
2 membrane (Mitsuno *et al.*, 1999) and it has been assumed from another ultrastructural study  
3 that granules are located in abnormal synaptic terminals (Irino *et al.*, 1994). In addition, the  
4 description of some neuronal origin components, such as amyloid- $\beta$  peptides (Robertson *et al.*,  
5 1998; Knuesel *et al.*, 2009; Del Valle *et al.*, 2010), neuronal nuclei protein and tau protein  
6 (Manich *et al.*, 2011; Krass *et al.*, 2003) or reelin protein (Knuesel *et al.*, 2009) also suggested a  
7 neuronal origin or, at least, some involvement of neurons in their formation. In contrast, a  
8 remarkably tight relationship between granules and astrocytes has been found in several  
9 occasions. In electron microscopy studies, granules have been observed within both the cell  
10 bodies and processes of protoplasmic astrocytes that were expanded and their normal content  
11 of cytoplasmic organelles greatly diluted (Robertson *et al.*, 1998). Light microscopy and  
12 confocal laser microscopy observations revealed that some granules are associated with the  
13 processes of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-positive astrocytes (Akiyama *et al.*, 1986;  
14 Jucker *et al.*, 1994; Manich *et al.*, 2011) and in some cases a cluster can be directly associated  
15 with a GFAP-positive astrocyte (Jucker *et al.*, 1994; Manich *et al.*, 2011). It has been  
16 hypothesized that granules are a byproduct of neuronal phagocytosis carried out by  
17 astrocytes, or that they can be produced by astrocytes (Kuo *et al.*, 1996). It has been recently  
18 proposed that aged neurons with impairments in their proteosomal/lysosomal degradation  
19 system form, as a protective strategy, 'budding-like' extrusions with accumulation of damaged  
20 or misfolded proteins, and that subsequently the aggregated extruded fibrillary material is  
21 engulfed by glia (Doehner *et al.*, 2012).  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32

33  
34 In spite of all these studies, the results obtained until now are not yet conclusive and  
35 sometimes are contradictory. In this sense, it must be taken into account that staining of  
36 granules with polyclonal antibodies was found to be non-specific (Jucker *et al.*, 1992). Our  
37 group recently reported that false positive stainings are due to the recognition of a neo-  
38 epitope in the granules by antibodies of IgM nature that are frequently present as a  
39 contaminant on commercial antibodies obtained from ascites or sera (Manich *et al.*, 2014). The  
40 IgM and the neo-epitope are responsible for numerous false positives, and the erroneous  
41 alleged presence of some components has distorted the study of these hippocampal granules.  
42 In any case, the significance of the neo-epitope and its possible role is unknown, and its  
43 location and appearance during the first phases of granule formation has not been explored  
44 yet.  
45  
46  
47  
48  
49  
50

51  
52 The present work has been mainly focused on the observation under electron microscope of  
53 the hippocampal granules in the first stages of formation, in order to describe the granule  
54 formation process and to clarify their cellular origin. Moreover, we studied the presence of the  
55 neo-epitope during the granule formation process and its precise location in the mature and  
56 immature granules. The ultrastructural studies have been complemented by  
57 immunofluorescence studies.  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 **MATERIALS AND METHODS**

2  
3  
4 **Mice**

5  
6  
7 Aged male SAMP8 mice (9 or 14 months old) were used. They were kept at standard  
8 temperature conditions ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and 12:12 h light-dark cycles (300 lux/0 lux). Throughout the  
9 study they had access to food and water *ad libitum*. All experimental procedures were  
10 reviewed and approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation of the University  
11 of Barcelona (DAAM 6459).  
12  
13  
14

15  
16  
17 **Brain processing for ultrastructural observation on transmission electron microscopy**

18  
19 The animals were anaesthetised intraperitoneally with 80 mg/kg of sodium pentobarbital and  
20 perfused intracardially with 50 mL of saline solution followed by 50 mL of p-formaldehyde (PF,  
21 Sigma-Aldrich) at 2% in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4). Coronal sections of 100- $\mu\text{m}$   
22 thickness were obtained with a vibratome. Sections were post-fixed with 2% glutaraldehyde  
23 (Sigma-Aldrich) in PBS. The samples were treated with 1% osmium tetroxide ( $\text{OsO}_4$ )  
24 containing potassium ferricyanide for 1 h at  $4^\circ\text{C}$ , dehydrated in acetone at  $4^\circ\text{C}$  and finally  
25 embedded in Spurr resin. Semi-thin sections ( $1\mu\text{m}$  thickness) were obtained, and after  
26 methylene blue staining, hippocampal CA1 regions were localised. Ultra-thin sections (55 nm  
27 thickness) were obtained using a Reichert-Jung ultracut E ultramicrotome and a diamond knife  
28 (Diatome, Switzerland), and the sections were then placed on gold grids and post-stained with  
29 uranyl acetate and lead citrate. Ultra-thin sections were examined using a JEM-1010  
30 transmission electron microscope operated at an accelerating voltage of 80 kV. The images  
31 were obtained using a Bioscan 792 camera (Gatan, CA, USA).  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40

41 The grids used for immunostaining were previously etched with 5%  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 6 minutes,  
42 washed for 5 minutes with distilled water (5 times) and washed again with 0.1M PBS for 5  
43 minutes. Samples were then blocked for 30 minutes on drops of 1% bovine serum albumin  
44 (BSA) in PBS and 20mM glycine (Sigma-Aldrich) for 20 min, and incubated in the mouse IgM  
45 anti-neo-epitope primary antibody contained in anti-tau IgG antibody produced in mouse  
46 ascites (1/100, Merck Millipore, Darmstadt, Germany, see ref. Manich *et al.*, 2014) in blocking  
47 buffer for 2 h. Then, the grids were washed 4 times with PBS and sections were incubated for 1  
48 h using an anti-mouse IgG secondary antibody coupled to 15 nm diameter colloidal gold  
49 particles (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) using a 1:30 dilution in blocking buffer. The  
50 incubation was followed by three washes with drops of PBS for 5 min, four washes with  
51 distilled water, and air-drying. Controls of staining were performed omitting the primary  
52 antibody. Sections were stained with 2% uranyl acetate in methanol and lead citrate.  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



1  
2  
3 **Brain processing and immunostaining for transmission electron microscopy**  
4  
5

6 For freeze-substitution, samples were chemically fixed by perfusion at 4°C with a mixture of  
7 4% PF and 0.1% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4). After washing with the  
8 same buffer containing 0.15 M glycine, samples were gradually infused in 30% glycerol in the  
9 same buffer, as a cryoprotection, and then they were frozen in liquid propane at -188 °C (Leica  
10 EM CPC, Leica Microsystems, Vienna) and stored in liquid nitrogen at -196 °C until the freeze-  
11 substitution was done. Freeze-substitution was performed in an Automatic Freeze substitution  
12 System (AFS; Leica Microsystems), using methanol containing 0.5% of uranyl acetate, for 3  
13 days at -90 °C. On the fourth day, the temperature was slowly increased, by 5 °C/hour, to -50  
14 °C. At this temperature, samples were rinsed in methanol, and then infiltrated and embedded  
15 in Lowicryl HM20 for 10 days. Ultrathin sections were obtained using a Leica Ultracut UC6  
16 ultramicrotome (Leica Microsystems) and were picked up on Formvar-coated gold grids.  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23

24 For the process of immunolabelling, sections were incubated at room temperature on drops of  
25 5% BSA in PBS for 20 min, followed by primary antibody chicken anti-GFAP IgG (1/50, Merck  
26 Millipore) or the mouse IgM anti-neo-epitope primary antibody contained in anti-tau IgG  
27 antibody produced in mouse ascites (1/100, Merck Millipore) in 1% BSA in PBS for 2 h. After  
28 three washes with drops of 0.25% Tween 20 in PBS for 30 min, sections were incubated for 1 h  
29 using a secondary antibody anti-chicken IgG or anti-mouse IgM coupled to 12 or 18 nm  
30 diameter colloidal gold particles (Jackson ImmunoResearch Laboratories) using a 1:30 dilution  
31 in 1% BSA in PBS. This was followed by three washes with drops of PBS for 5 min, two washes  
32 with distilled water, and air-drying. As a control for non-specific binding of the colloidal gold-  
33 conjugated antibody, the primary polyclonal antibody was omitted. Sections were stained with  
34 2% uranyl acetate in methanol and lead citrate and observed in a JEM-1010 electron  
35 microscope (Jeol, Japan) working at 80 kV and the images were digitized with a Megaview III  
36 CCD camera.  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45

46 **Brain processing and immunohistochemistry for fluorescence and confocal microscopy**  
47  
48

49 On one set of experiments, SAMP8 animals were anaesthetised intraperitoneally with sodium  
50 pentobarbital (80 mg/kg). They received an intracardiac gravity-dependent perfusion of 50 mL  
51 of saline solution. Brains were dissected and frozen by immersion in isopentane chilled in dry  
52 ice. Then, frozen brains were cut into 20-µm-thick sections on a cryostat (Leica Microsystems,  
53 Germany) at -22 °C, and placed on slides. Sections were fixed with acetone for 10 min at 4 °C  
54 and frozen at -20 °C. On these sections, the immunohistochemistry procedures were  
55 performed as described in Manich *et al.* (2014). Briefly, sections were rehydrated with PBS and  
56 they were blocked and permeabilised with 1% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, Madrid,  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Spain) and 0.1% Triton-X-100 (Sigma-Aldrich) in PBS for 20 min. Sections were then washed with PBS and incubated overnight with both the chicken primary antibody anti-GFAP IgG (1/300, Merck Millipore) and the mouse IgM anti-neo-epitope primary antibody contained in anti-tau IgG antibody produced in mouse ascites (1/100, Merck Millipore, see ref. Manich *et al.*, 2014). Slides were washed and incubated for 1 h at room temperature with the secondary antibodies AlexaFluor 488 goat anti-chicken IgG (1/250, Life Technologies, Carlsbad, CA) and goat anti-mouse IgM-TRITC (1/50, Jackson Immunoresearch Laboratories). Nuclear staining was done with Hoechst (H-33258, Fluka, Madrid, Spain) and slides were washed and coverslipped with Prolong Gold antifade reagent (Life Technologies). Controls of staining were performed incubating only with PBS, or with PBS and the secondary antibodies. Antibody cross-reactivity controls were also performed. Images of all the hippocampal clusters and GFAP-positive astrocytes contained in three brain sections of four 9-month-old SAMP8 mouse were taken using a fluorescence laser microscope (BX41, Olympus, Germany) and stored in tif format. These images were obtained in green, red and ultraviolet channels using a 20x objective. Random selected GFAP-positive astrocytes and clusters of granules were also obtained with the 60x objective. For each magnification, all images were acquired using the same laser and software settings. Images of selected areas that contain clusters of granules that colocalize with a GFAP reactive astrocyte were also taken with confocal scanning laser microscope (TCS/SP2, Leica Microsystems) for fine colocalization analysis. Orthogonal sections were obtained from these images to analyze the colocalization and spatial distribution of the fluorescence staining.

On another set of experiments, SAMP8 animals were perfused intracardially with 50 mL of saline solution followed by 50 mL of p-formaldehyde (PF, Sigma-Aldrich) at 2% in PBS. Brains were then dissected, postfixed 4 hours in PF at 2% in PBS and cryoprotected by immersion in PBS with 30% sucrose for 24 hours. Afterwards, brains were frozen by immersion in isopentane chilled in dry ice and stored at -80 °C until further use. Then, frozen brains were cut into 20- $\mu$ m-thick sections on a cryostat (Leica Microsystems, Germany) at -22 °C, and placed on slides. Using the same immunohistochemistry procedures described before, a double staining of some sections with rat *anti-CD11b directed against microglia* (1/100, Merck Millipore) and the goat anti-Syndecan antibody (1/100, Santa Cruz Biotechnology, CA) has been performed. This antibody has been proved to contain IgM antibodies directed against the neo-epitope. Secondary antibodies were *AlexaFluor 488 donkey anti-rat IgG* (1/250, Life Technologies, Carlsbad, CA) and *AlexaFluor 555 donkey anti-goat IgG* (1/250, Jackson Immunoresearch Laboratories). This last secondary antibody has cross reactivity with the IgM. Other sections have been double stained with mouse *anti-CNP directed against oligodendrocytes* (1/100, Abcam, UK) and the goat anti-Syndecan (1/100, Santa Cruz Biotechnology, CA) to stain the neo-epitope. In this case, secondary antibodies were *AlexaFluor 488 donkey anti-rat IgG* (1/250, Life Technologies, Carlsbad, CA) and *AlexaFluor 555 donkey anti-goat IgG* (1/250, Jackson Immunoresearch Laboratories) in the second one. Sections were observed and some

images were taken using the same fluorescence laser microscope (BX41, Olympus, Germany).

### ***Astrocyte and cluster diameter quantification***

The diameters of the GFAP-positive astrocytes and those of the granule clusters were measured using the Image J program (National Institute of Health, USA) on images obtained with the 20x objective. In both cases, each region of interest (ROI) was selected by using the “freehand selection” tool of the image J program, manually tracing the contour of the area of influence of each astrocyte or granule cluster, as exemplified in the ROIs indicated in Figure 5A. For each ROI, the Feret's diameter (the longest distance between any two points along the selection boundary, also known as maximum calliper) was determined. As the fine extreme processes of the astrocytes are not visible at 20x magnification, Feret's diameter values of the astrocytes have been corrected by the factor 1.23. This factor was calculated after comparing the value obtained for some astrocytes in both the 60x and the 20x magnification. The measure of the Feret's diameter of the granule clusters was not affected by the magnification, and thus it has not been corrected.

### ***Statistical analysis***

Statistical analyses were performed by means of ANOVA, t-test for dependent samples and correlation analysis by using Statistica for Windows (Stat Soft Inc.). Differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### **Ultrastructural characterization of mature hippocampal granules**

A portion of the hippocampal neuropil from SAMP8 mice aged 14 months is shown in Figure 1. In this area, several mature and immature granules from the same cluster can be visualized. Mature granules measured up to 3  $\mu\text{m}$  of diameter and presented a core formed by a dense mesh of electron-dense membranous-like structures when tissues were embedded in Spurr and treated with  $\text{OsO}_4$ . This core was surrounded by an electron-translucent region (halo), and this halo was encircled by a plasma membrane (Figure 2A). On the other hand, granules appeared practically translucent in sections embedded in Lowicryl, without  $\text{OsO}_4$  (Figure 2B). As  $\text{OsO}_4$  highlights the lipidic compounds, this observation indicates a high lipidic content of the granules core. On Spurr-embeded tissues, the translucent region contained some blebs or big cisterns, which seemed to originate from invaginations of the surrounding plasma membrane, but could also be near or maintain a close contact with the core of the granules (Figures 2A and 2C). Small granular structures compatible with glycogen and some cellular organelles, like mitochondria (Figures 2A and 2D), usually in a degenerating state (Figure 2D) are also observed in the translucent region. Moreover, the plasmatic membrane surrounding the granules frequently showed some characteristic junction with the membranes of adjacent cells (Figures 2A and 2B), described by Kuo *et al.* (1996) as astrocyte-astrocyte junctions. These junctions between astrocytes were also observed in some hydropic astrocyte end-feets around the blood vessels, an area where some granules have also been visualized (data not shown).

In general, the structures contained in the immediately surrounding area of the mature granules do not present perceivable morphological alterations. Occasionally some symptoms of worsening have been detected, such as degenerating dendrites (Figure 2A) or presynaptic buttons with mitochondria suffering a mitophagic process (Figure 2D). Other pathologic signs present in the hippocampal tissue but not always close to the granules were hydropic astrocytes with signs of swelling (data not shown).

### **Ultrastructural characterization of immature hippocampal granules**

As SAMP8 animals show a progressive and sustained increase of the number of granules and clusters, at the studied ages it was expected to find not only already formed granules, but also granules in process of formation. Occasionally granules that presented some sparse membranous-like structures, instead of a compact core, have been observed. We judged these structures, not described formerly, as granules in the first stages of their formation (immature granules). In Figure 1 some immature granules close to the mature granules could be observed. In Figure 3 several immature granules from 14-month-old mice are shown at high magnification. There are some features that are repeated in almost all the immature granules.

1 The most characteristic is the presence, in the translucent zone, of membranous structures  
2 that form intracellular bubbles or blebs, of variable sizes and irregular shapes, generally not  
3 spherical (Figures 3A and 3B). Although in some cases they resemble the smooth endoplasmic  
4 reticulum, blebs are generally not equivalent to any of the membranous organelles. Some of  
5 the blebs appeared merged with the plasma membrane, while others reached the  
6 membranous matrix of the inside of the granule (Figures 3A and 3B). In some cases, bleb  
7 membranes close to the core seem to fragment, and membrane fragments appear to be  
8 incorporated to the matrix (Figure 3B). Degenerating mitochondria could also be observed in  
9 the translucent zone (Figures 3A and 3B), and in some cases waste parts of the mitochondrial  
10 membrane seemed to be projected towards the central zone of the granule in formation  
11 (Figure 3B). The plasma membrane of the immature granules is often fragmented or unstable,  
12 as well as some membranes of adjacent structures, thus losing the boundaries between the  
13 cell where the granule is formed and the adjacent structures (Figures 3A, 3B and 3C, and a  
14 magnified region from 3A shown in 3D). These phenomena of membranous rupture of cellular  
15 structures adjacent to the immature granules are particularly evident in granules in formation,  
16 and causes that part of the neuropil next to the granule will be incorporated to it. For instance,  
17 in Figure 3C a presynaptic button with its vesicles could be observed, without part of the  
18 external membrane, and thus connected to the translucent area of the adjacent granule.  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28

29 On the other hand, some ultrathin sections were immunostained with anti-GFAP antibodies,  
30 and glial filaments positively labelled could be occasionally observed on the translucent region  
31 of some granules, near the forming core of the immature granules (Figure 3E). Moreover,  
32 some immature granules have been observed in some hydropic end-feet processes of the  
33 astrocytes surrounding the blood vessels, in which some astrocytic junctions as those  
34 described above were present (data not shown).  
35  
36  
37  
38  
39  
40

#### 41 **Fine localisation of the neo-epitope on the granules**

42  
43  
44 The immunostaining with the IgM antibody directed against the neo-epitope in Lowicryl-  
45 embedded sections allowed the determination of the precise location of the neo-epitope on  
46 the granules (Figure 4A). The nanogold particles intensely stained the granules and were  
47 mainly located in the core, although few of them could be observed next to the plasma  
48 membrane or in adjacent structures (Figure 4B). In the sections embedded in Spurr, it could be  
49 observed that the nanogold particles contained in the core are specifically located on the  
50 fragments of the membranous structures (Figures 4C and 4D). In the translucent zone, the  
51 staining was only located in membranous remnants (similar to those present in the core) but  
52 absent in the cytoplasm. In the immature granules (Figures 4E and 4F), the staining was  
53 located mainly in the region where the core is forming, but it could also be distinguished in  
54 some membranes of the adjacent structures.  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

### **Relationship between the clustered granules and the astrocytic cells**

Simultaneous fluorescence immunostaining with IgM antibodies directed against the neo-epitope and anti-GFAP antibodies allowed the visualization of the clustered hippocampal granules of SAMP8 mice as well as GFAP-positive astrocytes. In most cases, there is no relationship between GFAP-positive astrocytes and clusters, but sometimes the region occupied by a certain GFAP-positive astrocyte coincided with that occupied by the cluster of granules (Figure 5A). In those cases, the observation of both structures using confocal microscopy confirmed a close relationship between the astrocytic processes and the granules, i.e., the granules were located next to astrocytic processes without exception (Figure 5B), and some granules were even surrounded by the processes (Figure 5C). Simultaneous fluorescence immunostaining has also been performed with a) IgM antibodies and anti-CD11 antibodies, a marker for microglial cells, and b) IgM antibodies and anti-CNP antibodies, directed against oligodendrocytes. In any of these cases, the positive cells have been observed to be related neither to the granules nor to the clusters (Figure 5E and 5F). Thus, astrocytes, but not microglia or oligodendrocytes, are candidate to be related to the pathological process related to the granule formation.

As it is indicated, only some granule clusters match with the area of influence of a GFAP positive astrocyte. However, the size of the clusters appears to be somehow constant and similar to that of GFAP-positive astrocytes. To compare the sizes of both structures, a morphometric study was performed by determining the Feret's diameter of clusters and that of GFAP-positive astrocytes present in different sections from the hippocampus of SAMP8 mice. The Feret's diameter from 450 clusters and 610 astrocytes has been measured. In 123 cases, the cluster colocalized with a GFAP-positive astrocyte. However, the remaining 487 GFAP-positive astrocytes were not related with a granule cluster and the other 327 granule clusters did not show any relation with a GFAP-positive astrocyte. The mean Feret's diameter of astrocytes was  $71.289 \mu\text{m}$  ( $\pm 0.562 \mu\text{m}$ ), whereas the mean Feret's diameter of the clusters was  $72.984 \mu\text{m}$  ( $\pm 0.853 \mu\text{m}$ ). The ANOVA analysis did not indicate significant differences between them, being  $F_{(1,1058)}=2.98$  and  $p>0.05$ . On the other hand, the relationship between the two variables was studied considering the 123 cases where the astrocytes and the clusters colocalized. The Student's t-test for paired data resulted in not statistically significant differences between the Feret's diameter of the astrocytes and that of the clusters, being  $t_{122}=0.556$  and  $p>0.5$ . The correlation studies between both variables showed a  $R=0.5045$  and a  $p<0.001$ , thus indicating a positive correlation between the diameter of the astrocyte and that of the associated cluster (Figure 5D).

## DISCUSSION

1  
2  
3 In this study we describe the formation process of the pathological granules that appear in the  
4 hippocampus of aged mice and provide new data about their cellular origin. To our knowledge,  
5 this is the first study which shows the ultrastructure of the immature granules and their  
6 formation process. In addition we also determine that the neo-epitope recently described in  
7 the mature granules emerges in the first stages of the granule formation.  
8  
9

10  
11  
12 Results obtained in the present study indicated that mature granules were located in the  
13 astrocytic processes. Although the translucent zone of the granules was formed by disturbed  
14 cytoplasm, and it was then difficult to identify the cell where the granule was located,  
15 immunohistochemical studies on ultrathin sections revealed in some cases the presence of  
16 GFAP fibrils in this zone. Moreover, small granular structures resembling glycogen  
17 accumulations, which are characteristic of astrocytes, were also found in the translucent zone.  
18 Furthermore, we also observed that the plasma membrane of various granules showed  
19 junctions with the membrane of some adjacent cells, which seems characteristic of the  
20 junctions between astrocytes (Kuo *et al.*, 1996), and are similar to gap junction channels  
21 described in Nagy *et al.* (1998). We would like to point out that no synaptic vesicles or  
22 presynaptic buttons have been observed in the mature granules, neither in the core nor in the  
23 translucent zone. The relationship between granules and astrocytes is also shown in some  
24 cases in which the granules are located in astrocyte end-feets surrounding blood capillaries.  
25 Thus, these results agree with those of Jucker *et al.* (1994) and Kuo *et al.* (1996), which  
26 suggested the astrocytes as the cells where the granules are originated.  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36

37 The results of this study also suggested that there was an unambiguous relationship between  
38 the granules clusters and the astrocytes. As it has been previously described (Jucker *et al.*,  
39 1992; Manich *et al.*, 2011), the double immunofluorescence staining with antibodies against  
40 GFAP-protein and antibodies that stained granules showed in some cases that the granule  
41 cluster is distributed in correspondence with the reactive astrocyte. This relationship has not  
42 been observed with other cellular types, like oligodendrocytes or microglia. These cases of  
43 colocalization of the cluster and the GFAP-positive astrocyte represent, however, a small  
44 percentage in the present study performed with 9-month-old SAMP8 mice: only the 20.16% of  
45 GFAP-positive astrocytes showed an association with a cluster, and only the 27.33% of the  
46 clusters are associated with a GFAP-positive astrocyte. We believe therefore that there is not a  
47 causal relationship between the reactivity for GFAP and the presence of clusters; but the fact  
48 that clusters and GFAP-positive astrocytes occupied spherical regions of similar sizes according  
49 to Feret's diameters, reinforce the idea that each cluster is probably uniquely associated with a  
50 particular astrocyte, whether this astrocyte is GFAP-reactive or not. In some cases this  
51 astrocyte is GFAP-positive whereas in some other cases it would be a non-reactive astrocyte or  
52 an astrocyte which has lost this reactivity due to the degenerative processes that seem to  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 accompany the formation of the granules. In addition, as it has been shown in the results  
2 section, when an immature granule is visualized using ultrastructural studies, it is likely to find  
3 other immature granules in the nearby areas of the neuropil and in some cases even in the  
4 area of the same astrocytic process. This suggests that in different regions of the same  
5 astrocyte there is a generation of granules that will give rise to the cluster.  
6  
7

8  
9 According to the pattern already described (Del Valle *et al.*, 2010), the clustered granules  
10 mainly start their formation in the CA1 region of the hippocampus, and then they expand  
11 gradually to regions CA2 and CA3. It is frequent to find granule clusters close to each other.  
12 Thus, a possible explanation of the expansion of the clusters in the hippocampal astrocytes  
13 could be the communication network between astrocytes through the gap junction channels,  
14 formed by connexins 30 and 43, and constituting the glial syncytium (Giaume *et al.*, 2010). Gap  
15 junction channels are observed at the interface of the neighbouring astrocytes and in the  
16 contacts between the astrocytes end-feets surrounding blood vessels. In the present study, the  
17 junctions observed next to the granules in the ultrathin sections resembled those observed in  
18 the hydropic astrocyte end-feets which surround brain blood vessels. In addition, some  
19 granules have also been found in these end-feets. Moreover, in pathological situations, the  
20 expression of connexins is upregulated, especially when the astrocytes are close to some  
21 lesions (Ochalski *et al.*, 1995; Theriault *et al.*, 1997).  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29

30  
31 The astrocytes of the CA1 region are also characterized for being more sensitive to oxidative  
32 stress in comparison to other areas of the hippocampus, as reported in transitory focal  
33 ischemia (Ouyang *et al.*, 2007), as well as for their higher coupling compared to the CA3, as  
34 shown in dye coupling studies (D'Ambrosio *et al.*, 1998). These facts might explain the  
35 clustered granules appearance in the CA1 zone at the beginning of their formation. Moreover,  
36 the SAMP8 mice are a known model of oxidative stress because of the high levels presented at  
37 early ages (Álvarez-García *et al.*, 2006; Pallàs *et al.*, 2012). Thus, the high levels of oxidative  
38 stress could explain the early appearance of the granules in the CA1 zone of the hippocampus  
39 in comparison to other mouse strains. Furthermore, a diminishment of the granules expression  
40 was observed after dietary ingestion of antioxidant compounds, such as resveratrol in SAMP8  
41 mice (Porquet *et al.*, 2012) or an antioxidant diet in ApoE-deficient mice (Veurink *et al.*, 1993).  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48

49 Another important aspect of this work is the study of the granule formation process. The  
50 results suggested that in the affected astrocytes processes, some of them clearly swollen or  
51 hydropic astrocytes, there is a process of vacuolization or digestion of the cytoplasmic  
52 components and intracellular organelles that results in the formation of waste or debris. This  
53 waste includes membranous fragments, which generate a spread matrix of fibrils and  
54 thereafter the dense-core of the granule. In the regions where the granules are forming the  
55 plasma membrane of astrocytes appears to show some instability revealed by a certain degree  
56 of fragmentation, a less electron-dense appearance than the outermost regions, and the  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



1 presence of irregular invaginations and evaginations of variable sizes. In these unstable regions  
2 some effects, which can be really aggressive, can also be observed on adjacent structures. In  
3 some cases there are regions of neuropil where the cellular elements, including the  
4 presynaptic buttons and the dendritic spines with their secretory vesicles, appeared disrupted  
5 and are incorporated into the astrocytic region. The incorporation of the secretory vesicles  
6 may lead to the false interpretation that the granule is located in a neuronal component, as  
7 suggested by Mitsuno *et al.* (1999). Our results seem to indicate that glia do not engulf  
8 aggregated material, as postulated by Doehner *et al.*, (2012), but the aggregation of the  
9 material is produced inside the astrocyte from its own material and material coming from  
10 nearby neuropil regions.  
11

12  
13  
14  
15  
16  
17 It remains to be elucidated why once the granules are formed the region seems to stabilize,  
18 and only some symptoms of worsening are observed, like a degenerating dendrite or a  
19 presynaptic button with a mitochondria suffering a mitophagy process. However, these  
20 observations show that granules are the manifestation of an astrocytic degenerative process  
21 that could produce a neurodegenerative disease, and should not be understood as a mere  
22 accumulation of waste substances. It is conceivable that the presence of the granules produces  
23 some functional alterations and this could be especially noteworthy in old SAMP8 animals, in  
24 which clusters occupy almost the entire hippocampus.  
25  
26  
27  
28  
29

30  
31 From this point of view, the study from Soontornniyomkij *et al.* (2012) performed with the  
32 C57BL/6N strain with animals up to 26 months of age showed interesting results. They  
33 indicated that there was a negative correlation between the number of granule clusters and  
34 the discrimination ratio obtained by the object recognition test. Although the interpretation  
35 made should be reviewed due to the probable presence of contaminant IgM antibodies  
36 directed against the neo-epitope, the fact that increased granule clusters are negatively  
37 correlated with the ability of discrimination of objects reinforces the idea that the presence of  
38 granules is probably related to functional alterations.  
39  
40  
41  
42  
43

44  
45 Regarding the neo-epitope present in the granules, it could be observed that their presence is  
46 very high in the core of mature granules and in the region where the core is forming in  
47 immature granules. In both cases the neo-epitope appeared associated with membranous  
48 fragments that will be located in the core of the granules. This fact suggested that the neo-  
49 epitope is produced during the formation of these fragments, although a certain labelling was  
50 occasionally observed in the membranes of adjacent structures. The neo-epitope, therefore,  
51 does not seem to be a trigger or a key element in the formation of granules but its presence  
52 could be related to a possible immune response to the disease process that is occurring.  
53  
54  
55  
56  
57

58  
59 In conclusion, the present study shows that the granules formed with age in the hippocampus  
60 of mice are the result of a degenerative disease process that occurs primarily in astrocytes  
61  
62  
63  
64  
65

1 although nearby neuronal structures may also be affected. The formation of a granule in a  
2 particular astrocyte is not a punctual fact, but the different fingerings of the same astrocyte  
3 will host different granules resulting in the formation of a granule cluster. During the granule  
4 formation, different membranous fragments are generated and they will form part of the core  
5 of the granule. Moreover, the neo-epitope will be generated during the formation of these  
6 fragments. Further investigations are required to determine the cause of the granule  
7 formation and to establish the function of the neo-epitope.  
8  
9

## 10 11 **ACKNOWLEDGMENTS**

12  
13  
14  
15 This study was funded by grants BFU2010-22149, SAF2011-23631 and SAF2012-39852 from  
16 Spain's *Ministerio de Ciencia e Innovación*, and *Centros de Investigación Biomédica en Red*  
17 (CIBER) from *Instituto de Salud Carlos III*. We would like to thank *Generalitat de Catalunya* for  
18 funding the research group (2009/SGR00853) and for awarding a predoctoral fellowship to G.  
19 Manich (FI-DGR 2011). P.P. Liberski was supported with a HARC EC grant. We are thankful to  
20 Dr. Núria Cortadellas and Dr. Carmen López from the *Servei de Microscòpia Electrònica* and Dr.  
21 Anna Bosch from the *Servei de Microscòpia Confocal (Centres Científics i Tecnològics,*  
22 *Universitat de Barcelona)*, for their help with the microscopy services. We are also grateful to  
23 Dr. Albert Martínez and Dr. Carme Auladell for their advice about transmission electron  
24 microscopy studies.  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## REFERENCES

- 1  
2  
3  
4 Alvarez-García O, Vega-Naredo I, Sierra V, Caballero B, Tomás-Zapico C, Camins A, García JJ, Pallàs M, Coto-Montes A. (2006) Elevated oxidative stress in the brain of senescence-accelerated mice at 5  
5 months of age. *Biogerontology*. 7, 43–52.  
6  
7 Akiyama H, Kameyama M, Akiguchi I, Sugiyama H, Kawamata T, Fukuyama H, Kimura H, Matsushita M,  
8 Takeda T (1986) Periodic acid-Schiff (PAS)-positive, granular structures increase in the brain of  
9 senescence accelerated mouse (SAM). *Acta Neuropathol*. 72, 124–129.  
10  
11  
12 D'Ambrosio R, Wenzel J, Schwartzkroin PA, Mckhann GM, Janigro D (1998) Functional specialization and  
13 topographic segregation of hippocampal astrocytes. *J Neurosci*. 18, 4425–4438.  
14  
15  
16 Del Valle J, Duran-Vilaregut J, Manich G, Casadesús G, Smith MA, Camins A, Pallàs M, Pelegrí C, Vilaplana  
17 J (2010) Early amyloid accumulation in the hippocampus of SAMP8 mice. *J Alzheimers Dis*. 19, 1303–  
18 1315.  
19  
20 Doehner J, Madhusudan A, Konietzko U, Fritschy JM, Knuesel I (2010) Co-localization of Reelin and  
21 proteolytic A $\beta$ PP fragments in hippocampal plaques in aged wild-type mice. *J Alzheimers Dis*. 19, 1339–  
22 1357.  
23  
24 Doehner, J., Genoud, C., Imhof, C., Krstic, D., and Knuesel, I. (2012) Extrusion of misfolded and  
25 aggregated proteins - a protective strategy of aging neurons?. *Eur J Neurosci*, 35, 1938–50.  
26  
27 Giaume C, Koulakoff A, Roux L, Holcman D, Rouach N (2010) Astroglial networks: a step further in  
28 neuroglial and gliovascular interactions. *Nat Rev Neurosci*, 11, 87-99.  
29  
30 Irino, M.; Akiguchi, I.; Takeda, T., 1994: Ultrastructural study of PAS-positive granular structures in brains  
31 of SAMP8. Takeda, T. International Congress Series; The Sam Model Of Senescence. pp371-374.  
32  
33 Jucker M, Walker L, Martin L, Kitt C, Kleinman H, Ingram DK, Price D (1992) Age-associated inclusions in  
34 normal and transgenic mouse brain. *Science*. 255, 1445.  
35  
36 Jucker M, Walker LC, Schwarb P, Hengemihle J, Kuo H, Snow D, Bamert F, Ingram DK (1994) Age-related  
37 deposition of glia-associated fibrillar material in brains of C57BL/6 mice. *Neuroscience*. 60, 875–89.  
38  
39 Knuesel I, Nyffeler M, Mormède C, Muhia M, Meyer U, Pietropaolo S, Yee BK, Pryce CR, LaFerla FM,  
40 Marighetto A, Feldon J (2009) Age-related accumulation of Reelin in amyloid-like deposits. *Neurobiol*  
41 *Aging*. 30, 697–716.  
42  
43 Kuo H, Ingram DK, Walker LC, Tian M, Hengemihle JM, Jucker M (1996) Similarities in the age-related  
44 hippocampal deposition of periodic acid-schiff-positive granules in the senescence-accelerated mouse  
45 P8 and C57BL/6 mouse strains. *Neuroscience*. 74, 733–740.  
46  
47 Krass KL, Colinayo V, Ghazalpour A, Vinters HV, Lusis AJ and Drakec TA (2003) Genetic loci contributing  
48 to age-related hippocampal lesions in mice. *Neurobiol Disease*. 13:102-108.  
49  
50 Lamar CH, Hinsman EJ, Henrikson CK (1976) Alterations in the hippocampus of aged mice. *Acta*  
51 *Neuropathol*. 36, 387–391.  
52  
53 Manich G, del Valle J, Cabezón I, Camins A, Pallàs M, Pelegrí C, Vilaplana J (2014) Presence of a neo-  
54 epitope and absence of amyloid beta and tau protein in degenerative hippocampal granules of aged  
55 mice. *Age*. 36, 151-65.  
56  
57 Manich G, Mercader C, Del Valle J, Duran-Vilaregut J, Camins A, Pallàs M, Vilaplana J, Pelegrí C (2011)  
58 Characterization of amyloid- $\beta$  granules in the hippocampus of SAMP8 mice. *J Alzheimers Dis*. 25, 535–  
59 546.  
60  
61 Mitsuno S, Takahashi M, Gondo T, Hoshii Y, Hanai N, Ishihara T, Yamada M (1999)  
62 Immunohistochemical, conventional and immunoelectron microscopical characteristics of periodic acid-  
63 Schiff-positive granules in the mouse brain. *Acta Neuropathol*. 98, 31–38.  
64  
65

1 Nagy JI, Patel D, Ochalski PA, Stelmack GL (1999) Connexin30 in rodent, cat and human brain: selective  
2 expression in gray matter astrocytes, co-localization with connexin43 at gap junctions and late  
3 developmental appearance. *Neuroscience*. 88, 447-68.

4 Nomura Y, Okuma Y (1999) Age-related defects in lifespan and learning ability in SAMP8 mice. *Neurobiol*  
5 *Aging*. 20, 111-115.

6 Ochalski PA, Sawchuk MA, Hertzberg EL, Nagy JI (1995) Astrocytic gap junction removal, connexin43  
7 redistribution, and epitope masking at excitatory amino acid lesion sites in rat brain. *Glia*. 14, 279–294.

8 Ouyang YB, Voloboueva LA, Xu LJ, Giffard RG (2007) Selective dysfunction of hippocampal CA1  
9 astrocytes contributes to delayed neuronal damage after transient forebrain ischemia. *J Neurosci*. 27,  
10 4253-60.

11 Pallàs M, Porquet D, Vicente A, Sanfeliu C (2013) Resveratrol: new avenues for a natural compound in  
12 neuroprotection. *Curr Pharm Des*. 19, 6726-31.

