



**Universitat**  
de les Illes Balears

TESIS DOCTORAL

2017

ESTUDIO DEL EFECTO DEL ÁCIDO GRASO DE DISEÑO LP226 EN  
UN MODELO MURINO TRANSGÉNICO DE LA ENFERMEDAD DE  
ALZHEIMER (5XFAD)

Maria Antònia Fiol de Roque





**Universitat**  
de les Illes Balears

TESIS DOCTORAL  
2017

Programa de Doctorado en Neurociencias

ESTUDIO DEL EFECTO DEL ÁCIDO GRASO DE DISEÑO LP226 EN  
UN MODELO MURINO TRANSGÉNICO DE LA ENFERMEDAD DE  
ALZHEIMER (5XFAD)

Maria Antònia Fiol de Roque

Directores:

Xavier Busquets Xaubet

Pablo V. Escribá Ruiz

Rubén V. Rial Planas

Manuel Torres Canalejo

Doctora por la Universitat de les Illes Balears





**Universitat**  
de les Illes Balears

Nosotros, el Dr. Xavier Busquets Xaubet (Catedrático de Biología Celular de la Universitat de les Illes Balears), el Dr. Pablo V. Escribá Ruiz (Catedrático de Biología Celular de la Universitat de les Illes Balears), el Dr. Rubén V. Rial Planas (Catedrático emérito Fisiología Animal de la Universitat de les Illes Balears) y el Dr. Manuel Torres Canalejo (Investigador de Lipopharma y profesor asociado de la Universitat de les Illes Balears).

**CERTIFICAMOS:**

Que la presente Tesis Doctoral titulada: *“Estudio del efecto del ácido graso de diseño LP226 en un modelo murino transgénico de la enfermedad de Alzheimer (5XFAD)”* que presenta MARIA ANTÒNIA FIOL DE ROQUE, licenciada en Biología, para optar al grado de doctora por la Universidad de las Islas Baleares en el programa de Neurociencias, ha sido desarrollada bajo nuestra supervisión en el Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de las Islas Baleares. Tras la revisión del presente trabajo, autorizamos su presentación para ser evaluada por el tribunal correspondiente.

Y para que conste y a efectos oportunos, firman el presente certificado.

Palma, 15 de junio de 2017

Los directores de la Tesis,

**Dr. Xavier Busquets**

**Dr. Pablo V. Escribá**

**Dr. Rubén V. Rial**

**Dr. Manuel Torres**

La autora de la Tesis,

**Maria Antònia Fiol de Roque**







*“Que les coses que esperes  
no siguin com esperes quan les visquis.  
Que cada final sigui un principi,  
camina amb el ulls oberts.”*

Alguer Miquel



*Als meus pares, el meu referent;*

*als meus germans, el meu tresor;*

*i a tu Pau, el meu equilibri.*



Los trabajos incluidos en esta Tesis Doctoral han sido financiados por los proyectos de investigación *“Investigación y desarrollo de lípidos de diseño para el tratamiento de cáncer y Alzheimer (PET2008-0172-01, TRACE2008)”* y *“Investigación de la eficacia farmacológica de los ácidos grasos insaturados sintéticos para el tratamiento de patologías reconocidas con la neurodegeneración y neurogeneración (IPT-010000-2010-16, INNPACTO)”* ambos del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN), de los que el Dr. Xavier Busquets Xaubet fue el investigador principal; así como por los proyectos *“Lípidos y neurotrofinas de diseño racional en la terapia de patologías del sistema nervioso central (BIO2013-49006-C2-1-R, Retos de la Sociedad)”*, *“Desarrollo farmacéutico de lípidos de diseño para el tratamiento del ictus y patologías relacionadas (metabolopatías) (ICTUS) (RTC-2015-4094-1, Retos colaboración 2015)”* y *“Investigación de la eficacia farmacológica de ácidos grasos insaturados de diseño para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Igralzheimer) (RTC-2015-3542-1, Retos colaboración 2015)”* del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), cofinanciado con fondos europeos (*FEDER- una manera de hacer Europa*), de los que el Dr. Pablo V. Escribá Ruiz y el Dr. Xavier Busquets Xaubet fueron los investigadores principales.

Además, la contratación de la doctoranda, Maria Antònia Fiol de Roque fue posible gracias a la obtención de una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) de la Comunitat Autònoma de les Illes Balears - Conselleria d'Educació, Cultura i Universitats (*FPI11-43139654A*), beca cofinanciada por el Fondo Social Europeo.



En primer lugar, quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a mis directores de Tesis por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo, fomentar mi interés por la ciencia y ofrecerme su apoyo siempre que lo he necesitado. Al Dr. Xavier Busquets y al Dr. Pablo V. Escribá por permitirme formar parte de su grupo de investigación, donde he tenido la oportunidad de coincidir con grandes profesionales, empezando por ellos mismos, que han contribuido a mi formación durante todos estos años. Al Dr. Rubén V. Rial por iniciarme en el mundo de la investigación y haberme acompañado hasta este momento. Y al Dr. Manuel Torres por haberme guiado durante todo el proceso experimental y ser un apoyo imprescindible en esta última etapa de escritura.

También quisiera agradecer de forma especial al Dr. José Julio Rodríguez Arellano y a todo su grupo de investigación por haberme acogido tan bien durante mi estancia en su laboratorio, y por su colaboración en este trabajo con los experimentos de inmunohistoquímica para la detección de pHH3.

De igual forma, quisiera agradecer a la Dra. Antonia Gutiérrez y a la Dra. Laura Trujillo por su colaboración y aporte en este trabajo con los experimentos de inmunohistoquímica para la detección de NeuN.

Además, me gustaría agradecer a todos mis compañeros de laboratorio, que a lo largo de todos estos años han sido muchos, por su compañía, apoyo y ayuda. Los compañeros del grupo de Neurofisiología: Marga, Pere, Fiorella, Susana, Cristina, Toni, Sara y Mourad. Y los del grupo de Biomedicina Molecular y Celular, tanto a los que ya no están en el laboratorio como a los que aquí siguen: Silvia, Dani, Amaia, Maria Antònia, Mónica, Wendy, Fransi, Joel, David, Maitane, Rafa, Paula, Vicky, Cati Ana, Raheem, Marga, Roberto, Raquel, Laura, Javi, Tià, Juan Carlos y Dani. Sin todos vosotros este camino hubiera sido mucho más difícil y, sobre todo, mucho más aburrido. De forma muy especial quiero agradecer a la futura Dra. Marga Ramis por ser un apoyo imprescindible durante todo el camino. *Invencibles.*

Finalmente, me gustaría agradecer a todos mis amigos y a mi familia por todo el apoyo que me han dado durante el desarrollo de esta Tesis. *Vosaltres ja sabeu qui sou.*



Parte de los resultados presentados en este trabajo se encuentran recogidos en las siguientes publicaciones:

**Fiol-deRoque, M. A.**, Gutierrez-Lanza, R., Terés, S., Torres, M., Barceló, P., Rial, R. V., Verkhatsky, A., Escribá, P. V., Busquets, X. y Rodríguez, J. J. (2013) 'Cognitive recovery and restoration of cell proliferation in the dentate gyrus in the 5XFAD transgenic mice model of Alzheimer's disease following 2-hydroxy-DHA treatment', *Biogerontology*, 14(6), pp. 763-75.

Torres, M., Price, S. L., **Fiol-Deroque, M. A.**, Marcilla-Etxenike, A., Ahyayauch, H., Barceló-Coblijn, G., Terés, S., Katsouri, L., Ordinas, M., López, D. J., Iburguren, M., Goñi, F. M., Busquets, X., Vitorica, J., Sastre, M. y Escribá, P. V. (2014) 'Membrane lipid modifications and therapeutic effects mediated by hydroxydocosahexaenoic acid on Alzheimer's disease', *Biochim Biophys Acta*, 1838(6), pp. 1680-92.

**Fiol-deRoque, M. A.**, Mohaibes, R. J., Torres, M., Ordinas, M., López, D. J., Castro, J. A., Escribá, P. V. y Busquets, X. (2017) 'The hydroxylated form of docosahexaenoic acid (DHA-H) modifies the brain lipid composition in a model of Alzheimer's disease, improving behavioral motor function and survival', *Biochim Biophys Acta*.

Además, resultado del trabajo conjunto en el laboratorio con otros miembros del grupo, la doctoranda ha participado en la realización de estos trabajos:

Esteban, S., Garau, C., Aparicio, S., Moranta, D., Barceló, P., **Fiol, M. A.** y Rial, R. (2010) 'Chronic melatonin treatment and its precursor L-tryptophan improve the monoaminergic neurotransmission and related behavior in the aged rat brain', *J Pineal Res*, 48(2), pp. 170-7.

Lopez, D. H., **Fiol-deRoque, M. A.**, Noguera-Salvà, M. A., Terés, S., Campana, F., Piotto, S., Castro, J. A., Mohaibes, R. J., Escribá, P. V. y Busquets, X. (2013) '2-hydroxy arachidonic acid: a new non-steroidal anti-inflammatory drug', *PLoS One*, 8(8), pp. e72052.

Torres, M., Marcilla-Etxenike, A., **Fiol-deRoque, M. A.**, Escribá, P. V. y Busquets, X. (2015) 'The unfolded protein response in the therapeutic effect of hydroxy-DHA against Alzheimer's disease', *Apoptosis*, 20(5), pp. 712-24.

Barceló, P., Nicolau, C., Gamundí, A., **Fiol, M. A.**, Tresguerres, J. A., Akaârir, M. y Rial, R. V. (2016) 'Comparing the Behavioural Effects of Exogenous Growth Hormone and Melatonin in Young and Old Wistar Rats', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.



ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	1
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	5
ABREVIATURAS .....	9
RESUMEN.....	11
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>15</b>
1. La Enfermedad de Alzheimer: aspectos generales .....	17
1.1 Epidemiología.....	17
1.2 Características clínicas y diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer .....	17
1.3 Tratamientos .....	20
2. Características neuropatológicas de la Enfermedad de Alzheimer .....	20
2.1 Placas amiloides .....	21
2.2 Ovillos neurofibrilares .....	22
2.3 Pérdida sináptica .....	23
2.4 Muerte neuronal .....	24
2.5 Inflamación.....	25
3. Tipos de Enfermedad de Alzheimer: familiar y esporádica.....	26
3.1 Enfermedad de Alzheimer familiar.....	26
3.1.1 Mutaciones en el gen de la proteína precursora de amiloide .....	26
3.1.2 Mutaciones en los genes de la presenilina 1 y la presenilina 2 .....	28
3.2 Enfermedad de Alzheimer esporádico .....	29
3.2.1 Factores de riesgo genéticos.....	29
3.2.2 Factores de riesgo no genéticos .....	31
4. La proteína precursora de amiloide y su procesamiento .....	32
4.1 Vía de procesamiento no-amiloidogénico.....	32
4.2 Vía de procesamiento amiloidogénico .....	33
4.2.1 Procesamiento $\beta$ -secretasa.....	33
4.2.2 Procesamiento $\gamma$ -secretasa .....	34
4.3 Agregación del péptido $\beta$ -amiloide .....	35
5. Hipótesis de la cascada amiloide .....	36
6. Estudio de la Enfermedad de Alzheimer .....	38
6.1 Modelos transgénicos murinos de la Enfermedad de Alzheimer .....	38
6.1.1 Modelo 5XFAD .....	39

6.2 Pruebas comportamentales para la evaluación cognitiva de modelos animales de la Enfermedad de Alzheimer .....	40
6.2.1 Prueba del Laberinto Radial .....	41
7. Los lípidos en la Enfermedad de Alzheimer .....	43
7.1 Características generales y clasificación de los lípidos .....	43
7.2 Distribución de los lípidos en la membrana .....	45
7.3 Alteraciones lipídicas en la Enfermedad de Alzheimer .....	45
7.3.1 El colesterol y los esfingolípidos en la EA.....	45
7.3.2 Ácidos grasos poliinsaturados en la EA .....	46
7.4 Terapia lipídica de membrana .....	48
<b>II. OBJETIVOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>49</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>53</b>
1. Animales: cepas y mantenimiento de las colonias .....	55
1.1 5XFAD .....	55
1.2 Animales controles sanos: cepa B6/SJL F1 .....	55
1.3 Mantenimiento de las colonias .....	56
1.4 Genotipado.....	56
2. Tratamientos farmacológicos .....	58
3. Estudio de la toxicidad en embriones de pez cebra.....	60
4. Estudio toxicidad en ratones: test de Irwin .....	61
5. Prueba de comportamiento: Laberinto Radial de ocho brazos .....	63
6. Eutanasia de animales y disección de tejidos .....	65
7. Extracción de ARN.....	66
8. Retrotranscripción .....	67
9. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).....	68
10. Extracción de proteínas totales .....	71
11. Cuantificación de proteínas .....	72
12. Fraccionamiento celular: obtención de proteínas solubles y preparación de membranas.....	73
13. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS .....	74
14. Western Blot .....	76
15. Tinción con azul coomassie para geles de poliacrilamida:.....	78
16. Ensayo de actividad beta-secretasa .....	79

17. Ensayo de actividad $\gamma$ -secretasa .....	83
18. Inmunohistoquímica .....	85
19. Lipidómica .....	91
19.1 Extracción lipídica .....	91
19.2 Determinación del contenido en colesterol .....	92
19.3 Análisis lipídico por cromatografía de líquidos/espectrometría de masas (LC/MS) .....	92
20. Análisis estadísticos .....	94
<b>IV. RESULTADOS</b> .....	<b>95</b>
1. Establecimiento de la dosis terapéutica para el tratamiento con LP226.....	97
1.1 Evaluación de la toxicidad de LP226 en embriones de pez cebra .....	97
1.2 Valoración del efecto tóxico del tratamiento agudo con LP226 y DHA: test de Irwin .....	99
1.3 Efectos de diferentes dosis en un tratamiento crónico con LP226 .....	102
1.3.1 Valoración comportamental y control del peso .....	102
1.3.2 Evaluación cognitiva, prueba del Laberinto Radial .....	104
2. Valoración cognitiva de animales WT y 5XFAD tras el tratamiento crónico con LP226 .....	107
2.1 Valoración de la memoria espacial en animales de 7 meses tratados con LP226 .....	107
2.2 Evolución de la memoria espacial en los animales de 7 y 12 meses de edad .....	109
2.3 Valoración de la memoria espacial en animales de 12 meses tratados con LP226 .....	110
3. Estudio del efecto del tratamiento crónico con LP226 en el perfil lipídico de animales 5XFAD.....	112
4. Estudio del efecto del tratamiento crónico con LP226 en el procesamiento de la proteína precursora de amiloide (APP) en el modelo animal 5XFAD.....	116
4.1 Análisis de la expresión y procesamiento de APP en animales 5XFAD tras el tratamiento con LP226 .....	116
4.2 Estudio de la actividad secretasa implicada en la producción de A $\beta$ en animales 5XFAD tras el tratamiento crónico con LP226.....	121
4.2.1 Estudio de los niveles enzimáticos de las secretasas de la vía amiloidogénica .....	121
4.2.2 Estudio de la actividad $\beta$ -secretasa .....	123
4.2.3 Estudio de la actividad $\gamma$ -secretasa .....	128
5. Estudio del efecto neuroprotector potencial del tratamiento con LP226. ....	130
5.1 Evaluación del efecto del tratamiento con LP226 en la pérdida sináptica y la pérdida neuronal de animales 5XFAD.....	130
5.2 Evaluación del efecto del tratamiento con LP226 en la proliferación celular en el giro dentado del hipocampo.....	135

## Índice de contenidos

---

<b>V. DISCUSIÓN</b> .....	139
1. Seguridad del tratamiento con LP226.....	141
2. Recuperación cognitiva de los animales 5XFAD tras el tratamiento con LP226 .....	143
3. Modulación lipídica de la membrana.....	145
4. Caracterización de los mecanismos moleculares responsables del procesamiento amiloidogénico tras el tratamiento con LP226.....	147
5. Efecto del tratamiento con LP226 en la degeneración sináptica y neuronal.....	150
6. Implicación de los resultados obtenidos con la administración de LP226 para el tratamiento de la EA en humanos .....	154
<b>VII. CONCLUSIONES</b> .....	159
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	163

**FIGURAS**

**I. INTRODUCCIÓN**

Figura I1. Evolución neuropatológica en la EA en base a la dispersión de placas según Braak y Braak..... 22

Figura I2. Evolución neuropatológica en la EA en base a la dispersión de NFTs según Braak y Braak ..... 23

Figura I3. Atrofia cerebral en la EA. .... 25

Figura I4. Algunas de las mutaciones en APP en la EA..... 27

Figura I5. Algunas de las mutaciones en PS1 en la EA. .... 29

Figura I6. Procesamiento de APP..... 32

Figura I7. Topología del complejo  $\gamma$ -secretasa. .... 34

Figura I8. Agregación de  $A\beta$ . .... 35

Figura I9. Hipótesis de la cascada amiloide. .... 37

Figura I10. Laberinto radial de ocho brazos (Panlab) ..... 42

**II. OBJETIVOS**

Figura O1. Diseño experimental. .... 52

**III. MATERIALES Y MÉTODOS**

Figura M1. Comprobación del resultado de la PCR en gel de agarosa. .... 58

Figura M2. Visión superior de Laberinto Radial..... 64

Figura M3. Comprobación de la integridad del ARN en gel de agarosa. .... 67

Figura M4. Visualización de la carga proteica y niveles de BACE-1 en muestras de proteína de membrana de corteza cerebral de animales 5XFAD de 7 y 12 meses, solubilizadas con diferentes tampones de extracción. .... 81

Figura M5. Ensayo  $\beta$ -secretasa de muestras 5XFAD de 7 y 12 meses solubilizadas con diferentes tampones de extracción. .... 82

Figura M6. Comprobación de las condiciones óptimas para la detección de AICD en el ensayo de actividad enzimática  $\gamma$ -secretasa..... 85

Figura M7. Diagrama coronal del cerebro de ratón ..... 90

**IV. RESULTADOS**

Figura R1. Evolución del peso corporal de animales WT y 5XFAD durante 3 meses de tratamiento..... 104

Figura R2. Valoración de la memoria espacial en animales 5XFAD con dosis crecientes de LP226. .... 105

Figura R3. Evaluación cognitiva de machos 5XFAD de 7 meses tras el tratamiento crónico con LP226. .... 108

Figura R4. Evolución cognitiva entre los 7 y 12 meses en animales WT y 5XFAD. .... 109

Figura R5. Evaluación cognitiva de machos 5XFAD de 12 meses tras el tratamiento crónico con LP226. .... 111

Figura R6. Abundancia relativa de los diferentes tipos de lípidos en el cerebro de ratones WT, 5XFAD y 5XFAD tratados con LP226. ....	113
Figura R7. Efecto del LP226 en la composición de los lípidos de membrana en el cerebro de ratones 5XFAD. ....	114
Figura R8. Expresión de APP humano y murino en el cerebro de animales WT y 5XFAD de 7 meses. ....	117
Figura R9. Niveles de APP en el hipocampo de animales WT y 5XFAD de 7 y 12 meses, controles y tratados con LP226. ....	118
Figura R10. Estudio del procesamiento de APP en el hipocampo de animales 5XFAD de 7 y 12 meses, tratados con LP226. ....	119
Figura R11. Niveles de C99 y A $\beta$ en el hipocampo de animales WT y 5XFAD de 7 y 12 meses tratados con LP226 y DHA. ....	120
Figura R12. Estudio de BACE-1 por WB en animales WT y 5XFAD de 7 y 12 meses tras tratamiento crónico con LP226. ....	122
Figura R13. Estudio de PS1-CTF por WB en animales WT y 5XFAD de 7 y 12 meses tratados con LP226 y DHA. ....	123
Figura R14. Actividad $\beta$ -secretasa en la corteza de animales WT y 5XFAD de 7 meses tratados con LP226. ....	124
Figura R15. Actividad $\beta$ -secretasa en la corteza de animales WT y 5XFAD de 12 meses tratados con LP226. ....	126
Figura R16. Actividad $\beta$ -secretasa en tampón CHAPS en muestras de corteza de animales WT y 5XFAD de 7 y 12 meses tratados con LP226. ....	127
Figura R17. Actividad $\gamma$ -secretasa en la corteza de animales 5XFAD de 7 y 12 meses tras el tratamiento crónico con ácidos grasos omega-3. ....	128
Figura R18. Relación entre producto y sustrato en el ensayo de actividad $\gamma$ -secretasa en animales 5XFAD de 7 y 12 meses. ....	129
Figura R19. Marcadores sinápticos en el hipocampo de animales de 7 meses. ....	131
Figura R20. Evolución del estado de los marcadores sinápticos en el hipocampo entre animales de 7 y 12 meses. ....	132
Figura R21. Marcadores sinápticos en animales de 12 meses. ....	133
Figura R22. Prevención de la muerte neuronal en animales 5XFAD de 12 meses tratados con LP226. ....	134
Figura R23. Correlación lineal entre los niveles de sinaptofisina y memoria espacial en animales de 12 meses. ....	135
Figura R24. Correlación lineal entre la densidad neuronal y la memoria espacial en animales de 12 meses. ....	135
Figura R25. Estudio de la proliferación neuronal en el hipocampo. ....	137
<b>V. DISCUSIÓN</b>	
Figura D1. Modulación de la composición y estructura de la membrana lipídica por LP226. ....	157

