



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

**Resiliencia a la enfermedad de Alzheimer:
estudio postmortem de marcadores**

Tesis doctoral

Autora: Isabel Barroeta Espar

Directores: Dra. Teresa Gómez Isla

Dr. Jaime Kulisevsky Bojarski

Dr. Fabián Octavio Arenas Ríos

Tutor: Dr. Josep María Grau Veciana

Departamento de Medicina
Universidad Autònoma de Barcelona
Barcelona

Massachusetts General Hospital
Harvard University
Boston

Dedicatoria

A mi padre, por brujo.

A mi hermano Néstor, porque lo recuerdo.

A Leopoldo López, preso político venezolano, por su resiliencia.

Agradecimientos

A Teresa, por regalarme el mejor de los mundos posibles.

A Jaime, Josep y Fabián, por tejer realidades.

A Elena, por su elegancia de espíritu.
Por dejar entrar los planetas por la ventana.
Por neuroprotectora.

A Levi, por su genio y desprendimiento.

A Alberto, por su abnegación y destello.

A Álvaro, por ángel.

A Katarzyna, por sus códigos.

A Bea, por abrir la puerta.

A Avery, por cerrarla.

Índice

Resumen	
Abreviaturas	
Lista de tablas	
Lista de figuras	
1. Capítulo primero: Introducción	1
1.1. ¿Qué es resiliencia?	1
1.2. Conceptos fundamentales de la enfermedad de Alzheimer	4
i. Historia	4
ii. Epidemiología	7
iii. Genética	8
iv. Marcadores patológicos clásicos	11
v. Inflamación	16
vi. Enzima glucógeno sintetasa kinasa-3	20
1.3 Visión actual de la enfermedad de Alzheimer	21
2. Capítulo segundo. Objetivos	25
2.1. Planteamiento del problema	25
2.2. Hipótesis y objetivos	26
i. Hipótesis 1: sobre la existencia de resiliencia a la patología de la enfermedad de Alzheimer	26
Objetivo 1a	
Objetivo 1b	
ii. Hipótesis 2: sobre el valor predictivo de las especies solubles versus fibrilares de amiloide beta y tau con respecto al estado cognitivo	26
Objetivo 2a	
Objetivo 2b	
iii. Hipótesis 3: sobre la existencia de una respuesta inflamatoria propia de la resiliencia	27
Objetivo 3a	
Objetivo 3b	
3. Capítulo tercero: Materiales y métodos	28
3.1. Muestra	28
i. Estudio neuropatológico	28
ii. Valoración clínica	30
iii. Grupos	30
3.2. Áreas cerebrales	31
i. Surco temporal superior	31
ii. Corteza entorrinal	32
iii. Ambas regiones	32
3.3. Métodos generales	33
i. Neuropatología cuantitativa	33
- Inmunohistoquímica / Inmunofluorescencia	
- Estereología	
ii. Bioquímica	39
- Extracción de sinaptoneurosomas	
- Western blot	
- ELISA	
3.4. Parámetros	44

i.	Amiloide beta	44
	- Carga de placas de amiloide beta, placas oligoméricas y placas densas cuantificada por análisis de imágenes de microscopio.	
	- Fracciones de amiloide beta soluble citosólico y sináptico cuantificados por Western blot	
	- Especies solubles de amiloide beta 40 y amiloide beta 42 citosólico y sináptico cuantificadas por ELISA	
ii.	Tau	47
	- Ovillos neurofibrilares totales, intraneuronales y extraneuronales cuantificados por estereología	
	- Fracciones de tau total y tau fosforilada soluble citosólica y sináptica cuantificadas por Western blot	
	- Especies solubles de tau total y tau fosforilada soluble citosólica y sináptica cuantificadas por ELISA	
iii.	Glucógeno sintetasa kinasa-3- β citosólica y sináptica cuantificadas por Western blot	48
iv.	Número de neuronas cuantificado por estereología y grosor cortical cuantificado mediante análisis de imágenes de microscopio	49
v.	Trayectoria axonal y neuritas cuantificadas por análisis de imágenes de microscopio	50
vi.	Astrocitos reactivos cuantificados por estereología	50
vii.	Microglía activada cuantificada por estereología	51
3.5.	Análisis estadístico general	51
3.6.	Perfil de citoquinas	52
i.	Ensayo multiplex	52
ii.	Cuantificación de citoquinas	53
iii.	Normalización de los datos	54
iv.	Análisis con métodos de biología de sistemas: regresión de mínimos cuadrados parciales	55
4.	Capítulo cuarto: Resultados	59
4.1.	Identificación de marcadores de resiliencia	59
i.	Placas de amiloide beta	59
ii.	Ovillos neurofibrilares	60
iii.	Integridad neuronal	60
iv.	Resumen	69
4.2.	Valor predictivo de las formas solubles y fibrilares de amiloide beta y tau	70
i.	Amiloide beta	70
ii.	Tau	73
iii.	GSK-3 β	74
iv.	Resumen	84
4.3.	Caracterización de la respuesta inflamatoria	85
i.	Astrocitos reactivos	85
ii.	Microglía activada	86
iii.	Citoquinas	86
iv.	Resumen	104
5.	Capítulo quinto: Discusión	105

6. Limitaciones del estudio	124
7. Perspectivas	125
8. Conclusiones	126
9. Referencias bibliográficas	127
10. Anexos	135
10.1. Anexo 1	135
10.2. Anexo 2	148

Resumen

Estudios de correlación clínico-patológica y de neuroimagen de amiloide beta *in vivo* han mostrado que algunos individuos no sufren demencia a pesar de tener abundantes depósitos de amiloide beta y tau. La caracterización del fenotipo neuropatológico de estos casos únicos ayudaría a demostrar si existe una resiliencia a la enfermedad de Alzheimer. En este estudio hemos realizado el análisis postmortem más exhaustivo hecho hasta ahora de los casos que presentan discordancia entre los datos neuropatológicos y clínicos. Hemos reunido 90 muestras de cerebro humano que incluían 33 sujetos potencialmente resilientes—individuos cuyos cerebros al fallecer presentaban abundante patología de la enfermedad de Alzheimer pero que nunca desarrollaron síntomas de enfermedad en vida— y hemos estudiado dos áreas anatómicas de interés desde el punto de vista patológico y bioquímico: el surco temporal superior y la corteza entorrinal. En apoyo a la hipótesis de la resiliencia, hemos confirmado que hay individuos con una carga de amiloide y tau similar a la de sujetos dementes pero que no desarrollan demencia. Marcadores específicos de resiliencia son: preservación del número de neuronas y de la morfología axonal, menor carga de placas densas y oligoméricas de amiloide beta, menor acúmulo de especies solubles de tau hiperfosforilado en la sinapsis y, por último, menor número de astrocitos reactivos y de células microgliales activadas que secretan un perfil de citoquinas único que podría ser neuroprotector. El descubrimiento más importante en esta cohorte es que los oligómeros sinápticos de tau hiperfosforilado y la respuesta inflamatoria predicen la demencia con más fiabilidad que las placas de A β y los ovillos neurofibrilares. Definir los marcadores de resiliencia es muy importante en el contexto actual en el que los ensayos clínicos han fracasado reiteradamente. Gracias a la neuroimagen de amiloide beta y tau ya es posible la detección de las lesiones de la enfermedad de Alzheimer *in vivo* incluso en la fase preclínica. Debemos ser capaces de predecir con certeza la evolución clínica de sujetos asintomáticos a largo plazo para identificar quiénes podrían beneficiarse de un tratamiento preventivo secundario. En resumen, la detección de los marcadores de resiliencia puede ayudar a predecir si un individuo va a desarrollar una demencia o va a permanecer sin síntomas, cuantificar efectos terapéuticos y encontrar nuevas dianas neuroprotectoras.

Abstract

Clinico-pathological correlations and tomography imaging of amyloid beta with positron emission imaging have shown that some individuals tolerate substantial amounts of Alzheimer's pathology in their brains without experiencing dementia. The characterization of the neuropathological phenotype of these unique cases is necessary to demonstrate the existence of resilience to Alzheimer's pathology. In this study we have carried the most exhaustive postmortem analysis of mismatched subjects. Detailed histopathological and biochemical assessments were conducted in the superior temporal sulcus and entorhinal cortex of 90 brains, including 33 from non-demented individuals at the time of death but whose post-mortem examination demonstrated significant amounts of Alzheimer's changes, hence indicating that they are potentially resilient. Our results confirm that some individuals can accumulate equivalent loads of amyloid- β plaques and tangles to those found in demented Alzheimer's cases without experiencing dementia thus supporting the existence of resiliency to Alzheimer's disease. Resilient cases exhibited the following markers: preservation of neuron numbers and axonal geometry, lower burdens of fibrillar thioflavin-S positive plaques and oligomeric amyloid- β deposits, and fewer reactive astrocytes and activated microglial cells secreting a unique perhaps neuroprotective cytokine profile. The most important discovery in this cohort is that synaptic hyperphosphorylated tau oligomers and the inflammatory response predict dementia more reliably than amyloid beta plaques and neurofibrillary tangles. Resilience marker identification is very important at the present time because clinical trials have repeatedly failed. Neuroimaging of amyloid beta amyloid and tau allows us to detect lesions of Alzheimer's disease even in the preclinical phase. We need to accurately predict the clinical course of long-term asymptomatic subjects to identify those who would benefit from preventive secondary treatment. In summary, the detection of markers of resilience can contribute to predict whether an individual will develop dementia or will remain without symptoms, quantify therapeutic neuroprotective effects and find new therapeutics targets for Alzheimer's disease.

Lista de abreviaturas

A β	Beta amyloid	Amiloide beta
AD	Alzheimer's Disease	Enfermedad de Alzheimer
ADRDA	Alzheimer's Disease and Related Disorders Association	Asociación para la Enfermedad de Alzheimer's y Trastornos Relacionados
APOE	Apolipoprotein	Apolipoproteína
APP	Amyloid Precursor Protein	Proteína Precursora del Amiloide
APP- β	Amyloid Precursor Protein beta	Proteína Precursora del Amiloide Beta
BACE	β -site APP cleaving enzyme	Enzima de Escisión del Sitio β de la APP
BIN1	Bridging Integrator 1	Integradora de Puente 1
CE	Entorrinal Cortex	Corteza Entorrinal
CERAD	Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease	Consortio para Establecer un Registro de la Enfermedad de Alzheimer
CR1	Complement Receptor 1	Receptor del Complemento 1
CTRL	Control	Control
EA	Alzheimer's Disease	Enfermedad de Alzheimer
GFAP	Glial fibrillary acidic protein	Proteína Ácida Fibrilar Glial
GSK-3 β	Glucógeno sintetasa 3 β	Glycogen synthase 3 β
GWAS	Genome-Wide Association Study	Estudio de la Asociación Genómica

HP	High Pathology	Patología alta
IP	Intermediate Pathology	Patología Intermedia
LCR	-	Líquido Cefalorraquídeo
NIA-AA	National Institute on Aging - Alzheimer's Association	Instituto Nacional del Envejecimiento - Asociación del Alzheimer
NIA-Reagan	National Institute on Aging - Reagan	Instituto Nacional del Envejecimiento - Reagan
NMDA	N-methyl-D-aspartate	N-metyl-D-aspartato
p-Tau	phospho-tau	fosfo-tau
PET	Positron emission tomography	Tomografía por Emisión de Positrones
PET-PIB	Tomografía por Emisión de Positrones con compuesto de Pittsburgh B	Tomografía por Emisión de Positrones with Pittsburgh B compound
PHF	Paired Helical Filaments	Filamentos Pareados Helicoidales
PICALM	Phosphatidylinositol-Binding Clathrin Assembly	Complejo de Clatrina Fosfatidylinositol
PSEN	Presenilin Gene	Gen preselinina
RMN	Nuclear Magnetic Resonance	Resonancia Magnética Nuclear
STS	Superior Temporal Sulcus	Surco Temporal Superior

Lista de tablas

Tabla 1. Factores epidemiológicos asociados con la enfermedad de Alzheimer...	7
Tabla 2. Diagnóstico neuropatológico de la enfermedad de Alzheimer.....	29
Tabla 3. Grupos de estudio.....	31
Tabla 4. Anticuerpos primarios de inmunohistoquímica / inmunofluorescencia...	37
Tabla 5. Anticuerpos primarios de Western blot.....	43
Tabla 6. Resumen materiales y métodos.....	57
Tabla 7. Estudio neuropatológico cuantitativo en el surco temporal superior.....	102
Tabla 8. Estudio neuropatológico cuantitativo en la corteza entorrinal.....	103
Tabla 9. Citoquinas con valor predictivo de resiliencia.....	119

Lista de figuras

Figura 1. Historia de la enfermedad de Alzheimer.....	6
Figura 2. Genes asociados al metabolismo del amiloide beta.....	10
Figura 3. Regiones de interés genético en la enfermedad de Alzheimer.....	11
Figura 4. Modelo de la progresión de la enfermedad de Alzheimer.....	14
Figura 5. Estadios de Braak.....	15
Figura 6. Visión actual de la enfermedad de Alzheimer.....	24
Figura 7. Regiones anatómicas de interés.....	33
Figura 8. Método general de la inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.....	34
Figura 9. Aumento de la señal con conjugado de avidina-biotina.....	35
Figura 10. Muestreo usando el método del disector óptico.....	38
Figura 11. Extracción de sinaptoneurosomas.....	40
Figura 12. Técnica de Western blot.....	41
Figura 13. Técnica de ELISA Sándwich.....	44
Figura 14. ELISA de amiloide beta.....	47
Figura 15. Lavado automático en ensayo Bioplex.....	53
Figura 16. Análisis con regresión de mínimos cuadrados parciales.....	56
Figura 17. Carga de placas de amiloide beta.....	64
Figura 18. Número de ovillos neurofibrilares.....	65
Figura 19. Número de neuronas y grosor cortical.....	66
Figura 20. Razón de ovillos intra y extraneuronales/ovillos neurofibrilares.....	67
Figura 21. Trayectoria axonal.....	68
Figura 22. Correlaciones de la carga de placas de amiloide beta.....	76
Figura 23. Carga de placas densas y correlaciones.....	77
Figura 24. Carga de placas oligoméricas y correlaciones.....	78
Figura 25. Análisis bioquímico de especies solubles de amiloide beta.....	79
Figura 26. Correlación del número de ovillos neurofibrilares.....	80
Figura 27. Análisis bioquímico de las especies solubles de tau.....	81
Figura 28. Correlaciones de tau fosforilada.....	82
Figura 29. Análisis bioquímico de GSK-3 β	83
Figura 30. Número de astrocitos y de células microgliales.....	94
Figura 31. Correlaciones del número de astrocitos y de células microgliales.....	95
Figura 32. D-PLRS de patología en la corteza entorrinal.....	96
Figura 33. D-PLRS de patología en el surco temporal superior.....	97
Figura 34. Panel de datos de citoquinas y de patología.....	98
Figura 35. D-PLRS de citoquinas.....	99
Figura 36. Correlaciones de patología y de bioquímica con citoquinas.....	100
Figura 37. Citoquinas con valor predictivo de resiliencia.....	101

Capítulo primero. Introducción

1.1. ¿Qué es resiliencia?

El diccionario de la lengua de la Real Academia Española define así la resiliencia: del inglés *resilience*, y éste deriva del latín *resiliens*, *-entis*, part. pres. act. de *resilire* 'saltar hacia atrás, rebotar', 'replegarse'.

1. Capacidad de adaptación de un ser vivo frente a un agente perturbador o un estado o situación adversos.
2. Capacidad de un material, mecanismo o sistema para recuperar su estado inicial cuando ha cesado la perturbación a la que había estado sometido.

El término resiliencia se originó en el campo de la física para describir la adaptación que tiene un material frente a una agresión. Posteriormente, su uso se generalizó al campo de la psicología para referirse a la capacidad de adaptación, y superación, que tienen ciertas personas frente a la adversidad. Podemos, entonces, también hablar de “resiliencia” cuando un individuo desarrolla ciertos rasgos fenotípicos que le permiten mantener su homeostasis a pesar de un fenómeno patológico subyacente. La distinción con el término *resistencia* consiste en que el agente agresor sigue presente en la resiliencia, al contrario que en la resistencia, en la que el agente perturbador se evita o elimina.

La enfermedad de Alzheimer (EA) está definida por la presencia de dos marcadores patológicos fundamentales: las placas de amiloide beta (A β) y los ovillos neurofibrilares. Desde el punto de vista clínico es una demencia progresiva, irreversible e incapacitante.

Sin embargo, la correlación entre las lesiones patológicas y los síntomas cognitivos dista de ser perfecta, y desde que fue descrita por vez primera hace más de cien años, la EA sigue generando interés debido a las preguntas

que permanecen sin respuesta en relación a su patogénesis y a su curso clínico.

En 1968 Tomilson et al. comunicaron la existencia de cognición normal a pesar de la presencia de lesiones patológicas de EA (Tomlinson et al., 1968). Se trata de la primera vez que se describe un posible caso de resiliencia a la patología de la EA. Desde entonces, se han reportado numerosos casos y series de casos sin síntomas aparentes a pesar de la presencia de patología Alzheimer (Crystal et al., 1988; Dickson et al., 1992; Katzman et al., 1988; Terry et al., 1991; Troncoso et al., 1996).

Recientemente, diversos estudios epidemiológicos a gran escala de correlación clínico-patológica han apoyado la idea de que puede haber una **disociación entre la existencia de la patología de la EA y los síntomas clínicos de la demencia**. En estos estudios longitudinales de envejecimiento se incluyeron a los sujetos independientemente de sus síntomas y se realizó una valoración clínica y de la cognición de forma prospectiva, para finalmente hacer el examen patológico postmortem. Los estudios son los siguientes:

- (i) En el Nun Study un 12 % de los participantes con la cognición intacta en el momento de la muerte mostraron abundantes placas de A β y ovillos neurofibrilares en la necropsia. Además, este estudio sentó las bases para el concepto de “reserva o resiliencia cognitiva” al demostrar un efecto significativo del nivel de educación y de la habilidad lingüística adquirida durante la infancia en la función cognitiva en edades avanzadas (Iacono et al., 2009; Riley et al., 2005; Snowden et al., 1996; Tyas et al., 2007).
- (ii) Diversos estudios mostraron una disociación entre la presencia de placas de A β y ovillos neurofibrilares, y el grado de deterioro cognitivo:
 - El Baltimore Longitudinal Study of Aging (O'Brien et al., 2009; Troncoso et al., 1996).

- El Honolulu-Asia Aging Study (White et al., 2016).
 - El Medical Research Council Cognitive Function and Ageing Study (Savva et al., 2009).
 - El 90+ Study (Kawas, 2008).
- (iii) De forma notable, en el Religious Orders Study y Rush Memory and Aging Project, un tercio de los pacientes con cognición normal exhibieron lesiones patológicas de EA suficientes como para cumplir los criterios diagnósticos de probabilidad intermedia o alta del National Institute on Aging–Reagan Institute (Bennett et al., 2002; Bennett et al., 2006; Schneider et al., 2009).

Un hallazgo llamativo de estos estudios es que la disociación clínico-patológica parece ser aún más pronunciada en los sujetos más ancianos. Aunque en este grupo la correlación entre atrofia cerebral y demencia persiste, la correlación de placas y ovillos con los síntomas cognitivos disminuye con la edad (Haroutunian et al., 2008; Savva et al., 2009).

Debemos señalar que, en conjunto, estos individuos son muy poco frecuentes. Por ejemplo, el Dr. Serrano-Pozo estudió en la serie de necropsias del National Alzheimer's Coordinating Center (NACC) tan sólo 12 de un total de 835 sujetos se encontraban libres de síntomas cognitivos en presencia de abundante patología de EA con una estadio de Braak por encima de III y frecuentes placas neuríticas (Serrano-Pozo et al., 2013).

Por otra parte, desde la aparición de la neuroimagen del amiloide actualmente es posible examinar la deposición de $A\beta$ *in vivo* (Klunk et al., 2004). Los estudios de tomografía por emisión de positrones (PET) con el compuesto de Pittsburgh B (PIB), que tiene una elevada afinidad por los depósitos de $A\beta$ fibrilar, han mostrado que más del 20% de los sujetos con cognición intacta presentan una elevada retención de PIB (Aizenstein et al., 2008; Ikonovic et al., 2008; Lockhart et al., 2007; Lopresti et al., 2005; Mintun et al., 2006).

Aunque estos casos representan una minoría y han pasado casi inadvertidos hasta ahora, existe suficiente evidencia que indica que la correlación clínico-patológica de la EA es más compleja de lo que se creía, y que un continuum de patología cerebral subyace a la cognición normal. Aunque la mayor parte de individuos sin síntomas de demencia poseen un cerebro libre de enfermedad neurodegenerativa u otras lesiones patológicas, ***algunos individuos que permanecen cognitivamente intactos hasta el final de su vida, presentan una cantidad significativa de patología en sus cerebros y podrían ser resilientes de acuerdo a la definición anterior.***

En definitiva, las observaciones previas plantean la posibilidad de la existencia del fenómeno de ***la resiliencia a la patología de la EA***. De ser cierto, podríamos afirmar que algunas personas tienen un envejecimiento “Cool with Plaques and Tangles”, tal y como señalaban Ewbank and Arnold en el 2009 en un editorial del New England Journal of Medicine (Ewbank and Arnold, 2009). ***El estudio de estos individuos es relevante porque la identificación de marcadores de resiliencia podría tener un valor predictivo en el resultado clínico de la presencia en el cerebro de lesiones patológicas de la EA y, quizás, más importante, guiar el desarrollo de nuevos tratamientos neuroprotectores.***

1.2. Conceptos fundamentales de la enfermedad de Alzheimer

i. Historia

La EA es una enfermedad neurodegenerativa que se presenta clínicamente como una demencia en la que ocurre un deterioro cognitivo progresivo que afecta a la función mnésica de forma predominante.

La EA fue descrita por vez primera en 1906 por el psiquiatra y neuropatólogo alemán Alois Alzheimer a partir de un caso clínico de demencia (Alzheimer et al., 1995). Se trataba de Auguste D, una mujer que desde los 51 años desarrolló de forma progresiva: pérdida de memoria, delirios paranoides y afasia.

En los hallazgos patológicos de la autopsia el patólogo alemán describió una marcada atrofia cerebral y, utilizando la tinción argéntica de Bielschowsky, abundantes lesiones extracelulares que entonces denominó “placas seniles”. Además, describió otras lesiones que se caracterizaban por una tinción con patrón fibrilar intraneuronal, que desde entonces han sido llamadas “ovillos neurofibrilares”. Las placas seniles estaban formadas por neuritas distróficas rodeando un núcleo central, de ahí la denominación posterior de “placas neuríticas”. Este núcleo central fue caracterizado luego como un core de amiloide, dando origen al término actual de “placas de amiloide”. El origen del epónimo “EA” se atribuye a Kraepelin, quien en 1910 lo introdujo en la tabla de contenidos del capítulo titulado “Demencia presenil y senil” (E.Kraepelin et al. 1910).

Desde 1907 hasta 1950 la EA se consideraba muy poco frecuente y limitada sólo a lo que se denominaba “demencia presenil”, que incluía tan sólo a los sujetos menores de 65 años. No fue hasta finales de los años sesenta, cuando se realizó el primer estudio prospectivo en Newcastle, que la EA fue reconocida como la principal causa de lo que se conocía entonces como “demencia senil”. Fue entonces cuando se estableció que la presencia de placas neuríticas y de ovillos neurofibrilares era la causa principal de deterioro cognitivo en los mayores de 65 años (Blessed et al., 1968).

Las notas de Alois Alzheimer fueron revisadas y publicadas con detalles adicionales en 1996 (Maurer et al., 1997; O'Brien, 1996). ***Desde entonces la EA ha sido considerada una entidad clínico-patológica cuyo diagnóstico requiere de la aparición progresiva de demencia, definida por la presencia de deterioro cognitivo con repercusión en las actividades de la vida diaria y, además, de la existencia en el examen postmortem de lesiones neuropatológicas que incluyen las placas de amiloide, los ovillos neurofibrilares y la atrofia cortical.***

En la década de los ochenta se identificó el péptido amiloide beta ($A\beta$) como principal componente de las placas, y la proteína tau como elemento constituyente fundamental de los ovillos neurofibrilares. A principios de la década de los noventa se identificaron diversas mutaciones genéticas relacionadas con $A\beta$ y tau, y nació la hipótesis de la cascada del amiloide. En 1999 se identificaron las enzimas β -secretasa y γ -secretasa, que participan en la producción de $A\beta$. Diez años más tarde diversos compuestos basados en el mecanismo de acción de estas enzimas fueron adoptados como candidatos para ensayos clínicos, aunque hasta ahora han fracasado en su intento de modificar los síntomas y el curso de la EA.

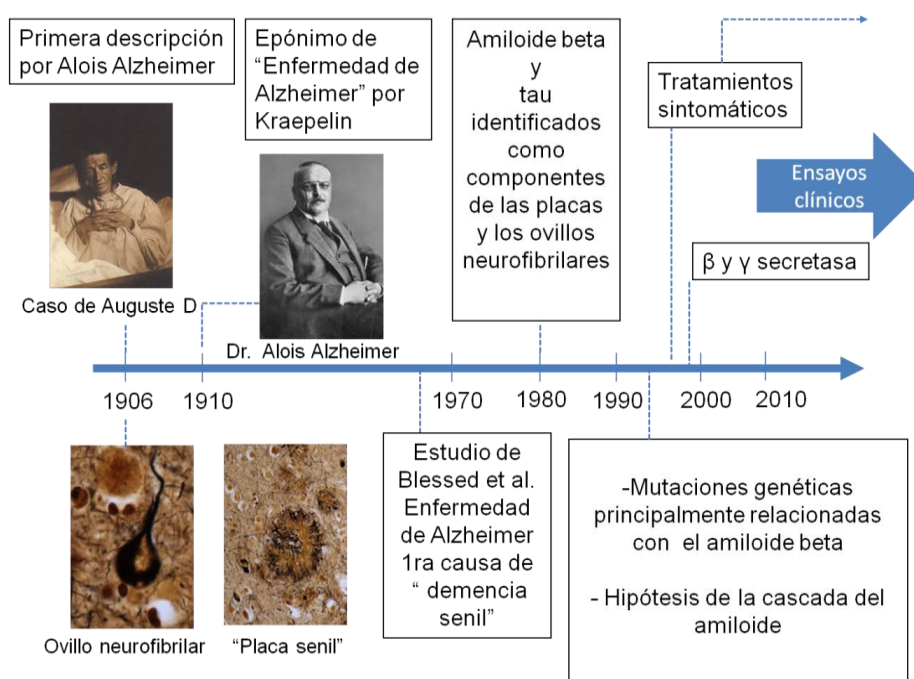


Figura 1. Historia de la EA. Línea de tiempo que muestra los hechos históricos fundamentales de la enfermedad de Alzheimer.

A partir de 1996 se aprobaron para uso sintomático las terapias colinérgicas — donepezilo, galantamina y rivastigmina— y en el año 2003 un antagonista de los receptores NMDA de glutamato —la memantina. Estos fármacos siguen siendo hoy en día los únicos tratamientos disponibles para la EA y su efecto es sólo sintomático. **Por lo tanto, más de 100 años después de que Alois Alzheimer la describiera por vez primera, la EA sigue sin tener cura (Figura 1).**

ii. Epidemiología

La EA evoluciona de manera inexorable hacia la muerte en un plazo medio de diez años desde el diagnóstico, y todos los esfuerzos encaminados hasta ahora hacia la búsqueda de una cura han sido infructuosos. Actualmente **la EA está reconocida como uno de los trastornos más prevalentes en la vejez, y como la causa más frecuente de demencia en los países desarrollados donde representa un 50-56% de las necropsias en las series clínicas.**

Más de 35 millones de personas en el mundo padecen EA, y debido a que la edad es su factor de riesgo más importante, su prevalencia llegará a duplicarse en los próximos 20 años. **Las previsiones de crecimiento son epidémicas.** La EA afectará principalmente a la tercera edad debido a que su prevalencia se incrementa exponencialmente entre los 65 y los 85 años, y se duplica cada década después de los 60 años, con una prevalencia en torno al 40% a los 85 años. La **Tabla 1** resume los factores epidemiológicos asociados con la EA (Ferri et al., 2005; Prince et al.).

Tabla 1. Factores epidemiológicos asociados con la EA	
Factores de riesgo	Factores de protectores
Edad Prevalencia: 60 años = 5% 75 años = 10 % 85 años ~ 40%	Alelo APOEϵ2
Historia familiar de EA	
Sexo femenino	
Alelo APOEϵ4	
Bajo nivel de educación	Alto nivel de educación (Hipótesis de la reserva cognitiva)
Antecedentes patológicos y estilo de vida:	

<ul style="list-style-type: none"> - Enfermedad cerebrovascular - Traumatismo craneoencefálico - Hipertensión arterial - Diabetes mellitus - Homocisteinemia - Dislipemia 	Vida social activa
	Ejercicio físico

iii. Genética

La evidencia de que la EA sigue un patrón de herencia autosómico dominante descubierta en la década de los noventa constituyó un punto de inflexión en la investigación sobre la EA, y llevó a la articulación de la “hipótesis de la cascada del amiloide beta”. Esta hipótesis **postula que el acúmulo de A β desencadena una cadena de eventos adversos que incluye: la hiperfosforilación de tau y su agregación en ovillos neurofibrilares, la pérdida neuronal y sináptica, y la respuesta inflamatoria, seguidas por el deterioro cognitivo**. Por tanto, aunque se trata de **<5 % de todos los casos de EA**, el descubrimiento de los genes responsables de **las formas familiares de la EA de inicio temprano** permitió la descripción de los primeros mecanismos patogénicos responsables de la neurodegeneración en la AD (Bertram et al.).

Gracias al **clonaje posicional** se identificaron tres distintos loci genéticos relacionados con el metabolismo de A β :

- (i) La proteína precursora del amiloide (APP) en el cromosoma 21q.
- (ii) La presenilina 1 (PSEN1) en el cromosoma 14q.
- (iii) La presenilina 2 (PSEN2) en el cromosoma 1q.

La primera mutación descubierta fue la del gen que codifica APP (Goate et al., 1991). La APP es una holoproteína a partir de la cual el péptido A β es escindido de forma secuencial por la enzima β -secretasa, también conocida por su acrónimo en inglés BACE (beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme), y la γ -secretasa (Hussain et al., 1999; Lin et al., 2000b; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999) (**Figura 2**).

Más tarde se reportó el descubrimiento de mutaciones autosómicas dominantes en los genes *PSEN1* y *PSEN2*, que codifican las proteínas homólogas presenilinas 1 y 2, que forman parte del sitio activo catalítico de la enzima γ -secretasa (De Strooper et al., 1998; Levy-Lahad et al., 1995; RogaeV et al., 1995; Wolfe et al., 1999).

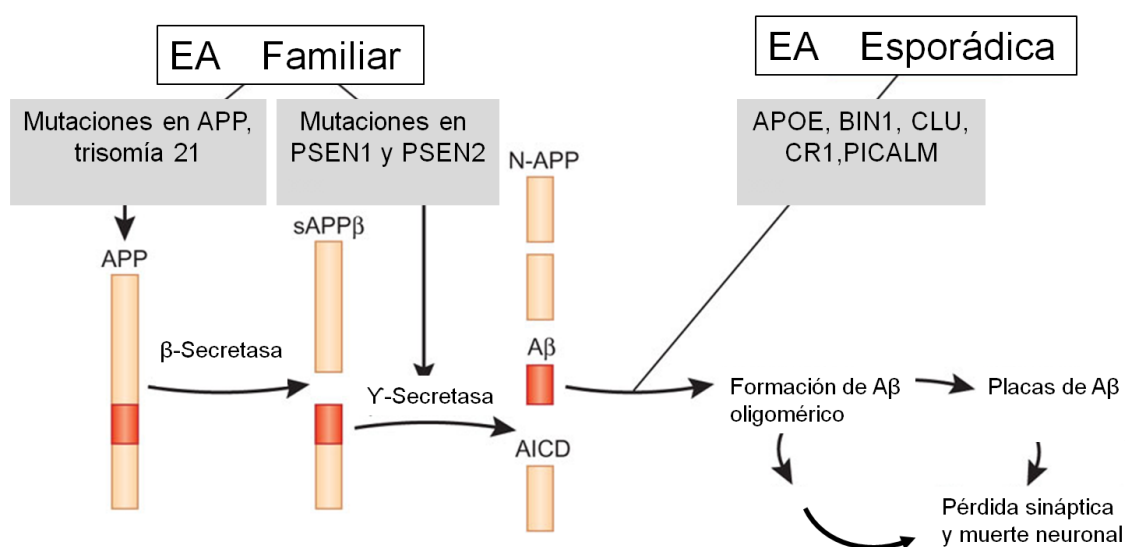
Además, la hipótesis fue reforzada por el hecho de que el gen de la APP está en el cromosoma 21, cuyas microduplicaciones causan formas raras de EA con angiopatía amiloide. En este mismo sentido, la trisomía del cromosoma 21 se acompaña de un fenotipo neuropatológico similar a la EA que comienza con el depósito difuso de A β en los adultos jóvenes, seguida de una neurodegeneración y de deterioro cognitivo (Glennner and Wong, 1984; Selkoe, 2001; Wisniewski et al., 1985).

Una vez que se identificaron los genes implicados en las formas familiares de la EA, se inició la búsqueda de causas genéticas para **la EA esporádica de inicio tardío que representa más del 95% los casos en la población**. Los genes candidatos fueron el resultado de la hipótesis de la cascada de A β ; por lo tanto, se buscaron genes relacionados con la producción, la agregación y el aclaramiento de A β . **Así, el gen de la apolipoproteína E (APOE) ubicado en el cromosoma 19q13 fue uno de los primeros genes candidatos estudiados en la búsqueda de asociaciones genéticas con la EA.**

El gen APOE representa el mayor factor de riesgo genético asociado con la EA esporádica de inicio tardío. Existen tres alelos de APOE: APOE ϵ 2, APOE ϵ 3 y APOE ϵ 4 (Nickerson et al., 2000). La herencia de un alelo ϵ 4 incrementa la probabilidad de EA de ~3 a 12 veces y anticipa la edad de inicio (Bertram et al., 2007; Saunders et al., 1993; Strittmatter et al., 1993). El alelo ϵ 3 se considera neutro y el alelo ϵ 2 se considera protector (Farrer et al., 1997). En un estudio reciente de transferencia genética, Hudry et al. demostraron que APOE ϵ 4 aumenta la deposición y el crecimiento de las placas, mientras que APOE ϵ 2 se asocia con el aclaramiento del A β de las placas (Hudry et al.)

Posteriormente, **los estudios GWAS (genome wide association study) transformaron el escenario genético de la EA esporádica de inicio**. En primer lugar, confirmaron la importancia de *APOE*, para luego describir varios genes adicionales asociados con el metabolismo de $A\beta$. Por ejemplo, *BIN1*, *CLU*, *PICALM* y *CR1*, que están implicados en la producción, agregación y aclaramiento de $A\beta$ (Harold et al., 2009; Hollingworth et al.).

En resumen, existe una amplia evidencia genética que apoya la hipótesis de la cascada de $A\beta$ en la EA (**Figura 2 y 3**).

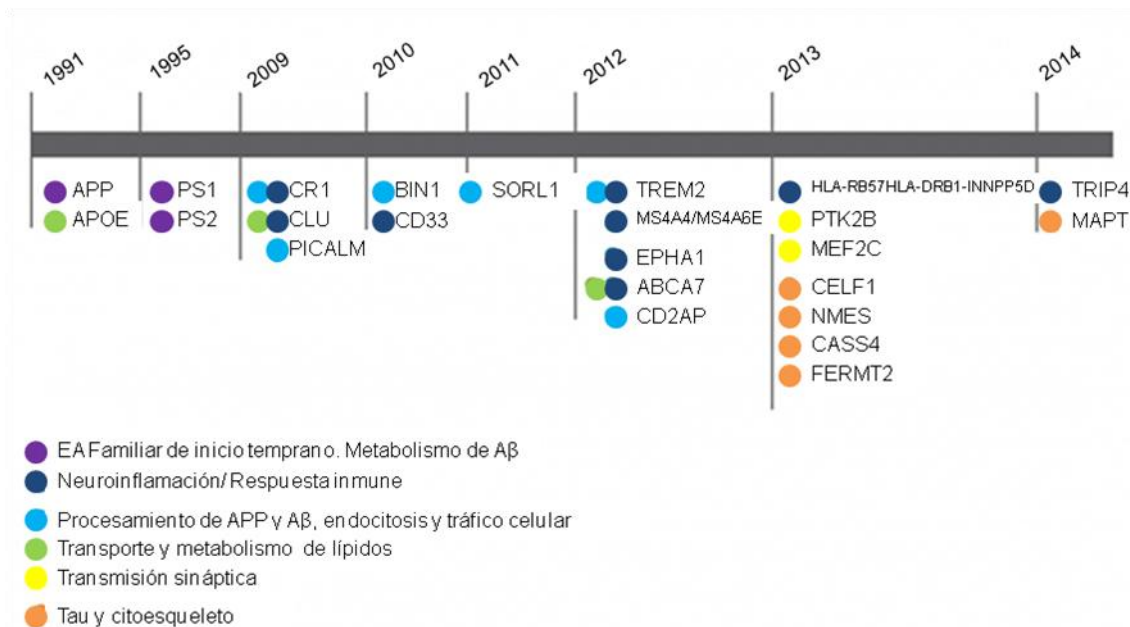


Modificado de Michael A van Es & Leonard H van den Berg, 2009

Figura 2. Genes asociados al metabolismo del amiloide beta ($A\beta$). La proteína precursora del amiloide (APP) es escindida de forma secuencial por las enzimas β -secretasa y γ -secretasa como parte de la vía amiloidogénica. Las mutaciones en *APP*, *PSEN1* y *PSEN2* en las formas familiares de la enfermedad de Alzheimer (EA) de inicio temprano, o una copia adicional de APP en el cromosoma 21 en el síndrome de Down, aumentan el procesamiento de APP. En cambio, en la EA esporádica de inicio tardío las mutaciones genéticas en *APOE*, *PICALM*, *CR1* y *CLU* parecen reducir el aclaramiento de $A\beta$.

Pero además, la identificación de nuevas mutaciones ha dado una mayor relevancia a otros mecanismos patogénicos en la EA que se suman a la hipótesis de la cascada amiloide. Es el caso de la respuesta inflamatoria, cuyo papel había sido considerado sólo de forma parcial durante mucho tiempo. En este sentido, **varias mutaciones en genes relacionados con la respuesta inflamatoria y el sistema inmune han sido descritas recientemente**, como por ejemplo *CD33*, *TREM2* y *CR1*. Y también es el caso de mutaciones en **genes relacionados con la transmisión sináptica, tau y la función del citoesqueleto** que sugieren un

papel prominente de la patología tau en la EA. Estudios de meta-análisis aportarán un mayor nivel de evidencia que confirme la importancia de estos últimos hallazgos (**Figura 3**).



Modificado de National Institute on Aging, 2015.

Figura 3. Modelo hipotético de la progresión temporal de los marcadores patológicos en el neocórtex en la enfermedad de Alzheimer (EA). El aumento en el depósito del amiloide beta (Aβ) en la fase preclínica de la EA es seguida de una pérdida progresiva de neuronas y sinapsis que ocurre en paralelo con la formación de ovillos neurofibrilares y de una reacción glial. El depósito de Aβ alcanza rápidamente una meseta después del inicio de los síntomas cognitivos, o incluso en la fase preclínica de la EA, mientras que el resto de marcadores patológicos sigue progresando.

iv. Marcadores patológicos clásicos

Desde el punto de vista patológico la EA presenta las siguientes lesiones:

- (i) Depósito de placas de amiloide beta.
- (ii) Formación de ovillos neurofibrilares compuestos por tau.
- (iii) Pérdida neuronal y sináptica.

El término “amiloide” se refiere a la estructura cuaternaria de una proteína de depósito. En la EA las previamente denominadas “placas seniles” poseen un núcleo central, que está constituido por Aβ, dando origen al término actual de **placas de Aβ**.

El A β es un péptido anfipático que se autoagrega en el espacio extracelular formando grandes esferas que se depositan en el neuropilo y destruyen de forma localizada las sinapsis. La mayor parte de la comunidad científica está de acuerdo en que el A β es un iniciador clave de la EA como postula la hipótesis de la cascada de A β basada en los hallazgos genéticos descritos previamente. El A β fue aislado de los depósitos de amiloide del parénquima cerebral en 1988 por Glenner (Glenner, 1988). El péptido A β es el resultado de la escisión secuencial del APP por las enzimas β y γ - secretasas. La mayor parte de los estudios se han centrado en las formas de A β con 40 y 42 aminoácidos. En la EA el péptido que se deposita de manera predominante en el parénquima cerebral es el A β -42 debido a que es más insoluble y forma fibrillas con mayor facilidad que el A β -40.

Los depósitos de A β están compuestos por fibrillas individuales que adoptan una conformación de hoja β plegada. Esta organización molecular les confiere un patrón de difracción de rayos X característico, que hace que se puedan identificar con tinciones como el rojo congo o la tioflavina-S. Las tinciones histopatológicas con anticuerpos anti-amiloide beta han mostrado que estos depósitos ocurren no sólo en la forma de las clásicas placas, llamadas “placas de A β ”, sino también en forma de placas más difusas, también conocidas en la literatura como “placas algodonosas”. Estos depósitos difusos han sido estudiados para determinar la naturaleza del A β que los conforma, sin embargo los resultados no son consistentes.

En resumen, según su morfología y su afinidad por las tinciones con rojo congo o tioflavina-S, las placas de A β se clasifican en:

- (i) **Placas densas o placas neuríticas:** son depósitos fibrilares de A β que poseen un núcleo compacto que se tiñen con rojo congo o tioflavina-S. Se caracterizan por estar rodeadas de neuritas distróficas — de ahí el término de “placas neuríticas” — astrocitos reactivos, células microgliales activadas, y pérdida sináptica.
- (ii) **Placas difusas:** son depósitos de A β con contornos mal definidos que no se tiñen con rojo congo o tioflavina-S. A diferencia de las placas densas,

las placas difusas no están rodeadas de neuritas distróficas, y no se acompañan de reacción glial ni de pérdida sináptica.

Para el diagnóstico patológico de la EA se utiliza una escala semicuantitativa de placas densas ya que este tipo de placas se asocia en general con la presencia de síntomas de deterioro cognitivo. En cambio, las placas difusas pueden estar presentes en personas mayores en ausencia de síntomas cognitivos. De hecho, a partir de 1991 el “Consortium to Establish a Registry for Alzheimer’s Disease” (CERAD) propuso unos criterios que buscaban aumentar la especificidad diagnóstica, y que se basan en una escala semicuantitativa que se asigna según **la densidad de placas neuríticas en el neocórtex** temporal, frontal y parietal, y la edad del sujeto en el momento de la necropsia (Mirra et al., 1991; Mirra et al., 1997).

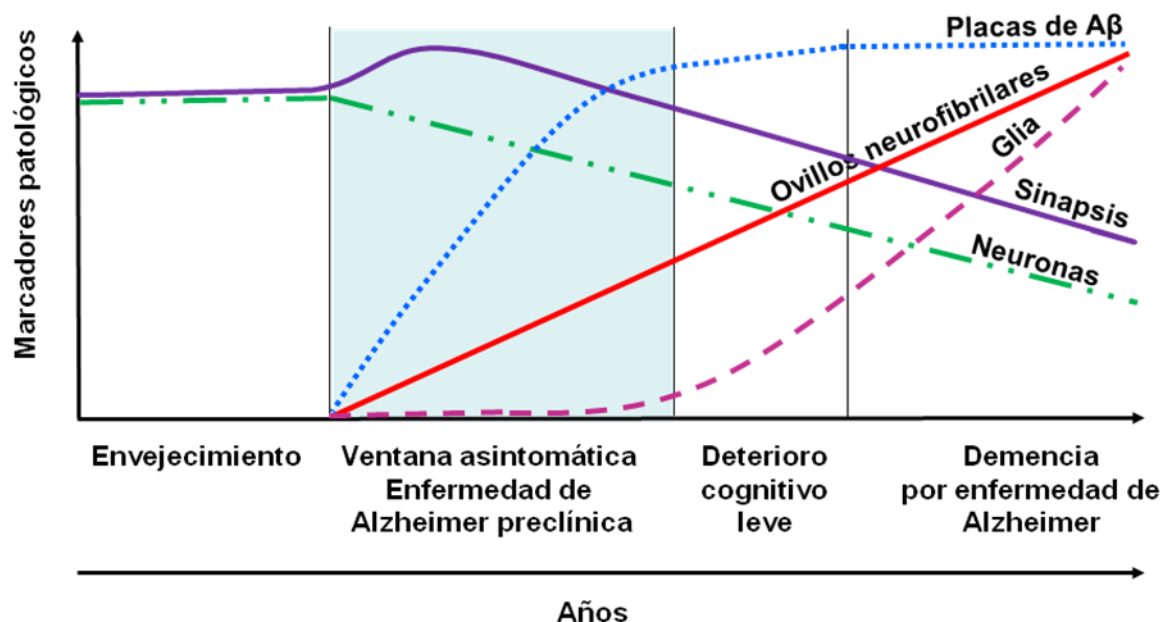
Según el CERAD los sujetos se clasifican en función de la densidad de placas neuríticas en:

- (i) A o escasa.
- (ii) B o moderada.
- (iii) C o frecuente.

En cuanto a su distribución topográfica y temporal, las placas se depositan siguiendo un patrón secuencial, en estadios que fueron descritos primero por Braak y más recientemente y con más detalle por Thal (Braak and Braak, 1991; Thal et al., 2002). En resumen, las placas tienden a aparecer en el neocórtex, y en las fases tardías de la enfermedad se depositan en los ganglios basales, el tronco del encéfalo, y el cerebelo. ***El patrón de distribución de las placas de A β en el neocórtex es más bien errático en comparación con el patrón estereotipado y predecible que siguen los ovillos neurofibrilares.***

Numerosos estudios de correlación clínico-patológica han demostrado que la cantidad de placas de A β —tanto placas densas como difusas— no se correlaciona ni con la duración, ni con la gravedad de los síntomas de la demencia por EA (Arriagada et al., 1992; Bierer et al., 1995; Giannakopoulos et al., 2003; Gomez-Isla et al., 1997; Hyman et al., 1993; Ingelsson et al., 2004). De

hecho, en la región de la corteza de asociación temporal, donde hay un depósito de A β precoz, la carga de amiloide alcanza una meseta rápidamente después del inicio de los síntomas cognitivos o incluso en la fase preclínica de la enfermedad (Ingelsson et al., 2004; Serrano-Pozo et al., 2011) (**Figura 4**).



Modificado de Ingelsson et al 2004.

Figura 4. Modelo hipotético de la progresión temporal de los marcadores patológicos en el neocórtex en la enfermedad de Alzheimer (EA). El aumento en el depósito del amiloide beta (A β) en la fase preclínica de la EA se sigue de una pérdida progresiva de neuronas y sinapsis que ocurre en paralelo con la formación de ovillos neurofibrilares, y de una reacción glial. El depósito de A β alcanza rápidamente una meseta después del inicio de los síntomas cognitivos, o incluso en la fase preclínica de la EA, mientras que el resto de marcadores patológicos siguen progresando.

Los ovillos neurofibrilares están compuestos por fibrillas que adoptan una conformación tridimensional que se conoce como “pares de filamentos helicoidales” también conocidos por sus siglas en inglés PHF (paired helical filaments). Su principal componente es la proteína tau, que es fundamental para la asociación y la estabilización de los microtúbulos. En las neuronas sanas se encuentra normalmente en los axones, pero en las *taupatías* se redistribuye hacia el soma y las dendritas. En el cerebro humano existen seis isoformas de tau, producidas por un único gen a través de un empalme alternativo de sus exones 2 y 10. En el cerebro normal, tau está fosforilada en un determinado número de sitios, y el grado de fosforilación regula negativamente su capacidad para interactuar con los microtúbulos. Sin embargo, en la EA tau se encuentra anormalmente hiperfosforilada y además existe una alteración en su conformación

parietal y occipital, hasta llegar finalmente a la corteza primaria motora, sensitiva y visual a medida que la enfermedad progresa (**Figura 5**).

Varios estudios de correlación clínico-patológica han demostrado que el número y la distribución de los ovillos neurofibrilares se correlaciona con la gravedad y la duración de los síntomas de la demencia por EA (Arriagada et al., 1992; Bierer et al., 1995; Giannakopoulos et al., 2003; Gomez-Isla et al., 1997; Hyman et al., 1993; Ingelsson et al., 2004) (**Figura 4**).

La pérdida neuronal es el principal sustrato patológico de la atrofia cerebral que se observa en la EA. La pérdida neuronal en la EA sigue un patrón regional y laminar que ocurre en paralelo con la formación de los ovillos neurofibrilares (Bussiere et al., 2003; de Calignon et al., 2009; Gomez-Isla et al., 1996; Hof et al., 2003; Iqbal and Grundke-Iqbal, 2002; Spires-Jones et al., 2008; Yoshiyama et al., 2007). Sin embargo, no está claro si los ovillos son la causa de la muerte neuronal; de hecho, la pérdida neuronal excede a la formación de ovillos neurofibrilares. ***La pérdida neuronal representa un mejor correlato de la cognición que las placas de A β y los ovillos neurofibrilares*** (Gomez-Isla et al., 1996; Gomez-Isla et al., 1997).

La pérdida sináptica sigue el mismo patrón espacio-temporal que la pérdida neuronal y excede a ésta, lo que significa que las neuronas supervivientes pierden contactos sinápticos con sus vecinas. La pérdida sináptica está considerada como el mejor correlato cognitivo que hay en la EA, en concreto la pérdida sináptica que ocurre en la neocorteza y en el sistema límbico (DeKosky and Scheff, 1990; DeKosky et al., 1996; Ingelsson et al., 2004; Masliah et al., 1994b) (**Figura 4**).

v. Inflamación

Desde la década de 1990 se sabe que la patología de la EA incluye una ***respuesta inflamatoria o activación del sistema inmune innato*** del cerebro, que aumenta con la progresión de la enfermedad, y que está dirigida fundamentalmente por las células microgliales (o microglía) y por los astrocitos.

El hecho de que tanto los astrocitos reactivos como la microglía activada se encuentran asociados con las placas de A β en la EA, indica que el A β es un desencadenante mayor de la respuesta glial (Itagaki et al., 1989; Pike et al., 1995; Vehmas et al., 2003). Pero lo que resulta más interesante es que la respuesta glial sigue un aumento lineal a lo largo de toda la evolución de la enfermedad, y esto ocurre a pesar de que el depósito de A β alcanza de forma temprana una meseta, en particular en la corteza de asociación temporal. **Varios estudios de correlación clínico-patológica han demostrado que hay una correlación altamente significativa entre el número de astrocitos reactivos y el número de células microgliales activadas con el número de ovillos neurofibrilares, pero no entre la glía reactiva y la carga de placas de A β , sugiriendo que la respuesta glial está también dirigida a la patología tau** (Ingelsson et al., 2004; Serrano-Pozo et al., 2011) (Figura 4).

A pesar de esta evidencia, la función de la inflamación en la EA sigue sin estar del todo clara, en particular si contribuye de forma deletérea a la enfermedad, si por el contrario representa una respuesta protectora o si es simplemente un epifenómeno que la acompaña. Por ejemplo, hasta ahora se asumía que la neuroinflamación sólo ocurría en los estadios tardíos de la EA, pero ahora se sabe que aparece ya en estadios tempranos y asintomáticos. Sin embargo, se desconoce también si la inflamación tiene distintos papeles según el estadio de la enfermedad.

Las células microgliales son células mieloides de origen embrionario hematopoyético que residen en el sistema nervioso central y que tienen capacidad fagocítica, y son claves en el mantenimiento de la homeostasis y en el remodelado sináptico. **Recientemente datos genéticos, preclínicos y bioinformáticos han demostrado que la activación del sistema inmune innato representado en la microglía no sólo acompaña a la patología de la EA, sino que además contribuye a la patogénesis de la enfermedad.** En particular, y como ha sido muchas veces el caso en la investigación en la EA, la genética ha liderado un mayor consenso en el campo. La identificación de la asociación entre la EA con mutaciones en los genes que codifican TREM2

(triggering receptor expressed on myeloid cells 2) y el antígeno receptor celular mieloide CD33 ha transformado los conceptos sobre inflamación, ya que es la primera vez que la asociación entre las alteraciones inmunes y la patogénesis de la EA está apoyada más allá de por una mera descripción histopatológica (Bradshaw et al., 2013; Jonsson et al., 2013). Como consecuencia de estos estudios genéticos, ***ahora se acepta mayoritariamente que la inflamación exacerba la patología de la EA.***

Sin embargo, datos también recientes sugieren escenarios más complejos. Las células de la microglía son las que más íntimamente se asocian con los cambios que se observan en la EA. Al igual que los astrocitos, rodean a las placas de A β y presentan un cambio en su morfología. La “activación microglial” es un término muy genérico que define un cambio morfológico que se asume asociado a una activación “funcional” de la microglía que se supone dañina. Sin embargo, un estudio reciente de análisis transcriptómico ha demostrado que los macrófagos, a cuyo linaje pertenece la microglía, pueden presentar hasta siete perfiles moleculares diferentes dependiendo del estímulo a que se les exponga (Xue et al., 2014) (Xue et al., 2014). ***La activación de la microglía es por lo tanto un fenómeno complejo estímulo-dependiente que puede resultar en varios fenotipos celulares que secretan distintos tipos de citoquinas con un resultado neto neuroprotector o neurotóxico. Por lo tanto, la heterogeneidad es una característica fundamental en la neuroinflamación.***

Los astrocitos son células gliales derivadas del neuroectodermo que residen en el sistema nervioso central y son responsables de la homeostasis cerebral. Están a cargo del soporte trófico y metabólico de las neuronas, y de la diferenciación y remodelamiento neuronal y sináptico. Además, responden a los estímulos patológicos a través de lo que se conoce como una gliosis o “astrocitos reactiva”. En la EA los astrocitos reactivos rodean a las placas de A β al igual que las células de la microglía activadas, y se sabe que su activación ocurre pronto en el curso patogénico de enfermedad. En un estudio reciente la Dra. Galea hizo un refinado análisis cuantitativo espacial computacional de imágenes in vivo en un modelo murino de EA, y demostró que los astrocitos reaccionan a la presencia de

las placas de A β con un cambio fenotípico y no con una migración, tal y como se pensaba hasta ahora (Galea et al., 2015). Los astrocitos reactivos muestran típicamente un aumento en la expresión de la proteína ácida fibrilar glial también conocida como GFAP por sus siglas en inglés (glial fibrillary acidic protein). Sin embargo, en modelos transgénicos murinos se ha observado que en presencia de patología A β los astrocitos presentan una atrofia que precede a la gliosis, excepto en el caso de los astrocitos que están cerca de las placas que por el contrario, muestran hipertrofia. Se piensa que esta atrofia lleva a una transmisión glutamatérgica deficiente, que posiblemente contribuye al deterioro cognitivo (Olabarria et al., 2010).

Por otra parte, varios estudios han demostrado que los astrocitos reactivos que están cerca de las placas son capaces de captar y degradar A β . Además, se ha demostrado, que la activación, y la liberación de la apolipoproteína E por parte de los astrocitos es crucial para la habilidad de la microglía de remover el A β fibrilar. En cambio la atrofia astrocítica resulta en una reducción de la eliminación proteolítica de A β . ***En resumen, la patología de la EA genera un cambio fenotípico en los astrocitos que se manifiesta por una ganancia de función tóxica o por una pérdida de su función normal.*** Este cambio fenotípico podría considerarse como parte integral de la respuesta inflamatoria de la EA y condicionaría en unos casos un efecto neuroprotector y en otros un efecto neurotóxico (Heppner et al., 2015).

Las citoquinas son moléculas proteicas que tienen como rol fundamental comunicar señales entre células. Para ello inducen la activación de receptores específicos que están integrados en diversas vías de señalización intracelular relacionadas con funciones como la quimiotaxis, la proliferación, la diferenciación y la muerte celular. ***Tanto las células microgliales como los astrocitos liberan citoquinas como parte de su respuesta de activación.*** Se piensa que las células microgliales inician la respuesta inflamatoria ante la patología de la EA con una migración hacia las placas de A β y allí liberan citoquinas que se consideran “pro-inflamatorias” como la IL-1, IL-6 y el TNF- α , entre otras. Además, algunas citoquinas expresadas en la superficie de las células microgliales estimulan la

reacción de los astrocitos. Se sabe que ciertas citoquinas contribuyen a la patogénesis de la EA induciendo muerte neuronal. Sin embargo, otras parecen tener un rol neuroprotector y se les considera por lo tanto “anti-inflamatorias”. No obstante, enlazando con la noción de heterogeneidad microglial, se piensa que las citoquinas actúan de una manera coordinada. Es decir, es un error considerar **la función de una citoquina aislada; por el contrario es más apropiado considerar un perfil de citoquinas cuya interacción tiene como resultado un balance final que puede ser deletéreo o favorecer por el contrario la homeostasis cerebral.**

Se ha postulado que las citoquinas podrían ser útiles como biomarcadores de la EA y, de hecho, algunas de ellas como por ejemplo la IL-1 α , IL-1 β , IL-6 y la IL-18, han sido medidas en el líquido cefalorraquídeo (LCR) con resultados inconsistentes (Delaby et al., 2015). Es por esto que la identificación y validación de citoquinas candidatas en estudios postmortem podría resultar útil antes de medir sus niveles en el LCR o eventualmente en el plasma sanguíneo.

vi. **Enzima glucógeno sintetasa kinasa-3**

Durante más de veinte años se pensó que la función de la enzima glucógeno sintetasa kinasa-3 (GSK-3) se limitaba al metabolismo del glucógeno. En 1980 la GSK-3 fue purificada por primera vez a partir del músculo esquelético de conejo, y se identificó como una de las múltiples proteínas kinasas capaces de fosforilar la glucógeno sintetasa, el enzima catalizador del paso final de la síntesis de glucógeno (Embi et al., 1980). Sin embargo, estudios posteriores dieron un giro conceptual novedoso al demostrar que la GSK-3, una serina-treonina kinasa, tenía un rol clave como regulador de múltiples funciones:

- (i) Señalización en la cascada de la insulina, factores de crecimiento y nutrientes.
- (ii) Diferenciación celular durante el desarrollo embrionario en la vía de Wnt, control de la división celular, función de los microtúbulos y apoptosis.

- (iii) Participación en la fisiopatología de enfermedades como el cáncer, la diabetes, el trastorno bipolar, la esquizofrenia, las enfermedades de Parkinson y Alzheimer.

En los mamíferos se identificaron inicialmente dos isoformas de esta enzima: GSK-3 α y GSK-3 β (Woodgett, 1990), para posteriormente añadirse la GSK-3 β 2 como resultado de un empalme alternativo del gen de la GSK-3 β (Mukai et al., 2002). Este enzima es ubicua en todos los tejidos y en el cerebro sus niveles son particularmente altos, sobre todo la isoforma GSK-3 β que regula múltiples sistemas de señalización celular (Forde and Dale, 2007).

Por tanto, no es sorprendente que la GSK3 se encuentre altamente conservada desde el punto de vista evolutivo y que esté sujeta a un estrecho sistema de regulación. Las fosforilaciones destacan entre los múltiples sistemas de regulación de la GSK3. La GSK-3 β se encuentra constitutivamente activa en la mayoría de los tejidos y se regula principalmente con la fosforilación inhibitoria a nivel de la serina 9 por parte de varias kinasas (Plyte et al., 1992). En cambio la fosforilación en el residuo 216 de tirosina incrementa su actividad enzimática (Hughes et al., 1993). Otras formas de regulación de la GSK3 son las defosforilaciones activadoras, la formación de complejos proteicos, y la actuación de inhibidores selectivos.

La hipótesis de la GSK-3 en la EA postula que un aumento en la actividad de GSK-3 β contribuye a la producción de A β , aumenta la hiperfosforilación de tau, ocasiona pérdida neuronal, y se asocia con la neuroinflamación y el deterioro cognitivo. Por lo tanto, los inhibidores de la GSK-3 β podrían ser dianas terapéuticas de valor en la EA (DaRocha-Souto et al., 2012).

1.3. Visión actual de la EA

Los criterios diagnósticos de la EA de 2011 del National Institute on Aging y la Alzheimer's Association (NIA-AA) sustituyeron a los de 1984 del NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurologic, Communicative Disorders and Stroke - Alzheimer's Disease and Related Disorders Association) (McKhann et al., 2011).

El aspecto más relevante de estos nuevos criterios diagnósticos es la incorporación del uso de biomarcadores en el proceso diagnóstico, que incluyen:

(i) Biomarcadores del depósito de A β :

1. Disminución de la proteína A β_{42} en líquido cefalorraquídeo;
2. PET amiloide positivo.

(ii) Biomarcadores de neurodegeneración:

1. Elevación de la proteína tau en el líquido cefalorraquídeo (tanto tau total como tau fosforilada);
2. Hipometabolismo o disminución de la captación de fluoro-desoxi-glucosa (FDG) en el córtex temporoparietal en el FDG-PET;
3. Atrofia cortical en el córtex de los lóbulos temporales medio, basal y lateral, y parietal medio, en la resonancia magnética nuclear (RMN) cerebral.

Los nuevos criterios diagnósticos están de acuerdo con la idea cada vez más aceptada de que la patología de ***la EA comienza alrededor de quince años antes de que aparezcan los síntomas de deterioro cognitivo. Por lo tanto, existe una amplia ventana temporal que se conoce como EA preclínica en la que las intervenciones terapéuticas podrían ser claves*** (Jack et al., 2010).

Los biomarcadores permiten estudiar esta fase preclínica de la EA. En particular, ya hemos mencionado que hasta 1/3 de los sujetos cognitivamente normales tienen un PET-PIB positivo, mientras que otros individuos con el mismo nivel de A β detectado por neuroimagen tienen demencia (Aizenstein et al., 2008; Lopresti et al., 2005; Mintun et al., 2006). ***Se piensa que estos sujetos con PET-PIB positivo y sin síntomas de deterioro cognitivo están en la fase asintomática de la enfermedad, pero también existe la posibilidad que algunos de estos individuos nunca desarrollen síntomas de demencia, y sean por lo tanto***

resilientes. El estudio de este problema es el tema central de esta tesis. Es de suma importancia ser capaces de predecir con certeza el pronóstico cognitivo a nivel individual en la fase preclínica de la EA, por sus implicaciones a la hora de la inclusión y seguimiento de los sujetos en los ensayos clínicos. Además, la llegada de **la neuroimagen de tau in vivo** dará nuevas pistas sobre el curso de la neurodegeneración, y pronto será posible hacer correlaciones clínico-patológicas precisas (Johnson et al., 2016; Marquie et al., 2015).

Por otra parte, los avances recientes en genética otorgan **un papel relevante a la respuesta inflamatoria y a la patología tau** en la EA, y el “amiloidocentrismo” que hasta ahora había dominado el campo ha comenzado a incorporar nuevos conceptos.

Finalmente, el **fallo reiterado de los ensayos clínicos en la EA** ha hecho que en los últimos años:

- La validación de biomarcadores sea una prioridad.
- La fase preclínica de la EA forme parte del diseño de los estudios que buscan una intervención temprana.
- Diversas terapias neuroprotectoras con mecanismos de acción alternativos — terapias moduladoras de la inflamación, terapias anti-tau, terapias con mecanismo de acción múltiple— se consideren como nuevos candidatos que se han sumado a los ya conocidos anti-A β .

La **Figura 6** presenta un resumen de la visión actual de la EA. Consideramos que la mejor comprensión del fenotipo resiliente puede contribuir a guiar el desarrollo de nuevos biomarcadores que permitan predecir con fiabilidad el futuro clínico de individuos asintomáticos cuyos cerebros albergan patología de Alzheimer, así como ayudar a identificar novedosas dianas terapéuticas que permitan el desarrollo de fármacos neuroprotectores frente a la EA.

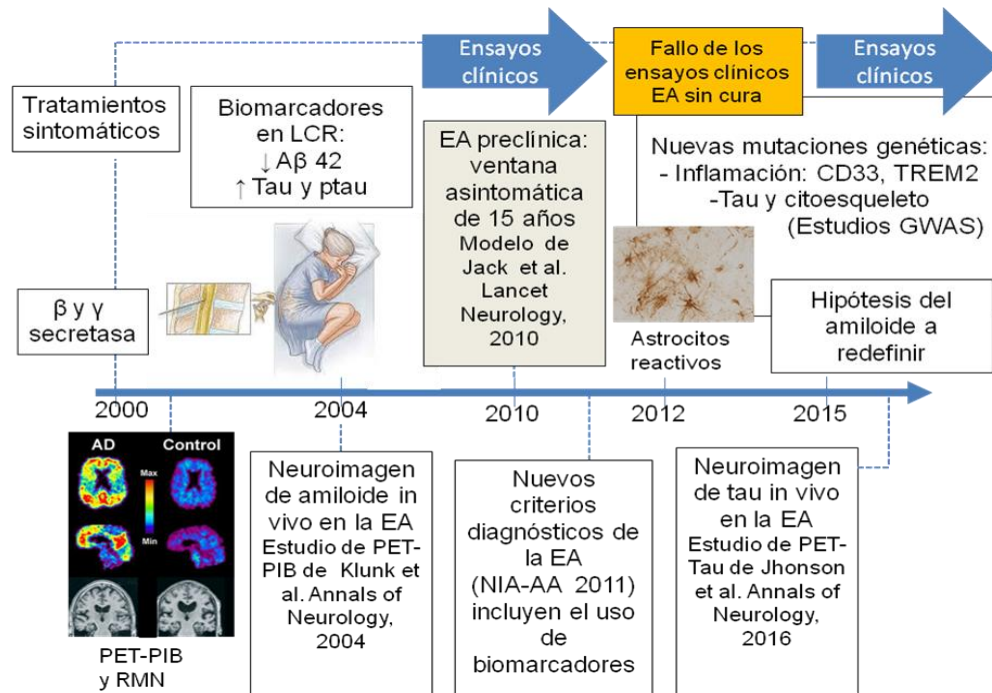


Figura 6. Visión actual de la enfermedad de Alzheimer. Línea de tiempo que muestra los avances recientes fundamentales en el conocimiento sobre la enfermedad de Alzheimer.