13 Porquet D, Casadesús G, Bayod S, Vicente A, Canudas AM, Vilaplana J, Pelegrí C, Sanfeliu C, Camins A,  
14 Pallàs M, Del Valle J (2013) Dietary resveratrol prevents Alzheimer’s markers and increases life span in  
15 SAMP8. *Age*. 35, 1851-65.

16 Robertson T, Dutton NS, Martins RN, Roses AD, Kakulas BA, Papadimitriou JM (1998). Age-related  
17 congophilic inclusions in the brains of apolipoprotein E-deficient mice. *Neuroscience*. 82, 171–180.

18 Soontornniyomkij V, Risbrough VB, Young JW, Soontornniyomkij B, Jeste DV, Achim CL (2012) Increased  
19 hippocampal accumulation of autophagosomes predicts short-term recognition memory impairment in  
20 aged mice. *Age*. 34, 305–316.

21 Theriault E, Frankenstein UN, Hertzberg EL, Nagy JI (1997) Connexin43 and astrocytic gap junctions in  
22 the rat spinal cord after acute compression injury. *J Comp Neurol*. 382, 199–214.

23 Veurink G, Liu D, Taddei K, Perry G, Smith MA, Robertson TA, Hone E, Groth DM, Atwood CS, Martins RN  
24 (2003) Reduction of inclusion body pathology in ApoE-deficient mice fed a combination of antioxidants.  
25 *Free Radic Biol Med*. 34, 1070–1077.

## FIGURE LEGENDS

1  
2  
3  
4 **Fig. 1.** Electron microscopy image of a hippocampal CA1 region from a 14-month-old SAMP8  
5 mouse in which some mature (circle) and immature (dashed circle) granules can be observed.  
6 Nu: Astrocyte nucleus. G1: magnification illustrated in Figure 2A. G2 and G3: magnification  
7 illustrated in Figure 3A. Scale bar: 5  $\mu\text{m}$ .  
8  
9

10 **Fig. 2.** Electron microscopy images of hippocampal mature granules from 14-month-old  
11 SAMP8 mice. Mature granules measured up to 3  $\mu\text{m}$ . When tissue was embedded in Spurr and  
12 treated with  $\text{OsO}_4$ , granules showed an electron-dense core formed by a dense mesh of  
13 fibrillar membranous-like structures, generally encircled by a translucent halo (A, C and D).  
14 When tissue was embedded in Lowicryl, the core appeared smoothly stained (B). Blebs or big  
15 cisterns (\*), as well as degenerating mitochondria (full arrowhead), are located in the  
16 translucent area. A characteristic junction with a membrane of an adjacent cell can be  
17 observed (empty arrowhead). In the surroundings of the mature granule, a degenerating  
18 dendrite (full arrow) and a mitophagy process (empty arrows) can be visualized. Scale bar: 1  
19  $\mu\text{m}$ .  
20  
21  
22

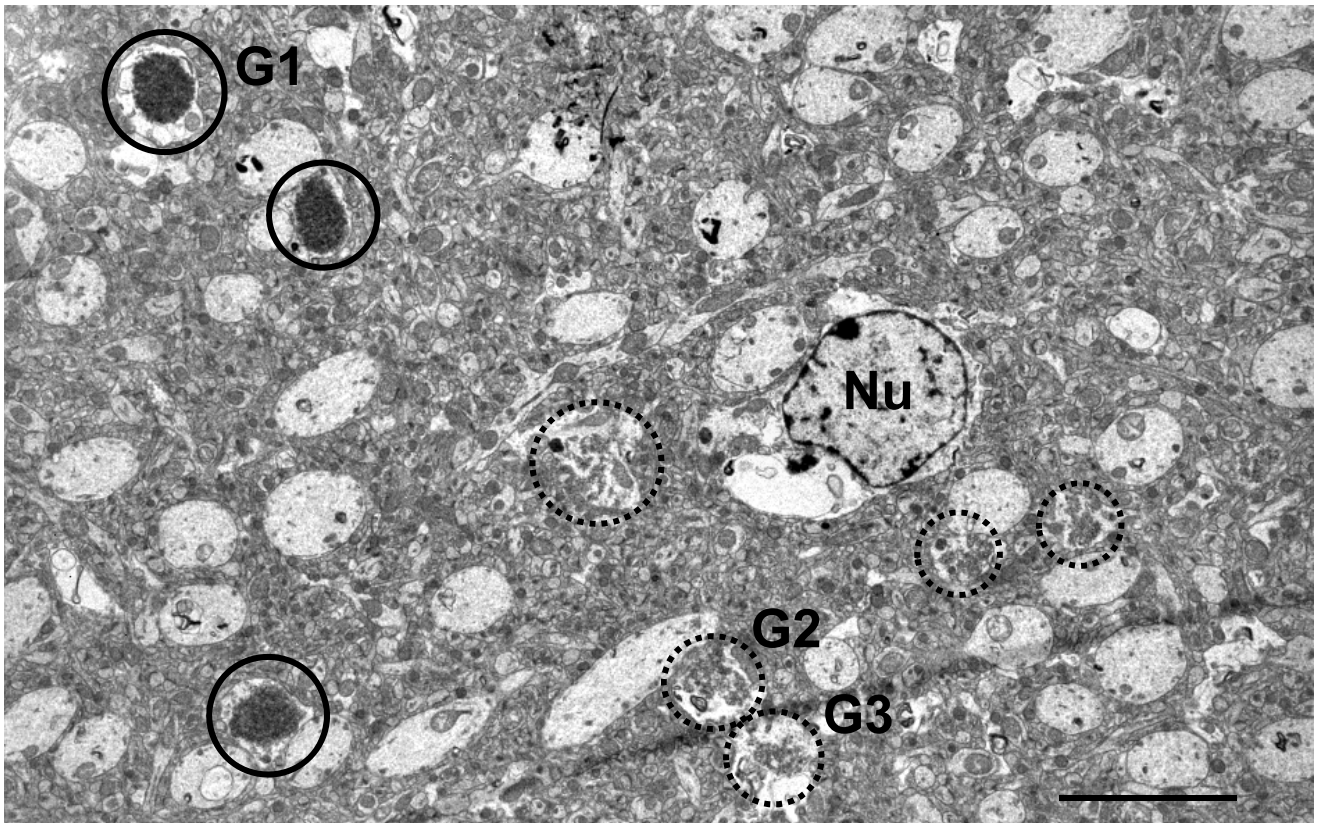
23 **Fig. 3.** Electron microscopy images of hippocampal immature granules from 14-month-old  
24 SAMP8 mice. A) Immature granules showed, instead of the electron-dense core, some sparse  
25 membranous-like structures. B) and C) Granules in a more advanced stage of development. Big  
26 blebs or bubbles (\*) and degenerating mitochondria (full arrowheads) appeared in the  
27 peripheral zone. The plasma membrane and membranes of adjacent structures showed  
28 instability and fragmentation (full arrows), causing a loose of the boundaries of these  
29 structures. This process of rupture can affect dendritic spines (empty arrowheads), as clearly  
30 shown in C). D) Inset from A in which the instability and the fragmentation of the membranes  
31 could be better observed. E) Immunoelectron GFAP-staining in Lowicryl embedded tissue.  
32 GFAP-positive fibrils labelled with nanogold particles appeared on the translucent area (t),  
33 near to the forming core (c) of an immature granule. Scale bar in A) and B): 1  $\mu\text{m}$ . Scale bar in  
34 C), D) and E): 200 nm.  
35  
36  
37  
38  
39

40 **Fig. 4.** Immunoelectron microscopy images of hippocampal granules of 14-month-old SAMP8  
41 mice stained with IgM antibodies directed against the neo-epitope. A) A granule of an ultrathin  
42 section embedded in Lowicryl is shown. The staining of the antibody is abundantly located in  
43 the core of the granule. B) Inset of A. C) An ultrathin section embedded in Spurr that presents  
44 a mature granule stained with the IgM anti-neo-epitope antibody. D) Inset of C, in which the  
45 nanogold particles were observed located in the fibrils constituting the core of the granule but  
46 not in the halo. E) Immature granules stained with the IgM anti-neo-epitope antibody. F) Inset  
47 of E, in which the staining of the antibody appeared located in the sparse fibrils of the core in  
48 process of formation but not in the translucent area. Some membranes on adjacent structures  
49 occasionally presented staining. Scale bar in A), C) and E): 1  $\mu\text{m}$ . Scale bar in B), D) and F): 200  
50 nm.  
51  
52  
53

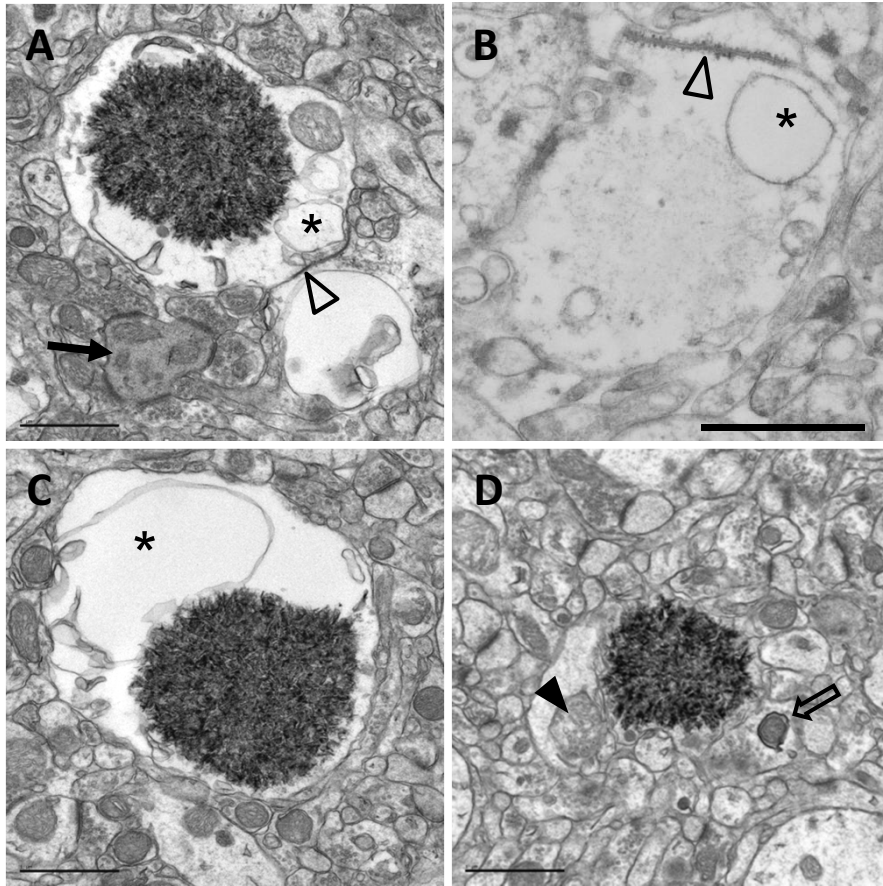
54 **Fig. 5.** A-C) Double immunohistochemical staining of the CA1 hippocampus area from 9-month  
55 old SAMP8 mice. The granules were detected with the mouse IgM antibody against the neo-  
56 epitope (red), and the reactive astrocytes were detected with an anti-GFAP antibody (green).  
57 Nuclei were stained by Hoechst (blue). A) Fluorescence microscopy allowed the observation of  
58 some clusters in the CA1 region, which were found alone (empty arrowhead) or associated  
59 with an astrocyte (arrow). Some astrocytes did not present any associated cluster (full  
60  
61  
62  
63  
64  
65

arrowhead). R1 and R2 exemplify a ROI for a granule cluster and a ROI for an astrocyte, respectively (see methods section). B) Image from confocal microscopy showed the close association of some clusters to the astrocytes. C) Inset of B in which two orthogonal projections are shown. The granules were found close to the astrocyte processes and even encircled by them (empty arrowhead). D) Correlation graph between the Feret's diameter of the clusters and that of the GFAP-positive astrocytes from data obtained from clusters and GFAP-positive astrocytes that colocalized. E) Double immunohistochemical staining with rat *anti-CD11b* directed against microglia (green) and IgM anti-neo epitope (red). Nuclei were stained by Hoechst (blue). F) Double immunohistochemical staining with mouse *anti-CNP* directed against oligodendrocytes (green) and IgM anti-neo epitope (red). Nuclei were also stained by Hoechst (blue). In any of these cases, the positive cells (microglia or oligodendrocytes) have been observed to be related neither to the granules nor to the clusters. Scale bar in A, E and F): 100  $\mu\text{m}$ ; B): 50  $\mu\text{m}$ ; C) 10  $\mu\text{m}$ .

**FIGURE 1**



**FIGURE 2**





**FIGURE 3**

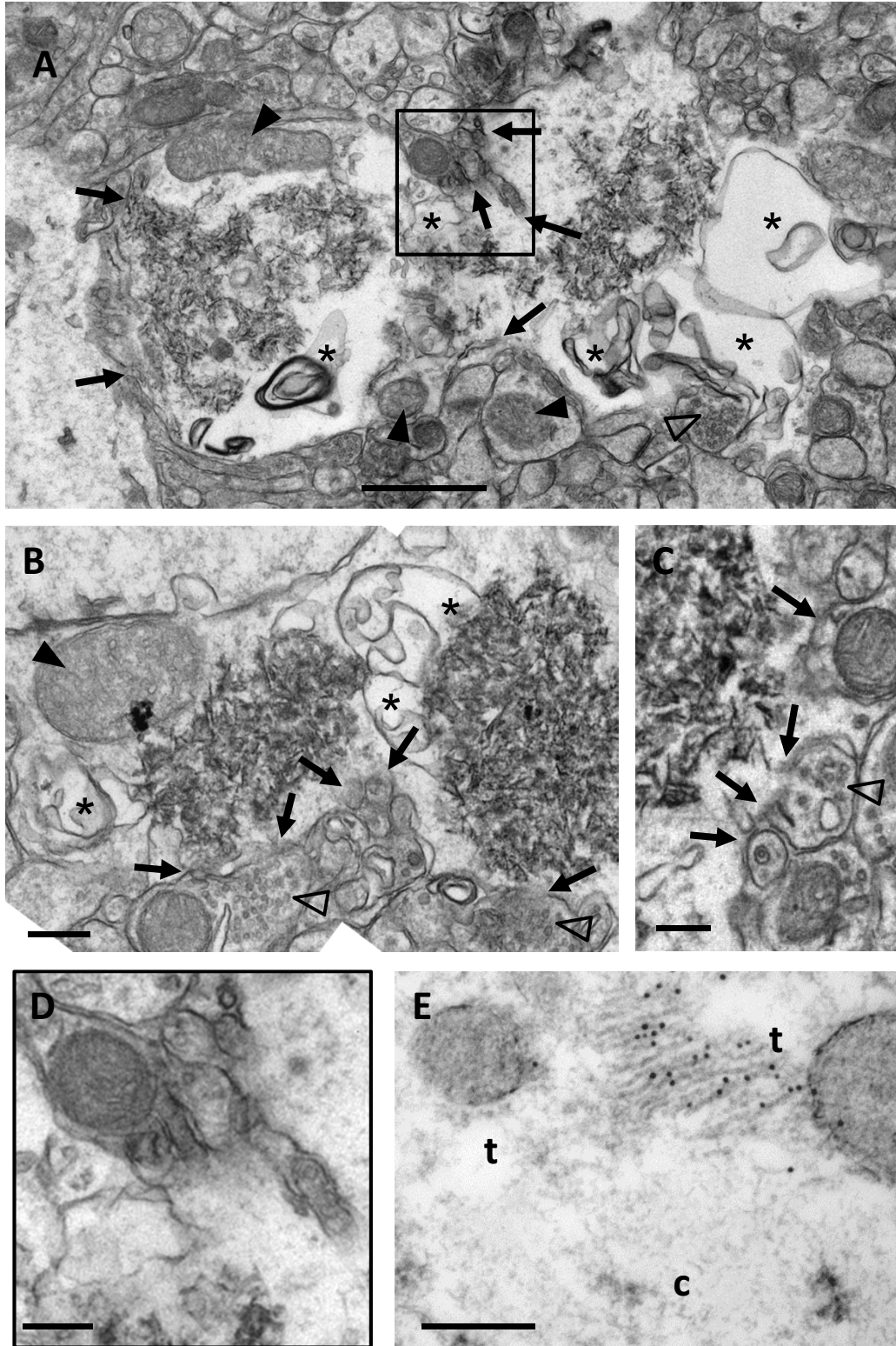
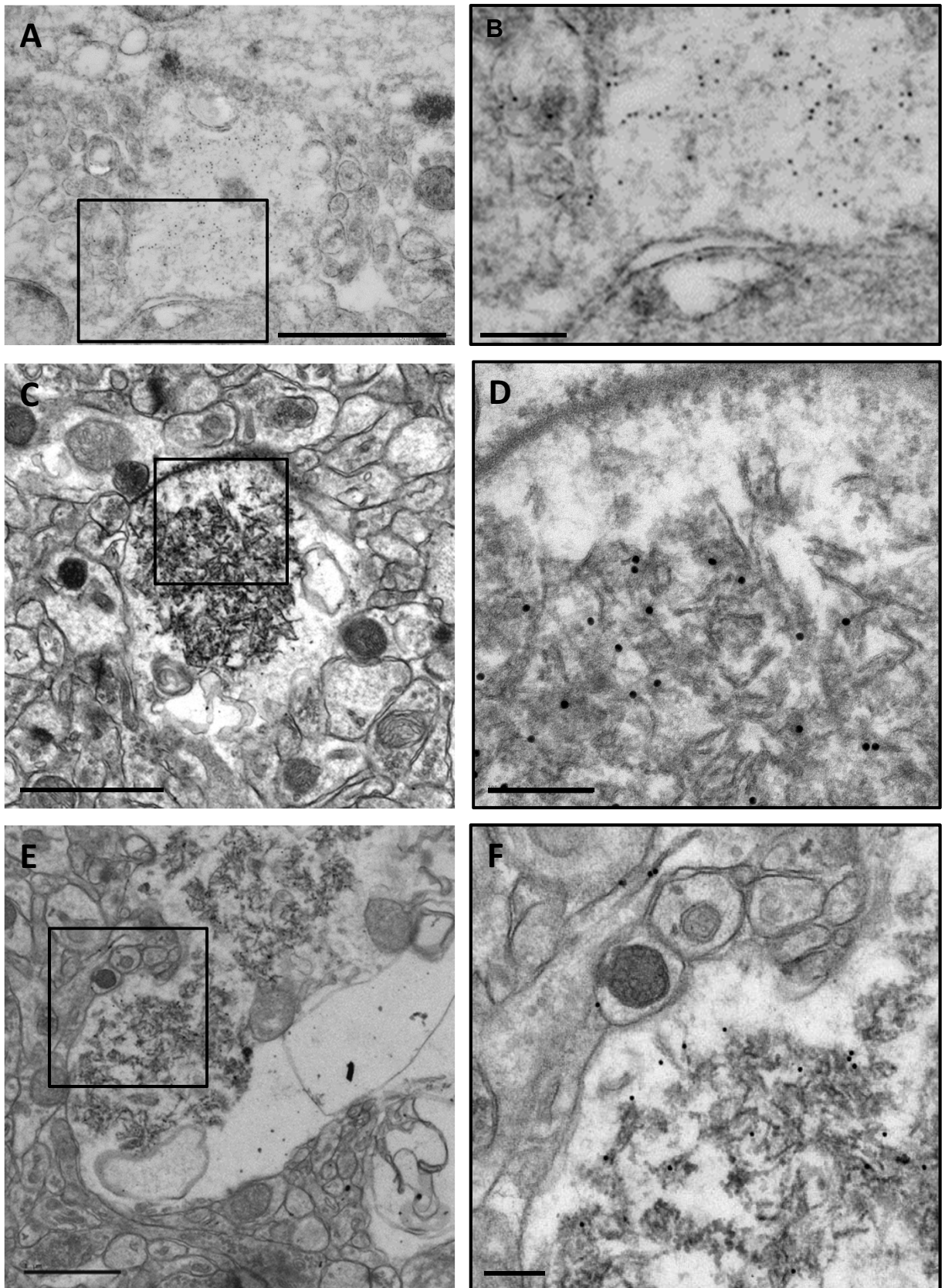
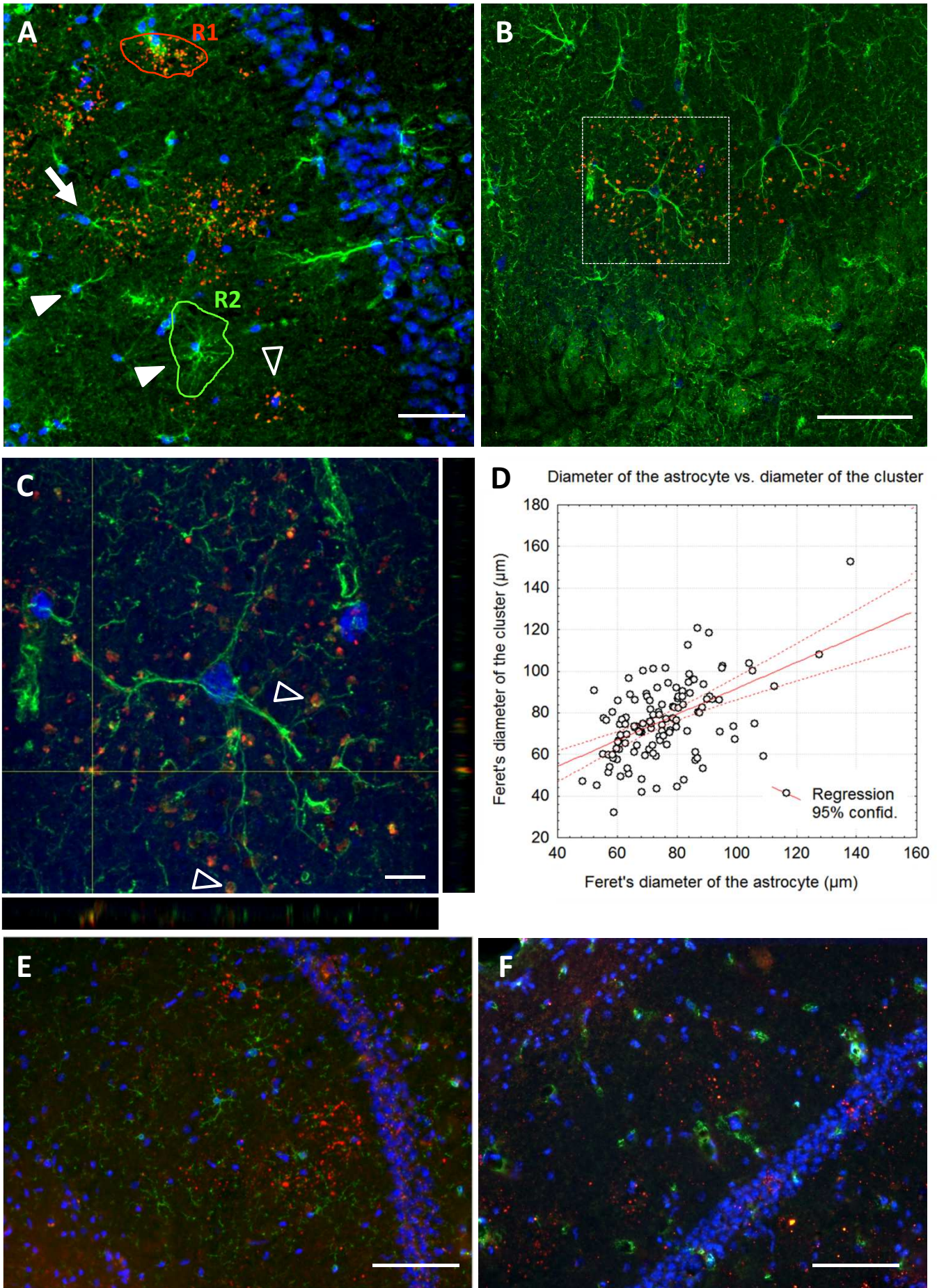


FIGURE 4



**FIGURE 5**



## *IV. DISCUSSION*



In previous studies, clustered pathological aggregates stained with antibodies directed against A $\beta$  peptides and A $\beta$ PP were described in the hippocampus of old SAMP8 mice (Del Valle *et al.*, 2010). These clustered granules appear first in the *stratum radiatum* of the CA1 region, and increase in number and extension throughout the hippocampus with age, from 3 months onwards. The presence of these clustered granules has not been detected at early ages in SAMR1 and ICR-CD1 control strains, and they were barely observed in the hippocampus of these mice at older ages in comparison to SAMP8 mice strain.

In order to study the composition of the hippocampal aggregates of SAMP8 mice, several double immunohistochemical stainings with antibodies directed against the main neuropathological proteins of human brain lesions were performed. Hence, the presence of A $\beta$ , tau and  $\alpha$ -synuclein in A $\beta$  aggregates of SAMP8 brains was studied, as they are the principal proteins contained in brain lesions of human neurodegenerative diseases: tauopathies and synucleinopathies (Armstrong *et al.*, 2012). Moreover, the presence of other secondary components usually contained in neurodegenerative lesions was assessed, such as MAP2, HSPG and laminin (Armstrong *et al.*, 2008). Taking into account the high similarity between morphology, distribution and time-course of the A $\beta$  aggregates found in the hippocampus of SAMP8 mice (Del Valle *et al.*, 2010) and the PAS granules described by Akiyama *et al.* (1986), a comparison between both structures was done performing an immunohistochemical detection of the components already described in the PAS granules.

The results of these immunohistochemical stainings showed that, besides the A $\beta$  components already described by Del Valle *et al.* (2010, 2011), the hippocampal clustered aggregates of SAMP8 mice were also stained with antibodies against tau, MAP2 and syndecan-2. All these components have been already described in the aggregates of some human neurodegenerative diseases. For instance, A $\beta$  peptides and tau protein have been frequently encountered together in the same brain lesions (Huang and Jiang, 2009). Interestingly, the A $\beta$  peptides can interact with syndecan-2 during the formation of synaptic contacts (Lucido *et al.*, 2009), and both proteins were found in amyloid plaques of AD patients (Shimizu and Toh, 2009). Tau and MAP2, which in physiological conditions stabilize the neurofilaments of axons and dendrites, have been described in NFT (Iqbal *et al.*, 2009).

On the other hand, the stainings of the hippocampal aggregates of SAMP8 mice with antibodies against  $\alpha$ -synuclein were negative.  $\alpha$ -Synuclein is present in DLB (Trojanowski *et al.*, 1998), PD (Ross and Poirier, 2004), and other  $\alpha$ -synucleinopathies (Hashimoto and Malsiah, 1999). The absence of  $\alpha$ -synuclein in the SAMP8 aggregates

and the presence of tau protein and A $\beta$  peptides suggested that these granules belong to a tauopathy rather than an  $\alpha$ -synucleinopathy.

The study of the time-course of appearance of both A $\beta$  peptides and tau protein in the aggregates of 3-, 6- and 12- month-old SAMP8 mice revealed an earlier presence of tau protein in relation to that of the A $\beta$  peptides. In addition, tau protein staining showed a predominance over A $\beta$  peptides and the other components detected in all tested ages. These facts displayed the main role of tau protein in granule formation and composition.

Regarding the presence of secondary components associated with the hippocampal clustered aggregates, the minor detection of MAP2 reinforced the major role of tau protein in these deposits, since in brain lesions of human neurodegenerative diseases a sequestration of MAP2 by abnormal tau proteins is observed (Alonso *et al.*, 1997).

Clustered granules stained with PAS had already been described in SAMP8 mice (Akiyama *et al.*, 1986; Kuo *et al.*, 1996); and several studies have been performed in this strain, as well as in others, to identify which proteoglycans or glycoconjugates caused the PAS-positive reaction in these structures (Jucker *et al.*, 1992, 1994a; Kuo *et al.*, 1996). According to the results described by Kuo *et al.* (1996), antibodies directed against both laminin- $\beta$ 2 chain and HSPG stained ultrathin sections of SAMP8 hippocampal granules. HSPGs are present in all animal tissues and the two main types of these molecules are cell-surface HSPGs and extracellular matrix HSPGs (Dreyfuss *et al.*, 2009). In the nervous system, perlecan and laminin are found in blood vessels, and syndecan-2 is located in neuronal post-synaptic densities. Immunohistochemical stainings of SAMP8 mice brain slices were performed with antibodies directed against syndecan-2, laminin and perlecan. The former stained positively the PAS granules, but neither laminin nor perlecan were found in these structures. Laminin antisera had previously been reported to stain the PAS granules by Kuo *et al.* (1996). However, this inconsistency with our results might be explained by non-specific stainings already reported in Jucker *et al.* (1992), where the staining of the granules with rabbit laminin antisera partially remained after the antibody preadsorption.

The proteolysis of tau protein may play an important role as an early step in neuronal degeneration (Johnson *et al.*, 2006) and in the formation of human brain lesions. Actually, the digestion of PHFs isolated from AD-affected brains with pronase showed the presence of a pronase-resistant core (Wischnik *et al.*, 1988). This core roughly contains the 4R of the microtubule-binding domain and the C-terminal flanking region (Jakes *et al.*, 1991; von Bergen *et al.*, 2006). Results from hippocampal granules stained

with anti-tau antibody provided the 210-230 amino acid sequence of tau protein, which could be constitutive of a tau protein core resistant to proteolytic enzymes in SAMP8 hippocampal granules. With the aim of verifying whether tau protein present in the granules was proteolytically cleaved, several stainings with antibodies against the C- terminal, N-terminal and 4R domains of tau protein were performed. In our work, results of the brain hippocampal granules stainings were inconsistent (data not shown), since anti-tau antibodies produced in mouse ascites showed a positive staining of the hippocampal granules, but other antibodies against the same tau protein sequence did not stain them. Likewise, some discrepancies in the results had been reported from immunohistochemical stainings of the hippocampal clustered PAS granules of C57BL/6 mice because of non-specific antibody stainings (Jucker *et al.*, 1992). These non-specific stainings with polyclonal antibodies produced in rabbit sera or pre-immune rabbit sera lead to a misinterpretation of the granules composition (Jucker *et al.*, 1992; Takemura *et al.*, 1993). Therefore, we decided to assess the specificity of SAMP8 hippocampal granules stainings performed with antibodies produced in mouse ascites with a variety of experimental approaches.

To elucidate if secondary antibodies used in the immunohistochemical techniques linked directly to the granules, the presence of mouse IgG Fc receptor in the hippocampal granules was tested incubating mouse serum as primary antibody. A negative result was then obtained indicating the absence of these receptors in the granules. Owing to the fact that the control stainings of secondary anti-mouse IgG antibodies did not stain the granules, the presence of endogenous IgG in these aggregates was also discarded.

Lastly, the preadsorption of the tau antibody produced in mouse ascites with tau protein was performed. The experiments results revealed the lack of specificity of the granules staining as it remained after the tau antibody preadsorption, although the tau protein staining of neuronal dendrites disappeared. What is more, the JJ319 antibody produced in mouse ascites stained the hippocampal granules too, although this antibody is not directed against any epitope present in the mouse brain, and when the JJ319 antibody was purified by column A chromatography, the hippocampal granules staining disappeared. A deeper study of the tau antibody staining in ultrathin sections of the SAMP8 hippocampal granules revealed a labelling of membranous-like structures contained in the granule core that were ultrastructurally different from the tau deposition in the NFT. Altogether, the results indicated the presence of an unknown component in some mouse ascites antibodies that could be removed by column A chromatography and can be detected by secondary anti-mouse IgG antibodies. That unknown component produced an artifact staining of the membranous-like structures constitutive of the SAMP8 mice hippocampal granules.



Actually, ascites and sera have been widely reported as a source of artifact immunohistochemical stainings. In 1982, Gooi and Feizi detected natural antibodies (NAb) directed against glycoproteins in mouse hybridoma-induced ascites. Later, an anti-Mouse Ascites Golgi (MAG) antibody was described as a contaminant in antibodies produced in mouse ascites fluid or sera and in rabbit sera (Kliman *et al.*, 1995; Shaw, 1986; Spicer *et al.*, 1994). The anti-MAG antibody stained structures which contained high amounts of mucins or glycoproteins (Finstad *et al.*, 1991; Kliman *et al.*, 1995; Spicer *et al.*, 1994). Thus, the anti-MAG antibody staining pattern includes the Golgi apparatus of some epithelial cells, especially the secretory ones (Finstad *et al.* 1991; Spicer *et al.* 1994; Kliman *et al.* 1995). The main feature of anti-MAG antibodies is the specific haemagglutination of A-type human erythrocytes, in a direct or indirect manner, is the main feature of antibodies directed against the MAG epitope (Finstad *et al.*, 1991; Kliman *et al.*, 1995). However, the anti-MAG antibodies have not been well-defined, and some differences have been attributed to the epitope detected by these antibodies. For example, the A3 subtype of A-type human erythrocytes (Finstad *et al.* 1991) but also the A1 subtype (Kliman *et al.* 1995; Smith *et al.* 1984) have both been described as the epitope stained by anti-MAG antibodies.

The results obtained in our studies suggested the possible presence of an anti-MAG antibodies in the mouse antibodies used in immunohistochemical stainings. This hypothesis was confirmed when only A-type human erythrocytes were directly haemagglutinated by the anti-tau antibody produced in mouse ascites, presumably due to the presence of an IgM antibody. Later, an immunohistochemical staining of the hippocampal granules with anti-tau antibodies and secondary antibodies directed against mouse IgG and/or mouse IgM confirmed that an anti-MAG IgM was the cause of the artifact staining. Moreover, the cross-reactivity of the secondary antibody anti-mouse IgG with mouse IgMs enabled the artifact staining. That is, commercial antibodies, such as the anti-tau and JJ319 antibodies, which contained an anti-MAG IgM could generate a positive artifact staining of the PAS granules.

The anti-MAG antibodies have not only been detected in antibodies produced in mouse ascites but also in mouse sera (Finstad *et al.*, 1991) and rabbit sera (Zerboni *et al.*, 2011). In view of the results obtained, a wide screening of the antibodies used in our studies was done, and we confirmed the general presence of a contaminant IgM antibody that positively stained the PAS granules. The high correspondence between the granules positive staining and the IgM antibody presence allowed to conclude that the main source of the PAS granules artifact staining was a contaminant IgM antibody which also haemagglutinated A-type human erythrocytes. These results were in contradiction with previous hypothesis about the source of artifact stainings, which attributed them to the polyclonality of antibodies (Jucker *et al.*, 1992).

The evidence reported about anti-MAG antibodies allowed identifying two factors that influence their final presence in commercial antibodies: the purification method and the antibody batch. On the one hand, our study confirmed that not all purified antibodies are exempt of contamination like described before (Finstad *et al.*, 1991), although the JJ319 antibody purification eliminated the anti-MAG antibodies. Actually, the purification method could influence the removal of contaminant IgMs. Immunoaffinity methods obtain better results when removing anti-MAG antibodies (Finstad *et al.*, 1991) and this method also decreases in a great manner the granular staining of a laminin antibody (Jucker *et al.*, 1992). In our study, only syndecan-2 antibody, which presented a slight IgM staining, was purified by immunoaffinity methods. On the other hand, the contaminant IgM is variably present depending on the antibody batch. As we have reported, in some of the antibodies tested, such as 4G8, 12F4 and 6E10, the staining of the IgM depended on the batch used. That is, the hippocampal PAS granules were stained when the batch of the antibody tested contained contaminant IgM, but they were not stained when the batch tested did not contain this antibody. This batch variability has also been observed in other studies, e.g., in mouse and rabbit antibodies (Finstad *et al.*, 1991; Spicer *et al.*, 1994).

In previous studies, anti-MAG antibodies have always been identified as IgG subtype (Finstad *et al.*, 1991), instead of the IgM isotype detected in our study. Nevertheless, IgM antibodies that recognize the human A blood group epitope have also been detected in mice non-immune sera (Larkin and Porter, 2005). Mouse Ig directed against MAG have been explained as NAbs present in sera that cross-react with human A blood group antigen, in spite of the absence of this same epitope in mice (Arend, 2011, 2014). However, a human A blood group-like antigen is expressed in reproductive tissue of female mice depending on their ovarian maturity, and it can be identified by its binding to *Dolichos biflorus* and *Helix pomatia* lectins (Arend and Nijssen, 1977; Rocher *et al.*, 2005). The detection of natural xeno-reactive antibodies against the human A blood group epitope has been reported in some strains of mice in variable titers (Baumghart *et al.*, 2005; Larkin and Porter, 2005; Schwartz *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 1984; White *et al.*, 1990). In spite of this, the origin of these natural xeno-reactive antibodies is unknown. In our studies it has not been possible to unveil the origin of MAG antibodies due to its commercial source. Yet, the multiple fluids that contain these antibodies and the numerous species that expressed them suggest that these contaminant antibodies are possibly IgM NAbs, as previously proposed.

IgM NAbs can be present from birth without external antigenic exposure, and contribute to critical innate immune functions involved in the maintenance of tissue homeostasis (Grönwall *et al.*, 2012). Nevertheless, their major function is the clearance of tissue and cell debris following degradation (Avrameas and Selmi, 2013; Grabar,

1965). In mice, NABs have been associated with the B1 cell population, which is responsible for up to 80% of all circulating IgM. B1 cells are common in the pleural and peritoneal linings, while they are in relative low numbers in spleen and circulation (Baumgarth, 1999, 2011; Holodick *et al.*, 2010). Importantly, the IgM NABs are encoded in the germline or near the germline encoded variable regions (Baumgarth *et al.*, 2005; Grönwall and Silverman, 2014). Their main properties are their low affinity and polyreactivity. Low affinity does not exclude specificity and, in fact, it is compensated by the avidity of the IgM pentameric structure (Santos-Argumendo, 2012). The polyreactivity of the IgM confers cross-reactivity to this antibody, that is, capacity to react with different apparently structurally unrelated antigens (Avrameas and Selmi, 2013). A large proportion of the NABs are polyreactive to phylogenetically conserved structures, such as the nucleic acids, heat shock proteins, carbohydrates and phospholipids (Boes, 2000; Hardy and Hayakawa, 1994; Kantor and Herzenberg, 1993). This feature is associated with their function in the first line of defence (Vollmers and Brändelin, 2006).