**TABLAS**

**I. INTRODUCCIÓN**

Tabla I1. Ácidos grasos más comunes.....44

**III. MATERIALES Y MÉTODOS**

Tabla M1. Cruces realizados para el mantenimiento de las colonias .....56

Tabla M2. Estequiometría general para la reacción de PCR en el genotipado.....57

Tabla M3. Cebadores específicos para la amplificación de los genes APP, PS1 y Pde6b.....57

Tabla M4. Ciclos de temperatura y tiempos de la reacción de PCR. ....57

Tabla M5. Tratamientos crónicos realizados en ratones macho de 7 meses (jóvenes). ....59

Tabla M6. Tratamientos crónicos realizados en machos de 12 meses (viejos). ....59

Tabla M7. Tratamientos realizados en los animales que se sometieron al test de Irwin.....61

Tabla M8. Protocolo para la evaluación toxicológica y neurológica en ratones según el test de Irwin.....62

Tabla M9. Ración de pienso diaria.....64

Tabla M10. Cebadores específicos para la amplificación de la diana específica. ....69

Tabla M11. Relación de los reactivos utilizados para la amplificación por RT-qPCR.....70

Tabla M12. Ciclos de temperatura y tiempos de la reacción de RT-qPCR para para la amplificación de APP y GAPDH. ....70

Tabla M13. Relación de reactivos y volúmenes utilizados para la preparación de geles de electroforesis. ....76

Tabla M14. Anticuerpos utilizados en el WB. ....78

Tabla M15. Anticuerpos primarios utilizados en los experimentos de IHC con doble marcaje. ....89

**IV. RESULTADOS**

Tabla R1. Evaluación de los efectos del LP226 en el desarrollo de embriones de pez cebra. ....98

Tabla R2. Test de Irwin. ....100

Tabla R3. Evaluación neurotoxicológica mediante el test de Irwin tras una dosis única de LP226 y DHA.....101

Tabla R4. Cambios observados en animales WT tras el tratamiento durante 14 días con LP226 o DHA a las dosis de 200 y 500 mg/kg. ....102

Tabla R5. Alteraciones físicas provocadas tras el tratamiento crónico con LP226.....103

Tabla R6. Resumen de los motivos que nos llevaron a la elección dosis terapéutica del LP226.....106

Tabla R7. Caracterización por LC/MS de las cadenas acilo de diacil-PE en el cerebro de animales 5XFAD tratados con LP226. ....115



15-LOX: lipoxigenasa 15	GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa
AA: acrilamida	GD: giro dentado
AICD: dominio intracelular de APP	GFAP: proteína fibrilar ácida de la glía
ADAM: desintegrinas y metaloproteasas	GPCR: receptores acoplados a proteína G
ADNc: ADN complementario al ARN	GSK3: glucógeno sintasa quinasa 3
ARA: ácido araquidónico	GWAS: estudios de asociación del genoma humano
ARNm: ARN mensajero	IHC: inmunohistoquímica
ApoE: apolipoproteína E	LC: cromatografía líquida
APP: proteína precursora de amiloide	LCR: líquido cefalorraquídeo
APP-CTF: fragmento C terminal de APP	LTP: potenciación a largo plazo
APP <sub>h</sub> : proteína precursora de amiloide humana	LP226: ácido 2-hidroxi-docosahexaenoico
APP <sub>m</sub> : proteína precursora de amiloide murina	LR: laberinto radial
Aβ: péptido β-amiloide	LTP: potenciación a largo plazo
Aβ <sub>40</sub> : péptidos β-amiloide de 40 aminoácidos	MRI: resonancia magnética nuclear
Aβ <sub>42</sub> : péptidos β-amiloide de 42 aminoácidos	MS: espectrometría de masas
BACE-1: enzima proteolítico de APP en la región β-1 ( <i>β-site Amyloid precursor protein Cleaving Enzyme-1</i> )	NFTs: ovillos de neurofilamentos
BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro	NMDA: N-metil-D-aspártico
CCG: capa de células granulares	NPD1: neuroprotectina D1
Cdk5: quinasa dependiente de ciclina 5 ( <i>cyclin-dependent kinase 5</i> )	Nv: densidad numérica
CI: control interno	OA: ácido oleico
Ct: ciclo umbral o "threshold"	PB: tampón fosfato
CTF: fragmento C-terminal	PBS: tampón fosfato salino
C83 (CTF <sub>α</sub> ): fragmento C-terminal de APP de 83 aminoácidos	PC: fosfatidilcolina
C99 (CTF <sub>β</sub> ): fragmento C-terminal de APP de 99 aminoácidos	PCR: reacción en cadena de la polimerasa
DHA: ácido docosahexaenoico	PE: fosfatidiletanolamina
DSM-V: manual diagnóstico y estadístico de las enfermedades mentales, 5ª revisión	PET: tomografía por emisión de positrones
DMSO: Dimetilsulfóxido	PFA: paraformaldehído
EA: enfermedad de Alzheimer	pHH3: histona H3 fosforilada
EPA: ácido eicosapentaenoico	PI: fosfatidilinositol
FA2H: ácido graso 2-hidroxilasa	PLA2: fosfolipasa A
FABP: proteínas de unión a ácidos grasos	PPAR: receptores activados por proliferadores de peroxisoma
	PS: fosfatidilserina
	PS1: presenilina 1

## Abreviaturas

---

PS2: presenilina 2

PSA: persulfato amónico

p-Tau: tau fosforilado

PUFA: ácido graso poliinsaturado (del inglés polyunsaturated fatty acid)

RME: errores de la memoria de referencia (*Reference Memory Errors*)

RXR: receptor retinoide X

sAPP $\alpha$ : fragmento soluble del ectodominio N-terminal de la APP - APP soluble alfa

SDS: *Sodium Dodecyl Sulphate*

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

SEM: error estándar de la media

SNC: Sistema Nervioso Central

TBE: tampón tris-bórico-EDTA

TBS: tampón tris-salino

TEMED: Tetrametiletilendiamina

TLM: terapia lipídica de membranas

T<sub>m</sub>: temperatura de disociación

T-Tau: Tau total

T-TBS: Solución al 0,1% (v/v) de Tween-20 (Sigma) en TBS

WB: western blot

WME: errores de la memoria de trabajo (*working memory errors*)

WT: cepa salvaje o *wild type*

## **RESUMEN (CASTELLANO)**

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es el desorden neurodegenerativo más común durante el envejecimiento y para el que aún no se dispone de una terapia efectiva. La alta incidencia de la EA en individuos de edad avanzada, junto con el aumento progresivo de la expectativa de vida actual y el envejecimiento progresivo de la población, convierten a esta enfermedad en uno de los problemas sociosanitarios más importantes de nuestra época. Sin embargo, la etiología de esta enfermedad (probablemente multifactorial) sigue sin ser conocida. En los últimos años se ha relacionado el desarrollo de la enfermedad con alteraciones lipídicas, como el aumento de los niveles de colesterol y esfingomielina, o el descenso de los niveles de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) omega-3, como el ácido docosahexaenoico (DHA). En este sentido, los tratamientos con DHA en modelos animales de la EA han sido muy prometedores. Sin embargo, los ensayos clínicos con DHA en humanos afectados por la EA han resultado poco concluyentes respecto a su eficacia farmacológica. Cabe indicar que recientemente se ha descrito la importancia de los derivados hidroxilados naturales del DHA, como las neuroprotectinas, en la acción que ejerce el DHA en el sistema nervioso, ya que estas neuroprotectinas actúan directamente como lípidos bioactivos. En base a todo esto, en este trabajo se presenta el LP226, un ácido graso hidroxilado sintético estructuralmente análogo al DHA, que persigue restaurar la homeostasis lipídica cerebral para el tratamiento de la EA.

Tras comprobar la seguridad del tratamiento agudo con LP226 en pez cebra y ratones, se estableció una dosis terapéutica segura y efectiva para el tratamiento crónico de ratones modelo de EA (5XFAD). La administración de LP226 en ratones 5XFAD permitió obtener una prueba de concepto del efecto neuroprotector del LP226, al revertir la pérdida de memoria espacial que experimentan los animales 5XFAD. A nivel molecular, el tratamiento con LP226 dio lugar a un aumento en las especies de fosfatidiletanolamina (PE) con PUFAs de cadena larga en el cerebro de los ratones 5XFAD. Estos cambios lipídicos se acompañaron de un descenso en la producción del fragmento C99 y del péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ). Los cambios en el procesamiento amiloidogénico de APP vienen dados por la modulación de la actividad  $\beta$ -secretasa, presumiblemente debido a los cambios lipídicos de las membranas cerebrales. En paralelo, el tratamiento con LP226 dio lugar a una reducción de la pérdida sináptica y de la muerte neuronal, así como a una restitución de la proliferación neuronal adulta en el hipocampo en los mismos animales. En definitiva, estos cambios explicarían la recuperación de la memoria espacial que experimentaron los animales 5XFAD tras el tratamiento con LP226.

En conclusión, en este trabajo se demuestra la seguridad y eficacia del LP226, así como su potencial terapéutico en la EA. La variedad de efectos que ejerce el tratamiento con LP226 sobre los eventos neuropatológicos que acontecen en la EA lo sitúan como un buen candidato para el tratamiento de esta enfermedad, a la vez que sugiere que la hidroxilación de moléculas lipídicas sería una buena estrategia en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

### **RESUM (CATALÀ)**

La malaltia d'Alzheimer (MA) és el desordre neurodegeneratiu més comú durant l'envelliment, per al qual encara no es disposa d'una teràpia efectiva. L'alta incidència de l'Alzheimer en individus d'edat avançada, juntament amb l'augment progressiu de l'expectativa de vida actual i l'envelliment progressiu de la població, converteixen aquesta malaltia en un dels problemes sociosanitaris més importants de la nostra època. Malgrat això, l'etiologia d'aquesta malaltia (probablement multifactorial), segueix essent desconeguda. En els últims anys s'ha relacionat el desenvolupament de la MA amb alteracions lipídiques, com l'augment dels nivells de colesterol i esfingomielina o el descens dels nivells d'àcids grassos poliinsaturats (PUFAs) omega-3, com l'àcid docosahexaenoic (DHA). En aquest sentit, els tractaments amb DHA en models animals de la MA han estat molt prometedors, encara que els assajos clínics amb DHA en humans afectats per la MA han resultat poc conclouents respecte a la seva eficàcia farmacològica. Cal remarcar que recentment s'ha descrit la importància dels derivats hidroxilats naturals del DHA, com les neuroprotectines, en l'acció que exerceix el DHA en el sistema nerviós, ja que les neuroprotectines actuen directament com a lípids bioactius. En base a tot això, en aquest treball es presenta el LP226, un àcid gras hidroxilat sintètic, estructuralment anàleg al DHA, que pretén restaurar la homeòstasi lipídica cerebral per al tractament de la MA.

Un cop comprovada la seguretat del tractament agut amb LP226 en peix zebra i ratolins es va establir una dosi terapèutica segura i efectiva per al tractament crònic de ratolins model de la MA (5XFAD). L'administració de LP226 a ratolins 5XFAD permeté obtenir una prova de concepte de l'efecte neuroprotector del LP226 al revertir la pèrdua de memòria espacial que experimenten els animals 5XFAD. A nivell molecular, el tractament amb LP226 donà lloc un augment de les espècies d'etanolamina amb PUFAs de cadena llarga al cervell dels ratolins 5XFAD. Aquests canvis lipídics es van acompanyar d'un descens en la producció del fragment C99 i del pèptid  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ). Els canvis en el processament amiloidogènic d'APP venen donats per la modulació de l'activitat  $\beta$ -secretasa, presumiblement a causa dels canvis lipídics de les membranes cerebrals. De forma paral·lela, el tractament amb LP226 donà lloc a una reducció de la pèrdua sinàptica i de la mort neuronal, així com a una restitució de la proliferació neuronal adulta en l'hipocamp del mateixos animals. Aquests canvis explicarien la recuperació de la memòria espacial que van experimentar els animals 5XFAD després del tractament amb LP226.

Per concloure, en aquest treball es demostra la seguretat i eficàcia del LP226, així com el seu potencial terapèutic en la MA. La varietat d'efectes que exerceix el tractament amb LP226 sobre els esdeveniments neuropatològics que esdevenen en aquesta malaltia el situen com un bon candidat per al tractament d'aquesta malaltia, alhora que suggereix que la hidroxilació de molècules lipídiques seria una bona estratègia en el desenvolupament de fàrmacs per al tractament de malalties neurodegeneratives.

**ABSTRACT (ENGLISH)**

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disorder during aging. However, no effective therapy is available for its treatment yet. The high incidence of AD in elderly individuals, together with the progressive increase of the current life expectancy and the progressive aging of the population, make this disease one of the most important socio-sanitary problems of our time. However, the etiology of this disease (probably multifactorial) remains unknown. Recently, the development of the disease has been linked to lipid alterations, such as increased levels of cholesterol and sphingomyelin, or a decrease in levels of omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), such as docosahexaenoic acid (DHA). In this sense, treatments with DHA in animal models of AD have been very promising. However, DHA clinical trials in humans affected by AD have been inconclusive regarding its pharmacological efficacy. It is noteworthy the importance of natural hydroxylated derivatives of DHA, such as neuroprotectins, has recently been described as part of the effect of DHA on the nervous system, since these neuroprotectins act directly as bioactive lipids. According to that, in this work it is presented the LP226, a synthetic hydroxylated fatty acid structurally analogous to DHA, which seeks to restore cerebral lipid homeostasis as a treatment for AD.

After confirming the safety of acute treatment with LP226 in zebrafish and mice, a safe and effective therapeutic dose was established for the chronic treatment of a mice model of AD (5XFAD). The administration of LP226 in 5XFAD mice enabled a proof of concept of the neuroprotective effect of LP226 as revealed by the capacity of LP226 to reverse the spatial memory loss experienced by 5XFAD animals. At a molecular level, treatment with LP226 resulted in an increase in phosphatidylethanolamine species with long chain PUFAs in the brains of 5XFAD mice. These lipid changes were accompanied by a decrease in the production of the C99 fragment and the  $\beta$ -amyloid peptide (A $\beta$ ). Changes in the amyloidogenic processing of APP are given by the modulation of  $\beta$ -secretase activity, presumably due to lipid changes in the cerebral membranes. In parallel, treatment with LP226 resulted in a reduction of synaptic loss and neuronal death as well as a restoration of adult neuronal proliferation in the hippocampus in the same animals. Finally, these changes would explain the recovery of spatial memory experienced by 5XFAD animals after treatment with LP226.

In conclusion, in this work it has been demonstrated the efficacy and safety of LP226, as well as its therapeutic potential in AD. The variety of effects of LP226 treatment on the neuropathological events that occur in AD places it as a good candidate for the treatment of this disease, while suggesting that the hydroxylation of lipid molecules would be a good strategy in the development of drugs for the treatment of neurodegenerative diseases.



## *I. INTRODUCCIÓN*

---



## **1. La Enfermedad de Alzheimer: aspectos generales**

Alois Alzheimer describió en 1906 el caso de su paciente Auguste Deter en la 37ª Reunión de Psiquiatras del Sudoeste de Alemania en Tübingen, sin despertar gran interés en la audiencia. Poco hacía prever que 100 años después la enfermedad que ahora lleva su nombre sería la principal causa de demencia en el mundo, así como todos los problemas médicos, sociales y económicos que conlleva.

En esa reunión, Alzheimer presentó los síntomas de una mujer de 50 años que experimentó durante 5 años alucinaciones, paranoia, y trastornos de la conducta, desorientación espacio-temporal junto con una pérdida progresiva de la memoria y del lenguaje. Su autopsia reveló una reducción significativa del tamaño cerebral, así como la presencia de placas y ovillos neurofibrilares. El término Enfermedad de Alzheimer (EA) para referirse a esta patología fue acuñado cuatro años después de esa reunión, en 1910, por el psiquiatra Emili Kraepelin (Dahm et al., 2006).

### **1.1 Epidemiología**

La EA es el desorden neurodegenerativo de carácter progresivo más común en el ser humano, siendo la principal causa de demencia a partir de los 65 años. Se estima que cada 4 segundos se diagnostica un nuevo caso de demencia y cerca de un 70% de estos nuevos casos son de EA, suponiendo en su conjunto más de 100.000 nuevos enfermos al año (Schaeffer et al., 2011).

De acuerdo con el Informe mundial del Alzheimer de 2015 (Prince, 2015), en la actualidad, hay más de 46 millones de personas en todo el mundo que sufren demencia, de los cuales más de 10 millones se sitúan en Europa y cerca de 800.000 en España. Según las previsiones, en 2050 esta cifra aumentará hasta los 131,5 millones.

Desde un punto de vista epidemiológico, la prevalencia de la EA es de un 10% en la población de 65 años, aumentando exponencialmente a partir de esa edad, llegando hasta un 40-50% en la población mayor de 85 años (Zhang et al., 2011), determinando la edad del paciente como el principal factor de riesgo para padecerla. Los pronósticos actuales estiman que en cuatro décadas el 35% de la población mundial tendrá más de 60 años. Si tenemos en cuenta que en la actualidad la EA tiene un origen y causas desconocidas, que es imposible de prevenir, se diagnostica tarde y no existe ninguna medicación eficaz en retrasar o frenar su curso, este aumento de la esperanza de vida puede generar graves problemas de sostenibilidad social y sanitaria a corto plazo. La progresiva discapacidad de las personas con demencia y la dedicación que requieren por parte de sus cuidadores, convierten esta enfermedad en una de las principales causas de dependencia de nuestra sociedad.

### **1.2 Características clínicas y diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer**

La EA es un proceso neurodegenerativo irreversible caracterizado por la pérdida progresiva de la memoria. Al inicio, se manifiesta como una pérdida de la memoria episódica, impidiendo la recolección de eventos recientes y la sintomatología progresa de forma gradual a lo largo de varios años (LaFerla et al., 2007). Tras la amnesia inicial, aparecen otros desórdenes, como la afasia (pérdida de la capacidad del habla), la apraxia (alteración de los gestos ya que, aunque la función motora no se ve afectada, los pacientes son incapaces de realizar tareas rutinarias), la agnosia (incapacidad de reconocimiento de personas u objetos) y problemas en las funciones ejecutivas. Todo esto puede desembocar en cambios en la personalidad, incluyendo paranoia, alucinaciones, apatía, perturbación del sueño, depresión y finalmente demencia. Estas alteraciones son debidas a daños selectivos en regiones cerebrales y circuitos neuronales implicados en estos procesos, tales como las áreas asociativas neocorticales, el hipocampo, la corteza entorrinal, la amígdala y el telencéfalo basal (Reiman y Caselli, 1999, Castellani et al., 2010).

Desde el momento en que la EA es diagnosticada, la enfermedad se prolonga entre 5 y 10 años, con un promedio de supervivencia de 8, aunque algunos pacientes pueden vivir hasta 20 años. Sin embargo, la aparición de los primeros síntomas clínicos se produce cuando la neurodegeneración ya está avanzada. De hecho, varios estudios revelan la existencia de lesiones histopatológicas características de la EA en una proporción relevante de individuos asintomáticos que evolucionan de acuerdo con un patrón progresivo, sugiriendo la existencia de fases neuropatológicas sucesivas previas a la manifestación clínica de la enfermedad (Schneider et al., 2009, SantaCruz et al., 2011, Perez-Nievas et al., 2013).

Por todo ello, el diagnóstico de la EA es complejo, especialmente si se basa únicamente en pruebas clínicas cognitivas y funcionales. Afortunadamente, en los últimos años se ha avanzado en el desarrollo de pruebas diagnósticas basadas en los cambios fisiopatológicos que ocurren en la EA, que permitirían diagnosticar la enfermedad de manera más rápida y eficaz (Masters et al., 2015, Winblad et al., 2016, Scheltens et al., 2016)

Los **biomarcadores diagnósticos** son marcadores de la patología in vivo que están presentes en todas las etapas de la enfermedad y, por tanto, pueden usarse para detectar cambios patológicos en la EA incluso en el estado asintomático. Son por ejemplo los estudios de neuroimagen por resonancia magnética nuclear (MRI), la tomografía por emisión de positrones (PET) de placas amiloides en el cerebro o la medición del péptido  $\beta$ -amiloide de 42 aminoácidos (A $\beta$ 42) y Tau fosforilada (p-Tau) en el líquido cefalorraquídeo (LCR) (Winblad et al., 2016, Scheltens et al., 2016). Por el contrario, los **marcadores de progresión** son aquellos que indican la gravedad clínica (es decir, los cambios a medida que avanza la enfermedad). Sin embargo, este tipo de marcadores pueden tener una especificidad baja para detectar la enfermedad y no estar presente en etapas tempranas. En esta categoría encontramos la evaluación del metabolismo de la glucosa cerebral por PET, la medición de Tau total (T-Tau) en el LCR o la atrofia cerebral medida por la resonancia (Winblad et al., 2016).

En la actualidad, la recolección de LCR por punción lumbar es rutinaria en neurología clínica, por lo que la detección de A $\beta$ 42, T-Tau y p-Tau se está extendiendo (Masters et al., 2015), a la vez que se sigue avanzando en el desarrollo de nuevos marcadores en el LCR, entre los que destacan los oligómeros de A $\beta$  y los biomarcadores sinápticos como la neurogranina (proteína dendrítica) (Díez-Guerra, 2010) o SNAP 25 (proteína presináptica) (Brinkmalm et al., 2014).