2. Capítulo segundo. Objetivos

2.1. Planteamiento del problema

Estudios de correlación clínico-patológica y de neuroimagen de A β *in vivo* sugieren una posible disociación entre la patología de la EA y el deterioro cognitivo. Estos resultados apoyan la hipótesis de que algunos individuos presentan resiliencia a la patología de Alzheimer. La resiliencia explicaría la ausencia de síntomas de demencia a pesar del hallazgo de cantidades importantes de A β y tau en la autopsia.

Nos preguntamos si existen individuos resilientes a la patología de la EA y, en caso afirmativo, si existen unos marcadores propios de este estado de resiliencia. Para responder a estas preguntas llevamos a cabo un estudio exhaustivo anatomopatológico y bioquímico en 90 cerebros coleccionados como resultado de la colaboración establecida entre 5 instituciones estadounidenses (Massachusetts General Hospital, Mayo Clinic, University of Pittsburgh, Columbia University y Washington University). De estos cerebros, 28 procedían de individuos asintomáticos antes de su fallecimiento y libres de lesiones cerebrales de EA, 33 de individuos asintomáticos cuyos cerebros mostraban lesiones de EA en la autopsia, y 29 de individuos sintomáticos cuyos cerebros mostraban lesiones de EA en la autopsia. En primer lugar estudiamos en todos estos cerebros las características de A β y tau y, en particular, sus especies solubles, ya que éstas podrían ser marcadores más específicos de la evolución clínica de la EA, así como los marcadores de integridad neuronal. A continuación, estudiamos la respuesta inflamatoria, incluyendo la activación de los astrocitos y la microglía, y el perfil de citoquinas secretadas por estas células gliales.

Definir los marcadores del estado de resiliencia es de suma importancia en el contexto actual de la EA, en el que los ensayos clínicos han fracasado reiteradamente. Gracias a la neuroimagen de A β y tau, ya somos capaces de detectar las lesiones de la EA *in vivo* incluso en ausencia de síntomas clínicos de enfermedad. Sin embargo, es clave refinar el pronóstico para ser capaces de

predecir con certeza la evolución clínica de sujetos asintomáticos a largo plazo. En resumen, pensamos que la detección de los marcadores de resiliencia puede contribuir a:

- (i) Predecir si un individuo va a desarrollar una demencia por EA o va a permanecer sin síntomas.
- (ii) Cuantificar el efecto de las terapias que buscan modificar la evolución de la EA.
- (iii) Encontrar dianas protectoras que permitan desarrollar intervenciones preventivas o terapéuticas efectivas contra la EA.

2.2. Hipótesis y objetivos

i. Hipótesis 1: Algunos individuos son resilientes a las lesiones cerebrales clásicas de la enfermedad de Alzheimer (placas de amiloide y ovillos neurofibrilares) de manera que dichas lesiones no ocasionan un daño estructural en sus cerebros ni conducen a la aparición de un deterioro cognitivo y funcional.

Objetivo 1a: investigar si los individuos resilientes a la patología de la EA pueden tener cantidades de placas amiloide y ovillos neurofibrilares similares a los sujetos con demencia por EA.

Objetivo 1b: comprobar si los sujetos resilientes mantienen la integridad neuronal a pesar de estas cantidades elevadas de placas amiloide y ovillos neurofibrilares.

ii. Hipótesis 2: Las especies solubles de A β y tau son mejores predictores del deterioro cognitivo que las formas fibrilares de estas proteínas, esto es, placas de A β y ovillos neurofibrilares, respectivamente.

Objetivo 2a: investigar si los individuos resilientes tienen niveles más bajos de especies solubles de A β y tau comparados con los sujetos con demencia por EA.

Objetivo 2b: comprobar si las especies solubles de A β y tau se correlacionan más estrechamente con las medidas de integridad neuronal y la respuesta inflamatoria que las placas de A β y los ovillos neurofibrilares.

iii. Hipótesis 3: los sujetos resilientes a la patología de la EA exhiben un perfil de respuesta inflamatoria, reflejada en la reacción de astrocitos y microglía y en el perfil de citoquinas secretadas por estas células gliales, diferente a la de individuos con EA sintomática.

Objetivo 3a: investigar si las medidas de respuesta inflamatoria, incluida la activación de astrocitos y microglía y el perfil de citoquinas, permiten discriminar a los sujetos resilientes de los sujetos con demencia por EA.

Objetivo 3b: comprobar si las medidas de respuesta inflamatoria, incluidas la activación de astrocitos y microglía y el perfil de citoquinas, se correlacionan con las medidas de integridad neuronal.

3. Capítulo tercero. Materiales y métodos

3.1. Muestra

i. Estudio neuropatológico

Empleamos 90 muestras de cerebro humano provenientes de los bancos de cerebro de los siguientes centros de investigación de la EA: Massachusetts General Hospital, Mayo Clinic, University of Pittsburgh, Columbia University y Washington University. En cada uno de estos centros, las muestras fueron estudiadas por un equipo de neuropatólogos acreditados quienes realizaron un examen postmortem histopatológico de regiones característicamente afectadas en diversas enfermedades neurodegenerativas. Todos los bloques fueron teñidos con luxol y hematoxilina-eosina, y ciertos bloques fueron seleccionados para la realización de tinción argéntica de Bielschowsky e inmunohistoquímica para detección de A β , α -sinucleína, ubiquitina y p-Tau.

Los neuropatólogos clasificaron a los sujetos según los criterios del CERAD (Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease), y los estadios de Braak.

Siguiendo los criterios CERAD los sujetos se clasificaron en función de la densidad de placas neuríticas en:

- (i) A o escasa.
- (ii) B o moderada.
- (iii) C o frecuente.

Siguiendo los estadios de Braak los sujetos se clasificaron según el número y la distribución de los ovillos neurofibrilares en:

- (i) 0 o ausentes.
- (ii) I/II o estadio entorrinal.
- (iii) III/IV o estadio límbico.

- (iv) V/VI o estadio neocortical.

Finalmente, los neuropatólogos siguieron los criterios del “National Institute on Aging and Reagan Institute” (NIA-Reagan) de 1997 para establecer el diagnóstico de EA (**Tabla 2**):

- (i) Una probabilidad alta de EA fue asignada a sujetos con una densidad elevada de placas neuríticas, y un estadio alto de Braak (CERAD C, Braak V/VI).
- (ii) Una probabilidad intermedia de EA fue asignada a sujetos con una densidad media de placas neuríticas, y una distribución límbica de los ovillos neurofibrilares (CERAD B, Braak III/IV).
- (iii) Una probabilidad baja de EA fue asignada a sujetos con una densidad baja de placas neuríticas, y una distribución de ovillos neurofibrilares limitada a la corteza entorrinal (CERAD A, Braak I/II).

Tabla 2. Diagnóstico neuropatológico de la EA		
CERAD	Braak	Criterios de NIA-Reagan
A	I-II	Probabilidad baja
B	III-IV	Probabilidad intermedia
C	V-VI	Probabilidad alta

Excluimos del estudio los sujetos con criterios neuropatológicos de demencia con cuerpos de Lewy, infartos cerebrales, y lesiones diferentes a las de la EA.

ii. Valoración clínica

En todos los sujetos documentamos el diagnóstico clínico de demencia o ausencia de demencia por EA de acuerdo con los datos de la historia clínica general y con los certificados de defunción. Treinta sujetos habían sido evaluados clínicamente en detalle en los dos años previos a su fallecimiento por un grupo de neurólogos acreditados. Para este subgrupo de sujetos, el diagnóstico clínico fue documentado de acuerdo con una detallada valoración neurológica y neuropsicológica.

iii. Grupos

Combinamos el diagnóstico clínico y el neuropatológico para distinguir cuatro grupos de estudio (**Tabla 3**):

- (i) Sujetos controles: sujetos sin demencia cuyo examen postmortem estableció una probabilidad baja de EA. Lo llamaremos **“grupo control” (CTRL)**. Son n=15 en el estudio del surco temporal superior, y n=19 en el estudio de la corteza entorrinal.
- (ii) Sujetos resilientes IP: sujetos sin demencia cuyo examen postmortem estableció una probabilidad intermedia de EA. Lo llamaremos **“grupo IP” (IP)** por “intermediate pathology” del inglés. Son n=12 en el estudio del surco temporal superior, y n=13 en el estudio de la corteza entorrinal.
- (iii) Sujetos resilientes HP: sujetos sin demencia cuyo examen postmortem estableció una probabilidad alta de EA. Lo llamaremos **“grupo HP” (HP)** por “high pathology” del inglés. Son n=8 en el estudio del surco temporal superior, y n=11 en el estudio de la corteza entorrinal.
- (iv) Sujetos con demencia debida a la EA: sujetos con demencia cuyo examen postmortem estableció una probabilidad alta de EA. Lo llamaremos **“grupo con demencia” (AD)** por “Alzheimer’s disease” del inglés. Son n=15 en el estudio del surco temporal superior, y n=23 en el estudio de la corteza entorrinal.

Utilizamos un total de 50 cerebros humanos en el estudio del surco temporal superior y 66 en el estudio de la corteza entorrinal. Para el estudio del perfil de citoquinas utilizamos un total de 53 cerebros humanos en los que había tejido congelado disponible de ambas regiones.

Tabla 3. Grupos de estudio					
Diagnóstico clínico	Diagnóstico neuro-patológico	Grupo	Abreviatura	Tamaño muestra (n)	
				STS (n=50)	CE (n=66)
Sin demencia por EA	Probabilidad baja de EA	Control	CTRL	15	19
Sin demencia por EA	Probabilidad intermedia de EA	Resiliencia IP = "Intermediate probability"	IP	12	13
Sin demencia por EA	Probabilidad alta de EA	Resiliencia HP = "High probability"	HP	8	11
Demencia por EA	Probabilidad alta de EA	Demencia = "Alzheimer's disease"	AD	15	23

EA = Enfermedad de Alzheimer, STS = Surco temporal superior, CE = Corteza entorrinal.

3.2. Áreas cerebrales

i. Surco Temporal Superior

En la primera parte del estudio seleccionamos el área de interés delimitando el banco superior e inferior del surco temporal superior (**Figura 1A**). El surco temporal superior es un área de la corteza de asociación temporal. El surco temporal superior fue elegido como región de interés porque es sabido que en la EA esta área se afecta de forma consistente con el depósito de A β , la formación

de ovillos neurofibrilares, y la muerte neuronal (Gómez-Isla et al, 1997). Cabe destacar que esta región es de especial interés para el estudio del fenotipo de A β debido a que presenta un abundante depósito de placas. Por tanto, resulta un área de interés adecuada para la caracterización de la patología de la EA en los grupos CTRL, IP, HP y AD, y comprobar así la hipótesis de la resiliencia.

ii. Corteza Entorrinal

En la segunda parte del estudio seleccionamos el área de interés delimitando los límites mediales y laterales de la corteza entorrinal descritos por Amaral et al (Amaral et al., 1990) (**Figura 1B**). La corteza entorrinal —área de Brodmann 28— es una región de gran vulnerabilidad donde los cambios patológicos de la EA aparecen de forma muy precoz (Gomez-Isla et al., 1996). Permite de este modo estudiar los sujetos con estadios iniciales de la EA (Braak I-II). Pero además, en los estadios finales de la enfermedad (Braak V-VI) las placas de A β y los ovillos neurofibrilares depositados en la corteza entorrinal se anticipa han estado presentes por más de 15 años. Por tanto, permite también el estudio de los estadios finales de la EA, y en particular nos proporciona una “foto” del fenotipo después de un largo período de evolución. Cabe destacar que esta región es de especial interés para el estudio del fenotipo de tau debido a que presenta una abundante formación de ovillos neurofibrilares. Por todo ello, resulta un área de interés adecuada para realizar:

- (i) El estudio confirmatorio del fenotipo de los grupos CTRL, IP, HP y AD.
- (ii) El estudio para comprobar la hipótesis sobre el valor diagnóstico de la formas solubles versus las formas fibrilares de A β y tau.

iii. Ambas regiones

En la tercera parte del estudio seleccionamos como áreas de interés el surco temporal superior y la corteza entorrinal tomando en cuenta las particularidades regionales que ya hemos detallado en los apartados 4.2.i y 4.2.ii. Utilizar ambas regiones nos permitió caracterizar los distintos estadios evolutivos de la EA, y

además, estudiar los fenotipos de A β y de tau con mayor precisión. Por todo ello consideramos estas dos áreas de interés adecuadas para comprobar la hipótesis de la respuesta inflamatoria propia de la resiliencia.

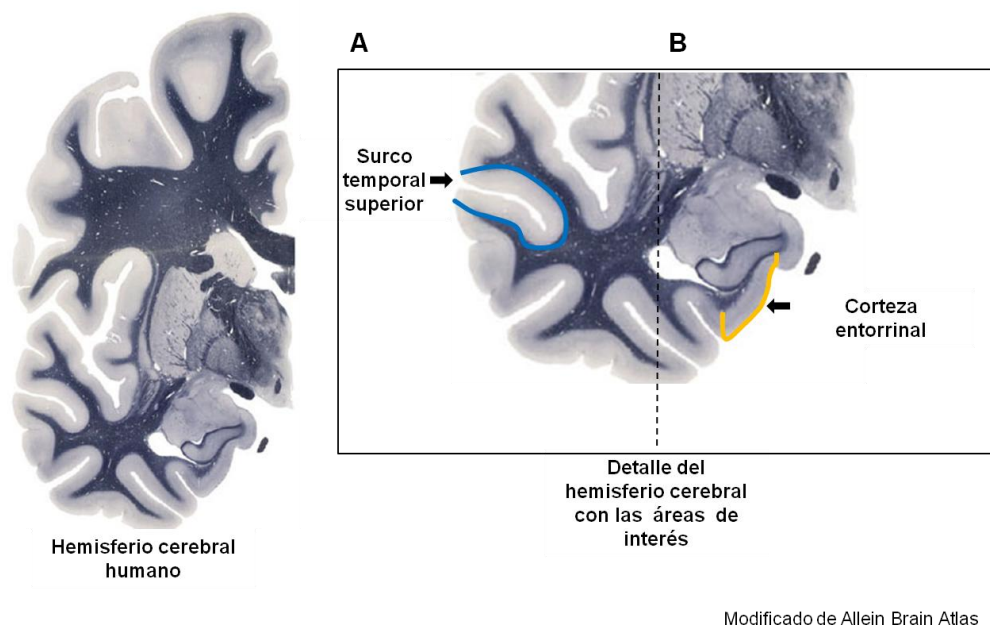


Figura 7. Hemisferio cerebral humano con las regiones de interés señaladas. (A) El surco temporal superior permitió estudiar los sujetos con estadios finales de la EA (Braak V-VI). La línea azul delimita el banco superior e inferior del surco temporal superior. (B) La corteza entorrinal permitió estudiar los sujetos con estadios iniciales de la EA (Braak I-II), y finales (Braak V-VI). En particular, en los sujetos con Braak V-VI, las placas de amiloide beta y los ovillos neurofibrilares presentes en la corteza entorrinal tenían un período de evolución de más de 15 años. La línea naranja delimita los límites mediales y laterales de la corteza entorrinal.

3.3. Métodos generales

i. Neuropatología cuantitativa

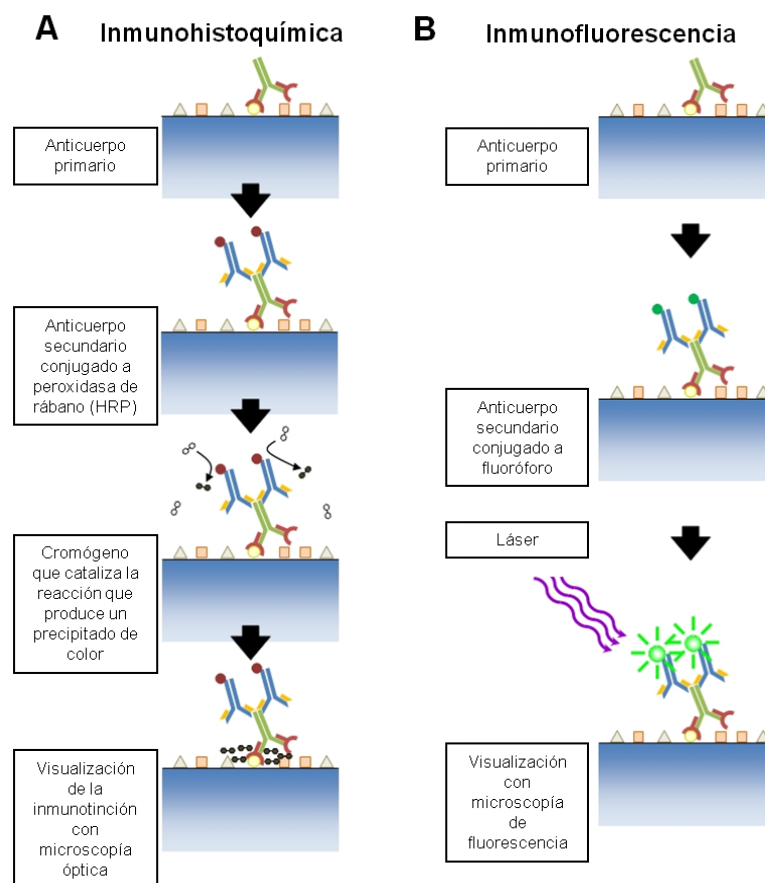
- Inmunohistoquímica / Inmunofluorescencia

La inmunohistoquímica es una técnica que utiliza anticuerpos específicos para reconocer y revelar estructuras en secciones de tejido.

El anticuerpo primario se dirige contra la estructura deseada, y para su visualización se utiliza un anticuerpo secundario etiquetado que se dirige contra anticuerpos de la especie en la cual se generaron los anticuerpos primarios. El anticuerpo secundario contiene un enzima, por ejemplo, peroxidasa de rábano

(HRP por sus siglas en inglés), que actúa como cromógeno catalizando una reacción que permite visualizar un compuesto incoloro en el lugar donde se encuentra el anticuerpo conjugado. Los resultados pueden ser entonces visualizados por microscopía óptica (**Figura 8A**).

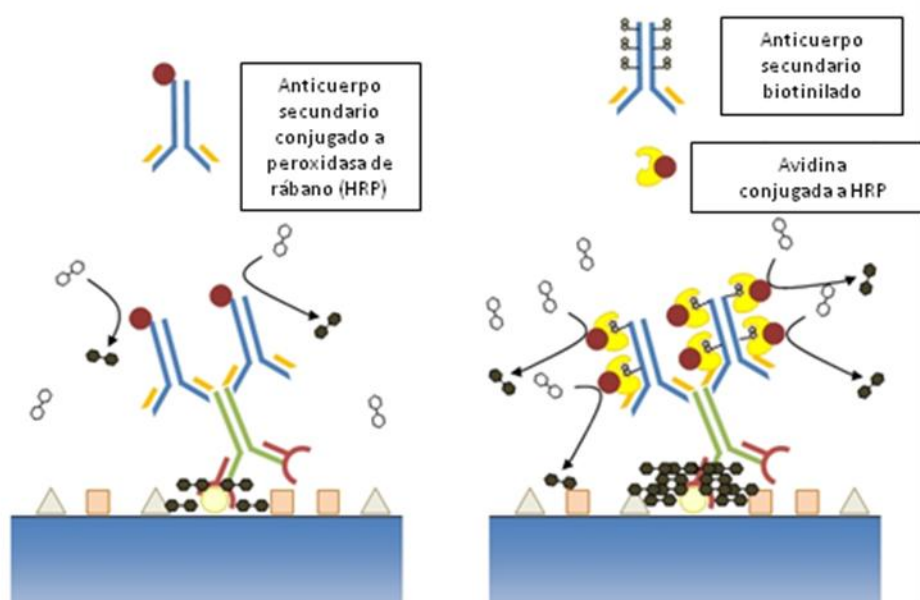
Por otra parte, una técnica análoga conocida como inmunofluorescencia utiliza agentes fluorescentes o fluoróforos conjugados al anticuerpo secundario, y los resultados se visualizan con un microscopio de fluorescencia (**Figura 8B**).



Modificado de Diamantine Institute

Figura 8. Método general de la inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. (A) En la técnica de inmunohistoquímica se utiliza un anticuerpo primario que reconoce de forma específica la estructura de interés. Un anticuerpo secundario etiquetado produce luego una reacción colorimétrica que permite la visualización del resultado con un microscopio óptico. (B) En la técnica de inmunofluorescencia se utiliza un anticuerpo primario que reconoce de forma específica la estructura de interés. Un anticuerpo secundario conjugado a un fluoróforo permite la visualización del resultado con un microscopio fluorescencia.

La señal que se obtiene tanto en inmunofluorescencia como en inmunohistoquímica puede ser incrementada con el uso de conjugados de avidina-biotina (ABC por sus siglas en ingles), que aumentan el número de sitios de enlace entre el enzima y el anticuerpo secundario. Para el uso del ABC se utiliza un anticuerpo secundario biotinilado que se une al anticuerpo primario. Luego se añade avidina conjugada a la peroxidasa de rábano, que se une al anticuerpo secundario por la afinidad con la biotina, produciéndose la reacción colorimétrica (**Figura 9**).



Modificado de Diamantine Institute

Figura 9. Aumento de la señal con conjugado de avidina-biotina. El uso de conjugados de avidina-biotina (ABC por sus siglas en ingles) incrementa la señal de la inmunohistoquímica al aumentar el número de sitios de enlace entre la peroxidasa de rábano y el anticuerpo secundario.

Las muestras de surco temporal superior eran muestras de tejido fresco que había sido congelado de manera instantánea, y conservado en la solución crioprotectora de Olmos (30% sacarosa) a -20°C . Utilizamos un criomicrotomo para obtener secciones de $50\ \mu\text{m}$ de grosor en las que aplicamos técnicas de inmunohistoquímica/inmunofluorescencia en secciones flotantes. En resumen, lavamos las muestras con solución tampón Tris ($\text{pH}=7$) y solución jabonosa que contenían tritón al 1%, bloqueamos las moléculas inespecíficas con solución de

leche al 5%, incubamos con el anticuerpo primario correspondiente durante al menos 12 horas, lavamos de forma seriada e incubamos con un anticuerpo secundario biotinilado/fluorescente por una hora. Revelamos con ABC usando el kit ABC (Vector laboratories, Burlingame, CA) sólo para la inmunohistoquímica, y colocamos el tejido sobre láminas de microscopía. Finalmente hidratamos el tejido con una serie de alcoholes de concentración decreciente, aclaramos con xileno, y aplicamos una solución de montaje.

Las muestras de corteza entorrinal habían sido previamente fijadas en una solución de formaldehído, deshidratadas con una serie de alcoholes de concentración creciente, aclaradas con xileno, y luego fijadas en bloques de parafina. Obtuvimos secciones de tejido de 8 μm de grosor con un micrótopo, y las colocamos en láminas de microscopía. Utilizamos xileno para desparafinizar, y luego hidratamos el tejido con una serie de alcoholes de concentración decreciente, y aplicamos técnicas de inmunohistoquímica / inmunofluorescencia de forma similar a las empleadas en secciones flotantes.

Para algunos de los parámetros estudiados realizamos un pretratamiento del tejido para exposición del antígeno. Es un procedimiento en el que el tejido se calienta en un tampón ácido o básico con el fin exponer los epítomos de algunos antígenos que resultan de otro modo difíciles de detectar. Utilizamos un horno microondas durante 20 minutos a 98°C, y un tampón de citrato de sodio 0.01M con un pH=6.0.

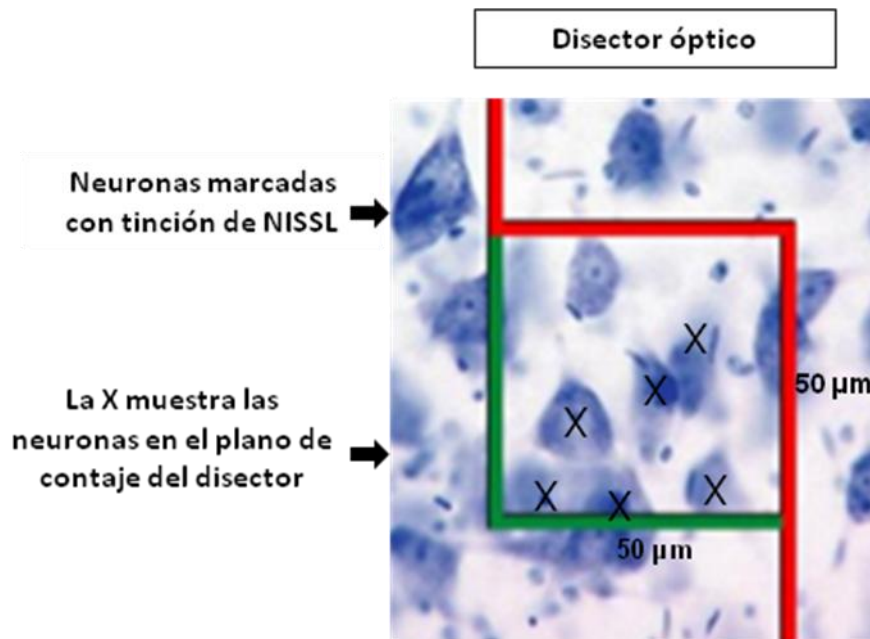
En la **Tabla 4** se enumeran los anticuerpos primarios utilizados en la inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

Tabla 4. Anticuerpos primarios de inmunohistoquímica / inmunofluorescencia

Parámetro	Anticuerpo primario	Huésped	Dilución tejido flotante	Dilución tejido parafinado	Pre-tratamiento
Carga de placas A β	10D5/6F3D	Ratón	1:500/1:100	1:50	Sí
Placas oligoméricas	NAB61	Ratón	1:400	1:200	No
Ovillos neurofibrilares	PFH-1	Ratón	1:200	1:100	Sí
Neuronas	NeuN	Ratón	1:200	N/A	Sí
Axones	SMI-312	Ratón	1:5000	1:2500	Sí
Astroцитos	GFAP	Ratón	1:5000	1:2500	Sí
Microglia	CD68	Ratón	1:100	1:50	Sí

- **Estereología**

El término estereología se refiere a un conjunto de métodos basados en principios matemáticos para obtener información sobre estructuras tridimensionales a partir de observaciones que se obtienen en secciones de tejido bidimensionales (Weibel, 1979). Para hacer el conteo de los ovillos neurofibrilares, las neuronas, los astroцитos reactivos y la microglía activada aplicamos técnicas de estereología sin sesgo de acuerdo con protocolos previamente publicados (Gomez-Isla et al., 1996; Hyman, 1998). En resumen, hicimos un muestreo sistemático al azar, y obtuvimos cinco secciones a lo largo de las regiones de interés a intervalos fijos de 3mm, de 50 μ m en el caso del surco temporal superior, y de 8 μ m en el caso de las secciones de parafina. Estimamos el volumen total de las regiones de interés aplicando el principio de Cavalieri, multiplicando la suma de las áreas delineadas que obtuvimos con el sistema Bioquant Image Analysis System (Nashville, TN) por la distancia entre las secciones. Finalmente, para hacer el conteo de los diferentes parámetros de estudio en cada sección, aplicamos un muestreo sistemático al azar con método de disector óptico de 50x50 μ m en el que se contaron los elementos que estaban contenidos en el marco del disector (**Figura 10**).



Modificado de Stereo Investigator

Figura 10. Muestreo sistemático al azar usando el método del disector óptico. En el método del disector óptico se cuentan los elementos contenidos en el marco de conteo. En este ejemplo se muestran neuronas teñidas con NISSL. Los elementos que tocan la línea verde y están dentro del marco aparecen marcados con una X y son los que se incluyen en la contaje. En cambio, los elementos que tocan la línea roja del marco del disector se excluyen de manera sistemática.

Calculamos el número de partículas o células aplicando la siguiente fórmula:

Por ejemplo, para una sección de 50μm:

$$\delta \text{ de neuronas} = x / y (50 \times 50 \times 50)$$

$$\text{Número total de neuronas} = \delta \text{ de neuronas} \times A1 \times 50$$

Donde:

δ = Densidad de neuronas

x= Número de neuronas contadas

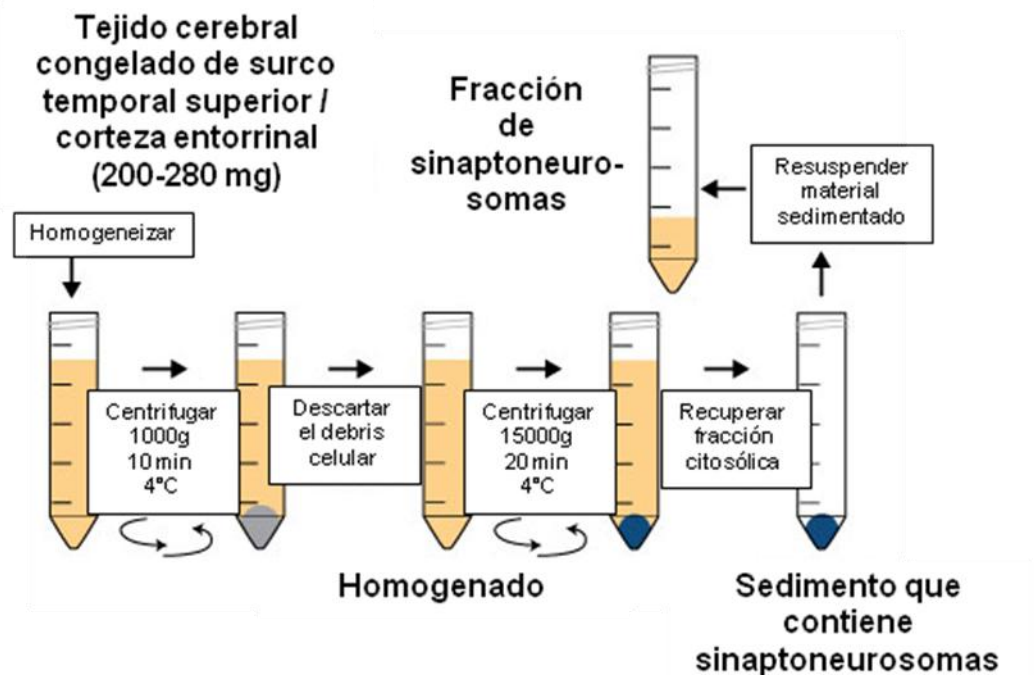
y= Número de disectores

A1= Área de la región de interés

ii. Bioquímica

- Extracción de sinaptoneurosomas

Preparamos fracciones de sinaptoneurosomas y citosólicas a partir de tejido congelado de la corteza del surco temporal superior, y de la corteza entorrinal (200-280 mg), siguiendo protocolos previamente publicados (Perez-Nievas B, 2013; Tai et al., 2012). En resumen, homogenizamos el tejido en un tampón de lisis a pH=7.9 con ayuda de un triturador mecánico a 170 rpm, y lo filtramos para eliminar los detritus celulares. Luego realizamos centrifugados secuenciales a diferente osmolaridad para obtener las diferentes fracciones celulares. Llevamos a ebullición una parte del filtrado con SDS 1.5%, y lo centrifugamos a 15000g durante 15 minutos. El sobrenadante obtenido fue el extracto total. Filtramos de nuevo el resto de la preparación, y la centrifugamos a 1000 g por 10 minutos. A partir del material sedimentado obtuvimos la fracción que contiene los sinaptoneurosomas; por otra parte, el sobrenadante obtenido fue centrifugado a 100000 g durante 30 minutos para eliminar los microsomas, y así recuperar la fracción de citosol. Para obtener los sinaptoneurosomas reconstituimos el material sedimentado en el tampón de lisis y lo centrifugamos de nuevo a 1000g por 10 minutos. Finalmente el material sedimentado fue extraído con la ayuda de un tampón Tris a pH=7.5, SDS 1.5% y dithiothreitol 2mM, y llevado a ebullición durante 5 minutos. Centrifugamos de nuevo a 15000 g por 15 minutos, y obtuvimos la fracción de sinaptoneurosomas a partir de la recolección del sobrenadante (**Figura 11**).



Modificado de Thermo-Fisher

Figura 11. Extracción de sinaptoneurosomas. La extracción de sinaptoneurosomas es un método de obtención de fracciones celulares que utiliza centrifugados secuenciales a diferentes velocidades, y lo combina con un gradiente de osmolaridad.

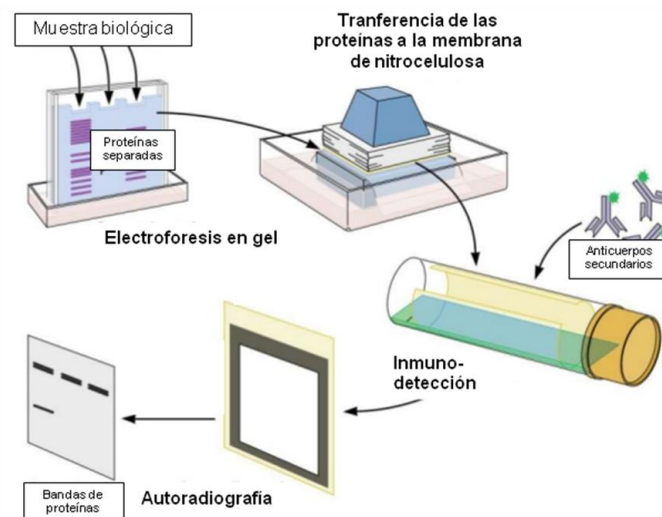
Para medir la pureza de los sinaptoneurosomas cuantificamos los niveles de las proteínas PSD-95, como marcador postsináptico, y sinaptofisina, como marcador presináptico, utilizando la técnica de SDS-PAGE seguida de Western-blot con los anticuerpos primarios adecuados (anti-PSD-95 de conejo 1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA; y anti-sinaptofisina de ratón 1:1000, Millipore, Billerica, MA), y los correspondientes anticuerpos secundarios fluorescentes (1:5000, anti-ratón IR680 and anti- conejo IR800). Para la detección usamos un sistema de imagen de fluorescencia infra-rojo (Odyssey, Li-cor, Lincoln, NE) (Ver apartado de Western blot para más detalle).

- Western blot

El Western blot o inmunoblot es una técnica que permite identificar una proteína de interés de forma específica, y cuantificarla de forma relativa en una muestra de tejido. Se basa en la electroforesis en gel que permite separar las proteínas por su

peso molecular. La proteína en estudio es reconocida por un anticuerpo específico, el anticuerpo primario, y de forma adicional, obtenemos información sobre su peso molecular y su cantidad relativa en la muestra.

La técnica comprende la preparación de la muestra con un lisado celular, y la degradación mecánica que permite liberar las proteínas. Luego se realiza una electroforesis en gel en las que se separan las proteínas. A continuación se hace una transferencia a una membrana que actuará como soporte. Finalmente, se procede a la inmunodetección específica de la proteína de interés con un anticuerpo primario. El resultado se hace visible gracias a un anticuerpo secundario que utiliza reacciones colorimétricas por autorradiografía, o sistemas de lectura para anticuerpos secundarios fluorescentes (**Figura 12**).



Modificado de Virology blog

Figura 12. Técnica de Western blot. El Western blot o inmunoblot permite reconocer una proteína con un anticuerpo de forma específica. Esta técnica se basa en el principio de la aplicación de la electroforesis en gel. Proporciona información sobre el peso molecular de la proteína de interés y su cantidad relativa en la muestra.

Utilizamos la técnica de Western blot para medir las fracciones solubles de A β , tau total, p-Tau, y del enzima glucógeno sintetasa kinasa-3- β , en los compartimentos sináptico y citosólico, tal y como se describe a continuación.

Previamente obtuvimos extractos de citosol y de sinaptoneurosomas de el surco temporal superior y la corteza entorrinal (para más detalle ver apartado de extracción de sinaptoneurosomas). Determinamos entonces la concentración de

proteína en cada muestra utilizando suero bovino de albúmina (Bovine serum albumin, o BSA) según el protocolo del kit de ensayo de Pierce™ BCA Protein (ThermoScientific, Waltham, MA).

En función de las características de migración de las proteínas de interés utilizamos uno de los siguientes geles de electroforesis (Invitrogen, Waltham, MA):

- 4%-12% Bis-Tris, 1,5 mm, tampón MES.
- 10% Bis-Tris, 1,5 mm, tampón MOPS.

Preparamos las muestras añadiendo agente reductor NuPAGE® 10x, tampón LDS 4x, y un volumen suficiente para obtener 20 µg de proteína. Desnaturalizamos las proteínas calentando a 95 °C durante 5 minutos, y añadimos SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard para su visualización durante la migración. Todos los reactivos utilizados fueron adquiridos de ThermoScientific, Waltham, MA.

Separamos las proteínas utilizando un gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Para ello cargamos las muestras en 4%-12% Bis-Tris, 1,5 mm, tampón MES o 10% Bis-Tris, 1,5 mm, tampón MOPS según la proteína de interés, y aplicamos un voltaje de 140 V durante 90 minutos. Transferimos las proteínas separadas durante la electroforesis a una membrana de nitrocelulosa Amersham Protran 0.4 (GE Healthcare, Chicago, IL) en una solución tampón de transferencia a 300 mA durante 90 minutos. Todo el procedimiento se realizó en un dispositivo para transferencia blot XCell SureLock™ Mini-Cell (ThermoScientific, Waltham, MA).

Previo a la inmunodetección realizamos un bloqueo de anticuerpos inespecíficos con una incubación de la membrana en solución tampón Tris, y tampón de bloqueo de Licor durante al menos 2 horas a 4°C. Finalmente, incubamos la membrana con el anticuerpo primario adecuado por un período de 12 horas. Realizamos lavados secuenciales y finalmente, añadimos el anticuerpo secundario de fluorescencia correspondiente. Detectamos la señal con el sistema de imagen Li-cor y el software Odyssey (Li-cor bioscience, Lincoln, MA).

En la **Tabla 5** se enumeran los anticuerpos primarios utilizados en el Western blot.

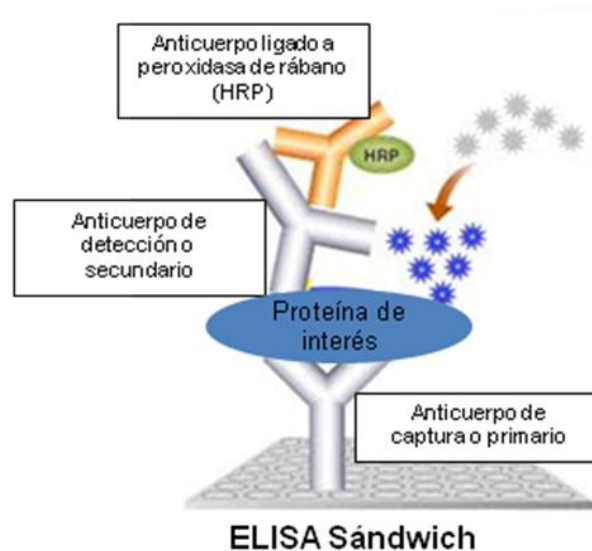
Tabla 5. Anticuerpos primarios de Western blot			
Parámetro	Anticuerpo primario	Huésped	Dilución
Sinaptoneurosomas	Sinaptofisina	Conejo	1:1000
	PSD95	Ratón	1:1000
Amiloide beta soluble	82E1/6E10	Ratón	1:1000
Tau total soluble	H7	Ratón	1:1000
p-Tau soluble	PHF-1	Ratón	1:1000
Glucógeno sintetasa kinasa-3- β	GSK-3- β	Conejo	1:1000

- ELISA

El ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA por sus siglas en inglés: “enzyme-linked immunosorbent assay”) es una técnica de inmunoensayo que permite reconocer un antígeno fijado a una matriz al combinar la especificidad de un anticuerpo con la sensibilidad de una reacción enzimática. Esta técnica, además de ser altamente específica, ofrece una alta sensibilidad por lo que permite realizar cuantificaciones absolutas en microgramos o incluso nanogramos a nivel celular o subcelular.

En general, el ELISA comprende el uso de un plato de microtitulación que se recubre con un antígeno. Se sigue de un bloqueo para evitar el reconocimiento de sitios inespecíficos y de falsos positivos, y de una incubación con un anticuerpo primario. Finalmente, la adición de un anticuerpo secundario etiquetado, permite gracias a una reacción enzimática colorimétrica, visualizar el resultado del ensayo. Existen variaciones de este método general, a continuación describiremos el método de “ELISA sándwich” que utilizamos en nuestro estudio.

Recubrimos un plato de ELISA de 96 micropocillos con un anticuerpo de captura y lo incubamos durante 12 horas a 4 °C. Hicimos lavados secuenciales, incubamos con la solución de bloqueo durante 30 minutos, lavamos de nuevo, y añadimos 100 µL de las muestras diluidas que incubamos durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, incubamos las muestras con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano durante una hora, lavamos, y añadimos el sustrato de la reacción enzimática colorimétrica para revelar el ensayo y obtener las medidas en un lector de microplatos (**Figura 13**).



Modificado de Sino Biological

Figura 13. Técnica de ELISA Sándwich. La técnica de ELISA permite reconocer un antígeno fijado a una matriz combinando la especificidad de un anticuerpo con la sensibilidad de una reacción enzimática. Ofrece la ventaja de poder realizar cuantificaciones absolutas en microgramos o incluso nanogramos a nivel celular o subcelular.

3.4. Parámetros

i. Amiloide beta

- **Carga de placas de amiloide beta, placas oligoméricas y placas densas cuantificada por análisis de imágenes de microscopio**

Realizamos tinciones inmunohistoquímicas con el anticuerpo primario 10D5 / 6F3D para determinar la **carga total de amiloide- β** que comprende las placas difusas y las placas fibrilares (1:50, Dako, Carpinteria), y con el anticuerpo primario conformacional NAB61 para marcar las **placas oligoméricas de amiloide- β** (1:400, cedido por la Dra. Virginia Lee, University of Pennsylvania) (Lee et al., 2006). Luego añadimos el correspondiente anticuerpo secundario biotinilado IgG anti-ratón (1:200, Southern Biotechnology, Birmingham, AL) y usamos el kit estándar Vectastain Elite ABC para amplificar la señal (Vector Laboratories, Burlingame, CA) (Montine et al., 2012). El estudio de la carga de placas A β en el surco temporal superior se completó con el anticuerpo primario 10D5. En el estudio de la corteza entorrinal sustituimos el 10D5 por el 6F3D ya que la casa comercial lo había dejado de fabricar. Realizamos pruebas que mostraron la consistencia interna entre ambos anticuerpos y así comprobamos que el 6F3D reconocía epítomos similares al 10D5. Para la inmunohistoquímica con 10D5 / 6F3D optimizamos la señal con pretratamiento para la exposición del antígeno, y tratamos las muestras con ácido fórmico al 90 % para desnaturalizar la conformación fibrilar y permitir la unión del anticuerpo.

La carga total de placas de A β se definió como el porcentaje total del área de interés de 50 μ m de grosor en el caso del surco temporal superior, y de 8 μ m de grosor en el caso de la corteza entorrinal, que estaba cubierta por la inmunotinción 10D5 / 6F3D. De forma similar se definió la carga total de placas oligoméricas de amiloide- β como el área cubierta por la inmunotinción NAB61. Para la cuantificación de ambos parámetros utilizamos la aplicación del umbral óptico del software Bioquant (version 6.90.10; MBSR, Nashville, TN) según había sido descrito previamente (Serrano-Pozo et al., 2012). En resumen, el software conectado con un microscopio óptico Leica DMRB (DAGE-MTI, Michigan, IN) permite hacer un muestreo sistemático al azar, y establecer un umbral de la imagen con el objetivo 10, que corrige las irregularidades del fondo, y mide la superficie cubierta por la tinción.

Utilizamos la tinción de tioflavina-S para marcar las **placas densas o placas de A β fibrilares con core denso**. Teñimos las muestras de tejido con tioflavina-S

(Sigma, St. Louis, MO) al 0.05% en etanol al 50% durante 10 minutos. Definimos la carga total de amiloide- β fibrilar como el porcentaje del área de interés de 50 μm de grosor en el caso del surco temporal superior, y de 8 μm de grosor en el caso de la corteza entorrinal, cubierto por depósitos tioflavina-S positivos. Calculamos manualmente la carga total de placas de $A\beta$ fibrilares con core denso delineando el perímetro de las placas con ayuda del software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) (Serrano-Pozo et al., 2012). Adquirimos las imágenes con un microscopio de epifluorescencia equipado con una cámara digital conectada al software de estereología CAST (DP70, Olympus, Melville, NY).

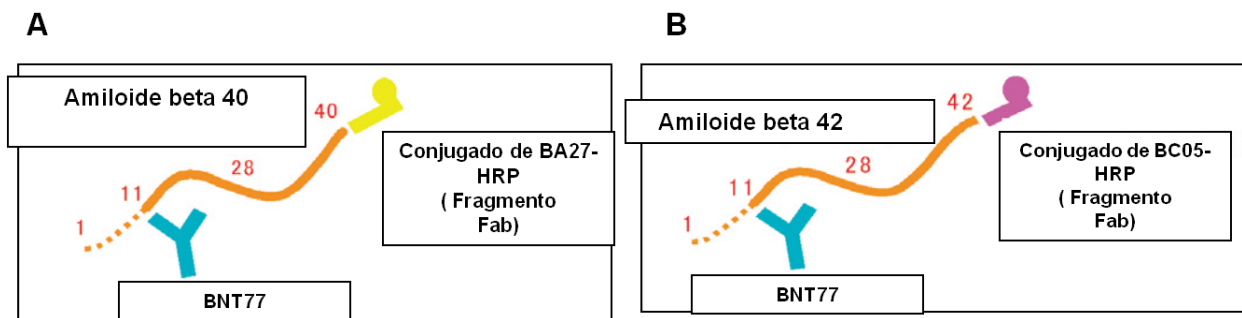
- **Fracciones de amiloide beta soluble citosólico y sináptico cuantificados por Western blot**

Detectamos los niveles de monómeros y dímeros de $A\beta$ en las fracciones citosólicas y sinápticas con Western blot. Para ello utilizamos una combinación de dos anticuerpos monoclonales específicos que aumentan la sensibilidad de la prueba: el anticuerpo 82E1 que reconoce el extremo N-terminal del péptido $A\beta$ (IBL, Minneapolis, MN), y el anticuerpo 6E10 (Covance, Princeton, NJ) cuyo epítipo está formado por los aminoácidos 3-8 del péptido $A\beta$ (BioLegend, San Diego, CA) (para más detalle ver apartado de Western blot).

- **Especies solubles de amiloide beta 40 y amiloide beta 42 citosólico y sináptico cuantificadas por ELISA**

Medimos los niveles de $A\beta$ 40 y $A\beta$ 42 en las fracciones citosólica y sináptica con kits de ELISA (Human Amyloid 40 BNT77/BA27 and Human Amyloid 42 BNT77/BC05 ELISA kit, Wako, Japón). Este kit contiene microplacas cubiertas con el anticuerpo monoclonal BNT77 que detecta de forma específica la secuencia 11-28 de $A\beta$, un anticuerpo conjugado con el fragmento ab (Fab) BA27 para reconocer el residuo 40 de $A\beta$ 40, y un anticuerpo conjugado con el Fab BC05 para reconocer el residuo 42 de $A\beta$ 42. Seguimos el protocolo de la casa

comercial de acuerdo con los principios del ELISA sándwich (para más detalle ver apartado de ELISA) (**Figura 14**).



Modificado de Wako

Figura 14. ELISA de amiloide beta con el anticuerpo primario BNT77. (A) Para la detección de las especies soluble del amiloide beta 40 utilizamos BNT77 conjugado a BA27. **(B)** Para la detección de las especies soluble del amiloide beta 42 utilizamos BNT77 conjugado a BC05.

ii. Tau

- Ovillos neurofibrilares totales, intraneuronales y extraneuronales cuantificados por estereología

Para detectar los ovillos neurofibrilares hicimos pretratamiento del tejido para la exposición del antígeno seguido de tinciones inmunohistoquímicas con el anticuerpo primario PHF-1 (1:100, cedido por el Dr. Peter Davies, Litwin-Zucker Center for Research on Alzheimer's disease). A continuación revelamos con el correspondiente anticuerpo secundario biotinilado IgG antiratón (1:200, Southern Biotechnology, Birmingham, AL), y aumentamos la señal con el kit estándar Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA). En el estudio de la corteza entorrinal, además, teñimos las secciones inmunomarcadas con PHF-1 con Nissl. Esto nos permitió discriminar los ovillos intraneuronales y extraneuronales. Clasificamos como ovillos intraneuronales tan sólo a aquellos ovillos neurofibrilares que colocalizaban con neuronas cuyo nucleolo era visible. Realizamos el conteo de los ovillos neurofibrilares totales, intraneuronales, y extraneuronales. Para ello utilizamos un microscopio que incorpora una cámara digital asociada a un software de análisis de imagen por estereología (Bioquant, version 6.90.10, Nashville, TN) según protocolos previamente publicados (para

más detalle ver apartado de estereología) (Gomez-Isla et al., 1996; West and Gundersen, 1990).

- Fracciones de tau total y tau fosforilada soluble citosólica y sináptica cuantificadas por Western blot

Medimos los niveles de especies solubles de tau en las fracciones citosólica y sináptica por Western blot. Para ello utilizamos anticuerpos específicos contra la proteína tau humana total (H7, Dako, Carpinteria, CA), y contra tau fosforilada (p-Tau) en los aminoácidos serina-396 y serina-404 (PHF-1, cedido amablemente por el Dr. Peter Davies, Litwin-Zucker Center for Research on Alzheimer's disease) (para más detalle ver apartado de Western blot).

- Especies solubles de tau total y tau fosforilada soluble citosólica y sináptica cuantificadas por ELISA

Medimos las especies solubles de tau total y p-Tau en las fracciones citosólica y sináptica por ELISA de doble sándwich. Para ello utilizamos un anticuerpo monoclonal específico para la proteína tau humana total (fosforilada y no fosforilada) siguiendo el protocolo de la casa comercial (Invitrogen, Camarillo, CA). En resumen, cargamos las muestras por duplicado en microplacas precubiertas con un anticuerpo primario específico para tau humana. A continuación, añadimos un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano. Finalmente medimos la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm en un lector de microplacas de 96 pocillos (Wallac 1420 Victor2, Perkin Elmer, Waltham, MA) (para más detalle ver apartado de ELISA).

iii. Glucógeno sintetasa kinasa-3- β citosólica y sináptica cuantificadas por Western blot

Para medir los niveles de glucógeno sintasa 3 β (GSK-3 β) en las fracciones citosólicas y sinápticas sometimos las muestras de tejido (20 μ g de proteínas). a

electroforesis en un gel Bis-Tris SDS de poliacrilamida al 4-12 % en tampón MES (NuPAGE Novex, NuPAGE MES, Invitrogen, Grand Island, NY). Luego transferimos las proteínas de los geles a membranas de nitrocelulosa y las incubamos 1 hora con tampón de bloqueo (Odyssey, Invitrogen, Grand Island, NY). Después las incubamos 2 horas con un anticuerpo primario anti-GSK-3 β de conejo (1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA). A continuación, realizamos una incubación de 1 hora con un anticuerpo secundario fluorescente (anti-conejo IR800). Finalmente, detectamos la señal utilizando un sistema de imagen fluorescente infra-rojo (Odyssey, Li-cor, Lincoln, NE) (para más detalle ver apartado de Western blot).

iv. Número de neuronas cuantificado por estereología y grosor cortical cuantificado por análisis de microfotografías

En el estudio del surco temporal superior realizamos tinciones inmunohistoquímicas con el anticuerpo primario NeuN (1:200, Chemicon, Billerica, MA) precedidas por un pretratamiento para la exposición del antígeno. A continuación revelamos la señal con el correspondiente anticuerpo secundario biotinilado IgG anti-ratón (1:200, Southern Biotechnology, Birmingham, AL), y amplificamos la señal utilizando el kit estándar Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

En el estudio de la corteza entorrinal, dado que la fijación en las secciones de parafina limitaba la inmunotinción con NeuN, hicimos el marcaje neuronal con la tinción de Nissl. Para ello desparafinamos las muestras en xileno, hidratamos el tejido con soluciones decrecientes de etanol seriadas, y finalmente, teñimos con violeta de cresilo al 0.1 % durante 10 minutos.

En ambas regiones de interés realizamos el conteo estereológico de neuronas según protocolos publicados (para más detalle ver apartado de estereología) (Gomez-Isla et al., 1996; West and Gundersen, 1990).

Para medir el grosor cortical utilizamos el software CAST (DP70, Olympus, Melville, NY) conectado a un microscopio equipado con una cámara digital que permitía visualizar las secciones.

v. Trayectoria axonal y neuritas cuantificadas por análisis de imágenes de microscopio

Visualizamos los axones y las neuritas distróficas con una tinción inmunofluorescente utilizando el anticuerpo SMI-312 (1:2000, Biolegend, San Diego, CA) y un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con cianina-3 (1:200, Jackson Inmuno Research, West Grove, PA). A continuación, teñimos las secciones con tioflavina-S (0.05% en 50% etanol). Obtuvimos múltiples microfotografías con un microscopio de epifluorescencia (Zeiss Axio Imager.Z2, Carl Zeiss microscopy LLC, Thornwood, NY) equipado con el software Axiovision 4 (Carl Zeiss Microimaging, GmbIt, Jena, Germany). Estimamos la razón de la curvatura de los segmentos axonales respecto a su distancia con las placas tioflavina-S positivas usando el software ImageJ según protocolos publicados (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) (Spires-Jones et al., 2009). En breve, calculamos la razón de la curvatura como el cociente entre la longitud curvilínea del segmento axonal y la distancia recta de un extremo a otro del segmento axonal. Estimamos la distancia de cada axón con la placa de A β tioflavina-S positiva más próxima calculando la media aritmética de tres medidas: las distancias entre los dos extremos del segmento axonal y el borde de la placa, y la distancia entre el punto medio del segmento axonal y el borde de la placa. Sólo incluimos en estos análisis los segmentos axonales con una longitud curvilínea >20 μm . Designamos los axones situados a una distancia de menos de 50 μm de las placas de tioflavina-S positivas como “axones cerca de placas”, y el resto como “axones lejos de placas”. Adicionalmente, cuantificamos las “neuritas distróficas por placa”, definidas como protrusiones y esferoides axonales SMI-312 positivos con una superficie >6 μm^2 contenidos en el área de las placas.

vi. Astrocitos reactivos cuantificados por estereología

Para marcar los astrocitos reactivos hicimos un pretratamiento del tejido para la exposición del antígeno seguido de tinciones inmunohistoquímicas con el anticuerpo primario contra la proteína ácida fibrilar glial o GFAP (1:2500, Abcam,

Cambridge, MA), que es un filamento intermedio del citoesqueleto de los astrocitos y que se regula al alza en los astrocitos reactivos (Beach et al., 1989). A continuación, revelamos con el correspondiente anticuerpo secundario biotinilado IgG anti-ratón (1:200, Southern Biotechnology, Birmingham, AL), y amplificamos la señal con el kit estándar Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

Realizamos el contaje estereológico de astrocitos activados según protocolos publicados (ver apartado de estereología) (Gomez-Isla et al., 1996; West and Gundersen, 1990) (para más detalle ver apartado de estereología).

vii. Microglia activada cuantificada por estereología

De forma similar, para marcar la microglía activada hicimos un pretratamiento del tejido para la exposición del antígeno seguido de tinciones inmunohistoquímicas con el anticuerpo primario anti-CD68 (1:50, Dako, Carpinteria, CA), que es un marcador muy usado para células con fenotipo fagocítico, incluyendo macrófagos y microglía, y que se expresa fundamentalmente en la membrana lisosomal (Verbeek et al., 1995). Luego utilizamos el correspondiente anticuerpo secundario biotinilado IgG anti-ratón (1:200, Southern Biotechnology, Birmingham, AL) para revelar el resultado, y amplificamos la señal utilizando el kit estándar Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA). El contaje estereológico se realizó según protocolos publicados (Gomez-Isla et al., 1996; West and Gundersen, 1990) (para más detalle ver apartado de estereología).

3.5. Análisis estadístico general

Hicimos el análisis de normalidad con el test de Kolmogorov-Smirnov. En el caso de las variables con distribución normal utilizamos el test de ANOVA unidireccional seguido del post-test de Tukey para comparaciones múltiples. En el caso de las variables que no seguían una distribución normal utilizamos el test de ANOVA unidireccional de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Dunn para

comparaciones múltiples. En todos los tests el nivel de significación fue establecido como un valor de $p < 0.05$. Los datos están presentados como media \pm error estándar de la media. Realizamos todos los análisis estadísticos generales con la versión 5.00 de GraphPad Prism (GraphPadSoftware, San Diego, CA).

3.6. Perfil de citoquinas

i. Ensayo multiplex

Un ensayo multiplex es aquel que mide de forma simultánea más de 12 parámetros. Se llama Bioplex al ensayo multiplex que mide moléculas biológicas. Utilizamos un inmunoensayo multiplex Bio-Plex[®] de BioRad para cuantificar de forma simultánea 27 citoquinas. El principio del ensayo es similar al del ELISA sándwich (para más detalle ver apartado de ELISA) pero la tecnología utilizada sigue los principios del Luminex Multi-Analyte Profiling[®] (xMAP). La tecnología Luminex permite analizar ensayos multiplex gracias a plataformas que detectan por citometría de flujo la superficie de poliestireno que recubre cuentas microscópicas. El ensayo Bioplex utiliza una matriz de cuentas cubiertas de poliestireno que están internamente teñidas con diferentes proporciones de fluoróforos, y codificadas por colores para generar un mapa específico de localización durante la lectura de la señal. A su vez, estas cuentas están cubiertas por un anticuerpo específico, que en este caso, es para una determinada citoquina. Un diodo de láser rojo identifica el color de las cuentas, y un láser verde excita de forma simultánea la etiqueta fluorescente de ficoeritrina que se usa para la detección del anticuerpo en la matriz. De esta forma, la cantidad de fluorescencia verde es proporcional a la cantidad de proteína capturada en el inmunoensayo. Utilizamos cuentas magnéticas ya que los ensayos Luminex xMAP pueden utilizar como sustrato este tipo de microesferas que presentan ciertas ventajas. Las cuentas magnéticas están cubiertas de magnetita, presentando propiedades fluorescentes y magnéticas de forma simultánea lo que permite hacer ensayos con lavados automatizados aportando una óptima consistencia (**Figura 15**).

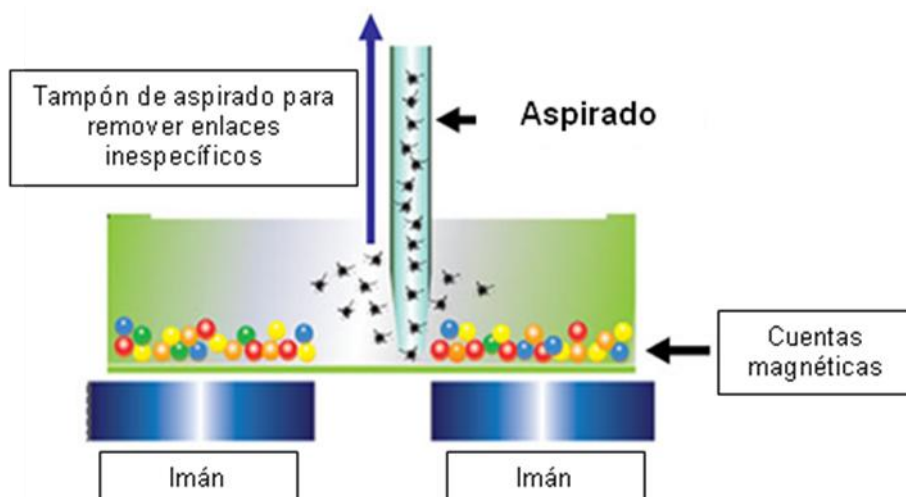


Figura 15. Lavado automático con cuentas magnéticas en ensayo Bioplex. El ensayo Bioplex permite medir específicamente más de 12 moléculas biológicas de forma simultánea. La tecnología más reciente utiliza cuentas fluorescentes, y magnéticas, que añaden consistencia al ensayo por medio de lavados automáticos.

ii. Cuantificación de citoquinas

En un subgrupo de 53 sujetos de los que se disponía de tejido cerebral criopreservado obtuvimos muestras de tejido congelado de dos regiones anatómicas de interés: el surco temporal superior y la corteza entorrinal. En primer lugar procesamos el tejido con el kit de lisis celular de bioplex (Bio-Plex Cell Lysis Kit, BioRad Laboratories, Hercules, CA) al que se añadió 1 tableta de inhibidor de proteasas (cOmplete Mini™, Roche, Indianapolis, IN). Una vez las muestras estuvieron lisadas y homogeneizadas las colocamos en un rotador “end-over-end” durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente, las centrifugamos a 13.200 RPM. Guardamos el sobrenadante a -80°C. Medimos la concentración de proteínas con un kit de ensayo de BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Waltham, MA), y normalizamos las muestras a una concentración de 7.5µg/25µL en el tampón de lisis. Posteriormente, diversas proteínas de la familia de las citoquinas fueron cuantificadas con el kit de inmunoensayo Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-Plex (BioRad, M50-0KCAF0Y) según el protocolo que acompaña al kit en una unidad de multiplex MAGPIX™ (Luminex, Austin, TX) (para más detalle ver apartado sobre ensayo multiplex). Cuantificamos un total de veinte 27 citoquinas:

- FGF basic
- Eotaxin
- G-CSF
- GM-CSF
- IFN- γ
- IL-1 β
- IL-1ra
- IL-2
- IL-4
- IL-5
- IL-6
- IL-7
- IL-8
- IL-9
- IL-10
- IL-12 (p70)
- IL-13
- IL-15
- IL-17
- IP-10
- MCP-1 (MCAF)
- MIP-1 α
- MIP-1 β
- PDGF-BB
- RANTES
- TNF- α
- VEGF

iii. Normalización de los datos

Realizamos análisis computacionales siguiendo métodos de biología de sistemas con MATLAB (Mathworks, Natick, MA). Para normalizar los datos obtenidos del ensayo bioplex aplicamos un método matemático que toma en cuenta su carácter multidimensional. Para un conjunto de datos con n muestras y m medidas por muestra, el conjunto de datos \mathbf{X} se expresa como:

$$\mathbf{X} = [\mathbf{x}_1 \cdots \mathbf{x}_i \cdots \mathbf{x}_n]^T \quad [1]$$

donde $\mathbf{x}_i = [x_{i,1} \cdots x_{i,j} \cdots x_{i,m}]^T$ son las medidas de citoquinas obtenidas en la muestra i^{th} . Calculamos entonces un “coeficiente de corrección de muestra” a partir de una sola muestra, y multiplicamos este valor por cada una de las medidas, corrigiendo de este modo, el error de carga y normalizando los datos. Utilizamos el coeficiente de corrección para minimizar el error “sum-squared” entre cada medida de citoquina corregida, y la media de dicha citoquina en todo el conjunto de datos:

$$a_i = \arg \min_{\hat{a}_i} \sum_{j=1}^m (\hat{a}_i x_{i,j} - \mu_j)^2 \quad [2]$$

donde $\mu_j = \sum_{i=1}^n x_{i,j} / n$ y el conjunto de datos normalizados fue

$$\mathbf{X}_{\text{norm}} = [a_1 \mathbf{x}_1 \cdots a_i \mathbf{x}_i \cdots a_n \mathbf{x}_n]^T \quad [3]$$

Para mantener un efecto consistente para cada citoquina en la ecuación, cada una de las medidas, $x_{i,j}$, se normalizó con μ_j antes de calcular los coeficientes de corrección de carga de las muestras.

iv. Análisis con métodos de biología de sistemas: regresión de mínimos cuadrados parciales

La regresión de mínimos cuadrados parciales, o D-PLRS por las siglas en inglés de “discriminant partial least squares regression”, es un método de identificación de variables que no son obvias al investigador, llamadas así latentes (LV), a partir de un análisis matemático de variables observadas. Las variables latentes representan la varianza común de las variables medidas y por lo tanto reflejan el grado en que éstas varían o se desplazan en conjunto (Tabachnick et al 2001). Aplicamos un rango de puntuación z a los datos de los parámetros patológicos, bioquímicos y de citoquinas medidos. Posteriormente, realizamos una regresión usando la función de D-PLRS de Cleiton Nunes disponible en el “Mathworks File Exchange”. Para cada regresión se usó una rotación ortogonal en el plano LV1-LV2 con el fin de encontrar un nuevo plano LV que separara de forma óptima los grupos según la variable Y. **(Figura 16)**.