The ability of a polyreactive antibody to bind to multiple antigens may rely upon the recognition of identical, similar or different epitopes in the context of distinct antigens (Casali and Schettino, 1996). The first kind of interaction is the basis of long-recognized immunological phenomenon of antigen cross-reactivity in high affinity antibodies (Casali and Schettino, 1996). In a second case, the recognition of similar epitopes on different antigen molecules can result in immunological cross-reactivity among different antigens (Avrameas, 1991). Both cases correspond to a structural correlation inherent to the antigen molecule. However, the antigens recognized by most polyreactive antibodies are very different in nature and are unlikely to share identical or similar epitopes. This heterogeneity suggests that the NABs polyreactivity is a function of structural features inherent to the binding cleft of the antibody (Casali and Schettino, 1996; Elkon and Casali, 2008).

Another source of variability in the glycan moiety and glycan binding protein interaction could depend on structural glycan differences, as it has been comprehensively explained by Cohen and Varki (2014). According to them, a defined glycan is necessary but not sufficient for the recognition by a glycan binding protein, such as antibodies or lectins. This inconsistency may be produced by the clustered saccharide patches, which represent a higher level of glycan complexity formed by multiple glycans interacting with each other, with or without the involvement of proteins. The spatial organization of glycans within such patches can influence the specificity of their interactions with antibodies (Cohen and Varki, 2014). For example, differences on sialylated glycans interactions with several agglutinins, or even parasites like *Plasmodium falciparum*, are modulated by the ABH(O) human blood group

epitopes (Cohen *et al.*, 2009). Furthermore, antibodies directed against SLe<sup>a</sup>, a human mucin of the Lewis blood group highly expressed in the plasma of some cancer patients, presents differences in recognition depending on the immunogen origin: whether this epitope is synthetic or extracted from tissue sources (Partyka *et al.*, 2012). Clustered saccharide patches of plasmatic tumour-derived mucin-like proteins have been indicated as the cause of these recognition differences (Cohen and Varki, 2014). A good example comes from studies performed with cancer patients, where an immunization with two epitopes expressed in colon cancer, STn and Tn, was found to enhance levels of IgG directed against them. Cancer patients already expressed low levels of IgM NAbs (Adluri *et al.*, 1995). However, this approach did not elicit the IgGs against the epitope and only the immunization with ovine submaxillary gland, a natural source of this antigen, could reproduce this effect (Adluri *et al.*, 1995).

Preliminary experiments performed in our group allowed the detection of IgM antibodies against the hippocampal PAS granules in 9-month-old SAMP8 mice sera (non-published observations). These results suggested the presence of IgM NAbs in SAMP8 mice sera, similar to the ones detected in the sera and ascites of other mice strains. Noteworthy, the high titers of NAbs in mouse ascites in relation to mouse sera might be related to the relevant presence of B1 cells in the peritoneal cavity of these rodents, where ascites are produced. However, more studies are needed to clarify whether these antibodies are genuinely natural IgM antibodies already present in SAMP8 mice before the appearance of the granules, or the result of an autoimmune response related to the accelerated senescence developed in SAMP8 mice.

Actually, the cross-reactivity of the MAG antibodies could possibly explain the recognition of both the PAS granules epitope and the A-type human erythrocyte epitope by the IgM contaminant antibody. Disparities in the results about the identification of human A blood group subtypes recognized by MAG antibodies have also been previously reported (Finstad *et al.* 1991, Kliman *et al.* 1995; Smith *et al.* 1984). In addition, both monoclonal antibodies directed against human A blood group and lectins failed to stain the epitope of the hippocampal granules in the present study. Hence, it could be suggested that either the IgM contaminant antibodies are polyreactive NAbs that present cross-reactivity for both epitopes, or the recognition of the human A blood group erythrocytes does not correspond only to the GalNAc-related epitope that differentiates A blood group from B and O blood groups due to structural issues, as it has been outlined above.

On the other hand, aging has been associated with an increase in an autoimmunity state, coexistent also with immunodeficiency (Schram *et al.*, 2007). It has been hypothesized that the autoreactive antibodies produced in older individuals might be

the product of memory B cells that survived in the host after the exposure to an antigen or autoantigen during the youth. These B cells could be activated later in life, promoting a late onset of autoimmune processes (Stacy *et al.*, 2002). The activation could start when tolerance mechanisms are compromised, thereby revealing autoreactivities previously held in check (Aggarwal and Gupta, 1998; Ishimaru *et al.*, 2000; Falcone *et al.*, 2001; Hsu *et al.*, 2001; Thoman and Weigle, 1983; Wakabayashi *et al.*, 1999; Wang and Schlomchik, 1998). Alternatively, the initial immune response may have been directed not against a self-antigen, but against a foreign moiety. Then, the autoimmune reactivity could be due to a cross-reaction with a molecular mimicry of a self-antigen (Panoutsakopoulou *et al.*, 2001; Schwimmbeck *et al.*, 1989; Theofilopoulos and Kono, 1998; Röcken *et al.*, 1992), such as the first and second recognition case explained above.

Neo-self antigens appear in senescence, and this event may account for an autoimmune reaction. Although the BBB is usually compromised in old individuals and in age-related neurodegenerative diseases, such as AD, the IgM antibodies are not probably able to cross the BBB, due to their high molecular size. The BBB usually maintains the immunological privilege of the CNS, and then, the high levels of IgM NAbs would be caused by a first exposure of the neo-antigen to the immune system outside the CNS. Because the presence of the neo-antigen has only been studied in the brain, there is currently a lack of data about its expression in other tissues.

An increase of autoantibodies has been recently described in SAMP8 mice from 2 months onwards in comparison to SAMR1, which shows this same increase at 12 and 15 months of age (Guo *et al.*, 2013). Taking into account the high degree of ROS present in the SAMP8 mice brains (Álvarez-García *et al.*, 2005; Pallàs *et al.*, 2008), neo-antigens or epitopes related to cell senescence process, such as the senescence cell antigen (SCA), could be expressed in sera. It remains to be known if the interaction of the IgM antibody with the neo-epitope would have a beneficial or a harmful effect in these mice. In view of the overall results, it would be necessary to further study the time of appearance of IgM antibodies and their titers on sera to address their role and significance in the PAS granule formation in SAMP8 mice.

The ubiquity and the cross-reactivity of the contaminant IgM antibodies may have been an important source of misunderstandings in studies about the PAS granules composition and origin. Then, the real presence of the compounds targeted by several antibodies in these structures was questioned here. Among the 19 antibodies tested in

our study, the antibody against matrix metalloproteinase-2 was the only one that did not show to contain a contaminant IgM but stained the hippocampal granules. However, zymography studies on brain slices discarded at least the presence of the active enzyme form in these structures (non-published observations). Moreover, the anti-syndecan-2 antibody showed only a slight IgM staining of the granules, suggesting that the positive antibody labelling of the granules when using anti-IgG as a secondary antibody was mostly due to the genuine presence of syndecan-2. Respect to the rest of the tested antibodies, they showed positive staining of the granules when they contained contaminant IgM antibodies.

The contaminant IgM antibodies could also explain the contradictions observed in the results from the PAS granules composition studies performed in other mice strains. The PAS granules content has been mainly studied by histochemical and immunohistochemical stainings. The former have consistently demonstrated the presence of a high amount of polysaccharides, glycoconjugates and carbohydrate molecules due to the positivity of the PAS reaction (Doehner *et al.*, 2010; Lamar *et al.*, 1976). However, confusing results about the amyloid nature of the PAS granules components have been obtained when staining with thioflavin S and Congo red (Doehner *et al.*, 2010; Robertson *et al.*, 1998). The latter have been previously questioned several times because of the contradictory results obtained in stainings (Jucker *et al.*, 1994a, Kern *et al.*, 2011) and the failure of the preadsorption controls (Jucker *et al.*, 1992). Indeed, controversies can emerge from the same staining controls used. For example, the negative staining of a pre-immune rabbit serum (Doehner *et al.*, 2010) could depend on variable titers of anti-MAG antibodies in the batch used, or its low binding due to the low affinity of the NABs and the dilution effect. Moreover, in a study performed with anti-reelin antibodies that positively stained the hippocampal PAS granules, the assumption of a specific staining was partially based on the absence of stained reelin deposits in the reeler orleans mice strain (Doehner *et al.*, 2010). Nevertheless, the non-reported but more than probable BALB/C strain background of the reeler orleans might better explain the absence of staining, as BALB/C mice do not develop PAS hippocampal granules (Jucker *et al.*, 1994a). In conclusion, specificity controls of the immunohistochemical stainings of PAS granules have to be carefully performed taking into account the IgM antibody presence and the mouse strain used to ensure specific staining of these antibodies. The identification of the source of the artifact staining, the IgM antibodies, might help to prevent these confusions.

Summing up, an interpretation of the real composition of the PAS granules based on the results of immunohistochemical stainings presents several difficulties. Noteworthy, a study performed with MAO-A and MAO-B enzyme histochemistry (Nakamura *et al.*, 1995) showed interesting and highly reliable results, as the lack of antibodies in this

procedure discards completely an artifact staining caused by contamination. Hence, MAO-B enzyme, which is mainly located in the external membrane of glial cells mitochondria, is one of the components of the hippocampal PAS granules.

The presence of A $\beta$  has been one of the main controversies about the hippocampal PAS granules, when the preadsorption controls of the anti-A $\beta$  antibody staining in C57BL/6 mice failed (Jucker *et al.*, 1992). In this study, we re-evaluated the presence of some components previously described in the hippocampal granules of SAMP8 mice, such as tau protein and A $\beta$  peptides. On one hand, the staining with anti-tau antibodies lacking contaminant IgM stained positively the neuron dendrites, but not the PAS granules although it was directed against the same amino acid sequence as the anti-tau antibody which stained also the PAS granules. Hence, the tau protein was not present in the PAS granules. On the other hand, as described in the results, some batches of antibodies directed against A $\beta$  peptides stained SAMP8 granules, whereas other batches did not stain them. Accordingly, IgM was absent in the batches that did not stain the granules, but it was detectable in the available 12F4 antibody batch that positively stained PAS granules. In APP/PS1 mice, granules and A $\beta$  plaques could be both observed in the hippocampus when staining with anti-A $\beta$  antibodies, although IgM stained only the PAS granules. To confirm the absence of A $\beta$ , a thioflavin S staining and A $\beta$  detection with Hilyte, a fluorescence-conjugated human A $\beta$  probe, were performed in the SAMP8 and APP-PS1 brain slices. Both stainings positively detected A $\beta$  plaques, but not the PAS granules. Still, the preadsorption controls performed in other studies with the 4G8 antibody against A $\beta$  peptides presumably showed a specific staining result of the A $\beta$  presence in PAS granules (Robertson *et al.*, 1998, 2000). Our results, however, indicate that the granules present in SAMP8 and APP/PS1 mice contain neither A $\beta$  peptides nor tau protein, and this observation can be extended to other mouse strains containing PAS granules.

Studies on A $\beta$  peptides deposition in SAMP8 mice brain have produced controversial results. The A $\beta$  deposits described included, among others,  $\beta$ /A4 protein-like immunoreactivity granular structures ( $\beta$ -LIGS) (Takemura *et al.*, 1993), A $\beta$ -peptide-like immunoreactivity deposits (A $\beta$ -LI) (Fukunari *et al.*, 1994), reelin deposits which contained A $\beta$  (Knuesel *et al.*, 2009) and hippocampal granules containing A $\beta$ <sub>40</sub> and A $\beta$ <sub>42</sub> (Del Valle *et al.*, 2010, 2011; Porquet *et al.*, 2013; Yamaguchi *et al.*, 2012). Studies performed by Morley *et al.* (2000) found A $\beta$  plaques that were not discernible before 16 months of age, and became more prevalent at 22 months of age. However, Nomura *et al.* (1996) did not find deposits or granular structures in SAMP8 brain although they reported an increase in A $\beta$ PP-like immunoreactivity. Recently, Lou *et al.* (2012) described diffuse A $\beta$  plaques stained with anti-A $\beta$ <sub>42</sub> antibodies present in the hippocampus of SAMP8 mice from 9 months onwards. From the description of the A $\beta$ -

LI and the reelin deposits containing A $\beta$  (Knuesel *et al.*, 2009), it appears that these deposits correspond to the pathological granules further investigated in this study. As we found that they are not stained with thioflavin S or with Hilyte-AF488, and we also observed that A $\beta$ -staining is an artifact staining due to the presence of the contaminant IgM, we conclude that there is no deposition of A $\beta$  in these granular structures. It should be noted that Doehner *et al.* (2010) reported that these granules were stained with thioflavin-S, but we did neither observe this positivity in SAMP8 mice granules nor in those from APP/PS1 transgenic mice. In the latter, amyloid plaques were used as positive control for thioflavin S staining. Thus, the only structures that could be considered as A $\beta$  deposition are the  $\beta$ -LIGS (Takemura *et al.*, 1993), the A $\beta$  plaques appearing at advanced ages in SAMP8 animals, as described by the Morley group, and the diffuse plaques reported by Lou *et al.* (2012). However, none of these results have been reproduced by other authors.

Pathology markers of AD-like senile plaques or A $\beta$  deposits and NFT are absent in wild-type rodents, being necessary to generate transgenic animals overexpressing human A $\beta$ PP (Games *et al.*, 1995; Hock *et al.*, 2001; Oddo *et al.*, 2003) or to perform intracerebral injections of A $\beta$  aggregates (Frautschy *et al.*, 1991; Reyes *et al.*, 2004) to generate *in vivo* models as a paradigm for AD studies. Deposition of A $\beta$  has been well documented in mammals; the sequence is generally >95% identical across mammals, and all vertebrates express  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases (Finch and Sapolsky, 1999; Sarasa and Gallego, 2006; Selkoe *et al.*, 1987). However, it is generally accepted that rodent A $\beta$  does not aggregate *in vivo* because neither the *Mus musculus* nor *Rattus norvegicus* rodents naturally produce A $\beta$  plaques (Beach, 2008; Dayan, 1971; Flood *et al.*, 2009). Exceptionally, Guinea pig rodents (*Cavia porcelus*), the common hare (*Oryctolagus cuniculus*) and the South-American rodent *Octodon degu* have been shown to generate A $\beta$  plaques with increasing age (Inestrosa *et al.*, 2005; Ionov and Puchinskaya, 2010; Tharp and Sarkar, 2013).

The sequence difference in *Mus musculus* and *Rattus norvegicus* results from three amino acid substitutions from three single nucleotide changes at positions 5, 10 and 13 (Figure 11) (Jankowsky *et al.*, 2007; Tharp and Sarkar, 2013). Mounting evidence suggests that the absence of amyloidogenesis in these particular rodents comes from these substitutions, although other physiological influences might be considered (Tharp and Sarkar, 2013). The substitution in the amino acid 13 might underlie the lack of aggregation, as it disrupts a metal binding site present in other A $\beta$  peptides (Bush *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000). Early studies observed different conformations between human and mouse A $\beta$  in membrane-mimicking solvents (Otvos *et al.*, 1993). Moreover, a lower tendency to aggregation was described in mouse A $\beta$  respect to human A $\beta$  under conditions of radical generation systems (Dyrks



*et al.*, 1993). Expression of the neuronal form of two mutant forms of human A $\beta$ PP associated with AD in rat hippocampal neurons dramatically increased amyloid-containing fragments, but when the mouse form of A $\beta$ PP was expressed, a strongly decrease was observed (De Strooper *et al.*, 1995). In this study, when the rodent A $\beta$ PP form was 'humanized' by introducing mutations on its sequence, an increase on the production of amyloid peptides was observed. The deficient ability of the rodent A $\beta$  to aggregate *in vivo* has also been proved by several studies. Overexpression of both human and mouse A $\beta$  in a triple transgenic mouse moAPP x APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> revealed a minimal capacity of mouse A $\beta$  to induce deposition, even when the mouse A $\beta$  concentration was 3- or 4- fold respect to wild type levels (Jankowsky *et al.*, 2007). This same observation has been done in APP/PS1 transgenic mice (van Groen *et al.*, 2006). In the triple transgenic mice, the presence of mouse A $\beta$  influenced human A $\beta$  aggregation, increasing its detergent solubility respect to human A $\beta$  brain deposits (Jankowsky *et al.*, 2007; Kalback *et al.*, 2002; Kuo *et al.*, 2001). In regards of these results, it has been suggested that as the majority of extra A $\beta$  present in this mice is soluble in SDS, this peptide may be accumulated only as diffuse amyloid in the brain of these animals. Oligomeric structures, difficult to detect histologically, could contribute also to the presence of this peptide in detergent extracts but not to its aggregation. Moreover, immunohistochemical analysis has demonstrated an aggregation of mouse A $\beta$  around the core of human peptide senile plaques in transgenic mouse models of AD, probably due to the inherent stability of the former peptide (van Groen *et al.*, 2006; Jankowsky *et al.*, 2007). These results can be easily interpreted considering the amyloid seed hypothesis (section 2.2), as only when a prone-aggregating human A $\beta$  is present, mouse A $\beta$  can easily acquire an amyloid structure and, consequently, aggregate and form deposits.

Regarding these results, the absence or hardly reported presence of A $\beta$  deposits in SAMP8 can be easily explained. SAMP8 mice have, at the amino acid level, a homology of 99.2% with other rodent A $\beta$ PP sequences. A single amino acid substitution of alanine for valine at position 300 was unique to SAMP8 (Butterfield and Poon, 2005; Kumar *et al.*, 2001). However, familial AD mutations were not observed in SAMP8 cDNA (Kumar *et al.*, 2001). Therefore, although SAMP8 mice have an increase of A $\beta$ PP and their mRNA with age (Kumar *et al.*, 2000; Morley *et al.*, 2000), the lack of a seed, as well as the soluble properties of the derived peptides, do not promote the aggregation and formation of these deposits. Then, thioflavin S staining would not be detected, and only the appearance of A $\beta$  diffuse deposits, as well as oligomers, would be possibly accumulating or exercising a detrimental effect on the brain cells.

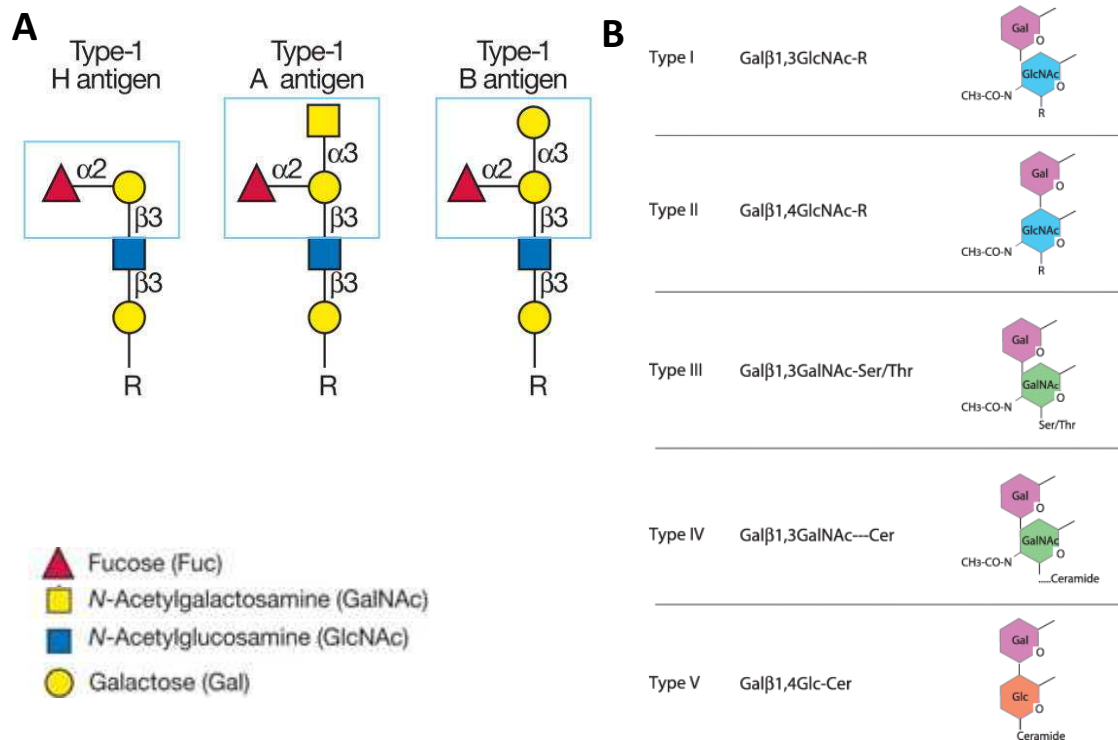
The lack of mouse A $\beta$  deposits or their low presence does not avoid the toxic effects of A $\beta$  peptides, as it has been reported that rodent A $\beta$  is also toxic (Boyd-Kimball *et al.*,

2004). In SAMP8 mice, the age-related increase of A $\beta$ PP mRNA affects learning and memory (Morley *et al.*, 2000), and these cognitive deficits are significantly improved when the expression of A $\beta$ PP is down-regulated by using an antisense oligonucleotide specific to A $\beta$ PP mRNA in aged SAMP8 mice (Butterfield and Poon, 2005; Kumar *et al.*, 2000, 2001). This cognitive improvement has been proposed to be associated with the reduction of A $\beta$ -induced oxidative stress, as the modulation of the oxidative stress markers indicated (Poon *et al.*, 2004). Therefore, it seems that the absence of A $\beta$  deposition in SAMP8 mice does not elude effects related with these peptides, such increased oxidative stress and cognitive deficits in aged SAMP8 mice (Butterfield and Poon, 2005).

Although the studies performed in this thesis have excluded or questioned the presence of several components reported in the hippocampal PAS granules, a shared reactivity pattern has been found in all the structures stained. The IgM contaminant antibody detected the presence of an epitope which is widely expressed in the hippocampal PAS granules. This epitope is only found in the granules, and is absent in other healthy brain areas.

In other studies related with the MAG contaminant antibodies, the **MAG antigen** was detected in human tissues of A blood group individuals, which expressed A human surface antigen as an artifact staining (Finstad *et al.*, 1991). Later, MAG antigen was found in a large extent in human endometrial tissue, salivary glands, nasal mucosa glands (Kliman *et al.*, 1995) and normal and carcinoma specimens of ovarian epithelium (Finstad *et al.*, 1991) of A blood group individuals. The pattern of MAG antibody staining included Golgi and tissues where mucins were easily stained, like endometrial tissue. In animals, expression of MAG has been described in pancreatic acinar rat cells (Smith *et al.*, 1984) and in several glandular epithelia such as submandibular, sublingual and parotid glands in rats; or intestine, oviduct and prostate of gerbils, but its presence has not been detected in mice (Spicer *et al.*, 1994). The only structures of the CNS which presented a slight staining of MAG were the perivascular astrocytes of human samples (Kliman *et al.*, 1995), and the Golgi zone of some neurons of A1 blood group individuals (Ouwendijk *et al.*, 2012; Zerboni *et al.*, 2012). In our experiments we have not observed the presence of IgM staining in Golgi cisternae. However, the exclusive and profuse expression of an epitope in the hippocampal PAS granules detected by the IgM contaminant antibodies suggested the appearance of a new antigen during the formation of the hippocampal granules. Hence, the IgM contaminant antibodies detected a neo-epitope present in the pathological hippocampal granules of aged mice.

In reported studies about the anti-MAG antibodies, several attempts have been performed to characterize the MAG antigen. The main feature of MAG epitope is the haemagglutination of human A-type blood group erythrocytes, but not B or O type, highlighting the presence of a GalNAc group, which is the main difference between them (Figure 38 A). In our studies we could also detect the presence of an IgM antibody observing the direct haemagglutination of human A blood group erythrocytes.



**Figure 38. Human ABO(H) blood group determinants.** A) Type-1 and -2 H, A, and B antigens that form the O (H), A, and B blood group determinants on N- and O-glycans (Stanley and Cummings, 2009). B) The disaccharide precursors utilised by glycosyltransferases to form the ABO and related  $\alpha$ -galactose ( $\alpha$ -Gal) and  $\alpha$ N-acetylgalactosamine ( $\alpha$ GalNAc) antigens (Milland and Sandrin, 2006).

The human ABH(O) blood group determinants, which are constituted by two or three monosaccharides, are carried by a disaccharide structure of the precursor chain (Figure 38 B) in glycolipids and glycoproteins of the erythrocyte membrane (Schenkel-Brunner, 2000). The antibodies recognize the last three or four sugars of these epitopes (Kabat, 1971; Schenkel-Brunner, 2000). The carbohydrate chain core structures, the carrier molecule and the cell membrane do not change blood group specificity but may influence serological reactivity by controlling the steric arrangement of the determinant groups (Schenkel-Bruner, 2000).

Based on the different reactivities of anti-MAG antibodies with the erythrocyte subtypes, preadsorption tests of the MAG antibody with human A blood group erythrocytes have been successfully performed (Finstad *et al.*, 1991; Kliman *et al.*, 1995; Spicer *et al.*, 1994). However, when the reactivity of these antibodies was tested for glycolipids of human A blood group, only A3 and A4 blood group types reacted with the anti-MAG antibody. Other experiments performed with anti-MAG antibodies included competition tests with a type III porcine stomach mucin (Kliman *et al.*, 1995), carbohydrates mixture and milk powder incubation, and all of them effectively blocked the anti-MAG antibody staining (Spicer *et al.*, 1994). Contradictory results were reported in relation to the blocking activity of ovine submandibullary gland mucin (Kliman *et al.*, 1995; Spicer *et al.*, 1994). As previously discussed, not only the sterical and epitope human blood group differences could explain the differential reactivities, but the clustered saccharide patches may also explain some observed variances in the reactivity of the anti-MAG antibodies and their epitopes.

Accordingly, the early evidences obtained in our study confirmed the presence of a neo-epitope of glycosidic nature in the pathological hippocampal granules of aged mice. Different findings indicated that the **neo-epitope** is constituted, at least in part, by carbohydrates. For example, the IgM contaminant antibody directed against the neo-epitope provoked a certain level of haemagglutination of human type-A erythrocytes. Furthermore, preincubation of the IgM antibodies with monosaccharides blocked the IgM staining. Finally, the PAS-positive granules' staining supports the wide presence of glycosylated products constituting these structures.

Neo-epitopes related to carbohydrates have been described in several situations, such as malignant tumour cells (Vollmers and Brändelin, 2006). In this case, the epitopes are post-transcriptional modifications of carbohydrate residues on cell surface glycolipids and glycoproteins (Cobb and Kasper, 2005). Among the most frequent glycolipids we could find the gangliosides and neutral glycolipids (Vollmers and Brändlein, 2007). The glycoproteins include, for example, the abnormal expression of MUC1 and MUC4. Heat shock proteins can also show a modified glycosylation pattern on cancer cells (Vollmers and Brändelin, 2007). These carbohydrate antigens are prominent targets of immune surveillance and natural IgM antibodies (Brändlein *et al.*, 2003; Vollmers and Brändelin, 2006). In addition, in aging processes there is an increase in advanced glycation end products (AGE) (Goldin *et al.*, 2006), which are the result of modifications of proteins or lipids non-enzymatically glycosylated and oxidised (Schmidt *et al.*, 1994; Singh *et al.*, 2001). Early glycation and oxidation processes result in the formation of Schiff bases and Amadori products that finally lead to the generation of AGEs (Schmidt *et al.*, 1994). Frequently, AGEs involve membrane proteins at the extracellular compartment, which leads to a highly significant hardening of the blood

vessel walls that may lead to dysfunction and disease (Gkogkolou and Böhm, 2012). AGEs and other oxidation-specific epitopes are a type of pathogen-associated molecular patterns that are also recognized by NABs and other innate immune receptors. In many, if not all, cases, molecular mimicry exists between oxidation-specific epitopes of self-antigens and epitopes of infectious pathogens (Binder *et al.*, 2005). Interestingly, IgM NABs against oxidation-specific epitopes are present in the sera of non-immunized mice and their titers greatly increase in ApoE-deficient mice (Palinski *et al.*, 1995). Another newly appearing antigen related with aging is the SCA, a 62 kDa protein firstly characterized in senescent erythrocytes (Kay, 2013) and detected later in non-erythroid cells such as platelets, lymphocytes, liver, kidney and brain (Kay, 1981, 2005). IgG autoantibodies against the SCA have been isolated from senescence cells, and they induce cell phagocytosis (Kay, 2005). This neoantigen belongs to the band-3 family of membrane proteins, and is also distributed in subcellular organelles such as Golgi or mitochondria (Kellokumpu *et al.*, 1988; Ostedgaard *et al.*, 1991). It has been related to oxidative processes and described, together with other components of the band 3 membranes, to be deposited in fibrillary structures and processes not in young brains but in old ones (Kay *et al.*, 1995).

Preliminary studies about the neo-epitope characterization performed with SAMP8 mouse brain have presented several difficulties to identify the proteinic or lipidic nature of the glycosylated epitope. A proteinase K treatment and chloroform-methanol extraction (1:1, v/v) in mouse SAMP8 brain slices indicated that the epitope was soluble in the organic solvent mixture but could not be enzymatically degraded by proteinase K (non-published observations). Even though, a lipid moiety cannot be clearly attributed to the neo-epitope, as a high amount of sialic acids could account for the organic solvent solubility and some proteins can be proteinase-K resistant. Additionally, studies with lipid extracts of human A blood group erythrocytes ghosts were performed to identify the possible antigen detected by the IgM. After a chloroform:methanol:water (4:8:3, v/v/v) extraction and an immune-overlay TLC staining with the IgM antibody, we could identify a band in the organic phase of the lipid extracts (non-published observations; experiments performed in A. Acosta-Serrano and J. Turnbull laboratories). The detected band could possibly correspond to a glycan conjugated to a long ceramide, as the compound migrated close to the application point in a solvent system of chloroform/methanol/KCl 0.25% w/v (60:35:8, v/v/v). The results revealed that this lipid was present in low amounts, and contained in the A blood group red blood cell membrane.

In our case, the origin and nature of the neo-epitope is still unknown, but possibly the neo-epitope identified is the result of a senescent, oxidative, apoptotic or proliferative-tumorigenic progression. However, as discussed later, the phenotype presented by

SAMP8 mice, as well as other successfully pathogenic-modifying treatments related with antioxidative compounds, reveals an important involvement of senescence and/or oxidative-related processes.

Ultrastructural studies performed on hippocampal granules previously reported that these structures contained a central core of electron-dense membranous-like structures deposition generally surrounded by a halo or electron-lucent region. The halo is delimited externally by a plasma membrane which suggested a cellular location, although appears discontinuous in some regions. The central core is round to ovoid in shape, and the membrane-like structures contained in it are haphazardly aggregated and do not resemble any cell organelle. Moreover, organelles cannot be observed in this centre. On the contrary, cytoplasmic organelles like endoplasmic reticulum, polyribosomes, intermediate filaments, multivesicular bodies or mitochondria have been occasionally described in the halo region (Doehner *et al.*, 2010; Kuo *et al.*, 1996; Mitsuno *et al.*, 1999; Robertson *et al.*, 1998). In our study, the ultrastructural features of the granules already described were confirmed. The contrast of the electron-dense core with the translucent core when stained with or without OsO<sub>4</sub> highlighted the lipidic compounds, indicating a high lipidic content of the granules core. Moreover, the translucent region contained some blebs or big cisterns, which seemed to originate from invaginations of the surrounding plasma membrane, but could also be near or maintain a close contact with the core of the granules. A characteristic junction of the plasmatic membrane surrounding the granules with the membranes of adjacent cells, described by Kuo *et al.* (1996) as astrocyte-astrocyte junctions, were frequently observed. These junctions between astrocytes were also observed in some hydropic astrocyte end-feet around the blood vessels, an area where some granules have also been visualized.

In previous studies, mature granules were further characterized; but granules in formation have not been described yet. The observations showed granules that presented some sparse membranous-like structures, instead of a compact core, thus suggesting the appearance of granules in the first stages of their formation or immature granules. Some features were repeated in almost all the immature granules. The most characteristic is the presence of membranous structures that form intracellular bubbles or blebs in the translucent zone, merged with the plasma membrane, while others reached the membranous matrix of the inside of the granule. Degenerating mitochondria could also be observed in this area. The plasma membrane of the immature granules is often fragmented or unstable, as well as some membranes of adjacent structures, thus losing the boundaries between the cell where the granule

is formed and the adjacent structures. This phenomenon is particularly evident in granules in formation, and is highly probable the cause that part of the neuropil is then incorporated to it.

Although it can be considered that the material accumulated in the centre of the granules is just an accumulation of molecular waste, the successive ultrastructural changes from the exterior to the interior of the granules suggested a pathological process initiated outside the granules and a migration of the degenerative structures inward (Kuo *et al.*, 1996).

To further characterize the presence of the neo-epitope in the ultrastructural localization of PAS granules, immunoelectron stainings with mouse IgM contaminant antibodies were performed. The neo-epitope was labelled with nanogold secondary antibodies in the core of mature granules, and in the immature granules it was highly present in the region where the core is formed. In both cases, the neo-epitope appeared associated with membranous fragments pretending to constitute of the granule core. This fact suggested that the neo-epitope appears during the formation of these fragments, although a certain labelling was occasionally observed in the membranes of adjacent structures. The neo-epitope, therefore, does not seem to be a trigger or a key element in the formation of granules but a byproduct of it.

In the first article of this thesis, some immunostainings were performed to detect several components related to neurodegenerative diseases and brain cells in order to characterize the granules composition and their cellular origin. The components stained such as NeuN protein, MAP2 and tau indicated a neuronal origin, although we could observe in some cases the coincidence of the region occupied by a cluster of granules and that of a determinate astrocyte. However, the aggregate clusters were not always close to reactive astrocytes, suggesting that these cells were not essential for the presence of clusters. In this same study we could observe astrocyte processes adjacent to the granules, and even surrounding them, but these granules did not appear to constitute a part of the astrocyte process. At first sight, the presence of neuronal components, mainly NeuN protein, which is only present in the neuronal soma, suggested a neuronal origin for the granules and some neurodegenerative process for its formation.

Until now, the results that have been obtained about the granule origin, whether is neuronal or astrocytic, are rather confusing. The description of some neuronal origin

components, such as amyloid- $\beta$  peptides (Robertson *et al.*, 1998; Knuesel *et al.*, 2009; Del Valle *et al.*, 2010), tau protein (Kern *et al.*, 2011) or reelin protein (Knuesel *et al.*, 2009) also suggested a neuronal origin or, at least, some involvement of neurons in their formation. However, as we reported a high number of antibody contaminations in the granules stainings, those results should be carefully considered. The studies about granule artifact staining revealed the presence of an IgM also in the NeuN antibody. Hence, the staining of this protein was discarded and the relationship between clustered granules and brain cells was reevaluated.

The ultrastructural studies performed helped to clarify the cellular origin of the granules. The results obtained indicated that mature granules were located in the astrocytic processes. Although the translucent zone of the granules was formed by disturbed cytoplasm, and it was then difficult to identify the cell where the granule was located, immunostaining studies with anti-GFAP antibodies on ultrathin sections revealed in some cases the presence of GFAP fibrils in this zone. Moreover, small granular structures resembling glycogen accumulations, which are characteristic of astrocytes, were also found in the translucent zone. Furthermore, we also observed that the plasma membrane of various granules showed junctions with the membrane of some adjacent cells, which seems characteristic of the junctions between astrocytes (Kuo *et al.*, 1996), and were similar to gap junction channels described in Nagy *et al.* (1999). No synaptic vesicles or presynaptic buttons have been observed in the mature granules, neither in the core nor in the translucent zone. The relationship between granules and astrocytes is also shown in some cases in which granules are located in astrocyte end-feet surrounding blood capillaries. Thus, these results agreed with previously reported ones (Jucker *et al.*, 1994; Kuo *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 1995; Robertson *et al.*, 1998), which suggested the astrocytes as the cells where the granules are originated.

The results of this study also suggested that there was an unambiguous relationship between granules clusters and astrocytes. As it has been previously described (Akiyama *et al.*, 1986; Jucker *et al.*, 1994), the double immunofluorescence staining with antibodies against GFAP-protein and antibodies that stained granules showed in some cases that the granule cluster is distributed in correspondence with the reactive astrocyte. Moreover, MAO enzyme histochemistry revealed the presence of this enzyme in granules and several positively stained close astrocytes (Nakamura *et al.*, 1995). This relationship has not been observed with other cellular types, like oligodendrocytes or microglia. These cases of cluster and GFAP-positive astrocyte colocalization represent, however, a small percentage in the present study performed with 9-month-old SAMP8 mice: only the 20.16% of GFAP-positive astrocytes showed an association with a cluster, and only the 27.33% of the clusters were associated with



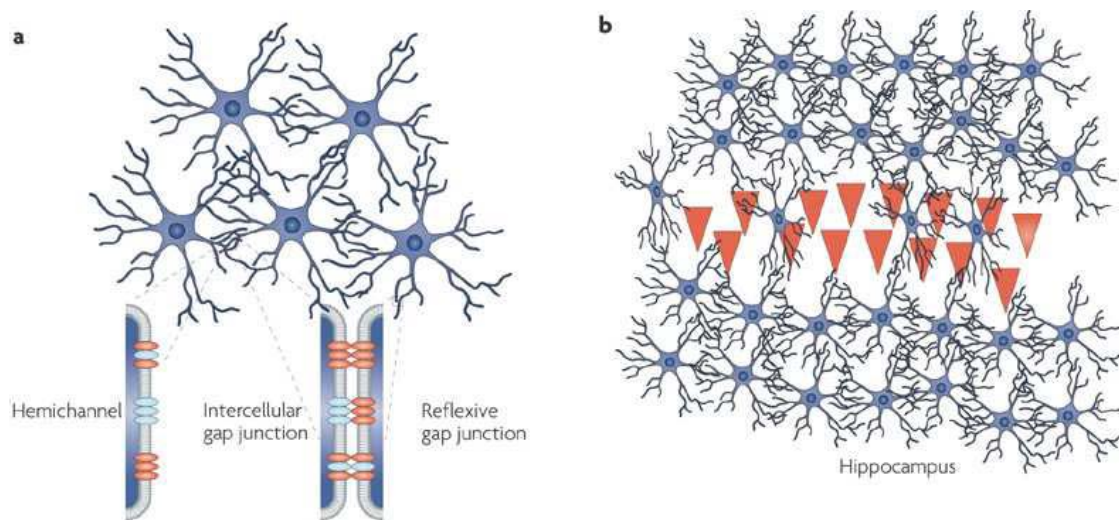
a GFAP-positive astrocyte. We believe therefore that there is not a causal relationship between the reactivity for GFAP and the presence of clusters; but the fact that clusters and GFAP-positive astrocytes occupied spherical regions of similar sizes according to Feret's diameters, reinforce the idea that each cluster is probably uniquely associated with a particular astrocyte, whether this astrocyte is GFAP-reactive or not. In some cases this astrocyte is GFAP-positive whereas in some other cases it would be a non-reactive astrocyte or an astrocyte which had lost this reactivity due to the degenerative processes that seem to accompany the granule formation. In addition, as it has been shown in the results section, when an immature granule is visualized using ultrastructural studies, it is likely to find other immature granules in the nearby areas of the neuropil and in some cases even in the area of the same astrocytic process. This suggests that in different regions of the same astrocyte there is a generation of granules that will give rise to the cluster.