Además, en los últimos años se ha avanzado en la búsqueda de biomarcadores en sangre, ya que la obtención de la muestra es menos invasiva que la de LCR (Humpel y Hochstrasser, 2011, Chintamaneni y Bhaskar, 2012). En diferentes estudios se ha propuesto la combinación de proteínas, lípidos, metabolitos u otras moléculas para discriminar a pacientes con EA de controles sanos (Mapstone et al., 2014, Wu et al., 2016). Sin embargo, los estudios proteómicos de biomarcadores plasmáticos han sido hasta ahora decepcionantes, con pocos resultados positivos replicables (Galasko y Golde, 2013). Por el contrario, se ha observado una buena correlación entre los niveles de determinados lípidos y el desarrollo de la EA. Un estudio en el que se analizaron los perfiles lipídicos en el plasma de individuos mayores de 70 años sugirió que podría ser posible discriminar a los enfermos de Alzheimer de los individuos cognitivamente sanos por el uso de un análisis de sangre, ya que la disminución de un conjunto de 10 metabolitos de fosfatidilcolina (PC) permitió predecir el diagnóstico de EA incluso antes de que aparecieran los déficits cognitivos (Mapstone et al., 2014). En este sentido, recientemente, se ha postulado la validez de los niveles de PC como marcador fiable en la EA (Olazarán et al., 2015). Además de la PC, el colesterol también se ha propuesto como un biomarcador sanguíneo de la EA. La caracterización de seis especies de colesterol en plasma permitieron discernir entre sujetos sanos y enfermos de Alzheimer con una precisión cercana al 80% (Proitsi et al., 2015).

Por lo que respecta a las pruebas de neuroimagen, clásicamente se han utilizaron para excluir otras causas de demencia, como los tumores cerebrales o el hematoma subdural (Waldemar et al., 2007), aunque actualmente se están usando para el diagnóstico presintomático de la EA. En este sentido, el marcador

de imagen más innovador para la EA utilizado clínicamente es la PET con ligandos para A $\beta$  (florbetapir, florbetabén y flutemetamol) (Herholz y Ebmeier, 2011). De hecho, la demostración de la acumulación de A $\beta$  por PET se correlaciona con niveles bajos de A $\beta$ 42 en el LCR y ambos hallazgos son detectables más de 15 años antes del inicio de la demencia debida a EA (Toledo et al., 2013). Sin embargo, debido a que la amiloidosis cerebral es una condición necesaria pero no suficiente para el diagnóstico de la EA, el PET amiloide es más excluyente que inclusivo (es decir, tiene un valor predictivo negativo alto y uno positivo moderado) (Scheltens et al., 2016). Además, en los últimos años se han desarrollado ligandos de Tau que se unen a los agregados fibrilares con bastante precisión. De hecho, la unión de estos ligandos se correlaciona bien con el síndrome clínico en la EA y muestran una mejor correlación con el hipometabolismo y la atrofia cerebral que la PET amiloide. Actualmente se está utilizando en ensayos clínicos de fármacos en estudio, pero su utilidad para el diagnóstico clínico aún no se ha confirmado (Villemagne et al., 2015, Ossenkoppele et al., 2015).

Finalmente, si nos centramos en el diagnóstico clínico de la EA, actualmente existen diversos criterios diagnósticos de referencia, a pesar de que el diagnóstico definitivo únicamente se puede realizar en tejido post-mortem, al comprobar la presencia de placas amiloides y ovillos de neurofilamentos (Winblad et al., 2016).

Por un lado, encontramos la clasificación que realiza la Asociación Americana de Psiquiatría en la quinta edición revisada del manual diagnóstico y estadístico de las enfermedades mentales (DSM-V), que engloba la EA dentro de los trastornos neurocognitivos (Association, 2013). El diagnóstico se basa en la valoración cognitiva del paciente, evaluando el estado de la atención, la función ejecutiva, el aprendizaje, la memoria, el lenguaje, las funciones visuoperceptivas y visuoespaciales y la cognición social, sin tener en cuenta los biomarcadores o las pruebas de neuroimagen como pruebas diagnósticas. Además, al ser una clasificación de enfermedades, no incluye los estadios preclínicos, aunque sí contempla un estadio patológico predominante (López-Álvarez y Agüera Ortiz, 2015)

Por otro lado, los criterios de Dubois (Dubois et al., 2007) determinan el diagnóstico de la EA en base a la afectación gradual y progresiva de la memoria episódica, acompañada o no de otras alteraciones cognitivas, pero siempre objetivada por pruebas neuropsicológicas y la presencia de biomarcadores obtenidos mediante pruebas complementarias, como la atrofia en el lóbulo temporal medial evidenciada por resonancia magnética, la alteración de los biomarcadores en líquido cefalorraquídeo, alteraciones en pruebas de neuroimagen funcional con PET o una mutación autosómica dominante en un familiar de primer grado. Según estos criterios, el diagnóstico de la EA sería definitivo cuando aparecen evidencias clínicas conjuntamente con evidencias anatomopatológicas (biopsia o necropsia) o genéticas (mutaciones en cromosomas 1, 14 o 21, véase el apartado 3.1). Además, esta clasificación incluye dentro de la EA los diferentes estados presintomáticos, desde el inicio de los cambios cerebrales hasta los primeros cambios cognitivos (Dubois et al., 2010).

Por último, encontramos los denominados criterios NIA-AA desarrollados de forma conjunta por el “*National Institute of Aging*” y la “*Alzheimer’s Association*” y que suponen una actualización de los criterios NINCDS-ADRDA (McKhann et al., 2011). Estos criterios definen el diagnóstico de la demencia en general, basada en síntomas cognitivos o conductuales, y de la EA en particular. En este caso, el diagnóstico de la EA se base principalmente en la realización de un examen neuropsicológico de diversos ámbitos cognitivos, a la exploración psicopatológica y a la valoración funcional, y se incluye como opcional la evidencia de biomarcadores fisiopatológicos (como el volumen hipocampal, PET amiloidogénica, o la determinación de A $\beta$ 42, p-Tau y T-Tau en el LCR), que apoyarían el diagnóstico, pero sin ser imprescindibles. Además, estos criterios conservan el concepto de deterioro cognitivo leve que no se incluiría dentro de la categoría de EA (Scheltens et al., 2016).

### 1.3 Tratamientos

A pesar de todos los esfuerzos destinados a desarrollar una terapia eficaz para la EA, hasta la fecha no se ha descubierto ninguna cura o método preventivo. Los tratamientos disponibles actualmente se dirigen únicamente a los síntomas, y no abordan los mecanismos moleculares de la enfermedad. En la actualidad, los tratamientos reconocidos para la EA se limitan a 3 fármacos inhibidores de la acetilcolinesterasa (donepezilo, rivastigmina, y galantamina) y un fármaco antagonista del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), la memantina (Ferreira-Vieira et al., 2016).

Los inhibidores de la colinesterasa (donepezilo, rivastigmina, y galantamina) se unen e inactivan de forma reversible a la colinesterasa, inhibiendo la hidrólisis de la acetilcolina y provocando un aumento en la concentración de este neurotransmisor en las sinapsis colinérgicas. En la EA se da una disminución sustancial de neuronas colinérgicas en la corteza, el área entorrinal, el hipocampo, el estriado ventral y la parte basal del prosencéfalo, lo que contribuye a la sintomatología en la EA y concretamente a los déficits de memoria. El aumento de acetilcolina que provocan estos inhibidores tiene un efecto protector sobre la muerte de neuronas colinérgicas, aliviando los síntomas de la EA (Kása et al., 1997).

La memantina es un antagonista de baja afinidad de los receptores NMDA glutamatérgicos que al unirse al receptor NMDA inhibe la afluencia de los iones de  $Ca^{2+}$  desde el espacio extracelular, modulando la transmisión glutamatérgica e impidiendo la muerte celular por excitotoxicidad. La descarga excesiva de glutamato está relacionada con procesos neurodegenerativos, como la EA, debido a la excitotoxicidad del glutamato y al posterior desequilibrio de la homeostasis del calcio (Reisberg et al., 2003).

Sin embargo, tanto los inhibidores de la colinesterasa, como los antagonistas de NMDA únicamente tienen efectos paliativos con una eficacia reducida, ya que, como hemos comentado anteriormente, ninguno de estos tratamientos es capaz de modificar los mecanismos moleculares de la enfermedad. Este escenario pone de relieve la necesidad de encontrar fármacos capaces de prevenir la degeneración neuronal y contrarrestar así la progresión de la EA.

Las estrategias en la búsqueda de un tratamiento se han centrado en la prevención de la producción del péptido A $\beta$ , su agregación, su toxicidad o del incremento de su degradación, o bien, en una combinación de éstas. Esto incluye inhibidores de la  $\beta$ -secretasa y la  $\gamma$ -secretasa; el empleo de antiinflamatorios no esteroideos, que reducen la producción de A $\beta$ ; las estatinas para disminuir el colesterol; la neprilisina, para promover la degradación del A $\beta$  y quelantes de metales para bloquear la agregación del A $\beta$ , además de agentes que promuevan su eliminación (Folch et al., 2015).

## 2. Características neuropatológicas de la Enfermedad de Alzheimer

Los cambios macroscópicos característicos del cerebro de los pacientes de Alzheimer incluyen una importante atrofia cortical, con adelgazamiento de las circunvoluciones, ensanchamiento de los surcos, engrosamiento de las meninges, dilatación de las cavidades ventriculares y disminución del peso y volumen cerebral. La atrofia afecta a los lóbulos temporales (más frecuentemente), frontales, parietales y occipitales. El patrón de atrofia más común es el difuso, seguido por una combinación de atrofia fronto-temporal, frontal o temporal aisladas y, en menor proporción, puede haber una afectación parietooccipital.

A nivel microscópico las principales marcas neuropatológicas son el depósito de placas de A $\beta$  a nivel extracelular y el acúmulo intracelular de ovillos neurofibrilares, que aparecen preferentemente en las regiones cerebrales más vulnerables, como el hipocampo y la corteza (Zhang et al., 2011). También se dan otro tipo de alteraciones funcionales y estructurales, incluyendo la respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo (LaFerla et al., 2007).

## 2.1 Placas amiloides

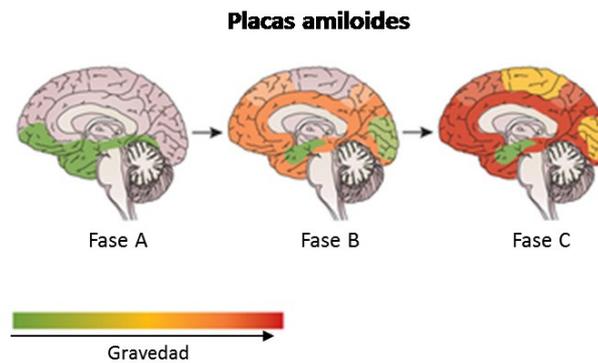
Las placas amiloides son acumulaciones proteicas insolubles, formadas principalmente por el péptido A $\beta$  que se deposita a nivel extracelular formando estructuras esféricas y complejas con estructura de lámina- $\beta$ . El péptido A $\beta$  contiene de 39-43 aminoácidos y deriva del procesamiento de la proteína precursora de amiloide (APP) (De Strooper, 2010). In vivo pueden encontrarse dos formas mayoritarias del péptido A $\beta$ : A $\beta$ 40 que termina en el aminoácido Val40, y A $\beta$ 42 que tiene dos aminoácidos adicionales, Ile41 y Ala42, lo que le confiere mayor hidrofobicidad y capacidad de agregación (Wolfe, 2007). El péptido A $\beta$  se deposita en el espacio extracelular del parénquima cerebral en forma de placas seniles, las cuales se subdividen en neuríticas y difusas, que se diferencian principalmente en la morfología compacta o difusa que presenten, y en la presencia o no de células gliales asociadas (Dickson y Vickers, 2001, Fiala, 2007).

Las **placas neuríticas** son depósitos extracelulares de aspecto filamentosos formados principalmente por fibrillas de A $\beta$ 42 y A $\beta$ 40. Asociadas a estas placas aparecen **neuritas distróficas** que son dilatadas y tortuosas y están marcadas por anomalías ultraestructurales, como la presencia de lisosomas alargados, numerosas mitocondrias y pares de filamentos helicoidales. Además, las neuritas distróficas pueden acumular en su interior depósitos de proteínas como APP, ubiquitina, p-Tau, además de vesículas autofágicas, vesículas sinápticas, etc., debido al fallo en el transporte axonal que se produce como consecuencia de la desestabilización de la red del citoesqueleto (Su et al., 1998, Norfray y Provenzale, 2004, Duyckaerts et al., 2009). El término “neurita distrófica” hace referencia tanto a los cambios a nivel axonal como dendrítico. Otra característica de las placas neuríticas es que se encuentran íntimamente asociadas con microglía reactiva y astrogía activada, que se localiza en la periferia rodeando la placa y enviado sus procesos hacia ella. El tiempo de formación de este tipo de placas es desconocido, ya que pueden formarse gradualmente durante un largo periodo de tiempo, incluso años. Su tamaño oscila entre 10 y 120  $\mu$ m, mientras que la densidad es muy variable (Dickson y Vickers, 2001, Selkoe, 2001a). Algunos autores las subdividen en placas primitivas (esféricas y sin núcleo compacto) que aparecen en zonas cercanas a los axones y las sinapsis, y placas clásicas (núcleo amiloide denso, redondo y compacto con un halo alrededor).

Las **placas difusas** son depósitos de A $\beta$  extracelular sin apariencia fibrilar, también denominados placas pre-amiloideas. Son zonas difusas o amorfas sin núcleo compacto, con poca o ninguna microglía y astrogía reactiva y no suelen presentar neuritas distróficas. Suelen aparecer en zonas cercanas a neuronas y están compuestas principalmente por A $\beta$ 42 (van Groen et al., 2003).

Las placas se acumulan principalmente en el neocórtex y aunque el patrón espacio temporal de progresión del amiloide es variable, en general la corteza entorrinal, perirrinal y la formación hipocámpal están menos afectadas que la corteza asociativa. Pese a la pobre predicción de la deposición de A $\beta$ , se han propuesto dos sistemas diferentes de clasificación en base a la evolución del depósito amiloide (Serrano-Pozo et al., 2011). El propuesto por Braak y Braak en 1991 (Figura 11), que distingue tres fases (Braak y Braak, 1991):

- Fase A: los depósitos extracelulares afectan a las porciones basales de los lóbulos frontal, temporal y occipital.
- Fase B: el depósito de A $\beta$  avanza hacia todas las áreas neocorticales de asociación, el hipocampo se encuentra ligeramente afectado y la corteza sensorial, motora y visual primaria aún están libres de depósitos.
- Fase C: el A $\beta$  finalmente se deposita en las áreas neocorticales primarias, en la capa molecular del cerebelo y en el estriado, el tálamo, el hipotálamo y el núcleo subtalámico.



**Figura 11. Evolución neuropatológica en la EA en base a la dispersión de placas según Braak y Braak.** En base a la dispersión del depósito de  $A\beta$  se distinguen 3 fases en la evolución de la enfermedad, A, B y C. Adaptado de (Masters et al., 2015).

Y el propuesto por Thal y colaboradores en 2002, que definen cinco fases o estadios, que a su vez pueden resumirse en 3, la fase neocortical, la fase límbica o allocortical, y la fase subcortical (Thal et al., 2002):

- Estadio 1 o neocortical.
- Estadio 2: los depósitos avanzan hacia la corteza perirrinal, corteza entorrinal, hipocampo, amígdala y corteza insular y cingulada.
- Estadio 3: ya aparecen afectados el estriado, los núcleos colinérgicos, el tálamo, hipotálamo y la sustancia blanca.
- Estadio 4: caracterizado por afectar a la sustancia nigra, la formación reticular, el bulbo raquídeo y el colículo superior e inferior.
- Estadio 5: los depósitos se expanden hasta la formación reticular, el núcleo del rafe, el locus ceruleus y la capa molecular del cerebelo.

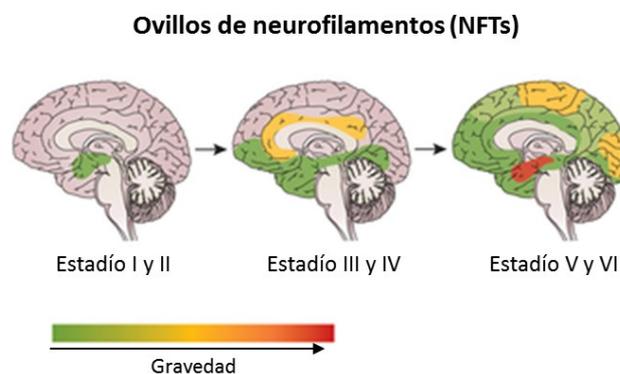
### 2.2 Ovillos neurofibrilares

Los ovillos neurofibrilares son estructuras histopatológicas localizadas en el interior neuronal, constituidas por pares de filamentos helicoidales cuyo principal componente es la proteína Tau hiperfosforilada, que forma una red compacta de filamentos intracelulares (Goedert et al., 1992). Tau es una proteína asociada a microtúbulos cuya función es estabilizar los microtúbulos del citoesqueleto colaborando en la generación y el mantenimiento de los axones (Cleveland et al., 1977). Para formar los ovillos, Tau se disocia de los microtúbulos, probablemente debido a la hiperfosforilación y pasa de tener una localización axonal a somatodendrítica, donde se ensambla en forma de pares de filamentos helicoidales que constituyen las unidades estructurales de los ovillos. Las principales quinasas implicadas en la fosforilación anómala de Tau son la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) y la quinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5) (Mandelkow et al., 1992, Baumann et al., 1993).

Los estudios con células hipocampales han descrito una relación entre los depósitos extracelulares de  $A\beta$  y la cascada de señales moleculares que activan la hiperfosforilación de Tau. Factores como el péptido  $A\beta$ , el estrés oxidativo o p25, inducen un cambio en la ruta de señalización que conlleva una desregulación de Cdk5, la cual fosforila de forma anómala a Tau. La forma hiperfosforilada de Tau estimula la acción de la GSK3, evitando de esta manera la incorporación de Tau en los microtúbulos, por tanto, favoreciendo la formación de los pares de filamentos helicoidales y finalmente los ovillos neurofibrilares (Maccioni et al., 2001, Blennow et al., 2006, Ballatore et al., 2007).

A diferencia de lo que ocurre con la evolución de la patología amiloide, el patrón espacio temporal de progresión de los NFT es bastante predecible a lo largo de la enfermedad. Braak y Braak distinguieron seis estadios o etapas de progresión, que pueden resumirse en tres (Figura 12): entorrinal (I y II), límbica (III y IV) y neocortical (V y VI) (Braak y Braak, 1991, Braak et al., 2006):

- Estadio I: Los primeros NFTs se desarrollan en la región transentorrinal de la corteza perirrinal.
- Estadio II: los NFTs se extienden a la corteza entorrinal del giro parahipocampal y a la región CA1 del hipocampo
- Estadio III: los ovillos se acumulan en regiones límbicas como el subículo
- Estadio IV: los NFTs avanzan hacia la amígdala, el tálamo y el claustró
- Estadio V: los ovillos se extienden por todas las áreas neocorticales, afectando más temprana y severamente las áreas asociativas
- Estadio VI: finalmente, la afectación llega a las áreas sensoriales primarias, motoras y visuales. Durante la etapa neocortical tardía, el estriado y la sustancia nigra pueden verse severamente afectados.



**Figura 12. Evolución neuropatológica en la EA en base a la dispersión de NFTs según Braak y Braak.** En base a la dispersión del depósito de ovillos se distinguen 6 fases en la evolución de la enfermedad I-VI, que pueden resumirse en tres: entorrinal (I y II), límbica (III y IV) y neocortical (V y VI). Adaptado de (Masters et al., 2015).

Además, esta degeneración también sigue un patrón dentro de cada región, de manera que primero se encuentran afectadas las capas superficiales II, III y IV de la corteza perirrinal y entorrinal, el estrato piramidal de CA1 y subículo, y las capas III y V de las áreas neocorticales (Braak et al., 2006, Serrano-Pozo et al., 2011).

### 2.3 Pérdida sináptica

Otras de las marcas neuropatológicas características del Alzheimer es la disminución de la densidad sináptica. Diferentes grupos de investigación han demostrado que en la EA se produce una pérdida significativa de la densidad sináptica en áreas neocorticales de asociación y en el hipocampo, concretamente en las capas III y V de la corteza de los lóbulos frontal, temporal y parietal, y en la capa granular del giro dentado (Scheff y Price, 2003).

Además, esta pérdida sináptica se caracteriza por mostrar reducciones diferenciales específicas de diferentes proteínas sinápticas en todo el cerebro, como sinaptofisina, syntaxina o SNAP25 (Honer, 2003). La cuantificación de la pérdida sináptica a través de los niveles de sinaptofisina se correlaciona de forma positiva con la carga de NFTs en neuronas (Clare et al., 2010). Además, la acumulación de A $\beta$  también se asocia con la pérdida de función sináptica y con la formación de neuritas distróficas y estos cambios

sinápticos parecen tener un gran efecto sobre los procesos de memoria y aprendizaje (Scheff et al., 2007). De hecho, la pérdida o la disfunción sináptica en estas regiones se correlaciona con el estado cognitivo de los pacientes mejor que cualquier otro marcador patológico de la EA (Shankar y Walsh, 2009). Por tanto, la pérdida sináptica se considera un índice consistente de deterioro cognitivo en la EA ya que el mecanismo celular y molecular de la memoria y el aprendizaje dependen de la integridad de los circuitos sinápticos en el hipocampo (Sze et al., 2000).