Para identificar candidatos de citoquinas con valor predictivo de resiliencia hicimos un análisis de D-PLRS y un análisis de curva ROC (del inglés “receiver operating characteristic curve”) basado en una validación cruzada dejando uno fuera o LOOCV (del inglés “Leave-one-out cross-validation”).

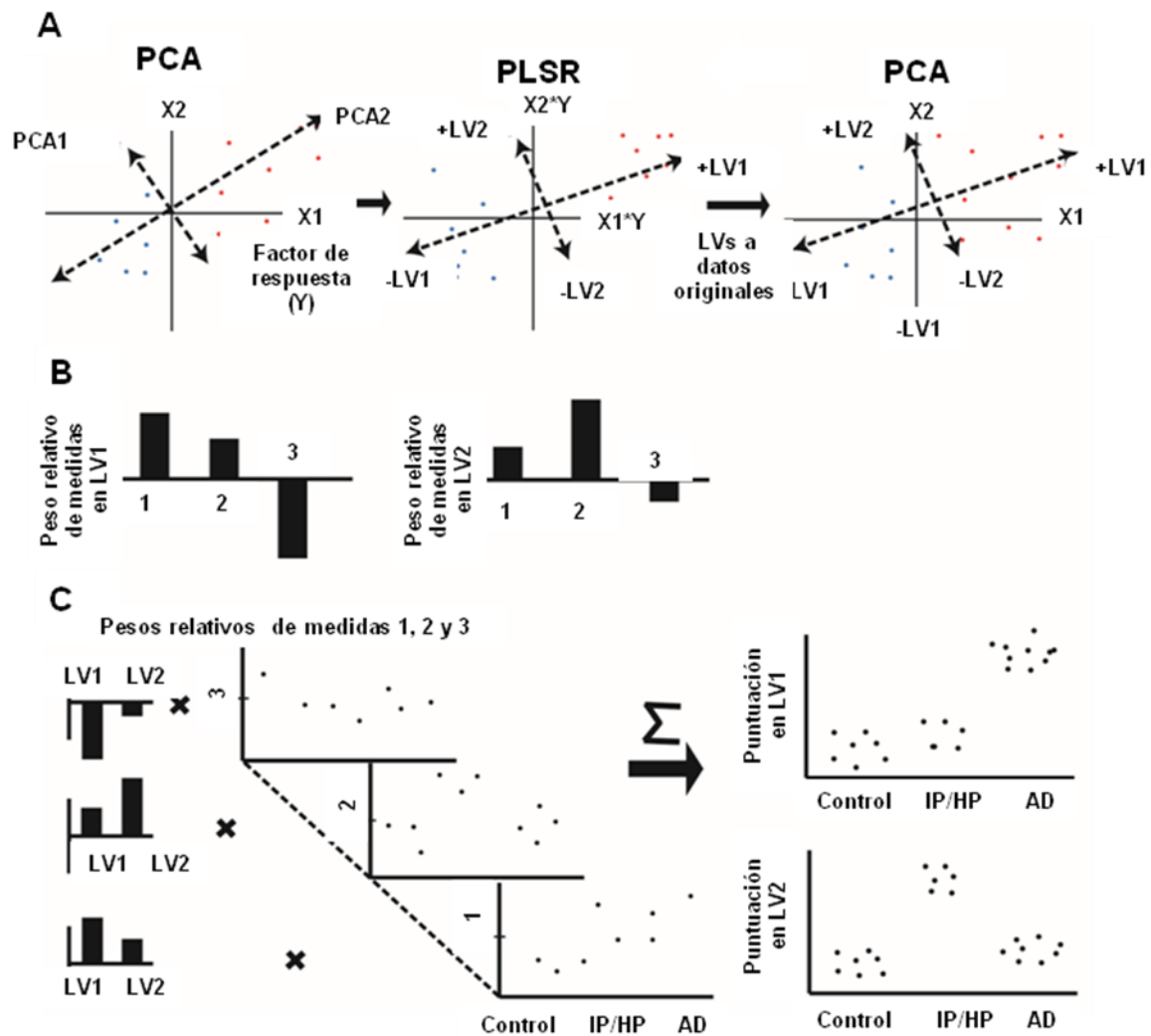


Figura 16. Descripción conceptual del análisis multivariante con regresión de mínimos cuadrados parciales. (A) El análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés) encuentra dos nuevos ejes que explican la máxima varianza en un grupo de datos independientes. Los datos se transforman con el factor de respuesta (Y) resultado del PCA y la regresión de mínimos cuadrados parciales (PLSR por sus siglas en inglés) que define nuevos ejes utilizando variables latentes para reflejar la máxima varianza de los datos transformados. **(B)** Las variables latentes (LV) son variables compositivas de cada una de las entradas de la variable x, y cada variable x tiene un peso o “efecto” cuantitativo diferente en la dirección final resultante de los vectores LV. El peso o “efecto” de cada variable x se representa en gráficos de barras, en este estudio las variables x son las medidas o marcadores de patología, de bioquímica o de citoquinas. **(C)** El impacto relativo o “efecto” de cada medida o marcador se multiplica por cada uno de los valores originales para obtener una puntuación o “score” de PLSR para cada uno de las muestras. Las nuevas dimensiones que definen LV1 y LV2 separan a los datos respecto a las variables de predicción que en este caso son los diferentes grupos de estudio (Control, IP, HP y AD).

La **tabla 6** resume el capítulo de materiales y métodos.

Tabla 6. Resumen materiales y métodos					
Parámetro		Región de interés	Técnica	Cuantificación	Análisis de datos
Medidas de amiloide beta	Placas de amiloide beta	Surco temporal superior	Inmunohistoquímica 10D5	Análisis de imágenes de microscopía óptica con umbral (Software Bioquant)	Análisis estadístico general
		Corteza entorrinal	Inmunohistoquímica 6F3D		
	Placas densas	Ambas regiones	Tinción tioflavina-S	Análisis de imágenes de microscopía fluorescente (Software Image J)	
	Placas oligoméricas		Inmunohistoquímica NAB61	Análisis de imágenes de microscopía óptica con umbral (Software Bioquant)	
	Amiloide beta soluble citosólico y sináptico		Western blot 82E1/6E10	Sistema de imagen Li-cor (Software Odyssey)	
	Amiloide beta 40 soluble citosólico y sináptico		ELISA BNT77/BA27	Análisis con lector de absorbancia (Wallac)	
	Amiloide beta 42 soluble citosólico y sináptico		ELISA BNT77/BC05		
Medidas de tau	Ovillos neurofibrilares totales		Ambas regiones	Inmunohistoquímica PFH-1	Estereología
	Ovillos neurofibrilares intraneuronales	Corteza entorrinal	Inmunohistoquímica PFH-1 cotinción de Nissl		
	Ovillos neurofibrilares extraneuronales				
	Tau total soluble citosólica y sináptica	Ambas regiones	Western blotH7	Sistema de imagen Li-cor (Software Odyssey)	

			Corteza entorrinal	ELISA tau total	Análisis con lector de absorbancia (Wallac)	
Medidas de tau	p-Tau soluble citosólica y sináptica		Ambas regiones	Western blot PHF-1	Sistema de imagen Li-cor (Software Odyssey)	Análisis estadístico general
			Corteza entorrinal	ELISA p-Tau	Análisis con lector de absorbancia (Wallac)	
Quinasa de tau	Glucógeno sintetasa-3-β		Corteza entorrinal	Western blot Glucógeno sintetasa-3-β	Sistema de imagen Li-cor (Software Odyssey)	
Medidas de integridad neuronal	Neuronas		Surco temporal superior	Inmunohistoquímica NeuN	Estereología	
			Corteza entorrinal	Tinción de Nissl		
	Grosor cortical					
	Trayectoria axonal			Inmunohistoquímica SMI-312 Cotinción tioflavina-S	Análisis de imágenes de microscopía fluorescente (Software ImageJ)	
	Neuritas distróficas					
Medidas de inflamación	Astrocitos		Ambas regiones	Inmunohistoquímica GFAP	Estereología	
	Microglia			Inmunohistoquímica CD68		
	FGF basic	IL-10		Ensayo bioplex con cuentas magnéticas	Detección por citometría de flujo y magnetismo con unidad de multiplex	Biología de sistemas: Análisis de regresión de mínimos cuadrados parciales
	Eotaxin	IL-12 (p70)				
G-CSF	IL-13					
GM-CSF	IL-15					
IFN-γ	IL-17					
IL-1β	IP-10					
IL-1ra	MCP-1 (MCAF)					
IL-2	MIP-1α					
IL-4	MIP-1β					
IL-5	PDGF-BB					
IL-6	RANTES					
IL-7	TNF-α					
IL-8	VEGF					
IL-9						

4. Capítulo cuarto: resultados

La media de edad de los sujetos resilientes fue 84,8 años, por lo tanto ~ 7 años mayor a la esperanza de vida media en EE.UU. en 2008, que fue 78,1 años (datos del National Center for Health Statistics (Arias, 2012), lo que indica que en general eran longevos. Los sujetos controles y los sujetos con demencia incluidos en este estudio se eligieron de forma ajustada a la edad y sexo de los sujetos resilientes (**Tablas 7 y 8**).

4.1. Identificación de marcadores de resiliencia

La hipótesis de la cascada amiloide de la EA postula que el acúmulo de A β desencadena una cadena de eventos adversos que incluyen la hiperfosforilación de tau y su agregación en ovillos neurofibrilares, y la pérdida neuronal, seguidas por el deterioro cognitivo.

Para comprobar la hipótesis de la resiliencia humana a la patología de la EA medimos la carga de placas de A β , el número de ovillos neurofibrilares, y la integridad neuronal en los sujetos resilientes, y los comparamos con los sujetos con demencia.

i. La carga de placas de amiloide beta no predice resiliencia

En el surco temporal superior, la carga total de placas de A β 10D5-inmunoreactivas —placas difusas y placas densas— resultó significativamente mayor en el grupo AD en comparación con los grupos CTRL e IP. Sin embargo, no observamos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos AD y HP (**Tabla 7, Figura 17A y B**).

En la corteza entorrinal, tampoco observamos diferencias estadísticamente significativas en la carga total de placas de A β 6F3D-inmunoreactivas entre los grupos AD y HP o IP (**Tabla 8, Figura 17C y D**).

ii. El número de ovillos neurofibrilares no predice resiliencia

En el surco temporal superior, el número de ovillos neurofibrilares PHF-1-inmunoreactivos fue significativamente mayor en el grupo AD en comparación con los grupos CTRL e IP. Sin embargo, no observamos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos AD y HP (**Tabla 7, Figura 18C y D**).

En la corteza entorrinal, no observamos tampoco diferencias estadísticamente significativas en el número de ovillos neurofibrilares PHF-1-inmunoreactivos entre los grupos AD y HP o IP (**Tabla 8, Figura 18C y D**).

iii. Las medidas de integridad neuronal predicen resiliencia

- Preservación del número de neuronas y del grosor cortical

La integridad del sistema neuronal es un marcador subrogado bien conocido de la cognición normal (DeKosky and Scheff, 1990; Scheff et al., 2006). Estudios postmortem previos, y en especial aquellos conducidos por la Dra. Gómez-Isla, han demostrado que en la EA hay una pérdida masiva de neuronas y una correlación negativa entre el número de éstas y el estatus cognitivo del individuo (Giannakopoulos et al., 2003; Gomez-Isla et al., 1996) 2008). Por consiguiente, investigamos si el número de neuronas y el grosor cortical está preservado en los sujetos resilientes a pesar de presentar cantidades elevadas de patología Alzheimer.

En el surco temporal superior, observamos una reducción significativa de un 40% en el número de neuronas NeuN-inmunoreactivas, y de aproximadamente un 20% en el grosor cortical en el grupo AD con respecto al grupo CTRL. Sin embargo, tanto el número de neuronas como el grosor cortical no difirieron significativamente entre los grupos resilientes IP y HP y el grupo CTRL (**Tabla 7, Figura 19A**).

En la corteza entorrinal observamos una reducción significativa de un 53% en el número de neuronas teñidas con Nissl, y una reducción de aproximadamente un 35% en el grosor cortical en el grupo AD con respecto al grupo CTRL. Pero, sorprendentemente, tanto el número de neuronas como el grosor cortical no difirieron significativamente entre los grupos resilientes IP y HP y el grupo CTRL (**Tabla 8, Figura 19B y C**).

Estos datos indican que un número preservado de neuronas en las dos regiones estudiadas es un marcador de resiliencia a la patología de la EA. Este fenómeno podría tener al menos dos explicaciones diferentes: 1) los sujetos resilientes están protegidos contra la demencia porque poseen un número mayor de neuronas de base —hipótesis de la reserva cerebral—, o 2) la protección depende de que sus poblaciones neuronales son capaces de poner en marcha mecanismos que protegen su supervivencia ante la presencia de placas de A β y ovillos neurofibrilares.

- **Un mayor ratio de ovillos neurofibrilares intraneuronales /
totales predice resiliencia**

En estudios estereológicos cuantitativos la Dra. Gómez Isla ha establecido que la magnitud de la pérdida neuronal excede el número de ovillos neurofibrilares (Gomez-Isla et al., 1997). Los ovillos neurofibrilares pueden durar hasta dos décadas, y las neuronas portadoras de ovillos son capaces de permanecer viables y metabólicamente activas, lo que puede evidenciarse con una tinción positiva de Nissl de su citoplasma (Bussiere et al., 2003; Hof et al., 2003). Ambas observaciones implican la existencia de al menos dos mecanismos de muerte neuronal en la EA: uno que afecta a las neuronas portadoras de ovillos y que llevará a la aparición de ovillos “fantasmas” —estos son los ovillos extraneuronales que permanecen en el cerebro después de que las neuronas han muerto—, y otro que afecta a las neuronas libres de ovillos.

El ratio de ovillos intraneuronales sobre el total de ovillos podría, pues, representar una medida indirecta de resiliencia neuronal, mientras que el ratio de

ovillos extraneuronales sobre el total de ovillos podría interpretarse como una medida indirecta de vulnerabilidad neuronal. Por ello, decidimos estimar estos ratios en secciones de corteza entorrinal sometidas a una inmunohistoquímica para PHF1 y luego contrateñidas con la tinción de Nissl.

De este modo observamos que el ratio de ovillos intraneuronales sobre el total de ovillos fue significativamente mayor en los grupos resilientes IP y HP en comparación con el grupo AD (**Figura 20A y B**). Por el contrario, el ratio de ovillos extraneuronales sobre el total de ovillos fue significativamente mayor en el grupo AD en comparación con los grupos resilientes IP y HP (**Figura 20A y C**). En otras palabras, aunque los tres grupos no se diferenciaron por la cantidad total de ovillos neurofibrilares, estos se hallaron más frecuentemente en el interior de neuronas viables —a juzgar por la tinción de su citoplasma con cresyl violeta— en los sujetos resilientes que en los sujetos con demencia.

En conjunto, estos datos sugieren que las neuronas de los sujetos resilientes son más resistentes a la toxicidad causada por los ovillos y apoyan la idea de que en estos cerebros existen probablemente mecanismos específicos de neuroprotección que garantizan la supervivencia de dichas poblaciones neuronales pese a la presencia de abundantes depósitos de A β y tau. De este modo parece descartarse la posibilidad de que la resiliencia a la patología de Alzheimer deriva de un mayor número de neuronas y una mayor reserva cerebral de partida.

- **La preservación de la morfología axonal predice resiliencia**

Estudios previos han demostrado que existe una alteración marcada de la morfología de los axones asociada a la subpoblación de placas densas de A β teñidas con tioflavina-S. La disrupción de la trayectoria axonal y las protuberancias distróficas ocurren principalmente cerca de las placas, pero también pueden ocurrir lejos de ellas en cierta medida. Se piensa que estos cambios morfológicos también contribuyen al daño en la función del sistema neuronal y al deterioro cognitivo en la EA (Bussiere et al., 2003; Coma et al.,

2010; DaRocha-Souto et al., 2011; Perez-Nievas B, 2013; Serrano-Pozo et al., 2010; Spires et al., 2005). Por ello decidimos cuantificar el ratio de curvatura de la trayectoria de los axones y el número de distrofias neuríticas por placa compacta tioflavina-S positiva en los diferentes grupos de sujetos.

Tanto en el surco temporal superior como en el estudio confirmatorio de la corteza entorrinal, observamos que el ratio de curvatura axonal fue significativamente mayor en el grupo AD en comparación con los grupos resilientes IP y HP (**Figura 21A-C**). De forma similar, observamos un número significativamente mayor de neuritas distróficas alrededor de las placas densas en el grupo AD con respecto a los grupos resilientes IP y HP (**Figura 21A, B y D**). En otras palabras, las placas densas tioflavina-S positivas de los sujetos resilientes tuvieron un impacto significativamente menor sobre la morfología y geometría de las neuritas que las placas densas tioflavina-S positivas de los sujetos con demencia por EA.

Estos datos están de acuerdo con la idea de que los cambios neuríticos contribuyen al deterioro cognitivo en la EA y apoyan la noción de que las neuronas de los sujetos del grupo de resiliencia son menos vulnerables al efecto neurotóxico de las placas densas.

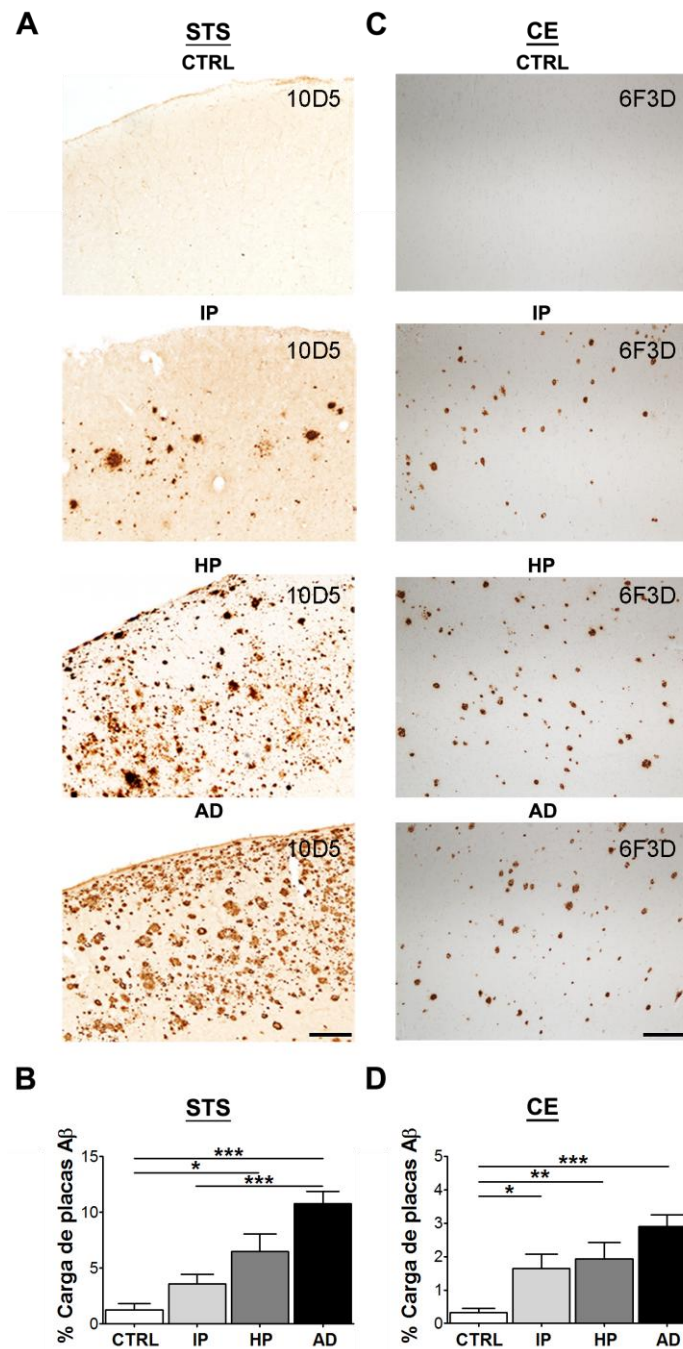


Figura 17. Carga de placas de amiloide beta ($A\beta$) en el surco temporal superior (STS) y en la corteza entorrinal (CE). Inmunohistoquímica con 10D5/6FD (A y C) y cuantificación estereológica de las placas de $A\beta$ (B y D) Comparación múltiple entre: (i) Grupo control (CTRL): sujetos sin demencia y con probabilidad baja de enfermedad de Alzheimer (EA) de acuerdo con los criterios del National Institute on Aging / Reagan Institute. (ii) Grupo IP: sujetos sin demencia y con probabilidad intermedia de EA. (iii) Grupo HP: sujetos sin demencia y con probabilidad alta de EA. (iv) Grupo con demencia (AD): sujetos con demencia y con probabilidad alta de EA. (A) Fotomicrografías representativas de placas de $A\beta$ inmunoreactivas para 10D5 en el STS. (B) No observamos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos AD y HP en la carga total de placas de $A\beta$ del STS. (C) Fotomicrografías representativas de placas inmunoreactivas para 6F/3D en la CE. (D) No observamos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos AD e IP o HP en la carga total de placas de $A\beta$ en la CE. Escala=200 micras. n=8-15 por grupo en el STS, n=11-23 por grupo en la CE. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Prueba de Kruskal-Wallis con post-test de Dunn para comparaciones múltiples.

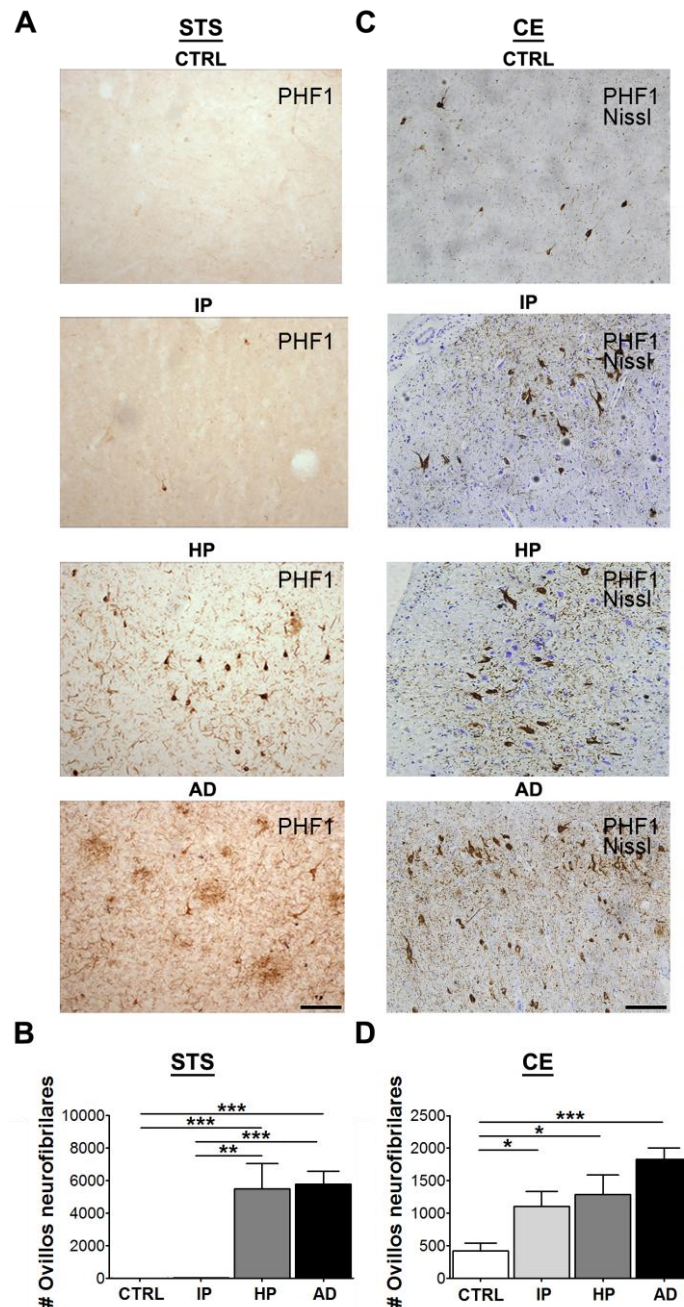


Figura 18. Número de ovillos neurofibrilares en el surco temporal superior (STS) y en la corteza entorrinal (CE). Immunohistoquímica con PHF-1 (**A y C**), co-tinción con Nissl (**C**) y cuantificación estereológica del número de ovillos neurofibrilares (**B y D**). Comparación múltiple entre: (i) Grupo control (CTRL): sujetos sin demencia y con probabilidad baja de enfermedad de Alzheimer (EA) de acuerdo con los criterios del National Institute on Aging / Reagan Institute. (ii) Grupo IP: sujetos sin demencia y con probabilidad intermedia de EA. (iii) Grupo HP: sujetos sin demencia y con probabilidad alta de AD. (iv) Grupo con demencia (AD): sujetos con demencia y con probabilidad alta de EA. (**A**) Fotomicrografías representativas de ovillos neurofibrilares inmunoreactivos para PHF-1 en el STS. (**B**) No observamos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos AD y HP en el número de ovillos neurofibrilares en el STS. (**C**) Fotomicrografías representativas de ovillos neurofibrilares inmunoreactivos para PHF-1 y cotinción con Nissl en CE. (**D**) No observamos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos AD e IP o HP en el número de ovillos neurofibrilares en la CE. Escala=200 micras. n=8-15 en surco temporal superior, n =11-23 por grupo en corteza entorrinal. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001. Prueba de Kruskal-Wallis con post-test de Dunn para comparaciones múltiples.

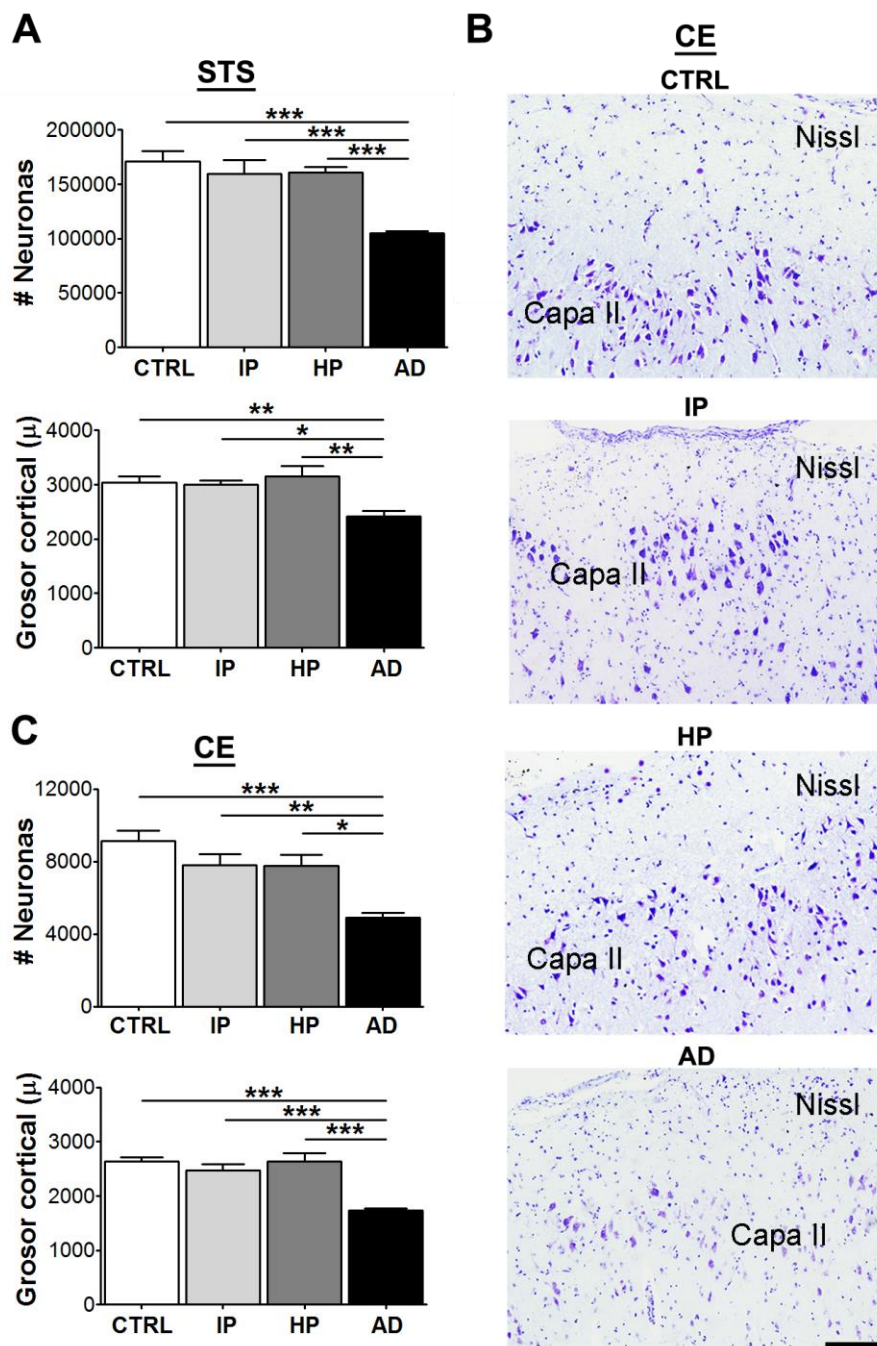


Figura 19. Número de neuronas y grosor cortical en el surco temporal superior (STS) y en la corteza entorrinal (CE). Cuantificación estereológica del número de neuronas (**A** y **C**) y tinción con Nissl. (**B**) Comparación múltiple entre: (i) Grupo control (CTRL): sujetos sin demencia y con probabilidad baja de enfermedad de Alzheimer (EA) de acuerdo con los criterios del National Institute on Aging / Reagan Institute. (ii) Grupo IP: sujetos sin demencia y con probabilidad intermedia de EA. (iii) Grupo HP: sujetos sin demencia y con probabilidad alta de AD. (iv) Grupo con demencia (AD): sujetos con demencia y con probabilidad alta de EA. (**A**) En el STS observamos una reducción significativa del 40% en el número de neuronas, y de aproximadamente un 20% del grosor cortical en el grupo AD en comparación con el grupo CTRL. El número de neuronas, y el grosor cortical estaban preservados los grupos IP y HP en comparación con el grupo CTRL. (**B**) Microfotografía representativa de la tinción de Nissl en CE que muestra una marcada disminución del número de neuronas de la capa II en el grupo AD, pero no en el grupo IP y HP (**C**) En la CE observamos una reducción significativa del 53% en el número de neuronas, y de aproximadamente un 35% del grosor cortical en el grupo AD en comparación con el grupo CTRL. El número de neuronas, y el grosor cortical estaban preservados en los grupos IP y HP en comparación con el grupo CTRL. Escala=200 micras. n=8-15 en surco temporal superior, n=11-23 por grupo en corteza entorrinal. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Prueba de Kruskal-Wallis con post-test de Dunn para comparaciones múltiples.

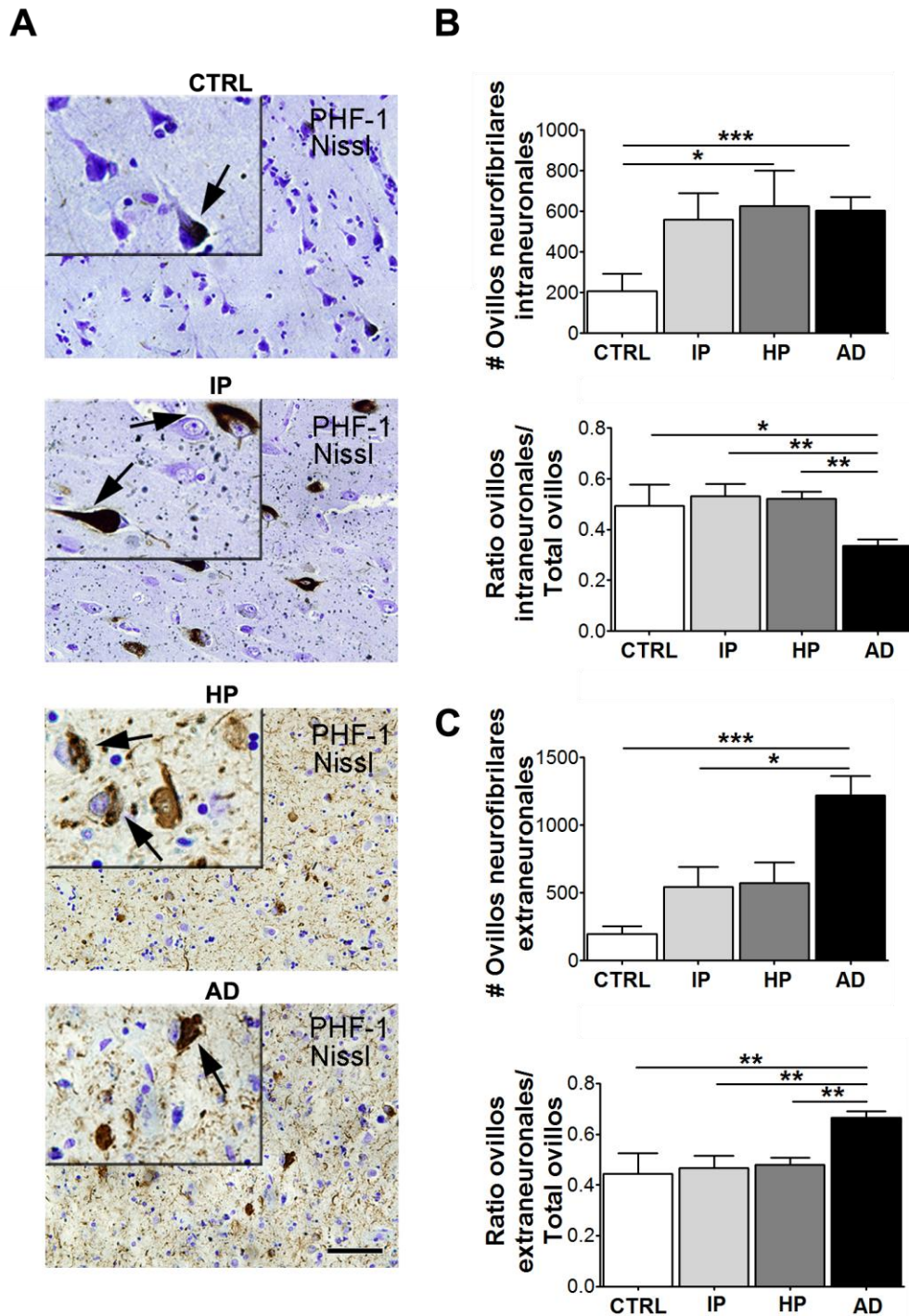


Figura 20. Razón de ovillos intraneuronales y extraneuronales / total de ovillos neurofibrilares en la corteza entorrinal (CE). Inmunohistoquímica con PHF-1, co-tinción de Nissl (**A**) y cuantificación estereológica de los ovillos intraneuronales y extraneuronales (**B y C**). Comparación múltiple entre: (i) Grupo control (CTRL): sujetos sin demencia y con probabilidad baja de enfermedad de Alzheimer (EA) de acuerdo con los criterios del National Institute on Aging / Reagan Institute. (ii) Grupo IP: sujetos sin demencia y con probabilidad intermedia de EA. (iii) Grupo HP: sujetos sin demencia y con probabilidad alta de AD. (iv) Grupo con demencia (AD): sujetos con demencia y con probabilidad alta de EA. (**A**) Fotomicrografías representativas de ovillos inmunoreactivos para PHF-1 y co-tinción de Nissl. Las flechas señalan los ovillos intraneuronales. (**B**) Observamos un aumento estadísticamente significativo del ratio de ovillos intraneuronales sobre el total de ovillos en los grupos IP y HP en comparación con el grupo AD. (**C**) Observamos un aumento estadísticamente significativo del ratio de ovillos extraneuronales sobre el total de ovillos en el grupo AD en comparación con los grupos IP y HP. Escala = 200 micras. n = 11-23 por grupo. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Prueba de Kruskal-Wallis con post-test de Dunn para comparaciones múltiples.

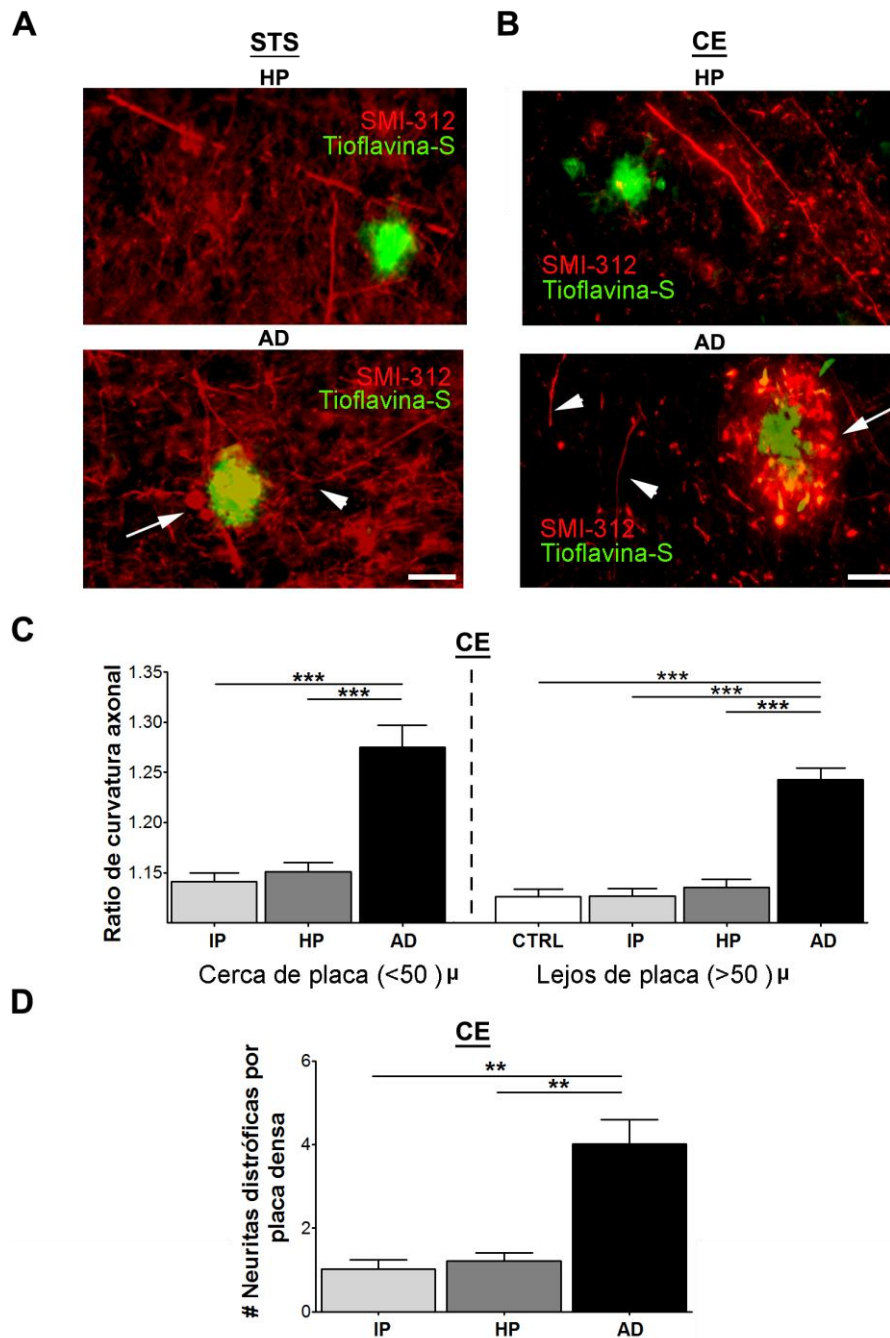


Figura 21. Trayectoria axonal en el surco temporal superior (STS) y en la corteza entorrinal (CE). Inmunohistoquímica con SMI-312, co-tinción con tioflavina-S (**A y B**) y cuantificación por análisis de imágenes de microscopio fluorescente (**C y D**). Comparación múltiple entre: (i) Grupo control (CTRL): sujetos sin demencia y con probabilidad baja de enfermedad de Alzheimer (EA) de acuerdo con los criterios del National Institute on Aging / Reagan Institute. (ii) Grupo IP: sujetos sin demencia y con probabilidad intermedia de EA. (iii) Grupo HP: sujetos sin demencia y con probabilidad alta de AD. (iv) Grupo con demencia (AD): sujetos con demencia y con probabilidad alta de EA. (**A y B**) Microfotografía representativa de axones inmunoreactivos para SMI312 (rojo) y placas de densas de A β marcadas con tioflavina-S (verde) en el STS (**A**) y en la CE. (**B**) Las puntas de flechas muestran algunos ejemplos de segmentos axonales curvados. La flecha muestra un ejemplo de neuritas distróficas. (**C**) El grupo AD presentó un ratio de curvatura axonal significativamente mayor, tanto cerca como lejos de las placas densas, en comparación con los grupos IP y HP. (**D**) El número de neuritas distróficas por placa fue significativamente mayor en el grupo AD en comparación con los grupos IP y HP. Escala=50 micras. n=172-290 segmentos axonales "cerca de placa" y 238-456 segmentos axonales "lejos de placa" en el STS. n=90-111 segmentos axonales "cerca de placa" y 90-118 segmentos axonales en la CE. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001. Prueba de ANOVA Kruskal-Wallis con post-test de Dunn para comparaciones múltiples.

iv. Resumen

En la primera parte del estudio, llevada a cabo en muestras del surco temporal superior, demostramos que:

- (i) La carga de placas de A β y el número de ovillos neurofibrilares no diferencian a los sujetos resilientes de los sujetos con demencia por EA, y por lo tanto, no predicen la presencia de síntomas de demencia en esta muestra informativa de sujetos de edad avanzada.
- (ii) Las medidas de integridad neuronal, incluyendo el número de neuronas, el grosor cortical y la morfología axonal, están preservadas en los sujetos resilientes y, por lo tanto, son mejores predictores de la presencia de síntomas de demencia.
- (iii) Algunos individuos son capaces de tolerar el depósito de A β y la formación de ovillos neurofibrilares en su cerebro de manera que estos no causan un daño estructural y cognitivo.

Estos resultados fueron confirmados posteriormente en el estudio de la corteza entorrinal. Por tanto, podemos concluir que algunos individuos son capaces de tolerar el depósito de A β y la formación de ovillos neurofibrilares sin presentar daño estructural y cognitivo. Todo ello apoya la hipótesis de la resiliencia a la patología de la EA.

4.2. Valor predictivo de las formas solubles y fibrilares del amiloide beta y tau

Una vez confirmada la hipótesis de la resiliencia en el surco temporal superior y la corteza entorrinal, en la segunda parte del estudio investigamos si existen rasgos distintivos en los fenotipos de A β y tau que caractericen la resiliencia. Para ello realizamos el estudio en la corteza entorrinal, que es una región particularmente vulnerable en la EA.

Debido al rol creciente que se atribuye a las formas solubles de A β y tau en la neurodegeneración razonamos que los niveles de estas especies, más que las propias placas y ovillos, podrían tener un mayor valor predictivo de la evolución clínica de la EA. Para comprobar esta hipótesis medimos las formas solubles y fibrilares de A β y tau en los sujetos resilientes y con demencia, y los comparamos. Además, hicimos un análisis de correlación de estos parámetros con las medidas de integridad neuronal y de respuesta inflamatoria.

i. Correlatos clínico-patológicos del amiloide beta

- Carga de placas de amiloide beta

Como se recordará, la cantidad total de placas de A β 10D5/6F3D inmunoreactivas no discriminó a los sujetos resilientes (IP y HP) de los sujetos con demencia (AD) **(Apartado 5.1.i., Tabla 7 y 8, Figura 17A-D).**

No encontramos ninguna correlación estadísticamente significativa entre la carga total de placas de A β y el número de neuronas ($r=-0.21$, $p=ns$), astrocitos reactivos ($r=0.22$, $p=ns$), o células microgliales activadas ($r=0.25$, $p=ns$) **(Figura 22A-C).**

- Carga de placas densas

En cuanto a la carga de placas densas teñidas con tioflavina-S, observamos un incremento estadísticamente significativo en el grupo AD en comparación con los grupos IP y HP (**Figura 23A y B**).

En este caso sí hallamos una correlación estadísticamente significativa entre la carga de placas densas y varios parámetros patológicos: en concreto, correlaciones negativas con medidas de integridad neuronal como el grosor cortical ($r=-0.47$, $p<0.001$) y el número de neuronas ($r=-0.38$, $p<0.01$), y correlaciones positivas con medidas de inflamación glial como el número de astrocitos reactivos ($r=0.53$, $p<0.001$) y el número de células microgliales activadas ($r=0.56$, $p<0.001$) (**Figura 23C-F**).

- Carga de placas oligoméricas

Observamos una carga de placas oligoméricas de A β NAB61-inmunoreactivas significativamente mayor en el grupo AD en comparación con los grupos IP y HP (**Tabla 7, Figura 24A y B**).

Asimismo, encontramos una correlación estadísticamente significativa entre la carga de placas oligoméricas y varios marcadores patológicos: específicamente, se correlacionó negativamente con marcadores de integridad neuronal como el grosor cortical ($r=-0.66$, $p<0.0001$) y el número de neuronas ($r=-0.59$, $p<0.0001$), y negativamente con marcadores de activación glial como el número de astrocitos reactivos ($r=0.61$, $p<0.0001$) y el número de células microgliales activadas ($r=0.56$, $p<0.001$) (**Figura 24C-F**).

En resumen, los datos previos sugieren que la carga total de placas de A β — placas difusas y placas densas, consideradas de forma conjunta — no discrimina a los sujetos sintomáticos de los asintomáticos en esta cohorte, ni se correlaciona de forma significativa con las medidas de integridad neuronal y de respuesta

inflamatoria. Por el contrario, las subpoblaciones de placas de A β compacto (o placas densas) y la de placas de A β oligomérico sí parecen discriminar a los sujetos según su estado cognitivo, y se correlacionan mejor que la carga total de placas de A β con las medidas de integridad neuronal y de respuesta inflamatoria. Ello sugiere que estas subpoblaciones de placas tienen un efecto más deletéreo sobre la integridad neuronal y la cognición que las placas de A β difuso.

- **Amiloide beta soluble citosólico y sináptico**

Medimos las especies solubles de A β en las fracciones citosólicas y sinápticas de la corteza entorrinal mediante Western blot (6E10/82E1) y ELISA (BNT77/BA27 para A β 40 y BNT77/BC05 para A β 42).

Debido al reducido número de sujetos con tejido congelado disponible, primero llevamos a cabo un análisis previo de los datos neuropatológicos y bioquímicos por el que determinamos que no había diferencias estadísticamente significativas entre los grupos resilientes IP y HP. Ello nos permitió agrupar a los sujetos resilientes IP y HP (grupo IP/HP) para posteriores análisis estadísticos de los parámetros bioquímicos.

No observamos diferencias estadísticamente significativas en los niveles de especies solubles —monómeros y dímeros— de A β en las fracciones citosólicas y sinápticas medidas por Western blot (**Figura 25A-B**). Si bien observamos un incremento en los niveles citosólicos y sinápticos de A β 40 medidos por ELISA en el grupo AD en comparación con los grupos resilientes IP/HP, no detectamos diferencias significativas en los niveles de A β 42, forma más amiloidogénica y potencialmente neurotóxica de este péptido, en ninguna de ambas fracciones entre dichos grupos (**Figura 25C**).

Considerados que en su conjunto los resultados obtenidos sugieren que las formas solubles de A β no representan un buen correlato de la cognición.

ii. Correlatos clínico-patológicos de tau

- Número de ovillos neurofibrilares

Como se recordará, el número de ovillos neurofibrilares PHF-1-inmunoreactivos no discrimina a los sujetos resilientes (IP y HP) de los sujetos con demencia (AD) (**Apartado 5.1.ii., Tabla 7 y 8, Figura 18A-D**). Asimismo, el número de ovillos neurofibrilares no se correlacionó significativamente con el número de neuronas ($r=-0.24$, $p=ns$), ni con el número de astrocitos reactivos ($r=0.41$, $p=ns$), o de células microgliales activadas ($r=0.16$, $p=ns$) (**Figura 26A-C**).

- Especies solubles de tau y fosfo-tau citosólico y sináptico

Al igual que con $A\beta$, medimos las especies solubles de tau y p-tau en las fracciones citosólicas y sinápticas de la corteza entorrinal mediante Western blot (H7 y PHF-1) y ELISA (anticuerpo monoclonal específico para tau y p-tau humana). De nuevo, agrupamos a los sujetos resilientes IP y HP (grupo IP/HP) debido al limitado número de sujetos con tejido congelado disponible, dado que un análisis previo que determinó que no había diferencias estadísticamente significativas en las medidas neuropatológicas y bioquímicas entre ambos grupos resilientes.

No observamos diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de especies monoméricas y oligoméricas de tau en las fracciones citosólicas y sinápticas medidas por Western blot entre los grupos AD y IP/HP (**Figura 27A-B**). Tampoco observamos diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de especies monoméricas de p-tau medidas por Western blot entre ambos grupos. Sin embargo, sí observamos un incremento estadísticamente significativo en los niveles de oligómeros de p-tau en el grupo AD con respecto al grupo resiliente IP/HP (**Figura 27C-D**).

Estos resultados fueron confirmados por ELISA, es decir, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de tau sináptico entre los grupos AD e IP/HP pero se observó un incremento en los niveles de p-tau sináptico en el grupo AD con respecto al grupo IP/HP. Además, el ratio de p-tau/tau fue significativamente mayor en el grupo AD con respecto al grupo IP/HP (**Figura 27E**).

Asimismo, se observó una correlación negativa significativa entre los niveles sinápticos de p-tau y los marcadores de integridad neuronal como el grosor cortical ($r=-0.44$, $p=0.012$) y el número de neuronas ($r=-0.49$, $p=0.002$), y una correlación positiva significativa entre los niveles sinápticos de p-tau y los marcadores de activación glial como el número de astrocitos reactivos ($r=0.47$, $p=0.006$) y el número de células microgliales activadas ($r=0.40$, $p=0.024$) (**Figura 28A-D**).

Estos resultados indican que el acúmulo aberrante de las especies solubles oligoméricas de tau hiperfosforilada en las sinapsis podría ser un mejor correlato del deterioro cognitivo asociado a la demencia por EA que los propios ovillos neurofibrilares. Esta idea es así mismo reforzada por el hallazgo de que estas formas solubles, se correlacionan mejor que los ovillos con las medidas de integridad neuronal y de respuesta inflamatoria.

iii. GSK-3 β citosólico y sináptico

La GSK-3 β es una quinasa clave para que ocurra la hiperfosforilación anormal de tau en la EA (Kosik, 1992). Medimos los niveles de GSK-3 β en las fracciones citosólicas y sinápticas de la corteza entorrinal mediante Western blot.

De forma similar a los análisis de medidas bioquímicas previos, agrupamos a los sujetos resilientes IP y HP (grupo IP/HP) debido a la limitación del tamaño muestral después de que un análisis preliminar determinara que no había diferencias estadísticamente significativas en las medidas neuropatológicas y bioquímicas entre ambos grupos de resiliencia.

Observamos una menor concentración de GSK-3 β citosólica en el grupo AD en comparación con el grupo IP/HP pero no hubo diferencias estadísticamente significativas en los niveles de GSK-3 β sinápticos entre ambos grupos. En consecuencia, el ratio de GSK-3 β sináptico/citosólico resultó significativamente mayor en el grupo AD en comparación con el grupo IP/HP (**Figura 29A-B**).

Estos resultados sugieren que en la demencia de la EA existe una redistribución aberrante de GSK-3 β desde el compartimento citosólico al compartimento sináptico, que no ocurre en los sujetos resilientes a la patología de la EA, sugiriendo que la abundancia relativa de GSK-3 β en las sinapsis podría jugar un rol importante en la sinaptotoxicidad y en el deterioro cognitivo asociado a la EA.

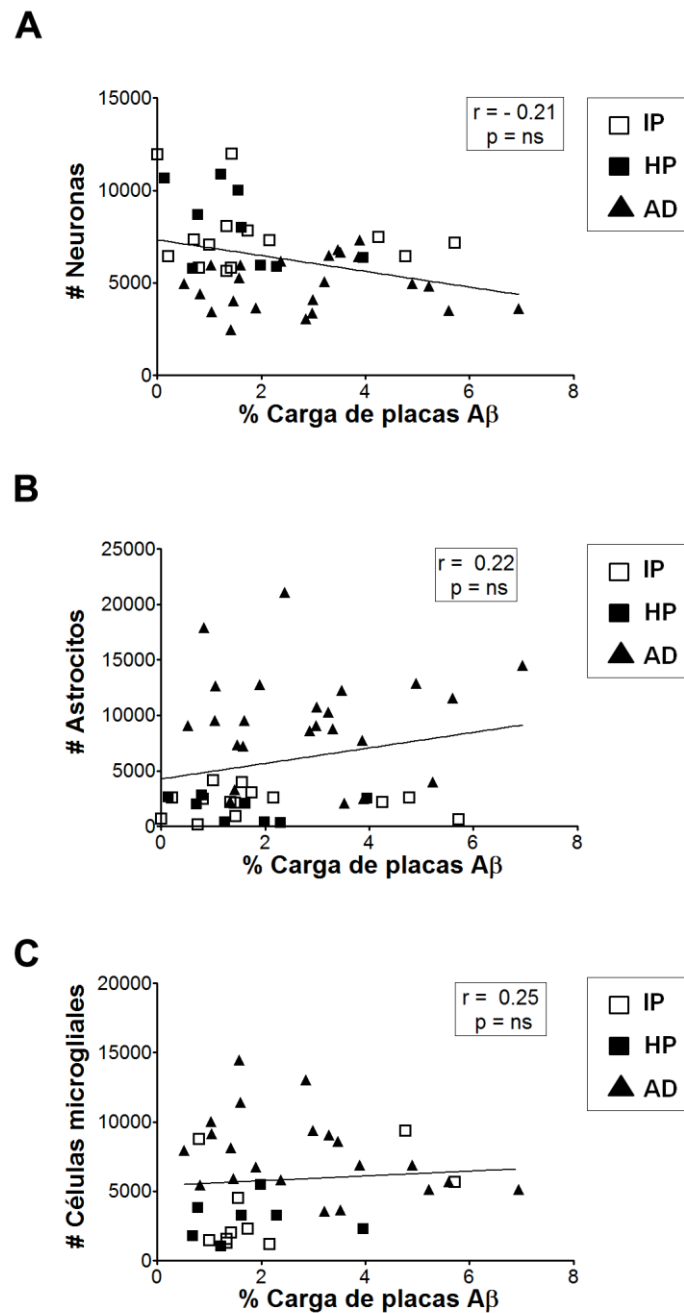


Figura 22. Correlación de la carga de placas de amiloide beta (A β) con las medidas de integridad neuronal y de respuesta inflamatoria en la corteza entorrinal. Incluimos la distribución de datos de: (i) Grupo IP: sujetos sin demencia y con probabilidad intermedia de enfermedad de Alzheimer (EA) de acuerdo con los criterios del National Institute on Aging / Reagan Institute. (ii) Grupo HP: sujetos sin demencia y con probabilidad alta de EA. (iii) Grupo con demencia (AD): sujetos con demencia y con probabilidad alta de EA. **(A-C)** No se observó una correlación estadísticamente significativa entre la carga total de placas de A β y **(A)** el número de neuronas ($r = -0.21$, $p = ns$), **(B)** de astrocitos reactivos ($r = 0.22$, $p = ns$), **(C)** ni de células microgliales activadas ($r = 0.25$, $p = ns$). $n = 47$. Análisis de regresión lineal.

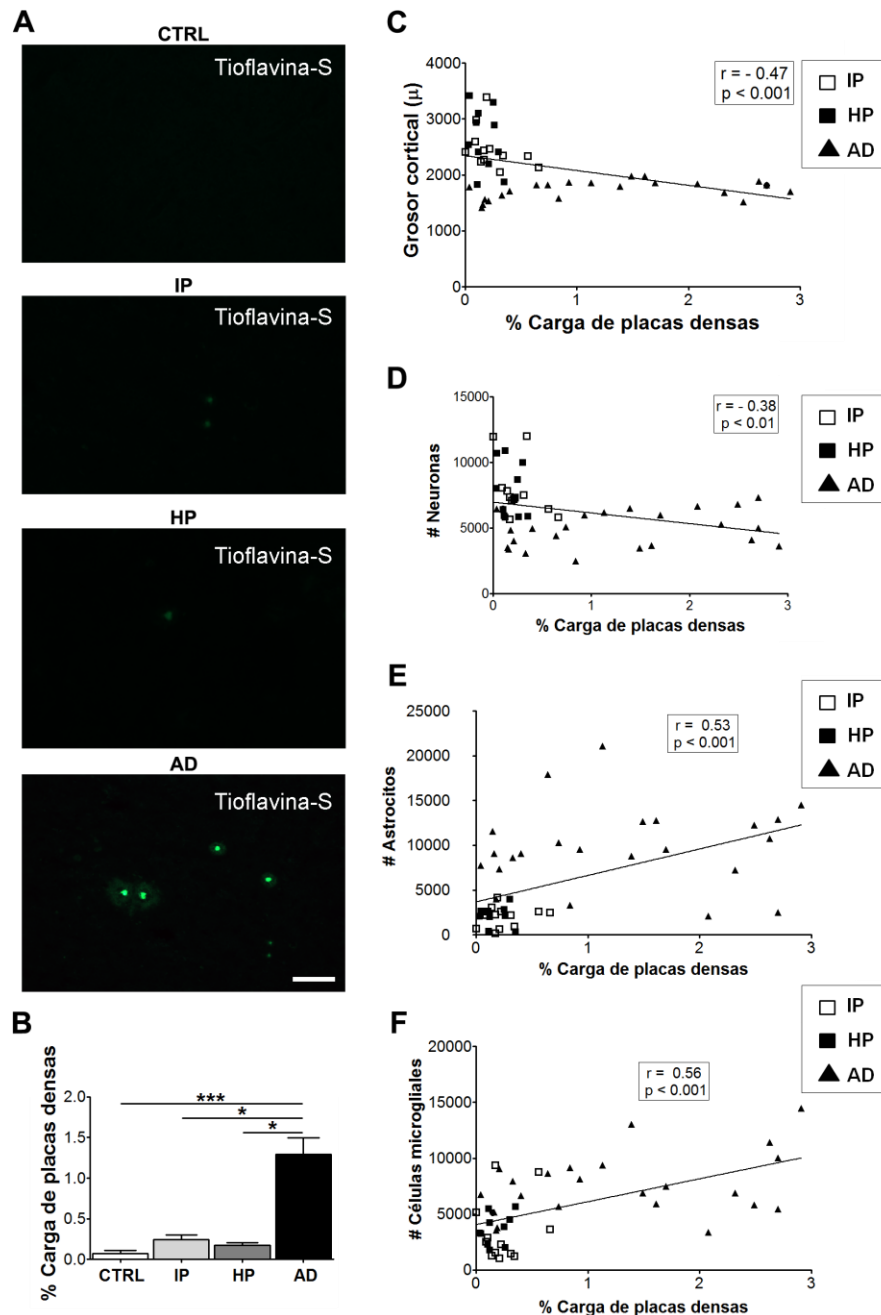


Figura 23. Carga de placas densas y correlación con las medidas de integridad neuronal y de respuesta inflamatoria en la corteza entorrinal (CE). Tinción con tioflavina-S (**A**), cuantificación por análisis de imágenes de microscopio fluorescente (**B**) y análisis de correlación (**C-D**). En (**B**) comparación múltiple entre: (i) Grupo control (CTRL): sujetos sin demencia y con probabilidad baja de enfermedad de Alzheimer (EA) de acuerdo con los criterios del National Institute on Aging / Reagan Institute. (ii) Grupo IP: sujetos sin demencia y con probabilidad intermedia de EA. (iii) Grupo HP: sujetos sin demencia y con probabilidad alta de AD. (iv) Grupo con demencia (AD): sujetos con demencia y con probabilidad alta de EA. En (**C-F**) incluimos la distribución de datos de ii, iii y iv. (**A**) Fotomicrografías representativas de placas densas teñidas con tioflavina-S en la CE (**B**) Observamos una carga de placas densas significativamente mayor en el grupo AD en comparación con los grupos IP y HP. (**C-F**) Observamos una correlación estadísticamente significativa entre la carga de placas densas y (**C**) el grosor cortical ($r=-0.47$, $p<0.001$), (**D**) el número de neuronas ($r=-0.38$, $p<0.01$), (**E**) el número de astrocitos reactivos ($r=0.53$, $p<0.001$) y (**F**) el número de células microgliales activadas ($r=0.56$, $p<0.001$). Escala = 200 micras. $n = 11-23$ por grupo en el estudio de comparaciones múltiples y $n = 47$ en el estudio de correlaciones. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Prueba de Kruskal-Wallis con post-test de Dunn para comparaciones múltiples (**B**) y análisis de regresión lineal (**C-F**).

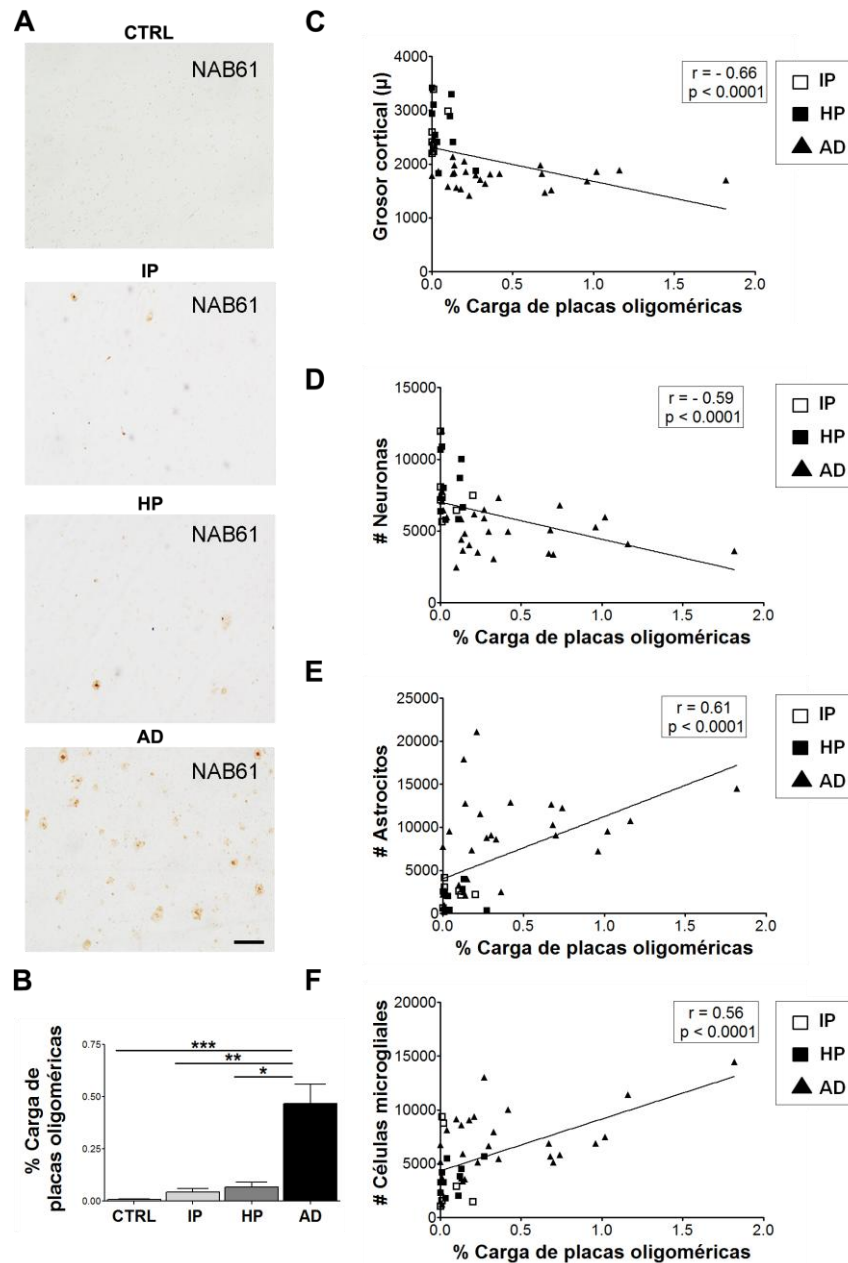


Figura 24. Carga de placas oligoméricas y correlación con las medidas de integridad neuronal y de respuesta inflamatoria en la corteza entorrinal (CE). Inmunohistoquímica con NAB61 (A), cuantificación estereológica de las placas oligoméricas (B), y análisis de correlación (C-F). En (B) comparación múltiple entre: (i) Grupo control (CTRL): sujetos sin demencia y con probabilidad baja de enfermedad de Alzheimer (EA) de acuerdo con los criterios del National Institute on Aging / Reagan Institute. (ii) Grupo IP: sujetos sin demencia y con probabilidad intermedia de EA. (iii) Grupo HP: sujetos sin demencia y con probabilidad alta de AD. (iv) Grupo con demencia (AD): sujetos con demencia y con probabilidad alta de EA. En (C-F) incluimos la distribución de datos de ii, iii y iv. En (C-F) observamos una carga de placas oligoméricas significativamente mayor en el grupo AD en comparación con los grupos IP y HP. (C-F) Observamos una correlación estadísticamente significativa entre la carga de placas oligoméricas y (C) el grosor cortical ($r=-0.66$, $p<0.0001$), (D) el número de neuronas ($r=-0.59$, $p<0.0001$), (E) el número de astrocitos reactivos ($r=0.61$, $p<0.0001$), y (F) el número de células microgliales activadas ($r=0.56$, $p<0.001$). Escala = 200 micras. $n = 11-23$ por grupo en el estudio de comparaciones múltiples y $n = 47$ en el estudio de correlaciones. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Prueba de Kruskal-Wallis con post-test de Dunn para comparaciones múltiples (B) y análisis de regresión lineal (C-F).