The granule formation process has been explained with different hypothesis depending on the cellular origin described. Kuo *et al.* (1996) stated that granules were either a byproduct of neuronal phagocytosis carried out by astrocytes or produced by astrocytes. It has also been recently proposed that aged neurons with impairments in their proteosomal/lysosomal degradation system form 'budding-like' extrusions with accumulation of damaged or misfolded proteins as a protective strategy, and that subsequently the aggregated extruded fibrillary material is engulfed by glia (Doehner *et al.*, 2012).

The results of our studies suggest that the granule formation process takes place in the affected astrocytes processes, some of them clearly swollen or hydropic. A digestion process of the cytoplasmic components and intracellular organelles would result in the formation of waste or debris. This waste includes membranous fragments, which generate a spread matrix of fibrils and thereafter the dense-core of the granule. In the regions where the granules are forming, the plasma membrane of astrocytes appears to show some instability revealed by a certain degree of fragmentation, a less electron-dense appearance than the outermost regions, and the presence of irregular invaginations and evaginations of variable sizes. In these unstable regions some effects, which can be really aggressive, could also be observed on adjacent structures. In some cases there are regions of neuropil where the cellular elements, including the presynaptic buttons and the dendritic spines with their secretory vesicles, appeared disrupted and are incorporated into the astrocytic region. The incorporation of the secretory vesicles may lead to the false interpretation that the granule is located in a neuronal component, as suggested by Mitsuno *et al.* (1999) and Irino *et al.* (1994). Our results seem to indicate that glia do not engulf aggregated material, as postulated by

Doehner *et al.*, (2012), but the aggregation of the material is produced inside the astrocyte from its own material and material coming from nearby neuropil regions.

According to the pattern already described (Del Valle *et al.*, 2010), the clustered granules mainly start their formation in the CA1 region of the hippocampus, and then they expand gradually to regions CA2 and CA3. It is frequent to find granule clusters close to each other, and in regard to the results obtained in our studies, the granules origin is astrocytic. Therefore, a possible general explanation of the clustered granules spreading process could involve the communication network of the hippocampal astrocytes through the gap junction channels, which are formed by connexins 30 and 43, and thus constitute a **glial syncytium** (Figure 39) (Giaume *et al.*, 2010).



**Figure 39. Glial syncytia and intercellular gap junctions of astrocytes.** A) Localization and structure of connexin channels in astrocytes. Domains that are occupied by neighbouring astrocytes do not overlap, and intercellular gap junction channels are located at contact points between neighbouring astrocytes. In an individual astrocyte, a process can contact another process and form 'reflexive' gap junctions. Astrocytes express mainly two Cxs, Cx43 (blue) and Cx30 (red). B) In the hippocampus, the layer of pyramidal neurons (red) limits the number of astrocytes in this compartment and affects their morphology (Giaume *et al.*, 2010).

Gap junction channels are observed in the interface of the neighbouring astrocytes and in the contacts between the astrocytes end-feet surrounding blood vessels. Their main functions are the intercellular ionic coupling and the allowance of the circulation of small molecules that facilitate biochemical and metabolic coupling (Rohmann and Wolff, 1998). This last function permits the regulation of ions and water excess from the perivascular compartment (Rash and Yasumura, 1999). The connection between astrocytes allows the intercellular propagation of intracellular signalling molecules, including  $\text{Ca}^{2+}$  and ROS (Giaume and McCarthy, 1996; Verkhratsky, 1998). The spreading of ROS between cells through intercellular gap junction has been recently confirmed in endothelial cells both *in vitro* and *in vivo* (Feine *et al.*, 2012; Nelson *et al.*,

2012). In astrocytes, gap intercellular communication junctions have been proved to be essential for the resistance to oxidative stress insults and cell death induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Le *et al.*, 2014). In pathological situations, the expression of connexins is upregulated, especially when astrocytes are close to some lesions (Ochalski *et al.*, 1995; Theriault *et al.*, 1997), possibly as a compensatory mechanism to a deficient intercellular communication. When focusing in the CA1 region, it can be noticed that CA1 astrocytes are more sensitive to oxidative stress in comparison to other hippocampal areas, as reported in transitory focal ischemia (Ouyang *et al.*, 2007); and they also show a higher coupling compared to the CA3, as observed in dye coupling studies (D'Ambrosio *et al.*, 1998). Importantly, the altered intercellular communication, such as the cases explained above, has been suggested as one of the nine hallmarks of senescence (section 1.3.9).

In this study, the junctions observed next to the granules in hippocampal ultrathin sections resembled to those observed in the hydropic astrocyte end-feet which surrounded brain blood vessels. In addition, some granules have also been found in these astrocyte end-feet. These observations supported the identification of the junctions located next to the granules as gap junctions between astrocytes. Nevertheless, a proper identification of this junction should be performed in further studies. Interestingly, MAO-B, which is an enzyme related to oxidative stress processes (Jenner, 2012), was detected in PAS granules, as well as some hippocampal astrocytes (Nakamura *et al.*, 1995). This fact may be probably explained by the mitochondria degeneration observed in granules, as this enzyme is located in the outer mitochondrial membrane of glial cells (Jenner, 2012). The enhanced sensitivity to oxidative stress of the CA1 hippocampal area referred above could be related to an earlier beginning of the granules appearance in this area.

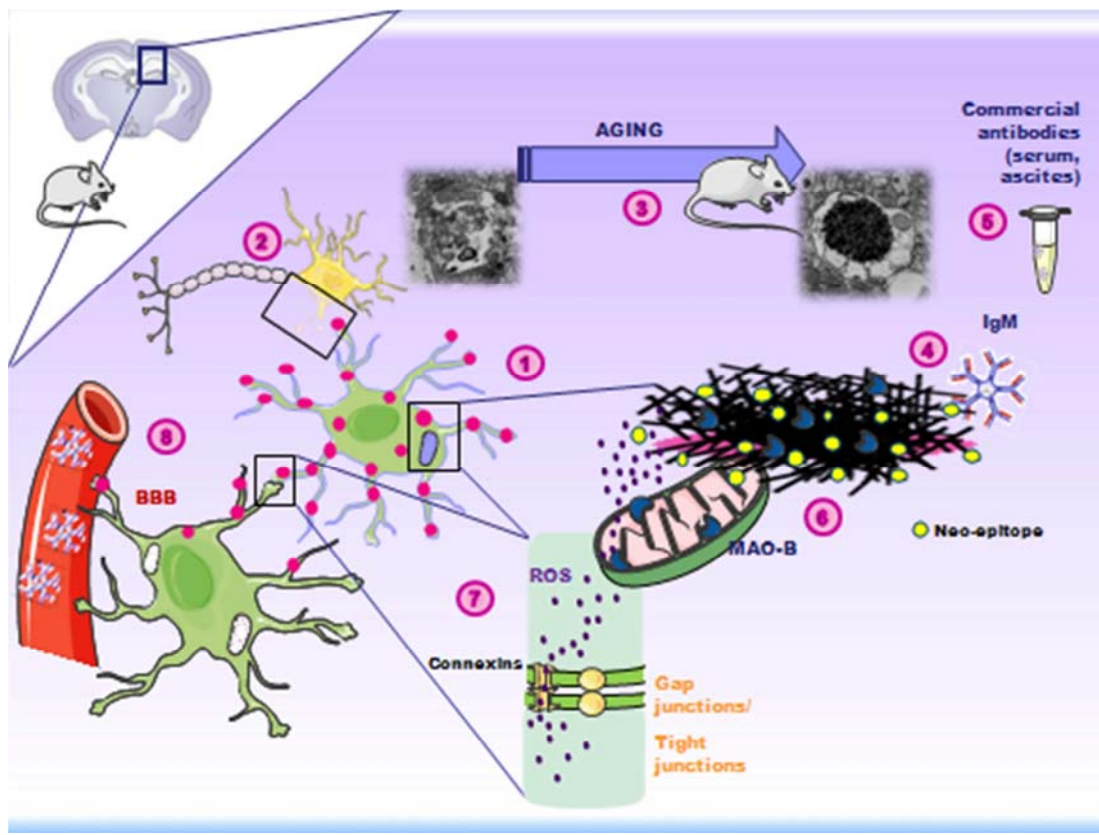
SAMP8 mice are also a known model of oxidative stress because of their high levels of this stress presented at early ages (Álvarez-García *et al.*, 2006; Pallàs *et al.*, 2012). Actually, an increase MAO-B has been observed in glial cells of old SAMP8 mice comparing to SAMR1 controls (Kato-Semba and Kato, 1993; Nomura *et al.*, 1989), and several early disturbances have been described in SAMP8 cultured astrocytes compared to SAMR1 strain, e.g., an increase of ROS generation or a diminishment of the mitochondrial membrane potential, and a reduction of glutamate uptake (García-Matas *et al.*, 2005). Thus, the high levels of oxidative stress could explain the early appearance of granules in the CA1 zone of the hippocampus in comparison to other mouse strains. In fact, a diminishment of the granules expression was observed after dietary ingestion of antioxidant compounds, such as resveratrol in SAMP8 mice (Porquet *et al.*, 2013) or an antioxidant diet in ApoE-deficient mice (Veurink *et al.*, 1993); and in APP/PS1 animals, although we observed a lower PAS granules expression

than in SAMP8 mice, it has been reported an increase of clustered granules formation respect to the C57BL/6 genetic background controls (Doehner *et al.*, 2010). Evidence suggests that the neurotoxic properties of A $\beta$  are mediated by oxidative stress (Butterfield, 1997), and actually an increase of oxidative stress has been described in A $\beta$  transgenic mice (Smith *et al.*, 1998) and a diminishment of oxidative stress brain levels has been observed in APP-PS1 after antioxidant treatment without altering the A $\beta$  burden (Zhou *et al.*, 2014). Therefore, oxidative stress seems to be a key factor in the formation of the hippocampal PAS granules in several mice strains.

The observations show that granules are the manifestation of an astrocytic degenerative process. Although the granules are not formed inside neurons, they could be affected, as some alterations have been observed in the surrounding neuropil. It is conceivable therefore that their presence could produce some functional alterations, especially in old SAMP8 animals where clusters occupy almost the entire hippocampus. The investigations performed by Soontornniyomkij *et al.* (2012) performed a study with the C57BL/6N animals up to 26 months of age and showed interesting results. They indicated that there was a negative correlation between the number of granule clusters and the discrimination ratio obtained by the object recognition test. Although the stainings performed might contain contaminant IgM antibodies directed against the neo-epitope, the negative correlation between granule clusters and the ability of object discrimination reinforces the idea of possible functional alterations due to the presence of granules.

Summing up all the results obtained and discussed in this thesis, a model of the formation and composition of the granules can be suggested (Figure 40). We conclude that the granules formed in the hippocampus of aged mice are the result of a degenerative disease process that occurs primarily in astrocytes, although nearby structures may also be affected. During granule formation, various membranous fragments are generated and they constitute part of the core of the granule. In these membranous fragments, a glycosidic neo-epitope is originated. This neo-epitope is detected by contaminant IgM antibodies present in several commercial antibodies. In the membranous fragments constituting the granules several degenerated mitochondrial fragments are found and, according to previous reports, MAO-B enzyme is also present. This observation, as well as the reported evidences suggests the principal role of oxidative stress in the granules formation process. The formation of a granule in a particular astrocyte is not an isolated circumstance. The astrocyte processes host different granules resulting in the formation of a granule cluster. A dysfunction of the GJ channels could spread ROS and promote the cluster formation across the hippocampal glial syncytia. The IgM antibodies could be NABs existing in several species sera, and also in SAMP8 mice. In usual conditions, the BBB could avoid

the interaction between the own IgM NABs and the glycosidic neo-epitope of the hippocampal granules.



**Figure 40. Model suggested for the clustered granules composition and formation process in the hippocampus of aged mice.** Hippocampal PAS granules are organized in clusters formed in astrocytes due to a degenerative process (1). Although the granules formation takes place in astrocytes, other cell structures located close to the granules can be affected by this degenerative process (2). The granule formation, which is a process related to aging in mice, occurs after the generation of several membranous fragments that will constitute the core of the granule (3). A glycosidic neo-epitope originated in the core of the granules has been identified (4) due to the presence of contaminant IgM antibodies in commercial antibodies produced in serum or ascites (5). Moreover, the MAO-B enzyme has been described to be another component of the granules, and degenerating mitochondrial fragments are usually constitutive of the granules core (6). The identification of a tight junction related to astrocytes and possibly constituted by connexins might explain the involvement of oxidative stress, which can be spread through the gap junctions of the astrocytes syncytia and promote the granules formation (7). Finally, IgM antibodies could be NABs existing in several species sera as well as in SAMP8 mice, but the blood-brain barrier could avoid the interaction of these antibodies with the glycosidic neo-epitope (8).

The granules composition and formation model proposed in this thesis does not agree with the physiopathological significance given to the granules in previous studies. Actually, as explained above, our study discards the interpretation of granules based only in immunohistochemical compositions, like their identification as senile plaques

or A $\beta$  aggregates (Robertson *et al.*, 1998), tau protein deposits related with a tauopathy (Kern *et al.*, 2011; Krass *et al.*, 2003) or autophagosomes (Soomtornniyomkij *et al.*, 2012). Our results do not support either the classification of the granules as corpora amylacea. Although there are remarkable similarities between this brain lesion and the PAS granules, there are also important differences noticed earlier, e.g., the main hippocampal localization and their ultrastructural properties (section 4.10) (Jucker *et al.*, 1994a; Robertson *et al.*, 1998). Finally, Doehner *et al.* (2012) suggested that PAS granules were budding extrusion bodies containing reelin and produced by neurons, which were engulfed afterwards by astrocytes. The results obtained in our studies concluded that granules are formed in astrocytes instead of neurons. Therefore, according to our observations, this hypothesis does not explain the PAS granules formation and could not be considered an explanation of their physiopathological significance. In regards of the whole information available about PAS granules, it is difficult to provide a clear physiopathological meaning of their presence in the hippocampus. More studies regarding the formation mechanisms and the composition of these structures are needed to provide a well-defined interpretation of this process.

The general objective of this thesis aimed to characterize the hippocampal granules of SAMP8 mice in order to deepening in its brain neuropathology; and thus, to provide new knowledge to evaluate the use of these mice as an animal model of sporadic AD. In view of the results exposed in this thesis, it can be assessed that the PAS granules do not reproduce any known feature of the brain pathology of sporadic AD. The new data provided in this thesis clarifies the use of SAMP8 mice regarding the hippocampal A $\beta$  deposits. However, taking into account the overall evidences of SAMP8 mice AD-like cognitive deficits and neuropathological hallmarks, such as oxidative stress, loss of dendritic spines, soluble A $\beta$  peptides increase, as well as tau protein hyperphosphorilation, the uncertainty of the presence of A $\beta$  deposits does not exclude SAMP8 mice as an interesting model for studying the pathological “switch” between aging and AD (Pallàs *et al.*, 2008). According to the logical criteria for evaluating animal models of AD stated by Woodruff-Pak (2008), SAMP8 mice have certain merits, such as better validity, better intra- and inter-laboratory reliability and better AD-related quality (Woodruff-Pak, 2008). While the mutation-based AD models may be more relevant to study mutation mechanisms (Woodruff-Pak, 2008), SAMP8 mice may provide a more encompassing picture of sporadic AD (Cheng *et al.*, 2014) and clearly can exert the role of a suitable animal model to study degenerative processes occurring in aging.



## *V. CONCLUSIONS*





1. The pathological clustered granules present in the hippocampus of aged SAMP8 mice correspond to the *Periodic Acid Schiff* granules described in aged mice of several mouse strains.
2. These pathological structures present in the hippocampus of aged mice are the result of a degenerative process.
3. The degenerative process is located in the astrocytic digitations and can affect also the surrounding neuropil, affecting neuronal structures.
4. The association of the granules in clusters is due to a formation process of the granules in one astrocyte. Thus, the granules present in one astrocyte will rise into a cluster of granules.
5. The appearance of abnormal membranous structures of different shapes and sizes is observed inside astrocytic digitations when the granules formation process occurs.
6. The degeneration of these membranous structures and the cellular organelles, especially mitochondria, produce membranous waste that finally accumulates forming the core of the granule.
7. A new epitope, which is absent before the formation of the granules, appears in the membranous residues. For this reason, it has been considered a neo-epitope.
8. Therefore, the neo-epitope is located in the nucleus of the mature granules.
9. The neo-epitope contains some structure of glycosidic nature.
10. The neo-epitope is recognized by IgMs present as contaminant antibodies in a wide range of commercial antibodies produced in mouse ascites or mouse and rabbit sera.
11. Some contaminant IgM antibodies contained in commercial antibodies haemagglutinate A-type human erythrocytes, but not B and O subtypes.
12. The monoclonal antibodies directed against human A blood group do not recognize the neo-epitope. Hence, the neo-epitope may not be considered equivalent to the A-type human erythrocyte antigen, but an A-like epitope.

13. The contaminant IgM antibodies that recognise the neo-epitope are probably natural antibodies.
14. The presence of the neo-epitope in the granular structures and the IgMs contained in commercial antibodies have produced false-positive stainings, and as a result, they have generated misunderstandings about the physiopathological significance and the nature of the hippocampal granules of aged mice.
15. The hippocampal granules of aged mice do not contain neither  $\beta$ -amyloid peptides nor tau protein.
16. The elucidation of the neo-epitope structure will provide relevant information related to the age-associated degenerative process in the central nervous system.
17. Human brain lesions described in patients of neurodegenerative diseases or aged individuals do not correspond to the clustered pathological granules present in the hippocampus of aged mice.
18. The knowledge of the neo-epitope found in the present study may be useful to look for these structures in diseased human brain.

## VI. BIBLIOGRAFIA



## A

Abeliovich A, Schmitz Y, Fariñas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE, Shinsky N, Verdugo JM, Armanini M, Ryan A, Hynes M, Phillips H, Sulzer D, Rosenthal A. Mice lacking  $\alpha$ -synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 2000; 25: 239-252.

Adluri S, Helling F, Ogata S, Zhang S, Itzkowitz SH, Lloyd KO, Livingston PO. Immunogenicity of synthetic TF-KLH (keyhole limpet hemocyanin) and sTn-KLH conjugates in colorectal carcinoma patients. *Cancer Immunol Immunother* 1995; 41: 185-192.

Aggarwal S, Gupta S. Increased apoptosis of T cell subsets in aging humans: altered expression of Fas (CD95), Fas ligand, Bcl-2, and Bax. *J Immunol* 1998; 160: 1627-1637.

Akiguchi I, Kawamata T. SAMP8 brain: model of accelerated aging and AD. En: Takeda T, Akiguchi I, Higuchi K, Hosokawa M, Hosokawa T, Nomura Y (eds), *The senescence-accelerated mouse (SAM): achievements and future directions*. Elsevier, Amsterdam, 2013, pp. 117-130.

Akiguchi A, Akiyama H, Sugiyama H. Morphological changes of the strain of senescence accelerated mouse (SAMP-8). En: Takeda T, Matsuo T, Akiguchi I, Hosokawa M (eds), *Proceedings of the first SAM Kyoto Symposium*. Fuji Printing Business Company, Kyoto, 1988 pp. 67-76.

Akiyama H, Kameyama M, Akiguchi I, Sugiyama H, Kawamata T, Fukuyama H, Kimura H, Matsushita M, Takeda T. Periodic acid-Schiff (PAS)-positive, granular structures increase in the brain of senescence accelerated mouse (SAM). *Acta Neuropathol* 1986; 72: 124-129.

Aldana Marcos HJ. Técnicas utilizadas para detectar glicoconjugados y glicanos en secciones de parafina. *Histoinforme SAH* 2001; 12: 5-11.

Alim MA, Hossain MS, Arima K, Takeda K, Izumiyama Y, Nakamura M, Kaji H, Shinoda T, Hisanaga S, Ueda K. Tubulin seeds  $\alpha$ -synuclein fibril formation. *J Biol Chem* 2002; 277: 2112-2117.

Alim MA, Ma QL, Takeda K, Aizawa T, Matsubara M, Nakamura M, Asada A, Saito T, Kaji H, Yoshii M, Hisanaga S, Ueda K. Demonstration of a role for  $\alpha$ -synuclein as a functional microtubule-associated protein. *J Alzheimers Dis* 2004; 6: 435-442.

Allinson TM, Parkin ET, Turner AJ, Hooper NM. ADAMs family members as amyloid precursor protein  $\alpha$ -secretases. *J Neurosci Res* 2003; 74: 342-352.

Alonso AD, Grundke-Iqbal I, Barra HS, Iqbal K. Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 298-303.

Alvarez-García O, Vega-Naredo I, Sierra V, Caballero B, Tomás-Zapico C, Camins A, García JJ, Pallàs M, Coto-Montes A. Elevated oxidative stress in the brain of senescence-accelerated mice at 5 months of age. *Biogerontology* 2006; 7: 43-52.

Andrade MA, Bork P. HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat Genet* 1995; 11: 115-116.

Andreadis A. Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1739: 91-103.

Arai H, Lee VM, Otvos L Jr, Greenberg BD, Lowery DE, Sharma SK, Schmidt ML, Trojanowski JQ. Defined neurofilament, tau, and  $\beta$ -amyloid precursor protein epitopes distinguish Alzheimer from non-Alzheimer senile plaques. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2249-2253.

Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, Mann D, Tsuchiya K, Yoshida M, Hashizume Y, Oda T. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 351: 602-611.

Arai T, Ikeda K, Akiyama H, Shikamoto Y, Tsuchiya K, Yagishita S, Beach T, Rogers J, Schwab C, McGeer PL. Distinct isoforms of tau aggregated in neurons and glial cells in brains of patients with Pick's disease, corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol* 2001; 101: 167-173.

Araki T, Sasaki Y, Milbrandt J. Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science* 2004; 305: 1010-1013.

Arend P, Nijssen J. Age-dependent appearance of A-specific ovarian glycolipids and syngeneic "natural" anti-A hemolysin in mice. *Z Immunitätsforsch Immunobiol* 1977; 153: 74-84.

Arend P. "Natural" antibodies and histo-blood groups in biological development with respect to histo-blood group A. A perspective review. *Immunobiology* 2011, 216: 1318-1321.

Arend P. Complementary innate (anti-A-specific) IgM emerging from ontogenic O-GalNAc-transferase depletion: (Innate IgM complementarity residing in ancestral antigen completeness). *Immunobiology* 2014; 219: 285-291.

Arima K, Murayama S, Mukoyama M, Inose T. Immunocytochemical and ultrastructural studies of neuronal and oligodendroglial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. 1. Neuronal cytoplasmic inclusions. *Acta Neuropathol* 1992; 83: 453-460.

Arima K, Ueda K, Sunohara N, Arakawa K, Hirai S, Nakamura M, Tonzuka-Uehara H, Kawai M. NACP/ $\alpha$ -synuclein immunoreactivity in fibrillary components of neuronal and oligodendroglial cytoplasmic inclusions in the pontine nuclei in multiple system atrophy. *Acta Neuropathol* 1998; 96: 439-444.

Arking R. *The biology of aging: observations and principles*. Oxford University Press, Oxford, 2006.

Armstrong DM, LeRoy S, Shields D, Terry RD. Somatostatin-like immunoreactivity within neuritic plaques. *Brain Res* 1985; 338: 71-79.

Armstrong RA, Lantos PL, Cairns NJ. Overlap between neurodegenerative disorders. *Neuropathology* 2005; 25: 111-124.

Armstrong RA, Lantos PL, Cairns NJ. What determines the molecular composition of abnormal protein aggregates in neurodegenerative disease?. *Neuropathology* 2008; 28: 351-365.

Armstrong RA, Smith CUM. Beta-amyloid ( $\beta$ /A4) deposition in the medial temporal lobe in Down's syndrome: effects of brain region and patient age. *Neurobiol of Disease* 1995; 1: 139-144.

Armstrong RA. On the 'classification' of neurodegenerative disorders: discrete entities, overlap or continuum? *Folia Neuropathol* 2012; 50: 201-208.

Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR, Van Hoesen GW. The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cereb Cortex* 1991; 1: 103-116.

Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 1992; 42: 631-639.

Astbury WT, Dickinson S, Bailey K. The X-ray interpretation of denaturation and the structure of the seed globulins. *Biochem J* 1935; 29: 2351-2360.

Atsumi T, Yamamura Y, Sato T, Ikuta F. Hirano bodies in the axon of peripheral nerves in a case with progressive external ophthalmoplegia with multisystemic involvements. *Acta Neuropathol* 1980; 49: 95-100.

Attwell D, Laughlin SB. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21: 1133-1145.

Austad SN. *Why We Age*. Wiley, New York, 1997.

Averback P. Parasynaptic corpora amylacea in the striatum. *Arch Pathol Lab Med* 1981; 105: 334-335.

Avrameas S, Selmi C. Natural autoantibodies in the physiology and pathophysiology of the immune system. *J Autoimmun* 2013, 41: 46-49.

Avrameas S. Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'. *Immunol Today* 1991; 12: 154-159.

Ayala YM, Pantano S, D'Ambrogio A, Buratti E, Brindisi A, Marchetti C, Romano M, Baralle FE. Human, *Drosophila*, and *C.elegans* TDP43: nucleic acid binding properties and splicing regulatory function. *J Mol Biol* 2005; 348: 575-588.

## **B**

Bahar R, Hartmann CH, Rodriguez KA, Denny AD, Busuttill RA, Dolle ME, Calder RB, Chisholm GB, Pollock BH, Klein CA, Vijg J. Increased cell-to-cell variation in gene expression in ageing mouse heart. *Nature* 2006; 441: 1011-1014.

Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* 2008; 319: 916-919.

Ball MJ, Lo P. Granulovacuolar degeneration in the ageing brain and in dementia. *J Neuropathol Exp Neurol* 1977; 36: 474-487.

Ball MJ, Nuttall K. Topography of neurofibrillary tangles and granulovacuoles in hippocampi of patients with Down's syndrome: quantitative comparison with normal ageing and Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1981; 7: 13-20.

Ball MJ, Vis CL. Relationship of granulovacuolar degeneration in hippocampal neurones to aging and to dementia in normal-pressure hydrocephalics. *J Gerontol* 1978; 33: 815-824.

Banks WA, Farr SA, Morley JE, Wolf KM, Geylis V, Steinitz M. Anti-amyloid- $\beta$  protein antibody passage across the blood-brain barrier in the SAMP8 mouse model of Alzheimer's disease: an age-related selective uptake with reversal of learning impairment. *Exp Neurol* 2007; 206: 248-256.



Banks WA, Morley JE, Farr SA, Price TO, Ercal N, Vidaurre I, Schally AV. Effects of a growth hormone-releasing hormone antagonist on telomerase activity, oxidative stress, longevity, and aging in mice. *Proc Nat Acad Sci USA* 2010; 107: 22272–22277.

Barger JL, Kayo T, Vann JM, Arias EB, Wang J, Hacker TA, Wang Y, Raederstorff D, Morrow JD, Leeuwenburgh C, Allison DB, Saupe KW, Cartee GD, Weindruch R, Prolla TA. A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice. *PLoS One* 2008; 3: e2264

Bartke A, Brown-Borg HM, Bode AM, Carlson J, Hunter WS, Bronson RT. Does growth hormone prevent or accelerate aging? *Exp Gerontol* 1998; 33: 675-687.

Barzilai N, Huffman DM, Muzumdar RH, Bartke A. The critical role of metabolic pathways in aging. *Diabetes* 2012; 61: 1315-1322.

Bass TM, Weinkove D, Houthoofd K, Gems D, Partridge L. Effects of resveratrol on lifespan in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev* 2001; 128: 546-552.

Baum L, Masliah E, Iimoto DS, Hansen LA, Halliday WC, Saitoh T. Casein kinase II is associated with neurofibrillary tangles but is not an intrinsic component of paired helical filaments. *Brain Res* 1992; 573: 126-132.

Baumgarth N, Herman OC, Jager GC, Brown L, Herzenberg LA. Innate and acquired humoral immunities to influenza virus are mediated by distinct arms of the immune system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:2250-2255.

Baumgarth N, Tung JW, Herzenberg LA. Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. *Springer Semin Immunopathol* 2005; 26: 347-362.

Baumgarth N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol* 2011; 11:34-46.

Beach TG. Physiologic origins of age-related  $\beta$ -amyloid deposition. *Neurodegener Dis* 2008; 5: 143-145.

Becher MW, Kotzok JA, Sharp AH, Davies SW, Bates GP, Price DL, Ross CA. Intranuclear neuronal inclusions in Huntington's disease and dentatorubral and pallidolusian atrophy: correlation between the density of inclusions and IT15 CAG triplet repeat length. *Neurobiol Dis* 1998; 4: 387-397.

Behl C, Ziegler C. *Cell aging: molecular mechanisms and implications for disease*. Springer, Heidelberg, 2014.

Bell G. *Sex and death in protozoa: the history of an obsession*. Cambridge University Press, Cambridge, 1988.

Ben Hamida M, Belal S, Sirugo G, Ben Hamida C, Panayides K, Ionannou P, Beckmann J, Mandel JL, Hentati F, Koenig M. Friedreich's ataxia phenotype not linked to chromosome 9 and associated with selective autosomal recessive vitamin E deficiency in two inbred Tunisian families. *Neurology* 1993; 43: 2179-2183.

Bennett E, Bence N, Jayakumar R, Kopito R. Global impairment of the ubiquitin-proteasome system by nuclear or cytoplasmic protein aggregates precedes inclusion body formation. *Mol Cell* 2005; 17: 351-365.

Bertolotti A, Lutz Y, Heard DJ, Chambon P, Tora L. hTAF(II)68, a novel RNA/ssDNA-binding protein with homology to the pro-oncoproteins TLS/FUS and EWS is associated with both TFIID and RNA polymerase II. *EMBO J* 1996; 15: 5022-5031.

Bierer LM, Hof PR, Purohit DP, Carlin L, Schmeidler J, Davis KL, Perl DP. Neocortical neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 1995; 52: 81-88.

Binder CJ, Shaw PX, Chang M-K, Boullier A, Hartvigsen K, Hörkkö S, Miller YI, Woelkers DA, Corr M, Witztum JL. The immune system and atherogenesis. The role of natural antibodies in atherogenesis. *J Lipid Res* 2005; 46: 1353-1363.

Bito H, Deisseroth K, Tsien RW. CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca(2+)- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell* 1996; 87: 1203-1214.

Björkstén J. Cross linkage and the aging process. En: Rothstein M (ed), *Theoretical aspects of aging*. Academic Press, New York, 1974, pp. 43-60.

Blackburn EH, Greider CW, Szostak JW. Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nat Med* 2006; 12: 1133-1138.

Blagosklonny MV. Rapamycin-induced glucose intolerance: hunger or starvation diabetes. *Cell Cycle* 2011; 10: 4217-4224.

Blancas-Mejía LM, Ramirez-Alvarado M. Systemic amyloidoses. *Annu Rev Biochem* 2013; 82: 745-774.

Blasco MA. Telomere length, stem cells and aging. *Nat Chem Biol* 2007; 3: 640-649.

Boes M, Schmidt T, Linkemann K, Beaudette BC, Marshak-Rothstein A, Chen J. Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of secreted IgM. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 1184-1189.

Braak E, Braak H, Mandelkow EM. A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol* 1994; 87: 554-567.

Braak H, Braak E. Argyrophilic grain disease: frequency of occurrence in different age categories and neuropathological diagnostic criteria. *J Neural Transm* 1998; 105: 801-819.

Braak H, Braak E. Argyrophilic grains: characteristic pathology of cerebral cortex in cases of adult onset dementia without Alzheimer changes. *Neurosci Lett* 1987; 76: 124-127.

Braak H, Braak E. Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiol Aging* 1997; 18: 351-357.

Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer related changes. *Acta Neuropathol* 1991; 82: 239-259.

Braak H, Braak E. Neuropil threads occur in dendrites of tangle-bearing nerve cells. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1988; 14: 39-44.

Braak H, Sandmann-Keil D, Gai W, Braak E. Extensive axonal Lewy neurites in Parkinson's disease: a novel pathological feature revealed by  $\alpha$ -synuclein immunocytochemistry. *Neurosci Lett* 1999; 265: 67-69.

- Brändlein S, Pohle T, Ruoff N, Wozniak E, Müller-Hermelink HK, Vollmers HP. Natural IgM antibodies and immunosurveillance mechanisms against epithelial cancer cells in humans. *Cancer Res* 2003; 63: 7995-8005.
- Brandmeir NJ, Geser F, Kwong LK, Zimmerman E, Qian J, Lee VM, Trojanowski JQ. Severe subcortical TDP-43 pathology in sporadic frontotemporal lobar degeneration with motor neuron disease. *Acta Neuropathol* 2008; 115: 123-131.
- Bringold F, Serrano M. Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol* 2000; 35: 317-329.
- Brion JP, Couck AM, Bruce M, Anderton B, Flament-Durand J. Synaptophysin and chromogranin A immunoreactivities in senile plaques of Alzheimer's disease. *Brain Res* 1991; 539: 143-150.
- Brion JP. Immunological demonstration of tau protein in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2006; 9: 177-185.
- Brody H. The deposition of aging pigment in the human cerebral cortex. *J Gerontol* 1960; 15: 258-261.
- Brosh RM Jr, Bohr VA. Roles of the Werner syndrome protein in pathways required for maintenance of genome stability. *Exp Gerontol* 2002; 37: 491-506.
- Brown WT. Genetic diseases of premature aging as models of senescence. *Annu Rev Gerontol Geriatr* 1990; 10: 23-42.
- Brown-Borg HM, Borg KE, Meliska CJ, Bartke A. Dwarf mice and the ageing process. *Nature* 1996; 384: 33.
- Brujin LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson KL, Anderson SD, Ohama E, Reaume AG, Scott RW, Cleveland DW. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 1998; 281: 1851-1854.
- Brun A, Gustafson L. Distribution of cerebral degeneration in Alzheimer's disease: a clinico-pathological study. *Arch Psychiatr Nervenkr* 1976; 223: 15-33.
- Brunk UT, Terman A. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur J Biochem* 2002; 269: 1996-2002.
- Buée L, Troquier L, Burnouf S, Belarbi K, Van der Jeugd A, Ahmed T, Fernandez-Gomez F, Caillierez R, Grosjean ME, Begard S, Barbot B, Demeyer D, Obriot H, Brion I, Buée-Scherrer V, Maurage CA, Balschun D, D'hooge R, Hamdane M, Blum D, Sergeant N. From tau phosphorylation to tau aggregation: what about neuronal death? *Biochem Soc Trans* 2010; 38: 967-972.
- Buée-Scherrer V, Buée L, Hof PR, Leveugle B, Gilles C, Loerzel AJ, Perl DP, Delacourte A. Neurofibrillary degeneration in amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex of Guam. Immunochemical characterization of tau proteins. *Am J Pathol* 1995; 146: 924-932.
- Buffenstein R, Edrey YH, Larsen PL. Animal models of aging research: A critical examination. En: Conn MP (ed), *Sourcebook of models for biomedical research*. Springer, New York, 2008, pp 141-156.
- Bugiani O, Giaccone G, Verga L, Pollo B, Frangione B, Farlow MR, Tagliavini F, Ghetti B. Beta APP participates in PrP-amyloid plaques of Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease, Indiana kindred. *J Neuropathol Exp Neurol* 1993; 52: 64-70.

Bullmann T, de Silva R, Holzer M, Mori H, Arendt T. Expression of embryonic tau protein isoforms persist during adult neurogenesis in the hippocampus. *Hippocampus* 2007; 17: 98-102.

Bulteau AL, Lundberg KC, Humphries KM, Sadek HA, Szweda PA, Friguet B, Szweda LI. Oxidative modification and inactivation of the proteasome during coronary occlusion/reperfusion. *J Biol Chem* 2001; 276: 30057-30063.

Buratti E, Brindisi A, Giombi M, Tisminetzky S, Ayala YM, Baralle FE. TDP-43 binds heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B through its C-terminal tail: an important region for the inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator exon 9 splicing. *J Biol Chem* 2005; 280: 37572-37584.

Buratti E, Dörk T, Zuccato E, Pagani F, Romano M, Baralle FE. Nuclear factor TDP-43 and SR proteins promote in vitro and in vivo CFTR exon 9 skipping. *EMBO J* 2001; 20: 1774-1784.