En este sentido, la plasticidad sináptica, definida como la capacidad de formar nuevas sinapsis funcionales, proporciona la base para los distintos tipos de memoria y aprendizaje. Los dos tipos de plasticidad sináptica son la potenciación a largo plazo (LTP) y la depresión a largo plazo. La toxicidad mediada por A $\beta$  disminuye la excitabilidad neuronal porque provoca la internalización de receptores AMPA, lo que genera depresión sináptica y pérdida de espinas dendríticas, provocando la interrupción de la LTP, imprescindible en la plasticidad sináptica asociada con los procesos de memoria y aprendizaje (Small, 2008). Por otro lado, también se ha propuesto que A $\beta$ 42 promueve la endocitosis de los receptores NMDA, reduciendo su densidad en las sinapsis y con ello afectando a la transmisión glutamatérgica, dando lugar al fallo en la plasticidad sináptica (Tanzi, 2005).

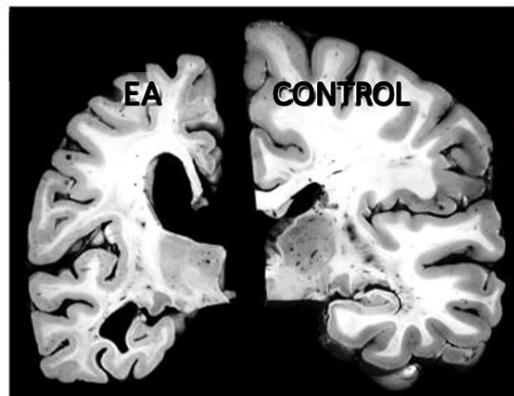
### **2.4 Muerte neuronal**

Junto a las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares, la muerte neuronal en regiones corticales y subcorticales representa una de las principales marcas patológicas de la EA. Durante el desarrollo de la enfermedad, la muerte neuronal progresiva da lugar a una atrofia importante en varias regiones cerebrales como el hipocampo, la corteza entorrinal y los núcleos basales de Meynert (Gómez-Isla et al., 1996). En los casos preclínicos de la EA no se ha descrito la pérdida neuronal en el hipocampo, mientras que en estados más avanzados de la EA se detecta una importante pérdida neuronal en las capas CA1, el hilus y el subículo de esta región cerebral (West et al., 2004).

El núcleo basal de Meynert es una fuente importante de innervaciones colinérgicas en la corteza cerebral y es una de las primeras regiones donde se experimenta una pérdida neuronal significativa, con la consecuente alteración de los sistemas de transmisión colinérgica en el neocórtex (Davies y Maloney, 1976, Schliebs y Arendt, 2011). Además, en pacientes de EA también se ha descrito la pérdida neuronal en otras regiones cerebrales como el bulbo olfatorio anterior, la amígdala, las áreas bajas y medias de la sustancia nigra, el núcleo cerúleo y los núcleos del rafe (Lyness et al., 2003, Zarow et al., 2003, ter Laak et al., 1994, Vereecken et al., 1994).

A pesar de la relevancia que tiene la muerte neuronal en la EA, en la actualidad aún se desconoce cuál es el mecanismo exacto o el tipo de muerte que provoca esta pérdida neuronal (Ghavami et al., 2014). Teniendo en cuenta que la EA es una enfermedad neurodegenerativa dependiente de la edad, es razonable pensar que la muerte neuronal es el resultado de la acumulación de múltiples daños crónicos como el aumento del estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, la inflamación, la degeneración axonal y el deterioro de la transmisión sináptica, que contribuirían a la muerte neuronal, posiblemente por apoptosis (Culmsee y Landshamer, 2006). De hecho, múltiples evidencias relacionan los péptidos de A $\beta$  con la activación de la vía intrínseca de la apoptosis (Biswas et al., 2007, Yamamoto et al., 2007). Sin embargo, el estudio de la apoptosis en tejido post-mortem de enfermos de Alzheimer ha dado resultados controvertidos, con algunos estudios que muestran una distribución generalizada de marcadores apoptóticos (Troncoso et al., 1996, Su et al., 2001), mientras que otros sólo han revelado una distribución dispersa (Selznick et al., 1999, Woodhouse et al., 2006). En esta línea, la diferencia entre la extensión de la pérdida neuronal y la expansión de los NFTs sugiere que hay al menos dos mecanismos de muerte neuronal en la EA: uno que afectaría a las neuronas con depósito de ovillos de Tau y otro que afectaría a las neuronas sin este tipo de depósitos (Serrano-Pozo et al., 2011).

Además de esta patología microscópica, el cerebro de pacientes con EA muestra una atrofia macroscópica pronunciada que provocan el ensanchamiento de los surcos y giros del cerebro, así como el aumento de volumen de los ventrículos (Figura 13). Aunque la evolución de la atrofia es lenta, la tasa de reducción del volumen cerebral es 10 veces mayor que la que se da en el envejecimiento no patológico (Andrews et al., 2013). En consecuencia, esta atrofia provoca la disminución del peso cerebral y la reducción volumétrica, que es posible medir con técnicas de resonancia magnética (Bottino et al., 2002). La atrofia cerebral macroscópica en la EA se expande con una secuencia temporal-frontal-sensoriomotora. La pérdida de materia gris se observa primero en las regiones temporal y parietal, siendo el hipocampo y la corteza entorrinal las zonas más afectadas. Más tarde, el déficit se expande a la corteza temporal y frontal, y finalmente, a cortezas sensomotora y visual, donde no aparece daño hasta muy avanzada la enfermedad (Thompson et al., 2003).



**Figura 13. Atrofia cerebral en la EA.** La comparación de un corte histológico del cerebro de un enfermo de Alzheimer (EA, izquierda) con el de un individuo con capacidades cognitivas normales (derecha) revela la severa atrofia cerebral que se produce en la EA. Adaptado de (Holtzman et al., 2011).

En cuanto a los déficits cognitivos, la atrofia cerebral se correlaciona bien con los resultados de las pruebas neuropsicológicas (Arlt et al., 2013, Peng et al., 2015). Por ejemplo, el volumen de materia gris del hipocampo en el hemisferio izquierdo se correlaciona significativamente con el desarrollo de las pruebas de memoria y el volumen de la materia gris de lóbulo temporal está relacionado con el desempeño de las tareas de lenguaje.

## 2.5 Inflamación

Además de la producción de A $\beta$  y la patología neurítica, la inflamación es también un actor clave en la EA, sin embargo, todavía se desconoce cuál de estos eventos (depósito amiloide, inflamación o neuritis distróficas) aparecen primero durante el desarrollo de la enfermedad y cómo estos tres eventos están conectados (Tuppo y Arias, 2005).

El Sistema Nervioso Central (SNC) posee un sistema inmune endógeno que es coordinado por células inmunocompetentes, como son las células de la microglía (Cagnin et al., 2002). Los responsables de la neuroinflamación se dividen en los componentes celulares (microglía, astrocitos y neuronas) y las sustancias proinflamatorias, como el sistema del complemento, las quimiocinas y las citoquinas, liberados por los anteriores tipos celulares. Las células de la microglía se activan rápidamente ante cualquier daño y pueden diferenciarse a distintos fenotipos, un fenotipo clásico o proinflamatorio y un fenotipo alternativo o antiinflamatorio.

La activación microglial clásica se da en respuesta a la secreción de las citoquinas, desencadenando la producción de especies reactivas de oxígeno, citoquinas y quimiocinas proinflamatorias mantenimiento de esta respuesta durante el tiempo daría lugar a la citotoxicidad neuronal, creando un círculo vicioso que

potenciaría aun más la respuesta clásica proinflamatoria (Cherry et al., 2014, Cai et al., 2014). En un escenario marcado por la inflamación crónica asociada a la EA, la microglía sería altamente sensible a la activación y diferenciación hacia un fenotipo clásico (Krstic y Knuesel, 2013, Heneka et al., 2015).

Por otro lado, la respuesta alternativa inhibe la activación clásica y promueve la reparación del tejido y la recuperación de la homeostasis mediante la liberación de moléculas antiinflamatorias y factores de crecimiento (Cherry et al., 2014). Durante el envejecimiento normal, la activación microglial alternativa se encarga de eliminar las proteínas plegadas erróneamente (como A $\beta$  o sinucleína) evitando así que se agreguen y se acumulen en el cerebro (Krstic y Knuesel, 2013, Harry, 2013).

En la EA es ampliamente aceptado que el depósito de A $\beta$  sería suficiente por sí sólo para inducir una reacción inflamatoria que posteriormente contribuiría a la muerte neuronal y al deterioro cognitivo (Heneka y O'Banion, 2007). Sin embargo, esto no implica necesariamente que la formación de las placas de A $\beta$  preceda a la activación microglial en la EA. De hecho, existen evidencias que apoyan la existencia de una respuesta inflamatoria neuroprotectora en la EA, fuertemente asociada a las placas de A $\beta$  desde estadios tempranos en modelos de EA (Jimenez et al., 2008). Curiosamente, durante el envejecimiento patológico relacionado con la EA, las células de la microglía se sitúan alrededor de las placas y fagocitan A $\beta$ , lo que constituye parte del mecanismo microglial alternativo neuroprotector para eliminar las fibras de A $\beta$  y promover la supervivencia neuronal. Sin embargo, también es cierto que la capacidad fagocítica de la microglía en el contexto de la EA es insuficiente para eliminar la totalidad de las fibras acumuladas. Se piensa que la disminución en la expresión de receptores de fagocitosis derivada del aumento del depósito amiloide, provocaría el incremento en la concentración de citoquinas, lo que finalmente daría lugar al viraje hacia el fenotipo microglial clásico, que aparece en edades avanzadas, asociado con la presencia de oligómeros de A $\beta$  solubles y con la pérdida neuronal. Estas evidencias muestran que la microglía alternativa neuroprotectora puede estar presente en edades avanzadas y coexistir con la clásica activación microglial (Jimenez et al., 2008, Heneka et al., 2015).

### **3. Tipos de Enfermedad de Alzheimer: familiar y esporádica**

De forma general se diferencian dos tipos de EA, la enfermedad de Alzheimer familiar y enfermedad de Alzheimer esporádica, que se diferencian en función de la edad de inicio, las causas de aparición y la incidencia; aunque la patología en ambos tipos curse con los mismos síntomas y lesiones histopatológicas (placas seniles y ovillos neurofibrilares), sugiriendo una patogénesis común (Van Gassen y Annaert, 2003).

#### **3.1 Enfermedad de Alzheimer familiar**

La forma familiar de la EA constituye solo el 5% de todos los casos y se caracteriza por la manifestación precoz de los primeros síntomas, alrededor de los 40 años (Rosenberg, 2000); y por su transmisión con carácter autosómico dominante. Hasta la fecha se han identificado 3 genes, cuyas mutaciones causan EA familiar: el gen de la APP localizado en el cromosoma 21, el gen de la presenilina 1 (PS1) en el cromosoma 14 y el gen de la presenilina 2 (PS2) situado en el cromosoma 1.

##### **3.1.1 Mutaciones en el gen de la proteína precursora de amiloide**

Los estudios sobre la APP como determinante genético de la EA comenzaron a mediados de los años 80 debido a la observación de las características neuropatológicas de EA en individuos con Síndrome de Down. Estos datos mostraron la implicación del cromosoma 21 en esta patología, deduciendo que, debido a la copia extra de un gen mapeado en el cromosoma 21, estos individuos desarrollan el fenotipo tipo Alzheimer (Price y Sisodia, 1998). La secuenciación del gen APP y los estudios para detectar mutaciones en individuos con la enfermedad, confirmaron que este gen estaba asociado a la patología. La primera

mutación que se identificó en APP afectaba a una familia británica, por lo que recibió el nombre de mutación “London” (Goate et al., 1991). Actualmente se conocen más de 50 mutaciones (Figura 14) identificadas en 121 familias (se puede encontrar una lista actualizada de mutaciones en <http://www.alzforum.org/mutations>). Sin embargo, todas estas mutaciones en APP sólo explican una pequeña proporción de los casos de Alzheimer familiar, entorno al 5%.



**Figura 14. Algunas de las mutaciones en APP en la EA.** La mutación Swedish aumenta el procesamiento por la  $\beta$ -secretasa mientras que la mutación Flemish impide parcialmente el procesamiento por la  $\alpha$ -secretasa. Las mutaciones Arctic, Dutch y Iowa favorecen la agregación. Las mutaciones tipo London aumentan los niveles de A $\beta$ 42, o la ratio A $\beta$ 42/ A $\beta$ 40 al alterar el sitio de procesamiento por la  $\gamma$ -secretasa. Las mutaciones se denominan de acuerdo a la posición del aminoácido en la isoforma 770 (Uniprot: P05067). Adaptado de Alzforum.org.

Las mutaciones de APP identificadas hasta la fecha se encuentran situadas en o cerca de la secuencia del péptido A $\beta$ . La gran mayoría se encuentran en las mediaciones de las regiones de corte de las secretasas, de forma que ejercen su efecto patogénico favoreciendo el procesamiento de APP y alterando la ratio de A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 (Figura 14).

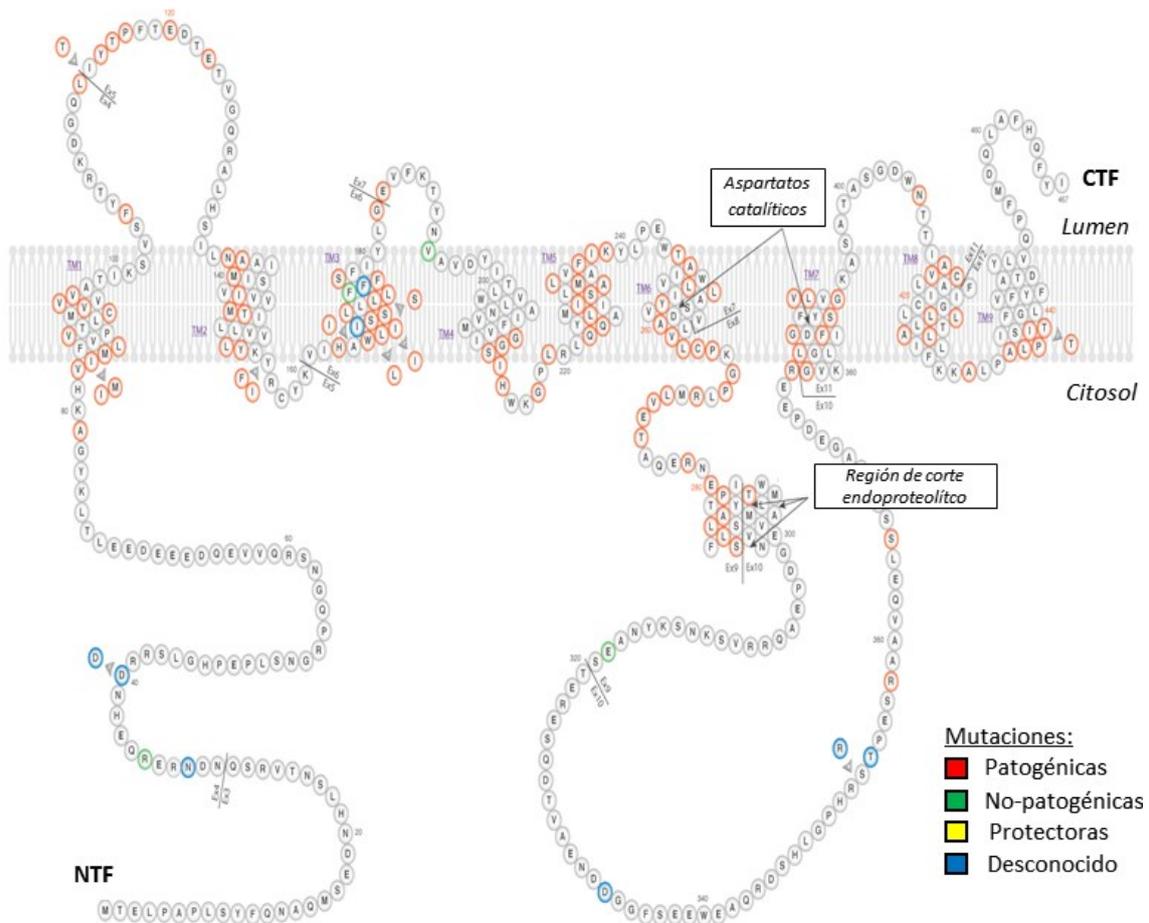
- La mutación “*Swedish*” (APP 670/671) se sitúa en el sitio de corte de la  $\beta$ -secretasa y supone un aumento en los niveles del péptido A $\beta$  (Mullan, 1991).
- Las mutaciones cerca de los lugares de corte de la  $\gamma$ -secretasa, afectan a la posición del corte C-terminal provocando un aumento de la ratio A $\beta$ 42/A $\beta$ 40, sin afectar a la producción total de A $\beta$ . Son, por ejemplo, la mutación “*London*” (APP717) o la mutación “*Florida*” (APP716) (Suzuki et al., 1994, Eckman et al., 1997).
- La mutación “*Flemish*” (APP692), situada en el sitio de corte de la  $\alpha$ -secretasa, interfiere en el procesamiento de esta secretasa, aumentando en sustrato para la  $\beta$ -secretasa (Cras et al., 1998).
- Por otro lado, las mutaciones dentro de la secuencia de A $\beta$  podrían alterar las propiedades fisicoquímicas del péptido A $\beta$ , promoviendo su agregación y aumentando la formación de fibrillas, tal y como se ha visto en las mutaciones “*Dutch*”, “*Arctic*” o “*Iowa*” (Nilsberth et al., 2001, Brouwers et al., 2008).

### 3.1.2 Mutaciones en los genes de la presenilina 1 y la presenilina 2

En 1992 se detectó un *locus* en el brazo largo del cromosoma 14 relacionado con la EA, que años después se denominó como PS1. Las mutaciones en PS1 son la causa más común de Alzheimer familiar, englobando el 70% de los casos y son, por regla general, las más agresivas en cuanto a inicio precoz y evolución rápida de los síntomas se refiere (Tandon y Fraser, 2002, Rocchi et al., 2003). Hasta la fecha se han identificado más de 180 mutaciones con efecto patogénico en PS1 en 480 familias (Figura 15). Se puede encontrar una lista actualizada de mutaciones en <http://www.alzforum.org/mutations>.

Además de las mutaciones en PS1, se identificaron mutaciones en el gen de la PS2 en el cromosoma 1. Estas mutaciones son responsables del 25% de los casos de EA familiar. Hasta la fecha se han identificado 16 mutaciones patogénicas en PS2 descritas en 34 familias diferentes (véanse en <http://www.alzforum.org/mutations>).

Las presenilinas constituyen una familia de proteínas muy similares, llegando a presentar una homología del 90% en sus dominios transmembrana. La función más conocida de las presenilinas es como centro activo del complejo  $\gamma$ -secretasa, implicado en el procesamiento de la APP y la generación de A $\beta$  (véase el apartado 4.2 de este capítulo). Las mutaciones en presenilina alteran el procesamiento de APP, llevando a un incremento en la razón A $\beta$ 42/40 (Wang et al., 2006, Bentahir et al., 2006) lo que da lugar a una mayor formación de oligómeros y formas fibrilares debido a que el péptido A $\beta$ 42 es más hidrofóbico y se agrega con mayor facilidad (Wolfe, 2007, Chen y Glabe, 2006).



**Figura 15. Algunas de las mutaciones en PS1 en la EA.** Se han descrito más de 180 mutaciones en PS1, y estas son la causa más común de la EA familiar. Las mutaciones se denominan de acuerdo a la posición del aminoácido en la isoforma 1 (Uniprot: 49768), que tiene 467 aminoácidos. Adaptado de Alzforum.org.

### 3.2 Enfermedad de Alzheimer esporádico

Este tipo de Alzheimer (senil o de inicio tardío), presenta una incidencia baja hasta los 60-65 años de edad, afectando a un 3 o 4% de la población. A partir de esta edad, el porcentaje de incidencia se duplica cada 5 años, lo que sitúa la prevalencia de la enfermedad en más de un 20% en la población mayor de 85 años (Prince, 2015).

Los principales factores de riesgo en la aparición de la forma esporádica de la EA son la edad y la presencia del alelo  $\epsilon 4$  para la apolipoproteína E (ApoE). Sin embargo, ni los factores genéticos ni los factores ambientales son, por sí solos, suficientes para desencadenar la enfermedad, sino que condicionan una mayor susceptibilidad. En última instancia, la aparición de este tipo de EA está determinada por el polimorfismo existente entre los individuos, que les pueden predisponer en mayor o menor grado al proceso neurodegenerativo.

#### 3.2.1 Factores de riesgo genéticos

El componente genético en la predisposición a padecer EA esporádica es complejo y heterogéneo, ya que no existe un modelo único que explique el modo de transmisión de la enfermedad y las mutaciones o polimorfismos genéticos pueden interactuar entre sí y con factores ambientales para determinar una

mayor o menor susceptibilidad a padecerla. Durante muchos años, APOE fue el único gen conocido que incrementaba el riesgo a padecer la EA esporádica. Sin embargo, en los últimos años, los estudios colaborativos de asociación del genoma completo (GWAS) y el proyecto Internacional de Genómica del Alzheimer han avanzado significativamente en el estudio de la base genética de la EA esporádica, identificando al menos 20 loci adicionales de riesgo genético (Van Cauwenberghe et al., 2015).

### APOE

El gen que codifica la lipoproteína ApoE fue el primero en identificarse como una variante que constituye un factor de riesgo confirmado tanto para la EA de presentación tardía como para las formas más precoces de la enfermedad (Rocchi et al., 2003, Mahley et al., 2006). La proteína ApoE está implicada en el metabolismo lipídico, mantenimiento y remodelación neuronal, retirada de toxinas y en la reparación de tejidos. En el cerebro, los astrocitos y la microglía son las principales células productoras de ApoE (Poirier, 2000). Se han identificado tres formas polimórficas que aparecen comúnmente en la población de esta proteína llamadas ApoE2, ApoE3 y ApoE4, codificadas por las variantes o alelos del gen APOE llamados  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$ .