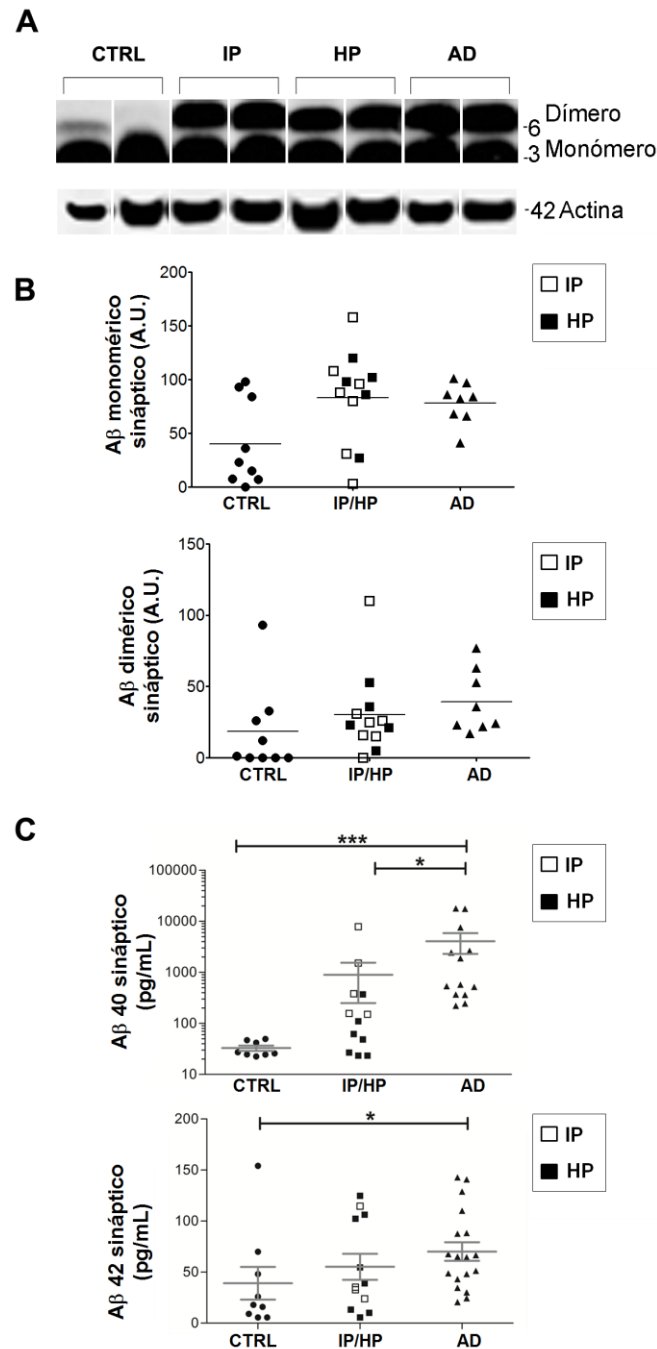


Figura 25. Análisis bioquímico de especies solubles de amiloide beta ($A\beta$) en sinaptoneurosomas. Western blot con 6E10 + 82E1 para monómeros (4 kDa) y dímeros (8 kDa) de $A\beta$ (**A** y **B**), y ELISA sándwich con BNT77/ BA27 para $A\beta$ 40, y BNT77/BC05 para $A\beta$ 42 (**C**) en fracciones de sinaptoneurosomas extraídos de la corteza entorrinal. Comparación múltiple entre: (i) Grupo control (CTRL): sujetos sin demencia y con probabilidad baja de enfermedad de Alzheimer (EA) de acuerdo con los criterios del National Institute on Aging / Reagan Institute. (ii) Grupo IP: sujetos sin demencia y con probabilidad intermedia de EA. (iii) Grupo HP: sujetos sin demencia y con probabilidad alta de AD. (iv) Grupo con demencia (AD): sujetos con demencia y con probabilidad alta de EA. Para el análisis agrupamos (ii) y (iii) debido a la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos y el número limitado de muestras disponibles. (**A**) Imagen representativa de un Western blot de $A\beta$ soluble sináptico (**B**) No observamos diferencias estadísticamente significativas en los niveles de monómeros y dímeros de $A\beta$ sináptico entre los grupos AD e IP/HP. (**C**) El nivel de $A\beta$ 40 sináptico fue significativamente mayor en el grupo AD con respecto al grupo IP/HP. El nivel de $A\beta$ 42 sináptico fue significativamente mayor en el grupo AD con respecto al grupo CTRL pero no con respecto al grupo IP/HP. $n = 8-13$ por grupo (Western blot), $n = 9-18$ (ELISA). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. Prueba de Kruskal-Wallis con post-test de Dunn para comparaciones múltiples.

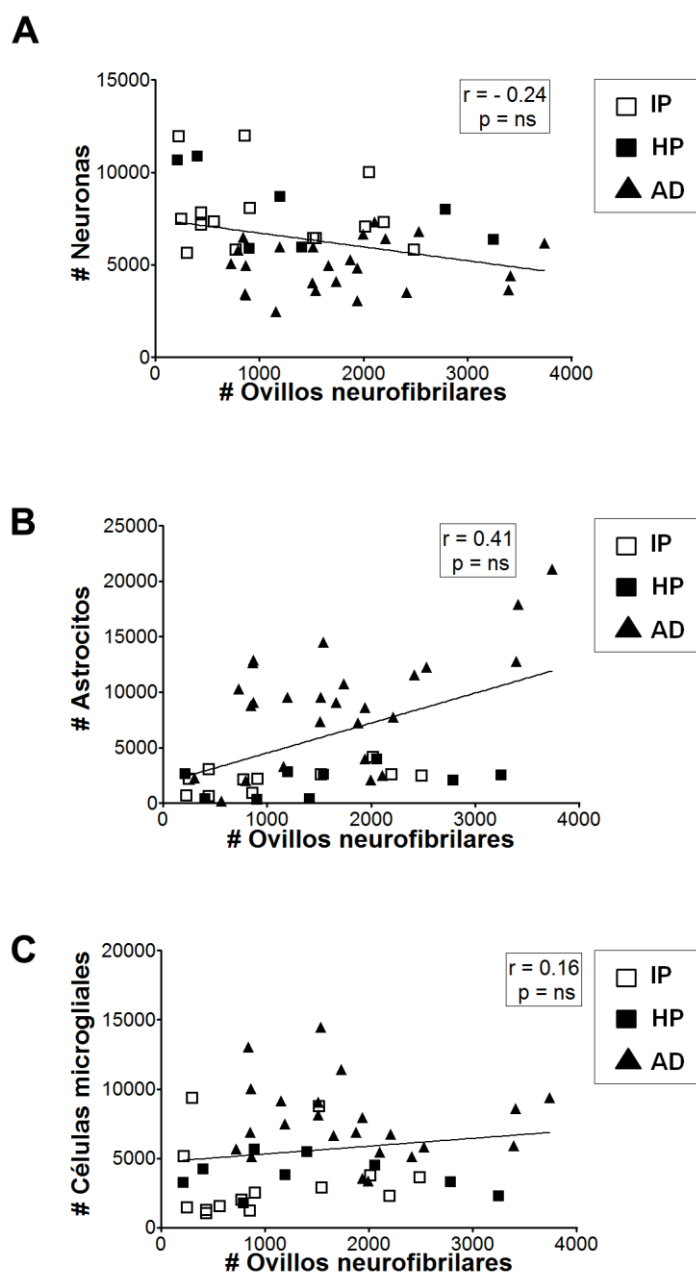


Figura 26. Correlación del número de ovillos neurofibrilares con las medidas de integridad neuronal y de respuesta inflamatoria en la corteza entorrinal. Incluimos la distribución de datos de: (i) Grupo IP: sujetos sin demencia y con probabilidad intermedia de enfermedad de Alzheimer (EA) de acuerdo con los criterios del National Institute on Aging / Reagan Institute. (ii) Grupo HP: sujetos sin demencia y con probabilidad alta de EA. (iii) Grupo con demencia (AD): sujetos con demencia y con probabilidad alta de EA. **(A-C)** No se halló una correlación estadísticamente significativa entre el número de ovillos neurofibrilares y **(A)** el número de neuronas ($r = -0.24$, $p = ns$), **(B)** el número de astrocitos reactivos ($r = 0.41$, $p = ns$), **(C)** ni el número de células microgliales activadas ($r = 0.16$, $p = ns$). $n = 47$. Análisis de regresión lineal.

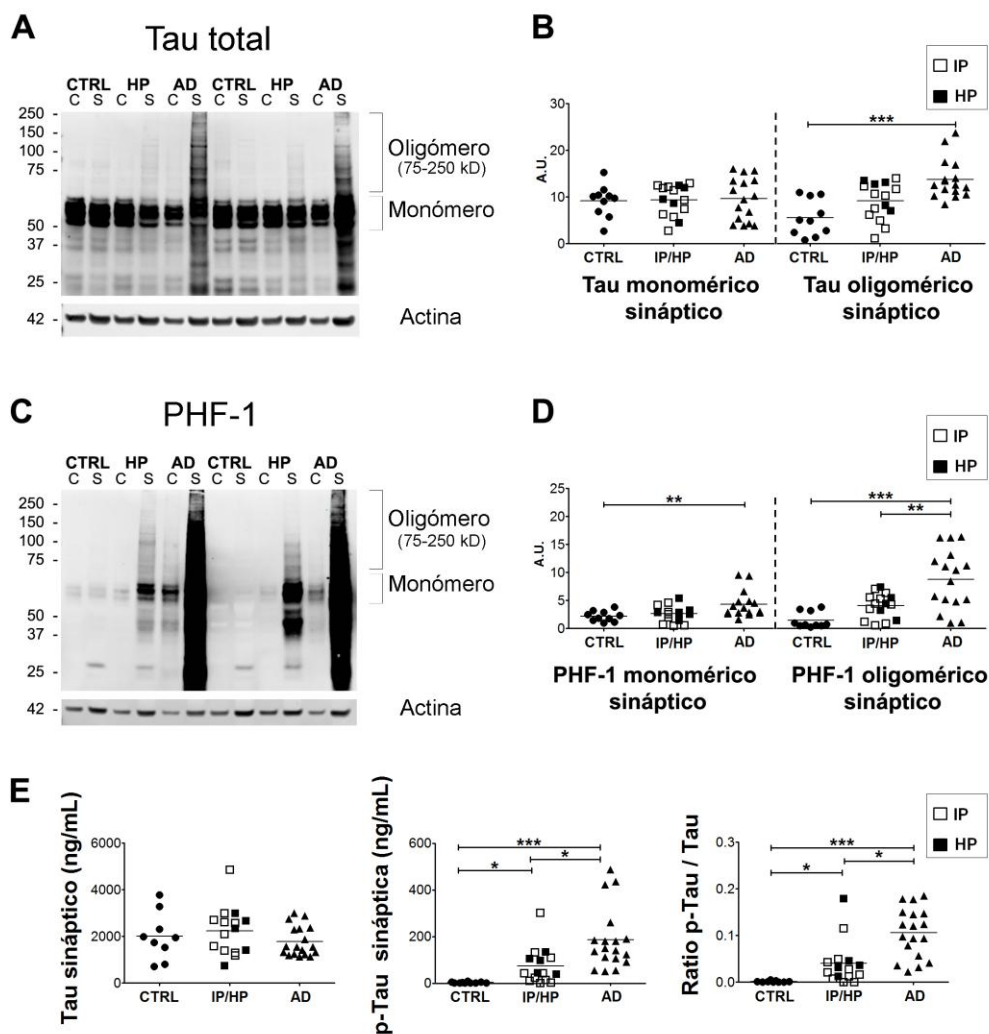


Figura 27. Análisis bioquímico de las especies solubles de tau total y tau fosforilada (p-tau) en sinaptoneurosomas. Western blot para tau total con H7 (**A** y **B**) y para p-tau con PHF-1 (**C** y **D**) que detectan monómeros (64 kDa) y oligómeros (75-250 kDa), y ELISA sándwich para tau y p-tau humana (**E**) en fracciones de citosol y sinaptoneurosomas extraídos de la corteza entorrinal. Comparación múltiple entre: (i) Grupo control (CTRL): sujetos sin demencia y con probabilidad baja de enfermedad de Alzheimer (EA) de acuerdo con los criterios del National Institute on Aging / Reagan Institute. (ii) Grupo IP: sujetos sin demencia y con probabilidad intermedia de EA. (iii) Grupo HP: sujetos sin demencia y con probabilidad alta de EA. (iv) Grupo con demencia (AD): sujetos con demencia y con probabilidad alta de EA. Para el análisis agrupamos (ii) y (iii) debido a la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos y al número limitado de muestras disponibles. (**A**) Imagen representativa de un Western blot que muestra un acúmulo de monómeros y oligómeros de tau en la sinapsis en el grupo AD (**B**) Análisis cuantitativo de tau total citosólica (C) y sináptica (S) en el que observamos un aumento estadísticamente significativo de oligómeros de tau sináptico en el grupo AD en comparación con el grupo CTRL pero no diferente del grupo IP/HP. No hubo diferencias estadísticamente significativas en los niveles de monómeros de tau sináptico entre los grupos. (**C**) Imagen representativa de un Western blot que muestra un acúmulo sustancial de monómeros y oligómeros de p-tau en la sinapsis en AD (**D**) Análisis cuantitativo de p-tau en las fracciones citosólica (C) y sináptica (S) en el que observamos un aumento estadísticamente significativo de oligómeros de p-tau en las sinapsis del grupo AD en comparación con el grupo IP/HP y el grupo CTRL (**E**) No observamos diferencias estadísticamente significativas en los niveles sinápticos de tau detectados por ELISA entre los grupos. Los niveles sinápticos de p-tau y el ratio de p-tau/tau total detectados por ELISA fueron significativamente más altos en el grupo AD en comparación con los grupos IP/HP y CTRL. n=10-16 por grupo. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001. Prueba de Kruskal-Wallis con post-test de Dunn para comparaciones múltiples.

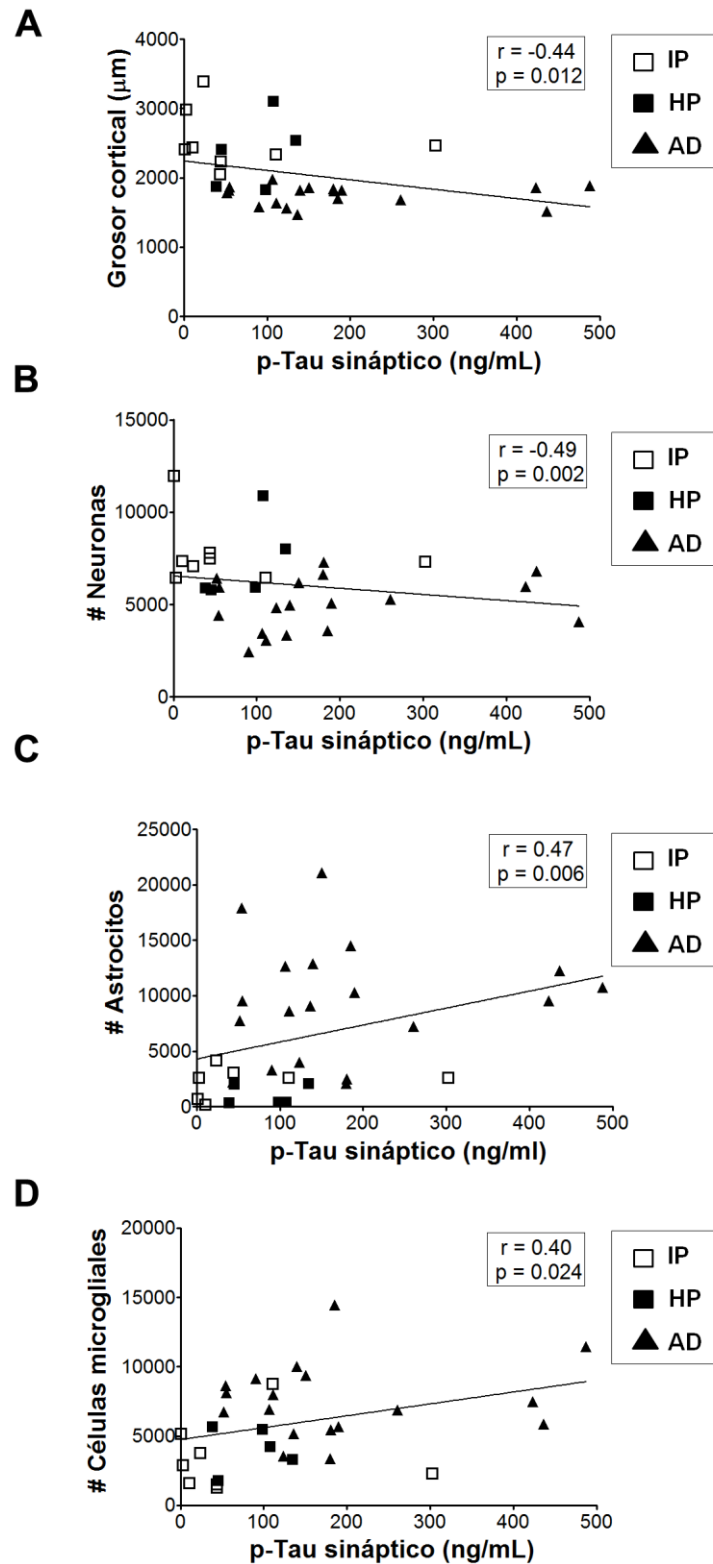


Figura 28. Correlación de tau fosforilada (p-Tau) con las medidas de integridad neuronal y de respuesta inflamatoria en la corteza entorrinal. Incluimos la distribución de datos de: (i) Grupo IP: sujetos sin demencia y con probabilidad intermedia de enfermedad de Alzheimer (EA) de acuerdo con los criterios del National Institute on Aging / Reagan Institute. (ii) Grupo HP: sujetos sin demencia y con probabilidad alta de EA. (iii) Grupo con demencia (AD): sujetos con demencia y con probabilidad alta de EA. **(A-D)** Observamos una correlación estadísticamente significativa entre los niveles de p-tau sináptico y **(A)** el grosor cortical ($r = -0.44$, $p = 0.012$), **(B)** el número de neuronas ($r = -0.49$, $p = 0.002$), **(C)** el número de de astrocitos reactivos ($r = 0.47$, $p = 0.006$) y **(D)** el número de células microgliales activadas ($r = 0.40$, $p = 0.024$). $n = 31$. Análisis de regresión lineal.

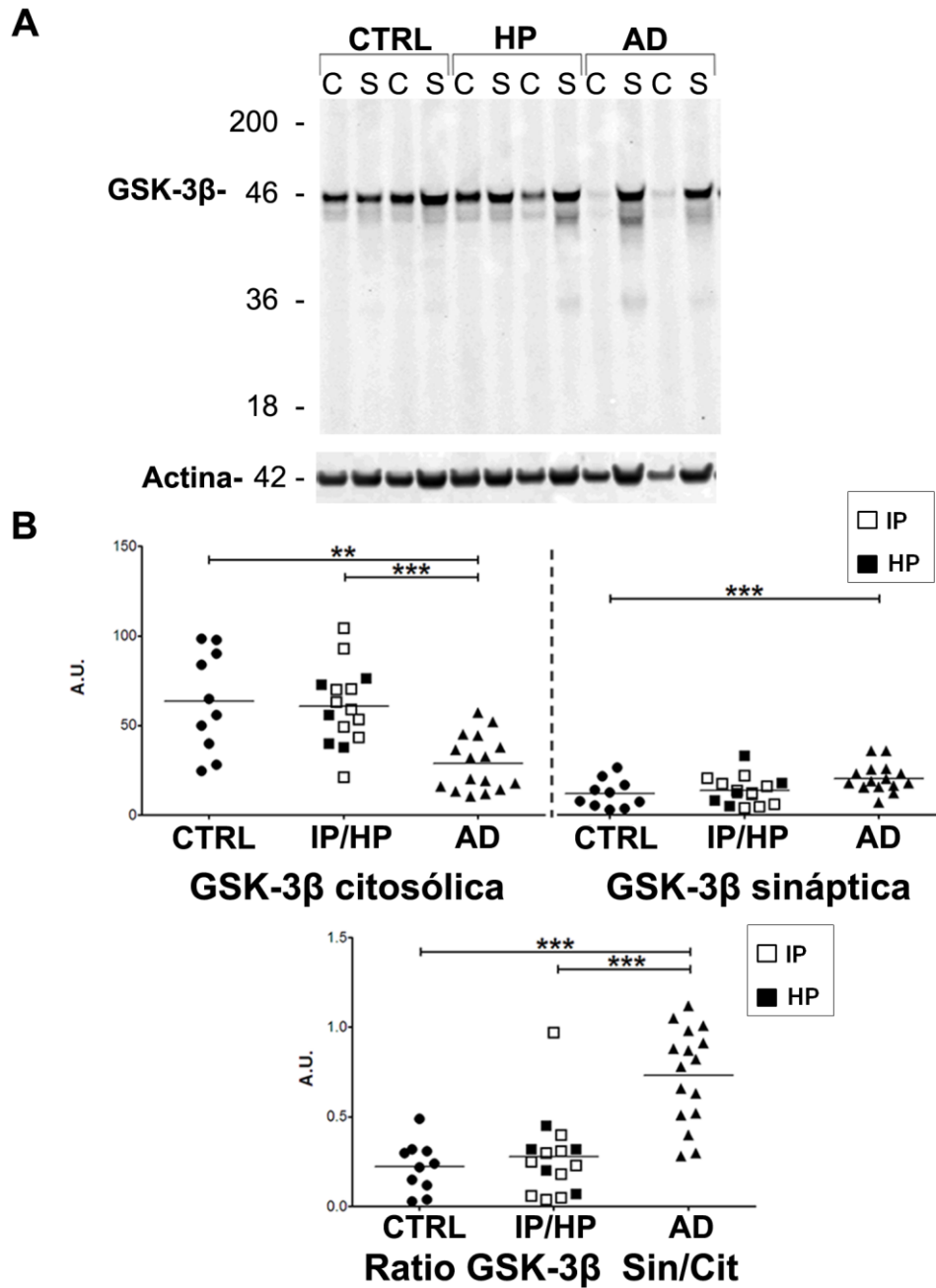


Figura 29. Análisis bioquímico de GSK-3β en sinaptoneurosomas. Western blot con GSK-3β (**A** y **B**) en fracciones de citosol (C) y sinaptoneurosomas (S) extraídos de la corteza entorrinal. Comparación múltiple entre: (i) Grupo control (CTRL): sujetos sin demencia y con probabilidad baja de enfermedad de Alzheimer (EA) de acuerdo con los criterios del National Institute on Aging / Reagan Institute. (ii) Grupo IP: sujetos sin demencia y con probabilidad intermedia de EA. (iii) Grupo HP: sujetos sin demencia y con probabilidad alta de AD. (iv) Grupo con demencia (AD): sujetos con demencia y con probabilidad alta de EA. Para el análisis agrupamos (ii) y (iii) debido a la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos y al número reducido de muestras disponibles. **(A)** Imagen representativa de un Western blot de GSK-3β. **(B)** Observamos un aumento significativo de los niveles de GSK3-β en el compartimento citosólico en el grupo IP/HP en comparación con el grupo AD. No hubo diferencias estadísticamente significativas en los niveles de GSK3-β en el compartimento sináptico entre grupos. **(C)** El ratio Sin/Cit de GSK3-β fue significativamente más alto en el grupo AD en comparación con el grupo IP/HP. n= 10-16 por grupo. **P < 0.01, ***P < 0.001. Prueba de ANOVA Kruskal-Wallis y post-test de Dunn para comparaciones múltiples.

iv. Resumen

En la segunda parte del estudio, llevada a cabo en muestras de la corteza entorrinal, demostramos que:

- (i) El fenotipo A β de la resiliencia se caracteriza por una menor carga de placas densas y oligoméricas en comparación con los sujetos con síntomas cognitivos.
- (ii) Ni la carga total de A β depositada ni las formas solubles de A β diferencian a los sujetos resilientes de los sujetos con demencia (a excepción de los niveles sinápticos de A β 40 medido por ELISA), y por lo tanto, no predicen la presencia de síntomas de demencia en esta muestra de sujetos.
- (iii) El fenotipo tau de la resiliencia se caracteriza por un menor acúmulo de especies solubles de p-tau en la sinapsis en comparación con los sujetos con síntomas cognitivos. Los oligómeros de tau hiperfosforilados sinápticos, por tanto, predicen la presencia de síntomas de demencia mejor que los propios ovillos neurofibrilares.
- (iv) El acúmulo de especies solubles de p-tau en la sinapsis en los sujetos con síntomas se acompaña de una redistribución anómala de la GSK-3 β , lo que añade evidencia sobre la posible contribución de esta kinasa de tau en el deterioro cognitivo asociado a la EA.

En resumen, en esta segunda parte definimos los marcadores fenotípicos de A β y tau que caracterizan a los cerebros de los individuos resilientes a la patología de la EA, y comprobamos que la acumulación de formas solubles de tau hiperfosforilada a nivel sináptico tiene un mejor valor predictivo con respecto al estado cognitivo y a la disrupción anatómica de poblaciones neuronales vulnerables que las lesiones clásicas de la EA, placas de A β y ovillos neurofibrilares.

4.3. Caracterización de la respuesta inflamatoria

En general se piensa que la respuesta inflamatoria en la EA ocurre en paralelo con la neurodegeneración. Sin embargo, aunque cada vez hay una mayor evidencia que señala a la respuesta inflamatoria como una pieza patogénica clave en la EA, aún se debate si la activación de la glia y la expresión de citoquinas contribuye a la neurodegeneración y al deterioro cognitivo, representa una respuesta protectora o simplemente un epifenómeno.

Para probar la hipótesis de la existencia de un fenotipo de respuesta inflamatoria característica de la resiliencia medimos la activación de los astrocitos y microglía, y el perfil de citoquinas en los sujetos resilientes, y lo comparamos con los sujetos con demencia.

i. El número de astrocitos reactivos y de células microgliales activadas predicen resiliencia

Observamos un incremento estadísticamente significativo del número de astrocitos reactivos (GFAP-inmunoreactivos) en el grupo AD en comparación con los grupos IP y HP (**Tabla 7, Figura 30A y B**), siendo estos dos últimos grupos indistinguibles del grupo CTRL. Del mismo modo, observamos un incremento estadísticamente significativo del número de células microgliales activadas (CD68-inmunoreactivas) en el grupo AD en comparación con los grupos IP y HP (**Tabla 7, Figura 30Cy D**), siendo estos dos últimos grupos indistinguibles del grupo CTRL.

Estos datos sugieren que el fenotipo glial no activado (“de reposo”) podría jugar un rol protector en la función de las neuronas y en la integridad de la cognición en los sujetos resilientes. Alternativamente, la falta de reacción glial podría ser simplemente el reflejo de la ausencia de daño sináptico o neuronal.

ii. **Correlatos clínico-patológicos de astrocitos reactivos y de células microgliales activadas**

El número de astrocitos reactivos mostró una correlación negativa significativa con el grosor cortical ($r=-0.54$, $p=0.001$) y el número de neuronas ($r=-0.56$, $p<0.001$) (**Figura 31A y B**). De forma similar, el número de células microgliales activadas se correlacionó negativamente con el grosor cortical ($r=-0.56$, $p<0.001$) y el número de neuronas ($r=-0.57$, $p<0.001$) (**Figura 31C y D**).

Estos resultados indican que las reacciones gliales son un buen correlato de integridad neuronal en la corteza entorrinal y pueden resultar útiles para predecir la presencia de deterioro cognitivo asociado a la EA.

El conjunto de estos datos indica que con respecto a las medidas patológicas de respuesta inflamatoria, el fenotipo de la resiliencia se caracteriza por un menor número de astrocitos y células microgliales activadas, en comparación con los sujetos con demencia por EA. A continuación investigamos si este fenotipo morfológico resiliente de astrocitos y microglía se asocia también a un fenotipo funcional, es decir, si esta disminución de la reactividad glial se acompaña de un perfil de señales de citoquinas neuroprotector propio de la resiliencia. Ello podría explicar la ausencia de daño neuronal estructural y cognitivo en los individuos resilientes a pesar de la presencia de abundantes depósitos de A β y ovillos neurofibrilares en sus cerebros.

iii. **Ciertas citoquinas predicen resiliencia**

Debido a que la heterogeneidad en la respuesta es una característica fundamental en la neuroinflamación, pensamos que los sujetos resilientes podrían tener un perfil único de expresión de múltiples citoquinas. Utilizamos métodos de biología de sistemas para investigar esta hipótesis.

- El análisis discriminante de regresión de mínimos cuadrados parciales definió un perfil de patología propio de la resiliencia en la corteza entorrinal

Hicimos un análisis de regresión de mínimos cuadrados parciales (D-PLRS) de todas las medidas de patología disponibles de la corteza entorrinal, a saber: grosor cortical, número de neuronas, carga de placas de A β , carga de placas densas, carga de placas oligoméricas, total de número de ovillos neurofibrilares, número de ovillos intraneuronales, número de ovillos extraneuronales, ratio de ovillos intraneuronales / total de ovillos, ratio de ovillos extraneuronales / total de ovillos, número de astrocitos reactivos y número de células microgliales activadas. Incluimos en el análisis todos los datos de los sujetos controles, resilientes y con demencia.

El análisis generó un perfil de patología de la corteza entorrinal que se obtiene con la suma proporcional de cada una de las medidas en las variables latentes 1 (LV1) y 2 (LV2).

La variable latente 1 (LV1) separó al grupo AD de los grupos IP, HP y CTRL, por lo tanto definió el perfil de patología propio de la demencia por EA.

Tal y como era esperable y de acuerdo con todos los resultados expuestos más arriba derivados de los estudios histopatológicos y bioquímicos, las medidas de integridad neuronal estaban disminuidas en el grupo AD respecto a los grupos IP, HP y CTRL. El número de astrocitos reactivos estaba aumentado en el grupo AD respecto a los grupos IP, HP y CTRL, y curiosamente fue además, la medida que tuvo más peso relativo o “efecto” en el perfil de patología propio de la demencia por EA. El número de ovillos neurofibrilares, en particular, el número de ovillos extraneuronales, marcador indirecto de la magnitud de la pérdida neuronal, fue la segunda medida patológica con mayor peso relativo (**Figura 32A-C**).

Estos resultados validaron la caracterización neuropatológica detallada de las muestras de la corteza entorrinal. Para hacer el análisis incluimos todos los datos de patología, y comprobamos si LV1 podía o no separar los grupos; es lo que se conoce como análisis “aséptico” donde *a priori* no se definen categorías

diferentes. En este caso LV1 separó claramente al grupo AD del resto, y como consecuencia validó la calidad de los datos de patología.

La variable latente 2 (LV2) separó a los grupos IP y HP de los grupos CTRL y AD, por lo tanto definió el perfil de patología propio de la resiliencia.

El número de células microgliales activadas estaba disminuido en los grupos IP y HP respecto a los grupos CTRL y AD. El número de ovillos intraneuronales estaba aumentado en el grupo IP y HP con respecto a los grupos CTRL y AD, y fue además, la medida que tuvo más peso relativo o “efecto” en el perfil de patología propio de la resiliencia (**Figura 32A, B y D**).

Estos resultados muestran que los ovillos neurofibrilares intraneuronales y las medidas de respuesta inflamatoria, en particular las células de la microglía activada, tienen un papel determinante en el perfil de patología propio de la resiliencia en la corteza entorrinal.

Por otra parte, el número de astrocitos activado fue la medida con mayor efecto en el perfil propio de la demencia por EA en esta región.

- El análisis discriminante de regresión de mínimos cuadrados parciales definió un perfil de patología propio de la resiliencia en el surco temporal superior

Hicimos un análisis de regresión de mínimos cuadrados parciales (D-PLRS) de todas las medidas de patología disponibles del surco temporal superior, a saber: grosor cortical, número de neuronas, carga de placas de A β , carga de placas densas, carga de placas oligoméricas, ratio de placas oligoméricas/carga de placas de A β , número de astrocitos reactivos y número de células microgliales activadas. Incluimos en el análisis los datos de los sujetos controles, resilientes y con demencia.

El análisis generó un perfil de patología del surco temporal superior que se obtiene con la suma proporcional de cada una de las medidas en las variables latentes 1 (LV1) y 2 (LV2).

De nuevo, la variable latente 1 (LV1) separó al grupo AD de los grupos IP, HP y CTRL, por lo tanto definió el perfil de patología propio de la demencia por EA.

Las medidas de integridad neuronal estaban disminuidas en el grupo AD respecto a los grupos IP, HP y CTRL. La carga total de A β estaba aumentada en el grupo AD respecto a los grupos IP, HP y CTRL, y fue además, la medida que tuvo más peso relativo o “efecto” en el perfil de patología propio de la demencia por EA. La carga de placas densas fue la segunda medida patológica con mayor peso relativo (**Figura 33A-C**).

Al igual que en el apartado previo, este análisis validó los datos de la caracterización neuropatológica detallada de las muestras de surco temporal superior ya que LV1 separó claramente al grupo AD del resto.

La variable latente 2 (LV2) separó a los grupos IP y HP de los grupos CTRL y AD, por lo tanto definió el perfil de patología propio de la resiliencia.

Al igual que en la corteza entorrinal el número de células microgliales activadas estaba disminuido en el grupo IP y HP con respecto a los grupos CTRL y AD. Las medidas de integridad neuronal estaban aumentadas en el grupo IP y HP con respecto a los grupos CTRL y AD, y en particular, el grosor cortical fue la medida que tuvo más peso relativo o “efecto” en la predicción de resiliencia (**Figura 33A, B y D**).

Estos resultados muestran que las medidas de respuesta inflamatoria, en particular las células microgliales activadas, y las medidas de integridad neuronal, número de neuronas y grosor cortical, son los marcadores que mejor caracterizan el perfil de patología propio de la resiliencia en el surco temporal superior.

Estos resultados muestran que las medidas de respuesta inflamatoria, en particular las células microgliales activadas, y las medidas de integridad neuronal, número de neuronas y grosor cortical, son los marcadores que mejor caracterizan el perfil de patología propio de la resiliencia en el surco temporal superior.

Por otra parte, la carga de placas de A β es el factor con mayor peso en el perfil de patología propio de la demencia por EA en esta región. Es decir que en el surco temporal superior cuando analizamos todos los datos de patología en conjunto, la

carga de placas de A β separa al grupo AD del grupo resiliente (IP/HP) y esto es paradójico puesto que parece contradecir la caracterización previa; pero se podría explicar por el hecho de que en esta región el grupo IP tenía una carga significativamente menor de placas de A β en comparación con el grupo AD (ver figura 17 A-B en apartado 4.1.i), y “fuerza” al grupo IP/HP a distinguirse matemáticamente del grupo AD. La carga de placas densas fue la segunda medida patológica con mayor peso relativo y este resultado es consistente con el estudio previo del surco temporal superior en el que habíamos observado que el grupo AD tenía una carga significativamente mayor de placas densas en comparación con los grupos IP y HP (ver figura 4 Anexo 2 en apartado 10.2).

- El análisis discriminante de regresión de mínimos cuadrados parciales definió un perfil de citoquinas propio de la resiliencia en la corteza entorrinal y el surco temporal superior

Hicimos un análisis de regresión de mínimos cuadrados parciales (D-PLRS) de un panel de 27 citoquinas, a saber: FGF basic, eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, IP-10, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF- α , VEGF, MCP-1.

La **Figura 34A y B** muestra los datos de las medidas de citoquinas obtenidas en la corteza entorrinal y el surco temporal superior.

El análisis generó un perfil de citoquinas que se obtiene con la suma proporcional de cada una de las medidas en las variables latentes 1 (LV1) y 2 (LV2).

En la corteza entorrinal la variable latente 1 (LV1) separó a los grupos HP y AD respecto a IP y CTRL, por lo tanto no discriminó claramente un perfil propio de demencia por EA ni de resiliencia (**Figura 35A y B**). En cambio, la variable latente 2 (LV2) separó a los grupos IP y HP de los grupos CTRL y AD, por lo tanto definió un perfil de citoquinas propio de la resiliencia. En particular la IP-10 y la IL-6 estaban elevadas en los grupos IP y HP con respecto a los grupos CTRL y AD (**Figura 35A y C**).

En el surco temporal superior la variable latente 1 (LV1) separó al grupo AD de los grupos IP, HP y CTRL, por lo tanto definió el perfil de citoquinas propio de la demencia por EA. En particular la IL-10 y MPC-1 estaban elevadas en el grupo AD respecto al resto (**Figura 35D y E**). La variable latente 2 (LV2) separó a los grupos IP y HP de los grupos CTRL y AD, por lo tanto definió el perfil de citoquinas propio de la resiliencia. En particular el TNF- α y la IL-5 estaban elevadas en los grupos IP y HP con respecto a los grupos CTRL y AD (**Figura 35D y F**).

Estos resultados muestran que la resiliencia tiene un perfil de citoquinas distintivo. Merece la pena señalar que las señales detectadas difieren en cierta medida entre la corteza entorrinal y el surco temporal, y esto podría explicarse por la heterogeneidad de la respuesta inflamatoria en la que tanto las células microgliales como los astrocitos no solo liberan citoquinas diferentes en diferentes contextos patológicos sino que, en este caso, probablemente también reflejan momentos evolutivos distintos de las lesiones patológicas de la enfermedad de Alzheimer (afectación muy temprana en el caso de la corteza entorrinal y más tardía en el caso del surco temporal superior).

- **Correlatos entre el perfil de citoquinas y las medidas de patología y bioquímica**

Hicimos un análisis de correlación múltiple de los perfiles de citoquinas obtenidos previamente con todas las medidas de patología y bioquímica disponibles de la corteza entorrinal y el surco temporal superior.

En la corteza entorrinal, el perfil de citoquinas propio de enfermedad (citoquinas en LV1) se correlacionó significativamente con el número de ovillos neurofibrilares ($p=0.001$), el número de astrocitos reactivos ($p=0.001$) y el ratio de pTau/ Tau sináptico ($p=0.008$) (**Figura 36A y B**).

En el surco temporal superior el perfil de citoquinas propio de resiliencia (citoquinas en LV2) se correlacionó significativamente con el número de células de microglía activada ($p=0.0007$), y con los niveles de monómeros de p-tau

(monómeros de PHF-1) sinápticos ($p=0.01$) y los multímeros de de p-tau (multímeros de PHF-1) sinápticos ($p=0.01$) (**Figura 36C y D**).

Resulta particularmente interesante que al tratarse de un análisis de correlación múltiple en el que la significación estadística se pierde al comparar tal número de medidas, los parámetros que mostraron correlación con valor estadístico significativo con el perfil de citoquinas fueron las medidas de activación glial y los niveles aumentados de p-tau en el compartimento sináptico. Como se ha mostrado anteriormente estos dos marcadores fenotípicos caracterizan el estado de resiliencia y son los que tienen mejor valor predictivo de cognición y daño neuronal.

Los datos previos sugieren que las células de la microglía activada y las especies de tau fosforilado sináptico podrían conformar un contexto patológico que se acompañe de un perfil de citoquinas deletéreo.

- Citoquinas con valor predictivo de resiliencia

Para identificar candidatos de citoquinas con valor predictivo de resiliencia hicimos un análisis de D-PLRS y un análisis de curva ROC basado en una validación cruzada dejando uno fuera (análisis de “Leave-one-out cross-validation”) con las puntuaciones del eje de la variable latente 1 (LV1) que fue la que separó a los sujetos resilientes del resto.

Refinamos el análisis hasta conseguir utilizar sólo las cinco señales de citoquinas más altas y más bajas medidas en la corteza entorrinal (EC) y el surco temporal superior (STS). El análisis de IP y HP vs CTRL y AD tenía un valor predictivo de apenas el 50%. Separamos IP de CTRL y AD, y luego, en un análisis separado HP de CTRL y AD y conseguimos un valor predicción ~80%.

Conseguimos un valor de predicción de resiliencia IP del 78,1 % con 5 señales disminuidas, que son: MIP-1 α _{EC}, IL-7_{EC}, IL-15_{STS}, MCP-1_{STS} y GM-CSF_{STS}; y 5 señales aumentadas, que son: MCP-1_{EC}, MIP-1 α _{STS}, Eotaxina_{STS}, IL-5_{STS} y TNF- α _{STS}. (**Figura 37 A-B**).

Conseguimos un valor de predicción de resiliencia HP del 82 % con 5 señales disminuidas, que son: IL-17_{STS}, MIP-1 β _{STS}, MCP-1_{STS}, IL-8_{STS}, IL-4_{STS}; y 5 señales aumentadas, que son: IL-1 β _{EC}, IL-6_{EC}, IL-1 α _{EC}, Eotaxina_{EC}, IL-12 p 70_{EC}. (**Figura 37 C-D**).

Estos datos enfatizan las diferencias regionales de expresión de citoquinas que podrían reflejar una respuesta inflamatoria diferente según el estadio evolutivo de las lesiones histopatológicas de la enfermedad. La expresión de estas citoquinas podría resultar en un fenotipo de respuesta inflamatoria neuroprotectora y su detección podría predecir si un sujeto va a desarrollar síntomas de deterioro cognitivo.

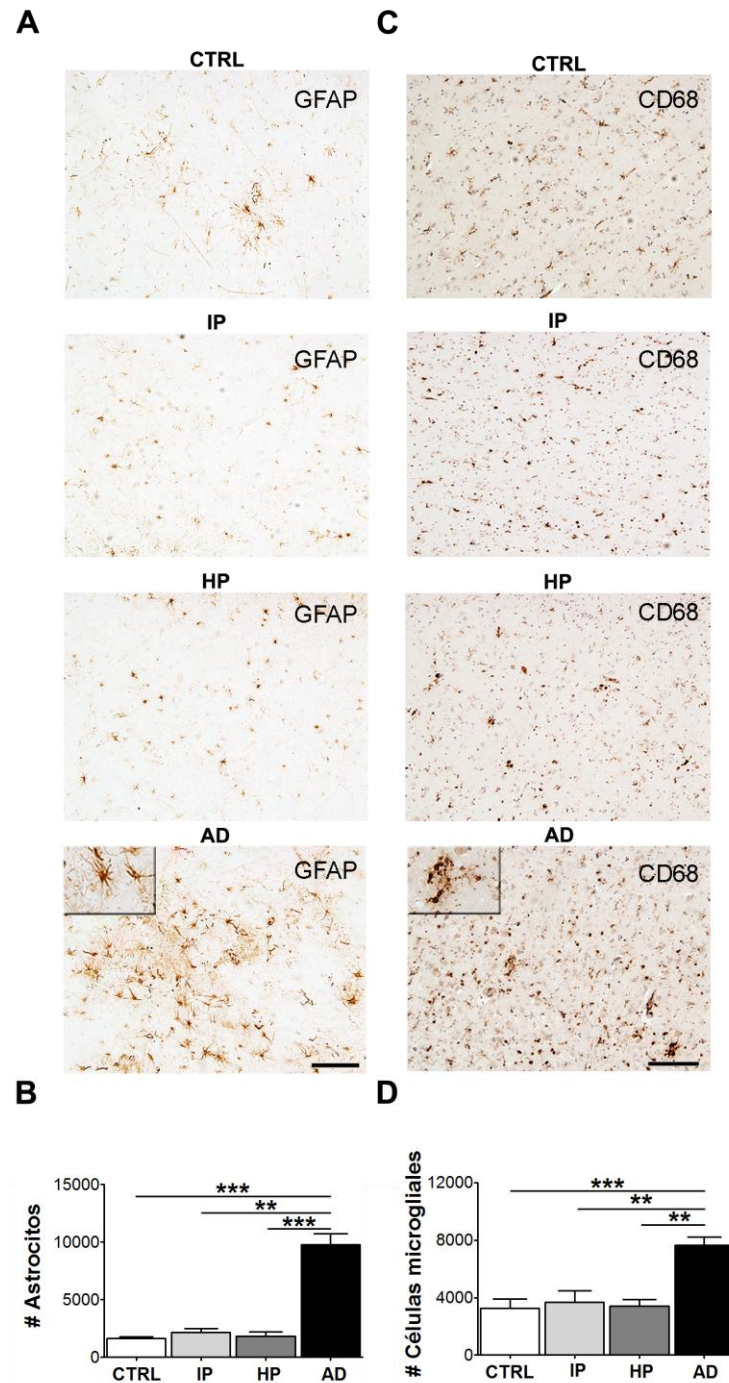


Figura 30. Número de astrocitos reactivos y de células microgliales activadas en la corteza entorrinal (CE). Inmunohistoquímica con GFAP y CD68 (**A y C**) y cuantificación estereológica del número de astrocitos y de células microgliales (**B y D**) Comparación múltiple entre: (i) Grupo control (CTRL): sujetos sin demencia y con probabilidad baja de enfermedad de Alzheimer (EA) de acuerdo con los criterios del National Institute on Aging / Reagan Institute. (ii) Grupo IP: sujetos sin demencia y con probabilidad intermedia de EA. (iii) Grupo HP: sujetos sin demencia y con probabilidad alta de AD. (iv) Grupo con demencia (AD): sujetos con demencia y con probabilidad alta de EA. (**A**) Fotomicrografías representativas de astrocitos GFAP-inmunoreactivos en la CE. (**B**) Se observó un aumento estadísticamente significativo del número de astrocitos reactivos en el grupo AD con respecto a los grupos IP y HP (**C**) Microfotografías representativas de células microgliales CD68-inmunoreactivas con co-tinción de hematoxilina en la CE. (**D**) Se observó un aumento estadísticamente significativo del número de células microgliales activadas en el grupo AD en comparación con los grupos IP y HP. Escala =200 micras. n= 11-23. **P < 0.01, ***P < 0.001. Prueba de ANOVA unidireccional con post-test de Tukey (**B**), y prueba de ANOVA Kruskal-Wallis con post-test de Dunn para comparaciones múltiples.

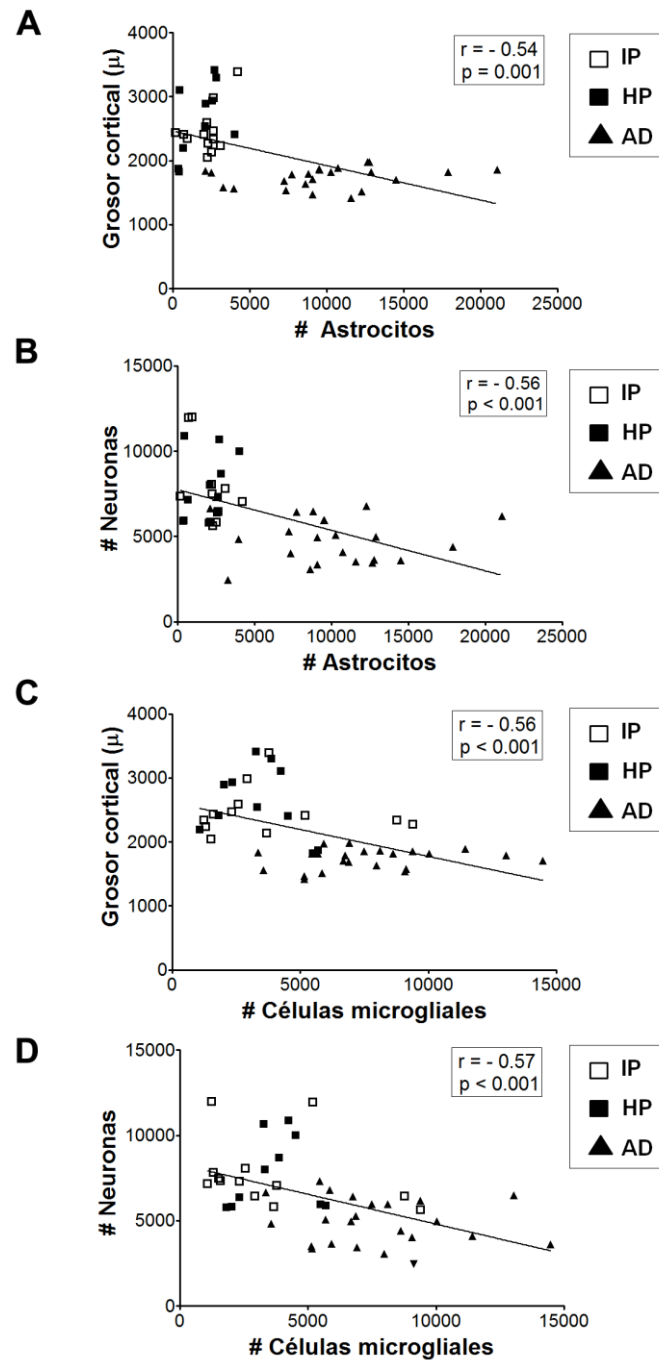


Figura 31. Correlación del número de astrocitos reactivos y de células microgliales activadas con las medidas de integridad neuronal en la corteza entorrinal. Incluimos la distribución de datos de: (i) Grupo IP: sujetos sin demencia y con probabilidad intermedia de enfermedad de Alzheimer (EA) de acuerdo con los criterios del National Institute on Aging / Reagan Institute. (ii) Grupo HP: sujetos sin demencia y con probabilidad alta de EA. (iii) Grupo con demencia (AD): sujetos con demencia y con probabilidad alta de EA. **(A-B)** Observamos una correlación negativa estadísticamente significativa entre el número de astrocitos reactivos y **(A)** el grosor cortical ($r = -0.54$, $p = 0.001$) y **(B)** el número de neuronas ($r = -0.58$, $p < 0.001$). ($r = -0.49$, $p = 0.002$). **(C-D)** Observamos una correlación negativa estadísticamente significativa entre el número células microgliales activadas y **(C)** el grosor cortical ($r = -0.56$, $p < 0.001$) y, **(D)** el número de neuronas ($r = -0.57$, $p < 0.001$). $n = 46$. Análisis de regresión lineal.

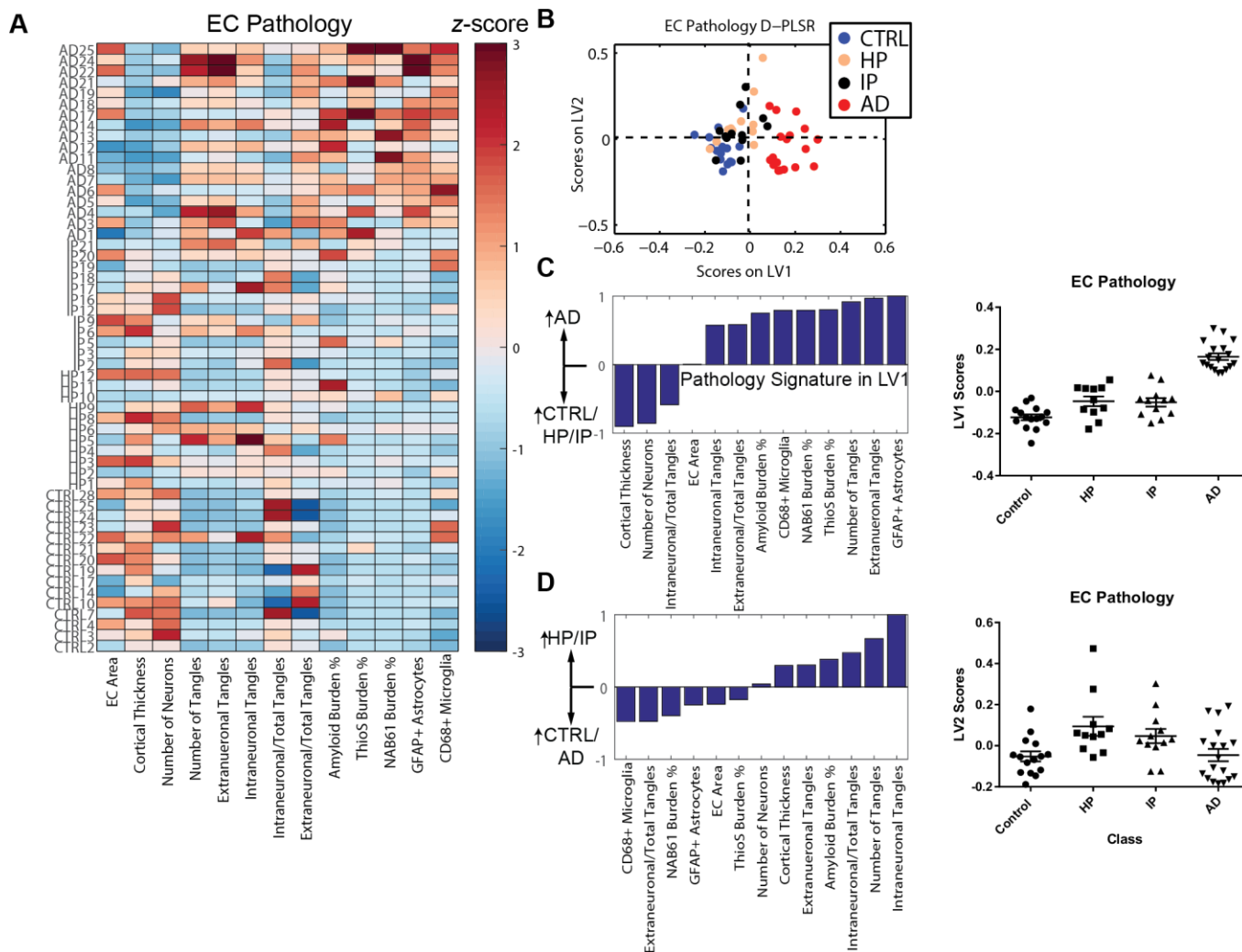


Figura 32. Regresión de mínimos cuadrados parciales (D-PLSR) de los parámetros patológicos en la corteza entorrinal (EC). (i) Grupo control (CTRL): sujetos sin demencia y con probabilidad baja de enfermedad de Alzheimer (EA) de acuerdo con los criterios del National Institute on Aging / Reagan Institute. (ii) Grupo IP: sujetos sin demencia y con probabilidad intermedia de EA. (iii) Grupo HP: sujetos sin demencia y con probabilidad alta de AD. (iv) Grupo con demencia (AD): sujetos con demencia y con probabilidad alta de EA. **(A)** Panel de datos de patología de la corteza entorrinal con puntaje-Z asignado. **(B)** Análisis D-PLSR. Distribución de valores de cada sujeto definidos por un perfil de patología que se obtiene con la suma proporcional de cada una de las medidas. El análisis detecta una variable latente 1 (LV1), en horizontal, que segrega a los sujetos IP y HP con los sujetos CTRL respecto al grupo AD, y una variable latente 2 (LV2), en vertical, que segrega a los sujetos IP y HP respecto a los grupos CTRL y AD. **(C y D)** La longitud de las barras en los ejes indica el peso o "efecto" que tiene cada una de las medidas en la suma proporcional. Representación del score de (B) con los datos individuales de todos los pacientes mostrando segregación diferencial de los sujetos resilientes en las variables latentes.

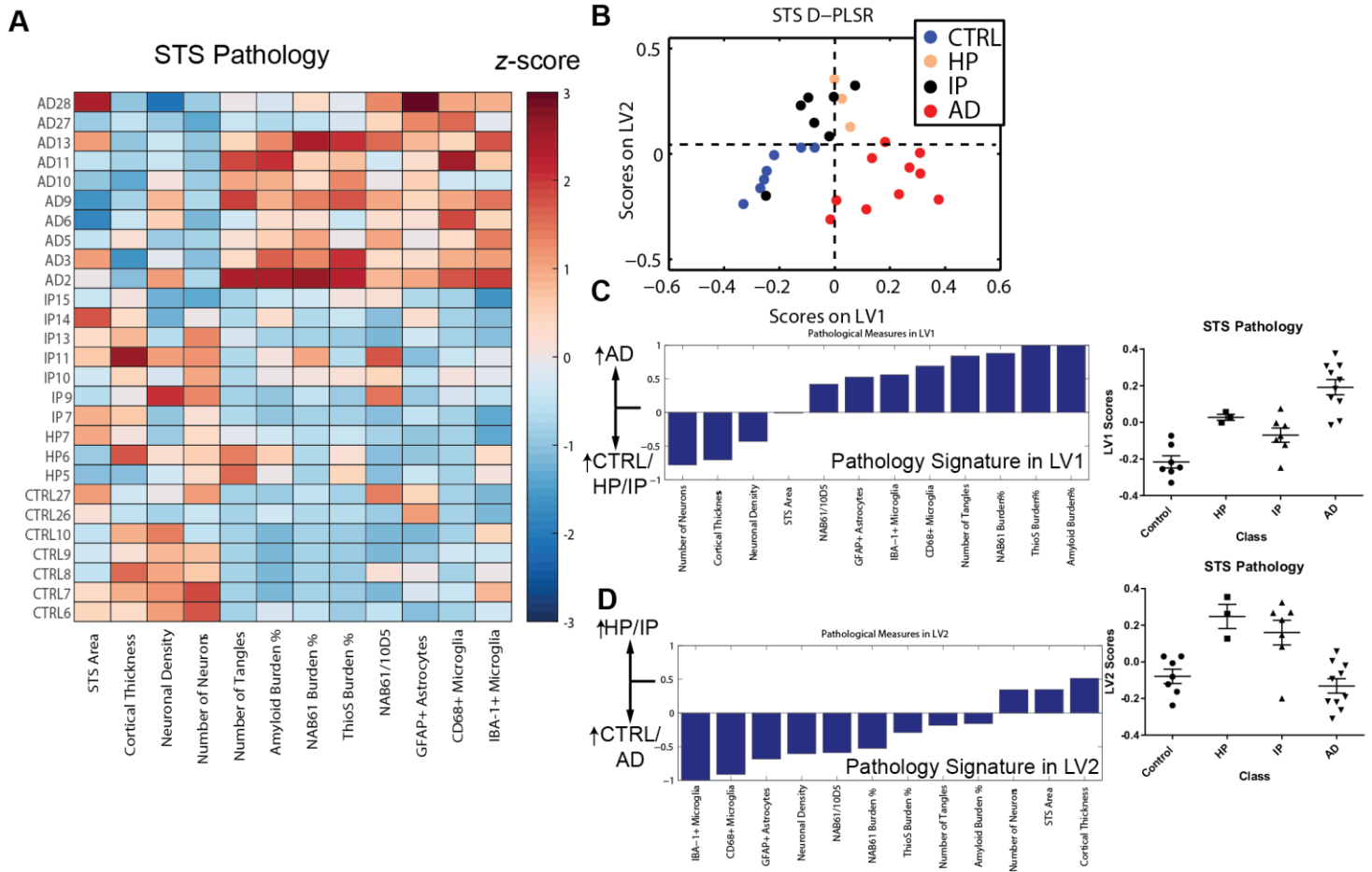


Figura 33. Regresión de mínimos cuadrados parciales (D-PLSR) de los parámetros patológicos en el surco temporal superior (STS). (i) Grupo control (CTRL): sujetos sin demencia y con probabilidad baja de enfermedad de Alzheimer (EA) de acuerdo con los criterios del National Institute on Aging / Reagan Institute. (ii) Grupo IP: sujetos sin demencia y con probabilidad intermedia de EA. (iii) Grupo HP: sujetos sin demencia y con probabilidad alta de AD. (iv) Grupo con demencia (AD): sujetos con demencia y con probabilidad alta de EA. **(A)** Panel de datos de patología del surco temporal superior con puntaje-Z asignado. **(B)** Análisis D-PLSR. Distribución de valores de cada sujeto definidos por un perfil de patología que se obtiene con la suma proporcional de cada una de las medidas. El análisis detecta una variable latente 1 (LV1), en horizontal, que segrega a los sujetos IP y HP con los sujetos CTRL respecto al grupo AD, y una variable latente 2 (LV2), en vertical, que segrega a los sujetos IP y HP respecto a los grupos CTRL y AD. **(C y D)** La longitud de las barras en los ejes indica el peso o "efecto" que tiene cada una de las medidas en la suma proporcional. Representación del score de (B) con los datos individuales de todos los pacientes mostrando segregación diferencial de los sujetos resilientes en las variables latentes.

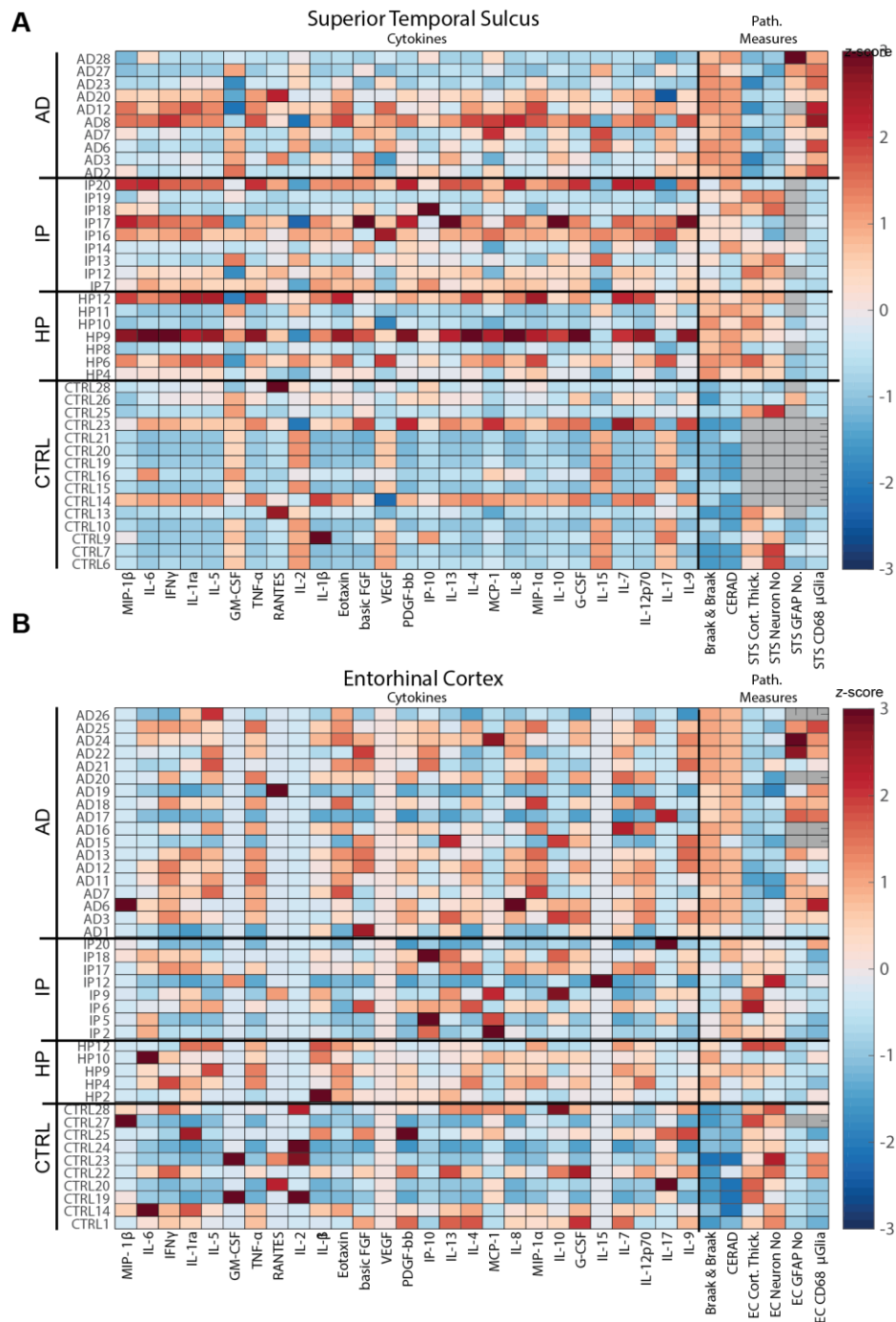


Figura 34. Panel de datos de citoquinas cuantificadas con un ensayo Bioplex y de medidas de patología en la corteza entorrinal y el surco temporal superior. (i) Grupo control (CTRL): sujetos sin demencia y con probabilidad baja de enfermedad de Alzheimer (EA) de acuerdo con los criterios del National Institute on Aging / Reagan Institute. (ii) Grupo IP: sujetos sin demencia y con probabilidad intermedia de EA. (iii) Grupo HP: sujetos sin demencia y con probabilidad alta de AD. (iv) Grupo con demencia (AD): sujetos con demencia y con probabilidad alta de EA. **(A)** Panel de datos de las medidas de citoquinas y de patología de la corteza entorrinal con puntaje Z asignado. No había muestras de tejido disponible en las medidas representadas en gris. **(B)** Panel de datos de las medidas de citoquinas y de patología del surco temporal superior con puntaje Z asignado. No había muestras de tejido disponible en las medidas representadas en gris.