Burtner CR, Kennedy BK. Progeria syndromes and ageing: what is the connection?. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11: 567-578.

Bush AI, Pettingell WH, Multhaup G, Paradis M, Vonsattel JP, Gusella JF, Beyreuther K, Masters CL, Tanzi RE. Rapid induction of Alzheimer A  $\beta$  amyloid formation by zinc. *Science* 1994; 265: 1464-1467.

Butterfield DA, Howard BJ, Yatin S, Allen KL, Carney JM. Free radical oxidation of brain proteins in accelerated senescence and its modulation by N-tert-butyl- $\alpha$ -phenylnitron. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 674-678.

Butterfield DA, Poon HF. The senescence-accelerated prone mouse (SAMP8): a model of age-related cognitive decline with relevance to alterations of the gene expression and protein abnormalities in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 2005; 40: 774-783.

## C

Caballero B, Vega-Naredo I, Sierra V, Huidobro-Fernández C, Soria-Valles C, De Gonzalo-Calvo D, Tolivia D, Gutiérrez-Cuesta J, Pallàs M, Camins A, Rodríguez-Colunga MJ, Coto-Montes A. Favorable effects of a prolonged treatment with melatonin on the level of oxidative damage and neurodegeneration in senescence-accelerated mice. *J Pineal Res* 2008; 45: 302-311.

Cairns NJ, Neumann M, Bigio EH, Holm IE, Troost D, Hatanpaa KJ, Foong C, White CL 3rd, Schneider JA, Kretschmar HA, Carter D, Taylor-Reinwald L, Paulsmeyer K, Strider J, Gitcho M, Goate AM, Morris JC, Mishra M, Kwong LK, Stieber A, Xu Y, Forman MS, Trojanowski JQ, Lee VM, Mackenzie IR. TDP-43 in familial and sporadic frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin inclusions. *Am J Pathol* 2007; 171: 227-240.

Cakatay U, Telci A, Kayali R, Tekeli F, Akcay T, Sivas A. Relation of oxidative protein damage and nitrotyrosine levels in the aging rat brain. *Exp Gerontol* 2001; 36: 221-229.

Calderwood SK, Murshid A, Prince T. The shock of aging: molecular chaperones and the heat shock response in longevity and aging--a mini-review. *Gerontology* 2009; 55: 550-558.

Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 729-740.

- Campisi J. Cellular senescence, cell death, and transgenic mouse models of aging. En: Timiras PS (ed), *Physiological basis of aging and geriatrics*. Informa Healthcare, New York, 2007, pp. 41-54.
- Campisi J. From cells to organisms: can we learn about aging from cells in culture? *Exp Gerontol* 2001; 36: 607-618.
- Campisi J. Replicative senescence: an old lives tale?. *Cell* 1996; 84: 497-500.
- Canudas AM, Gutiérrez-Cuesta J, Rodríguez MI, Acuña-Castroviejo D, Sureda FX, Camins A, Pallàs M. Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau in senescence-accelerated mouse (SAM). *Mech Ageing Dev* 2005; 126: 1300-1304.
- Carey JR, Zou S. Theories of Life Span and Aging. En: Timiras PS (ed), *Physiological basis of aging and geriatrics*. Informa Healthcare, New York, 2007, pp. 55-68.
- Carrell RW, Lomas DA. Conformational disease. *Lancet* 1997; 350: 134-138.
- Casali P, Schettino EW. Structure and function of natural antibodies. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 210: 167-179.
- Cashman NR, Loertscher R, Nalbantoglu J, Shaw I, Kascsak RJ, Bolton DC, Bendheim PE. Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocytes activation. *Cell* 1990; 61: 185-192.
- Castellani RJ, Lee HG, Zhu X, Nunomura A, Perry G, Smith MA. Neuropathology of Alzheimer disease: pathognomonic but not pathogenic. *Acta Neuropathol* 2006; 111: 503-509.
- Castellani RJ, Lee HG, Zhu X, Perry G, Smith MA. Alzheimer's disease pathology as a host response. *Neuropathol Exp Neurol* 2008; 67: 523-531.
- Cattaneo E, Rigamonti D, Goffredo D, Zuccato C, Squitieri F, Sipione S. Loss of normal huntingtin function: new developments in Huntington's disease research. *Trends Neurosci* 2001; 24: 182-188.
- Cattaneo E, Zuccato C, Tartari M. Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 919-930.
- Cavanagh JB. Corpora-amylacea and the family of polyglucosan diseases. *Brain Res Brain Res Rev* 1999; 29: 265-295.
- Chandra S, Fornai F, Kwon HB, Yazdani U, Atasoy D, Liu X, Hammer RE, Battaglia G, German DC, Castillo PE, Südhof TC. Double-knockout mice for  $\alpha$ - and  $\beta$ -synucleins: effect on synaptic functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 14966-14971.
- Charlesworth B, Hughes KA. Age-specific inbreeding depression and components of genetic variance in relation to the evolution of senescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 6140-6145.
- Chen C, Liu Y, Liu Y, Zheng P. mTOR regulation and therapeutic rejuvenation of aging hematopoietic stem cells. *Sci. Signal* 2009; 2: ra75.
- Chen GH, Wang YJ, Wang XM, Zhou JN. Accelerated senescence prone mouse-8 shows early onset of deficits in spatial learning and memory in the radial six-arm water maze. *Physiol Behav* 2004; 82: 883-890.

Chen ZY, Jing D, Bath KG, Ieraci A, Khan T, Siao CJ, Herrera DG, Toth M, Yang C, McEwen BS, Hempstead BL, Lee FS. Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. *Science* 2006; 314: 140-143.

Cheng XR, Zhou WX, Zhang YX. The behavioral, pathological and therapeutic features of the senescence-accelerated mouse prone 8 strain as an Alzheimer's disease animal model. *Ageing Res Rev* 2014, 13: 13-37.

Chiesa R, Harris DA. Prion diseases: what is the neurotoxic molecule?. *Neurobiol Dis* 2001; 8: 743-763.

Chiti F, Dobson CM. Protein misfolding, functional amyloid and human disease. *Annu Rev Biochem* 2004; 75: 333-366.

Citron M. Alzheimer's disease: treatments in discovery and development. *Nat Neurosci* 2002; 5(suppl.): 1055-1057.

Cleveland DW, Rothstein JD. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2: 806-819.

Cobb BA, Kasper DL. Coming of age: carbohydrates and immunity. *Eur J Immunol* 2005; 35: 352-356.

Cochran EJ, Fox JH, Mufson EJ. Severe panencephalic Pick's disease with Alzheimer's disease-like neuropil threads and synaptophysin immunoreactivity. *Acta Neuropathol* 1994; 88: 479-84.

Cohen M, Hurtado-Ziola N, Varki A. ABO blood group glycans modulate sialic acid recognition on erythrocytes. *Blood* 2009; 114: 3668-3676.

Cohen M, Varki A. Modulation of glycan recognition by clustered saccharide patches. *Int Rev Cell Mol Biol* 2014; 308: 75-125.

Colinayo V, Qaio JH, Wang X, Krass KL, Lusic AJ, Drake TA. Genetic loci for diet-induced atherosclerotic lesions and plasma lipids in mice. *Mamm Genome* 2003; 14:464-471.

Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 2007; 130: 223-233.

Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, Allison DB, Cruzen C, Simmons HA, Kemnitz JW, Weindruch R. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 2009; 325: 201-204.

Cookson MR. The biochemistry of Parkinson's disease. *Annu Rev Biochem* 2005; 74: 29-52.

Cooper AA, Gitler AD, Cashikar A, Haynes CM, Hill KJ, Bhullar B, Liu K, Xu K, Strathearn KE, Liu F, Cao S, Caldwell KA, Caldwell GA, Marsischky G, Kolodner RD, Labaer J, Rochet JC, Bonini NM, Lindquist S. Alpha-synuclein blocks ER-golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science* 2006; 313: 324-328.

Corsetti V, Amadoro G, Gentile A, Capsoni S, Ciotti MT, Cencioni MT, Atlante A, Canu N, Rohn TT, Cattaneo A, Calissano P. Identification of a caspase-derived N-terminal tau fragment in cellular and animal Alzheimer's disease models. *Mol Cell Neurosci* 2008; 38: 381-392.

Cosín-Tomás M, Alvarez-López MJ, Sanchez-Roige S, Lalanza JF, Bayod S, Sanfeliu C, Pallàs M, Escorihuela RM, Kaliman P. Epigenetic alterations in hippocampus of SAMP8 senescent mice and modulation by voluntary physical exercise. *Front Aging Neurosci* 2014; 6:51.

Cristofalo VJ, Lorenzini A, Allen RG, Torres C, Tresini M. Replicative senescence: a critical review. *Mech Ageing Dev* 2004; 125: 827-848.

Cristofalo VJ, Pignolo RJ. Replicative senescence of human fibroblast-like cells in culture. *Physiol Rev* 1993; 73: 617-638.

Crook R, Verkkoniemi A, Perez-Tur J, Mehta N, Baker M, Houlden H, Farrer M, Hutton M, Lincoln S, Hardy J, Gwinn K, Somer M, Paetau A, Kalimo H, Ylikoski R, Pöyhönen M, Kucera S, Haltia M. A variant of Alzheimer's disease with spastic paraparesis and unusual plaques due to deletion of exon 9 of presenilin 1. *Nat Med* 1998; 4: 452-455.

Crystal HA, Dickson DW, Sliwinski MJ, Lipton RB, Grober E, Marks-Nelson H, Antis P. Pathological markers associated with normal aging and dementia in the elderly. *Ann Neurol* 1993; 34: 566-573.

Cuanalo-Contreras K, Mukherjee A, Soto C. Role of protein misfolding and proteostasis deficiency in protein misfolding diseases and aging. *Int J Cell Biol* 2013, 2013: 638083.

Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D. Impaired degradation of mutant  $\alpha$ -synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* 2004; 305: 1292-1295.

Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: selectivity pays off. *Trends Endocrinol Metab* 2010; 21: 142-150.

Cutler RG. The dysdifferentiative hypothesis of mammalian aging and longevity. En: Giacobini E (ed), *The Aging brain: cellular and molecular mechanisms of aging in the nervous system*. Raven Press, New York, 1982, pp 1-18.

## D

Dale GE, Probst A, Luthert P, Martin J, Anderton BH, Leigh PN. Relationships between Lewy bodies and pale bodies in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 1992; 83: 525-529.

D'Ambrosio R, Wenzel J, Schwartzkroin PA, McKhann GM, Janigro D. Functional specialization and topographic segregation of hippocampal astrocytes. *J Neurosci* 1998; 18: 4425-4438.

David G, Abbas N, Stevanin G, Dürr A, Yvert G, Cancel G, Weber C, Imbert G, Saudou F, Antoniou E, Drabkin H, Gemmill R, Giunti P, Benomar A, Wood N, Ruberg M, Agid Y, Mandel JL, Brice A. Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. *Nat Genet* 1997; 17: 65-70.

Davidson Y, Kelley T, Mackenzie IR, Pickering-Brown S, Du Plessis D, Neary D, Snowden JS, Mann DM. Ubiquitinated pathological lesions in frontotemporal lobar degeneration contain the TAR DNA-binding protein, TDP-43. *Acta Neuropathol* 2007; 113: 521-533.

Dawson TM, Dawson VL. Rare genetic mutations shed light on the pathogenesis of Parkinson disease. *J Clin Invest* 2003; 111: 145-151.

Dayan AD. Comparative neuropathology of ageing. Studies on the brains of 47 species of vertebrates. *Brain* 1971; 94: 31-42.

de Boer J, Andressoo JO, de Wit J, Huijmans J, Beems RB, van Steeg H, Weeda G, van der Horst GT, van Leeuwen W, Themmen AP, Meradji M, Hoeijmakers JH. Premature aging in mice deficient in DNA repair and transcription. *Science* 2002; 296: 1276-1279.

de Boer J, de Wit J, van Steeg H, Berg RJ, Morreau H, Visser P, Lehmann AR, Duran M, Hoeijmakers JH, Weeda G. A mouse model for the basal transcription/DNA repair syndrome trichothiodystrophy. *Mol Cell* 1998; 1: 981-990.

De Silva R, Lashley T, Gibb G, Hanger D, Hope A, Reid A, Bandopadhyay R, Utton M, Strand C, Jowett T, Khan N, Anderton B, Wood N, Holton J, Revesz T, Lees A. Pathological inclusion bodies in tauopathies contain distinct complements of tau with three or four microtubule-binding repeat domains as demonstrated by new specific monoclonal antibodies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2003; 29: 288-302.

De Strooper B, Simons M, Multhaup G, Van Leuven F, Beyreuther K, Dotti CG. Production of intracellular amyloid-containing fragments in hippocampal neurons expressing human amyloid precursor protein and protection against amyloidogenesis by subtle amino acid substitutions in the rodent sequence. *EMBO J* 1995; 14: 4932-4938.

Déchat T, Pflieger K, Sengupta K, Shimi T, Shumaker DK, Solimando L, Goldman RD. Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes Dev* 2008; 22: 832-853.

Del Valle J. Estudi de la relació existent entre les alteracions de la barrera hematoencefàlica i la  $\beta$ -amiloidosi en el model murí de senescència accelerada i malaltia d'Alzheimer SAMP8. Directors: Dra Carme Pelegrí, Dr. Jordi Vilaplana. Barcelona: Universitat de Barcelona. Departament de Fisiologia, 2010.

Del Valle J, Bayod S, Camins A, Beas-Zárate C, Velázquez-Zamora DA, González-Burgos I, Pallàs M. Dendritic Spine Abnormalities in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons Underlying Memory Deficits in the SAMP8 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 2012; 32: 233-240.

Del Valle J, Duran-Vilaregut J, Manich G, Camins A, Pallàs M, Vilaplana J, Pelegrí C. Time-course of blood-brain barrier disruption in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice. *Int J Dev Neurosci* 2009; 27: 47-52.

Del Valle J, Duran-Vilaregut J, Manich G, Casadesús G, Smith MA, Camins A, Pallàs M, Pelegrí C, Vilaplana J. Early amyloid accumulation in the hippocampus of SAMP8 mice. *J Alzheimers Dis* 2010; 19: 1303-1315.

Del Valle J, Duran-Vilaregut J, Manich G, Pallàs M, Camins A, Vilaplana J, Pelegrí C. Cerebral amyloid angiopathy, blood-brain barrier disruption and amyloid accumulation in SAMP8 mice. *Neurodegener Dis* 2011; 8: 421-429.

Delacourte A, Defossez A. Alzheimer's disease: tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *J Neurol Sci* 1986; 76: 173-86.

Delaere P, He Y, Fayet G, Duyckaerts C, Hauw J.  $\beta$  A4 deposits are constant in the brains of the oldest old: An immunocytochemical study of 20 French Centenarians. *Neurobiol Aging* 1993; 14: 191-194.

Deng CX. Tumorigenesis as a consequence of genetic instability in Brca1 mutant mice. *Mutat Res* 2001; 477: 183-189.

Deretic V. Links between autophagy, innate immunity, inflammation and Crohn's disease. *Dig Dis* 2009; 27: 246-251.



Díaz-Moreno M, Hortigüela R, Gonçalves A, García-Carpio I, Manich G, García-Bermúdez E, Moreno-Estellés M, Eguiluz C, Vilaplana J, Pelegrí C, Vilar M, Mira H. A $\beta$  increases neural stem cell activity in senescence-accelerated SAMP8 mice. *Neurobiol Aging* 2013; 34: 2623-2638.

Dice J. Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* 2007; 3: 295-299.

Dickson DW, Crystal HA, Mattiace LA, Masur DM, Blau AD, Davies P, Yen SH, Aronson MK. Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. *Neurobiol Aging* 1992; 13: 179-189.

Dickson DW, Farlo J, Davies P, Crystal H, Fuld P, Yen SH. Alzheimer's disease: a double-labeling immunohistochemical study of senile plaques. *Am J Pathol* 1988; 132: 86-101.

Dickson DW, Lin W, Liu WK, Yen SH. Multiple system atrophy: a sporadic synucleinopathy. *Brain Pathol* 1999a; 9: 721-732.

Dickson DW, Liu W, Hardy J, Farrer M, Mehta N, Uitti R, Mark M, Zimmerman T, Golbe L, Sage J, Sima A, D'Amato C, Albin R, Gilman S, Yen SH. Widespread alterations of  $\alpha$ -synuclein in multiple system atrophy. *Am J Pathol* 1999b; 155: 1241-1251.

Dickson DW, Liu WK, Kress Y, Ku J, DeJesus O, Yen SH. Phosphorylated tau immunoreactivity of granulovacuolar bodies (GVB) of Alzheimer's disease: localization of two amino terminal tau epitopes in GVB. *Acta Neuropathol* 1993; 85: 463-470.

Dickson DW. Neuropathologic differentiation of progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *J Neurol* 1999; 246 (Suppl 2): II6-15.

Dickson DW. The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56: 321-339.

Díez-Vives C, Gay M, García-Matas S, Comellas F, Carrascal M, Abian J, Ortega-Aznar A, Cristòfol R, Sanfeliu C. Proteomic study of neuron and astrocyte cultures from senescence-accelerated mouse SAMP8 reveals degenerative changes. *J Neurochem* 2009; 111: 945-955.

DiFiglia M, Sapp E, Chase K, Schwarz C, Meloni A, Young C, Martin E, Vonsattel JP, Carraway R, Reeves SA. Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron* 1995; 14: 1075-1081.

Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 9363-9367.

Ding ZT, Wang Y, Jiang YP, Yoshida M, Mimuro M, Inagaki T, Iwase T, Hashizume Y. Argyrophilic grain disease: frequency and neuropathology in centenarians. *Acta Neuropathol* 2006; 111: 320-328.

Dobarro M, Orejana L, Aguirre N, Ramirez MJ. Propranolol restores cognitive deficits and improves amyloid and Tau pathologies in a senescence-accelerated mouse model. *Neuropharmacology* 2013; 64: 137-144.

Doehner J, Genoud C, Imhof C, Krstic D, Knuesel I. Extrusion of misfolded and aggregated proteins - a protective strategy of aging neurons?. *Eur J Neurosci* 2012; 35: 1938-1950.

Doehner J, Madhusudan A, Konietzko U, Fritschy JM, Knuesel I. Colocalization of Reelin and proteolytic A $\beta$ PP fragments in hippocampal plaques in aged wild-type mice. *J Alzheimers Dis* 2010; 19: 1339-1357.

Dragatsis I, Levine MS, Zeitlin S. Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nat Genet* 2000; 26: 300-306.

Dranovsky A, Hen R. Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants. *Biol Psychiatry* 2006; 59: 1136-1143.

Dreyfuss JL, Regatieri CV, Jarrouge TR, Cavalheiro RP, Sampaio LO, Nader HB. Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. *An Acad Bras Cienc* 2009; 81: 409-429.

Drouet B, Pinçon-Raymond M, Chambaz J, Pillot T. Molecular basis of Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57:705-715.

Dubey A, Forster MJ, Lal H, Sohal RS. Effect of age and caloric intake on protein oxidation in different brain regions and on behavioral functions of the mouse. *Arch Biochem Biophys* 1996; 333: 189-197.

Duckett S, Stern J. Origins of the Creutzfeldt and Jakob concept. *J Hist Neurosci* 1999; 8: 21-34.

Duda JE, Giasson BI, Chen Q, et al. Widespread nitration of pathological inclusions in neurodegenerative synucleinopathies. *Am J Pathol* 2000; 157: 1439-1445.

Duda JE, Giasson BI, Mabon ME, et al. Novel antibodies to synuclein show abundant striatal pathology in Lewy body diseases. *Ann Neurol* 2002; 52: 205-210.

Dyrks T, Dyrks E, Masters CL, Beyreuther K. Amyloidogenicity of rodent and human  $\beta$  A4 sequences. *FEBS Lett* 1993; 324: 231-236.

## **E**

Eckman EA, Eckman CB. A $\beta$ -degrading enzymes: modulators of Alzheimer's disease pathogenesis and targets for therapeutic intervention. *Biochem Soc Trans* 2005; 33(Pt 5): 1101-1105.

Edamatsu R, Mori A, Packer L. The spin-trap N-tert- $\alpha$ -phenyl-butyl nitron prolongs the life span of the senescence accelerated mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 211: 847-849.

Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B, Weinberger DR. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 2003; 112: 257-269.

Eikelenboom P, Zhan SS, van Gool WA, Allsop D. Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15: 447-450.

Eisenberg D, Jucker M. The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell* 2012; 148: 1188-1203.

Elkon K, Casali P. Nature and functions of autoantibodies. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008; 4: 491-498.

Epstein CJ, Martin GM, Schultz AL, Motulsky AG. Werner's syndrome a review of its symptomatology, natural history, pathologic features, genetics and relationship to the natural aging process. *Medicine (Baltimore)* 1966; 45: 177-221.

Erraji-Benchekroun L, Underwood MD, Arango V, Galfalvy H, Pavlidis P, Smyrniotopoulos P, Mann JJ, Sibille E. Molecular aging in human prefrontal cortex is selective and continuous throughout adult life. *Biol Psychiatry*. 2005; 57: 549-558.

Esler WP, Wolfe MS. A portrait of Alzheimer secretases - new features and familiar faces. *Science* 2001; 293: 1449-1454.

## E

Falcone M, Yeung B, Tucker L, Rodriguez E, Krahl T, Sarvetnick N. IL-4 triggers autoimmune diabetes by increasing self-antigen presentation within the pancreatic islets. *Clin Immunol* 2001; 98: 190-199.

Farr SA, Banks WA, Uezu K, Sano A, Gaskin FS, Morley JE. Antibody to  $\beta$ -amyloid protein increases acetylcholine in the hippocampus of 12 month SAMP8 male mice. *Life Sci* 2003; 73: 555-562.

Farrer M, Chan P, Chen R, Tan L, Lincoln S, Hernandez D, Forno L, Gwinn-Hardy K, Petrucelli L, Hussey J, Singleton A, Tanner C, Hardy J, Langston JW. Lewy bodies and parkinsonism in families with parkin mutations. *Ann Neurol* 2001; 50: 293-300.

Farrer M, Kachergus J, Forno L, Lincoln S, Wang DS, Hulihan M, Maraganore D, Gwinn-Hardy K, Wszolek Z, Dickson D, Langston JW. Comparison of kindreds with parkinsonism and  $\alpha$ -synuclein genomic multiplications. *Ann Neurol* 2004; 55: 174-179.

Feany MB, Mattiace LA, Dickson DW. Neuropathologic overlap of progressive supranuclear palsy, Pick's disease and corticobasal degeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55: 53-67.

Feine I, Pinkas I, Salomon Y, Scherz A. Local oxidative stress expansion through endothelial cells--a key role for gap junction intercellular communication. *PLoS One* 2012; 7:e41633.

Ferrer I, Gomez-Isla T, Puig B, Freixes M, Ribé E, Dalfo E, Avila J. Current advances on different kinases involved in tau phosphorylation, and implications in Alzheimer's disease and tauopathies. *Curr Alzheimer Res* 2005; 2: 3-18.

Fiesel FC, Voigt A, Weber SS, Van den Haute C, Waldenmaier A, Görner K, Walter M, Anderson ML, Kern JV, Rasse TM, Schmidt T, Springer W, Kirchner R, Bonin M, Neumann M, Baekelandt V, Alunni-Fabbroni M, Schulz JB, Kahle PJ. Knockdown of transactive response DNA-binding protein (TDP-43) downregulates histone deacetylase 6. *EMBO J* 2010; 29: 209-221.

Finch CE, Sapolsky RM. The evolution of Alzheimer disease, the reproductive schedule, and apoE isoforms. *Neurobiol Aging* 1999; 20: 407-428.

Finch CE. *Longevity, senescence and the genome*. Chicago University Press, Chicago, 1990.

Finstad CL, Yin BW, Gordon CM, Federici MG, Welt S, Lloyd KO. Some monoclonal antibody reagents (C219 and JSB-1) to P-glycoprotein contain antibodies to blood group A carbohydrate determinants: a problem of quality control for immunohistochemical analysis. *J Histochem Cytochem* 1991; 39: 1603-1610.

Flood DG, Lin YG, Lang DM, Trusko SP, Hirsch JD, Savage MJ, Scott RW, Howland DS. A transgenic rat model of Alzheimer's disease with extracellular A $\beta$  deposition. *Neurobiol Aging* 2009; 30: 1078-1090.

Flood F, Murphy S, Cowburn RF, Lannfelt L, Walker B, Johnston JA. Proteasome-mediated effects on amyloid precursor protein processing at the gamma-secretase site. *Biochem J* 2005; 385: 545-550.

Flood JF, Farr SA, Uezu K, Morley JE. Age-related changes in septal serotonergic, GABAergic and glutamatergic facilitation of retention in SAMP8 mice. *Mech Ageing Dev* 1998; 105: 173-188.

Flood JF, Morley JE, La Reginna M. Age-related changes in the pharmacological improvement of retention in senescence accelerated mouse (SAM). *Neurobiol Aging* 1993; 14: 159-166.

Flood JF, Morley JE. Age-related changes in footshock avoidance acquisition and retention in senescence accelerated mouse (SAM). *Neurobiol Aging* 1993; 14: 153-157.

Flood JF, Morley JE. Early onset of age-related impairment of aversive and appetitive learning in the SAM-P/8 mouse. *J Gerontol* 1992; 47: B52-B59.

Flood JF, Morley JE. Learning and memory in the SAMP8 mouse. *Neurosci Biobehav Rev* 1998; 22: 1-20.

Fontana L, Partridge L, Longo VD. Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science* 2010; 328: 321-326.

Forno LS, Norville RL. Ultrastructure of Lewy bodies in the stellate ganglion. *Acta Neuropathol* 1976; 34: 183-197.

Forno LS. Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55: 259-272.

Förstl H. Alzheimer's disease: the size of the problem, clinical manifestation and heterogeneity. *J Neural Transm Suppl.* 1998; 54: 1-8.

Forstl H. The Lewy body variant of Alzheimer's disease: clinical, pathophysiological and conceptual issues. *Eur Arch Psych Clin Neurol* 1999; 249: 64-67.

Foukas LC, Bilanges B, Bettedi L, Pearce W, Ali K, Sancho S, Withers DJ, Vanhaesebroeck B. Long-term p110 $\alpha$  PI3K inactivation exerts a beneficial effect on metabolism. *EMBO Mol Med* 2013; 5: 563-571.

Frasier M, Walzer M, McCarthy L, Magnuson D, Lee JM, Haas C, Kahle P, Wolozin B. Tau phosphorylation increases in symptomatic mice overexpressing A30P  $\alpha$ synuclein. *Exp Neurol* 2005; 192: 274-287.

Frautschy SA, Baird A, Cole GM. Effects of injected Alzheimer  $\beta$ -amyloid cores in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 8362-8366.

Freixes M, Puig B, Rodriguez A, Torrejon-Escribon B, Blanco R, Ferrer I. Clusterin solubility and aggregation in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol* 2004; 108: 295-301.

Friedland RP. Epidemiology, education, and the ecology of Alzheimer's disease. *Neurology* 1993; 43: 246-249.

Frolkis VV. *Aging and Life-Prolonging Processes*. Springer-Verlag, Wien, 1982.

Frost B, Diamond MI. Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 2010; 11: 155-159.

Froy O. Circadian rhythms, aging, and life span in mammals. *Physiology (Bethesda)* 2011; 26: 225-235.

Fujibayashi Y, Waki A, Wada K, Ueno M, Magata Y, Yonekura Y, Konishi J, Takeda T, Yokoyama, A. Differential aging pattern of cerebral accumulation of radiolabeled glucose and amino acid in the senescence accelerated mouse (SAM), a new model for the study of memory impairment. *Biol Pharm Bull* 1994; 17: 102-105.

Fujibayashi Y, Yamamoto S, Waki A, Konishi J, Yonekura Y. Increased mitochondrial DNA deletion in the brain of SAMP8, a mouse model for spontaneous oxidative stress brain. *Neurosci Lett* 1998; 254: 109-112.

Fujii R, Okabe S, Urushido T, Inoue K, Yoshimura A, Tachibana T, Nishikawa T, Hicks GG, Takumi T. The RNA binding protein TLS is translocated to dendritic spines by mGluR5 activation and regulates spine morphology. *Curr Biol* 2005; 15: 587-593.

Fujii R, Takumi T. TLS facilitates transport of mRNA encoding an actin-stabilizing protein to dendritic spines. *J Cell Sci* 2005b; 118: 5755-5765.

Fujiwara Y, Takahashi H, Kirai K, Miyamoto M. Involvement of the glutamatergic system in behavioral disorders in senescence-accelerated mice (SAMP8). En: Nomura Y, Takeda T, Okuma Y (eds), *The senescence-accelerated mouse (SAM): an animal model of senescence*. Elsevier, Amsterdam, 2004, pp. 303-308.

Fukunari A, Kato A, Sakai Y, Yoshimoto T, Ishiura S, Suzuki K, Nakajima T. Colocalization of prolyl endopeptidase and amyloid P-peptide in brains of senescence-accelerated mouse. *Neurosci Lett* 1994; 176: 201-204.

Funata N, Maeda Y, Koike M, Yano Y, Kaseda M, Muro T, Okeda R, Iwata M, Yokoji M. Neuronal intranuclear hyaline inclusion disease: report of a case and review of the literature. *Clin Neuropathol* 1990; 9: 89-96.

## G

Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F  $\beta$ -amyloid precursor protein. *Nature* 1995; 373: 523-527.

Gan L, Mucke L. Paths of convergence: sirtuins in aging and neurodegeneration. *Neuron* 2008; 58: 10-14.

Gang B1, Yue C, Han N, Xue H, Li B, Sun L, Li X, Zhao Q. Limited hippocampal neurogenesis in SAMP8 mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Research* 2011; 1389: 183-193.

García-Matas S1, Gutiérrez-Cuesta J, Coto-Montes A, Rubio-Acero R, Díez-Vives C, Camins A, Pallàs M, Sanfeliu C, Cristòfol R. Dysfunction of astrocytes in senescence-accelerated mice SAMP8 reduces their neuroprotective capacity. *Aging Cell* 2008; 7: 630-640.

Garen PD, Powers JM, Young GF, Lee V. Neuronal intranuclear hyaline inclusion disease in a nine year old. *Acta Neuropathol* 1986; 70: 327-332.

Gearing M, Mori H, Mirra SS. A $\beta$ -peptide length and apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1996; 39: 395-399.

Gerhard A, Pavese N, Hotton G, Turkheimer F, Es M, Hammers A, Eggert K, Oertel W, Banati RB, Brooks DJ. In vivo imaging of microglial activation with 11C(R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2006; 21: 404-412.

Giasson BI, Forman MS, Higuchi M, Golbe LI, Graves CL, Kotzbauer PT, Trojanowski JQ, Lee VM. Initiation and synergistic fibrillization of tau and  $\alpha$ -synuclein. *Science* 2003; 300: 636-640.

Giasson BI, Murray IV, Trojanowski JQ, Lee VM. A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of  $\alpha$ -synuclein is essential for filament assembly. *J Biol Chem* 2001; 276: 2380-2386.

Giaume C, Koulakoff A, Roux L, Holcman D, Rouach N. Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat Rev Neurosci* 2010; 11: 87-99.

Giaume C, McCarthy KD. Control of gap junctional communication in astrocytic networks. *Trends Neurosci* 1996; 8: 319-325.

Gibson PH, Tomlinson BE. Numbers of Hirano bodies in the hippocampus of normal and demented people with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 1977; 33: 199-206.

Gkogkolou P, Böhm M. Advanced glycation end products: key players in skin aging?. *Dermatoendocrinol* 2012; 4: 259-270.

Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 122: 1131-1135.

Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 1989; 3: 519-526.

Goldberg AL. Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: 12-17.

Golde TE, Younkin SG. Presenilins as therapeutic targets for the treatment of Alzheimer's disease. *Trends Mol Med* 2001; 7: 264-269.

Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 2006; 114: 597-605.

Gooi HC, Feizi T. Natural antibodies as contaminants of hybridoma products. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 106: 539-545.

Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Oncogene-induced senescence: the bright and dark side of the response. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22: 816-827.

Goto M. Hierarchical deterioration of body systems in Werner's syndrome: implications for normal ageing. *Mech Ageing Dev* 1997; 98: 239-254.

Gouras GK, Almeida CG, Takahashi RH. Intraneuronal A $\beta$  accumulation and origin of plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2005; 26: 1235-1244.

Gourfinkel-An I, Cancel G, Trottier Y, Devys D, Tora L, Lutz Y, Imbert G, Saudou F, Stevanin G, Agid Y, Brice A, Mandel JL, Hirsch EC. Differential distribution of the normal and mutated forms of huntingtin in the human brain. *Ann Neurol* 1997; 42: 712-719.

Gowing E, Roher AE, Woods AS, Cotter RJ, Chaney M, Little SP, Ball MJ. Chemical characterization of A $\beta$  17-42 peptide, a component of diffuse amyloid deposits of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 1994; 269: 10987-10990.

Grabar P. Some considerations of the problem of auto-antibody formation. *Tex Rep Biol Med* 1965; 23(Suppl 1): 278e84.

Graeber MB, Kosel S, Egensperger R, Banati RB, Muller U, Bise K, Hoff P, Moller HJ, Fujisawa K, Mehraein P. Rediscovery of the case described by Alois Alzheimer in 1911: historical, histological and molecular genetic analysis. *Neurogenetics* 1997; 1: 73-80.

Grönwall C, Silverman GJ. Natural IgM: Beneficial autoantibodies for the control of inflammatory and autoimmune disease. *J Clin Immunol* 2014; 34: 12-21.

Gronwall C, Chen Y, Vas J, Khanna S, Thiel S, Corr M, Kono DH, Silverman GJ. MAPK phosphatase-1 is required for regulatory natural autoantibody-mediated inhibition of TLR responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: 19745-19750.

Grönwall C, Vas J, Silverman GJ. Protective Roles of Natural IgM Antibodies. *Front Immunol* 2012; 3: 66.

Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau ( $\tau$ ) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 4913-4917.

Guarente L, Kenyon C. Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature* 2000; 408: 255-262.

Guo SJ, Qi CH, Zhou WX, Zhang YX, Zhang XM, Wang J, Wang HX. Proteomic data show an increase in autoantibodies and  $\alpha$ -fetoprotein and a decrease in apolipoprotein A-II with time in sera from senescence-accelerated mice. *Braz J Med Biol Res* 2013; 46: 417-425.

Gutekunst CA, Li SH, Yi H, Mulroy JS, Kuemmerle S, Jones R, Rye D, Ferrante RJ, Hersch SM, Li XJ. Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology. *J Neurosci* 1999; 19: 2522-2534.

Gutiérrez-Cuesta J, Sureda FX, Romeu M, Canudas AM, Caballero B, Coto-Montes A, Camins A, Pallàs M. Chronic administration of melatonin reduces cerebral injury biomarkers in SAMP8. *J Pineal Res* 2007; 42: 394-402.

Gwinn-Hardy K, Mehta ND, Farrer M, Maraganore D, Muentner M, Yen SH, Hardy J, Dickson DW. Distinctive neuropathology revealed by  $\alpha$ -synuclein antibodies in hereditary Parkinsonism and dementia linked to chromosome 4p. *Acta Neuropathol* 2000; 99: 663-672.

## H

Hainfellner JA, Wanschitz J, Jellinger K, Liberski PP, Gullotta F, Budka H. Coexistence of Alzheimer-type neuropathology in Cruetzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol* 1998; 96: 116-122.

Hall DA. Chemical and biochemical changes in aging connective tissues. *The aging of connective tissue*. : Academic Press, New York, 1976.

Haltia M, Somer H, Palo J, Karli H. Neuronal intranuclear inclusion disease in identical twins. *Ann Neurol* 1984; 15: 316-321.

Hamamoto H, Honma A, Irino M, Matsushita T, Toda K, Matsumura M, Takeda T. Grading score system: A method for evaluation of the degree of senescence in senescence accelerated mouse (SAM). *Mech Ageing Dev* 1984; 26: 91-102.

Hanger DP, Wray S. Tau cleavage and tau aggregation in neurodegenerative disease. *Biochem Soc Trans* 2010; 38: 1016-1020.

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

Harjes P, Wanker EE. The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. *Trends Biol Sci* 2003; 28: 425-433.

Harries LW, Hernandez D, Henley W, Wood AR, Holly AC, Bradley-Smith RM, Yaghootkar H, Dutta A, Murray A, Frayling TM, Guralnik JM, Bandinelli S, Singleton A, Ferrucci L, Melzer D. Human aging is characterized by focused changes in gene expression and deregulation of alternative splicing. *Aging Cell* 2011; 10: 868-878.

Harris DA, Peters PJ, Taraboulos V, Lingappa V, Dearmond SJ, Prusiner SB. Cell Biology of Prions. In: Prusiner SB ed. *Prion biology and diseases*, 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004: 483-544.

Harris J. Essays on science and society: intimations of immortality. *Science* 2000; 288: 59.

Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, Nadon NL, Wilkinson JE, Frenkel K, Carter CS, Pahor M, Javors MA, Fernandez E, Miller RA. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* 2009; 460: 392-395.

Hashimoto M, Masliah E. Alpha-synuclein in Lewy body disease and Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 1999; 9: 707-720.

Hasty P, Vijg J. Accelerating aging by mouse reverse genetics: a rational approach to understanding longevity. *Aging Cell*. 2004; 3: 55-65.

Hasty P. The impact energy metabolism and genome maintenance have on longevity and senescence: lessons from yeast to mammals. *Mech Ageing Dev* 2001; 122: 1651-1662.

Hatanpaa KJ, Bigio EH, Cairns NJ, Womack KB, Weintraub S, Morris JC, Foong C, Xiao G, Hladik C, Mantanona TY, White CL 3rd. TAR DNA-binding protein 43 immunohistochemistry reveals extensive neuritic pathology in FTL-DU: a Midwest-Southwest Consortium for FTL-DU Study. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008; 67: 271-279.