En 1993, Strittmatter y colaboradores observaron que la frecuencia del alelo  $\epsilon 4$  en los pacientes con EA (30- 50%) era mayor que en la de controles sanos de la misma edad (10-15%), lo que sugirió que este alelo podría ser un factor de susceptibilidad para la EA (Strittmatter et al., 1993). Actualmente se sabe además que su efecto depende de la dosis génica, ya que los individuos portadores de dos alelos  $\epsilon 4$  tienen un riesgo aun mayor de padecer la EA y de desarrollarla a una edad más temprana (Bu, 2009). Por el contrario, se ha observado que el alelo  $\epsilon 2$  resulta menos frecuente en pacientes con EA, y se encuentra en un alto grado de incidencia en centenarios sanos, por lo que podría ser una variante de protección (Farrer et al., 1997).

Además, la proteína ApoE parece estar implicada en la formación de placas amiloides y agregados neurofibrilares al interaccionar tanto con el péptido A $\beta$  como con la proteína Tau. De hecho, se ha demostrado que ApoE4 es capaz de modular el procesamiento de la proteína APP e incrementar la producción de A $\beta$  (Ye et al., 2005). Además, ApoE4 puede actuar de forma independiente al péptido A $\beta$ . Esta proteína puede ser procesada por proteasas en el medio ácido de lisosomas, generándose fragmentos tóxicos que afectan al funcionamiento mitocondrial (Mahley et al., 2006). La ApoE4 también es capaz de estimular la producción de prostaglandina E2, factor inflamatorio producido por la microglía, que contribuye a la patogénesis de la EA (Chen et al., 2005). Finalmente cabe destacar la importancia de la proteína ApoE en el transporte del colesterol. Se ha demostrado que las lipoproteínas que contienen la isoforma ApoE4 son menos eficientes en promover el flujo de colesterol en neuronas y astrocitos que las que contienen las otras isoformas; provocando una menor incorporación de colesterol a las membranas. Esta situación potencia la síntesis *de novo* de colesterol, lo que finalmente provoca una alteración en su distribución en la neurona. En los últimos años se ha relacionado la alteración de la homeostasis del colesterol con la patogénesis de la EA (Martins et al., 2009, Poirier, 2005).

### Otros genes susceptibles:

Además de APOE, el enfoque GWAS ha identificado al menos 20 loci de susceptibilidad cuya contribución relativa a la carga total de EA en la población es relativamente alta. Sin embargo, ninguno de ellos tiene un efecto de la magnitud de APOE  $\epsilon 4$  y la fracción de población con riesgo genético individual atribuible a estos loci sigue siendo limitada (Van Cauwenberghe et al., 2015, Winblad et al., 2016). Algunos de los loci identificados con una mayor fracción de población con EA atribuible serían:

- CLU: codifica para parte de la chaperona clusterina, que podría estar implicada en la patogénesis de la EA mediante el transporte de lípidos, la inflamación o influyendo directamente en la agregación de A $\beta$  y su eliminación del cerebro por endocitosis (Lambert et al., 2009).

- SORL1: codifica para el receptor relacionado con sortilina LR11/SorLA, proteína implicada en el control de la producción de péptidos A $\beta$ . Las mutaciones en este gen parecen tener un efecto patogénico tanto en casos de EA esporádica como en la EA de inicio temprano. Este hallazgo proporciona soporte para la hipótesis de cascada amiloide en los casos de formas de inicio temprano de la EA (Pottier et al., 2012).

- BIN1: codifica para la proteína “bridging integrator 1” involucrada en la endocitosis mediada por clatrina, un proceso esencial para el reciclado de las vesículas sinápticas (Seshadri et al., 2010). Los niveles de expresión de BIN1 aumentan en el cerebro humano y se asocian con el inicio tardío de la enfermedad y la duración más corta de la enfermedad en pacientes con EA (Van Cauwenberghe et al., 2015)

- CR1: codifica para el receptor del complemento 1 (receptor de C3b) expresado por la microglía. Está ligado a la EA a través de la activación de la cascada del complemento, inducida por el A $\beta$  fibrilar (Lambert et al., 2009).

- PICALM: codifica para la proteína “phosphatidyl inositol-binding clathrin assembly protein”. Se cree que podría modular la autofagia en la EA y participar en el procesamiento de APP a través de la ruta endocítica (Van Cauwenberghe et al., 2015).

### 3.2.2 Factores de riesgo no genéticos

Existen numerosos factores de tipo no genético que guardan relación con la probabilidad de padecer Alzheimer. En este sentido, el **envejecimiento** es el principal factor de riesgo no genético, como ya hemos comentado anteriormente. La prevalencia de la EA aumenta con la edad y se duplica cada 5 años entre los 65 y 85 años (Castellani et al., 2010). Se piensa que esto podría ser debido al daño producido por los radicales libres del metabolismo celular (Mattson y Magnus, 2006). De hecho, el **estrés oxidativo** *per sé* es también un factor de riesgo que posee implicaciones importantes en el inicio, progresión y patogénesis de la EA. Los radicales libres de oxígeno pueden contribuir a provocar daños en la membrana y el citoesqueleto y finalmente llevar a la muerte celular (Zhu et al., 2007).

Por otro lado, el **género** también es un factor de riesgo importante. La mujer tiene un riesgo mayor que el hombre de padecer la EA (Reiman y Caselli, 1999), independientemente de su mayor longevidad. Se han propuesto factores hormonales, ya que los estrógenos disminuyen la producción de A $\beta$  en cultivos celulares (Turner, 2001). Además, se conoce que los estrógenos poseen un papel neuroprotector, por lo que su pérdida con la edad en la mujer podría incrementar las probabilidades de desarrollar la enfermedad (Maccioni et al., 2009).

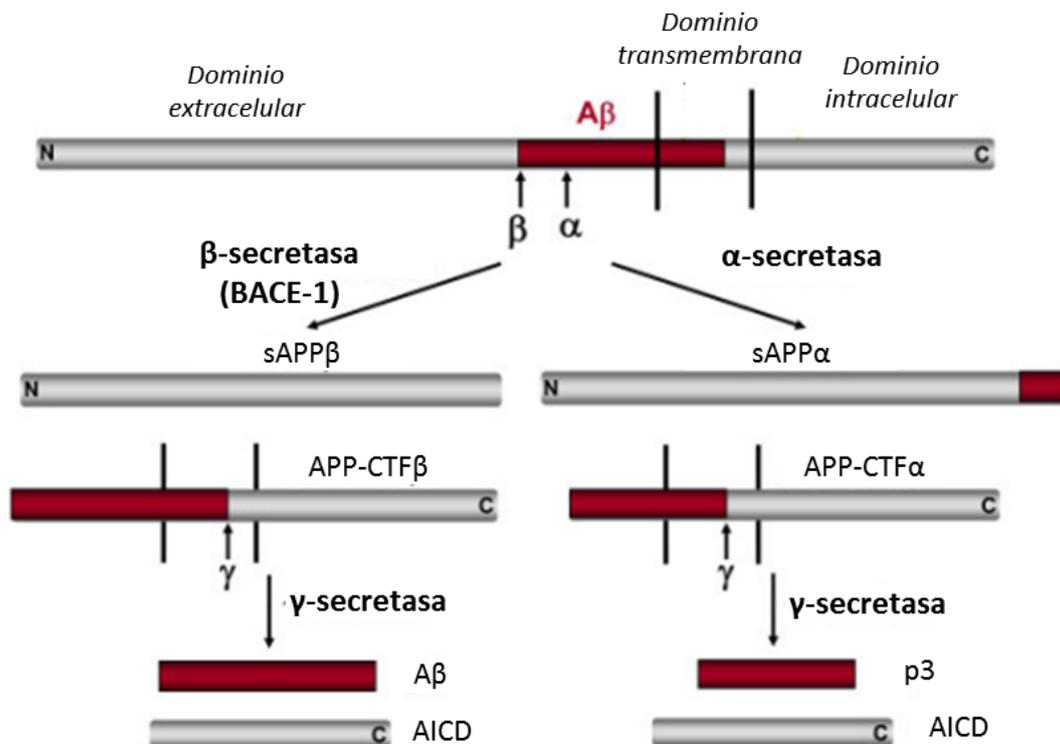
Además, los **problemas cardiovasculares** como la hipertensión, la aterosclerosis, el infarto o la isquemia cerebral son considerados factores de riesgo que incrementan la probabilidad de desarrollar la EA. Las enfermedades cardiovasculares pueden desencadenar también demencia vascular, que es la segunda causa de demencia tras la EA. Ha sido descrito que las enfermedades cardíacas y los infartos aumentan el deterioro de las personas que padecen EA y que pueden contribuir al inicio de la enfermedad (Martins et al., 2006). En este sentido, no sólo las enfermedades cardiovasculares sino también otras como la **diabetes mellitus** o los **procesos inflamatorios** pueden aumentar la probabilidad de padecer esta patología (Zhu et al., 2005, McGeer y McGeer, 2001). Por otro lado, la realización de ejercicio físico regular, el seguimiento de una dieta sana (como podría ser la dieta mediterránea) y el mantenimiento de la actividad intelectual se consideran buenos hábitos que disminuyen el riesgo de padecer una demencia (Reitz y Mayeux, 2014).

#### 4. La proteína precursora de amiloide y su procesamiento

La APP pertenece a una familia heterogénea de glicoproteínas transmembrana del tipo I, que contiene una señal terminal peptídica, un gran ectodominio para N-glicosilaciones, una región transmembrana y un pequeño dominio citoplasmático (Zhang et al., 2011). El gen APP codifica tres isoformas principales, APP695, APP751 y APP770, resultantes del *splicing* alternativo. APP se expresa en la mayor parte de los tipos celulares; las isoformas APP751 y APP770 son ampliamente expresadas en células no neuronales, mientras que en neuronas encontramos preferentemente la isoforma 695. Tanto en humanos como en roedores, la expresión de APP muestra una amplia distribución en el cerebro con una expresión elevada en la corteza, el hipocampo y el cerebelo (Solà et al., 1993). Tras la síntesis de APP en el retículo endoplasmático, la APP está sujeta a modificaciones postraduccionales tales como glicosilación, sulfatación y fosforilación durante su tránsito hacia la membrana plasmática. Durante la secreción e internalización a través de la vía secretora, APP puede sufrir diversas escisiones proteolíticas por tres proteasas llamadas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -secretasa (Figura I6). Dichas escisiones se agrupan en dos vías: la vía amiloidogénica y la vía no amiloidogénica (Zhang et al., 2011).

##### 4.1 Vía de procesamiento no-amiloidogénico

En la vía no amiloidogénica, la  $\alpha$ -secretasa escinde la APP entre los residuos Lys687 y Leu688, en el extremo N-terminal. Esta escisión se produce en el dominio  $A\beta$  y, por tanto, imposibilita su producción (Sisodia et al., 1990). Tiene lugar principalmente en la membrana plasmática, dando como resultado el desprendimiento de un fragmento soluble del ectodominio N-terminal de la APP (sAPP $\alpha$ ) al espacio extracelular y la retención de un fragmento C-terminal (CTF) de 83 residuos el CTF $\alpha$  en la membrana (Figura I6) (Sisodia, 1992).



**Figura I6. Procesamiento de APP.** Representación esquemática que muestra el procesamiento de APP por la vía no amiloidogénica (derecha), por la  $\alpha$ -secretasa y la  $\gamma$ -secretasa, y por la vía amiloidogénica (izquierda) por la  $\beta$ -secretasa (BACE-1) y la  $\gamma$ -secretasa, dando lugar a la formación del péptido A $\beta$  (izquierda). El dominio que da lugar al péptido A $\beta$  aparece en rojo. Para simplificar, de cada enzima sólo se muestra un sitio de corte. Adaptado de (Zheng y Koo, 2011).

La  $\alpha$ -secretasa es una única proteína transmembrana de tipo I dependiente del zinc (Roberts et al., 1994), que probablemente forma parte de la familia de las desintegrinas y metaloproteasas (ADAM). Parece ser que ADAM10 es el mejor candidato para  $\alpha$ -secretasa, ya que su sobreexpresión estimula de forma consecutiva la actividad de la proteína quinasa C y la secreción del ectodominio sAPP $\alpha$ . Otros candidatos son TACE, proteasa que procesa el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  y otros miembros de la familia ADAM, como ADAM 9 y ADAM 17 (Morishima-Kawashima y Ihara, 2002, Selkoe, 2001a).

El fragmento CTF $\alpha$  (C83) restante es procesado adicionalmente por la  $\gamma$ -secretasa para liberar al lumen extracelular el péptido p3 (A $\beta$ 17-40 y A $\beta$  17-42), y al citosol el dominio intracelular de APP (AICD) (Zhang et al., 2011).

## 4.2 Vía de procesamiento amiloidogénico

De forma alternativa, la APP puede sufrir una escisión diferente, la denominada vía amiloidogénica. En este caso, APP es procesada en primer lugar por la  $\beta$ -secretasa, generando un fragmento soluble N-terminal, el sAPP $\beta$ , y un fragmento C-terminal de 99 aminoácidos (C99) que queda insertado en la membrana (Figura I6). Tras el corte inicial por la  $\beta$ -secretasa, el complejo  $\gamma$ -secretasa realiza una escisión proteolítica de C99 dentro del dominio transmembrana a nivel de los residuos aminoácidos 711-713, dando lugar a AICD que se libera al espacio extracelular y a un péptido A $\beta$  de longitud variable (39-42 residuos), que consiste principalmente en un péptido A $\beta$  de 40 aminoácidos (A $\beta$ 40) y en menor medida en A $\beta$  de 42 aminoácidos (A $\beta$ 42) (Selkoe, 2001a, Takami et al., 2009).

### 4.2.1 Procesamiento $\beta$ -secretasa

La actividad  $\beta$ -secretasa se atribuye de forma general al enzima BACE-1 ( *$\beta$ -site APP cleaving enzyme 1*), una aspartil-proteasa transmembrana de tipo I. Sin embargo, además de BACE-1, BACE-2 y la catepsina B se han sugerido como responsables de la  $\beta$ -escisión de APP, pero su contribución fisiológica a este proceso todavía es discutible (Zhang et al., 2011). BACE-1 es altamente expresada en el cerebro, especialmente en el hipocampo, la corteza y el cerebelo, y se la considera la  $\beta$ -secretasa responsable de la generación del péptido A $\beta$  en neuronas (Vassar et al., 1999, Vassar et al., 2009, Cai et al., 2001).

Inicialmente, BACE-1 se genera como pro-enzima, y sufre complejas modificaciones postraduccionales a través de la vía secretora que incluyen N-glicosilación, fosforilación, formación de puentes disulfuro, y un procesamiento proteolítico que da lugar a la forma madura (Bennett et al., 2000). Una vez liberada de su predominio, la forma madura se sitúa en los dominios de membrana tipo *rafts* lipídicos donde ejerce su actividad catalítica (Ehehalt et al., 2003). A nivel subcelular, la proteína BACE-1 se localiza principalmente en compartimentos endosomales y en el trans-Golgi, también puede encontrarse en la membrana plasmática, aunque con niveles mucho menores (Huse et al., 2000). Una parte muy pequeña del procesamiento de APP por BACE-1 tiene lugar en la membrana plasmática, ya que se internaliza rápidamente a través de la vía endocítica hacia los endosomas, donde se localiza con APP y tiene lugar el procesamiento  $\beta$ -secretasa, debido al pH ligeramente ácido de este compartimento que lo hace óptimo para BACE-1 (Vassar et al., 2009, Vassar, 2001). Cabe destacar que, aunque BACE-1 ha recibido la mayor atención por su implicación en el procesamiento de APP, se han identificado otros sustratos para el enzima. Entre ellos se encuentran varias proteínas transmembrana como las neuroregulina-1 y 3, la subunidad  $\beta 2$  del canal de sodio regulado por voltaje, los receptores de lipoproteínas (LPR) y PSLG-1, entre otros; lo que sugiere que BACE-1 podría presentar gran variedad de funciones fisiológicas (Vassar et al., 2009).

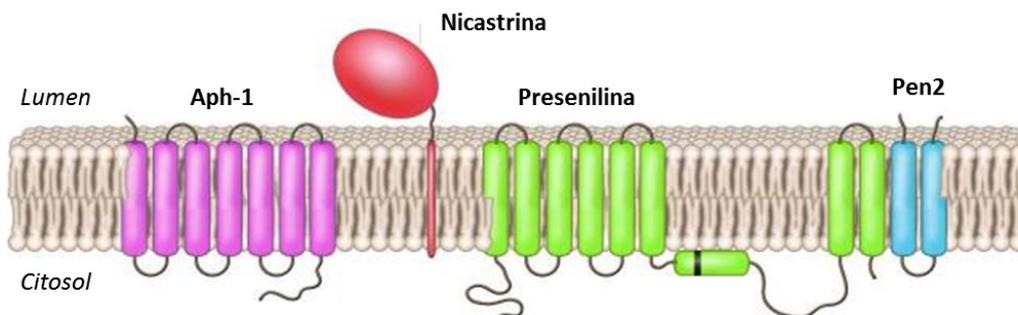
Por otro lado, a pesar de que no se han encontrado mutaciones en el gen de BACE-1 relacionadas con la EA, sí que se ha descrito la presencia de niveles elevados del enzima tanto en el cerebro como en el líquido cefalorraquídeo de pacientes, de igual forma que se ha descrito un aumento de la actividad  $\beta$ -secretasa (Zhong et al., 2007, Li et al., 2004, Yang et al., 2003). Por ello, la inhibición de BACE-1 es

actualmente una de las posibles dianas terapéuticas en el tratamiento de la EA. De hecho, tanto la delección genética de BACE-1, como la administración de inhibidores específicos han mostrado la recuperación de los déficits cognitivos, así como un descenso en la producción de A $\beta$ . Además, aunque BACE-1 tiene otros sustratos, su inhibición no ha mostrado por el momento efectos colaterales (Ohno et al., 2004, Chang et al., 2011). La última generación de pequeñas moléculas inhibitoras de BACE-1 ha conseguido satisfactoriamente atravesar la barrera hematoencefálica y reducir los niveles de A $\beta$  cerebrales en los estudios preclínicos en modelos animales, y muchos de estos fármacos ya están siendo evaluados en estudios clínicos (Vassar, 2014).

### 4.2.2 Procesamiento $\gamma$ -secretasa

Como ya hemos comentado, tanto el fragmento CTF $\alpha$  (C83) como CTF $\beta$  (C99), pueden ser procesados por el complejo  $\gamma$ -secretasa, generando los fragmentos p83 y A $\beta$  respectivamente. Este complejo consta de al menos cuatro componentes: presenilina (PS1 o PS2), Nicastrina, Aph-1 y Pen2 (Figura 17). El sitio activo de la  $\gamma$ -secretasa se encuentra en la presenilina, mientras que nicastrina, Pen-2 y Aph1 participan en el ensamblaje del complejo y en la modulación de la actividad enzimática (De Strooper, 2003).

Las presenilinas, PS1 y PS2, comparten gran homología, hasta del 90% en sus dominios transmembrana. Se trata de un enzima con actividad aspartil proteasa que se sintetiza como un polipéptido de 42-50 kDa y experimenta endoproteólisis, para dar lugar a un fragmento N-terminal (PS-NTF) de 27-30 kDa y un fragmento C-terminal (PS-CTF) de 16-20 kDa, generándose así el centro activo del complejo enzimático, una vez que se han ensamblado las 4 subunidades (Thinakaran et al., 1996). El papel presenilasa se ha atribuido a Pen-2, ya que su regulación a la baja induce simultáneamente la acumulación de presenilina no procesada en una conformación estable (Takasugi et al., 2003). Este procesamiento endoproteolítico está altamente regulado y es saturable, ya que la sobre-expresión de PS1 en células transfectadas o en ratones transgénicos no aumenta el nivel de NTF y CTF, y el exceso de holoproteína se degrada rápidamente, mayoritariamente por el proteosoma (Thinakaran et al., 1996). Del mismo modo, la sobre-expresión inducida de cualquiera de las cuatro subunidades por separado no induce un incremento de la actividad  $\gamma$ -secretasa, sino que es necesario que se sobre-expresen las 4 simultáneamente para que esto ocurra (De Strooper, 2003).



**Figura 17. Topología del complejo  $\gamma$ -secretasa.** La  $\gamma$ -secretasa está compuesta por 4 componentes: presenilina (verde), nicastrina (rojo), Pen-2 (azul) y Aph-1 (rosa). La barra negra en presenilina marca la región de corte endoproteolítico, para formar los fragmentos PS-CTF y PS-NTF de presenilina, que dan lugar a la forma activa del complejo. Adaptado de (Gandy, 2005).