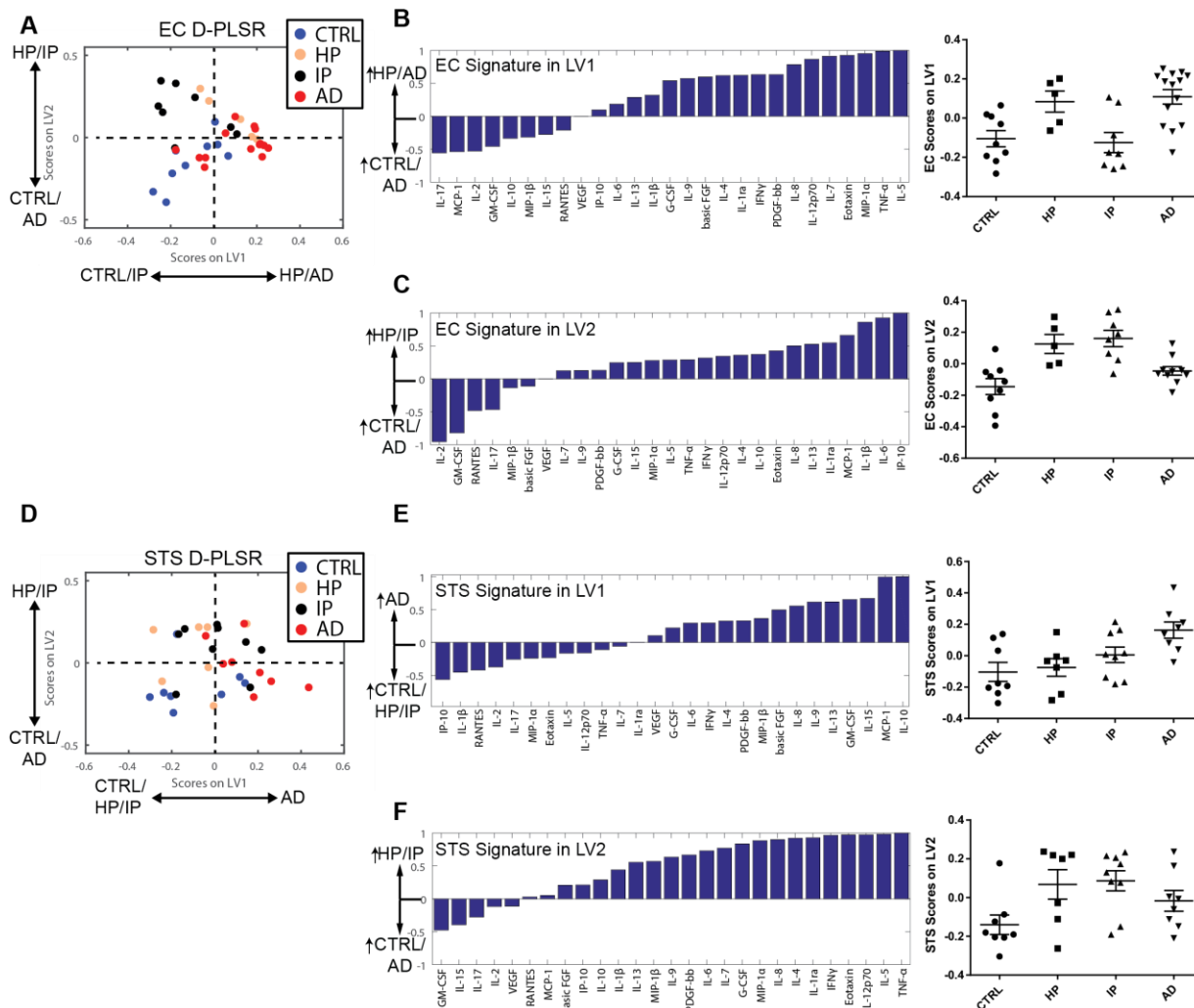


Figura 35. Análisis de regresión de mínimos cuadrados parciales (D-PLSR) de las medidas de citoquinas en la corteza entorrinal (EC) y el surco temporal superior (STS). (i) Grupo control (CTRL): sujetos sin demencia y con probabilidad baja de enfermedad de Alzheimer (EA) de acuerdo con los criterios del National Institute on Aging / Reagan Institute. (ii) Grupo IP: sujetos sin demencia y con probabilidad intermedia de EA. (iii) Grupo HP: sujetos sin demencia y con probabilidad alta de AD. (iv) Grupo con demencia (AD): sujetos con demencia y con probabilidad alta de EA. **(A)** CE. Análisis D-PLSR. Distribución de valores de cada sujeto definidos por un perfil de citoquinas que se obtiene con la suma proporcional de cada una de las medidas. El análisis detecta una variable latente 1 (LV1), en horizontal, que segrega a los sujetos HP y AD respecto a los sujetos IP y CTRL, y una variable latente 2 (LV2), en vertical, que segrega a los sujetos IP y HP respecto a los grupos CTRL y AD. **(B y C)** La longitud de las barras en los ejes indica el peso o “efecto” que tiene cada una de las medidas en la suma proporcional. Representación del score de (A) con los datos individuales de todos los pacientes mostrando segregación diferencial de los sujetos resilientes en las variables latentes. **(D)** STS. D-PLSR. LV1 segrega a los sujetos IP, HP, y CTRL respecto a los sujetos AD, y LV2 segrega a los sujetos IP y HP con respecto a los grupos CTRL y AD. **(E y F)** Representación del score de (D) con los datos individuales de todos los pacientes mostrando segregación diferencial de los sujetos resilientes en las variables latentes.

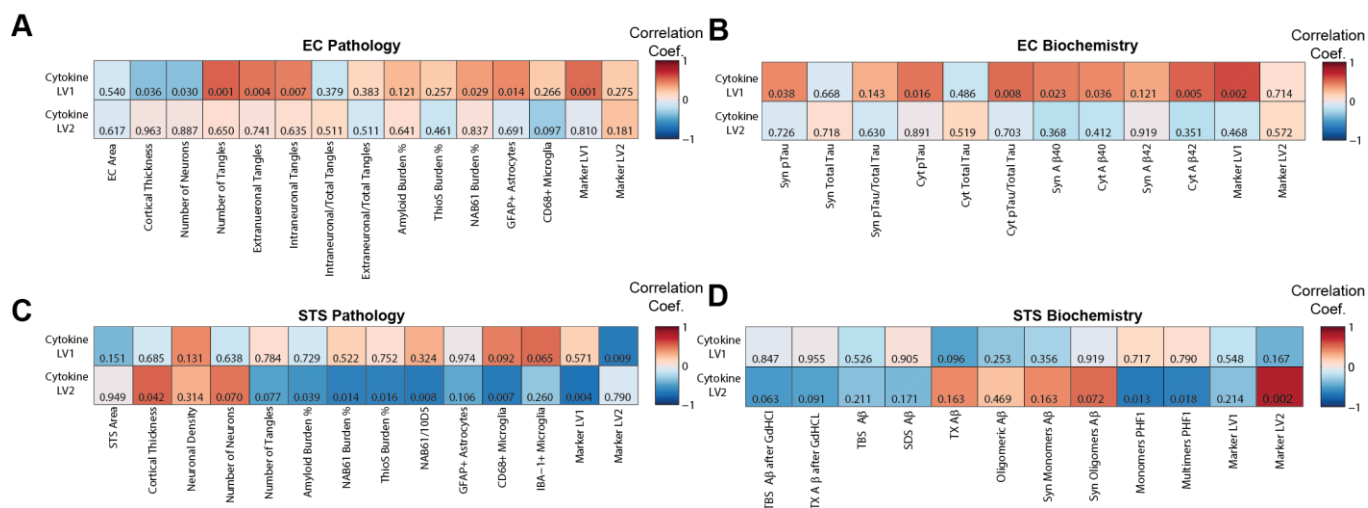


Figura 36. Identificación de medidas patológicas y de bioquímica que correlacionan con el perfil único o “firma” de citoquinas en corteza entorrinal (CE) y surco temporal superior (STS). Análisis de correlación entre los perfiles de citoquinas de LV1 y LV2 en cada región y (A) los marcadores patológicos en el CE, (B) los marcadores bioquímicos en el CE, (C) los marcadores patológicos en el STS, y (D) los marcadores bioquímicos en el STS. El código de colores representa el coeficiente de correlación R. Los valores numéricos la significación estadística de la correlación.

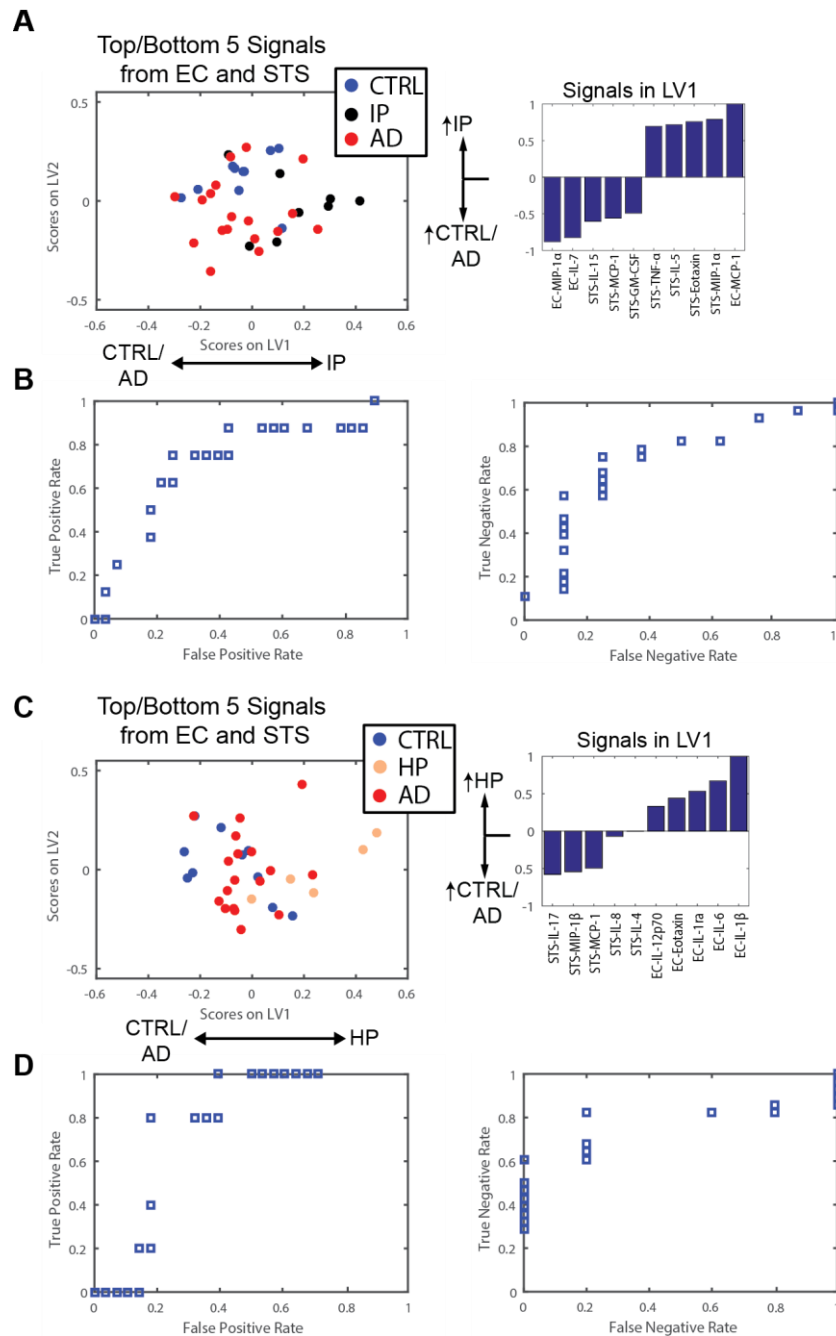


Figura 37. Análisis de regresión de mínimos cuadrados parciales (D-PLSR) y de curva ROC basada en validación cruzada dejando uno fuera que identifica citoquinas con valor predictivo de resiliencia. (i) Grupo control (CTRL): sujetos sin demencia y con probabilidad baja de enfermedad de Alzheimer (EA) de acuerdo con los criterios del National Institute on Aging / Reagan Institute. (ii) Grupo IP: sujetos sin demencia y con probabilidad intermedia de EA. (iii) Grupo HP: sujetos sin demencia y con probabilidad alta de AD. (iv) Grupo con demencia (AD): sujetos con demencia y con probabilidad alta de EA. **(A y C)** Análisis D-PLSR de las cinco señales de citoquinas más altas y más bajas medidas en la corteza entorrinal (EC) y el surco temporal superior (STS). Distribución de valores de cada sujeto definidos por un perfil de citoquinas que se obtiene con la suma proporcional de cada una de las medidas. El análisis detecta una variable latente 1 (LV1), en horizontal, que segrega en **(A)** a los sujetos IP respecto a los sujetos AD y CTRL, y en **(C)** a los sujetos HP de CTRL y AD; y una variable latente 2 (LV2), en vertical, que no segrega los grupos. La longitud de las barras en el eje LV1 indica el peso o "efecto" que tiene cada una de las medidas de citoquinas en la suma proporcional. **(B y D)** Curva ROC. Las medidas de citoquinas tienen un valor de predicción de resiliencia IP del 78,1 % (B) y de resiliencia HP del 82 % (D).

Las tabla 7 y 8 resumen los parámetros demográficos y neuropatológicos medidos en el surco temporal superior y la corteza entorrinal.

Tabla 7. Estudio neuropatológico cuantitativo en el surco temporal superior				
	Grupo control (n= 15)	Grupo IP (n=12)	Grupo HP (n=8)	Grupo con demencia (n=15)
Edad (años)	84.44 ± 3.20	89.82 ± 2.72	88.40 ± 6.01	87.2 ± 3.22
Carga de placas de amiloide beta (%)	1.25 ± 0.56	3.58 ± 0.88	6.49 ± 1.55*	10.7 ± 1.13***
Carga de placas densas (%)	0.28 ± 0.15	0.14 ± 0.45	0.55 ± 0.22	2.75± 0.7**
Carga de placas oligoméricas (%)	0.31 ± 0.14	1.34 ± 0.54	0.66 ± 0.41	4.79 ± 0.72***
Número de ovillos neurofibrilares	7± 3	40 ± 12	5509 ± 1536***	6670 ± 1122***
Número de neuronas	171070± 9457	159808 ± 12255	160858 ± 5055**	1047 ± 2322***
Grosor cortical (µm)	3035 ± 116	2955 ± 83	3154 ± 188	2421 ± 99**
Número de astrocitos reactivos	7243 ± 1811	6497 ± 1.117	5579 ± 1.157	1472 ± 1959*
Número de células microgliales activadas	1435 ± 688.1	2994 ± 1,441	2208 ± 1066	1574 ± 2580**

*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 versus grupo control.

Tabla 8. Estudio neuropatológico cuantitativo en la corteza entorrinal				
	Grupo control (n= 19)	Grupo IP (n=12)	Grupo HP (n=11)	Grupo con demencia (n=23)
Edad (años)	83.26 ± 2.13	83.50 ± 2.57	85.89 ± 3.54	80.89 ± 2.49
Carga de placas de amiloide beta (%)	0.33 ± 0.12***	1.64 ± 0.42	1.93 ± 0.48	2.89 ± 0.35
Carga de placas densas (%)	0.07 ± 0.03***	0.24 ± 0.05*	0.17 ± 0.03*	1.29 ± 0.20
Carga de placas oligoméricas (%)	0.00 ± 0.00***	0.04 ± 0.01**	0.06 ± 0.02*	0.46 ± 0.09
Número de ovillos neurofibrilares	422.10 ± 120.10***	1105.00 ± 235.10	1290.00 ± 301.90	1827.00 ± 177.00
Número de neuronas	9144.00 ± 574.20***	7792.00 ± 604.50**	7758.00 ± 608.80*	4886.00 ± 288.50
Grosor cortical (µm)	2641.00 ± 72.96***	2475.00 ± 108.20***	2630.00 ± 164.20***	1736.00 ± 33.26
Número de astrocitos reactivos	1626.00 ± 152.30***	2175.00 ± 317.60***	1824.00 ± 365.30***	9803.00 ± 954.70
Número de células microgliales activadas	3259.00 ± 636.20***	3681.00 ± 803.60**	3416.00 ± 454.80*	7654.00 ± 578.40

*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 versus grupo con demencia.

iv. Resumen

En la tercera parte del estudio, llevada a cabo en muestras de la corteza entorrinal y del surco temporal superior, demostramos que:

- (i) Existe una respuesta inflamatoria propia de la resiliencia que se caracteriza por un número menor de astrocitos reactivos y de células microgliales activadas en los sujetos resilientes en comparación con los sujetos con síntomas cognitivos.
- (ii) Las reacciones gliales son un buen correlato de integridad neuronal y tienen valor predictivo de los síntomas cognitivos de la demencia.
- (iii) Tanto en el surco temporal superior como en la corteza entorrinal la ausencia de activación glial fue el parámetro con más peso para discriminar los casos resilientes del resto en un perfil de patología que incluía medidas de integridad neuronal, de A β , tau y de respuesta inflamatoria.
- (iv) La ausencia de reactividad glial en los sujetos sin síntomas cognitivos se acompaña de un perfil de señales de citoquinas neuroprotector propio de la resiliencia.
- (v) Conseguimos un valor de predicción de resiliencia IP del 78,1 % con 5 señales de citoquinas disminuidas, que son: MIP-1 α _{EC}, IL-7_{EC}, IL-15_{STS}, MCP-1_{STS} y GM-CSF_{STS}; y 5 señales aumentadas, que son: MCP-1_{EC}, MIP-1 α _{STS}, Eotaxina_{STS}, IL-5_{STS} y TNF- α _{STS}.
- (vi) Conseguimos un valor de predicción de resiliencia HP del 82 % con 5 señales de citoquinas disminuidas, que son: IL-17_{STS}, MIP-1 β _{STS}, MCP-1_{STS}, IL-8_{STS}, IL-4_{STS}; y 5 señales aumentadas que son: IL-1 β _{EC}, IL-6_{EC}, IL-1 α _{EC}, Eotaxina_{EC}, IL-12 p 70_{EC}.

En resumen, en esta tercera parte caracterizamos la respuesta inflamatoria propia de la resiliencia que se define por un número menor de astrocitos reactivos y de células microgliales activadas que secretan un perfil único de múltiples citoquinas que podría jugar un papel neuroprotector.

5. Capítulo quinto. Discusión

Algunos individuos son capaces de tolerar el depósito de A β y la formación de ovillos neurofibrilares en sus cerebros sin presentar daño estructural y cognitivo, por lo tanto son resilientes a la patología de la EA, pero ¿qué define la resiliencia? Identificamos los siguientes marcadores: preservación del número de neuronas y de la morfología axonal, menor carga de placas densas y oligoméricas de A β , menor acúmulo de especies solubles de p-tau en la sinapsis y, por último, menor número de astrocitos reactivos y de células microgliales activadas que secretan un perfil de citoquinas único que resulta ser neuroprotector. ***El descubrimiento más importante de esta tesis es que son los oligómeros de tau hiperfosforilados sinápticos y la respuesta inflamatoria, y no las tradicionales placas de amiloide y los ovillos neurofibrilares, los marcadores que predicen con mayor fiabilidad, la presencia o ausencia de síntomas clínicos de enfermedad y de pérdida de las poblaciones neuronales vulnerables a la EA.***

La idea de resiliencia ha sido sugerida por múltiples estudios de correlación clínico-patológica y de neuroimagen de A β in vivo que han mostrado la presencia de los dos principales marcadores patológicos de la EA—placas de A β y ovillos neurofibrilares— en ausencia de deterioro cognitivo (Aizenstein et al., 2008; Andrade-Moraes et al., 2013; Bennett et al., 2002; Crystal et al., 1988; Ikonovic et al., 2008; Katzman et al., 1988; Lockhart et al., 2007; Lopresti et al., 2005; Savva et al., 2009; Tomlinson et al., 1968). Pero dado el período asintomático tan prolongado que caracteriza a la evolución de la EA, es difícil discernir si todos estos sujetos están en la fase preclínica de la enfermedad, o si, al menos algunos de ellos, son resilientes a la presencia en sus cerebros de patología de la EA y nunca desarrollarán síntomas de enfermedad pese a haber acumulado en sus cerebros unos niveles de placas y ovillos similares a los de individuos sintomáticos. No hay duda de que los casos resilientes representan un fenómeno muy poco frecuente y es por ello en parte que no abundan hasta el momento estudios en los que se lleve a cabo un análisis detallado del fenotipo que caracteriza a la resiliencia. Gracias al esfuerzo coordinado de cinco bancos de

cerebros reunimos un total de **90 muestras de cerebro humano que incluían 33 casos resilientes** y caracterizamos de forma detallada **dos áreas anatómicas de interés** desde el punto de vista patológico y bioquímico: el surco temporal superior y la corteza entorrinal. **En esta tesis presentamos el estudio postmortem más exhaustivo conducido hasta ahora de la resiliencia a la patología de la EA y de los marcadores que la caracterizan.**

La primera cuestión era **saber si estos sujetos realmente tenían una carga de patología de EA similar a la de los sujetos con demencia al examinarse con métodos de neuropatología cuantitativa detallada**. Los estudios previos de basaban en aproximaciones semicuantitativas o habían sido realizados con muestras de tamaño muy limitado. Cuantificamos la carga total de placas de A β por análisis de imágenes de microscopio y el número de ovillos neurofibrilares por estereología. **Nuestros resultados desestiman la explicación obvia de que la preservación de la cognición se debía a que los sujetos resilientes tuviesen una menor carga de patología de EA en comparación con los sujetos con demencia.**

Al ser este un estudio neuropatológico y por lo tanto transversal, la segunda cuestión es si los sujetos resilientes podrían desarrollar los síntomas de demencia a edades más avanzadas. Sin embargo, la edad media de los sujetos resilientes era de 84,8 años, lo cual representa ~7 años más que la media de edad de la esperanza de vida en USA en 2008, lo cual sugiere que estos sujetos son en realidad más longevos que la mayoría de los pacientes con demencia tipo EA para el momento en que desarrollan los síntomas clínicos de enfermedad. El depósito de A β y la formación de ovillos neurofibrilares a nivel cerebral ocurren de forma progresiva en un período que puede durar hasta 15 años; lo más lógico es pensar que los mecanismos de resiliencia aparecen también de forma gradual y permanecen. La presencia abundante de patología en la neocorteza tendría que asociarse con síntomas cognitivos con una gravedad suficiente como para cumplir con criterios de demencia, y este no fue el caso de los sujetos resilientes HP en el estudio del surco temporal superior. Tampoco hubo ninguna evidencia de deterioro cognitivo ligero en ninguno de los sujetos resilientes en los dos años

previos a la muerte, aunque no descartamos esta posibilidad categóricamente ya que el estudio neuropsicológico formal sólo estaba disponible para algunos de los sujetos. Y aunque esta fue una limitación del estudio **los datos obtenidos nos permiten afirmar que los sujetos resilientes tienen una “cognición mejor preservada” que los sujetos con demencia con cargas equivalentes de patología.**

La tercera cuestión en relación a la resiliencia era si se debe a una mayor reserva cerebral. Muy pocos estudios han abordado hasta ahora la cuestión de la integridad neuronal en los sujetos resilientes. En la cohorte longitudinal de Religious Order Study, Arnold et al. encontraron resultados paradójicos; por una parte los niveles de los marcadores sinápticos estaban preservados en un grupo de sujetos resilientes pero por otra parte la densidad neuronal también estaba preservada en los sujetos con demencia (Arnold et al., 2013). Queríamos saber si los sujetos resilientes partían de un número basal de neuronas similar al de los sujetos con demencia. De ser cierto, para una carga equivalente de patología esperábamos encontrar un sistema neuronal preservado en los sujetos resilientes. Utilizamos varias medidas de integridad neuronal como el número de neuronas y el grosor cortical, que para nuestro asombro estaban preservadas en los sujetos resilientes en comparación con los sujetos con demencia. Adicionalmente, y en acuerdo con los resultados previos, los niveles de los marcadores pre y postsinápticos en el estudio del surco temporal superior (ver figura 2 en publicación anexa en apartado 10.2) eran comparable en los sujetos resilientes con los sujetos controles. **La preservación de la estructura de la sinapsis que observamos en los sujetos resilientes es particularmente relevante porque la pérdida sináptica es el mejor correlato de la cognición en la EA** (DeKosky and Scheff, 1990; DeKosky et al., 1996; Ingelsson et al., 2004; Masliah et al., 1994a). Pero **el resultado más sorprendente fue la preservación del grosor cortical y del número de neuronas en la capa II de la corteza entorrinal en los sujetos resilientes HP en comparación con los sujetos con demencia.** Estudios previos han mostrado que la capa II de neuronas de la corteza entorrinal que proyecta al hipocampo es crítica para el funcionamiento de la memoria. Además estas son las primeras neuronas corticales en las aparecen los ovillos

neurofibrilares, y desde los estadios más leves de la EA ya se observa una pérdida neuronal muy marcada en esta región (Gomez-Isla et al., 1997). **Confirmamos que los sujetos resilientes mantenían la integridad neuronal incluso en una región, como la corteza entorrinal, donde la patología de la EA se presume ha estado presente por largos períodos de tiempo y que es particularmente vulnerable a la neurodegeneración. Por lo tanto la ausencia de daño estructural cerebral caracterizaba el fenotipo resiliente.** Finalmente, y con el fin de determinar de forma indirecta si los sujetos resilientes podrían haber tenido un mayor número de neuronas de base utilizamos el ratio de ovillos intraneuronales sobre el total de ovillos como medida indirecta de resistencia neuronal. De haber tenido estos sujetos resilientes un mayor número de neuronas de partida que los individuos con EA sintomática, habríamos encontrado en el cerebro del primer grupo un índice de ovillos extraneuronales/ total de ovillos (medida indirecta de la pérdida de neuronas) similar o superior al de los sujetos con demencia, y no un ratio inferior, como fue el caso. **Este resultado sugiere que los sujetos resilientes no tenían un mayor número de neuronas de base y desestima parcialmente la hipótesis de la reserva cerebral.** Sin embargo, cabe destacar que algunos estudios han reportado una hipertrofia en los cuerpos celulares de las neuronas, los núcleos y los nucléolos de los sujetos resilientes y se postula que es porque existe un mecanismo compensatorio que precede a la aparición de la demencia (Iacono et al., 2008). Estas medidas cuantitativas adicionales de integridad cerebral podrían ser estudiadas en estudios subsiguientes para completar el estudio de la hipótesis de la reserva cerebral, aunque los métodos de neuropatología al ser transversales no permiten descartar esta hipótesis de forma definitiva.

Una cuarta posibilidad es que los sujetos resilientes podrían tener una mayor “reserva cognitiva”, es decir, un número incrementado de conexiones sinápticas como resultado por ejemplo, de un nivel educativo alto. En el estudio Nun, Iacono et al sugirieron que la reserva cognitiva medida en años de educación podría ser protectora frente a la patología de la EA (Iacono et al., 2009). Resultaría de gran interés incluir estas medidas en estudios futuros.

Finalmente, estudios previos han demostrado que existe una alteración marcada de la morfología de los axones asociada a la subpoblación de placas densas de A β teñidas con tioflavina-S y que estos cambios morfológicos contribuyen al daño en la función del sistema neuronal y al deterioro cognitivo en la EA (Bussiere et al., 2003; Coma et al., 2010; DaRocha-Souto et al., 2011; Perez-Nievas B, 2013; Serrano-Pozo et al., 2010; Spires et al., 2005). Estudiamos la morfología axonal como medida adicional de integridad neuronal para saber si los sujetos resilientes eran capaces de tolerar la presencia de placas densas sin presentar un daño estructural en el cerebro. Confirmamos una alteración marcada de la morfología axonal en los sujetos con demencia, de acuerdo con resultados comunicados previamente (Arriagada et al. 1992; Knowles et al. 1999; Le et al. 2001; Spires et al. 2005). **Pero para nuestra sorpresa la morfología axonal estaba preservada en los sujetos resilientes y esto indica que las neuronas están de alguna manera mejor protegidas en sus cerebros de la toxicidad de las placas densas, o bien que hay algún otro factor que acompaña a dichos depósitos densos de amiloide y que es más responsable de la neurotoxicidad en la EA que el propio amiloide fibrilar.** A partir del conjunto de datos previos surgió la idea de que los marcadores patológicos clásicos de la EA —las placas de A β y los ovillos neurofibrilares— no eran suficientes para causar daño estructural en el cerebro ni deterioro cognitivo en el caso de individuos resilientes. Entonces, otros factores, como por ejemplo las formas solubles de amiloide y tau, o la respuesta inflamatoria, podrían tener un mejor valor predictivo con respecto a la cognición.

Valor predictivo de amiloide beta. Varios estudios de correlación clínico-patológica han demostrado que la carga total de placas de A β no se correlaciona ni con la duración, ni con la gravedad de los síntomas de la demencia por EA (Arriagada et al. 1992, Hyman et al. 1993; Bierer et al.; 1995, Gómez-Isla et al. 1997; Giannakopoulos et al. 2003; Ingelsson et al. 2004). Además se sabe que un gran número de placas de A β difusas pueden estar presentes en la corteza límbica y en la neocorteza en individuos con cognición normal (Arriagada et al. 1992., Morris et al. 1996., Knopman et al. 2003). Ya hemos comentado que la carga total de placas de A β era equivalente en los sujetos resilientes y los sujetos

con demencia, por lo tanto no discriminaba a los grupos según el estado cognitivo. Pero además **la carga de total de placas de A β no se correlacionó con ninguna medida de integridad neuronal ni de respuesta inflamatoria.** Para indagar más en el fenotipo A β de la resiliencia cuantificamos las placas densas —teñidas con tioflavina-S— y las placas oligoméricas —NAB61 inmunoreactivas. Estas dos subpoblaciones de placas se encontraban en un menor número en los sujetos resilientes y tenían una buena correlación con las medidas de integridad neuronal y de respuesta inflamatoria. **Esto sugiere que las placas densas de A β son un mejor correlato de cognición que las placas de A β difuso.**

La interpretación de los resultados relativos a las formas solubles y oligoméricas de A β medidas por Western blot, ELISA y anticuerpos conformacionales específicos, y su correlación con la integridad neuronal anatómica y la cognición, es algo más compleja. **Se ha propuesto que las especies solubles de A β , y en particular las especies de A β oligomérico, podrían ser formas más tóxicas que las placas de A β** (Selkoe, 1991; Mucke y Selkoe, 2012). Los estudios neuropatológicos y de neuroimagen de amiloide in vivo con PET-PIB miden el A β fibrilar y es sabido que no hay correlación clínico-patológica. Esta paradoja quedaría resuelta si se comprueba que las especies solubles de A β oligomérico y no las placas son las responsables de la toxicidad. Existe evidencia circunstancial en apoyo de esta idea. Una cohorte japonesa que desarrolla una forma autosómica dominante de la EA presenta una mutación en APP que aumenta la formación de oligómeros solubles de A β y disminuye las placas fibrilares. La presencia del alelo APOE4 se asocia también con un marcado aumento de la formación de oligómeros de A β . Por otro lado, las formas solubles oligoméricas de A β son neurotóxicas en los cultivos celulares y llevan a un deterioro cognitivo cuando se inyectan en el hipocampo de modelos animales (Shankar et al. 2008). Algunos estudios clínico-patológicos han sugerido que las especies solubles de A β oligomérico presentan una buena correlación con el deterioro cognitivo en la EA (Tomic et al. 2009; Mc Donald et al. 2012; Esparza et al. 2013).

Merece la pena recordar que la comparación e interpretación de los datos de especies solubles de A β , incluyendo las especies oligoméricas, derivados de distintos grupos de investigación, no es trivial puesto que ***no hay un consenso entre laboratorios a la hora de caracterizar y medir las especies de oligómeros de A β*** que se obtienen in vitro a partir de una variedad de proteínas amiloidogénicas de cerebros humanos (Benilova et al., 2012). En nuestro estudio los niveles de Abeta soluble medidos por Western Blot y ELISA mostraron escasa correlación con la presencia o ausencia de síntomas clínicos de enfermedad y daño anatómico, con la excepción de las especies oligoméricas reconocidas por el anticuerpo conformacional NAB61. Es posible que estas últimas especies estén presentes sólo en mínimas cantidades en los extractos de bioquímica, y resulten prácticamente indetectables por Western blot o ELISA. ***En conjunto, todos nuestros datos derivados de las medidas de especies solubles de A β , con la excepción de las formas oligoméricas detectadas por el anticuerpo NAB61, parecen tener un bajo valor predictivo del estatus cognitivo.***

Valor predictivo de tau. Al igual que la carga total de placas de A β , el número de ovillos neurofibrilares era equivalente en los sujetos resilientes y los sujetos con demencia, y por lo tanto no discrimina a los grupos según el estado cognitivo. ***Pero además el número de ovillos neurofibrilares no correlacionó de forma significativa con ninguna medida de integridad neuronal ni de respuesta inflamatoria en esta cohorte de cerebros.*** Sabemos que la magnitud de la pérdida neuronal excede el número de ovillos neurofibrilares (Gomez-Isla et al., 1997). Por consiguiente, existen al menos dos mecanismos de muerte neuronal en la EA: uno que afecta a las neuronas portadoras de ovillos y otro que afecta a las neuronas libres de ovillos, y que podría implicar especies solubles de tau. La Dra. Polidoro demostró en el modelo murino rTgTauEC de EA en estadios tempranos, que la reducción de los niveles de tau soluble a través de la supresión de un transgen prevenía la pérdida sináptica y la transmisión transsináptica, e incluso revertía la patología de ovillos neurofibrilares en el giro dentado y la corteza entorrinal (de Calignon et al., 2012). Además estudios postmortem en pacientes con EA y demencia frontotemporal con parkinsonismo ligada al cromosoma 17 han sugerido que las especies oligoméricas de alto peso

molecular de tau están relacionadas con la extensión de la neurodegeneración y representan un buen correlato de cognición. De acuerdo con lo previo **varios estudios apuntan a la toxicidad de las especies solubles de tau sobre las sinapsis** (Merino-Serrais et al., 2013; Pooler et al., 2014; Tai et al., 2012; Zempel et al., 2013).

Curiosamente, cuando medimos las especies solubles de tau total y p-tau por Western-blot y ELISA y obtuvimos resultados compatibles con esta idea. Consideramos que en la identificación del valor predictivo de los marcadores de resiliencia uno de los resultados más relevantes es que los sujetos resilientes tenían un menor acúmulo de especies solubles oligoméricas de tau hiperfosforiladas en la sinapsis, en comparación con los sujetos con demencia por EA. Y además esta medida se correlaciona de forma muy significativa con los marcadores de integridad neuronal y de respuesta inflamatoria. **El trabajo realizado en esta tesis nos permite afirmar que las especies solubles oligoméricas de tau hiperfosforiladas en las sinapsis representan un mejor correlato de deterioro cognitivo asociado a la demencia por EA que la carga de ovillos neurofibrilares y placas de A β , y tienen por lo tanto un mejor valor predictivo con respecto al estado cognitivo.**

Implicación de la GSK3- β en resiliencia. En un estudio previo nuestro grupo demostró que existe un aumento de la actividad de GSK-3- β dependiente de la edad en un modelo murino que sobre-expresa APP y tau —APPsw-tauv/w line— asociado con déficits de memoria y de aprendizaje. Lo más interesante es que el deterioro de memoria se pudo prevenir completamente gracias a una inhibición farmacológica sostenida de la GSK-3 β con un nuevo inhibidor del tipo tiadiazolidona (Serenó et al., 2009). Más recientemente, en un estudio in vitro e in vivo hemos observado que la GSK-3 β se activa de forma patológica en presencia de formas solubles de oligómeros de A β y contribuye a la pérdida de la integridad neuronal. La inhibición farmacológica de la GSK-3 β mejora el cambio neurítico relacionado con las placas y aumenta la expresión de genes mediados por CREB, un programa de transcripción relacionado con la integridad sináptica y la cognición (DaRocha-Souto et al., 2012). **En el presente estudio el acúmulo de especies solubles de p-tau en la sinapsis en los sujetos con síntomas se**

acompaña de una redistribución de la GSK-3 β lo que añade más evidencia sobre el posible papel de esta kinasa en las alteraciones de la cognición y la neurotoxicidad en la EA y la sitúa como posible diana de interés en el tratamiento de la EA.

Valor predictivo de la inflamación. Tal y como ya hemos mencionado se acepta que la patología de la EA está caracterizada por **una respuesta inflamatoria, o activación del sistema inmune innato del cerebro**, que aumenta con la progresión de la enfermedad, y que está dirigida fundamentalmente por las células microgliales y por los astrocitos. En un estudio previo, nuestro grupo comprobó que en un modelo murino transgénico de ratón de tau/APP el número de astrocitos reactivos fue el parámetro que mejor correlacionó con la pérdida neuronal y el deterioro cognitivo (DaRocha-Souto et al.). Además, varios estudios de correlación clínico-patológica han demostrado que hay una correlación altamente significativa entre el número de astrocitos reactivos y el número de células microgliales activadas con el número de ovillos neurofibrilares, pero no entre la glia reactiva y la carga de placas de A β , sugiriendo que la respuesta glial está también relacionada con la patología tau (Ingelsson et al., 2004; Serrano-Pozo et al., 2011). Encontramos un número menor de astrocitos y de células microgliales activadas en los sujetos resilientes, en comparación con los sujetos con demencia por EA, y éste es sin duda uno de los resultados más notable en relación a la identificación de los marcadores de la resiliencia porque, además, tanto el número de astrocitos reactivos como el número de células microgliales mostraron una muy buena correlación con las medidas de integridad neuronal. **Por lo tanto, podemos afirmar que en este estudio la respuesta glial representa un mejor correlato de deterioro cognitivo asociado a la demencia por EA que la carga de ovillos neurofibrilares y placas de A β .** Recordemos que la heterogeneidad en la respuesta es una característica fundamental en la neuroinflamación y que tanto las células microgliales como los astrocitos liberan **citoquinas** diferentes en diferentes contextos patológicos. En un estudio reciente el Dr. Wood utilizó un análisis de regresión de mínimos cuadrados parciales (D-PLSR) para identificar el perfil de citoquinas asociado con los estadios de Braak y CERAD en una muestra pequeña de cerebros humanos con patología de EA

(Wood et al., 2015). En nuestro estudio hemos cuantificado un panel de 27 citoquinas con un ensayo de bioplex en un subgrupo de 54 sujetos que habían sido previamente estudiados de forma detallada desde el punto de vista patológico y bioquímico, seguido de un análisis de (D-PLSR). ***Esta es la primera vez que se hace una caracterización tan completa y minuciosa de la respuesta inflamatoria de la resiliencia a la patología de la EA, que incluyó astrocitos reactivos, células microgliales activadas y citoquinas.*** La ventaja de utilizar un método de biología de sistemas como el D-PLRS es que permite correlacionar datos multidimensionales y hacer un análisis compuesto con gran cantidad de datos de forma simultánea. Gracias a ello es posible identificar parámetros que no son evidentes a simple vista, pero que aparecen revelados por el análisis. En jerga matemática, son parámetros o variables latentes. Los resultados indican que no existe un único elemento relevante sino que sólo la valoración conjunta de múltiples variables es capaz de predecir una categoría, en este caso desarrollar o no los síntomas de la EA. Un valor añadido del análisis es que validamos la caracterización detallada patológica y bioquímica que habíamos realizado previamente. Un hecho muy llamativo es que tanto en el surco temporal superior como en la corteza entorrinal la ***ausencia de activación glial fue el parámetro con más peso para discriminar los casos resilientes del resto.*** La respuesta glial fue un marcador específico y distintivo de la resiliencia y ***conseguimos identificar además un perfil de citoquinas propio de la resiliencia.*** Refinamos el análisis buscando sólo algunos candidatos con valor predictivo diagnóstico. Conseguimos clasificar a los sujetos resilientes IP según un perfil de citoquinas con una certeza del 78.1% y a los sujetos resilientes HP con una certeza del 82%. Este resultado es relevante porque le otorga potencia estadística al grupo de señales de citoquinas identificados en el análisis ya que no sólo separa a los sujetos resilientes del resto sin que lo hace con un grado de certeza ~80 en la cohorte estudiada. La interpretación del perfil de citoquinas es compleja porque existen diferencias regionales y algunas señales que están aumentadas en el surco temporal superior están disminuidas en la corteza entorrinal y viceversa. Además hay un perfil diferente según se trate de sujetos resilientes IP o HP, es decir según el grado de patología de la EA. Por lo tanto las diferentes señales de citoquinas identificadas en este estudio que están

relacionadas con un fenotipo de resiliencia a la patología EA reflejan muy probablemente, al menos en parte, momentos diferenciados en el tiempo de la aparición de placas de amiloide y ovillos neurofibrilares en las dos regiones de interés aquí estudiadas (afectación muy temprana de la corteza entorrinal y mucho más tardía de la región que configura el surco temporal superior). **La expresión de estas citoquinas podría resultar en un fenotipo de respuesta inflamatoria neuroprotectora y su detección podría predecir si un sujeto va a desarrollar síntomas de deterioro cognitivo.** Pero la cuestión clave radica quizás en identificar aquellas citoquinas cuya detección in vivo pudiera servir como marcador surrogado capaz de discriminar individuos asintomáticos que están destinados a sufrir una demencia tipo EA de individuos potencialmente resilientes a la presencia en sus cerebros de patología EA. Parte de la complejidad radica en que estas señales se deberían considerar en su conjunto y no de forma individual. En la **tabla 9** se resumen algunas de las funciones de estas citoquinas descritas en el sistema nervioso central. **Consideramos relevante que la expresión de estas señales tenga un valor de predicción de resiliencia porque muestra que el balance es neuroprotector a pesar de que incluye citoquinas consideradas “pro-inflamatorias”.** Por lo tanto, refuerza la idea de que es el contexto patológico en su conjunto, y no una señal individual, lo que determina un fenotipo dado de respuesta inflamatoria en la EA. Hay una aparente paradoja en estos resultados porque el perfil incluye citoquinas tradicionalmente consideradas proinflamatorias, pero lo que **resulta más interesante, es que muchas de las señales presentes son neurotróficas.** Recordemos que las citoquinas además de ser quimiotácticas y activadoras de la cascada efectora inflamatoria también tienen una función en la neurogénesis y el trofismo neuronal. **Una posibilidad es que el perfil propio de la resiliencia sea un coctel de señales neurotróficas y que la sinergia entre estas determine un fenotipo neuroprotector, independientemente de los roles variados que cada una de ellas pueda jugar de forma independiente en función de uno u otro contexto de salud o enfermedad.** Las citoquinas son biomarcadores potenciales, y aunque se han hecho algunos ensayos de detección en LCR y plasma, los resultados no son concluyentes. Dentro del grupo de citoquinas que forman parte del perfil de resiliencia identificado en este estudio, nos parece que

merece la pena destacar de forma especial la eotaxina, un candidato de interés particular ya que se encuentra elevada en ambas regiones y en ambos grupos de resiliencia (sujetos IP y HP). La eotaxina es una citoquina quimiotáctica cuyos niveles en plasma y LCR aumentan con el envejecimiento y se correlacionan con una disminución en la neurogénesis (Villeda et al., 2011). Pero, un estudio de GWAS reciente mostró que un haplotipo protector que contiene a la eotaxina retarda la edad de inicio en ~10 años en pacientes con EA familiar por mutaciones en el gen de *PSEN-1*. Por consiguiente, la eotaxina podría ser un nuevo candidato para modificar la edad de inicio de la EA y tendría una respuesta de hormesis en la que niveles bajos o moderados son protectores, pero niveles altos, en cambio, son deletéreos y causan neurodegeneración y deterioro cognitivo (Lalli et al., 2015). ***En este estudio postmortem piloto hemos identificado un perfil de citoquinas propio de la resiliencia con un valor predictivo ~ 80% que abre las vías para nuevas aproximaciones que validen su utilidad en el ámbito clínico de la EA.*** Sera ahora muy interesante su validación en muestras de cerebros humanos en una cohorte independiente, experimentos in vitro e in vivo para confirmar su potencial efecto neuroprotector, y por último, estudios de validación en LCR o plasma. ***Las observaciones derivadas del presente estudio apuntan a que la resiliencia tiene una respuesta inflamatoria propia que se caracteriza por la ausencia de activación glial y por la expresión única de múltiples citoquinas.***

Si tomamos en cuenta el conjunto de datos previos llegamos a la conclusión de que los niveles de oligómeros de tau hiperfosforilados sinápticos y el fenotipo de respuesta inflamatoria propia de la resiliencia son los dos marcadores con mejor valor predictivo de la cognición en este estudio. Esta observación es sin duda una de las aportaciones principales de esta tesis porque genera valiosas ideas para guiar el desarrollo de nuevos biomarcadores in vivo que permitan predecir con mayor fiabilidad sin un individuo que esta asintomático pero cuyo cerebro alberga placas de amiloide y ovillos neurofibrilares, desarrollará o no con el tiempo síntomas de demencia, y por tanto si es un candidato para someterse a una terapia preventiva secundaria. Esto es particularmente relevante ahora que somos capaces con la neuroimagen de amiloide y tau in vivo (PET-PIB,

PET-TAU) de detectar la patología de la EA incluso antes de que aparezcan los síntomas. **Los marcadores de resiliencia con mayor valor predictivo podrían validarse en estudios posteriores como biomarcadores**, y ser de particular utilidad en la fase preclínica de los ensayos clínicos de la EA en los que se busca una intervención temprana antes de que ocurra la neurodegeneración. En este mismo sentido los marcadores de resiliencia podrían tener utilidad en **la evaluación cuantitativa de intervenciones terapéuticas**. Por ejemplo, eventualmente la medida de niveles de estas citoquinas en LCR o plasma podrían reflejar una respuesta al tratamiento.

Por último, pensamos que la identificación de los marcadores de resiliencia puede contribuir **en el desarrollo de dianas para intervenciones terapéuticas o preventivas contra la EA**. En primer lugar proponemos una visión de la EA en la que se generen nuevas hipótesis alrededor del rol preponderante del amiloide. Por lo tanto se deberían considerar dianas terapéuticas que incluyan idealmente varios aspectos adicionales de la enfermedad. Esta tesis añade evidencia de que la GSK-3 β es una posible diana de interés en el tratamiento de la EA. Observamos que en la demencia de la EA existe una redistribución aberrante de GSK-3 β desde el compartimento citosólico al compartimento sináptico, que no ocurre en los sujetos resilientes, sugiriendo que la abundancia relativa de GSK-3 β en las sinapsis podría jugar un rol importante en el deterioro cognitivo y el daño neuronal y sináptico asociado a la EA. Además en estudios previos en modelos animales ya habíamos demostrado que la GSK-3 β contribuye a la producción de A β , aumenta la hiperfosforilación de tau, ocasiona pérdida neuronal, y se asocia con la neuroinflamación y el deterioro cognitivo (DaRocha-Souto, 2012). Más estudios, usando modelos *in vitro* e *in vivo* son necesarios ahora para revelar el mecanismo que subyace la interacción entre la GSK-3, las especies solubles de tau, el amiloide- β y las células gliales; pensamos que la evidencia hasta el momento apunta a esta kinasa como un buen candidato en el tratamiento de la EA. Por otra parte, hay cada vez más evidencia apoyando la aproximación terapéutica donde la reducción de los niveles de tau oligomérico fosforilado prevendrían la pérdida neuronal que contribuye de manera significativa al deterioro cognitivo en la EA. Un pre-requisito para el diseño de estas dianas

terapéuticas es testar de forma adecuada las especies sinaptotóxicas de tau soluble e identificarlas de forma precisa. Por último proponemos el diseño de terapias moduladoras de la inflamación que tomen en cuenta la complejidad de la respuesta glial por lo que necesitamos una mejor comprensión de este fenómeno en términos mecanísticos donde los estudio *in vitro* e *in vivo* serán particularmente útiles.

En definitiva, el estudio de la resiliencia a la enfermedad de Alzheimer y la identificación de sus marcadores postmortem representa un aporte en el conocimiento de esta enfermedad con previsiones de crecimiento epidémicas y que no tiene cura, más de 100 años después de su primera descripción por Alois Alzheimer.

Tabla 9. Citoquinas con valor predictivo de resiliencia		
Citoquina	Expresión celular	Función en el sistema nervioso central
IL-1 β	<p>Expresada principalmente por las células microgliales en respuesta a daño del SNC, directamente relacionada con la formación de placas de Aβ (Mrak and Griffin, 2001).</p> <p>Parte del bucle de retroalimentación positiva entre células microgliales, astrocitos y células epiteliales (Shaftel et al., 2008). Aumentada por APP (Del Bo et al., 1995).</p>	<p>Aumenta la proliferación de astrocitos y la secreción de MMPs, IL-1, IL-6, TNF y NGF (Simi et al., 2007). Aumenta la permeabilidad de las células endoteliales y MCP-1, y las selectinas E y P (Simi et al., 2007). Aumenta el APP, la proliferación de astrocitos y la expresión de S100B (Mrak and Griffin, 2001). Aumenta el APP en cultivos de tipo PC12 (Chang et al., 1999). Aumenta el TNF-α en cultivos de astrocitos de rata en conjunto con IFN-γ (Chung and Benveniste, 1990). Aumenta MCP-1 y MCP-3 mediada por IL-1b en cultivos de astrocitos de rata por las rutas NFκB y p38/JNK (Thompson and Van Eldik, 2009). Aumenta la expresión de bFGF en astrocitos de cerebro de rata mediada por IL-1β (Rivera et al., 1994).</p>
IL-1ra	<p>Expresada en astrocitos y células microgliales en respuesta a la norepinefrina (McNamee et al., 2010).</p>	<p>Receptor agonista de IL-1, anti-inflamatorio (Arend, 2002).</p>
IL-4	<p>Expresada por células microgliales de rata <i>in vivo</i> (Park et al., 2005). Receptor de la IL-4 expresado por astrocitos y neuronas (Brodie et al., 1998; Kiyota et al., 2010).</p>	<p>Reduce la activación de astrocitos y células microgliales, disminuye el depósito de Aβ y aumenta la neurogénesis en el modelo de ratón APP/PS1(Kiyota et al., 2010). Provee soporte trófico a precursores neuronales en cultivos de rata (Araujo and Cotman, 1993). Disminuye la IL-1β en el hipocampo de rata (Kiyota et al., 2010).</p>
IL-5	<p>Ligando expresado en astrocitos y células microgliales (Sawada et al., 1993).</p>	<p>Induce la proliferación de células microgliales de rata en cultivos (Liva and de Vellis, 2001). Promueve la diferenciación del progenitor Mk31 en neuronas (Mehler et al., 1993).</p>
IL-6	<p>Secretada por astrocitos y neuronas en respuesta a IL-1β, TNF-α y IFN-β (Ershler and</p>	<p>Aumenta la producción de APP en neuronas corticales de rata y promueve el crecimiento de neuritas (Del Bo et al., 1995). Aumenta la supervivencia de neuronas en cultivos de rata</p>

	<p>Keller, 2000; Gadiant and Otten, 1997; Sebire et al., 1993). Secretada por células microgliales en respuesta a patógenos y múltiples citoquinas (Gadiant and Otten, 1997). Aumentada en el LCR de pacientes con enfermedad de Alzheimer esporádica (Blum-Degen et al., 1995). Disminuida por el estrógeno y la testosterona, aumentada con la edad.</p>	<p>bajo estrés (Gadiant and Otten, 1997; Yamada and Hatanaka, 1994). Aumentada la diferenciación neuronal en cultivos PC12 en un proceso que implica la ruta STAT3 (Wu and Bradshaw, 1996). Disminuye la expresión de TNF-α en astrocitos de rata en cultivos (Benveniste et al., 1995).</p>
IL-7	<p>Expresada por astrocitos (Araujo and Cotman, 1993). Receptor IL-7R expresado por células progenitoras de neuronas humanas (Moors et al., 2010).</p>	<p>Apoptosis neuronal (Nunnari et al., 2005). Media la diferenciación de células progenitoras de neuronas humanas a astrocitos (Moors et al., 2010). Aporta soporte trófico a neuronas, y aumenta el número de astrocitos y células microgliales en cultivo (Araujo and Cotman, 1993).</p>
IL-8	<p>Expresada por astrocitos (Horuk et al., 1997). Expresada en cultivos de células microgliales humanas tratadas con IFN-β (D'Aversa et al., 2008).</p>	<p>Aporta soporte trófico en cultivos neuronales inmaduros (Araujo and Cotman, 1993; Horuk et al., 1997).</p>
IL-12 (p70) IL-12 (p40)	<p>IL-12p70 es un dímero que incorpora las sub-unidades IL-12p40 y IL-12p35. IL-12p70 es típicamente considerado como la forma biológicamente activa (Jana et al., 2009). IL-12 p40 es expresada por células microgliales¹²(Simi et</p>	<p>La IL-12p40 es aumentada por IFN-β y IL-12p70 en cultivos humanos de células microgliales (Taoufik et al., 2001). Induce la expresión de de óxido nítrico inducible sintetasa por las células microgliales(Jana et al., 2009) . Aumenta el óxido nítrico en cultivos neuronales murinos (Ireland and Reiss, 2004). Promueve el crecimiento de neuritas en neuronas ganglionares simpáticas de ratones (Lin et al., 2000a). El homodímero IL-12p40 induce la expresión de la IL-16 en ratones y en</p>

	<p>al., 2007; Taoufik et al., 2001).</p> <p>Ambas subunidades son expresadas por astrocitos en cultivos murinos tratados con LPS (Constantinescu et al., 2005). La IL-12p40 es también expresada por astrocitos en cerebros de ratón tratados con LPS (Stalder et al., 1997). aunque la IL12p40 no se expresa en un modelo murino de Alzheimer (Vom Berg et al., 2012). Las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ de la IL-12 son expresadas por las células microgliales (Taoufik et al., 2001). El receptor de la IL-12 funcional se expresa en cultivos neuronales murinos (Ireland and Reiss, 2004).</p>	<p>cultivos humanos de células microgliales (Jana and Pahan, 2009).</p>
IL-15	<p>Expresada por astrocitos y células microgliales en cultivos fetales humanos (Lee et al., 1996). El receptor IL-15Rα es expresado por células microgliales (Hanisch et al., 1997), de ratón, y por células madre neurales y neuronas (Huang et al., 2009).</p>	<p>Aumenta su expresión por astrocitos fetales humanos en cultivos en respuesta a IL-1β, IFN-γ, TNF-α, y en cultivos de células microgliales fetales humanas tratadas con INF-γ o LPS (Lee et al., 1996). Aumenta la ruta JAK1 en el cerebro del ratón (Hanisch et al., 1997). Ratonés “knockout” de IL-15 presentan déficit de memoria (He et al., 2010). Reduce los niveles de MAP-2 y el crecimiento de neuritas, y aumenta la fosforilación de STAT3 en cultivos neuronales de rata (Huang et al., 2009).</p>
IL-17	<p>Expresada por células microgliales en respuesta a IL-1 y IL-2</p>	<p>Funciona sinérgicamente con IL-6 para inducir la expresión de IL-6 en cultivos de astrocitos primarios, e induce las rutas de activación de</p>

	(Kawanokuchi et al., 2008). El receptor IL-17R es expresado por células microgliales y astrocitos de ratón (Kawanokuchi et al., 2008)	NFκ-β, JNK, y (Ma et al., 2010) Aumenta la producción de IL-6 en las células microgliales de rata (Kawanokuchi et al., 2008).
Eotaxin	Expresada por células microgliales murinas de cultivo tratadas con “pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide”(Wainwright et al., 2008). Los receptores CCR2, CCR3, CCR5 se expresan en astrocitos humanos (Dorf et al., 2000).	Aumenta la migración de astrocitos de ratón cultivados (Dorf et al., 2000).
GM-CSF	El ligando es expresado en neuronas de rata y oligo-dendrocitas mientras que el receptor, GM-CSFR, es expresado solamente en neuronas de rata (Schabitz et al., 2008).	Efecto anti-apoptótico en cultivos de neuronas de rata vía la ruta de PI3K-Akt (Schabitz et al., 2008).
MCP-1	Expresada por astrocitos de rata y oligodendrocitos expuestos a Aβ (Johnstone et al., 1999), y por astrocitos fetales humanos y células microgliales tratadas con LPS (Peterson et al., 1997).	Quimiotáctico de células microgliales de rata y humanas en cultivo (Cho et al., 2013; Johnstone et al., 1999; Peterson et al., 1997).
MIP-1α	Expresado por astrocitos fetales humanos y células microgliales tratadas con LPS (Peterson et al., 1997).	Quimiotáctico para células microgliales fetales de humanos en cultivo (Peterson et al., 1997).

MIP-1 β	Expresada por astrocitos humanos fetales y células microgliales tratada con LPS (Peterson et al., 1997).	Quimiotáctico para células microgliales fetales de humanos en cultivo (Peterson et al., 1997).
TNF- α	Expresada por astrocitos primarios de rata en cultivo (Benveniste et al., 1995), células microgliales embrionarias humanas en cultivo (Sebire et al., 1993), y neuronas en modelo murino 3xTg-AD (Janelsins et al., 2008).	Aumenta la expresión de IL-10 en cultivos de células microgliales fetales humanas (Hotta et al., 1999). La administración local de TNF- α aumenta los niveles de A β , la hiperfosforilación de tau y la activación células microgliales en ratones 3xTg-AD (Janelsins et al., 2008). Aumenta MCP-3 en astrocitos de macaco en cultivos (Renner et al., 2011) Aumenta MCP-3 en astrocitos de macaco en cultivos.86 Aumenta MCP-1 y MCP-3 en astrocitos de rata en cultivos vía NF κ B y p38/JNK (Thompson and Van Eldik, 2009).

6. Limitaciones del estudio

1. No sabemos con certeza absoluta si los sujetos resilientes hubiesen podido desarrollar síntomas de enfermedad de haber vivido más años, esta limitación es inherente a la naturaleza de un estudio *postmortem*.
2. La valoración neurológica y neuropsicológica detallada en los dos años previos al fallecimiento sólo estaba disponible en 1/3 de los sujetos de esta cohorte, y por consiguiente no podemos descartar categóricamente que alguno de ellos presentase deterioro cognitivo, al menos leve.
3. La hipótesis de “la reserva cerebral” sólo se puede descartar parcialmente utilizando medidas neuropatológicas indirectas de resistencia neuronal, pero no es posible saber de forma definitiva si los sujetos resilientes partían de un número de base de neuronas mayor en este tipo de estudio.
4. No había medidas de nivel educativo en esta cohorte lo cual limitó el estudio de la hipótesis de la “reserva cognitiva” como posible factor protector frente a la patología de la EA.
5. Debido al carácter inherente de los estudios neuropatológicos no es posible describir mecanismos causales, este aspecto resultaría particularmente interesante en lo que se refiere a la respuesta inflamatoria.
6. El tamaño de la muestra no es suficiente para hacer modelos predictivos del valor diagnóstico de los marcadores de resiliencia en la población general.

7. Perspectivas

1. Estudio de una cohorte con un mayor número de sujetos con datos de neuropsicología disponibles, en primer lugar, para afinar la clasificación en los distintos grupos y, en segundo lugar, para estratificar según el grado de deterioro cognitivo, lo que permitirá hacer una correlación clínico-patológica más precisa, y estudiar un subgrupo de sujetos con abundante patología de EA y deterioro cognitivo leve.
2. Estudio de “reserva cognitiva” en un subgrupo de casos con medidas de educación disponibles para establecer la contribución de esta variable a la resiliencia.
3. Caracterización neuropatológica y bioquímica detallada de una serie de casos que incluya sujetos PET-PIB positivos asintomáticos —fase preclínica de la EA— y PET-PIB positivos con síntomas de deterioro cognitivo, donde anticipamos que algunos de estos casos podrían ser resilientes.
4. Prueba de la hipótesis de la propagación de tau con la caracterización de áreas anatómicas próximas a la corteza entorrinal como el hipocampo.
5. Estudio genético de los sujetos de esta cohorte para examinar la expresión de los genes asociados a EA, según los GWAS, y determinar haplotipos adicionales que confieran protección contra la EA y que proporcionen evidencia sobre el mecanismo biológico de la resiliencia.
6. Identificación precisa de las especies sinaptotóxicas de tau soluble utilizando técnicas como la cromatografía por exclusión de talla.
7. Identificación de las células que secretan las citoquinas únicas de la resiliencia, y experimentos in vitro e in vivo, en modelos animales, que prueben su efecto neuroprotector. Identificación de nuevas citoquinas relevantes con la aplicación de métodos de biología de sistemas a través del estudio de interactomas.
8. Aumento del tamaño muestral y validación del perfil de citoquinas para predecir la presencia o ausencia de síntomas clínicos de EA en un estudio postmortem en una cohorte independiente con el fin de generalizar los resultados. Detección de este grupo único de citoquinas en el LCR y plasma para ser validados como nuevos biomarcadores.

8. Conclusiones

1. Algunos individuos son capaces de tolerar el depósito de A β y la formación de ovillos neurofibrilares en sus cerebros sin presentar daño estructural y cognitivo. Este fenómeno, aunque infrecuente, demuestra que en algunos casos el cerebro humano es resiliente a la patología de la EA.

2. La caracterización neuropatológica y bioquímica detallada de un grupo de cerebros resilientes en este estudio ha permitido identificar los siguientes rasgos fenotípicos característicos de la resiliencia a la patología de la EA: preservación del número de neuronas y de la morfología axonal, menor carga de placas densas y oligoméricas de A β , menor acúmulo de especies solubles de tau hiperfosforilado en la sinapsis, y menor número de astrocitos reactivos y de células microgliales activadas que secretan un perfil diferenciado de citoquinas que podría ser neuroprotector.

3. Los niveles de oligómeros sinápticos de tau hiperfosforilada y el fenotipo de la respuesta glial, incluyendo un perfil diferenciado de secreción de citoquinas, son los marcadores que predicen con una mayor fiabilidad la presencia o ausencia de síntomas clínicos de enfermedad y la pérdida de poblaciones neuronales vulnerables a la EA en este estudio.

4. La identificación de rasgos fenotipos de resiliencia del cerebro humano a la patología EA puede, por un lado, contribuir a guiar el desarrollo de nuevos biomarcadores que permitan predecir si un individuo asintomático cuyo cerebro alberga placas de A β y ovillos neurofibrilares, desarrollará o no con el tiempo síntomas de demencia, y por otro lado, ayudar a identificar nuevas dianas terapéuticas destinadas al desarrollo de terapias neuroprotectoras.

9. Referencias bibliográficas

- Aizenstein, H.J., et al., 2008. Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly. *Arch Neurol.* 65, 1509-17.
- Alzheimer, A., et al., 1995. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin Anat.* 8, 429-31.
- Amaral, D.G., Ishizuka, N., Claiborne, B., 1990. Neurons, numbers and the hippocampal network. *Prog Brain Res.* 83, 1-11.
- Andrade-Moraes, C.H., et al., 2013. Cell number changes in Alzheimer's disease relate to dementia, not to plaques and tangles. *Brain.* 136, 3738-52.
- Araujo, D.M., Cotman, C.W., 1993. Trophic effects of interleukin-4, -7 and -8 on hippocampal neuronal cultures: potential involvement of glial-derived factors. *Brain Res.* 600, 49-55.
- Arend, W.P., 2002. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13, 323-40.
- Arnold, S.E., et al., 2013. Cellular, synaptic, and biochemical features of resilient cognition in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 34, 157-68.
- Arriagada, P.V., et al., 1992. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology.* 42, 631-9.
- Beach, T.G., Walker, R., McGeer, E.G., 1989. Patterns of gliosis in Alzheimer's disease and aging cerebrum. *Glia.* 2, 420-36.
- Benilova, I., Karran, E., De Strooper, B., 2012. The toxic Abeta oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat Neurosci.* 15, 349-57.
- Bennett, D.A., et al., 2002. Natural history of mild cognitive impairment in older persons. *Neurology.* 59, 198-205.
- Bennett, D.A., et al., 2006. Neuropathology of older persons without cognitive impairment from two community-based studies. *Neurology.* 66, 1837-44.
- Benveniste, E.N., Tang, L.P., Law, R.M., 1995. Differential regulation of astrocyte TNF-alpha expression by the cytokines TGF-beta, IL-6 and IL-10. *Int J Dev Neurosci.* 13, 341-9.
- Bertram, L., Lill, C.M., Tanzi, R.E., The genetics of Alzheimer disease: back to the future. *Neuron.* 68, 270-81.
- Bertram, L., et al., 2007. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat Genet.* 39, 17-23.
- Bierer, L.M., et al., 1995. Neocortical neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in Alzheimer's disease. *Arch Neurol.* 52, 81-8.
- Blessed, G., Tomlinson, B.E., Roth, M., 1968. The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Br J Psychiatry.* 114, 797-811.
- Blum-Degen, D., et al., 1995. Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett.* 202, 17-20.
- Braak, H., Braak, E., 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82, 239-59.
- Bradshaw, E.M., et al., 2013. CD33 Alzheimer's disease locus: altered monocyte function and amyloid biology. *Nat Neurosci.* 16, 848-50.
- Brodie, C., et al., 1998. Functional IL-4 receptors on mouse astrocytes: IL-4 inhibits astrocyte activation and induces NGF secretion. *J Neuroimmunol.* 81, 20-30.
- Bussiere, T., et al., 2003. Stereologic analysis of neurofibrillary tangle formation in prefrontal cortex area 9 in aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 117, 577-92.