Hawse JR, Hejtmancik JF, Horwitz J, Kantorow M. Identification and functional clustering of global gene expression differences between age-related cataract and clear human lenses and aged human lenses. *Exp Eye Res* 2004; 79: 935-940.

Hayflick L, Moorhead PS. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1965; 37: 614-636.

He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 2009; 43: 67-93.

Henning KA, Li L, Iyer N, McDaniel LD, Reagan MS, Legerski R, Schultz RA, Stefanini M, Lehmann AR, Mayne LV, Friedberg EC. The Cockayne syndrome group A gene encodes a WD repeat protein that interacts with CSB protein and a subunit of RNA polymerase II TFIIF. *Cell* 1995; 82: 555-564.

Herholz K, Salmon E, Perani D, Baron JC, Holthoff V, Frölich L, Schönknecht P, Ito K, Mielke R, Kalbe E, Zündorf G, Delbeuck X, Pelati O, Anchisi D, Fazio F, Kerrouche N, Desgranges B, Eustache F, Beuthien-



Baumann B, Menzel C, Schröder J, Kato T, Arahata Y, Henze M, Heiss WD. Discrimination between Alzheimer's dementia and controls by automated analysis of multicenter FDG PET. *Neuroimage* 2002; 17: 302-316.

Herms J, Tings T, Gall S, Madlung A, Giese A, Siebert H, Schürmann P, Windl O, Brose N, Kretzschmar H. Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J Neurosci* 1999; 19: 8866-8875.

Hill WD, Lee VM, Hurtig HI, Murray JM, Trojanowski JQ.. Epitopes located in spatially separate domains of each neurofilament subunit are present in Parkinson's disease Lewy bodies. *J Comp Neurol* 1991; 309: 150-160.

Hirano A, Tuazon R, Zimmerman HM. Neurofibrillary changes, granulovacuolar bodies and argentophilic globules observed in tuberous sclerosis. *Acta Neuropathol* 1968; 11: 257-261.

Hirano A, Zimmerman HM. Alzheimer's neurofibrillary changes: a topographic study. *Arch Neurol* 1962; 7: 227-242.

Hirano A. Hirano bodies and related neuronal inclusions. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1994; 20: 3-11.

Ho GJ, Drego R, Hakimian E, Masliah E. Mechanisms of cell signaling and inflammation in Alzheimer's Disease. *Curr Targets Inflamm Allergy* 2005; 4: 247-256.

Hock Jr BJ, Lamb B. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Trends Genet* 2001; 17: S7-12.

Hof PR, Bouras C, Buee L, Delacourte A, Perl DP, Morrison JH. Differential distribution of neurofibrillary tangles in the cerebral cortex of dementia pugilistica and Alzheimer's disease cases. *Acta Neuropathol* 1992; 85: 23-30.

Holodick NE, Tumang JR, Rothstein TL. Immunoglobulin secretion by B1 cells: differential intensity and IRF4-dependence of spontaneous IgM secretion by peritoneal and splenic B1 cells. *Eur J Immunol* 2010; 40: 3007-3016.

Hornsby PJ. Cellular senescence and tissue aging in vivo. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2002; 57: B251-256.

Hosokawa M, Kasai R, Higuchi K, Takeshita S, Shimizu K, Hamamoto H, Matsumura A. Grading score system: a method for evaluation of the degree of senescence in senescence accelerated mouse (SAM). *Mechanisms of Ageing and Development* 1984; 26: 91-102.

Hosokawa M, Ueno M. Aging of blood-brain barrier and neuronal cells of eye and ear in SAM mice. *Neurobiol Aging* 1999; 20: 117-123.

Hoyer S. Age-related changes in cerebral oxidative metabolism. Implications for drug therapy. *Drugs Aging* 1995; 6: 210-218.

Hsieh TC, Lin WY, Ding HJ, Sun SS, Wu YC, Yen KY, Kao CH. Sex- and age-related differences in brain FDG metabolism of healthy adults: an SPM analysis. *J Neuroimaging* 2012; 22: 21-27.

Hsu HC, Zhou T, Shi J, Yang PA, Liu D, Zhang HG, Bluethmann H, Mountz JD. Aged mice exhibit in vivo defective peripheral clonal deletion of D(b)/H-Y reactive CD8(+) T cells. *Mech Ageing Dev* 2001; 122: 305-326.

Huang HC, Jiang ZF. Accumulated amyloid- $\beta$  peptide and hyperphosphorylated tau protein: relationship and links in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2009; 16: 15-27.

Hyman BT, Trojanowski JQ. Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer disease from the National Institute on Aging and the Reagan Institute Working Group on diagnostic criteria for the neuropathological assessment of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56: 1095-1097.

## I

Ikeda K, Haga C, Kosaka K, Oyanagi S. Senile plaque-like structures: observation of a probably unknown type of senile plaque by periodic-acid methenamine silver (PAM) electron microscopy. *Acta Neuropathol* 1989; 78: 137-142.

Ikeda S, Yanagisawa N, Allsop D, Glenner GG. Early senile plaques in Alzheimer's disease demonstrated by histochemistry, immunocytochemistry, and electron microscopy. *Hum Pathol* 1990; 21: 1221- 1226.

Ikegami S, Shumiya S, Kawamura H. Age-related changes in radial-arm maze learning and basal forebrain cholinergic systems in senescence accelerated mice (SAM). *Behav Brain Res* 1992; 51: 15-22.

Ikura Y, Kudo T, Tanaka T, Tani H, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Takeda M. Levels of tau phosphorylation at different sites in Alzheimer disease brain. *Neuroreport* 1998; 9: 2375-2379.

Impey S, Mark M, Villacres EC, Poser S, Chavkin C, Storm DR. Induction of CRE-mediated gene expression by stimuli that generate long-lasting LTP in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 1996; 16:973-982.

Ince P, Xuereb J, Mackenzie IR, Rossi M, Lowe J, Morris HJ, Matthews F, Brayne C, Esiri MM. Neuropathology of a community sample of elderly demented and non-demented people. *Brain Pathology* 2000; 10: 592-593.

Ince PG, Clark B, Holton J, Revesz T, Wharton SB. Diseases of movement and system degenerations. En: Love S, Louis DN, Ellison DW (eds), *Greenfield's Neuropathology*. Edward Arnold Publishers, London 2008, pp. 889-1030.

Ingram DK, Kuo H, Hengemihle A, Shimada A, Tian M, Jucker. Motor and memory performance of SAMP8, R1 and C57BL/6 mice: Assessing the relationship to PAS-positive granules in brain. En: Takeda, T (ed), *International Congress Series, The Sam Model of Senescence*. Elsevier, Amsterdam, 1994, pp. 73-82.

Ionov ID, Pushinskaya II. Amyloid- $\beta$  production in aged guinea pigs: atropine-induced enhancement is reversed by naloxone. *Neurosci Lett* 2010; 480: 83-86.

Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, Khatoon S, Li B, Liu F, Rahman A, Tanimukai H, Grundke-Iqbal I. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1739:198-210.

Iqbal K, Liu F, Gong CX, Alonso Adel C, Grundke-Iqbal I. Mechanisms of tau induced neurodegeneration. *Acta Neuropathol* 2009; 118: 53-69.

Irino M, Akiguchi I, Takeda T. Ultrastructural study of PAS-positive granular structures in brains of SAMP8. En: Takeda, T (ed) *International Congress Series; The Sam Model Of Senescence*. Elsevier, Amsterdam, 1994, pp. 371-374.

Ironside JW, Ghetti B, Head MW, Piccardo P, Wil RG. Prion diseases. En: Love S, Louis DN, Ellison DW (eds), *Greenfield's Neuropathology*. Edward Arnold Publishers, London, 2008, pp. 1197-1389.

Ishimaru N, Yoneda T, Saegusa K, Yanagi K, Haneji N, Moriyama K, Saito I, Hayashi Y. Severe destructive autoimmune lesions with aging in murine Sjögren's syndrome through Fas-mediated apoptosis. *Am J Pathol*. 2000; 156: 1557-1564.

Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Watanabe K, Sekiguchi M, Hosoki E, Kawashima-Morishima M, Lee HJ, Hama E, Sekine-Aizawa Y, Saido TC. Identification of the major A $\beta$  1–42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat Med* 2000; 6: 143-150.

Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y. Visualization of A $\beta$  42 and A $\beta$  40 in senile plaques with end-specific A $\beta$  monoclonals: evidence that an initially deposited species is A $\beta$  42. *Neuron* 1994; 13: 45-53.

## **J**

Jahngen JH, Lipman RD, Eisenhauer DA, Jahngen EG Jr., Taylor A. Aging and cellular maturation cause changes in ubiquitin-eye lens protein conjugates. *Arch Biochem Biophys* 1990; 276: 32-37.

Jakes R, Novak M, Davison M, Wischik CM. Identification of 3- and 4-repeat tau isoforms within the PHF in Alzheimer's disease. *EMBO J* 1991; 10: 2725-2729.

Janknecht R. EWS-ETS oncoproteins: the linchpins of Ewing tumors. *Gene* 2005; 363: 1-14.

Jankowsky JL, Younkin LH, Gonzales V, Fadale DJ, Slunt HH, Lester HA, Younkin SG, Borchelt, DR. Rodent A- $\beta$  modulates the solubility and distribution of amyloid deposits in transgenic mice. *J Biol Chem* 2007; 282: 22707-22720.

Jarrett JT, Lansbury PT Jr. Seeding one-dimensional crystallization of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 1993; 73: 1055-1058.

Jeck WR, Siebold AP, Sharpless NE. Review: a meta-analysis of GWAS and age-associated diseases. *Aging Cell* 2012; 11: 727-731.

Jellingher KA. Recent advances in our understanding of neurodegeneration. *J Neural Transm* 2009; 116: 1111-1162.

Jenner P. Mitochondria, monoamine oxidase B and Parkinson's disease. *Basal Ganglia* 2012 2: 4, S3-S7.

Jeong BH, Jin JK, Choi EK, Lee EY, Meeker HC, Kozak CA, Carp RI, Kim YS. Analysis of the expression of endogenous murine leukemia viruses in the brains of senescence-accelerated mice (SAMP8) and the relationship between expression and brain histopathology. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002; 61: 1001-1012.

Jicha GA, Petersen RC, Knopman DS, Boeve BF, Smith GE, Geda YE, Johnson KA, Cha R, Delucia MW, Braak H, Dickson DW, Parisi JE. Argyrophilic grain disease in demented subjects presenting initially with amnesic mild cognitive impairment. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006; 65: 602-609.

Johnson GV, Jope RS, Binder LI. Proteolysis of tau by calpain. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 163: 1505-1511.

Jonsson T, Stefansson H, Steinberg S, Jonsdottir I, Jonsson PV, Snaedal J, Bjornsson S, Huttenlocher J, Levey AI, Lah JJ, Rujescu D, Hampel H, Giegling I, Andreassen OA, Engedal K, Ulstein I, Djurovic S, Ibrahim-Verbaas C, Hofman A, Ikram MA, van Duijn CM, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K. Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2013; 368:107-116.

Jucker M, Walker L, Martin L, Kitt C, Kleinman H, Ingram DK, Price D. Age-associated inclusions in normal and transgenic mouse brain. *Science* 1992; 255: 1445-1446.

Jucker M, Walker LC, Kuo H, Tian M, Ingram DK. Age-related fibrillar deposits in brains of C57BL/6 mice. A review of localization, staining characteristics, and strain specificity. *Mol Neurobiol.* 1994b; 9:125-133.

Jucker M, Walker LC, Schwarb P, Hengemihle J, Kuo H, Snow AD, Bamert F, Ingram DK. Age-related deposition of glia-associated fibrillar material in brains of C57BL/6 mice. *Neuroscience* 1994a; 60: 875-889.

Jucker M, Walker LC. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* 2013; 501; 45-51.

## **K**

Kabat, EA. *Einführung in die Immunchemie und Immunologie*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1971.

Kalback W, Watson MD, Kokjohn TA, Kuo YM, Weiss N, Luehrs DC, Lopez J, Brune D, Sisodia SS, Staufenbiel M, Emmerling M, Roher AE. APP transgenic mice Tg2576 accumulate A $\beta$  peptides that are distinct from the chemically modified and insoluble peptides deposited in Alzheimer's disease senile plaques. *Biochemistry* 2002; 41: 922-928.

Kalpouzos G, Chételat G, Baron J-C, Landeau B, Mevel K, Godeau C, Barré L, Constans J-M, Viader F, Eustache F, Desgranges B. Voxel-based mapping of brain gray matter volume and glucose metabolism profiles in normal aging. *Neurobiol Aging.* 2009; 112-124.

Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell surface receptor. *Nature* 1987; 325: 733-736.

Kanungo MS. A model for ageing. *J Theor Biol* 1975; 53: 253-261.

Kato S, Nakamura H. Cytoplasmic argyrophilic inclusions in neurons of pontine nuclei in patients with olivopontocerebellar atrophy: immunohistochemical and ultrastructural studies. *Acta Neuropathol* 1990; 79: 584-594.

Kawaguchi S, Kishikawa M, Sakae M, Nakane Y. Age-related changes in basal dendrite and dendritic spine of hippocampal pyramidal neurons (CA1) among SAMP1TA/Ngs--quantitative analysis by the rapid Golgi method. *Mech Ageing Dev* 1995; 31; 83: 11-20.

Kawamata T, Akiguchi I, Maeda K, Tanaka C, Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T. Age-related changes in the brains of senescence-accelerated mice (SAM): association with glial and endothelial reactions. *Microsc Res Tech* 1998; 43: 59-67.

Kawamata T, Akiguchi I, Yagi H, Irino M, Sugiyama H, Akiyama H, Shimada A, Takemura M, Ueno M, Kitabayashi T, Ohnishi K, Seriu N, Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T. Neuropathological studies on strains of senescence accelerated mice (SAM) with age-related deficits in learning and memory. *Exp Gerontol* 1997; 32: 161-170.

Kawamata T, Akiguchi I, Yagi H, Irino M, Sugiyama H, Akiyama H, Shimada A, Takemura M, Ueno M, Kitabayashi T, Ohnishi K, Seriu N, Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T. Neuropathological studies on strains of senescence-accelerated mice (SAM) with age-related deficits in learning and memory. *Experimental Gerontology* 1997; 32: 161-169.

Kawamata T, Nakamura S, Akiguchi I, Tooyama I, Seriu N, Takemura M, Kimura J, Kimura H, McGeer EG, McGeer PL, Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T. Dystrophic changes in axons accumulating nitric oxide synthase are accelerated with age in dorsal column nuclei of senescence-accelerated mice (SAMP8). In: Takeda T (ed), *The SAM Model of Senescence*. Elsevier Science, Amsterdam, 1994, pp. 347-350.

Kawamata T, Nakamura S, Akiguchi I, Kimura J, Kameyama M, Kimura H, Takeda, T. Effect of aging on NADPH-diaphorase neurons in laterodorsal tegmental nucleus and striatum of mice. *Neurobiol Aging* 1990; 11: 185-192.

Kay M. Immunoregulation of cellular life span. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1057: 85-111.

Kay M. Isolation of the phagocytosis inducing IgG-binding antigen on senescent somatic cells. *Nature* 1981; 289: 491-494.

Kay MMB, Cover C, Schluter S, Bernstein RM, Marchalonis JJ. Band 3, the anion transporter, is conserved during evolution: implications for aging and vertebrate evolution. *Cell Mol Biol* 1995; 41: 883-892.

Kay MMB. Physiologic autoantibody and immunoglobulin interventions during aging. *Curr Aging Sci* 2013; 6: 56-62.

Keller JN, Dimayuga E, Chen Q, Thorpe J, Gee J, Ding Q. Autophagy, proteasomes, lipofuscin, and oxidative stress in the aging brain. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 2376-2391.

Kellokumpu S, Neff L, Jamsa-Kellokumpu S, Kopito R, Baron R. A 115-kD polypeptide immunologically related to erythrocyte band 3 is present in Golgi membranes. *Science* 1988; 242: 1308-1311.

Kennedy L, Evans E, Chen CM, Craven L, Detloff PJ, Ennis M, Shelbourne PF.. Dramatic tissue-specific mutation length increases are an early molecular event in Huntington disease pathogenesis. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 3359-3367.

Kenyon CJ. The genetics of ageing. *Nature*. 2010; 464: 504-512.

Kern DS, Maclean KN, Jiang H, Synder EY, Sladek JR, Bjugstad KB. Neural stem cells reduce hippocampal tau and reelin accumulation in aged Ts65Dn Down syndrome mice. *Cell Transplantation* 2011; 20: 371-379.

Kidd M. Alzheimer's disease: an electron microscopic study. *Brain* 1964; 87: 307-320.

Kim DW, Choi JH. Effects of age and dietary restriction on animal model SAMP8 mice with learning and memory impairments. *J Nutr Health Aging* 2000; 4: 233-238.

- Kim YJ, Ichise M, Ballinger JR, Vines D, Erami SS, Tatschida T, Lang AE. Combination of dopamine transporter and D2 receptor SPECT in the diagnostic evaluation of PD, MSA and PSP. *Mov Disord* 2002; 17: 303-312.
- Kirkwood TB, Austad SN. Why do we age? *Nature* 2000; 408:233-238.
- Kitamura Y, Zhao XH, Ohnuki T, Nomura Y. Ligand-binding characteristics of [3H]QNB, [3H]prazosin, [3H]rauwolscine, [3H]TCP and [3H]nitrendipine to cerebral cortical and hippocampal membranes of senescence accelerated mouse. *Neurosci Lett* 1989; 106: 334-338.
- Kitamura Y, Zhao XH, Ohnuki T, Takei M, Nomura Y. Age-related changes in transmitter glutamate and NMDA receptor/channels in the brain of senescence-accelerated mouse. *Neurosci Lett* 1992; 137: 169-172.
- Klebanov S, Astle CM, Roderick TH, Flurkey K, Archer JR, Chen J, Harrison DE. Maximum life spans in mice are extended by wild strain alleles. *Exp Biol Med* 2001; 226: 854-859.
- Kliman HJ, Feinberg RF, Schwartz LB, Feinman M, Lavi E, Meaddough EL. A mucin-like glycoprotein identified by MAG (Mouse Ascites Golgi) antibodies. Menstrual cycle-dependent localization in human endometrium. *Am J Pathol* 1995; 146: 166-181.
- Knowles TP, Buehler MJ. Nanomechanics of functional and pathological amyloid materials. *Nature Nanotechnol* 2011; 6: 469-479.
- Knuesel I, Nyffeler M, Mormède C, Muhia M, Meyer U, Pietropaolo S, Yee BK, Pryce CR, LaFerla FM, Marighetto A, Feldon J. Age-related accumulation of Reelin in amyloid-like deposits. *Neurobiol Aging* 2009; 30: 697-716.
- Kocherhans S, Madhusudan A, Doehner J, Breu KS, Nitsch RM, Fritschy J-M, Knuesel I. Reduced Reelin expression accelerates amyloid- $\beta$  plaque formation and tau pathology in transgenic Alzheimer's disease mice. *J Neurosci* 2010; 30: 9228-9240.
- Koga H, Kaushik S, Cuervo AM. Protein homeostasis and aging: The importance of exquisite quality control. *Ageing Res Rev* 2011; 10: 205-215.
- Kohn RR. Aging of animals: possible mechanisms. In: Kohn RR (ed), *Principles of mammalian aging*. Prentice-Hall, New Jersey, 1978.
- Kojro E, Fahrenholz F. The non-amyloidogenic pathway: structure and function of  $\alpha$ -secretases. *Subcell Biochem* 2005; 38: 105-127.
- Komatsu T, Chiba T, Yamaza H, Yamashita K, Shimada A, Hoshiyama Y, ... Shimokawa I. Manipulation of caloric content but not diet composition, attenuates the deficit in learning and memory of senescence-accelerated mouse strain P8. *Exp Gerontol* 2008; 43: 339-346.
- Kondziella D, Bidar A, Urfjell B, Sletvold O, Sonnewald U. The pentylentetrazole-kindling model of epilepsy in SAMP8 mice: behaviour and metabolism. *Neurochem Int* 2002; 40: 413-418.
- Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ. Microtubule-associated protein tau is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 4044-4048.
- Kosik KS, Orecchio LD, Binder L, Trojanowski JQ, Lee VM, Lee G. Epitopes that span the tau molecule are shared with paired helical filaments. *Neuron* 1988; 1: 817-825.

Kotzbauer PT, Giasson BI, Kravitz AV, Golbe LI, Mark MH, Trojanowski JQ, Lee VM. Fibrillization of  $\alpha$ -synuclein and tau in familial Parkinson's disease caused by the A53T  $\alpha$ -synuclein mutation. *Exp Neurol* 2004; 187: 279-288.

Krass KL, Colinayo V, Ghazalpour A, Vinters HV, Lusk AJ, Drake T. Genetic loci contributing to age-related hippocampal lesions in mice. *Neurobiol Dis* 2003; 13: 102-108.

Krass KL, Colinayo V, Ghazalpour A, Vinters HV, Lusk AJ, Drake TA. Genetic loci contributing to age-related hippocampal lesions in mice. *Neurobiol Disease* 2003; 13: 102-108.

Ksiazak-Reding H, Morgan K, Mattiace LA, Davies P, Liu WK, Yen SH, Weidenheim K, Dickson DW. Ultrastructure and biochemical composition of paired helical filaments in corticobasal degeneration. *Am J Pathol* 1994; 145: 1496-1508.

Kuemmerle S, Gutekunst CA, Klein AM, Li XJ, Li SH, Beal MF, Hersch SM, Ferrante RJ. Huntington aggregates may not predict neuronal death in Huntington's disease. *Ann Neurol* 1999; 46: 842-849.

Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev.* 2010; 24: 2463-2479.

Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhashi T, Mizushima N. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 2004; 432: 1032-1036.

Kumar VB, Farr SA, Flood JF, Kamlesh V, Franko M, Banks WA, Morley JE. Site-directed antisense oligonucleotide decreases the expression of amyloid precursor protein and reverses deficits in learning and memory in aged SAMP8 mice. *Peptides* 2000; 21: 1769-1775.

Kumar VB, Franko MW, Farr SA, Armbrecht HJ, Morley JE. Identification of age-dependent changes in expression of senescence-accelerated mouse (SAMP8) hippocampal proteins by expression array analysis. *Biochem Biophys Res Comm* 2000; 272: 657-661.

Kumar VB, Vyas K, Franko M, Choudhary V, Buddhiraju C, Alvarez J, Morley JE. Molecular cloning, expression, and regulation of hippocampal amyloid precursor protein of senescence accelerated mouse (SAMP8). *Biochem Cell Biol*, 2001; 79: 57-67.

Kuo H, Ingram DK, Walker LC, Tian M, Hengemihle JM, Jucker M. Similarities in the age-related hippocampal deposition of periodic acid-Schiff- Positive granules in the senescence-accelerated mouse P8 and C57BL/6 mouse strains. *Neurosci* 1996; 74: 733-740.

Kuo YM, Kokjohn TA, Beach TG, Sue LI, Brune D, Lopez JC, Kalback WM, Abramowski D, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Roher AE. *J Biol Chem* 2001; 276: 12991-12998.

Kurt MA, Davies DC, Kidd M. Beta-amyloid immunoreactivity in astrocytes in Alzheimer's disease brain biopsies: an electron microscope study. *Exp Neurol* 1999; 158: 221-228.

Kwiatkowski TJ Jr, Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, Davis A, Gilchrist J, Kasarskis EJ, Munsat T, Valdmanis P, Rouleau GA, Hosler BA, Cortelli P, de Jong PJ, Yoshinaga Y, Haines JL, Pericak-Vance MA, Yan J, Ticozzi N, Siddique T, McKenna-Yasek D, Sapp PC, Horvitz HR, Landers JE, Brown RH Jr. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2009; 323: 1205-1208.

## L

- Laas R, Hagel C. Hirano bodies and chronic alcoholism. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1994; 20: 12-21.
- Lagier-Tourenne C, Polymenidou M, Cleveland DW. TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Hum Mol Genet* 2010; 19, 46–64.
- Lamar CH, Hinsman EJ, Henrikson CK. Alterations in the hippocampus of aged mice. *Acta Neuropathol* 1976; 36: 387-391.
- Larkin JMG, Porter CD. Mice are unsuitable for modelling ABO discordance despite strain-specific A cross-reactive natural IgM. *Brit J Haematol* 2005; 130: 310-317.
- Lau A, Camins A, Pallàs M, Casadesús G. The SAMP8 as a murine model of early Alzheimer's disease. En: Takeda T, Akiguchi I, Higuchi K, Hosokawa M, Hosokawa T, Nomura Y (eds), *The senescence-accelerated mouse (SAM): achievements and future directions*. Elsevier, Amsterdam, 2013, pp. 205-220.
- Law WJ, Cann KL, Hicks GG. TLS, EWS and TAF15: a model for transcriptional integration of gene expression. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2006; 5: 8-14.
- Le HT, Sin WC, Lozinsky S, Bechberger J, Vega JL, Guo XQ, Naus CC. Gap junction intercellular communication mediated by connexin43 in astrocytes is essential for their resistance to oxidative stress. *J Biol Chem* 2014; 289: 1345-1354.
- Lebel CP, Bondy SC. Oxidative damage and cerebral aging. *Prog Neurobiol* 1992; 38: 601-609.
- Lee J, Culyba EK, Powers ET, Kelly JW. Amyloid- $\beta$  forms fibrils by nucleated conformational conversion of oligomers. *Nat Chem Biol* 2011; 7: 602-609.
- Lee VM, Balin BJ, Otvos L Jr, Trojanowski JQ. A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau. *Science* 1991; 251: 675-678.
- Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ. Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24: 1121-1159.
- Lee VM, Trojanowski JQ. Neurodegenerative tauopathies: human disease and transgenic mouse models. *Neuron* 1999; 24: 507-510.
- Lehesjoki AE, Koskiniemi M, Sistonen P, Miao J, Hastacka J, Norio R, de la Chapelle A. Localisation of a gene for progressive myoclonus epilepsy to chromosome 21q22. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 3696-3699.
- Leverenz JB, Agustin CM, Tsuang D, Peskind ER, Edland SD, Nochlin D, DiGiacomo L, Bowen JD, McCormick WC, Teri L, Raskind MA, Kukull WA, Larson EB. Clinical and neuropathological characteristics of hippocampal sclerosis: a community-based study. *Arch Neurol* 2002; 59: 1099-1106.
- Levine RL, Stadtman ER. Protein modifications with aging. En: Schneider EL, Rowe JW (eds), *Handbook of the biology of aging*. Academic Press, San Diego, 1996, pp. 184-197.
- Li JY, Plomann M, Brundin P. Huntington's disease: a synaptopathy? *Trends Mol Med* 2003; 9: 414-420.



- Li M, Inaba M, Guo K, Abraham NG, Ikehara S. Amelioration of cognitive ability in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) by intra-bone marrow-bone marrow transplantation. *Neurosci Lett* 2009; 465: 36-40.
- Liang H, Masoro EJ, Nelson JF, Strong R, McMahan CA, Richardson A. Genetic mouse models of extended lifespan. *Exp Gerontol* 2003; 38: 1353-1364.
- Libert S, Cohen D, Guarente L. Neurogenesis directed by Sirt1. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 373-374.
- Lieberman AP, Robitaille Y, Trojanowski JQ, Dickson DW, Fischbeck KH. Polyglutamine-containing aggregates in neuronal intranuclear inclusion disease. *Lancet* 1998; 351: 884.
- Lieberman AP, Trojanowski JQ, Leonard DG, Chen KL, Barnett JL, Leverenz JB, Bird TD, Robitaille Y, Malandrini A, Fischbeck KH. Ataxin 1 and ataxin 3 in neuronal intranuclear inclusion disease. *Ann Neurol* 1999; 46: 271-273.
- Lim DS, Vogel H, Willerford DM, Sands AT, Platt KA, Hasty P. Analysis of ku80-mutant mice and cells with deficient levels of p53. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 3772-3780.
- Ling Y, Morgan K, Kalsheker N. Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35:1505-1535.
- Liu J, Mori A. Age-associated changes in superoxide dismutase activity, thiobarbituric acid reactivity and reduced glutathione level in the brain and liver in senescence accelerated mice (SAM): a comparison with ddY mice. *Mech Ageing Dev* 1993; 71: 23-30.
- Liu ST, Howlett G, Barrow CJ. Histidine-13 is a crucial residue in the zinc ion-induced aggregation of the A $\beta$  peptide of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 1999; 38: 9373-9378.
- López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell* 2013; 153: 1194-1217.
- López-Ramos JC, Jurado-Parras MT, Sanfeliu C, Acuna-Castroviejo D, Delgado-Garcia JM. Learning capabilities and CA1-prefrontal synaptic plasticity in a mice model of accelerated senescence. *Neurobiol Aging* 2012; 33: 613-626.
- Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* 2012; 481: 287-294.
- Lou G, Zhang Q, Xiao F, Xiang Q, Su Z, Zhang L, Yang P, Yang Y, Zheng Q, Huang Y. Intranasal administration of TAT-haFGF14-154 attenuates disease progression in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 2012; 223: 225-237.
- Love S, Saitoh T, Quijada S, et al. Alz-50: ubiquitin and tau immunoreactivity of neurofibrillary tangles, Pick bodies and Lewy bodies. *J Neuropathol Exp Neurol* 1988; 47: 393-405.
- Love S. Neuropathology of Aging. En: Pathy MSJ, Sinclair AJ, Morley JE (eds), *Principles and Practice of Geriatric Medicine*. John Wiley and Sons, Chichester, England, 2006, pp. 69-84.
- Lowe J, Blanchard A, Morrell K, Lennox G, Reynolds L, Billett M, Landon M, Mayer RJ. Ubiquitin is a common factor in intermediate filament inclusion bodies of diverse type in man, including those of Parkinson's disease, Pick's disease, and Alzheimer's disease, as well as Rosenthal fibres in cerebellar astrocytomas, cytoplasmic bodies in muscle, and mallory bodies in alcoholic liver disease. *J Pathol* 1988; 155: 9-15.

Lowe J, Mirra SS, Hyman BT, Dickson DW. Ageing and dementia. En: Love S, Louis DN, Ellison DW (eds), Greenfield's Neuropathology, Edward Arnold Publishers, London, 2008.

Lucido AL, Suarez-Sanchez F, Thostrup P, Kwiatkowski AV, Leal-Ortiz S, Gopalakrishnan G, Liazoghli D, Belkaid W, Lennox RB, Grutter P, Garner CC, Colman DR. Rapid assembly of functional presynaptic boutons triggered by adhesive contacts. *J Neurosci* 2009; 29: 12449-12466.

Luk KC, Song C, O'Brien P, Stieber A, Branch JR, Brunden KR, Trojanowski JQ, Lee VM. Exogenous  $\alpha$ -synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 20051-20056.

Lüscher C, Nicoll RA, Malenka RC, Muller D. Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane. *Nat Neurosci* 2000; 3: 545-550.

## M

Ma J, Lindquist S. Conversion of PrP to a self-perpetuating PrP<sup>Sc</sup>-like conformation in the cytosol. *Science* 2002; 298: 1785-1788.

Ma J, Wollmann R, Lindquist S. Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. *Science* 2002; 298: 1781-1785.

Ma Q, Qiang J, Gu P, Wang Y, Geng Y, Wang M. Age-related autophagy alterations in the brain of senescence accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice. *Exp Gerontol* 2011; 46: 533-541.

Mackenzie IR, Bigio EH, Ince PG, Geser F, Neumann M, Cairns NJ, Kwong LK, Forman MS, Ravits J, Stewart H, Eisen A, McClusky L, Kretzschmar HA, Monoranu CM, Highley JR, Kirby J, Siddique T, Shaw PJ, Lee VM, Trojanowski JQ. Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Ann Neurol* 2007; 61: 427-434.

Mackenzie IR, Foti D, Woulfe J, Hurwitz TA. Atypical frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive, TDP-43- negative neuronal inclusions. *Brain* 2008; 131: 1282-1293.

Mackenzie IR, Rademakers R, Neumann M. TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet Neurol* 2010; 9: 995-1007.

Mackenzie IR. Senile plaques do not progressively accumulate with normal aging. *Acta Neuropathol* 1994; 87: 520-525.

Madhusudan A, Sidler C, Knuesel I. Accumulation of reelin-positive plaques is accompanied by a decline in basal forebrain projection neurons during normal aging. *Eur J Neurosci* 2009; 30: 1064-1076.

Maegawa S, Hinkal G, Kim HS, Shen L, Zhang L, Zhang J, Zhang N, Liang S, Donehower LA, Issa JP. Widespread and tissue specific age-related DNA methylation changes in mice. *Genome Res* 2010; 20: 332-340.

Mair W, Dillin A. Aging and survival: the genetics of life span extension by dietary restriction. *Annu Rev Biochem* 2008; 77: 727-754.

Mandybur TI, Ormsby I, Zemlan FP. Cerebral aging: a quantitative study of gliosis in old nude mice. *Acta Neuropathol* 1989; 77: 507-513.

- Mann DMA, Jones D. Deposition of amyloid A4 protein within the brains of persons with dementing disorders other than Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Neurosci Lett* 1990; 109: 68-75.
- Marambaud P, Robakis NK. Genetic and molecular aspects of Alzheimer's disease shed light on new mechanisms of transcriptional regulation. *Genes Brain Behav* 2005; 4: 134-146.
- Markesbery WR, Wang HZ, Kowall NW, Kosik KS, McKee AC. Morphometric image analysis of neuropil threads in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1993; 14: 303-307.
- Martínez-Vicente M, Sovak G, Cuervo AM. Protein degradation and aging. *Exp Gerontol.* 2005; 40: 622-633.
- Martínez-Vicente M, Talloczy Z, Kaushik S, Massey A, Mazzulli J, Mosharov E, Hodara R, Fredenburg R, Wu D, Follenzi A, Dauer W, Przedborski S, Ischiropoulos H, Lansbury P, Sulzer D, Cuervo A. Dopamine-modified  $\alpha$ -synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *J Clin Invest* 2008; 118: 777-788.
- Marx J. Cell biology: SUMO wrestles its way to prominence in the cell. *Science* 2005; 307: 836-839.
- Masaki T, Ishiura S, Sugita H, Kwak S. Multicatalytic proteinase is associated with characteristic oval structures in cortical Lewy bodies: an immunocytochemical study with light and electron microscopy. *J Neurol Sci.* 1994; 122: 127-134.
- Masliah E, Cole G, Shimohama S, Hansen L, DeTeresa R, Terry RD, Saitoh T. Differential involvement of protein kinase C isozymes in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 1990; 10: 2113-2124.
- Masliah E, Ellisman M, Carragher B, Mallory M, Young S, Hansen L, DeTeresa R, Terry RD. Three-dimensional analysis of the relationship between synaptic pathology and neuropil threads in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1992; 51: 404-414.
- Masliah E, Iimoto DS, Saitoh T, Hansen LA, Terry RD. Increased immunoreactivity of brain spectrin in Alzheimer disease: a marker for synapse loss? *Brain Res* 1990; 531: 36-44.
- Masliah E, Mallory M, Hansen L, Alford M, DeTeresa R, Terry R, Baudier J, Saitoh T. Patterns of aberrant sprouting in Alzheimer's disease. *Neuron* 1991; 6: 729-739.
- Masoro EJ. Animal models in aging research. En: Schneider EL, Rowe JW (eds), *Handbook of biology of aging.* Academic Press, San Diego, 1990, pp. 72-94.
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer's disease and Down Syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985; 82: 4245-4249.
- Matsugo S, Kitagawa T, Minami S, Esashi Y, Oomura Y, Tokumaru S, Kojo S, Matsushima K, Sasaki K. Age-dependent changes in lipid peroxide levels in peripheral organs, but not in brain, in senescence-accelerated mice. *Neurosci Lett* 2000; 278: 105-108.
- Matsui N, Takahashi K, Takeichi M, Kuroshita T, Noguchi K, Yamazaki K, Tagashira H, Tsutsui K, Okada H, Kido Y, Yasui Y, Fukuishi N, Fukuyama Y, Akagi M. Magnolol and honokiol prevent learning and memory impairment and cholinergic deficit in SAMP8 mice. *Brain Res.* 2009; 1305: 108-117.
- Mattison JA, Roth GS, Beasley TM, Tilmont EM, Handy AM, Herbert RL, Longo DL, Allison DB, Young JE, Bryant M, Barnard D, Ward WF, Qi W, Ingram DK, de Cabo R. Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature* 2012; 489: 318-321.