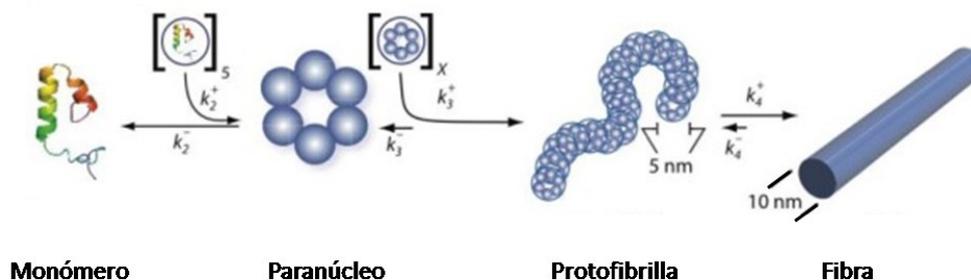
El ensamblaje del complejo  $\gamma$ -secretasa posiblemente ocurre en varios ciclos de intercambio vesicular entre retículo endoplásmico y aparato de Golgi. Una vez que el complejo maduro está ensamblado y se produce la endoproteólisis de la presenilina, el complejo es vesiculado hacia la membrana plasmática y otros compartimentos celulares, donde tiene lugar su actividad catalítica. Además, la  $\gamma$ -secretasa presenta otros sustratos como Notch, caderinas, receptores de LDL, CD44,

Nectina-1 $\alpha$ , entre otros, que participan en funciones celulares tales como la estabilización de  $\beta$ -catenina, la homeostasis del calcio o la adhesión celular, todas esenciales para la supervivencia celular (Wakabayashi y De Strooper, 2008, Parent y Thinakaran, 2010).

Al igual que BACE-1, el complejo  $\gamma$ -secretasa es una posible diana terapéutica en el tratamiento de la EA. Existen varias moléculas capaces de inhibir de forma no selectiva el complejo, lo que normalmente se acompaña de una disminución en el procesamiento de otros sustratos necesarios para la supervivencia neuronal, lo que desemboca en efectos adversos graves. En este sentido, teniendo en cuenta el gran número de proteínas que pueden ser procesadas por la  $\gamma$ -secretasa, se plantea como un objetivo difícil obtener un inhibidor específico del procesamiento de APP (De Strooper y Annaert, 2010).

### 4.3 Agregación del péptido $\beta$ -amiloide

El aumento de longitud del péptido A $\beta$  que se da en la EA (de 40 a 42 aminoácidos) favorece su agregación, lo que le permiten auto-asociarse en diferentes estados que van desde monómeros, a oligómeros solubles y fibrillas insolubles (Finder y Glockshuber, 2007). Aunque se pueden llegar a formar agregados de elevado peso molecular (mayores de 100 KDa), la mayor parte son los de bajo peso molecular, entre dímeros y octámeros. Los oligómeros solubles de A $\beta$  son estructuras no-fibrilares de bajo peso molecular que permanecen estables en solución acuosa incluso después de una centrifugación de alta velocidad (Walsh y Selkoe, 2007). Se ha sugerido que los monómeros de A $\beta$  estarían en equilibrio con otras formas oligoméricas (Figura 18): cuando se alcanza un cierto nivel de formas monoméricas, se favorece la polimerización de un paranúcleo (núcleo de alargamiento de fibrillas), que a su vez se autoasocia para formar protofibrillas. La maduración de estas protofibrillas da lugar a las estructuras fibrilares clásicas, que son el componente principal de las placas amiloides. De forma alternativa, la presencia de un elevado número de estas estructuras fibrilares puede provocar su desasociación, originando de nuevo formas de menor peso molecular (Walsh y Selkoe, 2007, Roychaudhuri et al., 2009, Selkoe, 2008).



**Figura 18. Agregación de A $\beta$ .** El péptido A $\beta$  existe en su forma monomérica como un equilibrio entre diferentes conformaciones. Para la creación de un paranúcleo (núcleo de alargamiento de fibrillas) es necesaria la formación de un monómero parcialmente plegado, en este caso, de seis monómeros. A continuación, los paranúcleos se asocian a sí mismos para formar protofibrillas (formados por un número significativo pero finito de paranúcleos). Finalmente, la maduración de las protofibrillas produce las fibras amiloides clásicas. Adaptado de (Roychaudhuri et al., 2009).

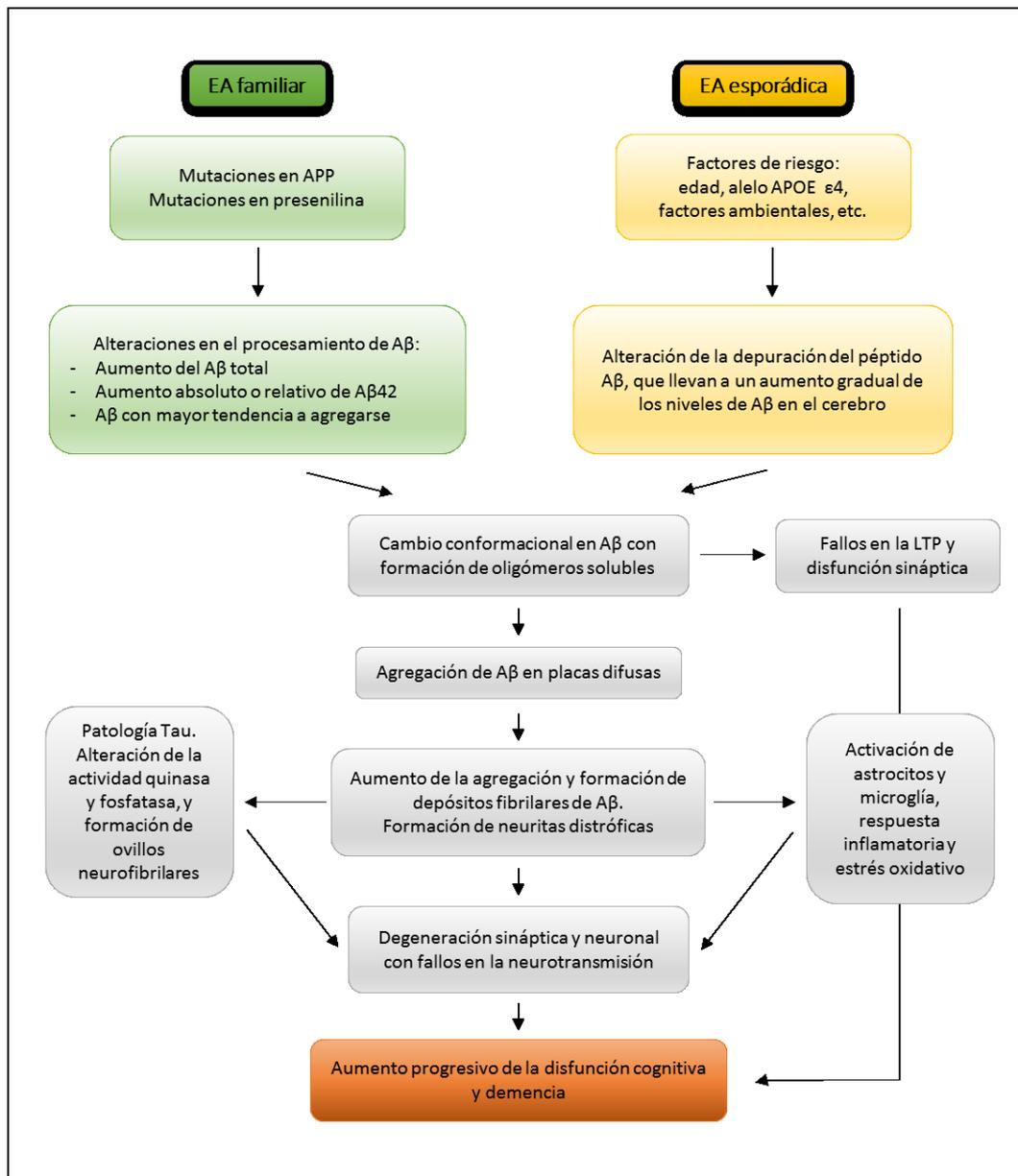
Por otro lado, se han identificado múltiples enzimas que podrían estar implicadas en la degradación del péptido A $\beta$  en el cerebro. Algunas de ellas, como la neprelisina, el IDE (*insulin degrading enzyme*) o la plasmina, degradan al A $\beta$  en su estado monomérico, otras lo hacen en su estado oligomérico, como la Catepsina B, y alguna en su estado más fibrilar (Selkoe, 2001b, Vardy et al., 2005).

### 5. Hipótesis de la cascada amiloide

La hipótesis amiloide considera el depósito de A $\beta$  como el principal agente causante de la patología, siendo los ovillos neurofibrilares, la pérdida neuronal, el daño vascular y la demencia, consecuencias de este hecho. La teoría fue propuesta en 1992 por John Hardy y Gerald Higgins (Hardy y Higgins, 1992) y durante más de dos décadas ha sido el punto cardinal para describir la etiología de la EA. El origen de la hipótesis de la cascada amiloide reside en el hecho de que las mutaciones en presenilina o APP, responsables de la EA familiar, inducen un procesamiento anormal en APP, dando lugar a la patología amiloide (Hardy y Selkoe, 2002, Selkoe y Hardy, 2016).

Sin embargo, a lo largo de los años la hipótesis original ha sido cuestionada ya que no siempre se correlaciona la densidad de placas de A $\beta$  con la severidad de la demencia (Snowdon y Study, 2003). En este sentido, la descripción de la existencia de formas solubles y oligoméricas de A $\beta$ , capaces de difundir en el parénquima cerebral, provocando pérdida sináptica y fallos cognitivos severos ha permitido reformular la teoría original, dando lugar a la hipótesis del A $\beta$  oligomérico (Walsh y Selkoe, 2007). Esta reformulación propone que cambios en el metabolismo del A $\beta$  provocarían el inicio de la cascada, generando una elevación de los niveles de A $\beta$  y de la proporción A $\beta$ 42/A $\beta$ 40, ya sea por sobreproducción o por falta de depuración. Debido a que la forma A $\beta$ 42 es más hidrofóbica que la A $\beta$ 40, tiende a oligomerizar más fácilmente, lo que potenciaría la formación de oligómeros difusibles. Estos provocarían cambios en la función sináptica, primero muy sutiles y, posteriormente, más severos. Junto con el aumento en los niveles de A $\beta$  a nivel extracelular, aparecerían las primeras placas extracelulares y la consecuente activación de la respuesta inflamatoria (en la astrogliá y la microgliá), lo que provocaría la pérdida de espinas sinápticas y generaría neuritis distróficas. Con el tiempo, se produciría estrés oxidativo que afectaría a la homeostasis neuronal. Posteriormente, estos cambios neuronales provocarían la alteración de la actividad fosfatasa de las quinasas, produciendo la hiperfosforilación de la proteína Tau y consecuentemente, los daños en el transporte axonal y la formación de ovillos neurofibrilares. Finalmente, la cascada terminaría con la muerte neuronal masiva y un estado de demencia progresivo (Figura I9) (Haass y Selkoe, 2007, Selkoe y Hardy, 2016).

Paralelamente, han surgido opositores a la hipótesis amiloide que cuestionan el papel del péptido A $\beta$  en el origen de la enfermedad y lo sitúan en un plano secundario, considerándolo más una consecuencia que una causa de la enfermedad. La mayoría de los detractores de la teoría se sustentan en el hecho de que los fármacos centrados en reducir la patología amiloide han fallado en los estudios clínicos (Herrup, 2015). En el intento de encontrar una explicación al origen de la patología, se han propuesto muchas alternativas, desde un origen neuroinflamatorio de la enfermedad (Cameron y Landreth, 2010), a fallos en la autofagia (Nixon y Yang, 2011) y/o la función lisosomal (Nixon y Cataldo, 2006), alteraciones en la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> debido a la actividad excitotóxica (Green y LaFerla, 2008), fallos en el control del ciclo celular (Herrup y Yang, 2007); alteraciones mitocondriales relacionadas con la edad (Swerdlow y Khan, 2004); reducción en el metabolismo de la glucosa en el cerebro (Cholerton et al., 2013), entre otras. De especial interés es la hipótesis de la vía dual, que propone la existencia de factores previos al depósito amiloide capaces de provocar las principales marcas patológicas de la EA (Small y Duff, 2008). Uno de los argumentos que apoyan esta teoría reside en el alelo APOE  $\epsilon$ 4, que se ha asociado con el incremento del depósito de A $\beta$  y de la fosforilación de Tau, y cuyo efecto fenotípico ha sido relacionado tanto con la EA esporádica como con la familiar (Pastor et al., 2003). Puesto que tanto la EA familiar como la esporádica se caracterizan por los mismos marcadores patológicos, se cree que en ambos casos se daría la misma cascada de eventos.



**Figura 19. Hipótesis de la cascada amiloide.** El aumento de los niveles del péptido Aβ sería el evento iniciador de la EA. Las formas oligoméricas solubles dan paso a los depósitos fibrilares, así como a los fallos sinápticos, a la muerte neuronal, la aparición de neuritas distróficas y a la reacción inflamatoria asociada a la patología. Finalmente se producirían las alteraciones cognitivas y la demencia. Adaptado de (Blennow et al., 2010).

En este sentido, se ha observado que las mutaciones responsables de la EA familiar, además de la influencia en el metabolismo de Aβ, tienen efectos en otras cascadas de señalización. De hecho, las presenilinas, centro catalítico del complejo γ-secretasa (cuyas mutaciones explican cerca del 95% de los casos de EA familiar), son responsables del procesamiento de más de 60 proteínas de membrana (Wakabayashi y De Strooper, 2008, De Strooper y Annaert, 2010). Por tanto, es de suponer que las mutaciones en presenilina ejerzan efectos adicionales en la señalización celular como consecuencia de alteraciones en el procesamiento de las proteínas de membrana. En este sentido, se ha observado que la pérdida de función del complejo γ-secretasa da lugar a alteraciones en la composición lipídica de la membrana, provocando alteraciones en la concentración de colesterol, que en última instancia podrían afectar a la homeostasis lipídica de la célula. En el cerebro humano, el colesterol es transportado principalmente por lipoproteínas que predominantemente contienen ApoE. Tal y como hemos comentado anteriormente en esta Introducción (véase el apartado 3.2.1), la presencia del alelo APOE ε4,

se ha identificado como un factor de riesgo para el desarrollo de la EA esporádica, sugiriendo que las alteraciones en el transporte del colesterol pueden relacionarse con la patogénesis de la EA. De hecho, los enfermos de Alzheimer que presentan la isoforma ApoE4 verían reducida la absorción de colesterol debido a la menor afinidad que este presenta por los receptores neuronales de lipoproteínas (Poirier, 2005, Rapp et al., 2006). Una menor incorporación de colesterol daría lugar a un aumento de su síntesis, provocando una alteración en su distribución. Por lo tanto, la homeostasis del colesterol podría ser un aspecto clave en la patogénesis de la EA, y las alteraciones en los niveles de colesterol parecen ser un punto de encuentro entre la EA familiar y la esporádica. Es más, las alteraciones en los lípidos de membrana de las neuronas de pacientes con EA, así como la asociación entre la normalización de los lípidos de membrana y la recuperación cognitiva, sugieren que los cambios en la bicapa lipídica podría ser el primer evento de la cascada amiloide (Xiang et al., 2015, Torres et al., 2016).

## 6. Estudio de la Enfermedad de Alzheimer

### 6.1 Modelos transgénicos murinos de la Enfermedad de Alzheimer

Dada la prevalencia y el pobre pronóstico de esta enfermedad, el desarrollo de modelos animales de la EA que permitan entender los mecanismos patogénicos y probar estrategias terapéuticas ha sido una prioridad. El descubrimiento de los genes implicados en las formas de EA familiar y las mutaciones específicas, ha permitido la creación de modelos transgénicos que reproducen muchos de los aspectos críticos de la enfermedad (Schaeffer et al., 2011).

Los ratones son los vertebrados más utilizados para el modelado transgénico de enfermedades humanas debido a su tiempo de vida relativamente corto, los bajos costes y el fácil manejo. Este tipo de modelos han permitido estudiar los mecanismos que subyacen en la patogénesis de la enfermedad, la interacción genética entre los genes de interés, los factores ambientales responsables de la EA esporádica, así como testar los efectos terapéuticos de fármacos candidatos en los marcadores neuropatológicos y la función cognitiva (Lee y Han, 2013). Actualmente, además de los modelos murinos, existen modelos invertebrados como *Drosophila melanogaster* o *Caenorhabditis elegans* que suponen una valiosa herramienta para las pruebas preclínicas en el desarrollo de nuevos fármacos, y que pueden ofrecer ciertas ventajas frente a los modelos murinos.

La mayoría de los modelos murinos de la EA se han desarrollado sobre la base de la hipótesis amiloide de la enfermedad. Se diferencian entre sí en el fondo genético de los animales utilizados, en la mutación seleccionada, en el promotor utilizado y en la técnica empleada para su obtención, por lo que existen grandes diferencias en las características neuropatológicas que manifiestan. Los principales modelos utilizados en el estudio de la EA son:

#### Modelos APP

Aunque existen modelos que sobreexpresan la forma *wild type* (WT) del gen APP humano, los que se usan de forma más habitual son aquellos que expresan una forma mutada del gen, ya que reproducen mejor los marcadores de la EA. Para que se consigan altas cantidades de A $\beta$  es necesario que el transgén esté bajo el control de un promotor constitutivo cuyo gen se exprese en grandes cantidades, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el promotor del gen de la proteína priónica o el promotor de Thy-1 (miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, marcador de células madres hematopoyéticas). Estos modelos desarrollan placas y presentan hiperfosforilación de Tau, aunque carecen de ovillos. Presentan neuritas distróficas y procesos inflamatorios, pero no presentan pérdida neuronal. Los estudios de comportamiento han revelado que estos animales manifiestan ansiedad, hiperactividad, convulsiones y agresividad. Sin embargo, en la mayoría de los casos estos cambios sólo

son apreciables a edades relativamente tardías, entre los 9 y 12 meses de edad (Hock y Lamb, 2001, Lee y Han, 2013).

### Modelos PS1 y PS2

Estos animales sobreexpresan una forma mutada de la PS1 o la PS2 humana, que provoca un aumento de la razón de A $\beta$ 42/A $\beta$ 40. Sin embargo, no presentan importantes cambios neuropatológicos: no desarrollan placas, ni presentan astrogliosis o pérdida neuronal (Flood et al., 2002, Toda et al., 2011).

### Modelos APP/PS1

Estos modelos sobreexpresan las proteínas humanas APP y PS1 mutadas. En este caso, las manifestaciones patológicas de la enfermedad aparecen a edades comprendidas entre los 4 y los 6 meses, lo que los convierte en modelos más interesantes y son utilizados más habitualmente que los anteriores. Sin embargo, tampoco reproducen totalmente la EA, ya que no presentan ni ovillos neurofibrilares, ni muerte neuronal masiva (Hall y Roberson, 2012, Schaeffer et al., 2011).

Un tipo particular de modelo APP/PS1 es el modelo 5XFAD, llamado así porque acumula 5 mutaciones propias de la EA, tres en el gen APP y dos en PS1. Se caracteriza por presentar un desarrollo muy temprano y agresivo de la EA (véase una descripción detallada en la sección 6.1.1 de este apartado).

### Modelos Tau

En este caso, los animales sobre-expresan la proteína humana Tau, componente principal de los ovillos neurofibrilares. Los animales que sobreexpresan una forma mutada de la proteína Tau reproducen marcadores neuropatológicos como la formación de ovillos, pero no presentan depósitos de A $\beta$  y tampoco desarrollan pérdida neuronal masiva. Es importante destacar que las mutaciones en Tau no guardan una relación causal con la EA, por lo que estos animales son considerados un mejor modelo de estudio para la demencia Fronto-Temporal que para la EA (Hall y Roberson, 2012).

### Modelos APP/PS1/Tau

El modelo triple transgénico PS1xAPPxTau (3xTg-AD) sobreexpresa las proteínas humanas PS1, APP con mutaciones familiares de la EA y Tau, con la mutación P310L, propia de la demencia frontotemporal. Se caracteriza por la manifestación conjunta de placas de A $\beta$  y ovillos neurofibrilares (Oddo et al., 2003). Además, este modelo presenta déficits de memoria a edades tempranas que se correlacionan con la acumulación intraneuronal de A $\beta$  (Billings et al., 2005).

#### **6.1.1 Modelo 5XFAD**

Tal y como hemos comentado anteriormente, el modelo 5XFAD es un caso concreto de los modelos APP/PS1. Fue desarrollado por Robert Vassar y colaboradores, que presentaron 4 cepas diferentes del mismo modelo en el trabajo original. De todas ellas se eligió la cepaTg6799 por ser la que presentaba un desarrollo más temprano y agresivo de la EA. Los ratones 5XFAD, cepaTg6799, coexpresan y coheredan el gen humano de la APP (695), con las mutaciones *Swedish* (K670N, M671L), *Florida* (I716V) y *London* (V717I) y también el gen humano de la PS1, con dos mutaciones de EA familiar: M146L y L286V. Ambos se encuentran bajo control transcripcional del promotor específico neuronal de ratón Thy1, que regula la expresión de los transgenes en el cerebro (Oakley et al., 2006).

La mutación *Swedish* provoca un aumento de los niveles totales de A $\beta$ , mientras que las mutaciones *Florida*, *London*, M146L y L286V aumentan de manera específica la producción de A $\beta$ 42. Por ello el modelo 5XFAD presenta rápidamente mayores niveles de A $\beta$ 42 que de A $\beta$ 40 y a edad temprana acumula en el cerebro cantidades masivas del primero. La acumulación intraneuronal de A $\beta$ 42 en ratones 5XFAD empieza a los 1,5 meses de edad, justo antes de la aparición de depósitos extracelulares de A $\beta$ , que

aparecen a los 2 meses en las capas corticales profundas y en el subículo (parte más baja de la formación hipocampal). Los depósitos de A $\beta$  se extienden llenando gran parte de la corteza cerebral, el subículo y el hipocampo. Las placas de A $\beta$  también se han observado en el tálamo, el bulbo raquídeo y el bulbo olfatorio, aunque en estas zonas los depósitos son menos abundantes. La astrogliosis y la microgliosis son proporcionales a los niveles de A $\beta$ 42 y al depósito extracelular de A $\beta$  (Oakley et al., 2006, Schneider et al., 2014). Este modelo no presenta ovillos neurofibrilares de la proteína Tau, pero sí hiperfosforilación de Tau a los 7 meses (Torres et al., 2014). Antes de que se inicie el depósito amiloide, ya se aprecia el ensanchamiento de los terminales sinápticos, situación que se agrava con el inicio del depósito extracelular de A $\beta$ , favoreciendo la aparición de la patología neurítica (Zhang et al., 2009).