- Coma, M., et al., 2010. Triflusal reduces dense-core plaque load, associated axonal alterations and inflammatory changes, and rescues cognition in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 38, 482-91.
- Constantinescu, C.S., et al., 2005. Astrocytes as antigen-presenting cells: expression of IL-12/IL-23. *J Neurochem.* 95, 331-40.
- Crystal, H., et al., 1988. Clinico-pathologic studies in dementia: nondemented subjects with pathologically confirmed Alzheimer's disease. *Neurology.* 38, 1682-7.
- Chang, K.A., et al., 1999. Inhibition of the NGF and IL-1beta-induced expression of Alzheimer's amyloid precursor protein by antisense oligonucleotides. *J Mol Neurosci.* 12, 69-74.
- Cho, H., et al., 2013. Microfluidic Chemotaxis Platform for Differentiating the Roles of Soluble and Bound Amyloid-beta on Microglial Accumulation. *Sci. Rep.* 3, 1823.
- Chung, I.Y., Benveniste, E.N., 1990. Tumor necrosis factor-alpha production by astrocytes. Induction by lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IL-1 beta. *J Immunol.* 144, 2999-3007.
- D'Aversa, T.G., Eugenin, E.A., Berman, J.W., 2008. CD40-CD40 ligand interactions in human microglia induce CXCL8 (interleukin-8) secretion by a mechanism dependent on activation of ERK1/2 and nuclear translocation of nuclear factor-kappaB (NFkappaB) and activator protein-1 (AP-1). *J Neurosci Res.* 86, 630-9.
- DaRocha-Souto, B., et al., Activation of glycogen synthase kinase-3 beta mediates beta-amyloid induced neuritic damage in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 45, 425-37.
- DaRocha-Souto, B., et al., 2011. Brain oligomeric beta-amyloid but not total amyloid plaque burden correlates with neuronal loss and astrocyte inflammatory response in amyloid precursor protein/tau transgenic mice. *J Neuropathol Exp Neurol.* 70, 360-76.
- DaRocha-Souto, B., et al., 2012. Activation of glycogen synthase kinase-3 beta mediates beta-amyloid induced neuritic damage in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 45, 425-37.
- de Calignon, A., et al., 2009. Tangle-bearing neurons survive despite disruption of membrane integrity in a mouse model of tauopathy. *J Neuropathol Exp Neurol.* 68, 757-61.
- de Calignon, A., et al., 2012. Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease. *Neuron.* 73, 685-97.
- De Strooper, B., et al., 1998. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature.* 391, 387-90.
- DeKosky, S.T., Scheff, S.W., 1990. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol.* 27, 457-64.
- DeKosky, S.T., Scheff, S.W., Styren, S.D., 1996. Structural correlates of cognition in dementia: quantification and assessment of synapse change. *Neurodegeneration.* 5, 417-21.
- Del Bo, R., et al., 1995. Reciprocal control of inflammatory cytokines, IL-1 and IL-6, and beta-amyloid production in cultures. *Neurosci Lett.* 188, 70-4.
- Delaby, C., et al., 2015. Central Nervous System and Peripheral Inflammatory Processes in Alzheimer's Disease: Biomarker Profiling Approach. *Front Neurol.* 6, 181.
- Dickson, D.W., et al., 1992. Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. *Neurobiol Aging.* 13, 179-89.
- Dorf, M.E., et al., 2000. Astrocytes express functional chemokine receptors. *J Neuroimmunol.* 111, 109-21.
- Embi, N., Rylatt, D.B., Cohen, P., 1980. Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem.* 107, 519-27.
- Ershler, W.B., Keller, E.T., 2000. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. *Annu Rev Med.* 51, 245-70.

- Ewbank, D.C., Arnold, S.E., 2009. Cool with plaques and tangles. *N Engl J Med.* 360, 2357-9.
- Farrer, L.A., et al., 1997. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA.* 278, 1349-56.
- Ferri, C.P., et al., 2005. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet.* 366, 2112-7.
- Forde, J.E., Dale, T.C., 2007. Glycogen synthase kinase 3: a key regulator of cellular fate. *Cell Mol Life Sci.* 64, 1930-44.
- Gadient, R.A., Otten, U.H., 1997. Interleukin-6 (IL-6)--a molecule with both beneficial and destructive potentials. *Prog Neurobiol.* 52, 379-90.
- Galea, E., et al., 2015. Topological analyses in APP/PS1 mice reveal that astrocytes do not migrate to amyloid-beta plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112, 15556-61.
- Giannakopoulos, P., et al., 2003. Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology.* 60, 1495-500.
- Glenner, G.G., Wong, C.W., 1984. Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 122, 1131-5.
- Glenner, G.G., 1988. Alzheimer's disease: its proteins and genes. *Cell.* 52, 307-8.
- Goate, A., et al., 1991. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature.* 349, 704-6.
- Gomez-Isla, T., et al., 1996. Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 16, 4491-500.
- Gomez-Isla, T., et al., 1997. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 41, 17-24.
- Hanisch, U.K., et al., 1997. Mouse brain microglia express interleukin-15 and its multimeric receptor complex functionally coupled to Janus kinase activity. *J Biol Chem.* 272, 28853-60.
- Harold, D., et al., 2009. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 41, 1088-93.
- Haroutunian, V., et al., 2008. Role of the neuropathology of Alzheimer disease in dementia in the oldest-old. *Arch Neurol.* 65, 1211-7.
- He, Y., et al., 2010. Interleukin-15 receptor is essential to facilitate GABA transmission and hippocampal-dependent memory. *J Neurosci.* 30, 4725-34.
- Heppner, F.L., Ransohoff, R.M., Becher, B., 2015. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci.* 16, 358-72.
- Hof, P.R., et al., 2003. Stereologic evidence for persistence of viable neurons in layer II of the entorhinal cortex and the CA1 field in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 62, 55-67.
- Hollingworth, P., et al., Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 43, 429-35.
- Horuk, R., et al., 1997. Expression of chemokine receptors by subsets of neurons in the central nervous system. *J Immunol.* 158, 2882-90.
- Hotta, K., Emala, C.W., Hirshman, C.A., 1999. TNF-alpha upregulates Galpha and Gqalpha protein expression and function in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 276, L405-11.
- Huang, Y.S., et al., 2009. Effects of interleukin-15 on neuronal differentiation of neural stem cells. *Brain Res.* 1304, 38-48.
- Hudry, E., et al., Gene transfer of human Apoe isoforms results in differential modulation of amyloid deposition and neurotoxicity in mouse brain. *Sci Transl Med.* 5, 212ra161.
- Hughes, K., et al., 1993. Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* 12, 803-8.

- Hussain, I., et al., 1999. Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci.* 14, 419-27.
- Hyman, B.T., Marzloff, K., Arriagada, P.V., 1993. The lack of accumulation of senile plaques or amyloid burden in Alzheimer's disease suggests a dynamic balance between amyloid deposition and resolution. *J Neuropathol Exp Neurol.* 52, 594-600.
- Hyman, B.T., 1998. Neuronal loss in Alzheimer's disease. *Aging (Milano).* 10, 156.
- Iacono, D., et al., 2008. Neuronal hypertrophy in asymptomatic Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 67, 578-89.
- Iacono, D., et al., 2009. The Nun study: clinically silent AD, neuronal hypertrophy, and linguistic skills in early life. *Neurology.* 73, 665-73.
- Ikonomic, M.D., et al., 2008. Post-mortem correlates of in vivo PiB-PET amyloid imaging in a typical case of Alzheimer's disease. *Brain.* 131, 1630-45.
- Ingelsson, M., et al., 2004. Early A β accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology.* 62, 925-31.
- Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., 2002. Neurofibrillary pathology leads to synaptic loss and not the other way around in Alzheimer disease. *J Alzheimers Dis.* 4, 235-8.
- Ireland, D.D., Reiss, C.S., 2004. Expression of IL-12 receptor by neurons. *Viral Immunol.* 17, 411-22.
- Itagaki, S., et al., 1989. Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. *J Neuroimmunol.* 24, 173-82.
- Jack, C.R., Jr., et al., 2010. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol.* 9, 119-28.
- Jana, M., et al., 2009. IL-12 p40 homodimer, the so-called biologically inactive molecule, induces nitric oxide synthase in microglia via IL-12R beta 1. *Glia.* 57, 1553-65.
- Jana, M., Pahan, K., 2009. IL-12 p40 homodimer, but not IL-12 p70, induces the expression of IL-16 in microglia and macrophages. *Mol Immunol.* 46, 773-83.
- Janelins, M.C., et al., 2008. Chronic neuron-specific tumor necrosis factor- α expression enhances the local inflammatory environment ultimately leading to neuronal death in 3xTg-AD mice. *Am J Pathol.* 173, 1768-82.
- Johnson, K.A., et al., 2016. Tau positron emission tomographic imaging in aging and early Alzheimer disease. *Ann Neurol.* 79, 110-9.
- Johnstone, M., Gearing, A.J., Miller, K.M., 1999. A central role for astrocytes in the inflammatory response to beta-amyloid; chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced. *J Neuroimmunol.* 93, 182-93.
- Jonsson, T., et al., 2013. Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 368, 107-16.
- Katzman, R., et al., 1988. Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques. *Ann Neurol.* 23, 138-44.
- Kawanokuchi, J., et al., 2008. Production and functions of IL-17 in microglia. *J Neuroimmunol.* 194, 54-61.
- Kawas, C.H., 2008. The oldest old and the 90+ Study. *Alzheimers Dement.* 4, S56-9.
- Kiyota, T., et al., 2010. CNS expression of anti-inflammatory cytokine interleukin-4 attenuates Alzheimer's disease-like pathogenesis in APP+PS1 bigenic mice. *Faseb J.* 24, 3093-102.
- Klunk, W.E., et al., 2004. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol.* 55, 306-19.
- Kosik, K.S., 1992. Alzheimer's disease: a cell biological perspective. *Science.* 256, 780-3.
- Lalli, M.A., et al., 2015. Whole-genome sequencing suggests a chemokine gene cluster that modifies age at onset in familial Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry.* 20, 1294-300.
- Lee, E.B., et al., 2006. Targeting amyloid-beta peptide (A β) oligomers by passive immunization with a conformation-selective monoclonal antibody improves

- learning and memory in Abeta precursor protein (APP) transgenic mice. *J Biol Chem.* 281, 4292-9.
- Lee, Y.B., et al., 1996. Interleukin-15 gene expression in human astrocytes and microglia in culture. *Neuroreport.* 7, 1062-6.
- Levy-Lahad, E., et al., 1995. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science.* 269, 973-7.
- Lin, H., et al., 2000a. Interleukin-12 promotes neurite outgrowth in mouse sympathetic superior cervical ganglion neurons. *Neurosci Lett.* 278, 129-32.
- Lin, X., et al., 2000b. Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 1456-60.
- Liva, S.M., de Vellis, J., 2001. IL-5 induces proliferation and activation of microglia via an unknown receptor. *Neurochem Res.* 26, 629-37.
- Lockhart, A., et al., 2007. PIB is a non-specific imaging marker of amyloid-beta (Abeta) peptide-related cerebral amyloidosis. *Brain.* 130, 2607-15.
- Lopresti, B.J., et al., 2005. Simplified quantification of Pittsburgh Compound B amyloid imaging PET studies: a comparative analysis. *J Nucl Med.* 46, 1959-72.
- Ma, X., et al., 2010. IL-17 enhancement of the IL-6 signaling cascade in astrocytes. *J Immunol.* 184, 4898-906.
- Marquie, M., et al., 2015. Validating novel tau positron emission tomography tracer [F-18]-AV-1451 (T807) on postmortem brain tissue. *Ann Neurol.* 78, 787-800.
- Masliah, E., et al., 1994a. Topographical distribution of synaptic-associated proteins in the neuritic plaques of Alzheimer's disease hippocampus. *Acta Neuropathol.* 87, 135-42.
- Masliah, E., et al., 1994b. Synaptic and neuritic alterations during the progression of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 174, 67-72.
- Maurer, K., Volk, S., Gerbaldo, H., 1997. Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet.* 349, 1546-9.
- McKhann, G.M., et al., 2011. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 7, 263-9.
- McNamee, E.N., et al., 2010. Noradrenaline induces IL-1ra and IL-1 type II receptor expression in primary glial cells and protects against IL-1beta-induced neurotoxicity. *Eur J Pharmacol.* 626, 219-28.
- Mehler, M.F., et al., 1993. Cytokine regulation of neuronal differentiation of hippocampal progenitor cells. *Nature.* 362, 62-5.
- Merino-Serrais, P., et al., 2013. The influence of phospho-tau on dendritic spines of cortical pyramidal neurons in patients with Alzheimer's disease. *Brain.* 136, 1913-28.
- Mintun, M.A., et al., 2006. [11C]PIB in a nondemented population: potential antecedent marker of Alzheimer disease. *Neurology.* 67, 446-52.
- Mirra, S.S., et al., 1991. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology.* 41, 479-86.
- Mirra, S.S., Gearing, M., Nash, F., 1997. Neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology.* 49, S14-6.
- Montine, T.J., et al., 2012. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease: a practical approach. *Acta Neuropathol.* 123, 1-11.
- Moors, M., et al., 2010. Interleukin-7 (IL-7) and IL-7 splice variants affect differentiation of human neural progenitor cells. *Genes Immun.* 11, 11-20.
- Mrak, R.E., Griffin, W.S., 2001. Interleukin-1, neuroinflammation, and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 22, 903-8.

- Mukai, F., et al., 2002. Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta. *J Neurochem.* 81, 1073-83.
- Nickerson, D.A., et al., 2000. Sequence diversity and large-scale typing of SNPs in the human apolipoprotein E gene. *Genome Res.* 10, 1532-45.
- Nunnari, G., et al., 2005. Exogenous IL-7 induces Fas-mediated human neuronal apoptosis: potential effects during human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Neurovirol.* 11, 319-28.
- O'Brien, C., 1996. Auguste D. and Alzheimer's disease. *Science.* 273, 28.
- O'Brien, R.J., et al., 2009. Neuropathologic studies of the Baltimore Longitudinal Study of Aging (BLSA). *J Alzheimers Dis.* 18, 665-75.
- Olabarria, M., et al., 2010. Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *Glia.* 58, 831-8.
- Park, K.W., et al., 2005. Neuroprotective role of microglia expressing interleukin-4. *J Neurosci Res.* 81, 397-402.
- Perez-Nievas B, S.T., Tai HC, Dols-Icardo O, Scotton TC, Fernandez-Carballo L, Lopez de Munain E, Barroeta I, Perez J, Marquie M, Serrano-Pozo A, Frosch MP, Lowe V, Parisi JE, Petersen RC, Ikonomovic MD, López O, Klunk W, Hyman BT, Gómez-Isla T., 2013. Dissecting Phenotypic Traits Linked to Human Resilience to Alzheimer's Pathology. *Brain.*
- Peterson, P.K., et al., 1997. Differential production of and migratory response to beta chemokines by human microglia and astrocytes. *J Infect Dis.* 175, 478-81.
- Pike, C.J., et al., 1995. Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *J Neurochem.* 64, 253-65.
- Plyte, S.E., et al., 1992. Glycogen synthase kinase-3: functions in oncogenesis and development. *Biochim Biophys Acta.* 1114, 147-62.
- Pooler, A.M., Noble, W., Hanger, D.P., 2014. A role for tau at the synapse in Alzheimer's disease pathogenesis. *Neuropharmacology.* 76 Pt A, 1-8.
- Prince, M., et al., The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement.* 9, 63-75 e2.
- Renner, N.A., et al., 2011. MCP-3/CCL7 production by astrocytes: implications for SIV neuroinvasion and AIDS encephalitis. *J Neurovirol.* 17, 146-52.
- Riley, K.P., et al., 2005. Early life linguistic ability, late life cognitive function, and neuropathology: findings from the Nun Study. *Neurobiol Aging.* 26, 341-7.
- Rivera, S., Gold, S.J., Gall, C.M., 1994. Interleukin-1 beta increases basic fibroblast growth factor mRNA expression in adult rat brain and organotypic hippocampal cultures. *Brain Res Mol Brain Res.* 27, 12-26.
- Rogaev, E.I., et al., 1995. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature.* 376, 775-8.
- Saunders, A.M., et al., 1993. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology.* 43, 1467-72.
- Savva, G.M., et al., 2009. Age, neuropathology, and dementia. *N Engl J Med.* 360, 2302-9.
- Sawada, M., et al., 1993. Production of interleukin-5 by mouse astrocytes and microglia in culture. *Neurosci Lett.* 155, 175-8.
- Schabitz, W.R., et al., 2008. A neuroprotective function for the hematopoietic protein granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF). *J Cereb Blood Flow Metab.* 28, 29-43.
- Scheff, S.W., et al., 2006. Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging.* 27, 1372-84.
- Schneider, J.A., et al., 2009. The neuropathology of older persons with and without dementia from community versus clinic cohorts. *J Alzheimers Dis.* 18, 691-701.

- Sebire, G., et al., 1993. In vitro production of IL-6, IL-1 beta, and tumor necrosis factor-alpha by human embryonic microglial and neural cells. *J Immunol.* 150, 1517-23.
- Selkoe, D.J., 2001. Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *J Alzheimers Dis.* 3, 75-80.
- Sereno, L., et al., 2009. A novel GSK-3beta inhibitor reduces Alzheimer's pathology and rescues neuronal loss in vivo. *Neurobiol Dis.* 35, 359-67.
- Serrano-Pozo, A., et al., 2010. Beneficial effect of human anti-amyloid-beta active immunization on neurite morphology and tau pathology. *Brain.* 133, 1312-27.
- Serrano-Pozo, A., et al., 2011. Reactive glia not only associates with plaques but also parallels tangles in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 179, 1373-84.
- Serrano-Pozo, A., et al., 2012. Stable size distribution of amyloid plaques over the course of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 71, 694-701.
- Serrano-Pozo, A., et al., 2013. Examination of the clinicopathologic continuum of Alzheimer disease in the autopsy cohort of the National Alzheimer Coordinating Center. *J Neuropathol Exp Neurol.* 72, 1182-92.
- Shaftel, S.S., Griffin, W.S., O'Banion, M.K., 2008. The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective. *J. Neuroinflammation.* 5, 7.
- Simi, A., et al., 2007. Interleukin-1 and inflammatory neurodegeneration. *Biochem Soc Trans.* 35, 1122-6.
- Sinha, S., et al., 1999. Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature.* 402, 537-40.
- Snowdon, D.A., et al., 1996. Linguistic ability in early life and cognitive function and Alzheimer's disease in late life. Findings from the Nun Study. *JAMA.* 275, 528-32.
- Spires-Jones, T.L., et al., 2008. In vivo imaging reveals dissociation between caspase activation and acute neuronal death in tangle-bearing neurons. *J Neurosci.* 28, 862-7.
- Spires-Jones, T.L., et al., 2009. Passive immunotherapy rapidly increases structural plasticity in a mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol Dis.* 33, 213-20.
- Spires, T.L., et al., 2005. Dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy. *J Neurosci.* 25, 7278-87.
- Stalder, A.K., et al., 1997. Lipopolysaccharide-induced IL-12 expression in the central nervous system and cultured astrocytes and microglia. *Journal of Immunology.* 159, 1344-51.
- Strittmatter, W.J., et al., 1993. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90, 1977-81.
- Tai, H.C., et al., 2012. The synaptic accumulation of hyperphosphorylated tau oligomers in Alzheimer disease is associated with dysfunction of the ubiquitin-proteasome system. *Am J Pathol.* 181, 1426-35.
- Taoufik, Y., et al., 2001. Human microglial cells express a functional IL-12 receptor and produce IL-12 following IL-12 stimulation. *Eur J Immunol.* 31, 3228-39.
- Terry, R.D., et al., 1991. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol.* 30, 572-80.
- Thal, D.R., et al., 2002. Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology.* 58, 1791-800.
- Thompson, W.L., Van Eldik, L.J., 2009. Inflammatory cytokines stimulate the chemokines CCL2/MCP-1 and CCL7/MCP-3 through NFkB and MAPK dependent pathways in rat astrocytes [corrected]. *Brain Res.* 1287, 47-57.
- Tomlinson, B.E., Blessed, G., Roth, M., 1968. Observations on the brains of non-demented old people. *J Neurol Sci.* 7, 331-56.

- Troncoso, J.C., et al., 1996. Neuropathology in controls and demented subjects from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Neurobiol Aging*. 17, 365-71.
- Tyas, S.L., et al., 2007. Healthy ageing in the Nun Study: definition and neuropathologic correlates. *Age Ageing*. 36, 650-5.
- Vassar, R., et al., 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*. 286, 735-41.
- Vehmas, A.K., et al., 2003. Immune reactive cells in senile plaques and cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 24, 321-31.
- Verbeek, M.M., et al., 1995. A lysosomal marker for activated microglial cells involved in Alzheimer classic senile plaques. *Acta Neuropathol*. 90, 493-503.
- Villeda, S.A., et al., 2011. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature*. 477, 90-4.
- Vom Berg, J., et al., 2012. Inhibition of IL-12/IL-23 signaling reduces Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline. *Nat Med*. 18, 1812-9.
- Wainwright, D.A., et al., 2008. Differential actions of pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide and interferon gamma on Th2- and Th1-associated chemokine expression in cultured murine microglia. *J. Neurodegen. Regen*. 1, 31-34.
- Weibel, E.R., 1979. Morphometry of the human lung: the state of the art after two decades. *Bull Eur Physiopathol Respir*. 15, 999-1013.
- West, M.J., Gundersen, H.J., 1990. Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J Comp Neurol*. 296, 1-22.
- White, L.R., et al., 2016. Neuropathologic comorbidity and cognitive impairment in the Nun and Honolulu-Asia Aging Studies. *Neurology*.
- Wisniewski, K.E., et al., 1985. Alzheimer's disease in Down's syndrome: clinicopathologic studies. *Neurology*. 35, 957-61.
- Wolfe, M.S., et al., 1999. Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature*. 398, 513-7.
- Wood, L.B., et al., 2015. Identification of neurotoxic cytokines by profiling Alzheimer's disease tissues and neuron culture viability screening. *Sci Rep*. 5, 16622.
- Woodgett, J.R., 1990. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J*. 9, 2431-8.
- Wu, Y.Y., Bradshaw, R.A., 1996. Synergistic induction of neurite outgrowth by nerve growth factor or epidermal growth factor and interleukin-6 in PC12 cells. *J Biol Chem*. 271, 13033-9.
- Xue, J., et al., 2014. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity*. 40, 274-88.
- Yamada, M., Hatanaka, H., 1994. Interleukin-6 protects cultured rat hippocampal neurons against glutamate-induced cell death. *Brain Res*. 643, 173-80.
- Yan, R., et al., 1999. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature*. 402, 533-7.
- Yoshiyama, Y., et al., 2007. Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron*. 53, 337-51.
- Zempel, H., et al., 2013. Amyloid-beta oligomers induce synaptic damage via Tau-dependent microtubule severing by TLL6 and spastin. *EMBO J*. 32, 2920-37.

10. Anexos

10.1. Anexo 1

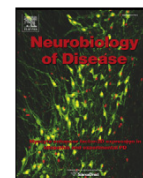
Neurobiology of Disease 45 (2012) 425–437



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Neurobiology of Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ynbdi



Activation of glycogen synthase kinase-3 beta mediates β -amyloid induced neuritic damage in Alzheimer's disease ☆☆☆★

B. DaRocha-Souto^a, M. Coma^a, B.G. Pérez-Nievas^a, T.C. Scotton^a, M. Siao^a, P. Sánchez-Ferrer^a, T. Hashimoto^a, Z. Fan^a, E. Hudry^a, I. Barroeta^b, L. Serenó^b, M. Rodríguez^b, M.B. Sánchez^b, B.T. Hyman^a, T. Gómez-Isla^{a,b,*}

^a Neurology Department, Massachusetts General Hospital, Harvard University, Boston, MA, USA

^b Neurology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 May 2011

Revised 15 August 2011

Accepted 2 September 2011

Available online 13 September 2011

ABSTRACT

β -Amyloid ($A\beta$) plaques in Alzheimer (AD) brains are surrounded by severe dendritic and axonal changes, including local spine loss, axonal swellings and distorted neurite trajectories. Whether and how plaques induce these neuropil abnormalities remains unknown. We tested the hypothesis that oligomeric assemblies of $A\beta$, seen in the periphery of plaques, mediate the neurodegenerative phenotype of AD by triggering activation of the enzyme GSK-3 β , which in turn appears to inhibit a transcriptional program mediated by CREB. We detect increased activity of GSK-3 β after exposure to oligomeric $A\beta$ in neurons in culture, in the brain of double transgenic APP/tau mice and in AD brains. Activation of GSK-3 β , even in the absence of $A\beta$, is sufficient to produce a phenocopy of $A\beta$ -induced dendritic spine loss in neurons in culture, while pharmacological inhibition of GSK-3 β prevents spine loss and increases expression of CREB-target genes like BDNF. Of note, in transgenic mice GSK-3 β inhibition ameliorated plaque-related neuritic changes and increased CREB-mediated gene expression. Moreover, GSK-3 β inhibition robustly decreased the oligomeric $A\beta$ load in the mouse brain. All these findings support the idea that GSK3 β is aberrantly activated by the presence of $A\beta$, and contributes, at least in part, to the neuronal anatomical derangement associated with $A\beta$ plaques in AD brains and to $A\beta$ pathology itself.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Background

Indisputable genetic data point to β -amyloid ($A\beta$) as a central player in Alzheimer's disease (AD) pathophysiology. However, how and in which way brain $A\beta$ accrual leads to neurotoxicity and impaired cognition in AD is not completely understood and identifying the signaling pathways and mechanisms involved may prove critical to prevent or cure this illness. It has been recently proposed that glycogen synthase kinase-3 (GSK-3), a multi-tasking kinase with major roles in brain signaling, may be important in the process leading to $A\beta$ -mediated neural system collapse and dementia in AD. "The GSK-3 hypothesis of AD" argues that overactivity of GSK-3 β , the most abundant of two isoforms (GSK-3 α and GSK-3 β) expressed in neurons, accounts for cognitive impairment, tau hyperphosphorylation, increased $A\beta$ production, neuronal death and neuroinflammation in AD (Hooper et al., 2008).

Remarkable connections between GSK-3 and the hallmarks of AD have been identified. GSK-3 β is a key kinase required for AD-type abnormal hyperphosphorylation of tau (Kosik, 1992) and GSK-3 β overexpression results in tau hyperphosphorylation and microtubule disruption in mice (Lucas et al., 2001). $A\beta$ activates GSK-3 in vitro, although the exact $A\beta$ species and mechanism involved remain unknown (Akiyama et al., 2005; Kim et al., 2003; Ryan and Pimplikar, 2005). GSK-3 α promotes $A\beta$ production (Phiel et al., 2003) and phosphorylates APP and presenilin-1 in vitro (Aplin et al., 1997; Takashima et al., 1998). In vitro and in vivo GSK-3 β overexpression leads to neuronal apoptosis (Beurel and Jope, 2006; Bhat et al., 2000a; Hetman et al., 2000; Kosik, 1992). GSK-3 β also participates in memory and synaptic plasticity, and mice overexpressing GSK-3 β showed impaired memory and long-term potentiation (LTP) (Hernandez et al., 2002). The above evidence has already led to clinical trials of GSK-3 inhibitors in AD, although there are major gaps in knowledge concerning GSK-3 effects in the human brain and uncertainty about whether drugs that specifically target GSK-3 are feasible and safe.

We tested the hypothesis that increased activity of GSK-3 β substantially contributes to $A\beta$ -induced neuronal damage in AD. We propose that soluble oligomeric $A\beta$ species trigger GSK-3 β activation, and this in turn mediates the AD neurodegenerative phenotype by

☆ This project was funded in part by FIS PI041887 and CIBERNED.

☆☆ We thank Dr. Virginia Lee for kindly providing us with Nab61 antibody.

★ We thank Noscira for kindly providing us with NP12.

* Corresponding author at: Neurology Department, Massachusetts General Hospital, WACC Suite 715, 15th Parkman St, Boston MA 0214, USA. Fax: +1 617 726 4101.

E-mail address: tgomezisla@partners.org (T. Gómez-Isla).

Available online on ScienceDirect (www.sciencedirect.com).

promoting phosphorylation of targets critically involved in synaptic stability. In particular, GSK-3 β activation appears to inhibit a transcriptional program mediated by CREB that may compromise synaptic integrity and cognition. We used three different settings to test this idea: primary neurons in culture, transgenic (Tg) mice and AD brains. We find evidence for GSK-3 β activation in cultured neurons exposed to oligomeric A β obtained from either Tg2576 conditioned medium (CM) or AD brains, in the brain of APP^{sw}-tau^{vw} mice and in AD brains. A β exposure in those three settings resulted in aberrant morphological changes in neurites – dendritic spine loss, dystrophies and altered neurite trajectories – increased GSK-3 β -mediated inhibitory phosphorylation of CREB and subsequent decrease of CREB-target gene expression. Blocking either A β or GSK-3 β activation prevented A β -induced neurite alterations in cultured neurons and normalized CREB-mediated gene expression, while introduction of an uninhibitable form of GSK-3 β recapitulated the neurodegenerative phenotype in the absence of A β . Importantly, in APP^{sw}-tau^{vw} mice, plaque-related neuritic changes, downregulation of CREB-target gene expression and impaired cognition were rescued by GSK-3 β inhibition. These data suggest that GSK-3 β activation and subsequent inhibition of CREB-mediated transcriptional program are involved in A β -induced neuronal derangement, providing further mechanistic insight into molecular links between A β , synaptic failure and impaired cognition in AD.

Material and methods

Primary neuronal cultures

Tg2576 mice overexpressing human APP containing the Swedish mutation K670NM671L were used for generating the cell cultures (Hsiao et al., 1996). Primary neurons were derived from cerebral cortex of embryonic day 14 as previously described (Wu et al., 2010). Neurons were seeded to a density 6×10^5 viable cells/35-mm culture dishes previously coated with poly-D-lysine (100 μ g/ml) for at least 1 h at 37 °C. Cultures were maintained at 37 °C with 5% CO₂, supplemented with neurobasal medium with 2% B27 nutrient, 2 mM L-glutamine, penicillin (100 units/ml) and streptomycin (100 μ g/ml). Tg2576 and wild type (wt) neuronal cultures were used after 14 days in vitro (DIV). To maintain elevated levels of extracellular A β , the media in the Tg2576 cultures (conditioned media, CM) was not changed during those 14 days, and then was collected to treat 14 DIV wt neurons. CM from 14 DIV wt neurons were used as a control. The genotype of the animals was determined by polymerase chain reaction on DNA obtained from fibroblasts.

Separation of A β oligomers from cultured media and AD brain lysates by size exclusion chromatography (SEC)

5 ml of CM from 14 DIV Tg2576 neurons was centrifuged at $3000 \times g$ at 4 °C in Amicon Ultra-15ML 3 K (Millipore) to concentrate proteins ~5 fold. AD brain lysates were centrifuged at $260,000 \times g$ at 4 °C, and the supernatant was used as TBS-soluble fraction (Hashimoto et al., 2002). 750 μ l of concentrated Tg2576 CM and 500 μ l of TBS-soluble fraction from AD brains were separated by SEC on Superdex 75 10/300 GL column (GE healthcare) in 50 mM ammonium acetate pH 8.5 with AKTA purifier 10 (GE healthcare) (Townsend et al., 2006) to characterize the A β species contained in the mixtures based on molecular weights. The concentration of A β in the Tg2576 CM was 1–1.5 nmol/ml. Wt or Tg2576 CM was applied for 24 h to 14 DIV wt neurons at 37 °C. Immunodepletion experiments were utilized to ensure that the active component in the Tg2576 CM media is A β using 3D6 antibody (Johnson-Wood et al., 1997). Confirmatory experiments, using oligomeric A β prepared on the SEC column from AD brains were also conducted.

Pharmacological inhibition of GSK-3 β in vitro

Wt neuron cultures were treated with the selective non-ATP competitive inhibitor of GSK-3 β TDZD-8 (4-Benzyl-2-methyl-1,2,4-thiadiazolidine-3,5-dione) (Sigma, St Louis, MO) at 1 μ M 30 min before exposure to A β containing Tg2576 CM. GSK-3 activity was measured by phosphorylation of Ser9 of GSK-3 β and Ser21 of GSK-3 α . This inhibitory phosphorylation is known to be the main regulatory mechanism of GSK-3 activity in mammalian cells (Woodgett, 1990). GSK-3 β /P Ser9GSK-3 β and GSK-3 α /P Ser21GSK-3 α ratios were determined by using commercially available antibodies (CST, Danvers, MA) and traditional Western Blotting techniques.

Plasmid construction

The open reading frame of the wt mouse GSK-3 β (GSK-3 β wt) and the constitutively active GSK-3 β mut (S9A) were amplified using pcDNA3-GSK3 β -HA (Addgene, Cambridge, MA) and pcDNA3-GSK3 β S9A-HA (Addgene, Cambridge, MA) as templates, respectively. The primers used to amplify GSK-3 β wt were:

GSK3 β wtKpn1-5F 5', AAAAAAGGTACCACCATGTCAGGGCGGCCA-GAACC
GSK3 β -Age1-3R 5', TTTTACC GGTTGGTGGAGTTGGAAGCTGAT-GCAGAAG

The primers used to amplify GSK-3 β (S9A) were:

GSK3 β mutKpn1-5 F 5', AAAAAAGGTACCACCATGGCAGGGCGGCC-CAGAACC
GSK3 β -Age1-3R 5', TTTTACC GGTTGGTGGAGTTGGAAGCTGAT-GCAGAAG.

The purified restriction fragments of Kpn1-GSK-3 β wt-Age1 and Kpn1-GSK-3 β (S9A)-Age1 were respectively cloned into Kpn1/Age1 sites of vector pEGFP-N1 (Clontech, Mountain View, CA) and transfected into 5–7 DIV primary cultured neurons using lipofectamineTM 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA). All the constructs were verified by sequencing before transfection.

Analysis of neuronal morphology and toxicity assays

Neuronal morphology was assessed on 14 DIV neurons transfected with the plasmid pEGFP-N1 (Clontech, Mountain View, CA). High-resolution digital images were taken using a Zeiss LSM510 confocal microscope system and analyzed with NeuronStudio software (CNIC, Mount Sinai School of Medicine). Spine density was defined as the number of spines per micrometer of dendrite length according to modified previously published protocols (Wu et al., 2010). Dendritic spine densities were calculated from 20 neurons per condition. The relative amounts of the three most notable classes of spine shapes “thin”, “stubby” and “mushroom” were quantified.

Toxicity assays were conducted using ToxiLight BioAssay kit from Lonza, Rockland, ME, according to manufacturer protocols.

Preparation of total homogenates and nuclear fractions from cultured neurons and human brain samples

Neurons in culture and frozen human temporal cortex samples (20 mg) from AD and control cases were homogenized in 0.32 M sucrose lysis buffer (0.32 M sucrose, 5 mM CaCl₂, 3 mM Mg(Acetate) 2, 0.1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) and 0.1% Triton X-100), supplemented with complete protease inhibitor cocktail tablets and centrifuged at $800 \times g$ for 15 min at 4 °C. Nuclear preparations free of cytosolic proteins were prepared from the pellets from the initial centrifugation step by using Qproteome nuclear protein kit from Qiagen,

Germantown, MD, according to manufacturer's protocols. For Western blot analysis, equal amounts of protein (20 µg) from total extracts and nuclear fractions were separated on 10% and 4–12% SDS-PAGE gels. Primary antibodies for GSK-3 α , GSK-3 β , GSK-3 α -pSer21, GSK-3 β -pSer9 and CREB (CST, Danvers, MA), 129-pCREB and c-fos (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), BDNF (Abcam, Cambridge, UK; Millipore, Billerica, MA; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and ARC (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) were used. Primary antibody incubation was followed by the appropriate horseradish peroxidase linked secondary antibody (rabbit polyclonal or mouse monoclonal 1:1000; Bio-Rad, Hercules, CA). Immunoreactivity was visualized using enhanced chemiluminescence reagent (Perkin-Elmer, Wellesley, MA) and exposure on X-ray film. Anti-GAPDH antibody (Millipore, Billerica, MA) and anti-HDAC1 antibody (ABR-Affinity BioReagents, Rockford, IL) were used to verify the cytoplasmic and nuclear fraction separation. BDNF levels in the mouse brain were assessed by ELISA using BDNF Emax ImmunoAssay System (Promega, Madison, WI).

Experimental animals

Transgenic APP^{sw}-tau^{vw} mice overexpressing human mutant APP (Swedish mutation K670N-M671L) and a triple human tau mutation associated with frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (G272V, P301L and R406W) on a mixed hybrid genetic background C57Bl6j/SJL/CBA were used in this study (Perez et al., 2005; Ribe et al., 2005). In brief, at 9 months these mice exhibit scarce amyloid deposits and infrequent tau filament formation in limbic and cortical areas, as well as incipient neuronal loss in the entorhinal cortex (EC) by about 19%, without significant memory impairment. Severe pathology, including enhanced amyloid deposition, increased levels of tau phosphorylation and aggregation (but no mature NFT formation), glial proliferation, and pronounced neuronal loss in the entorhinal cortex (EC) and the CA1 region of the hippocampus by about 36%, can be seen in mice at 16 months along with overt memory deficits. Mature argyrophilic NFT formation is a late stage event in this mouse line that can be demonstrated in the EC and CA1 regions at 25 months of age. Groups of APP^{sw}-tau^{vw} mice were administered a daily oral dose of NP12 (Noscira, Madrid, Spain) (n=6) or vehicle (n=6) starting at 9 months during 6 consecutive months and were used for subsequent clinicopathological and biochemical analyses. Groups of age and gender-matched wild-type littermates (n=6) received vehicle alone and were used as controls. All experiments were conducted in accordance to our institutional Animal Care and Use Committee guidelines and conformed to the European Union Directive 86/609/EEC.

Pharmacological GSK-3 β inhibition *in vivo*

NP12 (Noscira, Madrid, Spain) is another small heterocyclic thiadiazolidinone (TDZD) derivative, which is an ATP-non competitive inhibitor of GSK-3 β (Martinez et al., 2002). NP12 was reconstituted in 26% peg400 (Polyethylene Glycol 400), 15% Chremophor EL and water, and administered at a daily dose of 200 mg/kg. Drug or vehicle was administered for 6 consecutive months by oral gavage to APP^{sw}-tau^{vw} mice.

Mouse tissue preparation

Mice were sacrificed under isoflurane administration and brains were immediately removed. One hemisphere was snap frozen in liquid nitrogen for Western blotting and ELISA assays. The other hemisphere was fixed for 24 h in 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4, and coronally sectioned at 30 µm on a freezing sledge microtome for histological analyses.

Immunostaining

30 µm coronal sections were permeabilized with 0.5% Triton-X100 in PBS, blocked with normal goat serum, and sequentially probed with primary antibody (4G8 mouse anti-A β 1:500, Chemicon, Temecula, CA; mouse Nab61 1:100, a kind gift of Dr. Virginia Lee; SMI-312 antibody 1:1000, Covance Research Products, Princeton, NJ) and the appropriate secondary antibody (anti-mouse and anti-rabbit IgG 1:200, Southern Biotechnology, Birmingham, AL; Vector ABC Kit; anti-mouse IgG 1:200 conjugated with cyanine 3 (Cy3), Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA).

A β oligomeric burden quantification

Oligomeric A β deposits were detected using Nab61, an antibody that has been previously shown to recognize a conformational epitope specific to oligomeric A β (Lee et al., 2006), and quantified using the Bioquant Nova Prime V6 90.10 system according to protocols previously published (Gomez-Isla et al., 1996; Irizarry et al., 1997). In brief, video images were captured of each region of interest on 30 µm-thick sections, and a threshold of optical density was obtained that discriminated staining from background. Manual editing eliminated artifacts. The total "oligomeric amyloid burden", defined as the total percentage of cortex covered by Nab61 immunostained deposits over three sections were calculated for the CA1 hippocampal subfield, cingulate and entorhinal (EC) cortices.

Neurite trajectory analysis

Neurite curvature analyses were conducted in the EC. To visualize axons the tissue was incubated with SMI-312 antibody (1:1000, Covance Research Products, Princeton, NJ) and a secondary anti-mouse antibody conjugated with cyanine 3 (Cy3) (1:200, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), and then counterstained with Thioflavine-S (0.05% in 50% ethanol). The analysis of axonal ratio curvature was conducted according to previously published protocols (Spires-Jones et al., 2009). In brief, microphotographs were obtained on an upright Olympus BX51 (Olympus, Denmark) fluorescence microscope with a DP70 camera using DPController and CPManager software (Olympus). Axonal curvature ratio and distance to senile plaques were measured using ImageJ software from the NIH. Axons longer than 20 µm were analyzed and their curvature ratio was calculated by dividing the curvilinear length of the axon by the straight line length of the process (D'Amore et al., 2003; Knowles et al., 1999; Lombardo et al., 2003). Distance from the measured axon segment to the closest amyloid plaque (if present) was measured at three points – from each end and the midpoint of the segment – and the average distance was calculated from the three measurements. Axons closer than 50 µm to the plaque (n=90–110 axon segments derived from 6 animals per treatment group) were defined as being close to plaques and the others as being far from plaques (n=100–135 axon segments derived from 6 animals per treatment group).

Statistical analysis

One way ANOVA and Student's *t* test were used to examine main effects of transgenic status and treatment effect on spine density and morphology, oligomeric A β load, GSK-3 phosphorylation, CREB target-gene expression levels and neurite curvature ratio. One way ANOVA was used to compare GSK-3 phosphorylation and CREB target-gene expression levels in human tissue samples from AD patients vs. cognitively normal controls. In all tests the level of significance was at $p < 0.05$. Data are presented as mean \pm standard error, unless otherwise indicated.

Results

Exposure to oligomeric A β containing media from Tg2576 cultures and to oligomeric A β isolated by SEC from AD brain decreased spine density and reduced the proportion of thin and mushroom spines in wt primary neurons

Primary cortical neurons derived from Tg2576 embryos at 14 DIV produced high levels of human A β 40 and 42. The concentration of A β 40 was 16 ng/ml and of A β 42 was 1.2 ng/ml as determined by ELISA assay. IP Western blot analysis of CM from Tg2576 cultures at 14 DIV demonstrated the presence of detectable SDS-stable small oligomers, similar to those reported to be synaptotoxic (Shankar et al., 2008). The size exclusion chromatography (SEC) profile of the Tg2576 CM (which contains a mixture of oligomeric A β species – from dimer to about a hexamer, as a source of neuronally produced extracellular oligomeric A β) is in fact quite close to the one in the TBS fraction of AD brain. By Western blot using the ultrasensitive antibody 82E1, we estimated that the total amount of A β in Tg2576 CM is ~20 ng/ml. Diluted 1:4, these correspond to concentrations of ~5 ng/ml (or ~1 nM), and are similar to the amount of A β reported to be present in human CSF (~1–1.5 nM) (Snider et al., 2009). The elution profile from the SEC column further revealed that a large portion of the Tg2576 CM mixture used for the experiments consisted of low-molecular-weight (LMW) A β oligomers, such as dimers and trimers corresponding with fractions 15–18 (8 kDa–12 kDa). We assessed spine density and morphology by transfecting wt cultured neurons with the plasmid pEGFP-N1 (Clontech, Mountain View, CA) which encodes a red-shifted variant of wt green fluorescent protein (GFP) to label individual neurons and exposed them for 24 h to Tg2576 CM and to oligomeric A β prepared on the SEC column from TBS extraction of AD brain. During the course of 14 days in vitro (DIV), GFP positive neurons from wt cultures progressively demonstrated intricately branched dendritic arbors studded with protrusions that included mature spines and few fillopodia. Neurons exposed to CM from Tg2576 cultures had reduced overall spine density when compared to neurons exposed to wt media ($p=0.0004$) ($n=20$ neurons per condition) (Figs. 1A–B). Of note, confirmatory experiments showed that 24 hour exposure of neurons to oligomeric A β isolated from AD brains induced identical spine density reduction

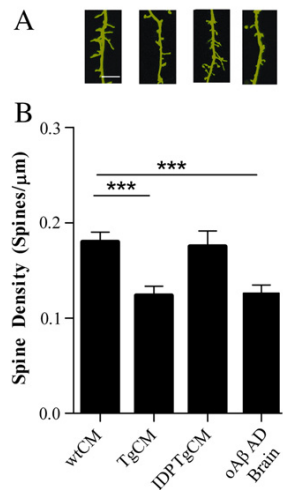


Fig. 1. (A, B) 24 hour exposure of neurons to Tg2576 CM resulted in a significant reduction of spine density when compared to neurons exposed to wt media. Exposure to oligomeric A β isolated on the SEC column from AD brains induced a similar reduction in the number of dendritic spines, and immunodepletion using 3D6 (=IDPTgCM) antibody completely rescued this phenotype. Data are derived from 20 neurons per condition. Calibration bars 10 μ m. *** $p < 0.001$.

($p=0.0004$), and immunodepletion using 3D6 antibody completely prevented this neurodegenerative phenotype (Figs. 1A–B). Dendritic spines are small membranous protrusions that provide the anatomical substrate for memory storage and synaptic transmission. The most notable classes of spine shape are “thin”, “stubby” and “mushroom” (Peters and Kaiserman-Abramof, 1970) (Fig. 2A). The variable spine shape and volume is thought to be correlated with the strength and maturity of each spine-synapse and spines with strong synaptic contacts typically have a large spine head. Synaptic enhancement leads to an enlargement of thin spines into mushroom spines and the mobilization of subcellular resources to potentiated synapses (reviewed in Bourne and Harris, 2007). Our data indicate that exposure to oligomeric A β containing Tg2576 CM is not only associated with a significant decrease in the total number of spines but also with a reduction in the relative proportion of thin spines, thought to be particularly plastic and linked to learning ($p=0.0248$), and mushroom spines, the most stable and mature type of spines and believed to be involved in memory formation ($p=0.0180$) (Fig. 2B). Importantly, all these effects are not due to overt toxicity since ToxiLight assay for cell death showed no significant difference between neurons exposed to Tg2576 or wt CM (data not shown). Taken together, these results indicate that 24 hour exposure to oligomeric A β containing Tg2576 CM is sufficient to induce a significant loss of dendritic spines and to alter spine morphology in cultured neurons.

Oligomeric A β containing media from Tg2576 cultures induced aberrant activation of GSK-3 β

It has been recently proposed that aberrant activation of GSK-3 β may play a role in A β mediated neurotoxicity in AD. To examine if A β is capable of inducing an increase in GSK-3 β activity, we studied the effect of Tg2576 CM on the inhibitory phosphorylation of serine 9 of GSK-3 β , the best known control mechanism of the enzyme's activity (Woodgett, 1990), using commercially available antibodies (CST, Danvers, MA) and Western Blot. Because GSK-3 β is dynamically

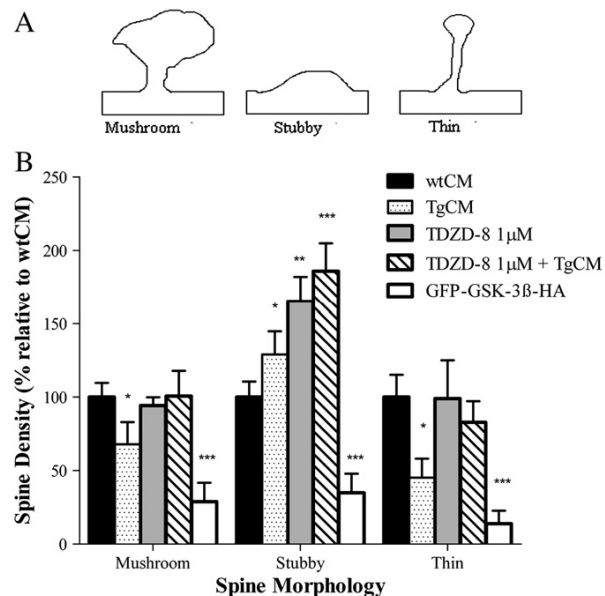


Fig. 2. (A, B). 24 hour exposure of neurons to Tg2576 CM significantly decreased the proportion of thin and mushroom spines. TDZD-8 treatment at 1 μ M increased the overall amount of dendritic spines by over 25%, restored the proportion of thin and mushroom spines to control levels, and increased the relative proportion of stubby spines. Transfection of neurons with a wt GSK-3 β isoform significantly decreased the amount of all three classes of spines, thin, mushroom and stubby in the absence of A β . Data are derived from 20 neurons per condition. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

regulated within the nucleus and mitochondria, where it is highly active, readouts were also conducted in nuclear fractions (Bijur and Jope, 2003). Our data indicate that oligomeric A β triggers GSK-3 β activation. The total level of GSK-3 β in whole cell and nuclear extracts did not significantly change in primary cultured neurons after 24 hour exposure to Tg2576 CM compared to wt CM ($p=0.889$) (Figs. 3A–B). However, the GSK-3 β /pSer9GSK-3 β ratio was increased by 25% in whole cell extracts ($p=0.0800$) and by 30% in the nuclear fraction ($p=0.0136$) in neurons exposed to Tg2576 CM indicating that oligomeric A β exposure triggers a significant increase in GSK-3 β activity ($n=24$ dishes per condition). 3D6 immunodepletion completely prevented the elevation of GSK-3 β activity. No significant changes were detected in the level of GSK-3 α or the GSK-3 α /pSer21GSK-3 α ratio in whole cell or nuclear extracts (data not shown).

Pharmacological inhibition of GSK-3 β rescued A β induced spine loss and restored spine morphology while transfection with a constitutively active form of GSK-3 β reproduced the neurodegenerative phenotype in the absence of A β

To examine if pharmacological blockage of GSK-3 β is sufficient to prevent A β induced spine density reduction, we studied the effect of treatment with TDZD-8 (a non-ATP competitive GSK-3 β inhibitor) in neurons exposed to Tg2576 CM and wt CM. We observed that TDZD-8 treatment at 0.5 and 1 μ M concentration had a significant trophic effect in neuronal cultures and significantly increased the overall amount of dendritic spines by over 25% ($p=0.013$) (Figs. 4A–B), and the relative proportion of stubby spines ($p=0.0021$) that are thought to be much more stable than thinner ones (Trachtenberg et al., 2002) (Fig. 2B). Importantly, higher concentrations of TDZD-8 though were toxic and resulted in significant reduction in the number of spines suggesting that excessive inhibition of GSK-3 β endogenous activity might not be safe (Figs. 4A–B). TDZD-8 at 1 μ M fully rescued spine loss triggered by A β exposure (Figs. 5A–B) and restored the normal proportion of both thin and mushroom spines (Fig. 2), strongly supporting that partial blockade of GSK-3 β is sufficient to block the A β induced synaptotoxic phenotype. As expected, TDZD-8 treatment resulted in a significant increase in the phosphorylation of serine 9 of GSK-3 β , indicating that the enzyme is less active

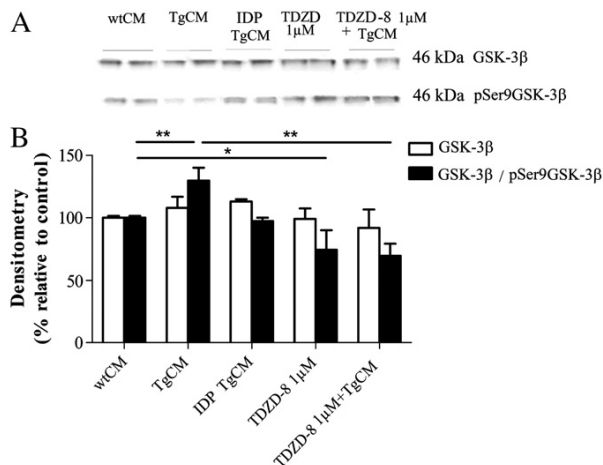


Fig. 3. (A, B). Total level of GSK-3 β in nuclear extracts did not significantly change in primary cultured neurons after 24 hour exposure to Tg2576 CM compared to wt CM. GSK-3 β /pSer9GSK-3 β ratio was increased by 30% indicating that oligomeric A β exposure triggers a significant increase in GSK-3 β activity. 6E10 immunodepletion completely prevented the elevation of GSK-3 β activity. Treatment of cultured neurons with TDZD-8 at 1 μ M significantly decreased GSK-3 β /pSer9GSK-3 β ratio indicating that the enzyme is inhibited by this treatment. Data are derived from 24 dishes per condition. * $p<0.05$ ** $p<0.01$.

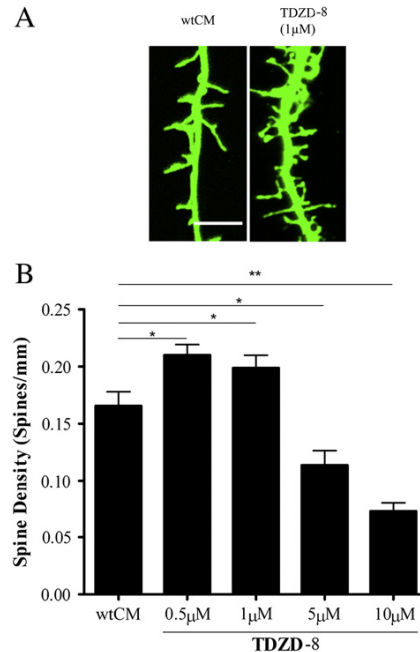


Fig. 4. (A, B) Treatment of neurons with TDZD-8 at 1 μ M increased the overall amount of dendritic spines by over 25% in comparison to neurons exposed to wt CM. Concentrations of TDZD-8 higher than 1 μ M were toxic and resulted in significant reduction in the number of spines suggesting that excessive inhibition of GSK-3 β endogenous activity might not be safe. Data are derived from 20 neurons per condition. Calibration bars 10 μ m. * $p<0.05$ ** $p<0.01$.

($p=0.0419$) (Figs. 3A–B). No significant changes were observed in the inhibitory phosphorylation of GSK-3 α at Ser21 after exposure to TDZD-8 (data not shown). To test the hypothesis that aberrant activation of GSK-3 β in wt neurons in culture recapitulates the same

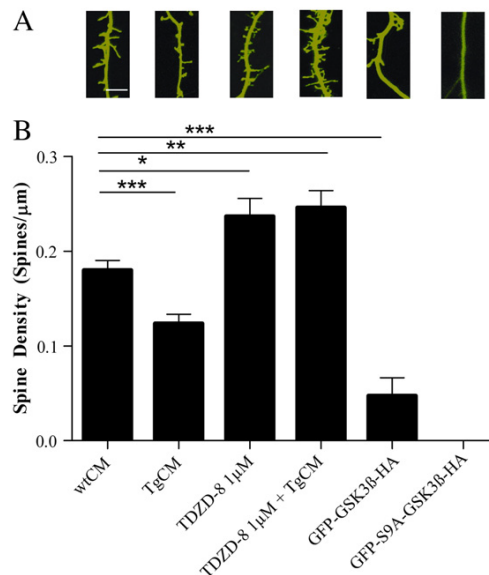


Fig. 5. (A, B) TDZD-8 at 1 μ M fully rescued spine loss triggered by exposure to oligomeric A β containing Tg2576 CM. 14 day transfection of wt GSK-3 β into neurons led to a very robust spine loss recapitulating that observed after exposure to Tg2576 CM. The phenotype is even more dramatic after transfection of a constitutively active mutant form of GSK-3 β (GSK-3 β mut (S9A)) that leads to a complete loss of all dendritic spines in cultured neurons. Data are derived from 20 neurons per condition. Calibration bars 10 μ m. * $p<0.05$ ** $p<0.01$ *** $p<0.001$.

morphological phenotype in the absence of A β , we next transfected the wild type mouse GSK-3 β (GSK-3 β wt) and the constitutively active GSK-3 β mut (S9A) into neurons in vitro. Our data indicated that 14 day transfection of wt GSK-3 β into neurons leads to a very robust loss of dendritic spines and a significant reduction in the proportion of thin and mushroom spines recapitulating that observed after exposure to oligomeric A β containing Tg2576 CM ($p < 0.0001$). The phenotype is even more dramatic after transfection of a constitutively active mutant form of GSK-3 β (GSK-3 β mut (S9A)) that leads to a complete loss of all dendritic spines in cultured neurons (Figs. 5A–B). All together the above results suggest that A β induced neurodegeneration is mediated by GSK-3 β activation and can be fully blocked by inhibition of GSK-3 β in vitro.

Activity of GSK-3 β is aberrantly increased in the AD brains

Literature concerning GSK-3 β effects in AD and Tg mouse models is not uniform. Some studies reported increased activity of GSK-3 β in AD brains compared to controls (Blalock et al., 2004; Leroy et al., 2007), but others found no change (Pei et al., 1997). To determine whether the aberrant activation of GSK-3 β observed in neurons exposed to oligomeric A β containing Tg2576 CM could be relevant to the AD human condition, total homogenates and nuclei were prepared from frozen human AD or control temporal cortex tissue samples and analyzed by Western Blotting with antibodies against total GSK-3 β and Ser9PGSK-3 β . GSK-3 β levels in total homogenates and nuclear fractions prepared from the temporal cortex of AD samples were markedly decreased compared to those seen in control samples, as expected due to neuronal cell loss in AD ($p = 0.0091$ and $p = 0.0248$, respectively) (Figs. 6A–D). However, the ratio GSK-3 β /pSer9GSK-3 β was increased in the total homogenates by 260%, even though this difference did not reach statistical significance ($p = 0.160$), and even more so, by 450% in the nuclear fraction ($p = 0.0019$) indicating that GSK-3 β is in fact more active in AD brains ($n = 11$ – 12 per group). These observations are in agreement with our previous data showing that the activity of GSK-3 β is increased in the brain of APP^{sw}-tau^{vlw} mice in comparison to age-matched littermate controls (Sereno et al., 2009). Thus, A β exposure in both settings, AD brains and Tg mice, results in aberrant activation of GSK-3 β further supporting the notion that increased activity of this enzyme is likely

involved in the neurodegenerative phenotype associated to A β exposure not only in vitro but also in vivo.

Sustained pharmacological inhibition of GSK-3 β successfully rescued A β associated neuritic changes in APP^{sw}-tau^{vlw} mice

If our overall hypothesis that aberrantly increased activity of GSK-3, and GSK-3 β isoform in particular, substantially contributes to A β mediated neural system degeneration in AD is right, then GSK-3 β inhibition gains substantial importance as potentially disease modifying strategy in AD. Our recently published data from 3 month exposure to a novel non-ATP competitive GSK-3 inhibitor (compound NP12) had shown that NP12 treatment resulted in a significant decrease of both tau and A β alterations and, perhaps more importantly, was sufficient to arrest neuronal cell loss in AD vulnerable brain regions and fully prevented memory deficits in APP^{sw}-tau^{vlw} mice (Sereno et al., 2009). We asked whether GSK-3 β pharmacological inhibition also had a significant impact in oligomeric A β accrual in the brain of APP^{sw}-tau^{vlw} mice and was sufficient to restore A β associated neuritic changes. Our previous data indicated that the amount of Nab61 oligomeric A β but not total A β plaque burden closely correlated with the amount of neuronal cell loss in the brain of these mice, favoring the view that oligomeric A β species may play a much larger role in neuronal damage than A β plaques in vivo (DaRocha et al., 2011). The total amount of Nab61 reactive oligomeric A β deposits was very significantly decreased in mice treated with NP12 in comparison to those treated with vehicle (Figs. 7A–C) ($p = 0.0024$). The regional exam further confirmed the robust treatment impact on Nab61 accumulation (cingulate cortex $p = 0.0277$, EC $p = 0.0050$). These data are in agreement with our previous observations that NP12 treatment significantly decreases the total amount of A β plaques in the brain of APP^{sw}-tau^{vlw} mice (Sereno et al., 2009) strengthening the idea that inhibition of GSK-3 β results in substantial decrease of amyloid pathology in vivo and further supporting the potential therapeutic use of TDZD compounds in AD. The mechanism/s by which NP12 ameliorates A β pathology need now to be clarified. Of note, we did not observe either a significant decrease in the activity of GSK-3 α or changes in the levels of BACE (data not shown) in the brain of mice treated with NP12 in comparison to vehicle-treated animals.

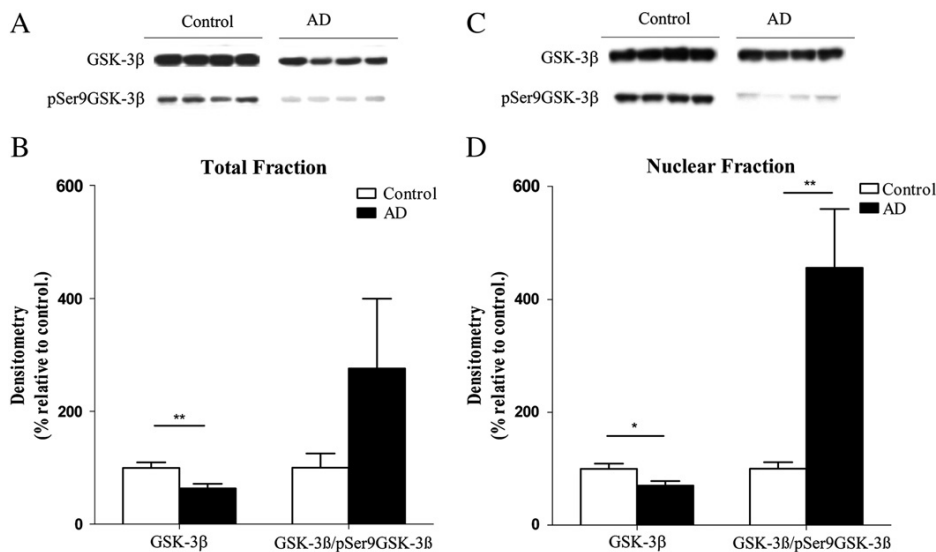


Fig. 6. (A–D) GSK-3 β levels in total homogenates (A, B) and nuclear fractions (C, D) prepared from the temporal cortex of AD samples were markedly decreased compared to those seen in control samples, as expected due to neuronal cell loss in AD. The ratio GSK-3 β /pSer9GSK-3 β was increased in the total homogenates from AD brains by 260%, and by 450% in the nuclear fraction when compared to controls indicating that GSK-3 β is more active in AD brains ($n = 12$ brains per group). * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

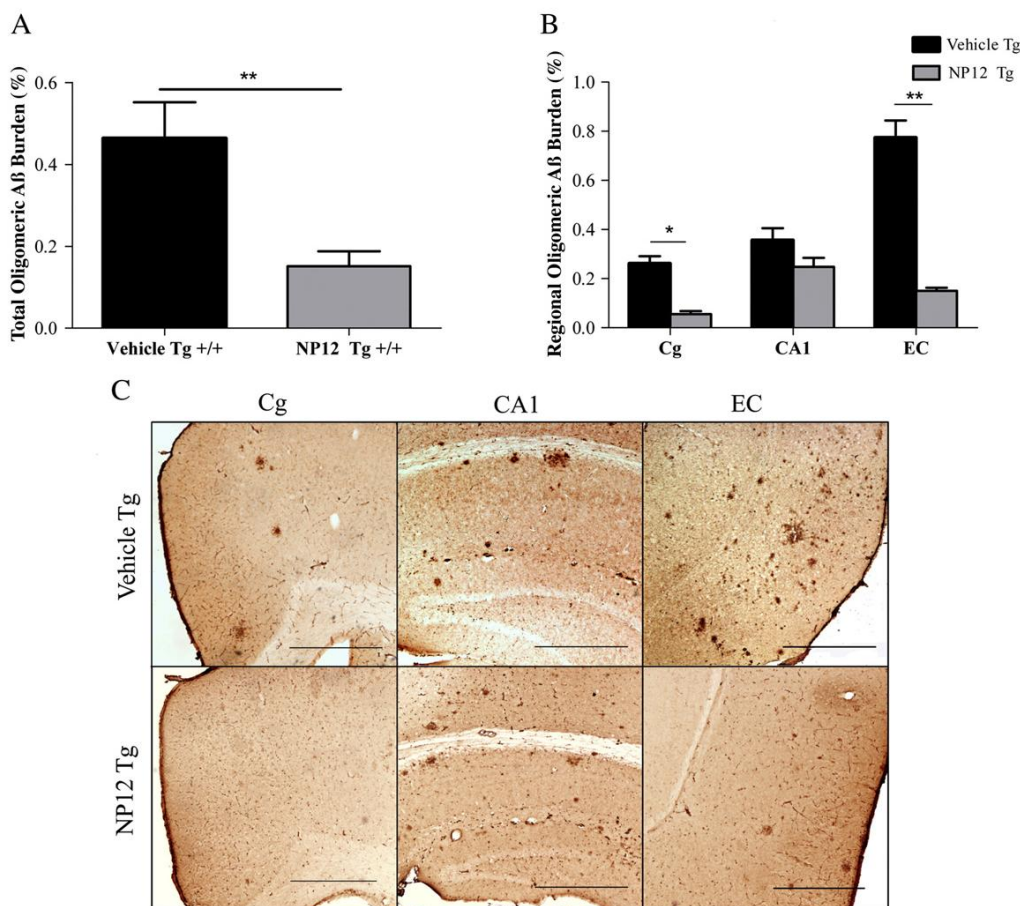


Fig. 7. (A) The total amount of Nab61 reactive oligomeric A β deposits was decreased in mice treated with NP12 in comparison to those treated with vehicle. (B) The regional exam further confirmed the treatment effect on Nab61 accumulation in the cingulate cortex and EC ($n = 6$ animals per group). (C) Representative photomicrographs of sections immunostained with Nab61 through Cg, CA1 and EC from NP12 and vehicle treated animals. Calibration bars 200 μ m. EC = entorhinal cortex, Cg = cingulate. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

Previous studies have demonstrated that the Thioflavin-S reactive dense-cored subpopulation of plaques in particular are associated with severe neurite changes, including axonal disrupted trajectories and reductions in dendritic spine density, that likely contribute to altered neural system function and behavioral impairments observed in APP mice (Coma et al., 2010; D'Amore et al., 2003; Spires et al., 2005). Of note, our prior work showed that the oligomeric conformational specific antibody Nab61 labeled the core and a halo surrounding the core of most of the Thioflavin-S reactive plaques in the brain of APP^{sw}-tau^{vlw} mice (DaRocha et al., 2011). In the present study we analyzed the axonal curvature ratio in the EC in 30 μ m SMI-312 immunostained coronal sections counterstained with Thioflavin-S. We observed that APP^{sw}-tau^{vlw} mice have significantly curvier axons at 15 months compared to similarly aged non-transgenic littermate controls ($p < 0.0001$) (Figs. 8A–B). When distance from a dense-cored plaque was taken into account, axons were significantly more curved close to plaque ($< 50 \mu$ m) compared to far from plaque ($> 50 \mu$ m) ($p < 0.0001$). Treatment with NP12 significantly reduced axonal curvature both near and far from plaques ($p < 0.0001$). Increased number of neurons with neuritic dystrophies (size of dystrophies defined as areas of swelling $> 2.5 \mu$ m in diameter in neurites) can also be seen in the brain of APP^{sw}-tau^{vlw} mice at 15 months of age in association with amyloid deposits (Figs. 8C–D). NP12 treatment significantly decreased the number of dystrophies near plaques in the brain of APP^{sw}-tau^{vlw} compared to vehicle treated mice ($p = 0.0011$). These results demonstrate that the neuritic changes (neurite trajectory

alterations and neuritic dystrophies) that accompany amyloid deposition in the brain of APP^{sw}-tau^{vlw} mice can be successfully rescued by this GSK-3 β inhibitor. The relative contribution of A β (aggregated vs. oligomeric species), inflammation and/or oxidative stress, among others, to the observed morphological axonal changes will now need to be further clarified by future studies.