- Mattson MP, Maudsley S, Martin B. A neural signaling triumvirate that influences ageing and age-related disease: insulin/IGF-1, BDNF and serotonin. *Ageing Res Rev* 2004; 3: 445-464.
- Mattson MP. Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1144: 97-112.
- McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. The effect of retarded growth upon the length of the life span and upon the ultimate body size. *J Nutr* 1935; 10: 63-79.
- McDermott JR, Gibson AM. Degradation of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid protein by human and rat brain peptidases: involvement of insulin-degrading enzyme. *Neurochem Res* 1997; 22: 49-56.
- McFadden K, Hamilton RL, Insalaco SJ, Lavine L, Al-Mateen M, Wang G, Wiley CA. Neuronal intranuclear inclusion disease without polyglutamine inclusions in a child. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005; 64: 545-552.
- McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 1988; 38: 1285-1291.
- McKee AC, Kosik KS, Kowall NW. Neuritic pathology and dementia in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1991; 30: 156-165.
- McKeith IG, Galasko D, Kosaka K, Perry EK, Dickson DW, Hansen LA, Salmon DP, Lowe J, Mirra SS, Byrne EJ, Lennox G, Quinn NP, Edwardson JA, Ince PG, Bergman A, Burns A, Miller BL, Lovestone S, Collerton D, Jansen ENH, Ballard C, de Vis RAI, Wilcock GK, Jellinger KA, Perry RH. Consensus guidelines for the clinical and pathological diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): Report of the consortium on DLB international workshop. *Neurology* 1996; 47: 1113-1124.
- McKhann GM, Albert MS, Grossman M, Miller B, Dickson D, Trojanowski JQ. Clinical and pathological diagnosis of frontotemporal dementia: report of the Work Group on Frontotemporal Dementia and Pick's Disease. *Arch Neurol* 2001; 58: 1803-1809.
- McLennan NF, Brennan PM, McNeill A, Davies I, Fotheringham A, Rennison KA, Ritchie D, Brannan F, Head MW, Ironside JW, Williams A, Bell JE. Prion protein accumulation and neuroprotection in hypoxic brain damage. *Am J Pathol* 2004; 165: 227-235.
- Meshorer E, Gruenbaum Y. Gone with the Wnt/Notch: stem cells in laminopathies, progeria and aging. *J Cell Biol* 2008; 181: 9-13.
- Meyer U, Nyffeler M, Engler A, Urwyler A, Schedlowski M, Knuesel I, Yee BK, Feldon J. The time of prenatal immune challenge determines the specificity of inflammation-mediated brain and behavioral pathology. *J Neurosci* 2006; 26: 4752-4762.
- Micheli F, Scorticati MC, Folgar S, Gatto E. Development of Parkinson's disease in patients with blepharospasm. *Mov Disord* 2004; 19: 1069-1072.
- Migheli A, Pezzulo T, Attanasio A, Schiffer D. Peripherin immunoreactive structures in amyotrophic lateral sclerosis. *Lab Invest* 1993; 68: 185-191.
- Milland J, Sandrin MS. ABO blood group and related antigens, natural antibodies and transplantation. *Tissue Antigens* 2006; 68: 459-466.

Miller RA, Buehner G, Chang Y, Harper JM, Sigler R, Smith-Wheelock M. Methionine-deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance. *Aging Cell* 2005; 119-125.

Miller RA, Harper JM, Dysko RC, Durkee SJ, Austad SN. Longer life spans and delayed maturation in wild-derived mice. *Exp Biol Med* 2002; 227: 500-508.

Min JN, Whaley RA, Sharpless NE, Lockyer P, Portbury AL, Patterson C. CHIP deficiency decreases longevity, with accelerated aging phenotypes accompanied by altered protein quality control. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 4018-4025.

Mishto M, Santoro A, Bellavista E, Bonafe M, Monti D, Franceschi C. Immunoproteasomes and immunosenescence. *Ageing Res Rev.* 2003; 2: 419-432.

Mitsuno S, Takahashi M, Gondo T, Hoshii Y, Hanai N, Ishihara T, Yamada M. Immunohistochemical, conventional and immunoelectron microscopical characteristics of periodic acid-Schiff-positive granules in the mouse brain. *Acta Neuropathol* 1999; 98: 31-38.

Miyamoto M, Kiyota Y, Nishiyama M, Nagaoka A. Senescence-accelerated mouse (SAM): age-related reduced anxiety-like behavior in the SAM-P/8 strain. *Physiol Behav* 1992; 51: 979-985.

Miyamoto M, Kiyota Y, Yamazaki N, Nagaoka A, Matsuo T, Nagawa Y, Takeda T. Age-related changes in learning and memory in the senescence-accelerated mouse (SAM). *Physiol Behav* 1986; 38: 399-406.

Miyamoto M. Characteristics of age-related behavioral changes in senescence-accelerated mouse SAMP8 and SAMP10. *Exp Gerontol* 1997; 32: 139-148.

Miyamoto M. Characteristics of age-related behavioural changes in senescence-accelerated mouse SAMP8 and SAMP10. *Exp Gerontol* 1997; 32: 139-148.

Miyamoto M. Age-related behavioural disorders in SAMP8 and SAMP10. En: Takeda T, Akiguchi I, Higuchi K, Hosokawa M, Hosokawa T, Nomura Y (eds), *The senescence-accelerated mouse (SAM): achievements and future directions*. Elsevier, Amsterdam, 2013, pp107-116.

Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 2008; 451: 1069-1075.

Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 2004; 15: 1101-1111.

Moeller JR, Ishikawa T, Dhawan V, Spetsieris P, Mandel F, Alexander GE, Grady C, Pietrini P, Eidelberg D. The metabolic topography of normal aging. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; 16: 385-398.

Moisse K, Volkening K, Leystra-Lantz C, Welch I, Hill T, Strong MJ. Divergent patterns of cytosolic TDP-43 and neuronal progranulin expression following axotomy: implications for TDP-43 in the physiological response to neuronal injury. *Brain Res* 2009; 1249: 202-211.

Morgan C, Colombres M, Nunez MT, Inestrosa NC. Structure and function of amyloid in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 2004; 74: 323-349.

Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, Suzuki M, Yoshida H, Titani K, Ihara Y. Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. *J Biol Chem* 1995; 270: 823-829.

Morley JE, Banks WA, Kumar VB, Farr SA. The SAMP8 mouse as a model for Alzheimer disease: studies from Saint Louis University. *Int Congr Ser* 2004; 1260: 23-28.

Morley JE, Farr SA, Flood JF. Antibody to Amyloid- $\beta$  Protein Alleviates Impaired Acquisition, Retention, and Memory Processing in SAMP8 Mice. *Neurobiol Learn Mem* 2002;78, 125-138.

Morley JE, Farr SA, Kumar VB, Armbrrecht HJ. The SAMP8 mouse: a model to develop therapeutic interventions for Alzheimer's disease. *Curr Pharm Design* 2012, 18: 1123-1130.

Morley JE, Kumar VB, Bernardo AE, Farr SA, Uezu K, Tumosa N, Flood JF. Beta-amyloid precursor polypeptide in SAMP8 mice affects learning and memory. *Peptides* 2000; 21: 1761-1767.

Moskalev AA, Shaposhnikov MV, Plyusnina EN, Zhavoronkov A, Budovsky A, Yanai H, Fraifeld VE. The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. *Ageing Res Rev* 2013; 12:661-684.

Mounkes LC, Kozlov S, Hernandez L, Sullivan T, Stewart CL. A progeroid syndrome in mice is caused by defects in A-type lamins. *Nature* 2003; 423: 298-301.

Mucke L, Selkoe DJ. Neurotoxicity of amyloid  $\beta$ -protein: synaptic and network dysfunction. *Cold Spring Harbor Perspect Med.* 2012; 2, a006338.

Muftuoglu M, Oshima J, von Kobbe C, Cheng W-H, Leistritz D, Bohr V. The clinical characteristics of Werner syndrome: molecular and biochemical diagnosis. *Hum Genet* 2008; 124: 369-377.

Mullan M, Crawford F. Genetic and molecular advances in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 1993; 16: 398-403.

Munch G, Thome J, Foley P, Schinzel R, Riederer P. Advanced glycation endproducts in ageing and Alzheimer's disease. *Brain Res Rev* 1997; 23: 134-143.

Muñoz DG, Neumann M, Kusaka H, Yokota O, Ishihara K, Terada S, Kuroda S, Mackenzie IR. FUS pathology in basophilic inclusion body disease. *Acta Neuropathol* 2009; 118: 617-627.

Murakami H, Bessinger K, Hellmann J, Murakami S. Manipulation of serotonin signal suppresses early phase of behavioral aging in *Caenorhabditis elegans*. *Neurobiol Aging* 2008;29: 1093-1100.

Murata S, Yashiroda H, Tanaka K. Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10: 104-115.

Myers RB, Fredenburgh JL, Grizzle WE. Carbohydrates. En: Bancroft JD, Gamble M (eds), *Theory and practice of histological techniques*. Churchill Livingstone Pub, Edinburgh, 2008, pp 161-186.

Myers RH, Vonsattel JP, Stevens TJ, Cupples LA, Richardson EP, Martin JB, Bird ED. Clinical and neuropathologic assessment of severity in Huntington's disease. *Neurology* 1988; 38: 341-347.

## **N**

Nagy JI, Patel D, Ochalski PA, Stelmack GL. Connexin30 in rodent, cat and human brain: selective expression in gray matter astrocytes, co-localization with connexin43 at gap junctions and late developmental appearance. *Neuroscience* 1999; 88: 447-468.

Nagy Z, Esiri MM, Jobst KA, Morris JH, King EM, McDonald B, Litchfield S, Smith A, Barnetson L, Smith AD. Relative roles of plaques and tangles in the dementia of Alzheimer's disease: correlations using three sets of neuropathological criteria. *Dementia* 1995; 6: 21-31.

Nakagami Y. Inhibitors  $\beta$ -amyloid-induced toxicity by modulating the Akt signaling pathway. *Drug News Perspect* 2004; 17: 655-660.

Nakamura S, Akiguchi I, Seriu N, Ohnishi K, Takemura M, Ueno M, Tomimoto H, Kawamata T, Kimura J, Hosokawa M. Monoamine oxidase-B-positive granular structures in the hippocampus of aged senescence-accelerated mouse (SAMP8). *Acta Neuropathol* 1995; 90: 626-632.

Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscl Thromb* 1994; 14: 133-140.

Nakazato Y, Yamazaki H, Hirato J, Ishida Y, Yamaguchi H. Oligodendroglial microtubular tangles in olivopontocerebellar atrophy. *J Neuropathol Exp Neurol* 1990; 49: 521-530.

Navon A, Ciechanover A. The 26 S proteasome: from basic mechanisms to drug targeting. *J Biol Chem* 2009; 284: 33713-33718.

Neary D, Snowden JS, Mann DM, Northen B, Goulding PJ, Macdermott N. Frontal lobe dementia and motor neuron disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1990; 53: 23-32.

Neary D, Snowden JS, Mann DM. Frontotemporal dementia. *Lancet Neurol* 2005; 4: 771-780.

Neff F, Flores-Dominguez D, Ryan DP, Horsch M, Schröder S, Adler T, Afonso LC, Aguilar-Pimentel JA, Becker L, Garrett L, Hans W, Hettich MM, Holtmeier R, Hölter SM, Moreth K, Prehn C, Puk O, Rác I, Rathkolb B, Rozman J, Naton B, Ordemann R, Adamski J, Beckers J, Bekeredjian R, Busch DH, Ehninger G, Graw J, Höfler H, Klingenspor M, Klopstock T, Ollert M, Stypmann J, Wolf E, Wurst W, Zimmer A, Fuchs H, Gailus-Durner V, Hrabe de Angelis M, Ehninger D. Rapamycin extends murine lifespan but has limited effects on aging. *J Clin Invest* 2013; 123: 3272-3291.

Nelson G, Wordsworth J, Wang C, Jurk D, Lawless C, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T. A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence. *Aging Cell* 2012; 11: 345-349.

Nelson R, Sawaya MR, Balbirnie M, Madsen AO, Riekel C, Grothe R, Eisenberg D. Structure of the cross- $\beta$  spine of amyloid-like fibrils. *Nature* 2005; 435: 773-778.

Neumann M, Kwong LK, Truax AC, Vanmassenhove B, Kretschmar HA, Van Deerlin VM, Clark CM, Grossman M, Miller BL, Trojanowski JQ, Lee VM. TDP-43-positive white matter pathology in frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007; 66: 177-183.

Neumann M, Rademakers R, Roeber S, Baker M, Kretschmar HA, Mackenzie IR. A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology. *Brain* 2009; 132: 2922-2931.

Neumann M, Roeber S, Kretschmar HA, Rademakers R, Baker M, Mackenzie IR. Abundant FUS-immunoreactive pathology in neuronal intermediate filament inclusion disease. *Acta Neuropathol* 2009; 118: 605-616.

Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden W, Kretschmar HA, Trojanowski JQ, Lee VM. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2006; 314: 130-133.

Neuwald AF, Hirano T. HEAT repeats associated with condensins, cohesins, and other complexes involved in chromosome-related functions. *Genome Res* 2000; 10: 1445-1452.

Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA. Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res* 1986; 387: 271-280.

Nicholas A, de Magalhaes JP, Kraytsberg Y, Richfield EK, Levanon EY, Khrapko K. Age-related gene-specific changes of A-to-I mRNA editing in the human brain. *Mech Ageing Dev* 2010; 131: 445-447.

Nishie M, Mori F, Yoshimoto M, Takahashi H, Wakabayashi K. A quantitative investigation of neuronal cytoplasmic and intranuclear inclusions in the pontine and inferior olivary nuclei in multiple system atrophy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2004; 30: 546-554.

Nishikawa T, Takahashi JA, Fujibayashi Y, Fujisawa H, Zhu B, Nishimura Y, Ohnishi K, Higuchi K, Hashimoto N, Hosokawa M. An early stage mechanism of the age-associated mitochondrial dysfunction in the brain of SAMP8 mice; an age-associated neurodegeneration animal model. *Neurosci Lett* 1998; 254: 69-72.

Nomura Y, Kitamura Y, Ohnuki T, Arima Y, Yamanaka Y, Sasaki K, Oonuma Y. Alterations in acetylcholine, NMDA, benzodiazepine receptors and protein kinase C in the brain of the senescence-accelerated mouse: an animal model useful for studies on cognitive enhances. *Behav Brain Res* 1997; 83: 51-55.

Nomura Y, Okuma Y. Age-related defects in lifespan and learning ability in SAMP8 mice. *Neurobiol Aging* 1999; 20: 111-115.

Nomura Y, Yamanaka Y, Kitamura Y, Arima T, Ohnuki T, Oomura Y, Sasaki K, Nagashima K, Ihara Y. Senescence-accelerated mouse. *Neurochemical studies on aging. Ann N Y Acad Sci* 1996; 786: 410-418.

## O

Ochalski PA, Sawchuk MA, Hertzberg EL, Nagy JI. Astrocytic gap junction removal, connexin43 redistribution, and epitope masking at excitatory amino acid lesion sites in rat brain. *Glia* 1995; 14: 279-294.

Octave JN. The amyloid peptide and its precursor in Alzheimer's disease. *Rev Neurosci.* 1995; 6: 287-316.

Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Laferla FM. Triple-Transgenic Model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A $\beta$  and synaptic dysfunction 2003; 39: 409-421.

Ogata J, Budzilovich GN, Cravioto H. A study of rod-like structures (Hirano bodies) in 240 normal and pathological brains. *Acta Neuropathol* 1972; 21: 61-67.

Ohgami T, Kitamoto T, Weidmann A, Beyreuther K, Takeishi J. Alzheimer's amyloid precursor protein-positive degenerative neuritis exist even without Kuru plaques not specific to Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1991; 139: 1245-1250.

Ohsawa T, Shumiya S. Age-related alteration of brain gangliosides in senescence-accelerated mouse (SAM)-P/8. *Mech Ageing Dev* 1991; 59: 263-274.



- Ohta A, Hirano T, Yagi H, Tanaka S, Hosokawa M, Takeda T. Behavioral characteristics of the SAM-P/8 strain in Sidman active avoidance task. *Brain Res* 1989; 498: 195-198.
- Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ, Miyahara Y. Hepatic mitochondrial dysfunction in senescence-accelerated mice: correction by long-term, orally administered physiological levels of melatonin. *J Pineal Res* 2002; 33: 127-133.
- Onozuka M, Watanabe K, Fujita M, Tomida M, Ozono S. Changes in the septohippocampal cholinergic system following removal of molar teeth in the aged SAMP8 mouse. *Behav Brain Res* 2002; 133: 197-204.
- Orgel LE. The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1963; 49: 517-521.
- Ortega-Molina A, Efeyan A, Lopez-Guadamillas E, Muñoz-Martin M, Gomez-Lopez G, Canamero M, Mulero F, Pastor J, Martinez S, Romanos E, González-Barroso MM, Rial E, Valverde AM, Bischoff JR, Serrano M. Pten positively regulates brown adipose function, energy expenditure, and longevity. *Cell Metab* 2012; 15: 382-394.
- Osborne TB, Mendel LB, Ferry EL. The effect of retardation of growth upon the breeding period and duration of life of rats. *Science* 1917; 45: 294-295.
- Osorio FG, Varela I, Lara E, Puente XS, Espada J, Santoro R, Freije JM, Fraga MF, López-Otín C. Nuclear envelope alterations generate an aging-like epigenetic pattern in mice deficient in Zmpste24 metalloprotease. *Aging Cell* 2010; 9: 947-957.
- Ostedgaard LS, Jennings ML, Karniski LP, Schuster VL. A 45-kDa protein antigenically related to band 3 is selectively expressed in kidney mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 981-985.
- Otvos L, Szendrei GI, Lee VM, Mantsch HH. Human and rodent Alzheimer  $\beta$ -amyloid peptides acquire distinct conformations in membrane-mimicking solvents. *Eur J Biochemistry* 1993; 211: 249-257.
- Ouwendijk WJD, Flowerdew SE, Wick D, Horn AK, Sinicina I, Strupp M, Osterhaus AD, Verjans GM, Hüfner K. Immunohistochemical detection of intra-neuronal VZV proteins in snap-frozen human ganglia is confounded by antibodies directed against blood group A1-associated antigens. *J Neurovirol* 2012; 18: 172-180.
- Ouyang YB, Voloboueva LA, Xu LJ, Giffard RG. Selective dysfunction of hippocampal CA1 astrocytes contributes to delayed neuronal damage after transient forebrain ischemia. *J Neurosci* 2007; 27: 4253-4260.
- Overmyer M, Helisalmi S, Soininen H, Laakso M, Riekkinen P Sr, Alafuzoff I. Astroglialosis and the ApoE genotype: an immunohistochemical study of postmortem human brain tissue. *Dementia Geriatr Cogn Disord* 1999; 10: 252-257.
- Oyer CE, Cortez S, O'Shea P, Popovic M. Cardiomyopathy and myocyte intranuclear inclusions in neuronal intranuclear inclusion disease: a case report. *Hum Pathol* 1991; 22: 722-724.
- Ozawa T. Genetic and functional changes in mitochondria associated with aging. *Physiol Rev* 1997; 77: 425-464.

## **P**

Palinski W, Koschinsky T, Butler SW, Miller E, Vlassara H, Cerami A, Witztum JL. Immunological evidence for the presence of advanced glycosylation end products in atherosclerotic lesions of euglycemic rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 571-582.

Pallàs M, Camins A, Smith MA, Perry G, Lee H, Casadesus G. From aging to Alzheimer's disease: Unveiling "the switch" with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8). *J Alzheimers Dis* 2008; 15: 615-624.

Pallàs M, Porquet D, Vicente A, Sanfeliu C. Resveratrol: new avenues for a natural compound in neuroprotection. *Curr Pharm Des* 2013; 19: 6726-6731.

Pallàs M. Senescence-Accelerated Mice P8: A Tool to Study Brain Aging and Alzheimer's Disease in a Mouse Model. *Cell Biology*, 2012: 1-12.

Pang KCH, Miller JP, Fortress A, McAuley JD. Age-related disruptions of circadian rhythm and memory in the senescence-accelerated mouse (SAMP8). *Age* 2006; 28: 283-296.

Panoutsakopoulou V, Sanchirico ME, Huster KM, Jansson M, Granucci F, Shim DJ, Wucherpfennig KW, Cantor H. Analysis of the relationship between viral infection and autoimmune disease. *Immunity* 2001; 15: 137-147.

Papp MI, Kahn JE, Lantos PL. Glial cytoplasmic inclusions in the CNS of patients with multiple system atrophy (striatonigral degeneration, olivopontocerebellar atrophy and Shy-Drager syndrome). *J Neurol Sci* 1989; 94: 79-100.

Papp MI, Lantos PL. Accumulation of tubular structures in oligodendroglial and neuronal cells as the basic alteration in multiple system atrophy. *J Neurol Sci* 1992; 107: 172-182.

Park CB, Larsson NG. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *J Cell Biol* 2011; 193: 809-818.

Parrinello S, Samper E, Goldstein J, Melov S, Campisi J. Oxygen sensitivity severely limits the replicative life span of murine cells. *Nature Cell Biol* 2003; 5: 741-747.

Partyka K, Maupin KA, Brand RE, Haab BB. Diverse monoclonal antibodies against the CA 19-9 antigen show variation in binding specificity with consequences for clinical interpretation. *Proteomics* 2012; 12: 2212-2220.

Patel H, Norman MG, Perry TL, Berry KE. Multiple system atrophy with neuronal intranuclear hyaline inclusions: report of a case and review of the literature. *J Neurol Sci* 1985; 67: 57-65.

Pegoraro G, Kubben N, Wickert U, Gohler H, Hoffmann K, Misteli T. Ageing-related chromatin defects through loss of the NURD complex. *Nat Cell Biol*. 2009; 11: 1261-1267.

Pelegri C, Canudas AM, del Valle J, Casadesús G, Smith MA, Camins A, Pallàs M, Vilaplana J. Increased permeability of blood-brain barrier on the hippocampus of a murine model of senescence. *Mech Ageing Dev* 2007; 128: 522-528.

Penev PD, Turek FW, Zee PC. Monoamine depletion alters the entrainment and the response to light of the circadian activity rhythm in hamsters. *Brain Res*. 1993; 612: 156-164.

Peress NS, Kane WC, Aronson SM. Central nervous system findings in a tenth decade autopsy population. *Prog Brain Res* 1973; 40: 473-483.

Pérez-Cáceres D, Ciudad-Roberts A, Rodrigo MT, Pubill D, Camins A, Camarasa J, Escubedo E, Pallàs M. Depression-like behavior is dependent on age in male SAMP8 mice. *Biogerontology*. 2013;14: 165-176.

Perls T, Levenson R, Regan M, Puca A. What does it take to live to 100? *Mech Ageing Dev* 2002; 123: 231-242.

Perluigi M, Domenico F Di, Schininà ME, Coccia R, Cini C, Bellia F, Cambria MT, Cornelius C, Butterfield DA, Calabrese V. Redox proteomics in aging rat brain: involvement of mitochondrial reduced glutathione status and mitochondrial protein oxidation in the aging process. *J Neurosci Res* 2010; 88: 3498-3507.

Perluigi M, Swomley AM, Butterfield DA. Redox proteomics and the dynamic molecular landscape of the aging brain. *Ageing Res Rev* 2014; 13: 75-89.

Perry G, Friedman R, Shaw G, Chau V. Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer's disease brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 3033-3036.

Perry G, Kawai M, Tabaton M, Onorato M, Mulvihill P, Richey P, Morandi A, Connolly JA, Gambetti P. Neuropil threads of Alzheimer's disease show a marked alteration of the normal cytoskeleton. *J Neurosci* 1991; 11: 1748-1755.

Perry G, Siedlak SL, Richey P, Kawai M, Cras P, Kalaria RN, Galloway PG, Scardina JM, Cordell B, Greenberg BD, Ledbetter SR, Gambetti P. Association of heparan sulfate proteoglycan with the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 1991; 11: 3679-3683.

Petit-Taboué MC, Landeau B, Desson JF, Desgranges B, Baron JC. Effects of healthy aging on the regional cerebral metabolic rate of glucose assessed with statistical parametric mapping. *Neuroimage* 1998; 7: 176-184.

Petrasccheck M, Ye X, Buck LB. A high-throughput screen for chemicals that increase the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1170: 698-701.

Petrasccheck M, Ye X, Buck LB. An antidepressant that extends lifespan in adult *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2007; 450: 553-556.

Petursdottir AL, Farr SA, Morley JE, Banks WA, Skuladottir GV. Lipid peroxidation in brain during aging in the senescence-accelerated mouse (SAM). *Neurobiol Aging* 2007; 28: 1170-1178.

Pollanen MS, Dickson DW, Bergeron C. Pathology and biology of the Lewy body. *J Neuropathol Exp Neurol* 1993; 52: 183-191.

Pollina EA, Brunet A. Epigenetic regulation of aging stem cells. *Oncogene* 2011; 30: 3105-3126.

Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. Mutation in the  $\alpha$ -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997; 276: 2045-2047.

Poon HF, Joshi G, Sultana R, Farr SA, Banks WA, Morley JE, Calabrese V, Butterfield DA. Antisense directed at the A $\beta$  region of APP decreases brain oxidative markers in aged senescence accelerated mice. *Brain Res* 2004; 101: 86-96.

Poon HF, Joshi G, Sultana R, Farr SA, Banks WA, Morley JE, Calabrese V, Butterfield DA. Antisense directed at the A $\beta$  region of APP decreases brain oxidative markers in aged senescence accelerated mice. *Brain Res* 2004; 1018: 86-96.

Porquet D, Casadesús G, Bayod S, Vicente A, Canudas AM, Vilaplana J, Pelegrí C, Sanfeliu C, Camins A, Pallàs M, Del Valle J. Dietary resveratrol prevents Alzheimer's markers and increases life span in SAMP8. *Age* 2013; 35: 1851-1865.

Pountney DL, Chegini F, Shen X, Blumbergs PC, Gai WP. SUMO-1 marks subdomains within glial cytoplasmic inclusions of multiple system atrophy. *Neurosci Lett* 2005; 381: 74-79.

Pountney DL, Huang Y, Burns RJ, Haan E, Thompson PD, Blumbergs PC, Gai WP. SUMO-1 marks the nuclear inclusions in familial neuronal intranuclear inclusion disease. *Exp Neurol* 2003; 184: 436-446.

Powers ET, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW, Balch WE. Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annu Rev Biochem* 2009; 78: 959-991.

Price JL, Davis PB, Morris JC, White DL. The distribution of tangles, plaques and related immunohistochemical markers in healthy aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1991; 12: 295-312.

Probst A, Langui D, Lautenschlager C, Ulrich J, Brion JP, Anderton BH. Progressive supranuclear palsy: extensive neuropil threads in addition to neurofibrillary tangles. Very similar antigenicity of subcortical neuronal pathology in progressive supranuclear palsy and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 1988; 77: 61-68.

Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13363-13383.

Prusiner SB. Shattuck lecture—Neurodegenerative diseases and prions. *N Engl J Med* 2001; 344: 1516-1526.

## Q

Qiu WQ, Walsh DM, Ye Z, Vekrellis K, Zhang J, Podlisny MB, Rosner MR, Safavi A, Hersh LB, Selkoe DJ. Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid  $\beta$ -protein by degradation. *J Biol Chem* 1998; 273: 32730–32738.

## R

Rachubinski AL, Maclean KN, Evans JR, Bjugstad KB. Modulating cognitive deficits and tau accumulation in a mouse model of aging Down syndrome through neonatal implantation of neural progenitor cells. *Exp Gerontol.* 2012; 47: 723-733.

Rai P, Troen BR. Principles and Practice of Geriatric Surgery. En: Rosenthal RA, Zenilman ME, Katlic MR (eds). New York, NY: Springer New York. 2011

Rakhit R, Cunningham P, Furtos-Matei A, Dahan S, Qi XF, Crow JP, Cashman NR, Kondejewski LH, Chakrabartty A. Oxidation-induced misfolding and aggregation of superoxide dismutase and its implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 2002; 277: 47551-47556.

Ramsey H. Ultrastructure of corpora amylacea. *J Neuropathol Exp Neurol* 1965; 24: 25-39.

Rash JE, Yasumura T. Direct immunogold labeling of connexins and aquaporin4 in freeze-fracture replicas of liver, brain and spinal cord: factors limiting quantitative analysis, *Cell Tiss Res* 1999; 296: 307-321.

Renkawek K, Bosman GJ, Gaestel M. Increased expression of heat-shock protein 27 kDa in Alzheimer disease: a preliminary study. *Neuroreport* 1993; 5: 14-16.

Ressler S, Bartkova J, Niederegger H, Bartek J, Scharffetter-Kochanek K, Jansen-Durr P, Wlaschek M. p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell* 2006; 5:379-389.

Rex CS, Lauterborn JC, Lin CY, Kramar EA, Rogers GA, Gall CM, Lynch G. Restoration of long-term potentiation in middle-aged hippocampus after induction of brain-derived neurotrophic factor. *J Neurophysiol* 2006; 96: 677-685.

Reyes AE, Chacón MA, Dinamarca MC, Cerpa W, Morgan C, Inestrosa NC. Acetylcholinesterase-A $\beta$  complexes are more toxic than A $\beta$  fibrils in rat hippocampus: effect on rat  $\beta$ -amyloid aggregation, laminin expression, reactive astrocytosis and neuronal cell loss. *Am J Pathol* 2004; 164: 2163-2174.

Ricklefs RE, Finch CE. *Aging: A Natural History*. Scientific American Library, New York, 1995.

Robertson T, Dutton NS, Martins RN, Roses AD, Kakulas BA, Papadimitriou JM. Age-related congophilic inclusions in the brains of apolipoprotein E-deficient mice. *Neuroscience* 1998; 82: 171-180.

Robertson T, Dutton NS, Martins RN, Taddei K, Papadimitriou JM. Comparison of astrocytic and myocytic metabolic dysregulation in apolipoprotein E deficient and human apolipoprotein E transgenic mice. *Neuroscience* 2000; 98: 353-359.

Rocher J. Développement de modèles expérimentaux en vue de la mise au point de protocoles d'immunothérapie ciblant les antigènes glycaniques sialyl-Tn et A type  $\frac{3}{4}$ , antigènes associés aux carcinomes. Director: JF Jeannin. École Pratique des Hautes Etudes (Sciences de la Vie et de la Terre), Diplômé. 2005.

Röcken M, Urban JF, Shevach EM. Infection breaks T-cell tolerance. *Nature* 1992; 359: 79-82.

Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* 2011; 192: 547-556.

Roeber S, Mackenzie IR, Kretschmar HA, Neumann M. TDP-43- negative FTL-D-U is a significant new clinico-pathological subtype of FTL-D. *Acta Neuropathol* 2008; 116: 147-157.

Rojo A, Pernaute RS, Fontan A, Ruíz PG, Honnorat J, Lynch T, Chin S, Gonzalo I, Rábano A, Martínez A, Daniel S, Pramstaller P, Morris H, Wood N, Lees A, Taberner C, Nyggard T, Jackson AC, Hanson A, de Yébenes JG. Clinical genetics of familial progressive supranuclear palsy. *Brain* 1999; 122: 1233-1245.

Rosenblatt DE, Geula C, Mesulam MM. Protease nexin I immunostaining in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1989; 26: 628-634.

Ross C, Poirier M. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* 2004; 10: S10-17.

Rossor MN. Pick's disease: a clinical overview. *Neurology* 2001; 56: S3-5.

Roukema PA, Oderkerk CH. Isolation and preliminary characterisation of corpora amylacea from human brain. *Psychiatr Neurol Neurosurg.* 1970; 73: 87-96.

Russo C, Venezia V, Repetto E, Nizzari M, Violani E, Carlo P, Schettini G. The amyloid precursor protein and its network of interacting proteins: physiological and pathological implications. *Brain Res Rev* 2005; 48: 257-264.

## **S**

Sakai M, Austin J, Witmer F, Trueb L. Studies of corpora amylacea: I. Isolation and preliminary characterization by chemical and histochemical techniques. *Arch Neurol* 1969; 21: 526-544.

Sánchez-Barceló EJ, Megias M, Verduga R, Crespo D. Differences between the circadian system of two strains of senescence-accelerated mice (SAM). *Physiol Behav* 1997; 62:1225-1229.

Santos-argumedo L. *Natural Antibodies.* 2012; 3: 345-352.

Santuccione A, Sytnyk V, Leshchyn'ska I, Schachner M. Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. *J Cell Biol* 2005; 169: 341-354.

Sapp E, Schwarz C, Chase K, Bhide PG, Young AB, Penney J, Vonsattel JP, Aronin N, DiFiglia M. Huntingtin localization in brains of normal and Huntington's disease patients. *Ann Neurol* 1997; 42: 604-612.

Sato E, Inoue A, Kurokawa T, Ishibashi S. Early changes in glucose metabolism in the cerebrum of senescence accelerated mouse: involvement of glucose transporter. *Brain Res* 1994; 637: 133-138.

Sato E, Kurokawa T, Oda N, Ishibashi S. Early appearance of abnormality of microperoxisomal enzymes in the cerebral cortex of senescence-accelerated mouse. *Mech Ageing Devel* 1996a; 92: 175-184.

Sato E, Oda N, Ozaki N, Hashimoto SI, Kurokawa T, Ishibashi S. Early and transient increase in oxidative stress in the cerebral cortex of senescence-accelerated mouse. *Mech Ageing and Devel* 1996b; 86: 105-114.

Sato T, Takeuchi S, Saito A, Ding W, Bamba H, Matsuura H, Hisa Y, Tooyama I, Urushitani M. Axonal ligation induces transient redistribution of TDP-43 in brainstem motor neurons. *Neuroscience* 2009; 164: 1565-1578.

Saudou F, Finkbeiner S, Devys D, Greenberg ME. Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* 1998; 95: 55-66.

Scaffidi P, Misteli T. Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nat Med* 2005; 11: 440-445.

Schaible R, Gowen JW. A new dwarf mouse. *Genetics* 1961; 46: 896.

Schenkel-Brunner H. Human blood groups. Chemical and biochemical basis of antigen specificity Springer-Verlag, Wien. 2000.

Schiborr C, Schwamm D, Kocher A, Rimbach G, Eckert GP, Frank J. The senescence-accelerated mouse-prone 8 is not a suitable model for the investigation of cardiac inflammation and oxidative stress and their modulation by dietary phytochemicals. *Pharmacol Res* 2013; 74: 113-120.

Schmidt AM, Hori O, Brett J, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Cellular receptors for advanced glycation end products: implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 1521-1528.

Schmidt ML, Murray JM, Trojanowski JQ. Continuity of neuropil threads with tangle-bearing and tangle-free neurons in Alzheimer disease cortex: a confocal laser scanning microscopy study. *Mol Chem Neuropathol* 1993; 18: 299-312.

Schneider EL, Rowe JW. *Handbook of the biology of aging*. Academic Press, San Diego, 1996.

Schram MT, Euser SM, de Craen AJ, Witteman JC, Frölich M, Hofman A, Jolles J, Breteler MM, Westendorp RG. Systemic markers of inflammation and cognitive decline in old age. *J Am Geriatr Soc*. 2007; 55: 708-716.

Schwartz LB, Naftolin F, Lyttle CR, Penzias AS, Meaddough EL, Kliman HJ. 2001. Mouse ascites golgi (MAG) mucin expression and regulation by progesterone in the rat uterus. *J Soc Gynecol Investig* 2001; 8: 216-223.

Schwimbeck PL, Dyrberg T, Drachman DB, Oldstone MB. Molecular mimicry and myasthenia gravis. An autoantigenic site of the acetylcholine receptor  $\alpha$ -subunit that has biologic activity and reacts immunochemically with herpes simplex virus. *J Clin Invest* 1989; 84: 1174-1180.

Seelaar H, Klijnsma KY, de Koning I, van der Lugt A, Chiu WZ, Azmani A, Rozemuller AJ, van Swieten JC. Frequency of ubiquitin and FUS-positive, TDP-43-negative frontotemporal lobar degeneration. *J Neurol* 2010; 257: 747-753.

Segall PE, Timiras PS, Walton JR. Low tryptophan diets delay reproductive ageing. *Mech Ageing Dev* 1983; 24: 245-252.

Selkoe D, Kopan R. Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu Rev Neurosci* 2003; 26: 565-597.

Selkoe DJ, Bell DS, Podlisny MB, Price DL, Cork LC. Conservation of brain amyloid proteins in aged mammals and humans with Alzheimer's disease. *Science* 1987; 235: 873-877.

Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 2002; 298: 789-791.

Seluanov A, Gorbunova V, Falcovitz A, Sigal A, Milyavsky M, Zurer I, Shohat G, Goldfinger N, Rotter V. Change of the death pathway in senescent human fibroblasts in response to DNA damage is caused by an inability to stabilize p53. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 1552-1564.

Sharma R, Nakamura A, Takahashi R, Nakamoto H, Goto S. Carbonyl modification in rat liver histones: decrease with age and increase by dietary restriction. *Free Radic Biol Med* 2006; 40: 1179-1184.

Sharpless NE, DePinho RA. How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 703-713.

Shaw AC, Joshi S, Greenwood H, Panda A, Lord JM. Aging of the innate immune system. *Curr Opin Immunol* 2010; 22: 507-513.

- Shaw MA. Inherent anti-A in mouse ascites fluid. *Med Lab Sci* 1986; 43: 194-195.
- Sherr CJ, DePinho RA. Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell* 2000; 102: 407-410.
- Shibata M, Lu T, Furuya T, Degterev A, Mizushima N, Yoshimori T, MacDonald M, Yankner B, Yuan J. Regulation of intracellular accumulation of mutant Huntingtin by Beclin 1. *J Biol Chem* 2006; 281: 14474-14485.
- Shibayama H, Kitoh J. Electron microscopic structure of the Alzheimer's neurofibrillary changes in case of atypical senile dementia. *Acta Neuropathol* 1978; 41: 229-234.
- Shih JC, Chen K, Ridd MJ. Monoamine oxidase: from genes to behavior. *Annu Rev Neurosci* 1999; 22: 197-217.
- Shimizu K, Toh H. Interaction between intrinsically disordered proteins frequently occurs in a human protein-protein interaction network. *J Mol Biol* 2009; 392: 1253-1265.
- Shostak S. *Becoming Immortal: Combining Cloning and Stem-Cell Therapy*. State University of New York Press, Albany (New York), 2002.
- Shumaker DK, Dechat T, Kohlmaier A, Adam SA, Bozovsky MR, Erdos MR, Eriksson M, Goldman AE, Khuon S, Collins FS, et al. Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103: 8703-8708.
- Sibille E, Su J, Leman S, Le Guisquet AM, Iburguen-Vargas Y, Joeyen-Waldorf J, Glorioso C, Tseng GC, Pezzone M, Hen R, Belzung C. Lack of serotonin1B receptor expression leads to age-related motor dysfunction, early onset of brain molecular aging and reduced longevity. *Mol Psychiatry* 2007; 12: 1042-1056.
- Siedlak SL, Cras P, Kawai M, Richey P, Perry G. Basic fibroblast growth factor binding is a marker for extracellular neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *J Histochem Cytochem* 1991; 39: 899-904.
- Silverberg GD, Mayo M, Saul T, Rubenstein E, McGuire D. Alzheimer's disease, normal-pressure hydrocephalus, and senescent changes in CSF circulatory physiology: a hypothesis. *Lancet Neurol* 2003; 2: 506-511.
- Simchowicz T. Histologische Studien ueber die senile Demenz. *Histol Histopathol Arbeit Grosshirn* 1911; 4: 267-444.
- Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 2011; 44: 129-146.
- Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, Tanaka K, Cuervo AM, Czaja MJ. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*. 2009; 458: 1131-1135.
- Sipe JD, Benson MD, Buxbaum JN, Ikeda S, Merlini G, Saraiva MJ, Westermark P. Amyloid fibril protein nomenclature: 2012 recommendations from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid* 2012; 19: 167-170.
- Sitte N, Huber M, Grune T, Ladhoff A, Doecke WD, Von Zglinicki T, Davies KJ. Proteasome inhibition by lipofuscin/ceroid during postmitotic aging of fibroblasts. *FASEB J*. 2000; 14: 1490-1498.
- Sloane AE, Becker LE, Ang LC, Wark J, Haslam RH. Neuronal intranuclear hyaline inclusion disease with progressive cerebellar ataxia. *Pediatr Neurol* 1994; 10: 61-66.