Además de la patología amiloide, estos animales experimentan una degeneración sináptica progresiva y dependiente de la edad, tal y como revela la pérdida de marcadores sinápticos como sinaptofisina, syntaxina y PSD-95, que muestran una reducción significativa a los 9-12 meses (Oakley et al., 2006). Además, el modelo 5XFAD desarrolla parcialmente la pérdida neuronal de la EA. A partir de los 9 meses se observa una reducción significativa en número de neuronas piramidales en la capa 5 de la corteza y en el subículo (Oakley et al., 2006, Jawhar et al., 2012).

Como consecuencia de la amplia patología que presentan los animales 5XFAD, este modelo desarrolla, con la edad, diferentes alteraciones del comportamiento y déficits de memoria. Los estudios comportamentales realizados en esta cepa se han centrado en demostrar el deterioro de la memoria espacial que, depende del hipocampo, una de las regiones más afectadas durante la enfermedad. Los estudios realizados en el laberinto en Y han demostrado déficits en las pruebas de memoria espacial de trabajo a partir de los 4-5 meses de edad (Oakley et al., 2006). Los deterioros de la memoria espacial también se han descrito en el laberinto de agua de Morris (Ohno et al., 2006), mostrando alteraciones tanto en la memoria de trabajo como en la de referencia a partir de los 3 meses de edad (Wei et al., 2016). Además de la memoria espacial, en estos animales también se han evaluado otros tipos de memoria. Estudios en los que se utiliza el test de reconocimiento de objetos, muestran deterioro de la memoria en animales de 6-8 meses (Joyashiki et al., 2011, Tohda et al., 2011). En estudios de miedo condicionado, donde se analiza la importancia de los factores que determinan el contexto emocional de la memoria también se muestran déficits dependientes de la edad, tanto en el aprendizaje como en la consolidación de la memoria (Ohno, 2009). Además, el modelo presenta alteraciones en pruebas de miedo condicionado por el contexto a partir de los 4 meses de edad, alteraciones que se correlacionan con la disfunción sináptica en el hipocampo (Kimura y Ohno, 2009) y a partir de los 9 meses, en pruebas de aversión gustativa condicionada, mostrando que la memoria independiente del hipocampo empeora más tarde (Devi y Ohno, 2010). Por otro lado, los primeros problemas motores aparecen a los 8-9 meses, coincidiendo con otras alteraciones como la reducción del acicalamiento, la aparición de estereotipias o alteraciones en la formación del nido (Schneider et al., 2014).

### ***6.2 Pruebas comportamentales para la evaluación cognitiva de modelos animales de la Enfermedad de Alzheimer***

Idealmente, los test cognitivos en los modelos murinos de la EA deberían medir los mismos aspectos cognitivos que se examinan a través de los test neuropsicológicos que se realizan en humanos. Y, de hecho, muchas pruebas comportamentales en roedores han sido diseñadas específicamente con este propósito. Los aspectos de la memoria más ampliamente estudiados en modelos animales son la memoria de trabajo, la memoria de referencia y la memoria de reconocimiento.

La **memoria de trabajo** se refiere a un sistema de procesamiento mental utilizado para retener información transitoria durante un tiempo limitado en el que la memoria puede ser manipulada y utilizada para guiar el comportamiento. La memoria de trabajo es quizás uno de los aspectos de la memoria mejor

caracterizados en la EA. En humanos este tipo de memoria se analiza a través de tareas que requieren del lenguaje, mientras que en ratones se estudia principalmente a través de tareas de tipo espacial.

El concepto de **memoria de referencia** no se utiliza clínicamente para describir la cognición humana, sino que se limita su uso al hablar de modelos animales. Como memoria de referencia se entienden los conocimientos aprendidos sobre un aspecto concreto de una tarea que permanece constante a lo largo de una prueba comportamental, y se correlaciona estrechamente con la memoria semántica en humanos.

La **memoria de reconocimiento** hace referencia a la habilidad de reconocer eventos, objetos o individuos previamente conocidos y se engloba dentro de la memoria declarativa a largo plazo, y se estudia por medio del aprendizaje asociativo (Webster et al., 2014).

La mayor parte de las pruebas comportamentales diseñadas para evaluar la memoria de trabajo en ratones son laberintos que necesitan del uso de la memoria espacial para desarrollarse. Gran parte de ellas pueden usarse igualmente para evaluar la memoria de referencia adaptando el protocolo. Entre los laberintos más sencillos encontramos el **laberinto en Y** o el **laberinto en T**. Se trata de pruebas simples que se valen del comportamiento natural de exploración de los animales para evaluar el estado de la memoria espacial de trabajo (Dudchenko, 2004). Un tipo de laberinto más complejo es el **laberinto radial** (LR), que permite valorar a la vez la memoria de trabajo espacial y la memoria de referencia (véase una descripción extensa en la sección 6.2.1 de este apartado).

Otras de las pruebas utilizadas para evaluar la memoria de trabajo espacial es el **laberinto acuático de Morris**. Esta prueba obliga a los animales a recordar la situación de unos soportes ocultos bajo el agua en un recinto inundado (Morris et al., 1982) y permite medir a la vez la memoria de referencia y la capacidad de aprendizaje. Ha sido muy utilizada para comprobar los efectos de las lesiones en el hipocampo, así como los efectos farmacológicos de sustancias con capacidad para modificar las funciones cognitivas. Muchos modelos de EA han sido evaluados mediante esta prueba, y la mayor parte muestran déficits de memoria relacionados con la enfermedad.

Muchas de las pruebas diseñadas para analizar la memoria de reconocimiento se basan en el aprendizaje asociativo. Entre ellas se encuentran las pruebas de **miedo condicionado** (Wehner y Radcliffe, 2004) basadas en el clásico condicionamiento Pavloviano, que implica aprender la relación entre dos estímulos. En este caso, uno de los dos estímulos es aversivo, lo que hace de esta prueba un mecanismo excelente para estudiar el estado de la amígdala (LeDoux, 2003). Otro tipo de pruebas, basadas en el comportamiento de exploración natural de los roedores es la prueba de **reconocimiento de objetos**. Según el protocolo utilizado con esta prueba es posible medir la memoria a corto plazo y la memoria a largo plazo (Ennaceur, 2010).

### **6.2.1 Prueba del Laberinto Radial**

La prueba del LR fue desarrollada por Olton y Samuelson en 1976 (Olton y Samuelson, 1976) para evaluar la memoria de trabajo espacial en roedores. Se trata de un laberinto de 8-17 brazos de la misma longitud que radian desde una plataforma central por la que el animal tiene que desplazarse para obtener una recompensa (agua o comida) en el menor tiempo posible (Figura I10). El animal se orienta gracias a una serie de claves visuales situadas en la cámara experimental y se espera que el animal entre una única vez en cada brazo y consiga la recompensa de la forma más eficiente posible. El número de re-entradas en brazos ya visitados se consideran errores. La versión original del LR fue diseñada para testar únicamente la memoria de trabajo espacial. Sin embargo, años después Olton desarrolló una variante que permitiría analizar a la vez la memoria de referencia (Olton et al., 1979). Para comprobar el estado de ambas memorias, sólo debe ponerse recompensa en 3 o 4 brazos. En este caso, la re-entrada en brazos con recompensa se computa como errores de la memoria de trabajo (WME), y las entradas en los brazos que nunca han tenido recompensa, como errores de la memoria de referencia (RME). Por tanto, la realización de la prueba requiere del uso de la memoria de trabajo para recordar los brazos ya visitados,

lo que exige retener la información a corto plazo; y la memoria de referencia para retener las reglas generales de la prueba a lo largo de los ensayos diarios sucesivos.



**Figura I10. Laberinto radial de ocho brazos (Panlab)**

La estructura cerebral crítica para la memoria espacial es el hipocampo. Sin embargo, el estado de las otras regiones cerebrales también puede afectar a la adquisición de este tipo de memoria, al influir en la navegación espacial, la capacidad motora o la organización del movimiento. Entre estas estructuras se encuentran las conexiones hipocampales, así como el córtex prefrontal, el córtex anterior cingulado, el estriado, las estructuras talámicas, los cuerpos mamilares, la amígdala, el *locus coeruleus* y el cerebelo (Puzio et al., 2014). Por otro lado, para la adquisición de la memoria de trabajo, además del uso de la memoria espacial, también es necesaria la memoria de procedimiento, lo que supone la implicación tanto del hipocampo como del córtex prefrontal. La región cortical participa principalmente en el almacenaje y procesamiento temporal de la información, mientras que el hipocampo es más crítico en el almacenaje a largo plazo, necesario para mantener la memoria de referencia (Yoon et al., 2008). En cualquier caso, las dos estructuras que se analizan de forma más intensa con esta prueba son el hipocampo y el córtex prefrontal.

Las ventajas del LR es que tanto el protocolo como la interpretación de los datos es sencilla y permite valorar a la vez dos tipos de memoria, a diferencia de otros laberintos más simples como el laberinto en T o en Y (Sharma et al., 2010). Además esta prueba induce únicamente niveles moderados de estrés en comparación con otras pruebas como el test de agua de Morris (Hodges, 1996). De hecho, los ratones realizan mejor las pruebas que no implican un estímulo aversivo o estresante, como las descargas eléctricas o nadar en el agua (Francis et al., 1995). Por otro lado, las limitaciones del LR son la necesidad previa de privar de comida o agua y la posibilidad de que el animal utilice pistas olfatorias para encontrar la recompensa. Esto último puede ser corregido limpiando y/o rotando los brazos entre cada valoración, siempre que se mantenga la orientación original de la recompensa (Dudchenko, 2004). Además, cabe la posibilidad de que algunos animales utilicen una estrategia de visita seriada de brazos en lugar de usar las pistas visuales para completar la prueba, lo que supondría tener que eliminarlos del estudio. En cualquier caso el LR ha sido usado de forma habitual para estudiar la memoria espacial en roedores (Sharma et al., 2010), y actualmente es una de las pruebas de elección para comprobar los déficits cognitivos en modelos transgénicos de la EA (Bryan, 2009, Webster et al., 2014).

En el presente estudio se decidió utilizar el LR de ocho brazos para la valoración cognitiva de los animales 5XFAD, debido a la posibilidad de estudiar a la vez la memoria de trabajo y de referencia, y también a las ventajas que presenta sobre el test de Morris.

## 7. Los lípidos en la Enfermedad de Alzheimer

Tal y como hemos comentado anteriormente, las alteraciones lipídicas en la membrana celular podría ser el factor clave en la patogénesis de la EA (Xiang et al., 2015). Un elevado número de evidencias sugieren que las alteraciones de algunos lípidos, como el colesterol, los ácidos grasos omega-3 o los triglicéridos, participan en el deterioro cognitivo durante el envejecimiento y en enfermedades como la obesidad o la EA (Morley y Banks, 2010, Xiang et al., 2015). La importancia de los lípidos en la EA radica en que tanto la APP como las proteínas implicadas en su procesamiento son proteínas integrales de membrana lo que sugiere que el contexto lipídico de los enzimas hidrolíticos influye en la producción de A $\beta$  y, por tanto, en el desarrollo de la patología (Hartmann et al., 2007).

### 7.1 Características generales y clasificación de los lípidos

El término lípido se define como cualquier compuesto orgánico insoluble en agua, pero soluble en disolventes orgánicos. Conforman un grupo muy heterogéneo de moléculas con gran diversidad de funciones biológicas fundamentales: actúan como componentes estructurales de las membranas celulares, donde sirven como fuente de almacenamiento de energía, y participan en las vías de señalización (Fahy et al., 2011). Las principales categorías de clasificación de los lípidos son: glicerofosfolípidos, glicerolípidos, esfingolípidos, lípidos esteroides y ácidos grasos.

#### Glicerofosfolípidos

Los glicerofosfolípidos, también llamadas fosfolípidos, son moléculas omnipresentes en la naturaleza y son componentes clave de la bicapa lipídica de la membrana celular. Están formados por una molécula de glicerol-3-fosfato con dos ácidos grasos esterificados en las posiciones C1 y C2. El grupo fosfato tiene a su vez unido un grupo polar. Dependiendo del tipo de grupo polar se forman diferentes fosfolípidos: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilglicerol y ácido fosfatídico.

La hidrólisis de los fosfolípidos por parte de una fosfolipasa produce la liberación de uno o ambos derivados acilo, formando el lisofosfolípido correspondiente. Existen diferentes tipos de fosfolipasas en función del enlace éster que hidrolizan. Por ejemplo, la fosfolipasa A2 escinde hidrolíticamente el ácido graso en posición C2 del glicerol, liberando ese ácido graso y originando lisofosfolípido correspondiente.

#### Glicerolípidos

Los glicerolípidos se diferencian de los fosfoglicerolípidos en que la molécula unida al hidroxilo del carbono sn-3 del glicerol no es un fosfato sino un carbohidrato unido por un enlace glicosídico. El grupo de los glicerolípidos está dominado por los gliceroles mono, di y trisustituidos. Los más conocidos son los ésteres de ácidos grasos de glicerina (acilgliceroles). Otras subclases adicionales están representadas por los glicerolglucanos, que se caracterizan por la presencia de uno o más residuos de azúcar unidos al glicerol mediante enlaces glucosídicos.

#### Esfingolípidos

Son uno de los principales componentes lipídicos de las membranas biológicas. Son derivados de aminoalcoholes de 18 átomos de carbono: la esfingosina y la dihidroesfingosina. La unión de un ácido graso de longitud variable al grupo amino de la esfingosina da lugar a los distintos tipos de ceramidas (N-acil-esfingosina). Las ceramidas, a las que se les unen diferentes tipos de grupos polares, constituyen la unidad estructural básica de otros esfingolípidos como son las esfingomielinas y los esfingoglicolípidos.

### Esteroles

Los lípidos esteroides son los principales lípidos no polares de las membranas celulares. Se encuentran en las membranas celulares de vegetales, animales y microorganismos eucariotas. En animales, el esteroide más abundante es el colesterol, que es una molécula compacta, rígida e hidrofóbica con un pequeño grupo hidroxilo que confiere cierto carácter anfipático a la molécula. El colesterol es esencial para la regulación de la fluidez de membrana. Constituye aproximadamente el 25% del total de los lípidos de la membrana plasmática, aunque su abundancia en las membranas de los orgánulos es inferior.

### Ácidos grasos

Los ácidos grasos son ácidos orgánicos monoenoicos, generalmente de cadena lineal en cuyo extremo presentan un grupo carboxilo. Los ácidos grasos difieren entre sí en función de la longitud de la cadena de hidrocarburo (C4-C36), el grado de insaturación (número de enlaces dobles, lo que también rige sus propiedades físicas y la del lípido que los contiene), y la sustitución en uno o más grupos metilo (Tabla 11). La cadena hidrocarbonada del ácido graso puede contener uno (monoinsaturados) o más (poliinsaturados) dobles enlaces. La configuración del doble enlace es principalmente *cis*, lo que proporciona un punto de torsión rígida de 30° en la cadena hidrocarbonada; mientras que la configuración *trans* da lugar a una estructura de cadena extendida. La estructura de los ácidos grasos representa el principal bloque de construcción de lípidos complejos. Sin embargo, en tejidos y células solo se encuentran trazas de ácidos grasos libres. Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, de las siglas en inglés de *polyunsaturated fatty acids*) son abundantes en las membranas celulares, a las que se incorporan como fosfolípidos de membrana.

<b>Nombre común</b>	<b>Símbolo</b>
<b>Ácidos grasos saturados</b>	
Ácido láurico	12:0
Ácido mirístico	14:0
Ácido palmítico	16:0
Ácido esteárico	18:0
Ácido araquídico	20:0
Ácido behénico	22:0
Ácido lignocérico	24:0
<b>Ácidos grasos insaturados</b>	
Ácido palmitoleico	16:1 ( $\Delta$ 9)
Ácido oleico (OA)	18:1 ( $\Delta$ 9)
Ácido linoleico	18:2 ( $\Delta$ 9,12)
Ácido $\alpha$ -linolénico	18:3 ( $\Delta$ 9,12,15)
Ácido $\gamma$ -linolénico	18:3 ( $\Delta$ 6,9,12)
Ácido araquidónico (ARA)	20:4 ( $\Delta$ 5,8,11,14)
Ácido eicosapentaenoico (EPA)	20:5 ( $\Delta$ 5,8,11,14,17)
Ácido docosahexaenoico (DHA)	22:6 ( $\Delta$ 4,7,10,13,16,19)

**Tabla 11. Ácidos grasos más comunes.** Adaptada de (Fahy et al., 2011, Watson, 2006).

Los ácidos pueden aparecer en su forma libre en las membranas biológicas, aunque la forma más abundante son los fosfolípidos, ésteres de colesterol y otros acilglicéridos. Son de especial interés los fosfolípidos hidroxilados, muy abundantes en esfingolípidos e imprescindibles para la formación de la mielina de las neuronas (Hama, 2010). De hecho, la mutación del enzima que introduce un radical hidroxilo en la posición 2 de los ácidos grasos, la ácido graso 2-hidroxilasa (FA2H por sus siglas en inglés)

da lugar a alteraciones en la mielinización de neuronas periféricas con alteraciones neurológicas y motoras, dando lugar a un síndrome denominado paraplejía espástica G35 (Kruer et al., 2010, Dick et al., 2010). Por lo tanto, los ácidos grasos hidroxilados son de vital importancia para el normal funcionamiento del SNC. De hecho, tanto los ácidos grasos omega-3 (p.ej., el DHA) como sus derivados hidroxilados, son imprescindibles para el normal funcionamiento del SNC y una gran parte de ellos proceden de la dieta, ya que nuestro organismo tiene una capacidad limitada de sintetizar ácidos grasos omega-3 (Kim, 2007).

## 7.2 Distribución de los lípidos en la membrana

Las membranas biológicas son estructuras compuestas por lípidos, proteínas y carbohidratos que desempeñan un papel clave en la organización de procesos bioquímicos a través de la compartimentación de los mismos. Los tipos principales de lípidos que encontramos en las membranas eucariotas son los fosfolípidos, los esfingolípidos y el colesterol. Sin embargo, estos no se encuentran distribuidos de manera homogénea en la membrana, sino que las cantidades de los diferentes lípidos varía dependiendo del tipo celular o del orgánulo (Alberts et al., 2008). Además, ciertas membranas poseen asimetría transversal en su composición lipídica, siendo diferentes la monocapa citosólica y la no citosólica. Del mismo modo se da una asimetría lateral, de forma que los lípidos no están distribuidos uniformemente en el plano de la membrana, sino que hay zonas diferenciadas en las que se localizan preferentemente cierto tipo de proteínas y lípidos (van Meer et al., 2008). Estas regiones se conocen como *rafts* lipídicos y fueron descritas por primera vez en 1997 (Simons y Ikonen, 1997) como microdominios transitorios de la membrana *in vivo*, resistentes a detergentes y ricos en colesterol y esfingolípidos donde se unen diversos tipos de proteínas. Los esfingolípidos se unen al colesterol formando en su conjunto una estructura intermedia entre fluida y gel denominada líquido-ordenada (Brown y London, 1998). Los *rafts* lipídicos sirven como plataforma para la señalización celular, la unión ligando-receptor entre otros, y participan en multitud de procesos celulares, incluyendo el tráfico de proteínas, la neurotransmisión o la endocitosis (Korade y Kenworthy, 2008).

Se cree que los *rafts* lipídicos son puntos cruciales para la agregación de A $\beta$  y para el procesamiento amiloidogénico de APP (Lai y McLaurin, 2010), ya que tanto APP como BACE-1 y el complejo  $\gamma$ -secretasa están presentes en proporciones variables en estos microdominios, en los que se ve favorecida la actividad secretasa (Kalvodova et al., 2005, Holmes et al., 2012). Por lo tanto, un mecanismo a través del cual la célula podría regular el balance entre el procesamiento amiloidogénico y el no amiloidogénico sería a través de la localización diferencial de APP y sus secretasas en los *rafts* lipídicos (Taylor y Hooper, 2007).

## 7.3 Alteraciones lipídicas en la Enfermedad de Alzheimer

En los últimos años muchos estudios han relacionado las alteraciones lipídicas con la EA. Entre otros, se ha comprobado la existencia de alteraciones en el colesterol, los fosfolípidos o los ácidos grasos omega-3 (Tajima et al., 2013, Xiang et al., 2015).