GSK-3 β activation appears to promote synaptotoxicity through inhibition of CREB dependent gene expression

Inhibitory control of GSK-3 β is important in promotion of cell survival, and hyperactive GSK-3 β contributes to apoptotic cell death (Bijur et al., 2000; Li et al., 2000; Pap and Cooper, 1998). The proapoptotic action of GSK-3 β has been attributed, at least in part, to the regulation by GSK-3 β of an array of transcription factors that control the expression of numerous genes with prominent roles in cell fate and survival. One of the transcription factors regulated by GSK-3 β is CREB. GSK-3 β negatively regulates CREB by phosphorylation of its Ser129 (Grimes and Jope, 2001). Multiple studies in different models have extensively established a critical role for the cAMP signaling pathway and CREB-mediated gene expression in cell survival and also in different forms of synaptic plasticity related to learning (reviewed in Bito and Takemoto-Kimura, 2003; Pittenger and Kandel, 1998). These data provide the rational basis for the hypothesis posed here where oligomeric A β triggers GSK-3 β activation and GSK-3 β in turn contributes to A β -triggered synaptic derangement (spine loss

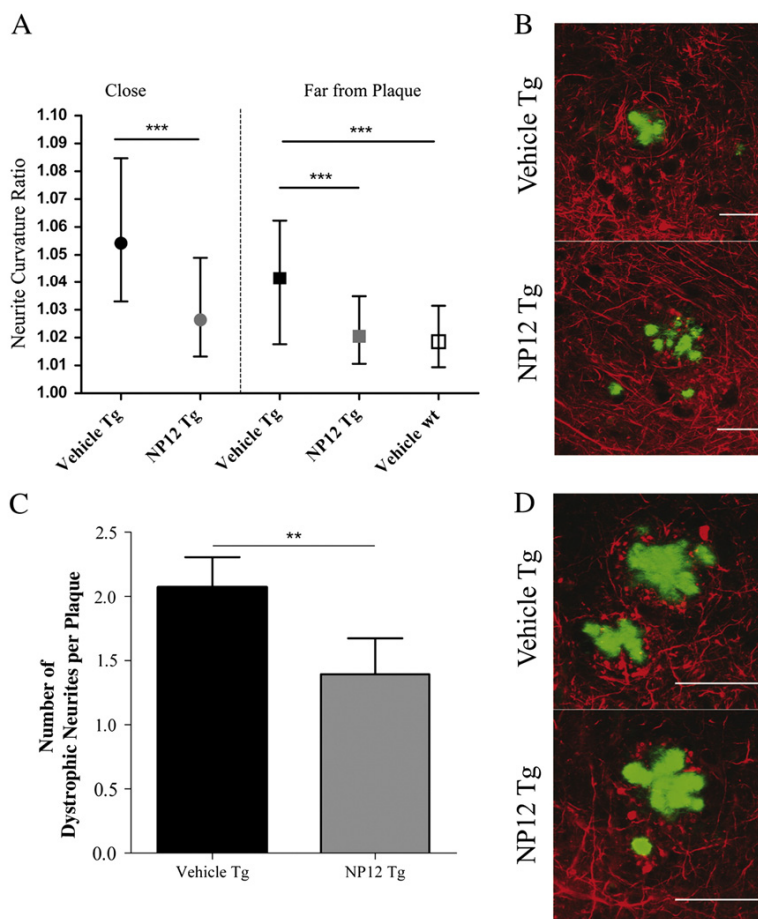


Fig. 8. (A) Axons far (>50 μm) from plaques were significantly curvier in 15 month-old APP^{sw}-tau^{vlw} mice compared to non-Tg littermate controls. Treatment with NP12 restored the normal straight pattern of axons close to plaques (<50 μm) and far from them (n = 90–135 axons analyzed per group). (B) Representative image of SMI312-positive neurites immunostaining (red) and senile plaque (Thioflavine S) (green). Curvature ratio was calculated by dividing the curvilinear length of the axon by the straight line length of the axon. (C) Neuritic dystrophies (size of dystrophies defined as areas of swelling >2.5 μm in diameter in neurites) can be seen in the brain of APP^{sw}-tau^{vlw} mice at 15 months of age in association with amyloid deposits. NP12 treatment significantly decreased the amount of dystrophies near plaques in the brain of APP^{sw}-tau^{vlw} compared to vehicle treated mice. (D) Representative image of SMI312-positive neurites immunostaining (red) and senile plaque (Thioflavine S) (green). Data are derived from 6 animals per group. Calibration bar 25 μm. **p < 0.01 ***p < 0.001.

and formation of varicosities) and neuronal toxicity through negative regulation of CREB and its transcriptional targets. We measured P-Ser129 CREB by Western blotting and the levels of protein expression of three of its transcriptional targets (c-fos, ARC and BDNF) in cultured neurons, brain tissue from APP^{sw}-tau^{vlw} mice and AD brains. Our data indicate that the increased activity of GSK-3β triggered by exposure of neurons to Tg2576 CM media results in a significant increase in the inhibitory phosphorylation at serine 129 of CREB promoted by this enzyme (p = 0.0262) (Figs. 9A–H). Of note, CREB inhibition in this condition is associated with a significant decrease in the amount of BDNF (p = 0.0057) and TDZD-8 treatment significantly decreased the GSK-3β mediated inhibitory phosphorylation of CREB and reversed the BDNF deficit in cultured neurons. A concordant and significant increase in p129CREB (p = 0.0262) and decreases in the levels of c-fos (p = 0.0029) and ARC (p = 0.0154) were observed in brain extracts from 15 month-old APP^{sw}-tau^{vlw} mice in comparison to similarly aged wt mice (Figs. 10A–H). An 18% reduction in the levels of BDNF was also noted in the brain of APP^{sw}-tau^{vlw} mice compared to wt mice, a difference that approached but did not reach statistical significance (p = 0.1510). Importantly, all these deficits in CREB-target gene expression levels were fully rescued by pharmacological inhibition of GSK-3β in APP^{sw}-tau^{vlw} mice (Figs. 10A–H).

In accord with these data, a significant increase in the inhibitory phosphorylation at serine 129 of CREB (p = 0.0004) and a decrease in the levels of ARC (p = 0.0002) and BDNF (p = 0.0233) were also observed in the temporal cortex of AD brains in comparison to cognitively normal controls (Figs. 11A–H). All together these results suggest that aberrant activation of GSK-3β inhibits a transcriptional program mediated by CREB both in vivo and in vitro, and offer an insight into the molecular mechanisms that may link Aβ exposure to synaptic and neuronal derangement in AD. The fact that the impact on CREB inhibition seems to be relatively more robust in mouse and human brain samples than in vitro could reflect the different durations of Aβ exposure in those settings (months in mice and years in humans vs. 24 h in cultured neurons).

Discussion

The idea that brain accumulation of β-amyloid (Aβ) is the primary influence that triggers the cascade of pathogenic events leading to neuronal damage and dysfunction as the final common pathway in AD is the current leading hypothesis in the field (Hardy and Allsop, 1991; Hardy and Selkoe, 2002). Favoring this idea is the long time standing observation that amyloid plaques are associated with

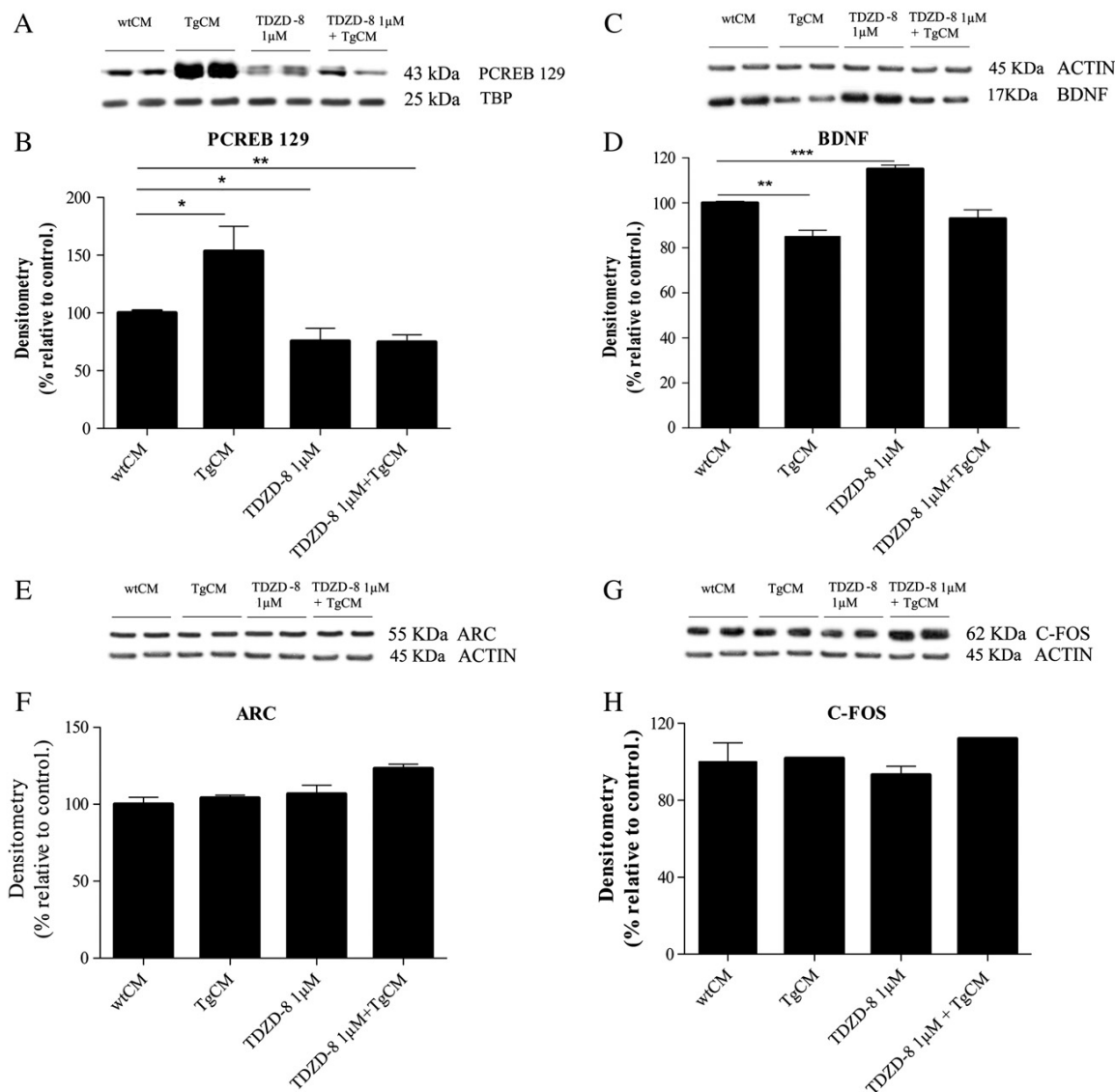


Fig. 9. (A–H) Increased activity of GSK-3 β triggered by exposure of neurons to Tg2576 CM media resulted in a significant increase in the inhibitory phosphorylation at serine 129 of CREB promoted by this enzyme and a significant decrease in the amount of BDNF. Treatment with TDZD-8 at 1 μ M concentration significantly decreased the inhibitory phosphorylation at Ser 129 of CREB mediated by GSK-3 β and restored the normal level of BDNF in neuronal cultures. Data are derived from 24 dishes per condition. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

dendritic and axonal changes with local spine loss, axonal swellings, and dysmorphic processes surrounding the plaques. However, the exact molecular mechanisms by which accrual of brain A β leads to neuronal toxicity and morphological disruption of dendrites and axons remain unknown. Here we present data supporting the idea that aberrant activation of GSK-3 β and subsequent inhibition of a transcriptional program mediated by CREB are likely key mechanisms that link A β to the structural damage of neural networks. Exposure to A β results in aberrant activation of GSK-3 β that leads in turn to phosphorylation of targets critically involved in synaptic stability and neuronal survival. In particular, GSK-3 β activation appears to inhibit a transcriptional program mediated by CREB that may compromise synaptic anatomical integrity and transmission by promoting dendritic spine loss and neuritic dystrophies, and distortion of the normal straight patterns of dendrites and axons. Importantly, we show reversal of A β induced morphological neurodegenerative phenotypes in vitro and in vivo by pharmacological GSK-3 β inhibition, providing

an important proof that this therapeutic intervention protects neuronal structure in cultured neurons and in a transgenic mouse model.

GSK-3 β is a multi-tasking serine/threonine kinase with crucial roles in many major signaling processes in the brain and has recently proposed to promote most of the key steps involved in the neuronal dysfunction associated with AD including tau hyperphosphorylation and increased β -amyloid production (Hooper et al., 2008). In vitro and in vivo overexpression of GSK-3 β has been shown to result in apoptotic neuronal cell death (reviewed in Beurel and Jope, 2006; Bhat et al., 2000b; Hetman et al., 2000; Lucas et al., 2001). GSK-3 β has also been involved in memory formation through mechanisms controlling synaptic function and synaptic plasticity and transgenic mice overexpressing GSK-3 β exhibited pronounced impairment in spatial memory and long-term potentiation (LTP) in CA1 and dentate gyrus (Hernandez et al., 2002). CREB-mediated gene expression plays a critical role in the best established form of synaptic plasticity related to learning, long-term potentiation (LTP), (reviewed in Barco et al.,

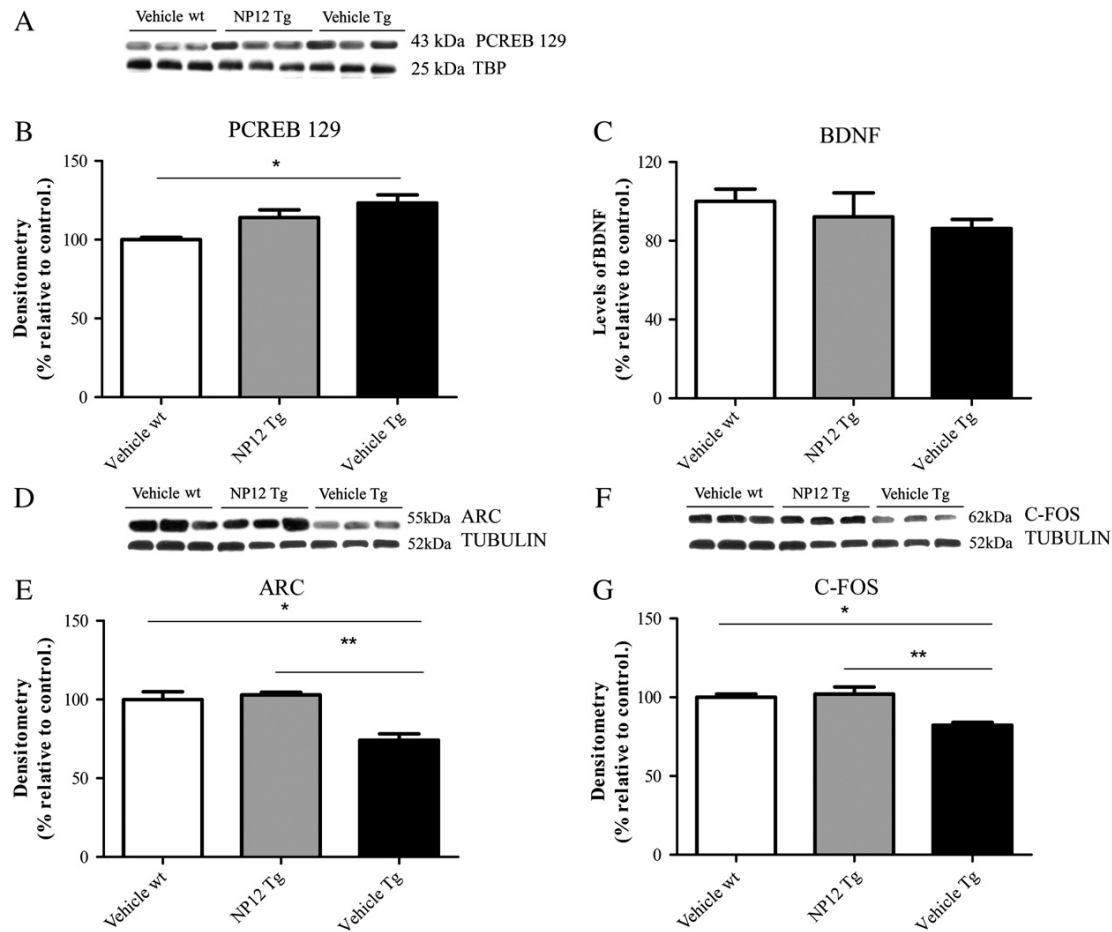


Fig. 10. (A–H) A significant increase in GSK-3 β mediated inhibitory phosphorylation at serine 129 of CREB and concordant significant decreases in the amount of c-fos and ARC were observed in brain extracts from 15 month-old APP^{sw}-tau^{vlw} mice in comparison to similarly aged wt mice. These changes were fully rescued by pharmacological inhibition of GSK-3 β in APP^{sw}-tau^{vlw} mice. Data are derived from n = 3 animals per group. *p < 0.05 ** p < 0.01 ***p < 0.001.

2002; Josselyn and Nguyen, 2005; Lonze and Ginty, 2002). Importantly, CREB DNA binding activity is inhibited by phosphorylation by GSK-3 β and facilitated by lithium, the first known GSK-3 inhibitor (Grimes and Jope, 2001). We had previously demonstrated an age-dependent aberrant increase in GSK-3 β activity in the hippocampi of transgenic mice overexpressing human mutant APP and tau (APP^{sw}-tau^{vlw} line) accompanying learning and memory deficits exhibited by these mice in the Morris water maze and contextual fear conditioning paradigms (Sereno et al., 2009). Moreover, we have recently demonstrated that memory impairment can be completely prevented in these mice by sustained pharmacological inhibition of GSK-3 β (Sereno et al., 2009). These results suggest that the synaptic dysfunction and memory retention deficits that occur in AD patients and animal AD models might result, at least in part, from aberrantly increased GSK-3 β activity and the resulting inhibition of the transcriptional program mediated by CREB.

In the present study, we have shown that exposure of neurons in culture to Tg2576 CM, which contains high levels of naturally secreted A β , and to oligomeric A β isolated from human brain, trigger aberrant activation of GSK-3 β and this can be blocked by immunodepletion of the Tg2576 CM with an A β -specific antibody and by treatment with TDZD-8 which inhibits GSK-3 β (Fig. 3). In this model, GSK-3 β activation results in turn in decreased expression of one of the CREB targeted genes involved in synaptic plasticity, BDNF (Fig. 9). Importantly,

aberrant activation of GSK-3 β and decreased levels of two of the CREB transcriptional targets extensively implicated in synaptic plasticity and neuronal survival, ARC and BDNF, were also found in AD postmortem temporal cortex, indicating that the increase in the activity of this enzyme and the compromise of CREB signaling pathway also occurs in AD. Moreover, in cultures, GSK-3 β inhibition provided very significant neuroprotection from Tg2576 CM and restored BDNF levels (Figs. 5 and 9).

GSK-3 β activation has profound effects on spine density and morphology. We show in cultures that overexpression of GSK-3 β is sufficient to mimic the A β induced neurodegenerative phenotype in the absence of A β (dendritic spine loss and reduction in the proportion of thin and mushroom spines) (Figs. 2 and 5), and transfection of neurons with a constitutively active form of GSK-3 β results in a complete loss of dendritic spines (Fig. 5) further favoring the idea that aberrant activation of this enzyme has a dramatic detrimental effect on neuron sculpture. GSK-3 β inhibition in cultured neurons was associated with increases in spine density and the proportion of stubby spines and these effects may be mediated by BDNF signaling, as it has been shown in CA1 pyramidal neurons of hippocampal slice cultures (Chapleau et al., 2008), reinforcing the notion that CREB-dependent transcription plays a key role in spine remodeling. GSK-3 β inhibition in the mouse brain completely rescued the A β -related neurite morphological changes that occur both far from and near plaques, decreased the level of the inhibitory phosphorylation

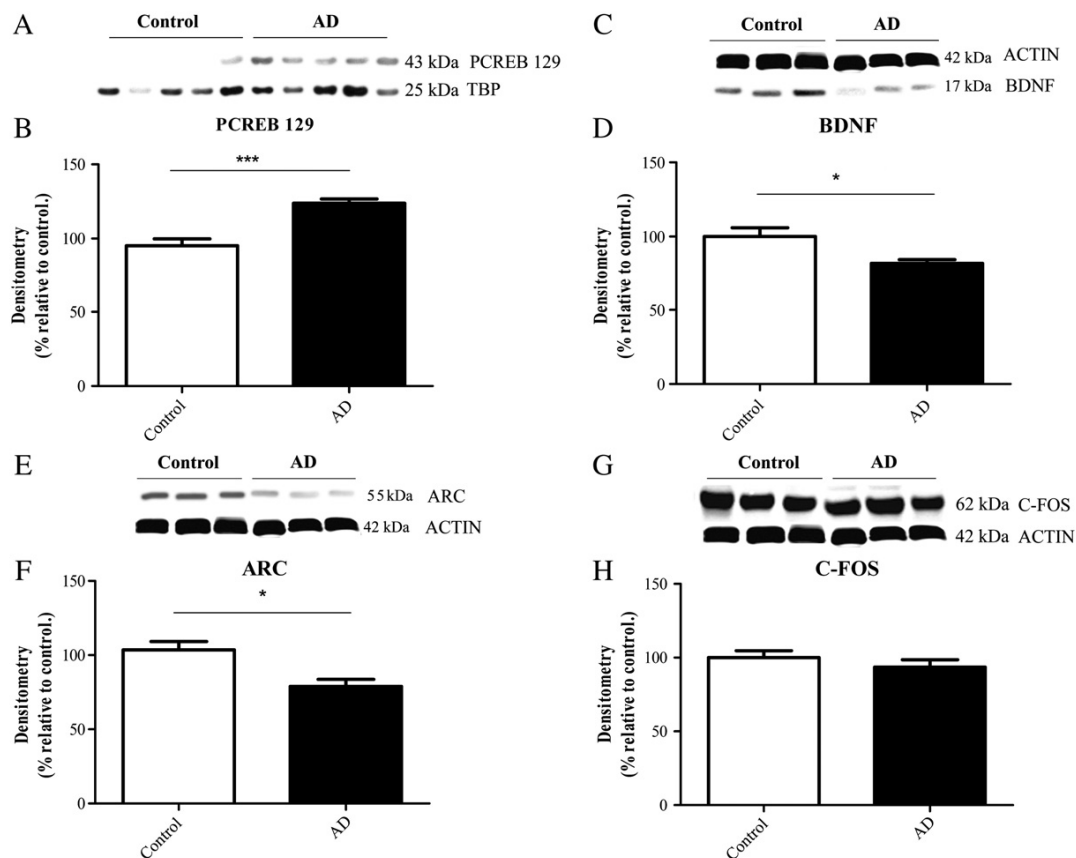


Fig. 11. (A–H) A significant increase in the inhibitory phosphorylation at serine 129 of CREB and a decrease in the levels of ARC and BDNF were observed in the temporal cortex of AD brains in comparison to cognitively normal controls. Data are derived from $n=11-12$ brains per group. * $p<0.05$ *** $p<0.001$.

of CREB at Serine 129 and restored the level of expression of two of CREB target genes, c-fos and ARC (Figs. 8 and 10) confirming in vivo relevance of our in vitro observations. All together these data point to a pivotal role of GSK-3 β activation and CREB signaling pathway in A β -related neurite alterations, providing a mechanistic link between aberrant activation of GSK-3 β , inhibition of CREB transcriptional targets, and A β -induced morphological disruption of neural systems both in vitro and in vivo. GSK3 β is reportedly the predominant NFAT kinase, and inhibits NFAT activity (Beurel et al., 2010). Our prior work (Wu et al., 2010) suggested that increased (rather than decreased) NFAT activity mediated by calcineurin activation disrupts neurite structure around plaques. We have confirmed that oligomeric A β exposure increases the levels of nuclear NFAT in cultured neurons (data not shown), despite concomitant increase in GSK-3 β activity, and this is consistent with the idea that calcineurin/NFAT is one of the signaling pathway involved in A β toxicity. The finding reported here that GSK-3 β activation alone, even in the absence of A β , is sufficient to produce a phenocopy of A β -induced dendritic spine loss in neurons in culture provides evidence for the involvement of multiple mechanisms (e.g. calcineurin/NFAT activation, GSK-3 β activation/CREB inhibition) in A β mediated neurotoxicity. Interestingly, nuclear NFAT levels did not increase after treatment with TDZD-8, as it could be predicted a priori. We argue that this is most likely mediated by the reported agonistic effect of TDZD compounds on the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-gamma) (Luna-Medina et al., 2007). It has been previously shown that PPAR-gamma agonists and overexpression of PPAR-gamma inhibit the nuclear translocation of NFAT in different human cell types, pointing to a cross-talk between PPAR-gamma and calcineurin/NFAT (Yang et al., 2000.; Bao et al., 2008).

Thus, some of the effects of TDZDs on neurite changes may be mediated in part by PPAR-gamma agonism in addition to GSK-3 β inhibition, and this reinforces the potential usefulness of these compounds in AD.

Interestingly, sustained pharmacological GSK-3 β inhibition robustly decreases the amount of total A β plaques and oligomeric A β deposits in the brain of APP^{sw}-tau^{viw} mice, (Fig. 7) favoring a model where, on the one hand, activation of GSK-3 β lies downstream of soluble A β neurotoxic effects and, on the other hand, inhibition of this enzyme impacts oligomeric brain A β accrual in vivo. These observations are in agreement with recent data showing reduction of A β 42 levels upon GSK-3 inhibition in a *Drosophila* model of AD (Sofola et al., 2010), and point to a direct role of GSK-3 in the regulation of A β levels. The mechanism/s responsible for the reduction of brain A β deposition observed after pharmacological inhibition of GSK-3 β in the APP^{sw}-tau^{viw} mouse model need now to be elucidated.

One important implication of our results is that they confirm that A β induces aberrant activation of GSK-3 β (Akiyama et al., 2005; Kim et al., 2003; Ryan and Pimplikar, 2005) and we now show that aberrantly increased activity of GSK-3 β in neurons causes loss of dendritic spines and spine morphological alterations. Although activation of GSK-3 has multiple effects, including tau phosphorylation, regulation of APP processing/A β production, activation of NF-kB and its proinflammatory targeted genes, and inhibition of multiple transcription factors involved in cell fate and survival (reviewed in Jope et al., 2007), and thus it is possible that A β exposure induces neurotoxicity through many different mechanisms, our in vitro and in vivo data are consistent with the possibility that GSK-3 β inhibition of the transcriptional program mediated by CREB plays a prominent role in the

A β triggered neurodegenerative process. Moreover, our results implicate a soluble form of A β , likely oligomeric, as the responsible bioactive molecule that mediates the neuronal alterations that occur near plaques (Koffie et al., 2009). A second relevant implication of our results is that increased activity of GSK-3 β produces a phenocopy of these A β effects. Importantly, either immunodepletion of A β or pharmacological inhibition of GSK-3 β can inhibit these changes and lead to recovery of spine density and neurite structure. Moreover, our current data show that pharmacological reduction of aberrantly increased GSK-3 β activity not only blocks the morphological changes induced by A β on neuronal processes but also decreases brain oligomeric A β accrual in vivo, reinforcing the importance of this therapeutic strategy and the disease-relevance of these observations. However, our in vitro data also alert about potential adverse effects of excessive GSK-3 β inhibition on dendritic spines. Concordant with these data a recent study showed that administration of a novel ATP competitive GSK3 inhibitor (SB216763) to wt mice induced inflammation and behavioral deficits further indicating that the window to safely achieved beneficial GSK-3 inhibition needs to be carefully defined.

Finally, our results suggest that GSK-3 β and CREB mediated transcriptional program play a major role in neural sculpting. It has been established that GSK-3 β has a prominent role in memory and CREB-mediated gene expression plays a critical role in the best established form of synaptic plasticity related to learning, long-term potentiation (LTP), (Barco et al., 2002; Josselyn and Nguyen, 2005; Lonze and Ginty, 2002). However, a major role for GSK-3 β -CREB mediated transcriptional events in neurite remodeling in the adult brain or in disease conditions as we observed here has not been previously reported. Our data favor a model where the neurotoxic and structural damage effects of A β accrual may be mediated, at least in part, by aberrant activation of GSK-3 β and its consequent inhibition of CREB mediated transcriptional program providing a molecular mechanism of neurodegeneration in AD and further evidence that inhibition of GSK-3 β has the potential to be a disease-modifying strategy in this devastating disorder.

References

- Akiyama, H., et al., 2005. Pin1 promotes production of Alzheimer's amyloid beta from beta-cleaved amyloid precursor protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336, 521–529.
- Aplin, A.E., et al., 1997. Effect of increased glycogen synthase kinase-3 activity upon the maturation of the amyloid precursor protein in transfected cells. *Neuroreport* 8, 639–643.
- Bao, Y., et al., 2008. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits endothelin-1-induced cardiac hypertrophy via the calcineurin/NFAT signaling pathway. *Mol. Cell. Biochem.* 317, 189–196.
- Barco, A., et al., 2002. Expression of constitutively active CREB protein facilitates the late phase of long-term potentiation by enhancing synaptic capture. *Cell* 108, 689–703.
- Beurel, E., Jope, R.S., 2006. The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Prog. Neurobiol.* 79, 173–189.
- Beurel, E., et al., 2010. Innate and adaptive immune responses regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK3). *Trends Immunol.* 31, 24–31.
- Bhat, R.V., et al., 2000a. Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta in cellular and animal models of neuronal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 11074–11079.
- Bhat, R.V., et al., 2000b. Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta in cellular and animal models of neuronal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 11074–11079.
- Bijur, G.N., Jope, R.S., 2003. Glycogen synthase kinase-3 beta is highly activated in nuclei and mitochondria. *Neuroreport* 14, 2415–2419.
- Bijur, G.N., et al., 2000. Glycogen synthase kinase-3beta facilitates staurosporine- and heat shock-induced apoptosis. Protection by lithium. *J. Biol. Chem.* 275, 7583–7590.
- Bito, H., Takemoto-Kimura, S., 2003. Ca(2+)/CREB/CBP-dependent gene regulation: a shared mechanism critical in long-term synaptic plasticity and neuronal survival. *Cell Calcium* 34, 425–430.
- Blalock, E.M., et al., 2004. Incipient Alzheimer's disease: microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2173–2178.
- Bourne, J., Harris, K.M., 2007. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr. Opin. Neurobiol.* 17, 381–386.
- Chapleau, C.A., et al., 2008. The actions of BDNF on dendritic spine density and morphology in organotypic slice cultures depend on the presence of serum in culture media. *J. Neurosci. Methods.* 169, 182–190.
- Coma, M., et al., 2010. Triflusal reduces dense-core plaque load, associated axonal alterations and inflammatory changes, and rescues cognition in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 38, 482–491.
- D'Amore, J.D., et al., 2003. In vivo multiphoton imaging of a transgenic mouse model of Alzheimer disease reveals marked thioflavine-S-associated alterations in neurite trajectories. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62, 137–145.
- DaRocha-Souto, B., et al., 2011. Brain oligomeric beta-amyloid but not total amyloid plaque burden correlates with neuronal loss and astrocyte inflammatory response in amyloid precursor protein/tau transgenic mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 70, 360–376.
- Gomez-Isla, T., et al., 1996. Clinical and pathological correlates of apolipoprotein E epsilon4 in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 39, 62–70.
- Grimes, C.A., Jope, R.S., 2001. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog. Neurobiol.* 65, 391–426.
- Hardy, J., Allsop, D., 1991. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 383–388.
- Hardy, J., Selkoe, D.J., 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353–356.
- Hashimoto, T., et al., 2002. CLAC: a novel Alzheimer amyloid plaque component derived from a transmembrane precursor, CLAC-P/collagen type XXV. *EMBO J.* 21, 1524–1534.
- Hernandez, F., et al., 2002. Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express GSK-3beta in the brain but do not form tau filaments. *J. Neurochem.* 83, 1529–1533.
- Hetman, M., et al., 2000. Role of glycogen synthase kinase-3beta in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal. *J. Neurosci.* 20, 2567–2574.
- Hooper, C., et al., 2008. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 104, 1433–1439.
- Hsiao, K., et al., 1996. Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274, 99–102.
- Irizarry, M.C., et al., 1997. A β deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse. *J. Neurosci.* 17, 7053–7059.
- Johnson-Wood, K., et al., 1997. Amyloid precursor protein processing and A β 42 deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 1550–1555.
- Jope, R.S., et al., 2007. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochem. Res.* 32, 577–595.
- Josselyn, S.A., Nguyen, P.V., 2005. CREB, synapses and memory disorders: past progress and future challenges. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* 4, 481–497.
- Kim, J.W., et al., 2003. Glycogen synthase kinase 3 beta is a natural activator of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase 1 (MEK1). *J. Biol. Chem.* 278, 13995–14001.
- Knowles, R.B., et al., 1999. Demonstration by fluorescence resonance energy transfer of a close association between activated MAP kinase and neurofibrillary tangles: implications for MAP kinase activation in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 1090–1098.
- Koffie, R.M., et al., 2009. Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 4012–4017.
- Kosik, K.S., 1992. Cellular aspects of Alzheimer neurofibrillary pathology. *Prog. Clin. Biol. Res.* 379, 183–193.
- Lee, E.B., et al., 2006. Targeting amyloid-beta peptide (A β) oligomers by passive immunization with a conformation-selective monoclonal antibody improves learning and memory in A β precursor protein (APP) transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 281, 4292–4299.
- Leroy, K., et al., 2007. Increased level of active GSK-3beta in Alzheimer's disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurones at different stages of neurofibrillary degeneration. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 33, 43–55.
- Li, M., et al., 2000. Cyclic AMP promotes neuronal survival by phosphorylation of glycogen synthase kinase 3beta. *Mol. Cell. Biol.* 20, 9356–9363.
- Lombardo, J.A., et al., 2003. Amyloid-beta antibody treatment leads to rapid normalization of plaque-induced neuritic alterations. *J. Neurosci.* 23, 10879–10883.
- Lonze, B.E., Ginty, D.D., 2002. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35, 605–623.
- Lucas, J.J., et al., 2001. Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *EMBO J.* 20, 27–39.
- Luna-Medina, R., et al., 2007. NP031112, a thiazolidinone compound, prevents inflammation and neurodegeneration under excitotoxic conditions: potential therapeutic role in brain disorders. *J. Neurosci.* 23, 5766–5776.
- Martinez, A., et al., 2002. First non-ATP competitive glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3beta) inhibitors: thiazolidinones (TDZD) as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* 45, 1292–1299.
- Pap, M., Cooper, G.M., 1998. Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. *J. Biol. Chem.* 273, 19929–19932.
- Pei, J.J., et al., 1997. Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 70–78.
- Perez, M., et al., 2005. Characterization of a double (amyloid precursor protein-tau) transgenic: tau phosphorylation and aggregation. *Neuroscience* 130, 339–347.
- Peters, A., Kaiserman-Abramof, I.R., 1970. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *Am. J. Anat.* 127, 321–355.
- Phiel, C.J., et al., 2003. GSK-3alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature* 423, 435–439.

- Pittenger, C., Kandel, E., 1998. A genetic switch for long-term memory. *C. R. Acad. Sci. III* 321, 91–96.
- Ribe, E.M., et al., 2005. Accelerated amyloid deposition, neurofibrillary degeneration and neuronal loss in double mutant APP/tau transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* 20, 814–822.
- Ryan, K.A., Pimplikar, S.W., 2005. Activation of GSK-3 and phosphorylation of CRMP2 in transgenic mice expressing APP intracellular domain. *J. Cell Biol.* 171, 327–335.
- Sereno, L., et al., 2009. A novel GSK-3beta inhibitor reduces Alzheimer's pathology and rescues neuronal loss in vivo. *Neurobiol. Dis.* 35, 359–367.
- Shankar, G.M., et al., 2008. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat. Med.* 14, 837–842.
- Snider, B.J., et al., 2009. Cerebrospinal fluid biomarkers and rate of cognitive decline in very mild dementia of the Alzheimer type. *Arch. Neurol.* 66, 638–645.
- Sofola, O., et al., 2010. Inhibition of GSK-3 ameliorates Abeta pathology in an adult-onset *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *PLoS Genet.* 6.
- Spires, T.L., et al., 2005. Activity-dependent regulation of synapse and dendritic spine morphology in developing barrel cortex requires phospholipase C-beta1 signalling. *Cereb. Cortex.* 15, 385–393.
- Spires-Jones, T.L., et al., 2009. Passive immunotherapy rapidly increases structural plasticity in a mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol. Dis.* 33, 213–220.
- Takashima, A., et al., 1998. Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3beta and its substrate tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 9637–9641.
- Townsend, M., et al., 2006. Effects of secreted oligomers of amyloid beta-protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers. *J. Physiol.* 572, 477–492.
- Trachtenberg, J.T., et al., 2002. Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature* 420, 788–794.
- Woodgett, J.R., 1990. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J.* 9, 2431–2438.
- Wu, H.Y., et al., 2010. Amyloid beta induces the morphological neurodegenerative triad of spine loss, dendritic simplification, and neuritic dystrophies through calcineurin activation. *J. Neurosci.* 30, 2636–2649.
- Yang, X.Y., et al., 2000. Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists. PPAR-gamma co-association with transcription factor NFAT. *J. Biol. Chem.* 275, 4541–4544.

10.2. Anexo 2

doi:10.1093/brain/awt171

Brain 2013; 136; 2510–2526 | 2510

BRAIN
A JOURNAL OF NEUROLOGY

Dissecting phenotypic traits linked to human resilience to Alzheimer's pathology

Beatriz G. Perez-Nievas,¹ Thor D. Stein,¹ Hwan-Ching Tai,¹ Oriol Dols-Icardo,¹ Thomas C. Scotton,¹ Isabel Barroeta-Espar,¹ Leticia Fernandez-Carballo,¹ Estibaliz Lopez de Munain,¹ Jesus Perez,¹ Marta Marquie,¹ Alberto Serrano-Pozo,¹ Mathew P. Frosch,¹ Val Lowe,² Joseph E. Parisi,³ Ronald C. Petersen,⁴ Milos D. Ikonomic,^{5,6} Oscar L. López,⁵ William Klunk,⁷ Bradley T. Hyman¹ and Teresa Gómez-Isla¹

1 Massachusetts General Hospital ADRC, Harvard University, Boston, MA, USA

2 Department of Diagnostic Radiology, Mayo Clinic and Foundation, Rochester, MN, USA

3 Laboratory Medicine and Pathology, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA

4 Department of Neurology, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA

5 Department of Neurology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, USA

6 Geriatric Research Education and Clinical Center, VA Pittsburgh Healthcare System Pittsburgh, Pennsylvania, United States

7 Departments of Psychiatry and Neurology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA, USA

Correspondence to: Teresa Gómez-Isla, MD, PhD,
Neurology Department,
Massachusetts General Hospital,
15th Parkman St, Boston MA 02114,
USA
E-mail: tgomezisla@partners.org

Clinico-pathological correlation studies and positron emission tomography amyloid imaging studies have shown that some individuals can tolerate substantial amounts of Alzheimer's pathology in their brains without experiencing dementia. Few details are known about the neuropathological phenotype of these unique cases that might prove relevant to understanding human resilience to Alzheimer's pathology. We conducted detailed quantitative histopathological and biochemical assessments on brains from non-demented individuals before death whose brains were free of substantial Alzheimer's pathology, non-demented individuals before death but whose post-mortem examination demonstrated significant amounts of Alzheimer's changes ('mismatches'), and demented Alzheimer's cases. Quantification of amyloid- β plaque burden, stereologically-based counts of neurofibrillary tangles, neurons and reactive glia, and morphological analyses of axons were performed in the multimodal association cortex lining the superior temporal sulcus. Levels of synaptic integrity markers, and soluble monomeric and multimeric amyloid- β and tau species were measured. Our results indicate that some individuals can accumulate equivalent loads of amyloid- β plaques and tangles to those found in demented Alzheimer's cases without experiencing dementia. Analyses revealed four main phenotypic differences among these two groups: (i) mismatches had striking preservation of neuron numbers, synaptic markers and axonal geometry compared to demented cases; (ii) demented cases had significantly higher burdens of fibrillar thioflavin-S-positive plaques and of oligomeric amyloid- β deposits reactive to conformer-specific antibody NAB61 than mismatches; (iii) strong and selective accumulation of hyperphosphorylated soluble tau multimers into the synaptic compartment was noted in demented cases compared with controls but not in mismatches; and (iv) the robust glial activation accompanying amyloid- β and tau pathologies in demented cases was remarkably reduced in mismatches. Further biochemical measurements of soluble amyloid- β species—monomers, dimers and higher molecular weight oligomers—in total brain homogenates and synaptoneurosomal preparations failed to demonstrate significant differences between mismatches and demented cases. Together, these data suggest that amyloid- β plaques and tangles do not inevitably result in neural system derangement and dementia in all

Received January 23, 2013. Revised April 12, 2013. Accepted May 10, 2013. Advance Access publication July 3, 2013
© The Author (2013). Published by Oxford University Press on behalf of the Guarantors of Brain. All rights reserved.
For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

individuals. We identified distinct phenotypic characteristics in the profile of brain fibrillar and soluble amyloid- β and tau accrual and in the glial response that discriminated demented and non-demented individuals with high loads of Alzheimer's pathology. Amyloid- β deposition in the form of fibrillar plaques and intimately related oligomeric amyloid- β assemblies, hyperphosphorylated soluble tau species localized in synapses, and glial activation emerged in this series as likely mediators of neurotoxicity and altered cognition, providing further insight into factors and pathways potentially involved in human susceptibility or resilience to Alzheimer's pathological changes.

Keywords: Alzheimers disease; amyloid pathology; tau pathology; resilience; astrocytes; microglia

Introduction

Increasing evidence suggests that there can be dissociation between occurrence of Alzheimer's disease pathology and clinical symptoms of dementia. In the Nun Study, where individuals volunteered for autopsy regardless of symptoms, 12% of participants with intact cognition at time of death had abundant amyloid- β plaques and neurofibrillary tangles, the two chief pathological hallmarks of Alzheimer's disease, at post-mortem examination (Riley *et al.*, 2005). Consistent with these observations, data from the Religious Orders Study and the Memory and Aging Project showed that one-third of brains from older people without cognitive impairment demonstrated enough Alzheimer's disease lesions to meet pathological criteria for Alzheimer's disease (Schneider *et al.*, 2009). Amyloid neuroimaging has made it possible to identify amyloid deposition *in vivo* (Klunk *et al.*, 2004) and recent studies have suggested that Pittsburgh compound B binds to fibrillar amyloid- β deposits (Lockhart *et al.*, 2007; Ikonomic *et al.*, 2008). Elevated Pittsburgh compound B retention has been reported in >20% of clinically unimpaired elderly volunteers (Lopresti *et al.*, 2005; Mintun *et al.*, 2006; Rowe *et al.*, 2007; Aizenstein *et al.*, 2008). Altogether, the above data suggest that some individuals can remain asymptomatic for dementia while alive despite having substantial amounts of Alzheimer's disease pathology in their brains.

Little is known about these unique cases that may prove valuable to identify factors and pathways responsible for human resilience to Alzheimer's disease and help guide the design of novel neuroprotective therapies. In fact, fundamental questions remain unanswered. Why do they not get demented? Are their neurons and synapses truly preserved? Is the form of amyloid- β or tau (the two main components of plaques and tangles, respectively) accumulated in the brain e.g. soluble amyloid- β /tau species versus fibrillar plaques/tangles; what determines structural damage and impaired cognition in Alzheimer's disease?

It has been recently proposed that soluble amyloid- β , and specifically soluble oligomeric forms of amyloid- β , rather than plaques themselves, could play a larger role in synaptic and neuronal damage and cognitive impairment in Alzheimer's disease (Selkoe, 1991; Shankar *et al.*, 2008; Mc Donald *et al.*, 2010). Favouring this possibility, recent data in humans suggested that soluble amyloid- β oligomers strongly correlate with cognitive impairment in Alzheimer's disease (Tomic *et al.*, 2009; Mc Donald *et al.*, 2010). Alternatively, or in addition to soluble amyloid- β , forms of soluble tau could also play a substantial role in neural system disruption and altered cognition in Alzheimer's disease. Supporting

this notion, two recent studies identified potentially neurotoxic soluble tau species that correlated with memory loss and neuronal cell loss in the absence of tangles in the brain of mouse tauopathy models and patients with Alzheimer's disease and frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17) (Berger *et al.*, 2007; Hampton *et al.*, 2010).

The present study was designed to test the idea that amyloid- β plaques and tangles do not inevitably result in neural system derangement and dementia in all individuals, and that a differential profile in brain accrual of potentially neurotoxic soluble amyloid- β and/or tau species may explain human resilience to Alzheimer's disease pathology. To confirm or refute these hypotheses, we conducted detailed quantitative neuropathological and biochemical assessments on post-mortem brain samples containing the banks of the superior temporal sulcus from (i) non-demented individuals before death whose post-mortem examination demonstrated absence of substantial Alzheimer's disease pathology; (ii) non-demented individuals before death but whose post-mortem examination demonstrated abundant Alzheimer's disease pathology (we refer to them as 'mismatches'); and (iii) individuals with Alzheimer's disease pathology and dementia. Our results suggest that some individuals may accumulate equivalent burdens of amyloid- β plaques and neurofibrillary tangles in high order association cortex to those found in demented cases with Alzheimer's disease without experiencing dementia or suffering substantial structural damage in their neuronal populations. Indeed, mismatches had striking preservation of neuronal and synaptic elements and axonal geometry despite high levels of Alzheimer's disease pathology. We did not find significant differences between mismatches and demented cases when we measured soluble species of amyloid- β (monomers, dimers and higher molecular weight oligomers) in whole brain homogenates or synaptoneurosomal preparations using western blot and ELISA assays. However, we observed significantly higher loads of fibrillar thioflavin S-reactive plaques and oligomeric amyloid- β deposits recognized by conformation-specific antibody NAB61, and aberrant accumulation of hyperphosphorylated soluble tau in synapses in demented cases. These differential phenotypic traits in demented cases were accompanied by a robust glial response, with a significant increase in the number of reactive astrocytes and microglial cells that was markedly reduced in mismatches. Altogether, our results suggest that the load of classical fibrillar thioflavin-S-reactive plaques in the brain, but not the amount of total amyloid- β plaques (fibrillar plus non-fibrillar) or tangles, and some of the changes preferentially associated with that subset of plaques (e.g. oligomeric amyloid- β deposits, aberrant accumulation of soluble phospho-tau into the

synaptic compartment, and glial reaction) predict anatomical neural system disruption and dementia, and differentiate classical demented cases with Alzheimer's disease from individuals who seem to tolerate high loads of Alzheimer's disease pathology in their brains.

Material and methods

Human brain samples

The study included 50 cases combined from Massachusetts General Hospital, Mayo Clinic and University of Pittsburgh ADRC Brain Banks. Cases were scored by the Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD) scale for neuritic plaques (A–C) and Braak stage for neurofibrillary tangles (0–VI). According to the National Institute on Aging and Reagan Institute, there is a high probability of a diagnosis of Alzheimer's disease if there are frequent neuritic plaques and high Braak stage of neurofibrillary tangles (CERAD C, Braak V/VI), an intermediate probability if there is a moderate density of neuritic plaques and neurofibrillary tangles in a limbic distribution (CERAD B, Braak III/IV), and a low probability if there is a scarce distribution of neuritic plaques and neurofibrillary tangles (CERAD A and Braak I/II) (The NIA-RIA Working group, 1997). Cases were divided in four groups according to these criteria: (i) non-demented individuals before death whose post-mortem exam demonstrated low probability of Alzheimer's disease, termed 'controls' ($n = 15$); (ii) non-demented individuals before death but whose post-mortem examination demonstrated intermediate probability of Alzheimer's disease, termed 'intermediate probability mismatches' ($n = 12$); (iii) non-demented individuals before death but whose post-mortem examination demonstrated high probability of Alzheimer's disease, termed 'high probability mismatches' ($n = 8$); and (iv) demented individuals before death whose post-mortem examination demonstrated high probability of Alzheimer's disease, termed 'cases with Alzheimer's disease' ($n = 15$). One-third of non-demented cases, including three of eight high probability mismatches, had been clinically seen with formal cognitive evaluation within 2 years of death. The rest were individuals with no reported dementia according to their clinical records and death certificates. Histological evaluation was performed on a set of blocked regions representative for a spectrum of neurodegenerative diseases; all blocks were stained with Luxol fast blue and haematoxylin and eosin, and selected blocks were stained for Bielschowsky silver stain and amyloid- β , alpha-synuclein, ubiquitin and phospho-tau immunoreactivity. Neuropathological diagnosis was recorded, and cases with evidence of brain infarcts, cortical Lewy bodies or other lesions different to Alzheimer's disease pathology were excluded.

Quantitative neuropathology

Quantitative neuropathological assessments were performed in multimodal association cortex lining the upper and lower bank of the superior temporal sulcus that consistently undergoes amyloid- β deposition, neurofibrillary tangle formation and neuronal loss in Alzheimer's disease (Gomez-Isla *et al.*, 1997). Morphological phenotypes were derived by immunostaining 50- μ m thick formalin

fixed sections with 10D5 antibody to label amyloid- β plaques (1:50, Elan Pharmaceuticals), NAB61 antibody to label oligomeric amyloid- β deposits (1:100, kind gift of Dr. Virginia Lee, University of Pennsylvania) (Lee *et al.*, 2006), PHF-1 antibody to label neurofibrillary tangles (1:100, kind gift of Dr. Peter Davies), NeuN antibody to label neurons (1:200; Chemicon), GFAP antibody to label activated astrocytes (1:500, Chemicon) and CD68 antibody to label activated microglia (1:100, Dako), followed by the appropriate secondary antibody (horseradish peroxidase anti-mouse or anti-rabbit IgG 1:200, Southern Biotechnology; Vector ABC Kit). Sections were also stained with thioflavin-S for fibrillar amyloid- β plaques and analysed using a microscope equipped with a digital camera, linked to a computerized image analysis system running Bioquant software (R and M Biometrix). Amyloid- β plaque deposition was quantified according to protocols previously published (Gomez-Isla *et al.*, 1997; Irizarry *et al.*, 1997). Total amyloid- β plaque burden, defined as total percentage of superior temporal sulcus per section covered by 10D5 immunostained deposits; fibrillar amyloid- β plaque burden defined as total percentage of superior temporal sulcus per section covered by thioflavin-S positive amyloid- β plaques; and average plaque size were calculated in each case. Stereologically-based counts of neurofibrillary tangles, neurons, GFAP-positive astrocytes and CD68-positive microglial cells were performed as previously described (West and Gundersen, 1990; Gomez-Isla *et al.*, 1996). Superior temporal sulcus cortical thickness was measured on Nissl stained sections as additional measure of anatomical integrity.

Axonal trajectory and morphology analyses

To visualize axons, tissue was incubated with SMI-312 antibody (1:1000, Covance Research Products) and a secondary anti-mouse antibody conjugated with cyanine 3 (1:200, Jackson ImmunoResearch), and then counterstained with thioflavin-S (0.05% in 50% ethanol). Analysis of axonal ratio curvature was conducted using ImageJ software from the NIH and according to previously published protocols (Spires-Jones *et al.*, 2009). Axon segments longer than 20 μ m were analysed and their curvature ratio was calculated by dividing the curvilinear length of the axon segment by the straight line length of the process. Axons closer than 50 μ m to a plaque were defined as 'close to plaques' and others as 'far from plaques'. Number of neuritic dystrophies per plaque (size of dystrophies defined as areas of neurite swelling $>2.5 \mu$ m in diameter) was also assessed.

Measures of synaptic markers and soluble amyloid- β and tau species in total brain homogenates and synaptoneuroosomes

Levels of postsynaptic density protein 95 (PSD-95), a postsynaptic marker, and synaptophysin, a presynaptic marker, were measured in total homogenates from frozen samples containing the superior temporal sulcus by SDS-PAGE immunoblotting technique using the appropriate primary (PSD-95 1:1000 Cell Signaling; Synaptophysin

1:1000 Millipore) and secondary antibodies (horseradish peroxidase anti-mouse or anti-rabbit IgG 1:2000, Bio-Rad). Amyloid- β monomers and oligomers were detected in frozen samples containing the superior temporal sulcus sequentially extracted with Tris-buffered saline (TBS), 1% TritonTM X-100 and 2% SDS. Total homogenates were centrifuged at 260 000 g for 30 min at 4°C, and the supernatant was collected as the Tris-buffered saline soluble fraction. The pellet was detached and an equivalent volume of 1% TritonTM X-100 was added. Then the pellet was homogenized and centrifuged at 260 000 g for 30 min at 4°C, and the supernatant was collected as the Triton-X soluble fraction. This second pellet was detached and an equivalent volume of 2% SDS was added. The pellet was again homogenized, the tubes were kept at 37°C for 30 min, then centrifuged at 260 000 g for 30 min at room temperature, and the supernatant was collected as the SDS soluble fraction. Three different methods were used to detect and quantify soluble amyloid- β species: (i) SDS-PAGE immunoblotting with a mixture of two amyloid- β N-terminal monoclonal antibodies, 82E1 (IBL) and 6E10 (Covance), to increase detection sensitivity (Hashimoto *et al.*, 2012); (ii) two-site sandwich ELISA kit (Wako) that uses the well-characterized BNT77/BA27 antibody pair to detect amyloid- β_{40} , following the manufacturer's protocol. Briefly, samples were loaded in duplicates onto microplates pre-coated with antibody specific to amyloid- β_{11-28} , BNT77 and detected with horseradish peroxidase-conjugated BA27 antibody, which specifically detects the C terminus of amyloid- β_{40} . The absorbance of each well at 450 nm was determined with a 96-plate reader (Wallac 1420 VICTOR2, Perkin Elmer); and (iii) human amyloid- β oligomers (82E1-specific) assay kit (IBL International), based on a same site sandwich phase ELISA specific for dimers and higher molecular weight amyloid- β oligomers, following the manufacturer's protocol. In brief, samples were loaded in quadruplicates onto microplates pre-coated with 82E1 and detected with horseradish peroxidase-conjugated 82E1, a mouse monoclonal antibody that recognizes the N-terminus of human amyloid- β specifically, with two or more epitopes. The absorbance of each well at 450 nm was determined with a 96-plate reader (Wallac 1420 VICTOR2, Perkin Elmer). Amyloid- β monomers and dimers were also detected and measured in synaptoneurosomes prepared according to previously published protocols as briefly described below (Tai *et al.*, 2012), by SDS-PAGE immunoblotting and 82E1 plus 6E10 antibodies.

Levels of soluble tau were assessed in cytosolic and synaptic fractions from frozen samples containing the superior temporal sulcus using western blot and specific antibodies against human tau (H7, Dako) and phospho-tau (PHF-1, kind gift of Dr. Peter Davies). Synaptoneurosomes were prepared from ~250 mg of frozen tissue (grey matter). Tissue was homogenized in 1.5 ml cold Buffer A (25 mM HEPES, pH 7.9, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 1 mM dithiothreitol, protease inhibitors, phosphatase inhibitors) using a Teflon-glass mechanical tissue grinder at 170 rpm and filtered through 80 μ m pore filters. A small portion of the filtrate was supplemented with 1.5% SDS, boiled for 5 min, and centrifuged at 15 000 g for 15 min, and the supernatant was collected as total extract. The other portion was further filtered through 5 μ m pore filters and centrifuged at 1000g for 10 min to pellet synaptoneurosomes. The supernatant was

collected as cytosolic extract, which was further centrifuged at 100 000 g for 30 min to remove microsomes. The synaptoneurosome pellet was washed once with cold Buffer A and centrifuged again at 1000 g for 10 min. The pellet was extracted with 0.5 ml Buffer B (50 mM Tris pH 7.5, 1.5% SDS, 2 mM dithiothreitol) and boiled for 5 min. After centrifugation at 15 000 g for 15 min, the supernatant was collected as synaptoneurosomal extract. Synaptophysin and PSD-95 were used for purity control of the extracts.

Statistical analyses

Kolmogorov-Smirnov test was used for analysis of normality. For variables with normal distribution one-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* comparison was used to detect differences among groups. Non-parametric Kruskal-Wallis one-way ANOVA and Dunn's multiple comparison test were used to detect differences among groups for variables with non-normal distributions. In all tests the level of significance was at $P < 0.05$. Data are presented as mean \pm standard error, unless otherwise indicated.

Results

Table 1 summarizes the descriptive statistics for demographics and quantitative neuropathological assessments. Average age at death mismatches with high and intermediate probability was about a decade older than the overall average life expectancy in the USA, 78.1 years in 2008 according to the National Center for Health Statistics (Arias, 2012), indicating that mismatches were generally long-lived individuals. Controls and demented cases with Alzheimer's disease were selected to match the ages of mismatches.

Total amyloid- β plaque burden and number of neurofibrillary tangles in the superior temporal sulcus region did not distinguish high probability mismatches from demented Alzheimer's disease cases

The percentage of superior temporal sulcus covered by 10D5-positive amyloid- β deposits (total amyloid- β plaque burden), including diffuse and fibrillar amyloid- β plaques, was significantly higher in demented cases with Alzheimer's disease compared with intermediate probability mismatches and controls (Table 1, Fig. 1A and B) but did not significantly differ from high probability mismatches. Number of neurofibrillary tangles in the superior temporal sulcus was also significantly higher in demented cases with Alzheimer's disease than in intermediate probability mismatches but did not significantly differ from that found in high probability mismatches (Table 1, Fig. 1C and D). Controls were essentially free of neurofibrillary tangles in this area. These data indicate that some individuals (high probability mismatches) may remain free of dementia despite having accumulated amounts of

Table 1 Descriptive statistics for demographics and quantitative neuropathological assessments

	Control (n = 15)	Intermediate probability mismatches (n = 12)	High probability mismatches (n = 8)	Alzheimer's disease (n = 15)
Age (years)	84.44 ± 3.20	89.82 ± 2.72	88.4 ± 6.01	87.2 ± 3.22
10D5 Amyloid- β plaque burden (%)	1.25 ± 0.56	3.58 ± 0.88	6.49 ± 1.55*	10.7 ± 1.13***
Thioflavin-S plaque burden (%)	0.28 ± 0.15	1.14 ± 0.45	0.55 ± 0.22	2.75 ± 0.7**
NAB61 oligomeric burden (%)	0.31 ± 0.14	1.34 ± 0.54	0.66 ± 0.41	4.79 ± 0.72***
NFTs/50- μ m thick section	7 ± 3	40 ± 12	5509 ± 1536***	6670 ± 1122***
Neurons/50- μ m thick section	171 070 ± 9457	159 808 ± 12 255	160 858 ± 5055**	104 721 ± 2322***
Cortical thickness (μ m)	3035 ± 116	2955 ± 83	3154 ± 188	2421 ± 99**
GFAP-positive astrocytes/50- μ m thick section	7243 ± 1811	6497 ± 1,117	5759 ± 1,157	14 728 ± 1959*
CD68-positive microglia/50- μ m thick section	1435 ± 688.1	2994 ± 1,441	2208 ± 1066	15 748 ± 2580**

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ versus control.

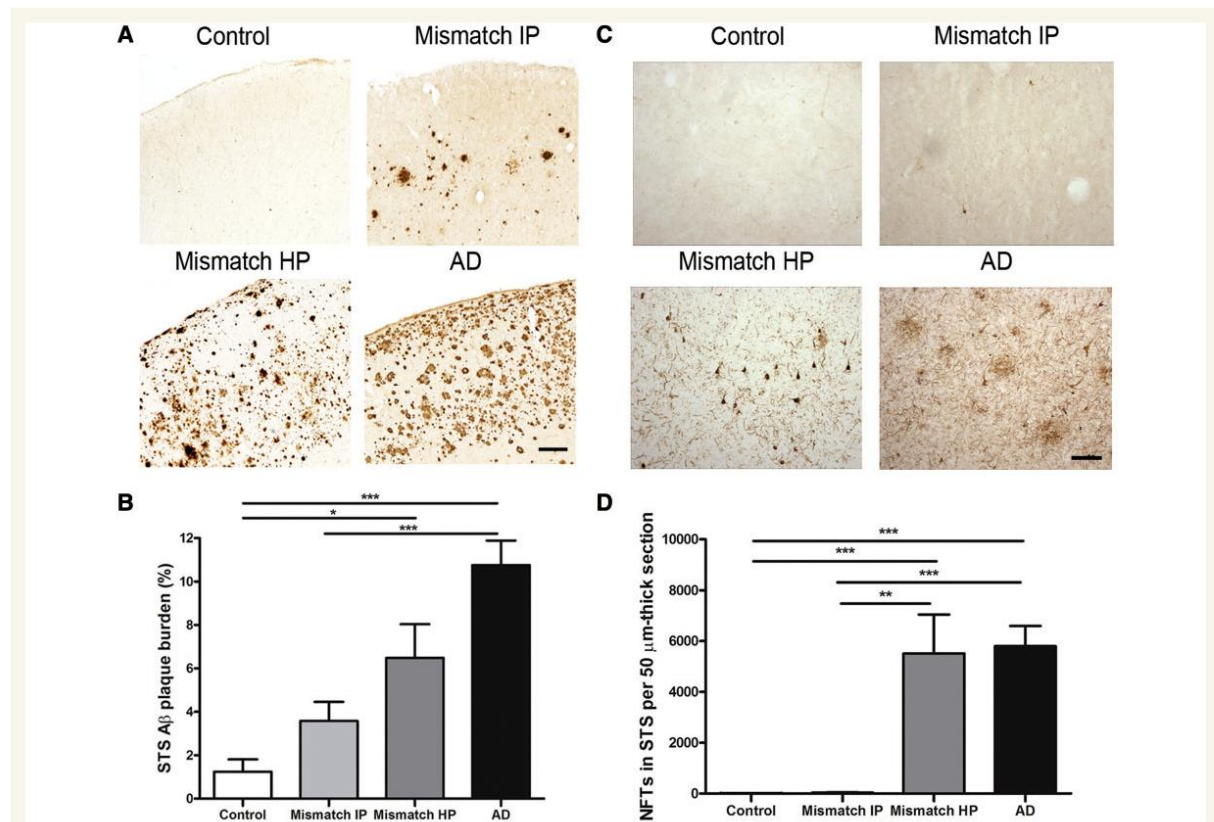


Figure 1 Amyloid- β plaque burden and number of neurofibrillary tangles in the superior temporal sulcus (STS). (A) Representative photomicrographs of 10D5 immunostained plaques in the superior temporal sulcus. (B) Demented cases with Alzheimer's disease (AD) had a significantly higher amyloid- β plaque burden in the superior temporal sulcus when compared with intermediate probability mismatches (Mismatch IP) and controls. No significant differences were found between demented cases with Alzheimer's disease and high probability mismatches (Mismatch HP). (C) Representative photomicrographs of PHF-1 immunostained neurofibrillary tangles in the superior temporal sulcus. (D) A significantly higher number of neurofibrillary tangles (NFTs) in the superior temporal sulcus were found in demented cases with Alzheimer's disease when compared with intermediate probability mismatches. No significant differences were detected in the number of neurofibrillary tangles between cases with Alzheimer's disease and high probability mismatches. Controls were essentially free of neurofibrillary tangles in this brain area. Scale bar = 150 μ m; $n = 8$ –15 per group; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. One way ANOVA and *post hoc* Tukey test, and Kruskal-Wallis ANOVA and Dunn's multiple comparison test, respectively.

amyloid- β plaques and neurofibrillary tangles in their brains comparable to those seen in demented cases with Alzheimer's disease.