Smith MA, Taneda S, Richey PL, Miyata S, Yan SD, Stern D, Sayre LM, Monnier VM, Perry G. Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 5710–5714.

Smith ZD, D'Eugenio-Gumkowski F, Yanagisawa K, Jamieson JD. Endogenous and monoclonal antibodies to the rat pancreatic acinar cell Golgi complex. *J Cell Biol* 1984; 98: 2035-2046.

Snowden DA, Kane RL, Beeson WL. Is early natural menopause a biological marker of health and ageing? *Am J Public Health* 1989; 79: 709-714.

Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction and aging. *Science* 1996; 273: 59-63.

Soontornniyomkij V, Risbrough VB, Young JW, Soontornniyomkij B, Jeste DV, Achim CL. Increased hippocampal accumulation of autophagosomes predicts short-term recognition memory impairment in aged mice. *Age* 2012; 34: 305-316.

Soto C. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4: 49-60.

Sousa-Victor P, Gutarra S, García-Prat L, Rodríguez-Ubrea J, Ortet L, Ruiz-Bonilla V, Jardí M, Ballestar E, González S, Serrano AL, Perdiguero E, Muñoz-Cánoves P. Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence. *Nature* 2014; 506: 316-321.

Spangler EL, Patel N, Speer D, Hyman M, Hengemihle J, Markowska A, Ingram DK. Passive avoidance and complex maze learning in the senescence accelerated mouse (SAM): age and strain comparisons of SAM P8 and R1. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2002; 57: 61-68.

Spicer SS, Schulte BA. Diversity of cell glycoconjugates shown histochemically: a perspective. *J Histochem Cytochem* 1992; 40: 1-38.

Spicer SS, Spivey M, Ito M, Schulte B. Some ascites monoclonal antibody preparations contain contaminants that bind to selected Golgi zones or mast cells. *J Histochem Cytochem*. 1994; 42: 213-221.

Spicer SS. The use of various cationic reagents in histochemical differentiation of mucopolysaccharides. *Am J Clin Pathol*. 1961; 36: 393-407.

Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Cairns NJ, Lantos PL, Goedert M. Filamentous  $\alpha$ -synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurosci Lett* 1998; 251: 205-208.

Spillantini MG, Tolnay M, Love S, Goedert M. Microtubule-associated protein tau, heparan sulphate and  $\alpha$ -synuclein in several neurodegenerative diseases with dementia. *Acta Neuropathol* 1999; 97: 585-594.

Spira PJ, Sharpe DM, Halliday G, Cavanagh J, Nicholson GA. Clinical and pathological features of a Parkinsonian syndrome in a family with an Ala53Thr  $\alpha$ -synuclein mutation. *Ann Neurol* 2001; 49: 313-319.

Stacy S, Krolick KA, Infante AJ, Kraig E. Immunological memory and late onset autoimmunity. *Mech Ageing Dev* 2002; 123: 975-985.

Stam FC, Roukema PA. Histochemical and biochemical aspects of corpora amylacea. *Acta Neuropathol* 1973; 25: 95-102.

- Stanley P, Cummings RD. Structures common to different glycans. En: Ajit Varki, Richard D Cummings, Jeffrey D Esko, Hudson H Freeze, Pamela Stanley, Carolyn R Bertozzi, Gerald W Hart, and Marilyn E Etzler (eds), *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2009, pp. 175-198.
- Steele HD, Kinley G, Leuchtenberger C, Lieb E. Polysaccharide nature of corpora amylacea. *Arch Pathol* 1952; 54: 94-97.
- Steele JC, Richardson JC, Olszewski J. Progressive supranuclear palsy: a heterogenous degeneration involving the brain stem, basal ganglia and cerebellum with vertical gaze and pseudobulbar palsy, nuchal dystonia and dementia. *Arch Neurol* 1964; 10: 333-359.
- Steffan, JS et al. SUMO modification of huntingtin and Huntington's disease pathology. *Science* 2004; 304: 100-104.
- Steiner H. Uncovering gamma-secretase. *Curr Alzheimer Res* 2004; 1: 175-181.
- Sternberg H, Timiras PS. *Studies of Aging*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 1999.
- Stevnsner T, Muftuoglu M, Aamann MD, Bohr VA. The role of Cockayne Syndrome group B (CSB) protein in base excision repair and aging. *Mech Ageing Dev* 2008; 129: 441-448.
- Strehler BL (1977) *Time, cells, and aging*, 2nd edn. Academic Press, New York
- Strong MJ, Volkening K, Hammond R, Yang W, Strong W, Leystra-Lantz C, Shoesmith C. TDP43 is a human low molecular weight neurofilament (hNFL) mRNA-binding protein. *Mol Cell Neurosci* 2007; 35: 320-327.
- Strong R, Miller RA, Astle CM, Floyd RA, Flurkey K, Hensley KL, Javors MA, Leeuwenburgh C, Nelson JF, Ongini E, Nadon NL, Warner HR, Harrison DE. Nordihydroguaiaretic acid and aspirin increase lifespan of genetically heterogeneous male mice. *Aging Cell* 2008; 7: 641-650.
- Strong R, Reddy V, Morley HE. Cholinergic deficits in the septal-hippocampal pathway of the SAM-P/8 senescence accelerated mouse. *Brain Res* 2003; 966: 150-156.
- Sugiyama H, Akiyama H, Akiguchi I, Kameyama M, Takeda T. Loss of dendritic spines in hippocampal CA1 pyramidal cells in senescence accelerated mouse (SAM) a quantitative Golgi study. *Rinsho Shinkeigaku*. 1987; 27: 841-845.
- Sultana R, Cenini G, Butterfield DA. SAMP8 a model to understand the role of oxidative stress in age-related diseases including Alzheimer's disease. En: Takeda T, Akiguchi I, Higuchi K, Hosokawa M, Hosokawa T, Nomura Y (eds), *The senescence-accelerated mouse (SAM): achievements and future directions*. Elsevier, Amsterdam, 2013.
- Sun AA, Sadighi A, Miller RA, Harper JM. Life-span extension in mice by preweaning food restriction and by methionine restriction in middle age. *J Gerontol Series A: Biol Sci Med Sci*. 2009; 64: 711-722.
- Sureda FX, Gutiérrez-Cuesta J, Romeu M, Mulero M, Canudas AM, Camins A, Mallol J, Pallàs M. Changes in oxidative stress parameters and neurodegeneration markers in the brain of the senescence-accelerated mice SAMP-8. *Exp Gerontol* 2006; 41: 360-367.
- Suzuki K, Terry RD. Fine structural localization of acid phosphatase in senile plaques in Alzheimer's presenile dementia. *Acta Neuropathol* 1967; 8: 276-284.

Swindell WR, Masternak MM, Kopchick JJ, Conover CA, Bartke A, Miller RA. Endocrine regulation of heat shock protein mRNA levels in long-lived dwarf mice. *Mech Ageing Dev* 2009; 130: 393-400.

Sze JY, Victor M, Loer C, Shi Y, Ruvkun G. Food and metabolic signalling defects in a *Caenorhabditis elegans* serotonin-synthesis mutant. *Nature* 2000; 403: 560-564.

## **I**

Tabaton M, Cammarata S, Mancardi G, Manetto V, Autilio-Gambetti L, Perry G, Gambetti P. Ultrastructural localisation of  $\beta$ , tau and ubiquitin epitopes in extracellular neurofibrillary tangles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2098-2102.

Tajes M, Gutiérrez-Cuesta J, Folch J, Ferrer I, Caballero B, Smith MA, Casadesus G, Camins A, Pallàs M. Lithium treatment decreases activities of tau kinases in a murine model of senescence. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008; 67: 612-623.

Takahashi H, Egawa S, Piao YS, Hayashi S, Yamada M, Shimohata T, Oyanagi K, Tsuji S. Neuronal nuclear alterations in dentatorubral-pallidolusian atrophy: ultrastructural and morphometric studies of the cerebellar granule cells. *Brain Res* 2001; 919: 12-19.

Takahashi H, Sakamoto J, Ohata H, Miyamoto M. Age-related decrease in spontaneity observed in senescence-accelerated mice (SAMP10) on the involvement of the dopaminergic system in behavioural disorders. *Int Cong Series* 2004; 1260: 309-314.

Takahashi J, Fukuda T, Tanaka J, Minamitani M, Fujigasaki H, Uchihara T. Neuronal intranuclear hyaline inclusion disease with polyglutamine immunoreactive inclusions. *Acta Neuropathol* 2000; 99: 589-594.

Takahashi K, Agari M, Nakamura H. Intra-axonal corpora amylacea in ventral and lateral horns of the spinal cord. *Acta Neuropathol* 1975; 31: 151-158.

Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K. Senescence-accelerated mouse (SAM). A novel murine model of aging. En: Takeda T (ed), *International Congress Series, The SAM Model of Senescence*. Excerpta Medica, Amsterdam, pp. 15-22.

Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K. Senescence-accelerated mouse (SAM). En: Takeda T, Akiguchi I, Higuchi K, Hosokawa M, Hosokawa T, Nomura Y (eds), *The senescence-accelerated mouse (SAM): achievements and future directions*. Elsevier, Amsterdam, 2013, pp. 3-14.

Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K. Senescence-accelerated mouse (SAM): a novel murine model of accelerated senescence. *J Am Geriatr Soc* 1991; 39: 911-919.

Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S, Irino M, Higuchi K, Matsushita T, Tomita Y, Yasuhira K, Hamamoto H, Shimizu K, Ishii M, Yamamuro T. A new murine model of accelerated senescence. *Mech Ageing Dev* 1981; 17: 183-194.

Takeda T. Senescence-Accelerated Mouse (SAM) with Special References to Neurodegeneration Models, SAMP8 and SAMP10 Mice. *Neurochem Res* 2009; 34: 639-659.

Takemura M, Nakamura S, Akiguchi I, Ueno M, Oka N, Ishikawa S, Shimada A, Kimura J, Takeda T. B/A4 proteinlike immunoreactive granular structures in the brain of senescence-accelerated mouse. *Am J Pathol* 1993; 142: 1887-1897.

- Talens RP, Christensen K, Putter H, Willemsen G, Christiansen L, Kremer D, Suchiman HE, Slagboom PE, Boomsma DI, Heijmans BT. Epigenetic variation during the adult lifespan: cross-sectional and longitudinal data on monozygotic twin pairs. *Aging Cell* 2012; 11: 694-703.
- Tanaka J, Okuma Y, Tomobe K, Nomura Y. The age-related degeneration of oligodendrocytes in the hippocampus of the senescence-accelerated mouse (SAM)P8: a quantitative immunohistochemical study. *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 615-618.
- Tanaka M, Collins SR, Toyama BH, Weissman JS. The physical basis of how prion conformations determine strain phenotypes. *Nature* 2006; 442, 585-589.
- Tanaka M, Kohno Y, Nakagawa R, Ida Y, Takeda S, Nagasaki N. Time-related differences in noradrenaline turnover in rat brain regions by stress. *Pharmacol Biochem Behav* 1982; 16: 315-319.
- Tanzi RE, Moir RD, Wagner SL. Clearance of Alzheimer's A $\beta$  peptide: the many roads to perdition. *Neuron* 2004; 43: 605-608.
- Tapia-Arancibia L, Aliaga E, Silhol M, Arancibia S. New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease. *Brain Res Rev.* 2008; 59: 201-220.
- Tatar M, Khazaeli AA, Curtisinger JW. Chaperoning extended life. *Nature* 1997; 390: 30.
- Tateishi J, Nagara H, Ohta M, Matsumoto T, Fukunaga H, Shida K. Intranuclear inclusions in muscle, nervous tissue, and adrenal gland. *Acta Neuropathol* 1984; 63: 24-32.
- Terry RD, Gonatas NK, Weiss M. Ultrastructural studies in Alzheimer's presenile dementia. *Am J Pathol* 1964; 44: 269-297.
- Tha KK, Okuma Y, Miyazaki H, Murayama T, Uehara T, Hatakeyama R, ... Nomura, Y. Changes in expressions of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 in the brain of senescence accelerated mouse (SAM) P8. *Brain Research* 2000; 885: 25-31.
- Thal DR, Rub U, Schultz C, Sassin I, Ghebremedhin E, Del Tredici K, Braak E, Braak H. Sequence of A $\beta$ -protein deposition in the human medial temporal lobe. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; 59: 733-748.
- Thal DR, Sassin I, Schultz C, et al. Fleecy amyloid deposits in the internal layers of the human entorhinal cortex are comprised of N-terminal truncated fragments of A $\beta$ . *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; 58: 210-216.
- Tharp WG, Sarkar IN. Origins of amyloid- $\beta$ . *BMC Genomics* 2013; 14: 290.
- Theofilopoulos AN, Kono DH. Mechanisms and genetics of autoimmunity. *Ann NY Acad Sci* 1998; 841: 225-235.
- Theriault E, Frankenstein UN, Hertzberg EL, Nagy JI. Connexin43 and astrocytic gap junctions in the rat spinal cord after acute compression injury. *J Comp Neurol* 1997; 382, 199-214.
- Thoman ML, Weigle WO. Deficiency in suppressor T cell activity in aged animals. Reconstitution of this activity by interleukin 2. *J Exp Med* 1983; 157: 2184-2189.
- Timiras PS. Comparative Aging, Geriatric Functional Assessment, Aging and Disease. En: Timiras PS (ed), *Physiological basis of aging and geriatrics*. Informa Healthcare, New York, 2007, pp. 23-40.

Timiras PS, Maletta GJ. The Nervous System: structural, biochemical, metabolic and circulatory changes. En: Timiras PS (ed), *Physiological basis of aging and geriatrics*. Informa Healthcare, New York, 2007, pp. 71-88.

Tobita M, Nakamura S, Nagano I, Itoh A, Itoyama Y. DNA single-stranded breaks in hippocampal regions of senescence-accelerated mice (SAMP8/Ta) detected by modified in situ nick translation procedure. En: Takeda T (ed), *International Congress Series, The SAM Model of Senescence*. Excerpta Medica, Amsterdam, pp. 125-128.

Togo T, Sahara N, Yen SH, Cookson N, Ishizawa T, Hutton M, de Silva R, Lees A, Dickson DW. Argyrophilic grain disease is a sporadic 4-repeat tauopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002; 61: 547-556.

Tolnay M, Mistl C, Ipsen S, Probst A. Argyrophilic grains of Braak: occurrence in dendrites of neurons containing hyperphosphorylated tau protein. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1998; 24: 53-59.

Tolnay M, Schwietert M, Monsch AU, Staehelin HB, Langui D, Probst A. Argyrophilic grain disease: distribution of grains in patients with and without dementia. *Acta Neuropathol* 1997; 94: 353-358.

Tomobe K, Okuma Y, Nomura Y. Impairment of CREB phosphorylation in the hippocampal CA1 region of the senescence-accelerated mouse (SAM)P8. *Brain Res* 2007; 1141: 214-217.

Tooyama I, Sasaki K, Oomura Y, Li AJ, Kimura H Effect of acidic fibroblast growth factor on basal forebrain cholinergic neurons in senescence-accelerated mice. *Exp Gerontol* 1997; 32: 171-179.

Toussaint O, Remacle J, Dierick JF, Pascal T, Fripiat C, Zdanov S, Magalhaes JP, Royer V, Chainiaux F. From the Hayflick mosaic to the mosaics of ageing. Role of stress-induced premature senescence in human ageing, *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34: 1415-1429.

Troelstra C, van Gool A, de Wit J, Vermeulen W, Bootsma D, Hoeijmakers JH. ERCC6, a member of a subfamily of putative helicases, is involved in Cockayne's syndrome and preferential repair of active genes. *Cell* 1992; 71: 939-953.

Troen BR. The biology of Aging. *Mt Sinai J Med* 2003; 70: 3-22.

Trojanowski JQ, Goedert M, Iwatsubo T, Lee VM. Fatal attractions: abnormal protein aggregation and neuron death in Parkinson's disease and Lewy body dementia. *Cell Death Differ* 1998; 5: 832-837.

Trottier Y, Lutz Y, Stevanin G, Imbert G, Devys D, Cancel G, Saudou F, Weber C, David G, Tora L, Agid Y, Brice A, Mandel JL. Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias. *Nature* 1995; 378: 403-406.

Tsukamoto S, Kuma A, Mizushima N. The role of autophagy during the oocyte-to-embryo transition. *Autophagy*. 2008; 4: 1076-1078.

Turker MS, Martin GM. Genetics of human disease, longevity and aging. En: Hazzard WR, Blass JP, Ettinger WH, Jr, Halter JB (eds). *Principles of geriatric medicine and gerontology*. McGraw-Hill, London, 1999, pp. 21-44.

Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol* 2003; 70: 1-32.

## U

Ueno M, Akiguchi I, Hosokawa M, Shinnou M, Sakamoto H, Takemura M, Keiichi Higuchi K. Age-related changes in the brain transfer of blood-borne horseradish peroxidase in the hippocampus of senescence-accelerated mouse. *Acta Neuropathologica*; 2001; 93: 233-240.

Ueno M, Akiguchi I, Yagi H, Naiki H, Fujibayashi Y, Kimura J, Takeda T. Accelerated age-related increase of brain transfer of serum albumin in accelerated senescence prone SAM-P/8 mice with deficits in learning and memory. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 1993; 16: 233-248.

Ueno M, Sakamoto H, Kanenishi K, Onodera M, Akiguchi I, Hosokawa M. Ultrastructural and permeability features of microvessels in the hippocampus, cerebellum and pons of senescence-accelerated mice (SAM). *Neurobiol Aging* 2001; 22: 469-478.

## V

Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, González-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RJ, Dallapiccola B, Auburger G, Wood NW. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 2004; 304: 1158-1160.

Van der Schouw YT, van der Graaf Y, Steyerberg EW, Eijkemans JC, Banga JD. Menopause as a risk factor for cardiovascular mortality. *Lancet* 1996; 347: 714-718.

Van Groen T, Kiliaan AJ, Kadish I. Deposition of mouse amyloid  $\beta$  in human APP/PS1 double and single AD model transgenic mice. *Neurobiol Dis* 2006; 23: 653-662.

Vance C, Rogelj B, Hortobagyi T, De Vos KJ, Nishimura AL, Sreedharan J, Hu X, Smith B, Ruddy D, Wright P, Ganesalingam J, Williams KL, Tripathi V, Al-Saraj S, Al-Chalabi A, Leigh PN, Blair IP, Nicholson G, de Bellerocche J, Gallo JM, Miller CC, Shaw CE. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* 2009; 323: 1208-1211.

Vanhooren V, Libert C. The mouse as a model organism in aging research: usefulness, pitfalls and possibilities. *Ageing Res Rev* 2013; 12: 8-21.

Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M. B-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 1999; 286: 735-741.

Vassar R. BACE1: the  $\beta$ -secretase enzyme in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 2004; 23: 105-114.

Vechio JD, Buijn LI, Xu Z, Brown RH Jr, Cleveland DW. Sequence variants in human neurofilament proteins: absence of linkage to familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1996; 40: 603-110.

Verkhatsky A. Calcium and neuronal ageing. *Trends Neurosci* 1998; 21: 2-7.

Veurink G, Liu D, Taddei K, Perry G, Smith MA, Robertson TA, Hone E, Groth DM, Atwood CS, Martins RN. Reduction of inclusion body pathology in ApoE-deficient mice fed a combination of antioxidants. *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 1070-1077.

Viña J, Borrás C, Miquel J. Theories of ageing. *IUBMB Life* 2007; 59: 249-254.

Vollmers HP, Brändlein S. Natural IgM antibodies: the orphaned molecules in immune surveillance. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58: 755-765.

Vollmers HP, Brändlein S. Tumors: too sweet to remember? *Mol Cancer* 2007; 6: 78.

Von Bergen M, Barghorn S, Muller SA, Pickhardt M, Biernat J, Mandelkow EM, Davies P, Aebi U, Mandelkow E. The core of tau-paired helical filaments studied by scanning transmission electron microscopy and limited proteolysis. *Biochemistry* 2006; 45: 6446-6457.

Vonsattel JP, Myers RH, Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED, Richardson EP Jr. Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1985; 44: 559-577.

## W

Wakabayashi A, Utsuyama M, Hosoda T, Sato K, Hirokawa K. Differential age effect of oral administration of an antigen on antibody response: an induction of tolerance in young mice but enhancement of immune response in old mice. *Mech. Ageing Dev* 1999; 109: 191-201.

Wakabayashi K, Matsumoto K, Takayama K, Yoshimoto M, Takahashi H. NACP, a presynaptic protein, immunoreactivity in Lewy bodies in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 1997; 239: 45-48.

Wakayama I, Kihira T, Yoshida S, Garruto RM. Rare neuropil threads in amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia on Guam and in the Kii Peninsula of Japan. *Dementia* 1993; 4: 75-80.

Walford RL. Immunologic theory of aging: current status. *Fed Proc* 1974; 33: 2020-2027.

Wallace DC, Zheng XX, Lott MT, Shoffner JM, Hodge JA, Kelley RI, Epstein CM, Hopkins LC. Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): genetic, pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease. *Cell* 1988; 55: 601-610.

Wang CM, Tsai SN, Yew TW, Kwan YW, Ngai SM. Identification of histone methylation multiplicities patterns in the brain of senescence-accelerated prone mouse 8. *Biogerontology* 2010; 11: 87-102.

Wang H, Shlomchik MJ. Maternal Ig mediates neonatal tolerance in rheumatoid factor transgenic mice but tolerance breaks down in adult mice. *J Immunol* 1998; 160: 2263-2271.

Wang IF, Wu LS, Chang HY, Shen CK. TDP-43, the signature protein of FTL-D, is a neuronal activity-responsive factor. *J Neurochem* 2008b; 105: 797-806.

Wang JZ, Liu F. Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. *Prog Neurobiol* 2008; 85: 148-175.

Wang RH, Sengupta K, Li C, Kim HS, Cao L, Xiao C, Kim S, Xu X, Zheng Y, Chilton B, Jia R, Zheng ZM, Appella E, Wang XW, Ried T, Deng CX. Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice. *Cancer Cell* 2008; 14: 312-323.

Wang Y, Martínez-Vicente M, Kruger U, Kaushik S, Wong E, Mandelkow EM, Cuervo AM, Mandelkow E. Tau fragmentation, aggregation and clearance: the dual role of lysosomal processing. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 4153-4170.

Wang Y, Sarika Garg, Mandelkow EM, Mandelkow E. Proteolytic processing of tau. *Biochem Soc Trans* 2010; 38: 955-961.

Wei X, Zhang Y, Zhou J. Differential display and cloning of the hippocampal gene mRNAs in senescence accelerated mouse. *Neurosci Lett* 1999; 275: 17-20.

Weiler R, Lassmann H, Fischer P, Jellinger K, Winkler H. A high ratio of chromogranin A to synaptin/synaptophysin is a common feature of brains in Alzheimer and Pick disease. *FEBS Lett* 1990; 263: 337-339.

Weissmann C. The state of the prion. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 861-871.

Weller RO, Massey A, Kuo YM, Roher AE. Cerebral amyloid angiopathy: accumulation of A $\beta$  in interstitial fluid drainage pathways in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 903: 110-117.

Weller RO, Massey A, Newman TA, Hutchings M, Kuo YM, Roher AE. Cerebral amyloid angiopathy: amyloid- $\beta$  accumulates in putative interstitial fluid drainage pathways in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1998; 153: 725-733.

Wellington CL, Ellerby LM, Gutekunst CA, Rogers D, Warby S, Graham RK, Loubser O, van Raamsdonk J, Singaraja R, Yang YZ, Gafni J, Bredesen D, Hersch SM, Leavitt BR, Roy S, Nicholson DW, Hayden MR. Caspase cleavage of mutant huntingtin precedes neurodegeneration in Huntington's disease. *J Neurosci* 2002; 22: 7862-7872.

White T, Mandel U, Orntoft TF, Dabelsteen E, Karkov J, Kubeja M, Hakomori S, Clausen H. Murine monoclonal antibodies directed to the human histo-blood group A transferase (UDP-GalNAc:Fuc  $\alpha$  1-2Gal  $\alpha$  1-3-N-acetylgalactosaminyltransferase) and the presence therein of N-linked histo-blood group A determinant. *Biochemistry* 1990; 29: 2740-2747.

Wilhelmus MM, Boelens WC, Otte-Holler I, Kamps B, de Waal RM, Verbeek MM. Small heat shock proteins inhibit amyloid- $\beta$  protein aggregation and cerebrovascular amyloid- $\beta$  protein toxicity. *Brain Res* 2006; 1089: 67-78.

Wilkinson JE, Burmeister L, Brooks SV, Chan CC, Friedline S, Harrison DE, Hejtmancik JF, Nadon N, Strong R, Wood LK, Woodward MA, Miller RA. Rapamycin slows aging in mice. *Aging Cell* 2012; 11: 675-682.

Williams GC. Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence. *Evolution* 1957; 11: 398-411.

Wilson RS, Li Y, Aggarwal NT, Barnes LL, McCann JJ, Gilley DW, Evans DA. Education and the course of cognitive decline in Alzheimer disease. *Neurology* 2004; 63: 1198-1202.

Winter BD, Sasida LM, Bussey TJ. Object recognition memory: neurobiological mechanism of encoding, consolidation and retrieval. *Neurosci Biobehav Rev* 2008; 32: 1055-1070.

Winton MJ, Igaz LM, Wong MM, Kwong LK, Trojanowski JQ, Lee VM. Disturbance of nuclear and cytoplasmic TAR DNA-binding protein (TDP-43) induces disease-like redistribution, sequestration, and aggregate formation. *J Biol Chem* 2008; 283: 13302-13309.

Wirak DO, Bayney R, Ramabhadran TV, Fracasso RP, Hart JT, Hauer PE, Hsiau P, Pekar SK, Scangos GA, Trapp BD, Unterbeck AJ. Deposits of amyloid- $\beta$  protein in the central nervous system of transgenic mice. *Science* 1991; 253: 323-325.



Wischik CM, Novak M, Thogersen HC, Edwards PC, Runswick MJ, Jakes R, Walker JE, Milstein C, Roth M, Klug A. Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 4506-4510.

Wisniewski HM, Merz PA, Iqbal K. Ultrastructure of paired helical filaments of Alzheimer's neurofibrillary tangle. *J Neuropathol Exp Neurol* 1984; 43: 643-656.

Wisniewski HM, Sadowski M, Jakubowska-Sadowska K, Tarnawski M, Wegiel J. Diffuse, lake-like amyloid- $\beta$  deposits in the paraventricular layer of the presubiculum in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; 57: 674-683.

Wisniewski K, Jervis GA, Moretz RC, Wisniewski HM. Alzheimer neurofibrillary tangles in diseases other than senile and presenile dementia. *Ann Neurol* 1979; 5: 288-294.

Witte AV, Fobker M, Gellner R, Knecht S, Flöel A. Caloric restriction improves memory in elderly humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 1255-1260.

Wolff JR, Stuke K, Missler M, Tytko H, Schwarz P, Rohlmann A, Chao TI. Autocellular coupling by gap junctions in cultured astrocytes: a new view on cellular autoregulation during process formation. *Glia* 1998; 24: 121-140.

Wolff M, Benhassine N, Costet P, Hen R, Segu L, Buhot MC. Delay-dependent working memory impairment in young-adult and aged 5-HT1BKO mice as assessed in a radial-arm water maze. *Learn Mem* 2003; 10: 401-409.

Wood JG, Mirra SS, Pollock NJ, Binder LI. Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 4040-4043.

Wood JG, Rogina B, Lavu S, Howitz K, Helfand SL, Tatar M, D. Sinclair. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* 2004; 430: 686-689.

Woodford B, Tso MO. An ultrastructural study of the corpora amylacea of the optic nerve head and retina. *Am J Ophthalmol* 1980; 90: 492-502.

Woodruff-Pak DS. Animal models of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *J Alzheimers Dis* 2008; 15: 507-521.

World Health Organization Centre for Health Development. A Glossary of Terms for Community Health Care and Services for Older Persons. World Health Organization, Kobe Japan, 2004.

Worman HJ. Nuclear lamins and laminopathies. *J Pathol* 2012; 226: 316-325.

Wright WE, Shay JW. Historical claims and current interpretations of replicative aging. *Nature Biotechnol* 2002; 20: 682-688.

Wright WE, Shay JW. Telomere dynamics in cancer progression and prevention: fundamental differences in human and mouse telomere biology. *Nature Med* 2000; 6: 849-851.

Wu Y, Zhang AQ, Yew DT. Age related changes of various markers of astrocytes in senescence-accelerated mice hippocampus. *Neurochem Int* 2005; 46: 565-574.

## X

Xia J, Lee DH, Taylor J, Vandelft M, Truant R. Huntingtin contains a highly conserved nuclear export signal. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 1393-1403.

Xu M, Shibayama H, Kobayashi H, Yamada K, Ishihara R, Zhao P, Takeuchi T, Yoshida K, Inagaki T, Nokura K. Granulovacuolar degeneration in the hippocampal cortex of aging and demented patients: a quantitative study. *Acta Neuropathol* 1992; 85: 1-9.

Xu X, Qiao W, Linke SP, Cao L, Li WM, Furth PA, Harris CC, Deng CX. Genetic interactions between tumor suppressors Brca1 and p53 in apoptosis, cell cycle and tumorigenesis. *Nat Genet* 2001; 28: 266-271.

## Y

Yagi H, Irino M, Matsushita T, Katoh S, Umezawa M, Tsuboyama T, Hosokawa M, Akiguchi I, Tokunaga R, Takeda T. Spontaneous spongy degeneration of the brain stem in SAM-P/8 mice, a newly developed memory-deficient strain. *J Neuropathol Exp Neurol* 1989; 48: 577-590.

Yagi H, Katoh S, Akiguchi I, Takeda T. Age-related deterioration of ability of acquisition in memory and learning in senescence accelerated mouse: SAM-P/8 as an animal model of disturbances in recent memory. *Brain Res* 1988; 474: 86-93.

Yagishita S, Itoh Y, Nan W, Amano N. Reappraisal of the fine structure of Alzheimer's neurofibrillary tangles. *Acta Neuropathol* 1981; 54: 239-246.

Yamada S, Uchida S, Ohkura T, Kimura R, Yamaguchi M, Suzuki M, Yamamoto M. Alterations in calcium antagonist receptors and calcium content in senescent brain and attenuation by nimodipine and nifedipine. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 277: 721-727.

Yamada T, McGeer PL, McGeer EG. Lewy bodies in Parkinson's disease are recognized by antibodies to complement proteins. *Acta Neuropathol* 1992; 84: 100-104.

Yamaguchi H, Hirai S, Morimatsu M, Shoji M, Harigaya Y. Diffuse type of senile plaques in the brains of Alzheimer-type dementia. *Acta Neuropathol* 1988; 77: 113-119.

Yamaguchi H, Nakazato Y, Kawarabayashi T, Ishiguro K, Ihara Y, Morimatsu M, Hirai S. Extracellular neurofibrillary tangles associated with degenerating neurites and neuropil threads in Alzheimer type dementia. *Acta Neuropathol* 1991; 81: 603-609.

Yamaguchi H, Nakazato Y, Shoji M, Ihara Y, Hirai S. Ultrastructure of the neuropil threads in the Alzheimer brain: their dendritic origin and accumulation in the senile plaques. *Acta Neuropathol* 1990; 80: 368-374.

Yamaguchi H, Nakazato Y, Shoji M, Okamoto K, Ihara Y, Morimatsu M, Hirai S. Secondary deposition of  $\beta$  amyloid within extracellular tangles in Alzheimer-type dementia. *Am J Pathol* 1991; 138: 699-705.

Yamaguchi Y, Saito K, Matsuno T, Takeda K, Hino M. Effects of ZSET1446/ST101 on cognitive deficits and Amyloid- $\beta$  deposition in the senescence accelerated prone mouse brain. *J Pharmacol Sci* 2012; 119: 160-166.

- Yang DS, McLaurin J, Qin K, Westaway D, Fraser PE. *Eur J Biochem* 2000; 267: 6692-6698.
- Yankner BA, Lu T, Loerch P. The aging brain. *Annu Rev Pathol* 2008; 3: 41-66.
- Yasuhara O, Kawamata T, Aimi Y, McGeer EG, McGeer PL. Expression of chromogranin A in lesions in the central nervous system from patients with neurological diseases. *Neurosci Lett* 1994; 170: 13-16.
- Yasui F, Ishibashi M, Matsugo S, Shosuke Kojoc, Oomura Y, Sasaki K. Brain lipid hydroperoxide level increases in senescence-accelerated mice at an early age. *Neurosci Lett* 2003; 350: 66-68.
- Ye X, Meeker HC, Kozlowski P, Carp RI. The occurrence of vacuolation 2004; 995: 158-166.
- Yokota O, Terada S, Ishizu H, et al. Variability and heterogeneity in Alzheimer's disease with cotton wool plaques: a clinicopathological study of four autopsy cases. *Acta Neuropathol* 2003; 106: 348-356.
- Yokoyama T, Kusunoki JI, Hasegawa K, Sakai H, Yagishita S. Distribution and dynamic process of neuronal cytoplasmic inclusion (NCI) in MSA: correlation of the density of NCI and the degree of involvement of the pontine nuclei. *Neuropathology* 2001; 21: 145-154.
- Yoshikai S, Sasaki H, Dohura K, Furuya H, Sakaki Y. Genomic organization of the human amyloid  $\beta$ -protein precursor gene. *Gene* 1990; 87: 257-263.
- Yu CE, Oshima J, Fu YH, Wijsman EM, Hisama F, Alisch R, Matthews S, Nakura J, Miki T, Ouais S, Martin GM, Mulligan J, Schellenberg GD. Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* 1996; 272: 258-262.
- Yuan M, Wen-Xia Z, Jun-Ping C, Yong-Xiang Z. Age-related changes in the oestrous cycle and reproductive hormones in senescence-accelerated mouse. *Reprod Fertil Dev* 2005; 17: 507-512.

## Z

- Zecca L, Youdim MB, Riederer P, Connor JR, Crichton RR. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5: 863-873.
- Zerboni L, Sobel R, Lai M, Triglia R, Steain M, Abendroth A, Arvin A. Apparent expression of varicella-zoster virus proteins in latency resulting from reactivity of murine and rabbit antibodies with human blood group a determinants in sensory neurons. *J Virol* 2012; 86: 578-583.
- Zhang C, Cuervo AM. Restoration of chaperone-mediated autophagy in aging liver improves cellular maintenance and hepatic function. *Nat Med* 2008; 14: 959-965.
- Zhang G, Zhang B, Fu X, Tomozawa H, Matsumoto K, Higuchi K, Mori M. Senescence-Accelerated Mouse (SAM) strains have a spontaneous mutation in the *Abcb1a* gene. *Exp Anim* 2008; 57: 413-417.
- Zhang Y, He JS, Wang X, Wang J, Bao FX, Pang SY, ... Hong T. Administration of amyloid- $\beta$ 42 oligomer-specific monoclonal antibody improved memory performance in SAMP8 mice. *J Alzheimers Dis* 2011; 23: 551-561.
- Zhao XH, Kitamura Y, Nomura Y. Age-related changes in NMDA-induced [3H]acetylcholine release from brain slices of senescence-accelerated mouse. *Int J Dev Neurosc* 1992; 10: 121-129.

Zhao XH, Nomura Y. Age-related changes in uptake and release on L-[3H]noradrenaline in brain slices of senescence accelerated mouse. *Int J Dev Neurosci* 1990; 8: 267-272.

Zhong L, D'Urso A, Toiber D, Sebastian C, Henry RE, Vadysirisack DD, Guimaraes A, Marinelli B, Wikstrom JD, Nir T, Clish CB, Vaitheesvaran B, Iliopoulos O, Kurland I, Dor Y, Weissleder R, Shirihai OS, Ellisen LW, Espinosa JM, Mostoslavsky R. The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1 $\alpha$ . *Cell* 2010; 140: 280-293.

Zhu C, Bogue MA, Lim DS, Hasty P, Roth DB. Ku86-deficient mice exhibit severe combined immunodeficiency and defective processing of V (D) J recombination intermediates. *Cell* 1996; 86: 379-389.

Zinszner H, Sok J, Immanuel D, Yin Y, Ron D. TLS (FUS) binds RNA in vivo and engages in nucleocytoplasmic shuttling. *J Cell Sci* 1997; 110: 1741-1750.

Zuendorf G, Kerrouche N, Herholz K, Baron JC. Efficient principal component analysis for multivariate 3D voxel-based mapping of brain functional imaging data sets as applied to FDG-PET and normal aging. *Hum Brain Mapp* 2003; 18: 13-21.