Number of neurons, cortical thickness and markers of synaptic integrity in the superior temporal sulcus were preserved in high probability mismatches but not in demented Alzheimer's disease cases

In Alzheimer's disease brains there is massive neuronal cell death, especially in limbic and association cortices that leads to brain gross atrophy, and loss of pre and postsynaptic structures that likely contribute to neural system dysfunction and cognitive deficits (reviewed in Gomez-Isla *et al.*, 2008). We performed stereological neuronal counts and measured the cortical thickness in the superior temporal sulcus area in this series. In agreement with previous observations (Gomez-Isla *et al.*, 1996) we noted a significant reduction of about 40% in the number of superior temporal sulcus neurons, and of about 20% in the cortical thickness in demented cases with Alzheimer's disease compared with controls whereas no significant neuronal loss or decrease in cortical thickness could be demonstrated in intermediate or high probability mismatches (Fig. 2A and B). Consistent with these results, levels of PSD-95, a prominent scaffolding neuronal component of the postsynaptic density, were significantly decreased by ~50% in demented cases with Alzheimer's disease but unchanged in high probability mismatches in comparison to controls (Fig. 2C). Levels of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein ubiquitously present in presynaptic vesicles, were also significantly lower by about 50% in demented cases with Alzheimer's disease compared to controls, but not in high probability mismatches (Fig. 2D). A trend towards a higher level of PSD-95 and significantly higher levels of synaptophysin were noted in intermediate probability mismatches compared with controls; we believe this may represent an early synaptic compensatory mechanism in individuals with moderate amounts of Alzheimer's disease pathology and no dementia.

The above data confirm previous studies showing substantial loss of neurons in high order association cortex and of synaptic integrity markers in demented cases with Alzheimer's disease (DeKosky and Scheff, 1990; Gomez-Isla *et al.*, 1996, 1997; Giannakopoulos *et al.*, 2003; Scheff and Price, 2003). But they also demonstrate that in some unique human brains these selectively vulnerable neuronal populations, and their synaptic markers, are preserved despite robust amyloid- β deposition and neurofibrillary tangle formation.

Axonal morphology was better preserved in high probability mismatches than in demented Alzheimer's disease cases

Studies in humans and transgenic mice have demonstrated a widespread alteration in the geometry and morphology of dendrites and axons, including disrupted trajectories and dystrophic

swellings, which occurs both near plaques, especially fibrillar thioflavin-S reactive plaques, but also distant from them in Alzheimer's disease (Knowles *et al.*, 1999; Le *et al.*, 2001; D'Amore *et al.*, 2003; Spires *et al.*, 2005; Coma *et al.*, 2010; DaRocha-Souto *et al.*, 2012). These changes likely contribute to altered neural system function and cognitive impairment in Alzheimer's disease. We analysed curvature ratio of axons in the superior temporal sulcus and observed that demented cases with Alzheimer's disease had significantly curvier axons than high probability mismatches and controls (Fig. 3A and B). When distance from a thioflavin-S-positive plaque was taken into account, axons were significantly curvier close to plaques (<50 μ m) than far from them (>50 μ m) both in demented cases with Alzheimer's disease and high probability mismatches (Fig. 3A and B). However, in high probability mismatches axons close to plaques were significantly less distorted than in demented cases with Alzheimer's disease (Fig. 3A and B), and axons far from plaques had normal straight trajectories indistinguishable from control cases, whereas in demented cases with Alzheimer's disease axons far from plaques were also significantly curvier than in controls (Fig. 3B). Moreover, a significantly higher number of neuritic dystrophies were seen in association with thioflavin-S-positive plaques in demented cases with Alzheimer's disease in comparison with high probability mismatches (Fig. 3C). These results demonstrate that the morphology and geometry of axons is much better preserved in high probability mismatches than in demented cases with Alzheimer's disease, despite similar total amyloid- β plaque burdens, and this may explain in part the absence of dementia in the former group.

Thioflavin-S-positive fibrillar plaque load in the superior temporal sulcus region was significantly higher in demented cases with Alzheimer's disease than in high probability mismatches

We investigated whether the amyloid- β phenotype (specific amyloid- β plaque subpopulations and/or soluble amyloid- β species) might impact the differences between mismatches and demented cases. We focused on the so-called 'neuritic' plaques that in general contain a core of amyloid histologically positive for dyes that stain β -pleated sheets and are often surrounded focal areas of neuronal loss and glial activation, dystrophic neurites and oligomeric amyloid- β deposits in Alzheimer's disease brains. Our previous data suggested that this subpopulation of plaques correlates much better than total amount of amyloid- β plaques with neuronal loss and impaired cognition in patients with Alzheimer's disease and transgenic mice (Gomez-Isla *et al.*, 1997; DaRocha-Souto *et al.*, 2011). In agreement with those observations, the superior temporal sulcus fibrillar thioflavin-S-positive plaque burden, but not the total amyloid- β plaque burden, was significantly higher in demented cases with Alzheimer's disease when compared with high probability mismatches (Table 1 and Fig. 4). Interestingly, although the number of fibrillar thioflavin-S-positive plaques did not significantly differ between the two groups (data

not shown), the average plaque size was significantly larger in demented cases with Alzheimer's disease than in high probability mismatches ($1133 \pm 153 \mu\text{m}^2$ versus $131 \pm 4.5 \mu\text{m}^2$, respectively) ($P < 0.001$) accounting for the larger percentage of cortex covered by fibrillar thioflavin-S-positive plaques found in the former group as it is illustrated in Fig. 4.

Levels of soluble amyloid- β species measured by immunoblotting and ELISA did not differ among groups with a high burden of Alzheimer's disease pathology, but NAB61 reactive oligomeric amyloid- β load was higher in demented cases with Alzheimer's disease

It has been proposed that soluble oligomeric amyloid- β species could be a toxic moiety that plays a larger role in synapse and neuronal damage and cognitive impairment than plaques themselves (Selkoe, 1991; Shankar *et al.*, 2008; Mc Donald *et al.*, 2010). If this is correct, soluble amyloid- β levels should predict impaired cognition and disruption of brain anatomy. We measured levels of amyloid- β monomers and dimers in whole brain homogenates containing the superior temporal sulcus using sequential extractions yielding fractions that are hypothesized to be enriched with soluble proteins from distinct anatomical compartments: Tris-buffered saline (extracellular soluble), 1% TritonTM X-100 (intracellular soluble) and 2% SDS (membrane-associated) using specific antibodies against amyloid- β and western blot (Fig. 5A–E). As shown in Fig. 5B and C, the levels of monomeric amyloid- β , corresponding to the band detected at 4 kDa, in the three fractions were significantly higher in demented cases with Alzheimer's disease than in controls but did not significantly differ from those found in high probability mismatches.

Amyloid- β dimers, corresponding to the band detected at 8 kDa, were particularly abundant in the 1% TritonTM X-100 and 2% SDS fractions, and were significantly higher in demented cases with Alzheimer's disease when compared with controls but did not significantly differ from those found in high probability mismatches (Fig. 5B and C). Levels of soluble amyloid- β species were also measured by using a two-site sandwich ELISA that preferentially detects monomers but also amyloid- β oligomers. As shown in Fig. 5D, significantly higher levels of soluble amyloid- β were found in demented cases with Alzheimer's disease compared with controls in Tris-buffered saline and SDS soluble fractions but, in agreement with the data obtained by western blot, no statistically significant differences were demonstrated between high probability mismatches and demented cases with Alzheimer's disease. To further explore these observations, we measured levels of amyloid- β oligomers in the Tris-buffered saline soluble fraction using a specific oligomeric amyloid- β ELISA able to distinguish higher molecular weight amyloid- β assemblies from monomers. As shown in Fig. 5E, this assay detected significantly higher amounts of amyloid- β oligomers in demented cases with Alzheimer's disease

compared with controls but failed to detect differences between high probability mismatches and demented cases with Alzheimer's disease.

We wanted to determine whether levels of soluble amyloid- β peptides segregated into distinct cellular compartments would differentially correlate with cognition and anatomical integrity in the presence of Alzheimer's disease pathology. We prepared synaptic enriched fractions and measured amyloid- β monomers and dimers by western blot using specific antibodies against amyloid- β (Fig. 6B and C). As shown in Fig. 6C levels of amyloid- β monomers and dimers in synaptoneuroosomes were significantly higher in demented cases with Alzheimer's disease compared with controls but did not significantly differ from those found in high probability mismatches.

In contrast, when we measured oligomeric amyloid- β deposits reactive to NAB61, an antibody that preferentially recognizes a conformational epitope present in dimeric, small oligomeric, and higher order amyloid- β structures but not full-length amyloid- β precursor protein (APP) or C-terminal APP (Lee *et al.*, 2006; Koffie *et al.*, 2009), we noted a >5-fold higher NAB61 burden in demented cases with Alzheimer's disease than in high probability mismatches (Table 1, Fig. 6D and E). We believe this observation is particularly noteworthy because it suggests that different methods used to assess amyloid- β oligomers likely report different amyloid- β assemblies, thus limiting direct comparison of results from different assays.

The above data indicate that although biochemical measurements of soluble amyloid- β oligomeric species, based on western blot and sensitive ELISA assays, failed to discriminate demented Alzheimer's disease from high probability mismatches, quantitative immunohistochemical assessment using a conformer-specific antibody revealed a close relationship between oligomeric amyloid- β deposits and anatomical derangement in this series.

Aberrant accumulation of soluble phospho-tau species into the synaptic compartment discriminated demented cases with Alzheimer's disease but not high probability mismatches from controls

An alternate or additional possibility we have investigated is that the tau phenotype (soluble tau species versus neurofibrillary tangles) could contribute to explain the resilience of high probability mismatches to Alzheimer's disease pathology. In addition to the pool of insoluble hyperphosphorylated tau contained in classic neurofibrillary tangles in the cell soma, and in dendrites and dystrophic axons nearby fibrillar amyloid plaques, it has been recently proposed that soluble hyperphosphorylated tau species may substantially contribute to impaired cognition in Alzheimer's disease (Berger *et al.*, 2007; Lasagna-Reeves *et al.*, 2011). We measured levels of soluble tau species in cytosolic and synaptic fractions obtained from samples containing the superior temporal sulcus region by using western blot and specific antibodies against human tau and phospho-tau epitopes. As shown in

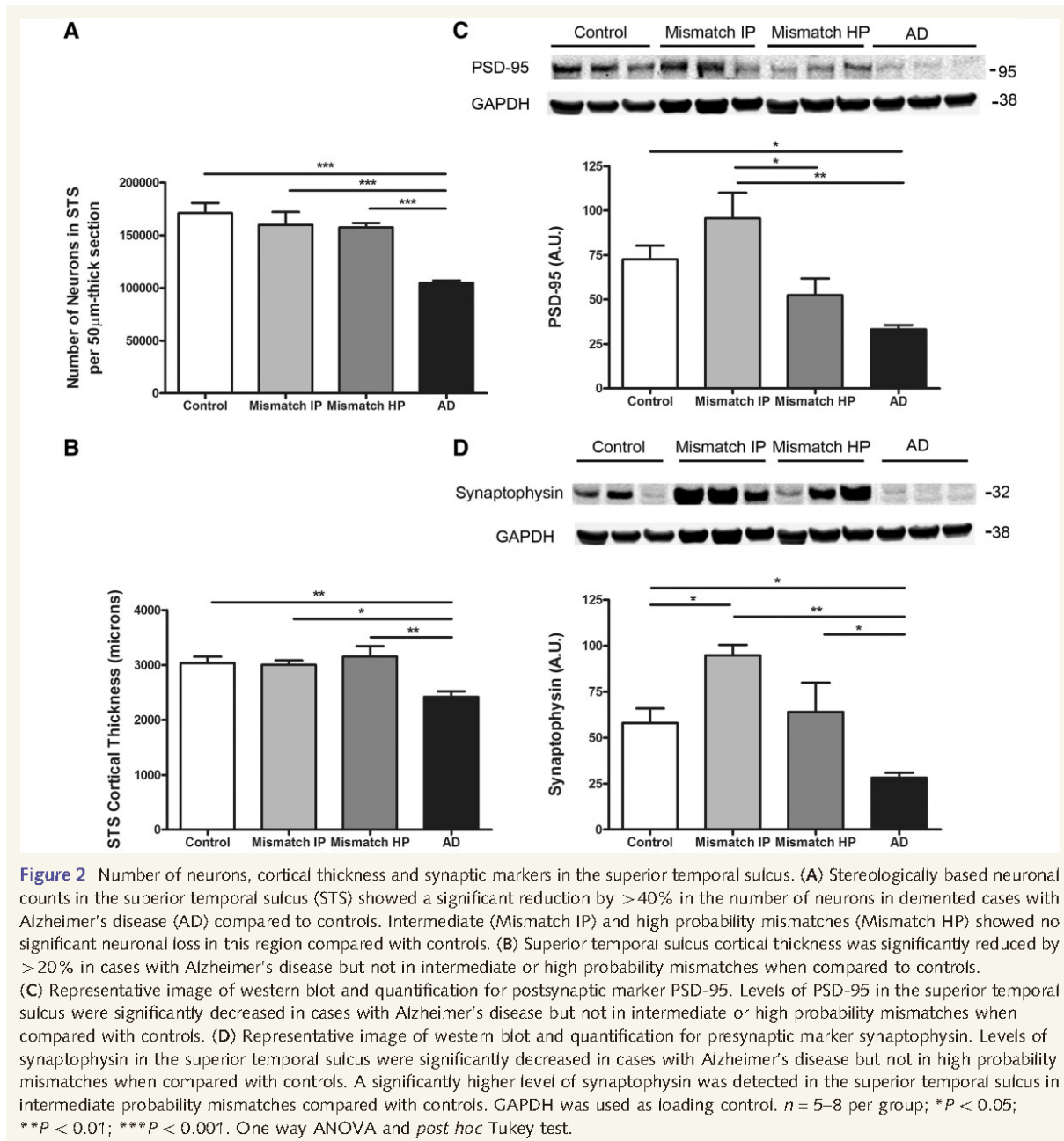


Fig. 7A and B, the majority of tau in controls and high probability mismatches was found in the cytosolic fraction in the form of monomers whereas in demented cases with Alzheimer's disease soluble tau species preferentially accumulated within the synaptic compartment ranging from monomeric (migrating at ~64 kDa) to high molecular weight multimeric forms (75–250 kDa) and were abnormally hyperphosphorylated (Fig. 7C and D). The levels of hyperphosphorylated tau monomers and multimers in synapses were significantly increased in demented cases with Alzheimer's disease but not in high probability

mismatches when compared with controls. Abundant low molecular weight bands (migrating at ~20–50 kDa), likely corresponding to truncated forms of tau, were also observed within the synaptic compartment in demented cases with Alzheimer's disease, but only present in very small quantities or absent in high probability mismatches and controls. These data suggest that aberrant accumulation of soluble hyperphosphorylated tau into synapses might contribute to a greater extent than tangle formation to clinical symptoms and neuronal and synaptic disruption in Alzheimer's disease.

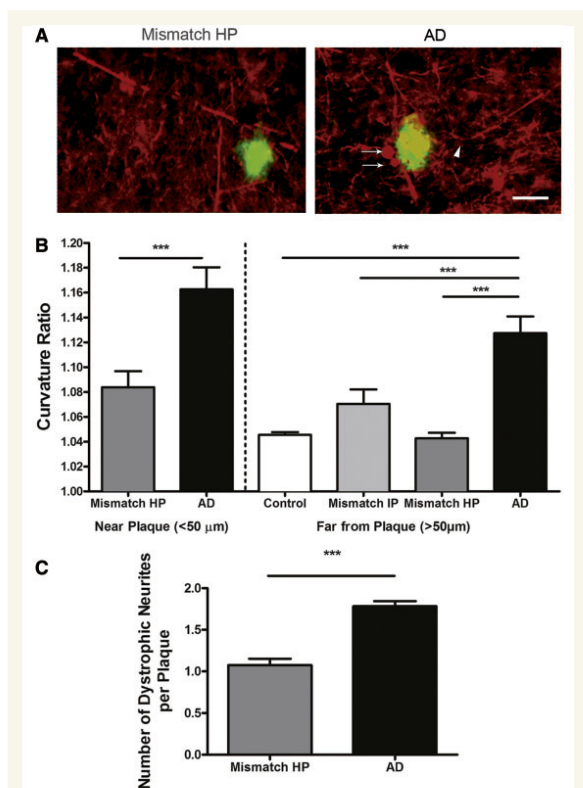


Figure 3 Neurite trajectory analysis. (A) Representative photomicrographs of SMI-312 immunostained axons (red) and thioflavin-S labelled amyloid plaques (green) in the superior temporal sulcus. Arrowhead shows example of curved axonal segment. Arrows show examples of neuritic dystrophies. Scale bar = 50 μm. (B) Demented cases with Alzheimer's disease (AD) had significantly curvier axons close (<50 μm) and far (>50 μm) from plaque than high and intermediate probability mismatches (Mismatch IP and HP) and controls free of Alzheimer's disease pathology (control); *** $P < 0.001$. Mann Whitney test ('close to plaque' analysis) and Kruskal-Wallis ANOVA and Dunn's multiple comparison test ('far from plaque' analysis). (C) The number of dystrophic neurites was significantly higher in cases with Alzheimer's disease compared to high probability mismatches. $n = 172$ – 290 axonal segments 'close to plaque' and 238 – 456 axonal segments 'far from plaque'; *** $P < 0.001$ Mann Whitney test.

Number of GFAP-positive astrocytes and CD68-positive microglia is increased in demented cases with Alzheimer's disease but not in high probability mismatches

Abundant activated glia and release of proinflammatory mediators are consistently identified in association with fibrillar thioflavin-S-positive plaques in Alzheimer's disease brains and transgenic mouse models (McGeer and McGeer, 1996, 2007; Wyss-Coray, 2006).

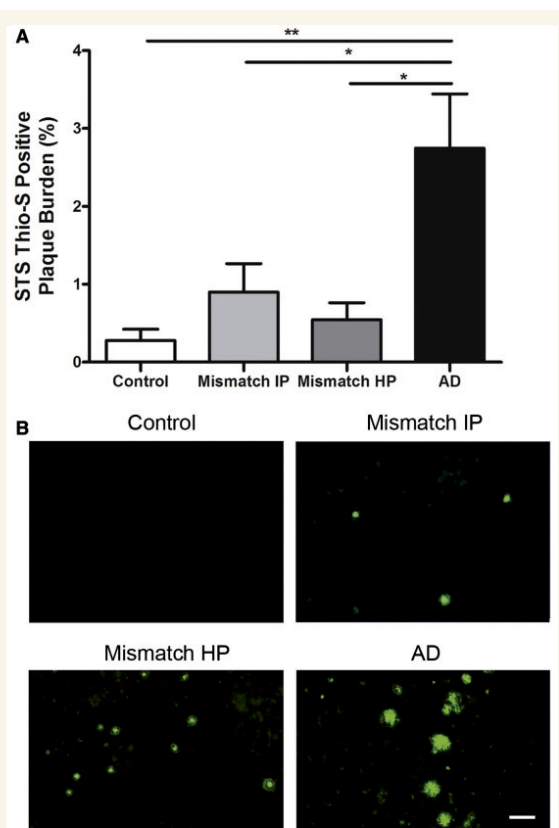


Figure 4 Superior temporal sulcus thioflavin-S-positive amyloid plaque burden. (A) Demented cases with Alzheimer's disease (AD) had a significantly higher thioflavin-S-positive plaque burden in the superior temporal sulcus when compared with intermediate and high probability mismatches (Mismatch HP and IP). $n = 8$ – 10 per group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. One way ANOVA and *post hoc* Tukey test. (B) Representative photomicrographs of thioflavin-S stained plaques in the superior temporal sulcus. Scale bar = 100 μm.

Whether or not glial activation substantially contributes to structural damage and impaired cognition in Alzheimer's disease remains unknown. We performed stereological counts in the superior temporal sulcus of astrocytes stained with an antibody to GFAP, a well-recognized marker of reactive astrocytes, and activated microglial cells stained with an antibody to CD68. We noted a significant increase in the amount of activated astrocytes and microglial cells in demented cases with Alzheimer's disease in comparison with controls but not in intermediate or high probability mismatches (Fig. 8A–D). The robust difference observed in glial cell responses between mismatches and demented cases with Alzheimer's disease suggests that aberrant glial activation might play a deleterious role on neuronal function and integrity in Alzheimer's disease. Alternatively, the lack of activation of these glial elements in mismatches may reflect the relative lack of synaptic and neuronal damage in these cases.

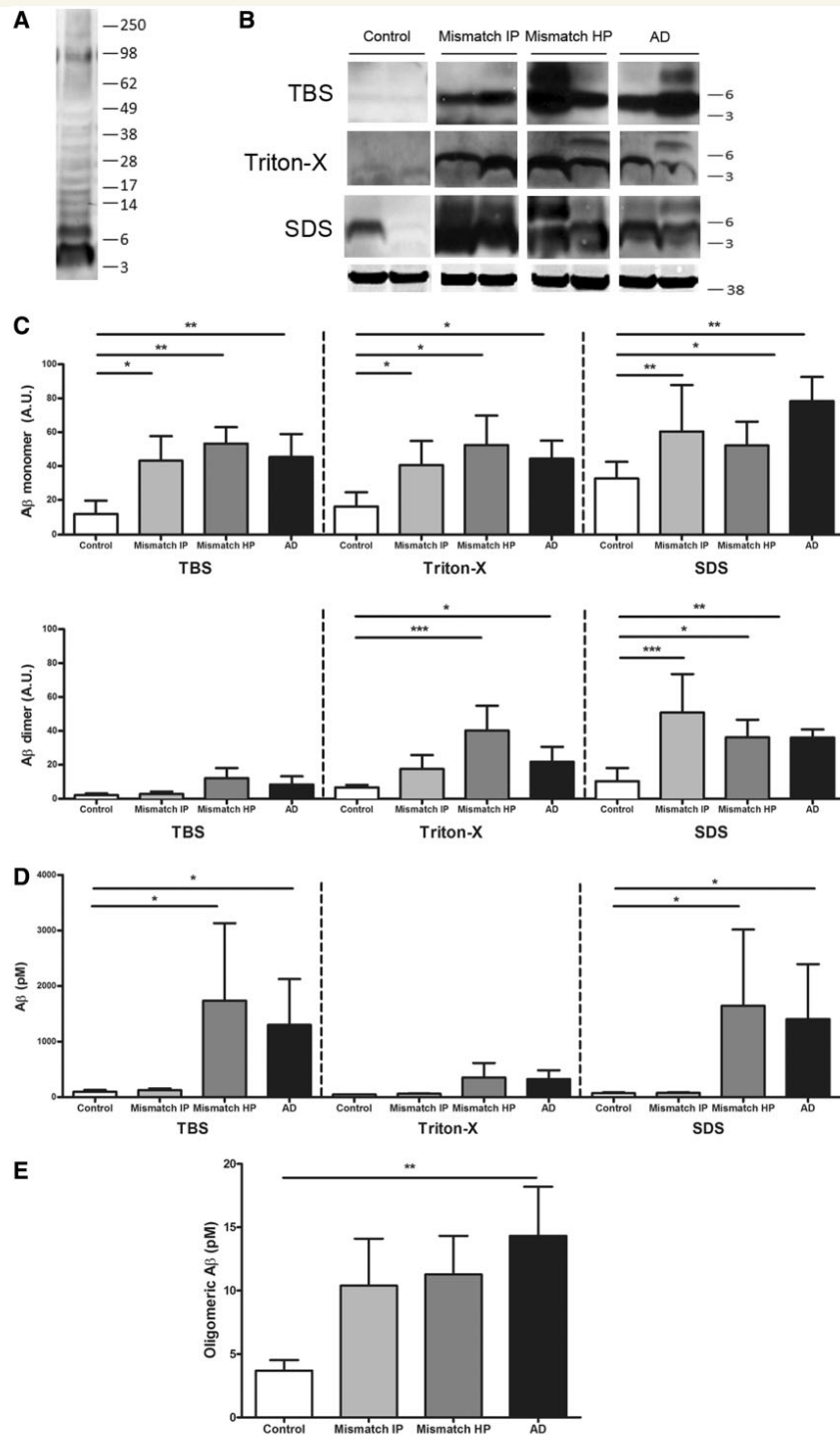


Figure 5 Biochemical analyses of soluble amyloid- β species in serially extracted samples (Tris-buffered saline, 1% TritonTM X-100 and 2% SDS) containing the superior temporal sulcus. (A) Representative image of western blot showing bands recognized by 6E10 plus 82E1 antibodies. (B) Representative image of western blot for amyloid- β monomers (4 kDa) and dimers (8 kDa); GAPDH (38 kDa) is used as loading control. (C) Levels of amyloid- β monomers and dimers by western blot did not significantly differ between demented cases with Alzheimer's disease (AD) and intermediate or high probability mismatches (Mismatch IP and HP) but were significantly higher in all three groups compared to controls (monomers in all three fractions and dimers in TritonTM X-100 and SDS fractions). (D) Two-sandwich ELISA

(continued)

Discussion

Increasing evidence suggests that some individuals can tolerate substantial amounts in their brains of classical Alzheimer's disease lesions, e.g. plaques and tangles, without becoming demented

(Klunk *et al.*, 2004; Lopresti *et al.*, 2005; Riley *et al.*, 2005; Mintun *et al.*, 2006; Rowe *et al.*, 2007; Aizenstein *et al.*, 2008; Schneider *et al.*, 2009). Although these mismatches are infrequent, their study may prove useful for the design of neuroprotective and cognitive sparing therapies in the elderly. Literature

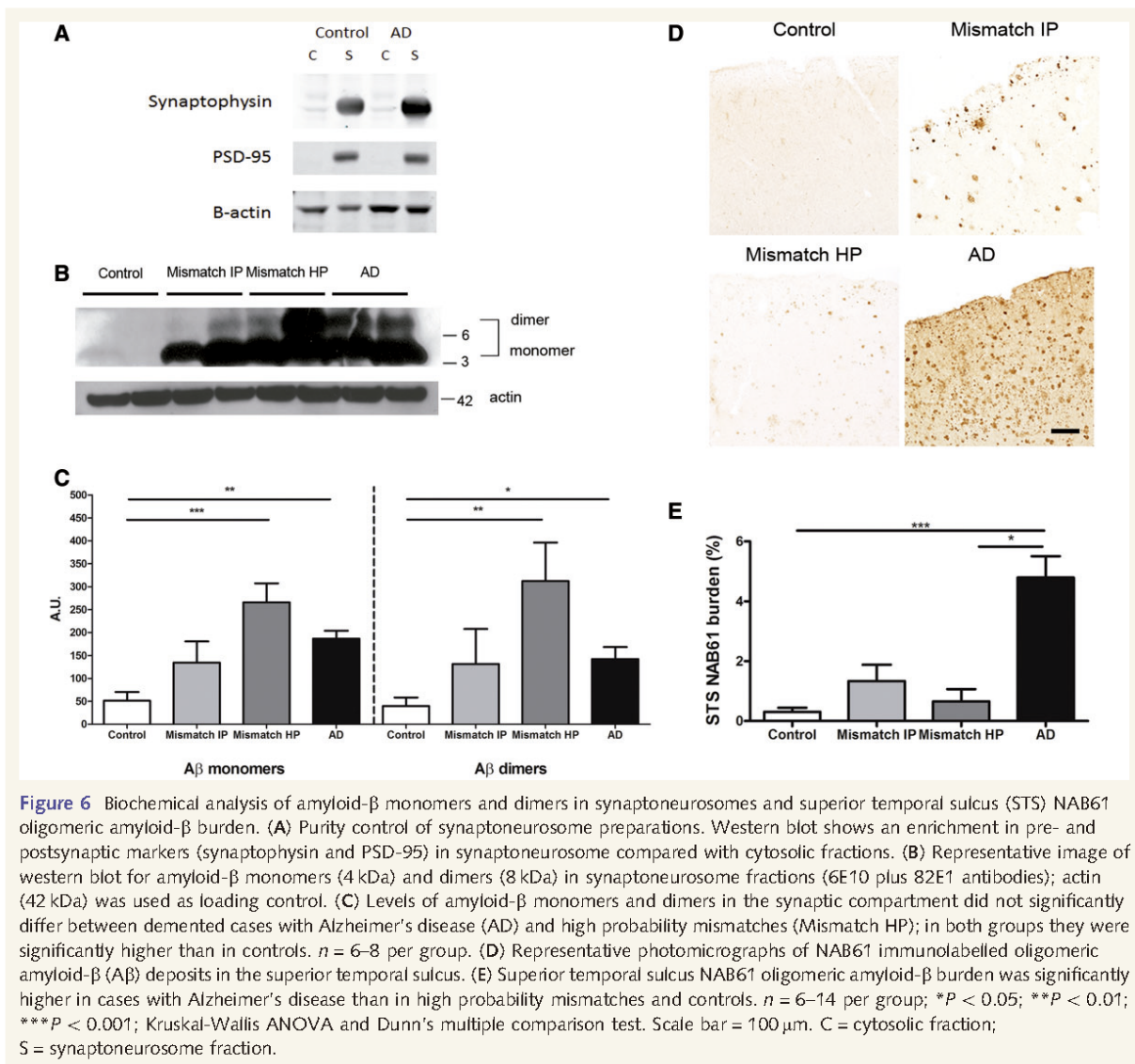


Figure 5 Continued

using BNT77/BA27 antibody pair did not detect significant differences in soluble amyloid- β levels (monomers and oligomers) between cases with Alzheimer's disease and high probability mismatches; in both groups amyloid- β levels were significantly higher in Tris-buffered saline and SDS fractions than in intermediate probability mismatches and controls. (E) Same site sandwich ELISA (82E1), specific for dimers and higher molecular weight amyloid- β species, did not detect significant differences between Alzheimer's disease and high probability mismatches; Alzheimer's disease had significantly higher levels of oligomeric amyloid- β than controls. $n = 7-11$ per group; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; Kruskal-Wallis ANOVA and Dunn's multiple comparison test.

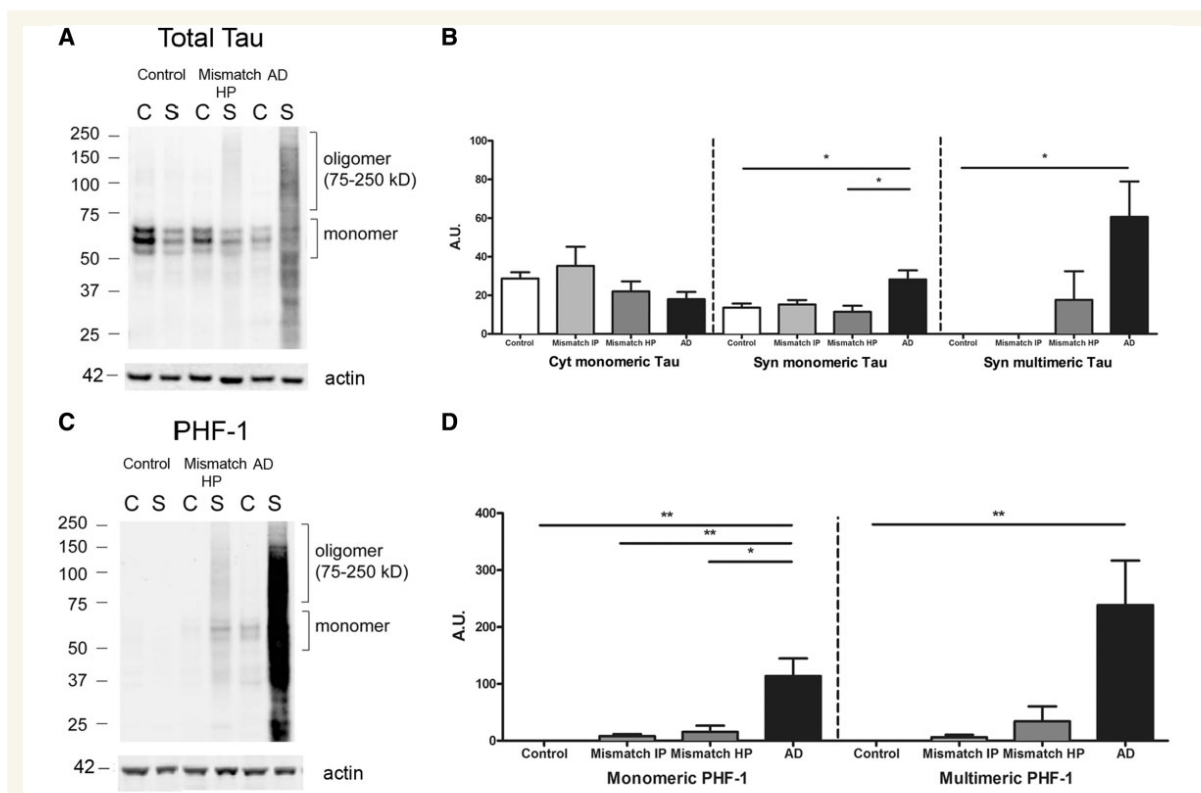
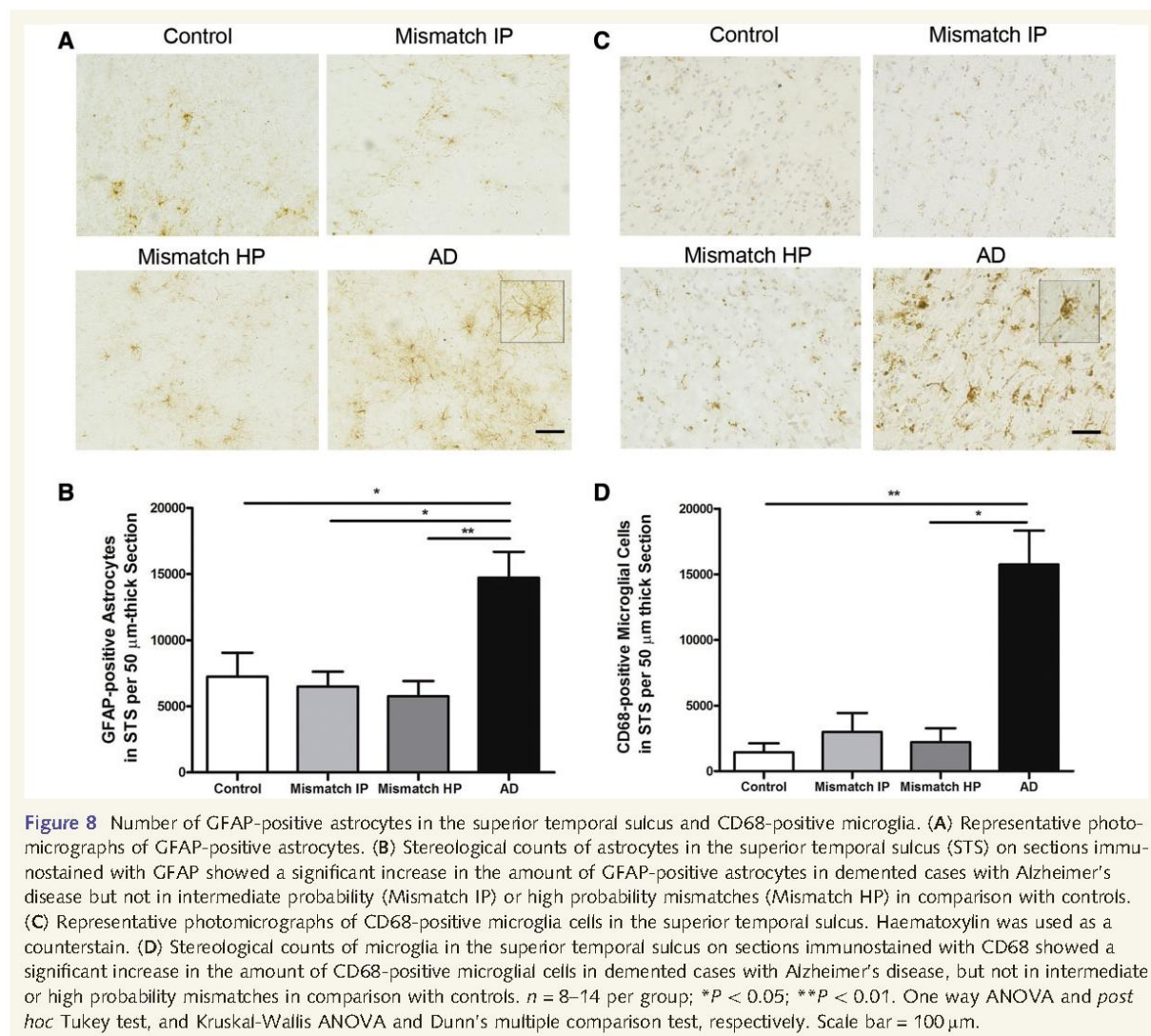


Figure 7 Biochemical analysis of total tau and hyperphosphorylated monomeric and multimeric tau in synaptoneurosomes. (A) Representative images of cytosolic (C) and synaptoneurosomal (S) fractions on western blot for total human tau (H7 antibody) and (C) hyperphosphorylated tau (PHF-1 antibody), showing strong accumulation of tau monomers and multimers at synapses in demented Alzheimer's disease (AD) cases. (B) Quantitative analyses for (C) cytosolic and (S) synaptic total tau and (D) hyperphosphorylated tau showed selective and significantly higher accumulation of monomeric tau (64 kDa) and multimeric tau (75–250 kDa) species in synapses in cases with Alzheimer's disease, but not in intermediate and high probability mismatches (Mismatch IP and HP) when compared with controls. Total levels of tau monomers in the cytosol did not significantly differ between groups. Actin (42 kDa) was used as loading control. $n = 6–9$ per group; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; Kruskal-Wallis ANOVA and Dunn's multiple comparison test.

concerning these unique cases, apparently resilient to Alzheimer's disease pathology, is scarce and fundamental questions remain unanswered. For instance, it is unclear whether the load of Alzheimer's disease pathological lesions in mismatches, when carefully quantified, is comparable to that found in cases with Alzheimer's disease with dementia. Thus, the most parsimonious explanation for the absence of dementia in these cases would be that their plaque and tangle burdens are substantially lower than in demented cases with Alzheimer's disease. Alternatively, despite the accumulation of equivalent amounts of plaques and tangles, some brains may be nonetheless resilient to structural damage assessed in terms of neuronal and synaptic loss, and neuropil disruption. And in this case, the possibility exists that one or more pathological species other than classical tangles or plaques might correlate better with structural brain damage and the consequent neuronal system collapse. For example, recent data have suggested that soluble forms of amyloid- β and tau may play a much larger role in synapse and neuronal damage and clinical symptoms of dementia than plaques and tangles themselves

(Selkoe, 1991; Shankar *et al.*, 2008; De Calignon *et al.*, 2010; McDonald *et al.*, 2012).

Our data support the idea that amyloid- β plaque deposition and tangle formation do not inevitably result in dementia in all individuals. Although an insufficient load of plaques and tangles in the neocortex may explain the absence of dementia in mismatches pathologically classified as intermediate probability of Alzheimer's disease, a rare subset of apparently non-demented individuals that could be classified as high probability of Alzheimer's disease by NIA-RI criteria was identified in this series. Detailed quantitative assessments demonstrated that these high probability mismatches were well matched to demented cases with Alzheimer's disease with regards to amyloid- β plaques and neurofibrillary tangles in the superior temporal sulcus, therefore, we feel these cases represent individuals who seem resistant to Alzheimer's disease pathology. If these cases simply had greater 'reserve' of neurons and synapses, one would expect equivalent degrees of local damage around plaques and equally robust glial inflammatory changes. This was not the case. Instead, further detailed pathological



characterization of these cases provided evidence that their neuronal populations and the morphology of their neurites were remarkably well preserved in comparison with the massive neuronal depopulation and the dramatic distortion of neurite architecture seen in demented cases with Alzheimer's disease. A differential phenotype characterized by a larger cortical load of fibrillar thioflavin-S-reactive plaques and oligomeric amyloid- β deposits labelled by a conformer-specific antibody, aberrant accumulation of hyperphosphorylated soluble tau at synapses and a robust glial cell response differentiated demented cases with Alzheimer's disease from high probability mismatches, pointing to those factors as potential mediators of neurotoxicity and impaired cognition in Alzheimer's disease.

One caveat in our study is that formal neuropsychological evaluation close to death was not available in all cases. Thus, although dementia was not reported in any of the controls or

mismatches, subtle declines in cognition cannot be unequivocally ruled out in some of the cases. However, it should be acknowledged that a high load of Alzheimer's disease pathology in cortical association areas like the superior temporal sulcus is expected to be associated with robust cognitive deficits sufficient to meet criteria for dementia. Thus, we feel confident that cognition in our non-demented mismatches was, being conservative, much better preserved than in demented cases with Alzheimer's disease with a comparable load of Alzheimer's disease pathology in the neocortex.

Studies addressing whether the number of neurons and synapses in subjects with Alzheimer's disease pathology but preserved cognition are comparable to age-matched control subjects free of Alzheimer's disease pathology or substantially decreased are very limited. In a recent study, neuronal densities and pre- and post-synaptic elements in the midfrontal gyrus were found to be

preserved in cognitively normal subjects with high burden of Alzheimer's disease pathology compared with controls free of Alzheimer's disease pathology (Arnold *et al.*, 2013). Of note, in that study no significant decrease in neuronal density was detected in demented cases with Alzheimer's disease. A significant hypertrophy of neuronal cell bodies, nuclei and nucleoli was reported in the cortex and the CA1 region in clinically asymptomatic subjects with Alzheimer's disease pathology from the Nun Study, and it was hypothesized that it might represent an early brain reaction to the presence of plaques and tangles, or a compensatory mechanism that prevents clinical progression to dementia (Iacono *et al.*, 2008, 2009). Our study corroborates that there is neither neuronal loss nor significant decrease of pre- or postsynaptic markers in the superior temporal sulcus of mismatches with neuropathologically high probability of Alzheimer's disease in comparison with similarly aged controls free of substantial classical Alzheimer's disease pathology. As discussed below, the finding of robust differences between these mismatches and demented cases with Alzheimer's disease in the alteration of axonal morphology around plaques and in glial activation argues against a natural protection of mismatches against dementia due to a higher baseline number of neurons and synapses compared with average individuals.

In Alzheimer's disease brains amyloid- β plaques appear in a variety of morphological forms including 'diffuse' plaques, immunoreactive deposits of amyloid- β that do not appear to have a substantial effect on the neuropil and do not incite a glial response, and 'neuritic' plaques that in general contain a core of amyloid that can be stained with dyes like thioflavin-S, and that are surrounded by disruption in the neuropil, local glial activation, and often dystrophic axons and dendrites that contribute to their neuritic component (Dickson and Vickers, 2001). Multiple studies have shown that total amyloid- β plaque load does not correlate well with cognitive impairment in demented subjects with Alzheimer's disease (Arriagada *et al.*, 1992; Gomez-Isla *et al.*, 1997) and numerous diffuse plaques may be present in limbic and neocortical regions in cognitively normal individuals (Arriagada *et al.*, 1992; Morris *et al.*, 1996; Knopman *et al.*, 2003). Our data show similar burdens in the superior temporal sulcus of total amyloid- β plaques in high probability mismatches and demented cases with Alzheimer's disease but a significantly larger load and size of fibrillar thioflavin-S-positive plaques in demented cases further suggesting that this particular subset of plaques is more closely related to dementia and neuronal loss in Alzheimer's disease. Detailed analyses of axonal morphology in this series confirmed a robust distortion of neurite morphology in demented cases with Alzheimer's disease as previously reported (Arriagada *et al.*, 1992; Knowles *et al.*, 1999; Le *et al.*, 2001; Spires *et al.*, 2005). Neurite changes were especially severe close to fibrillar amyloid- β plaques, but could also be demonstrated far from them. Interestingly, the trajectory and morphology of axons was much better preserved in high probability mismatches than in demented cases with Alzheimer's disease, even near plaques. Of note, this cannot be attributed to the smaller average plaque size noted in high probability mismatches as previous studies demonstrated that the higher curvature ratio of axons observed close to plaques is not influenced by the size of the plaque (Serrano-Pozo

et al., 2010). The finding of a relatively spared neurite geometry in high probability mismatches in comparison to demented cases with Alzheimer's disease has two important implications. First, it reinforces the idea that these widespread neurite alterations represent a substantial additional type of lesion in Alzheimer's disease that likely contributes to dementia. And second, it suggests that factors other than the toxic effect of fibrillar amyloid- β deposits themselves, and that are intimately related to them (e.g. oligomeric amyloid- β accrual inside and around plaques and glial cell reaction) may likely contribute to alter the geometry and morphology of neurites in Alzheimer's disease.

The idea that soluble species of amyloid- β ('amyloid- β oligomers'), rather than or in addition to plaques, could be the toxic moiety in Alzheimer's disease brains resolving the central paradox in the field of the lack of correlation between amyloid- β deposits and clinical symptoms or neuronal cell loss has recently gained attention (Selkoe, 1991). Amyloid- β dimers, in particular, directly isolated from Alzheimer's disease brains were reported to impair synaptic plasticity and memory in rodents (Shankar *et al.*, 2008). Some recent studies in humans have suggested that soluble amyloid- β oligomers strongly correlate with cognitive impairment in Alzheimer's disease (Tomic *et al.*, 2009; McDonald *et al.*, 2012). Another study recently reported a weaker correlation of the ratio of amyloid- β oligomers to plaque density in non-demented individuals with high brain plaque burden than in demented cases with Alzheimer's disease (Esparza *et al.*, 2013). However, concerns have been raised regarding difficulties in interpreting and comparing data from different laboratories in the absence of consensus on the exact meaning of the term 'toxic amyloid- β oligomer', the likely existence of a mixture of different species in the amyloid- β oligomeric fractions isolated from human brains, and the lack of a common validated technique to measure amyloid- β oligomers (Benilova *et al.*, 2012). In the present study, biochemical assessments of brain soluble amyloid- β species—monomers, dimers and higher molecular weight assemblies—by western blot and sensitive and specific amyloid- β oligomeric ELISA assays confirmed the presence of significantly higher levels of these species in demented cases with Alzheimer's disease compared with controls, but we could not detect significant differences between high probability mismatches and demented cases. Only when we used immunohistochemistry and a conformation-specific antibody (NAB61), we found a significantly higher burden of oligomeric amyloid- β deposits in demented Alzheimer's disease than in high probability mismatches. NAB61-positive amyloid- β oligomeric deposits were mainly seen decorating the periphery and core of fibrillar plaques, as noted in previous human and mouse studies (Koffie *et al.*, 2009; DaRocha-Souto *et al.*, 2011; Koffie *et al.*, 2012). Of note, NAB61 was effective in normalizing cognition in immunotherapy experiments in transgenic mice suggesting that it can detect neurotoxic amyloid- β species (Lee *et al.*, 2006). Several explanations may reconcile these apparently conflicting results derived from biochemical and immunohistological assessments of amyloid- β oligomers in our series. One possibility is that amyloid- β oligomers recognized by NAB61 might represent a 'toxic' but relatively small fraction of the mixture of soluble amyloid- β species detected by western blot and ELISA assays, as different techniques and antibodies may report different amyloid- β assemblies. It is also

possible that a large proportion of the amyloid- β oligomeric species detected by these biochemical methods might not be naturally occurring in the human brain, but rather be artificially promoted by the extracting technique as recently suggested by others (Watt *et al.*, 2013). In this scenario, the development and validation of analytical tools that reliably measure amyloid- β oligomers in the CSF should help solve these critical uncertainties.

Alternatively, or in addition to soluble forms of amyloid- β , soluble species of tau could play a substantial role in neural system disruption and altered cognition in Alzheimer's disease. Our previous studies (Gomez-Isla *et al.*, 1996, 1997) demonstrated that, although total number of tangles strongly predicts number of neurons lost in Alzheimer's disease brains, the amount of neuronal loss outstrips tangle formation by at least one order of magnitude (Gomez-Isla *et al.*, 1997), suggesting that there are likely nontangle-related mechanisms responsible for neuronal death in Alzheimer's disease. In support of this idea, potentially toxic multimeric tau species were found to strongly correlate with memory loss in brain samples from tau transgenic mice and from patients with Alzheimer's disease and frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (Berger *et al.*, 2007). Moreover, recent studies using *in vivo* multiphoton imaging to observe how tangles form in living tau transgenic mice have shown that caspase activation cleaves tau to initiate tangle formation, but surprisingly, tangle-bearing neurons are long-lived, further favouring the idea that tangles are 'off pathway' to acute neuronal death, and that soluble tau species, rather than tangles, might be the critical toxic moiety underlying neurodegeneration (De Calignon *et al.*, 2010). We have recently shown that, in addition to its well-described axonal localization, normal soluble tau is also present at both presynaptic and postsynaptic terminals in control brains; and synaptic tau becomes hyperphosphorylated and ubiquitinated, and forms stable multimeric assemblies resistant to SDS denaturation in Alzheimer's disease brains (Tai *et al.*, 2012). Here we provide further evidence of an aberrant accrual of soluble monomeric and multimeric species of hyperphosphorylated tau within the synaptic compartment in demented cases with Alzheimer's disease but not in high probability mismatches in comparison with controls. If confirmed in future studies, this would favour the idea that abnormal accumulation of soluble tau species into synapses might be more directly related to neuronal damage and dementia than classic tangles. Of note, the presence of mistargeted soluble tau forms at synapses in demented cases with Alzheimer's disease would argue in favour of the recently suggested neuron-to-neuron propagation of tau pathology in a murine model of early Alzheimer's disease (De Calignon *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012).

Aside from differences in the amyloid- β and tau phenotypes, one of the most striking phenotypic divergences observed in high probability mismatches was the lack of glial activation when compared to demented cases. Although brain inflammation is thought to be an important factor in Alzheimer's disease, how and to what extent it may contribute to synaptic and neuronal damage and altered cognition in Alzheimer's disease remains unknown. In Alzheimer's disease brains glial responses were found to increase linearly with progression of the disease around plaques and tangles (Serrano-Pozo *et al.*, 2011). Two

large genome-wide association studies (Harold *et al.*, 2009; Lambert *et al.*, 2009) have identified receptor for complement C3b, a key regulator of complement activation, as one of the genes that increases the risk for late-onset Alzheimer's disease. More recently, a rare variant in the gene encoding TREM2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2), that is expressed in microglial cells, was found to confer a significant risk of Alzheimer's disease (Jonsson *et al.*, 2013) further supporting the importance of inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease. In transgenic mice, the number of GFAP-positive astrocytes was the parameter most closely correlated with memory impairment and neuronal cell loss (DaRocha-Souto *et al.*, 2011), and treatment with triflusal—an anti-inflammatory drug that inhibits NF- κ B activation—significantly decreased glial activation and rescued alterations in neurite morphology and memory deficits despite lack of reduction of amyloid- β plaque burden (Coma *et al.*, 2010). The above data and the findings reported here favour the idea that aberrant activation of glial elements, rather than reflecting a mere response to neuronal injury, may substantially contribute to neuronal cell damage and neurite changes in Alzheimer's disease. Whether or not glial cell response influences amyloid- β and tau oligomerization/fibrillation and/or neuronal propagation of altered forms of amyloid- β and tau remains unknown. In humans, the expression of an innate pro-inflammatory cytokine profile in middle age offspring with parental history of late-onset Alzheimer's disease was identified as a risk factor of Alzheimer's disease in old age (Van Exel *et al.*, 2009) suggesting that inflammation in early years may contribute to development of Alzheimer's disease pathology and cognitive impairment later in life. In a recent study in mice the use of an adeno-associated viral vector to drive selective astrocyte expression of VIVIT, a peptide that interferes with the inflammatory calcineurin/nuclear factor of activated T cells signalling pathway, improved cognition and decreased glial activation and amyloid levels (Furman *et al.*, 2012). Thus, it is possible that a toxic gain of function and/or the loss of physiological neuroprotective functions of glial cells in the neocortex of demented cases with Alzheimer's disease may account in part for the larger brain accrual of fibrillar amyloid- β plaques and oligomeric amyloid- β deposits, the aberrant accumulation of hyperphosphorylated soluble tau in synapses, and the striking loss of neurons and synaptic markers seen in these cases in comparison to high probability mismatches. Further studies directed at the role of glia in neurodegeneration and altered cognition in Alzheimer's disease are now needed.

In conclusion, our study suggests that some unique individuals can tolerate a high burden of amyloid- β plaques and tangles without experiencing dementia or a substantial disruption in neuronal integrity and neurite architecture. Detailed biochemical and histopathological analyses of such cases selectively identified enhanced accrual of amyloid- β in the form of fibrillar plaques and intimately related oligomeric amyloid- β deposits, accumulation of soluble hyperphosphorylated tau in synapses, and aberrant glial cell reaction as likely mediators of neurotoxicity and altered cognition in Alzheimer's disease, providing further insight into factors and pathways potentially involved in human resilience to Alzheimer's disease pathology.

Acknowledgements

We thank Dr. Peter Davies for kindly providing us PHF-1 antibody and Dr. Virginia Lee for NAB61 antibody.

Funding

This project was funded in part by NIH grant (U01 AG016976 and AG005133). IBE is recipient of a scholarship from Fundacion Alfonso Martin Escudero.

References

- Aizenstein HJ, Nebes RD, Saxton JA, Price JC, Mathis CA, Tsopelas ND, et al. Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly. *Arch Neurol* 2008; 65: 1509–17.
- Arias E. United States life tables, 2008. *Natl Vital Stat Rep* 2012; 61: 3.
- Arnold SE, Louneva N, Cao K, Wang LS, Han LY, Wolk DA, et al. Cellular, synaptic, and biochemical features of resilient cognition in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2013; 34: 157–68.
- Arriagada PV, Marzloff K, Hyman BT. Distribution of Alzheimer-type pathologic changes in nondemented elderly individuals matches the pattern in Alzheimer's disease. *Neurology* 1992; 42: 1681–88.
- Benilova I, Karran E, De SB. The toxic Abeta oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat Neurosci* 2012; 15: 349–57.
- Berger Z, Roder H, Hanna A, Carlson A, Rangachari V, Yue M, et al. Accumulation of pathological tau species and memory loss in a conditional model of tauopathy. *J Neurosci* 2007; 27: 3650–62.
- Coma M, Sereno L, Da Rocha-Souto B, Scotton TC, España J, Sánchez MB, et al. Triflusal reduces dense-core plaque load, associated axonal alterations and inflammatory changes, and rescues cognition in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 2010; 38: 482–91.
- D'Amore JD, Kajdasz ST, McLellan ME, Bacskai BJ, Stern EA, Hyman BT. *In vivo* multiphoton imaging of a transgenic mouse model of Alzheimer disease reveals marked thioflavine-S-associated alterations in neurite trajectories. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; 62: 137–45.
- DaRocha-Souto B, Coma M, Perez-Nievas BG, Scotton TC, Siao M, Sánchez-Ferrer P, et al. Activation of glycogen synthase kinase-3 beta mediates beta-amyloid induced neuritic damage in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 2012; 45: 425–37.
- DaRocha-Souto B, Scotton TC, Coma M, Serrano-Pozo A, Hashimoto T, Sereno L, et al. Brain oligomeric beta-amyloid but not total amyloid plaque burden correlates with neuronal loss and astrocyte inflammatory response in amyloid precursor protein/tau transgenic mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 2011; 70: 360–76.
- De Calignon CA, Fox LM, Pitstick R, Carlson GA, Bacskai BJ, Spire-Jones TL, et al. Caspase activation precedes and leads to tangles. *Nature* 2010; 464: 1201–04.
- De Calignon CA, Polydoro M, Suarez-Calvet M, William C, Adamowicz DH, Kopeikina KJ, et al. Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease. *Neuron* 2012; 73: 685–97.
- Dekosky ST, Scheff SW. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol* 1990; 27: 457–64.
- Dickson TC, Vickers JC. The morphological phenotype of beta-amyloid plaques and associated neuritic changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 2001; 105: 99–107.
- Esparza TJ, Zhao H, Cirrito JR, Cairns NJ, Bateman RJ, Holtzman DM, et al. Amyloid-beta oligomerization in Alzheimer dementia versus high-pathology controls. *Ann Neurol* 2013; 73: 104–19.
- Furman JL, Sama DM, Gant JC, Beckett TL, Murphy MP, Bachstetter AD, et al. Targeting astrocytes ameliorates neurologic changes in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2012; 32: 16129–40.
- Giannakopoulos P, Herrmann FR, Bussiere T, Bouras C, Kövari E, Perl DP, et al. Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology* 2003; 60: 1495–1500.
- Gomez-Isla T, Hollister R, West H, Mui S, Growdon JH, Petersen RC, et al. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1997; 41: 17–24.
- Gomez-Isla T, Price JL, McKeel DW Jr., Morris JC, Growdon JH, Hyman BT. Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci* 1996; 16: 4491–500.
- Gomez-Isla T, Spire T, De Calignon A, Hyman BT. Neuropathology of Alzheimer's disease. *Handb Clin Neurol* 2008; 89: 233–43.
- Hampton DW, Webber DJ, Bilican B, Goedert M, Spillantini MG, Chandran S. Cell-mediated neuroprotection in a mouse model of human tauopathy. *J Neurosci* 2010; 30: 9973–83.
- Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 2009; 41: 1088–93.
- Hashimoto T, Serrano-Pozo A, Hori Y, Adams KW, Takeda S, Banerji AO, et al. Apolipoprotein E, especially apolipoprotein E4, increases the oligomerization of amyloid beta peptide. *J Neurosci* 2012; 32: 15181–92.
- Iacono D, Markesbery WR, Gross M, Pletnikova O, Rudow G, Zandi P, et al. The Nun study: clinically silent AD, neuronal hypertrophy, and linguistic skills in early life. *Neurology* 2009; 73: 665–73.
- Iacono D, O'Brien R, Resnick SM, Zonderman AB, Pletnikova O, Rudow G, et al. Neuronal hypertrophy in asymptomatic Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008; 67: 578–89.
- Ikonomic MD, Klunk WE, Abrahamson EE, Mathis CA, Price JC, Tsopelas ND, et al. Post-mortem correlates of *in vivo* PiB-PET amyloid imaging in a typical case of Alzheimer's disease. *Brain* 2008; 131: 1630–45.
- Irizarry MC, Soriano F, McNamara M, Page KJ, Schenk D, Games D, et al. Abeta deposition is associated with neurofil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse. *J Neurosci* 1997; 17: 7053–9.
- Jonsson T, Stefansson H, Steinberg S, Jonsdottir I, Jonsson PV, Snaedal J, et al. Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2013; 368: 107–16.
- Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang Y, Blomqvist G, Holt DP, et al. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol* 2004; 55: 306–19.
- Knopman DS, Boeve BF, Petersen RC. Essentials of the proper diagnoses of mild cognitive impairment, dementia, and major subtypes of dementia. *Mayo Clin Proc* 2003; 78: 1290–308.
- Knowlton RB, Wyart C, Buldyrev SV, Cruz L, Urbanc B, Hasselmo ME, et al. Plaque-induced neurite abnormalities: implications for disruption of neural networks in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 5274–9.
- Koffe RM, Hashimoto T, Tai HC, Kay KR, Serrano-Pozo A, Joyner D, et al. Apolipoprotein E4 effects in Alzheimer's disease are mediated by synaptotoxic oligomeric amyloid-beta. *Brain* 2012; 135: 2155–68.
- Koffe RM, Meyer-Luehmann M, Hashimoto T, Adams KW, Mielke ML, Garcia-Alloza M, et al. Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 4012–7.
- Lambert JC, Schraen-Maschke S, Richard F, Fievet N, Rouaud O, Berr C, et al. Association of plasma amyloid beta with risk of dementia: the prospective Three-City Study. *Neurology* 2009; 73: 847–53.
- Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Cios AL, Jackson GR, Kaye R. Tau oligomers impair memory and induce synaptic and mitochondrial dysfunction in wild-type mice. *Mol Neurodegener* 2011; 6: 39.

- Le R, Cruz L, Urbanc B, Knowles RB, Hsiao-Ashe K, Duff K, et al. Plaque-induced abnormalities in neurite geometry in transgenic models of Alzheimer disease: implications for neural system disruption. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; 60: 753–8.
- Lee EB, Leng LZ, Zhang B, Kwong L, Trojanowski JQ, Abel T, et al. Targeting amyloid-beta peptide (Abeta) oligomers by passive immunization with a conformation-selective monoclonal antibody improves learning and memory in Abeta precursor protein (APP) transgenic mice. *J Biol Chem* 2006; 281: 4292–9.
- Liu L, Drouet V, Wu JW, Witter MP, Small SA, Clelland C, et al. Trans-synaptic spread of tau pathology *in vivo*. *PLoS One* 2012; 7: e31302.
- Lockhart A, Lamb JR, Osredkar T, Sue LI, Joyce JN, Ye L, et al. PIB is a non-specific imaging marker of amyloid-beta (Abeta) peptide-related cerebral amyloidosis. *Brain* 2007; 130: 2607–15.
- Lopresti BJ, Klunk WE, Mathis CA, Hoge JA, Ziolkowski SK, Lu X, et al. Simplified quantification of Pittsburgh Compound B amyloid imaging PET studies: a comparative analysis. *J Nucl Med* 2005; 46: 1959–72.
- McDonald JM, Savva GM, Brayne C, Weizel AT, Forster G, Shankar GM, et al. The presence of sodium dodecyl sulphate-stable Abeta dimers is strongly associated with Alzheimer-type dementia. *Brain* 2010; 133: 1328–41.
- McDonald CR, Gharapetian L, McEvoy LK, Fennema-Notestine C, Hagler DJ Jr, Holland D, et al. Relationship between regional atrophy rates and cognitive decline in mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 2012; 33: 242–53.
- McGeer PL, McGeer EG. Anti-inflammatory drugs in the fight against Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 777: 213–20.
- McGeer PL, McGeer EG. NSAIDs and Alzheimer disease: epidemiological, animal model and clinical studies. *Neurobiol Aging* 2007; 28: 639–47.
- Mintun MA, Larossa GN, Sheline YI, Dence CS, Lee SY, Mach RH, et al. [¹¹C]PIB in a nondemented population: potential antecedent marker of Alzheimer disease. *Neurology* 2006; 67: 446–52.
- Morris JC, Storandt M, McKeel DW Jr, Rubin EH, Price JL, Grant EA, et al. Cerebral amyloid deposition and diffuse plaques in "normal" aging: Evidence for presymptomatic and very mild Alzheimer's disease. *Neurology* 1996; 46: 707–19.
- Riley KP, Snowden DA, Desrosiers MF, Markesbery WR. Early life linguistic ability, late life cognitive function, and neuropathology: findings from the Nun Study. *Neurobiol Aging* 2005; 26: 341–7.
- Rowe CC, Ng S, Ackermann U, Gong SJ, Pike K, Savage G, et al. Imaging beta-amyloid burden in aging and dementia. *Neurology* 2007; 68: 1718–25.
- Scheff SW, Price DA. Synaptic pathology in Alzheimer's disease: a review of ultrastructural studies. *Neurobiol Aging* 2003; 24: 1029–46.
- Schneider JA, Aggarwal NT, Barnes L, Boyle P, Bennett DA. The neuropathology of older persons with and without dementia from community versus clinic cohorts. *J Alzheimers Dis* 2009; 18: 691–701.
- Selkoe DJ. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 1991; 6: 487–98.
- Serrano-Pozo A, Mielke ML, Gomez-Isla T, Betensky RA, Growdon JH, Frosch MP, et al. Reactive glia not only associates with plaques but also parallels tangles in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 2011; 179: 8373–84.
- Serrano-Pozo A, William CM, Ferrer I, Uro-Coste E, Delisle MB, Maurage CA, et al. Beneficial effect of human anti-amyloid-beta active immunization on neurite morphology and tau pathology. *Brain* 2010; 133: 1312–27.
- Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, et al. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 2008; 14: 837–42.
- Spires TL, Meyer-Luehmann M, Stern EA, McLean PJ, Skoch J, Nguyen PT, et al. Dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravitral multiphoton microscopy. *J Neurosci* 2005; 25: 7278–87.
- Spires-Jones TL, Mielke ML, Rozkalne A, Meyer-Luehmann M, De Calignon A, Bacskai BJ, et al. Passive immunotherapy rapidly increases structural plasticity in a mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol Dis* 2009; 33: 213–20.
- Tai HC, Serrano-Pozo A, Hashimoto T, Frosch MP, Spires-Jones TL, Hyman BT. The synaptic accumulation of hyperphosphorylated tau oligomers in Alzheimer disease is associated with dysfunction of the ubiquitin-proteasome system. *Am J Pathol* 2012; 181: 1426–35.
- Tomic JL, Pensalfini A, Head E, Glabe CG. Soluble fibrillar oligomer levels are elevated in Alzheimer's disease brain and correlate with cognitive dysfunction. *Neurobiol Dis* 2009; 35: 352–8.
- Van Exel E, Eikelenboom P, Comijs H, Frölich M, Smit JH, Stek ML, et al. Vascular factors and markers of inflammation in offspring with a parental history of late-onset Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry* 2009; 66: 1263–70.
- Watt AD, Perez KA, Rembach A, Sherratt NA, Hung LW, Johanssen T, et al. Oligomers, fact or artefact? SDS-PAGE induces dimerization of beta-amyloid in human brain samples. *Acta Neuropathol* 2013; 125: 549–64.
- West MJ, Gundersen HJ. Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J Comp Neurol* 1990; 296: 1–22.
- Wyss-Coray T. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat Med* 2006; 12: 1005–15.