### 7.3.1 El colesterol y los esfingolípidos en la EA

El SNC contiene alrededor del 25% del colesterol del cuerpo. En los últimos años se han acumulado evidencias sobre cómo la alteración de la homeostasis de este lípido podría influir en la patogénesis de la EA. Por un lado, estudios epidemiológicos han asociado la hipercolesterolemia con un aumento del riesgo de padecer la EA (Puglielli et al., 2003, Whitmer et al., 2005). Además, el depósito de A $\beta$  en el cerebro de pacientes con EA se correlaciona con niveles elevados de colesterol y de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en el plasma sanguíneo (Launer et al., 2001, Pappolla et al., 2003). Es más, tanto en células como en modelos animales de EA, los niveles elevados de colesterol se relacionan con una sobreproducción de A $\beta$ , así como los niveles bajos con una disminución en la producción del péptido, aunque existe cierta

controversia con estos resultados (Puglielli et al., 2003, Vetrivel y Thinakaran, 2010, Ledesma y Dotti, 2006).

Por otro lado, los estudios lipídicos muestran que tanto el colesterol, como ciertos esteres del colesterol y algunas especies de esfingomielina están regulados al alza en el cerebro en enfermos de EA, siendo esta correlación particularmente fuerte en aquellos pacientes portadores del alelo Apoε4, aunque de nuevo, también existe cierta controversia en este aspecto (Bandaru et al., 2009, Chan et al., 2012, Cutler et al., 2004). De hecho, las alteraciones en la distribución y el transporte del colesterol se relacionan con las enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la EA (Vetrivel y Thinakaran, 2010). La proteína ApoE está implicada en el transporte de colesterol y otros lípidos entre astrocitos y neuronas. En las placas amiloides, el colesterol está colocalizado con la ApoE4 y las fibrillas de Aβ (Morley y Banks, 2010).

Como ya hemos comentado, el colesterol es un componente estructural esencial de las membranas celulares y, junto con los esfingolípidos, es uno de los componentes principales de los *rafts* lipídicos. Parece ser que en estos microdominios tiene lugar el procesamiento amiloidogénico de APP, que se vería favorecido por el incremento de estas dos especies lipídicas. Por un lado, el enriquecimiento de estos lípidos en la membrana podría alterar las propiedades biofísicas de la bicapa lipídica, afectando a la actividad secretasa y potenciando la producción de los péptidos de Aβ en lugar del péptido p3 (Askarova et al., 2011). Por otra parte, los trastornos en el almacenamiento del colesterol y la esfingomielina afectarían al tráfico intracelular de APP, resultando en la acumulación de APP, APP-CTFs y Aβ en vesículas autofágicas de la vía endolisosomal (Runz et al., 2002, Tamboli et al., 2011a). En este sentido, varios estudios sugieren que la alteración de la homeostasis del colesterol y los esfingolípidos que se da en la EA podría promover la patología neurítica, la hiperfosforilación de Tau y el procesamiento amiloidogénico de APP (Torres et al., 2012, Bhat y Thirumangalakudi, 2013, Rushworth et al., 2013).

Por todo ello, la vía de síntesis del colesterol ha sido una de las dianas para diseñar fármacos contra la EA. En este sentido, se ha propuesto el uso de las estatinas para tratar o prevenir la EA (Shepardson et al., 2011a, Shepardson et al., 2011b). Las estatinas son un grupo de fármacos utilizados para tratar la hipercolesterolemia, ya que inhiben el principal enzima responsable de su síntesis (HMG-CoA sintetasa). A pesar de ello, actualmente no hay suficientes evidencias que apoyen su uso como fármaco en la EA y se cree que tal vez el papel del colesterol en el desarrollo de la enfermedad sea indirecto.

### **7.3.2 Ácidos grasos poliinsaturados en la EA**

Los PUFAs son abundantes en las membranas celulares, a las que se incorporan como fosfolípidos de membrana, principalmente como DHA y EPA.

El DHA (22:6 n-3) es un PUFA de la serie omega-3. La mayor parte se obtiene a partir de la dieta con el consumo de pescado y algas marinas, aunque en menor medida también puede ser biosintetizado a partir de fuentes dietéticas de omega-3, especialmente el ácido linoléico (Lim et al., 2005). El DHA representa el 40% de los PUFAs del cerebro y es el mayor componente de los fosfolípidos de las membranas neuronales, participando en la regulación del transporte celular y de las funciones sinápticas. Es crítico para el correcto desarrollo del sistema nervioso durante la embriogénesis, de las habilidades motoras y de la agudeza visual durante la infancia, así como para el mantenimiento de las capacidades cognitivas en la vejez (Guesnet y Alessandri, 2011). Puesto que la EA es un trastorno cognitivo y el DHA está involucrado en el desarrollo cognitivo normal, los niveles de DHA en pacientes de EA se han analizado ampliamente. Los enfermos de Alzheimer presentan un descenso en los niveles de DHA y otros PUFAs omega-3 en el cerebro y el suero, cuando se comparan con sujetos de la misma edad sin demencia (Lim et al., 2005, Green et al., 2007, Cunnane et al., 2012, Astarita et al., 2010). Además, en el hipocampo, una de las regiones que se ven afectadas de forma más temprana en la EA, la reducción de los niveles de DHA se asocia a una disminución de los niveles de PE o de sus plasmalógenos (Söderberg et al., 1991, Prasad et al., 1998, Han et al., 2001), apoyando la relación entre los niveles bajos de DHA y los déficits cognitivos

en la EA. Sin embargo, aunque es ampliamente aceptado que en la EA se produce una disminución en los niveles de DHA, también existen discrepancias en este sentido. Estas discrepancias pueden ser debidas a las diferencias en la región cerebral estudiada, tal y como ocurre con la neurodegeneración, que no afecta por igual a todas las regiones cerebrales. Los cambios descritos en la composición lipídica en el cerebro de pacientes de EA son heterogéneos, de forma que las alteraciones lipídicas parecen restringidas a las regiones afectadas en la enfermedad, principalmente la corteza y el hipocampo, y no están presentes en las regiones cerebrales no afectadas como el cerebelo (Chan et al., 2012). Por otro lado, numerosos estudios epidemiológicos han mostrado una correlación inversa entre el consumo de DHA y la incidencia de EA, asociando el consumo moderado de pescado y los niveles elevados de DHA que esto implica, con una reducción del riesgo de padecer alteraciones cognitivas (Kalmijn et al., 1997, Barberger-Gateau et al., 2002, Morris et al., 2003, Johnson y Schaefer, 2006, Oster y Pillot, 2010). Por todo ello, actualmente está aceptado que la EA cursa con una disminución de los niveles de DHA en el cerebro, y se sugiere que una deficiencia de PUFAs podría jugar un papel en el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, la administración directa de DHA no ha mostrado efectos claros en la recuperación cognitiva en ensayos clínicos (Freund-Levi et al., 2006, Quinn et al., 2010b).

Pese a ello los estudios con modelos animales han demostrado que la administración de DHA o aceite de pescado reduce la patología amiloide, mejorando los déficits cognitivos, protegiendo de la pérdida sináptica y reduciendo los niveles de A $\beta$  (Calon et al., 2004, Lim et al., 2005, Oksman et al., 2006, Ma et al., 2007, Green et al., 2007). A nivel celular, parece ser que los PUFAs tipo omega-3 serían capaces de inhibir la producción de oligómeros de A $\beta$  y su transformación en fibrillas (Oksman et al., 2006, Hartmann et al., 2007, Hossain et al., 2009), además de mejorar la plasticidad sináptica, aumentando la LTP, la expresión de proteínas sinápticas y promoviendo la neurogénesis en el hipocampo (Su, 2010, Kawakita et al., 2006, Dyllal et al., 2010). Además, los PUFAs omega-3 tienen efectos antioxidantes, anti-inflamatorios y anti-apoptóticos, facilitando así la supervivencia neuronal tanto en el envejecimiento normal como en la EA.

Sin embargo, aún sigue siendo una incógnita como los PUFAs omega-3 ejercen su función celular y consecuentemente, que tipo de cascadas de señalización estarían alteradas en el cerebro debido a su deficiencia. Por un lado, los PUFAs omega-3 mantienen la funcionalidad estructural de las membranas celulares. Es más, de acuerdo con la reducción de DHA en el cerebro de enfermos de Alzheimer, los *rafts* lipídicos obtenidos de pacientes de EA también presentan una reducción de los niveles de DHA (Martín et al., 2010). Curiosamente, las propiedades biofísicas y estructurales de la PE y el DHA en membranas son opuestas a las de colesterol y la esfingomielina. Por lo tanto, estas anomalías en la composición de los *rafts* lipídicos pueden provocar modificaciones en la estructura de la membrana de las neuronas, como alteración de la viscosidad, rigidez y espesor de la membrana, el empaquetamiento lateral de los lípidos y su ordenación, así como otros parámetros que podrían ser relevantes para la actividad secretasa y la producción de A $\beta$  (Shaikh, 2012). Por tanto, la disminución de los PUFAs en los *rafts* lipídicos se sumaría al enriquecimiento en colesterol y esfingolípidos, promoviendo conjuntamente el procesamiento amiloidogénico de APP, la formación de neuritas distróficas, la hiperfosforilación Tau y la degeneración neuronal.

De forma alternativa, el DHA podría ejercer su función actuando como una molécula de señalización. Los PUFAs pueden ser liberados de los fosfolípidos de membrana gracias a la acción de la fosfolipasa A2. Posteriormente, tanto el DHA como el EPA, pueden ser hidroxilados para producir diversos lípidos bioactivos secundarios (Ibarguren et al., 2014). Entre otros eicosanoides, los compuestos derivados de DHA son las resolvinas de la serie D y las protectinas, mientras que los compuestos derivados del EPA son las resolvinas de la serie E. Entre las protectinas destaca la neuroprotectina D1 (NPD1), que ha sido relacionada con la EA. NPD1 ofrecería protección contra la EA regulando la producción del péptido A $\beta$  por medio de las secretasas, al redirigirlas hacia la vía no amiloidogénica; además de regular negativamente

la expresión génica proinflamatoria y facilitar la supervivencia celular (Lukiw et al., 2005, Zhao et al., 2011, Stark y Bazan, 2011).

Además, se cree que estos derivados hidroxilados de PUFAs ejercerían su función biológica mediante mecanismos que van más allá de la regulación de la composición y estructura de la membrana lipídica. De hecho, el DHA no esterificado, las resolvinas y las proteínas pueden unirse a diferentes receptores de ácidos grasos como el receptor retinoide X, receptores acoplados a proteínas G, receptores activados por proliferadores de peroxisoma (PPAR) y proteínas de unión a ácidos grasos. De hecho, se ha propuesto que el DHA y sus derivados hidroxilados, como NPD1, actuarían mediante la activación de PPAR $\gamma$ . En este sentido, se sabe que NPD1 promueve la activación de PPAR $\gamma$  de forma más intensa que el DHA, por lo que los efectos neuroprotectores del DHA en el cerebro podrían estar mediados por NPD1 y/u otros derivados bioactivos hidroxilados (Stark y Bazan, 2011, Zhao et al., 2011).

### **7.4 Terapia lipídica de membrana**

Por todo ello, cobra especial interés la terapia lipídica de membrana (TLM). La TLM es una aproximación terapéutica que tiene como objetivo desarrollar fármacos que regulen la composición de la membrana. Cambios en las propiedades fisicoquímicas de las membranas, como la presión lateral, la fluidez o el comportamiento de fase, podría regular la localización y actividad de proteínas relevantes en la señalización celular, dando lugar a la regulación de la expresión génica y/o a la reversión de los estados patológicos. Además, el hecho de que los fármacos hidrofóbicos atraviesan con facilidad la barrera hematoencefálica apoya el uso potencial de la TLM para tratar desordenes en el SNC, como muchas de las enfermedades neurodegenerativas (Escribá, 2006, Escribá et al., 2015, Nicolson y Ash, 2014).

En el contexto de la TLM, en los últimos años se han diseñado un elevado número de ácidos grasos hidroxilados para el tratamiento de patologías como el cáncer, la inflamación, la obesidad, la diabetes, las lesiones medulares, etc. Los datos disponibles hasta la fecha indican que el mecanismo de acción de estos compuestos está relacionado con su capacidad de modular la estructura lipídica de la membrana (Escribá, 2006, Barceló et al., 2004, Yang et al., 2005). En este sentido el OA hidroxilado se ha mostrado efectivo en reducir la presión sanguínea en ratas hipertensas a través de mecanismos que implican la modulación de la composición lipídica de la membrana y sus propiedades biofísicas (Prades et al., 2008). Además, el OA hidroxilado está actualmente en fase clínica I/IIa para el tratamiento de tumores sólidos (NCT01792310, 2013) y en estudios preclínicos para el tratamiento de daños medulares. El ARA hidroxilado ha sido propuesto como nuevo fármaco antiinflamatorio no esteroideo, ya que es capaz de inhibir la actividad de COX1 y COX2, reduciendo la síntesis de mediadores pro-inflamatorios (Lopez et al., 2013). Se cree que todos estos compuestos hidroxilados actúan regulando la transducción de señales a través de la TLM.

En este trabajo se presenta el estudio del ácido 2-hidroxi-docosahexanoico (LP226) en el tratamiento de la EA. Se trata de un derivado sintético del DHA, desarrollado a partir del lípido precursor añadiendo una hidroxilación en el carbono  $\alpha$ ; que en los últimos años ha surgido como candidato interesante para revertir las deficiencias cognitivas asociadas a la neurodegeneración, propia de la EA.

## *II. OBJETIVOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL*

---



Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, el objetivo principal del presente estudio fue determinar la eficacia, seguridad farmacológica y mecanismo de acción del tratamiento con LP226 en la enfermedad de Alzheimer en un modelo transgénico de la Enfermedad de Alzheimer (5XFAD), para sentar las bases para un futuro desarrollo del fármaco en humanos.

Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar la seguridad farmacológica y toxicológica del LP226 en pez cebra y ratones sanos (WT) y establecer la ventana terapéutica para este compuesto.
2. Establecer la dosis terapéutica para el tratamiento de ratones 5XFAD, modelo de estudio de la Enfermedad de Alzheimer.
3. Determinar el efecto del LP226 en el deterioro cognitivo propio del modelo 5XFAD de la enfermedad de Alzheimer.
4. Caracterizar el perfil lipídico cerebral de los animales tratados con LP226.
5. Caracterizar molecularmente el procesamiento de la proteína precursora del amiloide tras el tratamiento con LP226.
6. Estudiar la degeneración sináptica, la muerte neuronal y la proliferación neuronal en los animales 5XFAD tratados con LP226.

Para llevar a cabo todo esto se desarrolló el siguiente diseño experimental (Figura O1):

### *Diseño experimental*

#### **Fase previa**

1. Determinación de la toxicidad del compuesto en pez cebra (*Danio rerio*)
2. Determinación de la toxicidad del compuesto en ratones *wild type* (WT)
  - Tratamiento agudo y a corto plazo (14 días)
  - Test de Irwin
3. Establecimiento de la dosis terapéutica en el modelo 5XFAD
  - Tratamiento crónico (4 meses)
  - Estudio sobre el comportamiento en el Laberinto Radial

#### **Fase experimental**

Animales WT y 5XFAD tratados con LP226 y DHA

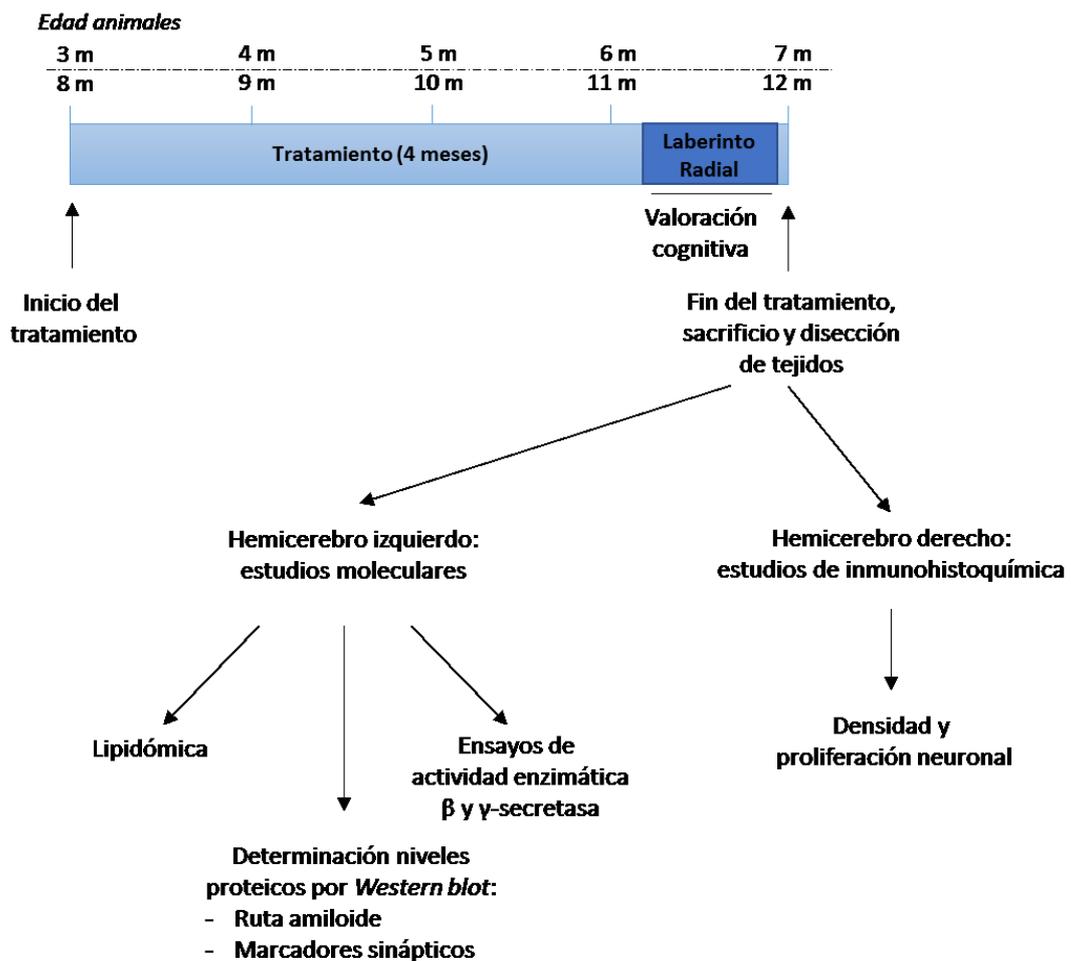


Figura O1. Diseño experimental.

### *III. MATERIALES Y MÉTODOS*

---



## 1. Animales: cepas y mantenimiento de las colonias

Los experimentos realizados en el presente estudio han sido desarrollados en ratones transgénicos 5XFAD (modelo murino PS1/APP de la enfermedad de Alzheimer) y controles sanos *wild type* (WT), originalmente procedentes de *The Jackson Laboratory* (EE.UU.) y posteriormente criados y estabulados en el animalario de la Universidad de las Islas Baleares (UIB).

Todos los animales se mantuvieron en condiciones estándar de estabulación: 12/12 horas de luz/oscuridad,  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 70% de humedad relativa, alimentados con pienso (A03, PanLab) y agua *ad libitum*.

Durante los meses de tratamiento, el peso de los animales fue controlado semanalmente y tanto el comportamiento como el aspecto de los animales fueron observados regularmente en su jaula para identificar posibles signos de dolor o estrés. La manipulación de los animales se realizó de acuerdo a las recomendaciones de la Unión Europea (86/609/EEC) y de España (el RD 53/2013) y todos los experimentos se desarrollaron bajo la aprobación del Comité Ético de la UIB.

### 1.1 5XFAD

Se trata de un modelo murino doble transgénicos APP/PS1 en fondo genético híbrido B6/SJL (C57BL6 x SJL; véase la Tabla M1) que fue desarrollado por Robert Vassar y colaboradores en la Northwestern University (Oakley et al., 2006). Este modelo sobreexpresa las proteínas humanas presenilina 1 (PS1) y proteína precursora de amiloide (APP) bajo control transcripcional del promotor neuronal Thy-1. En heterocigosis, estos animales presentan los transgenes para APP (isoforma 695) y PS1 con 5 mutaciones clínicas asociadas con la EA familiar: las mutaciones *Swedish* (K670N, M671L), *Florida* (I716V) y *London* (V717I) en APP; y M146L y L286V en PS1. En consecuencia, este modelo se denomina comúnmente como 5XFAD (portador de 5 mutaciones clínicas propias de la EA familiar). Originalmente se desarrollaron varias cepas diferentes del modelo 5XFAD, en este trabajo hemos utilizado la cepa Tg6799, que es la que demostró un desarrollo más agresivo de la patología (Oakley et al., 2006).

El modelo 5XFAD muestra varias marcas neuropatológicas asociadas a la EA, caracterizándose principalmente por un desarrollo temprano de una fuerte patología amiloide dependiente de la edad del animal. También presenta gliosis que se desarrolla a partir de los 2 meses de forma paralela al depósito de placas. Los déficits cognitivos aparecen alrededor de los 4 meses, a los 4-6 se detecta la degeneración sináptica y a los 9 meses se inicia la muerte neuronal (Oakley et al., 2006). Las características del modelo 5XFAD se describen de forma más detallada en la Introducción (véase el apartado 6.1.1).

### 1.2 Animales controles sanos: cepa B6/SJL F1

Como control sano hemos utilizado ratones WT de la cepa B6/SJL. Estos ratones presentan el mismo fondo genético híbrido en el que se mantiene el modelo 5XFAD. Con la finalidad de reducir la heterogeneidad asociada a la deriva genética, los animales WT empleados en el presente trabajo siempre fueron de la primera generación (F1). Estos animales se obtuvieron a partir del cruce de las cepas consanguíneas C57BL6 y SJL, ambas procedentes de Harlan Laboratories (Barcelona, España), (véase la Tabla M1).

Como todas las cepas consanguíneas, los ratones B6/SJL F1 son genética y fenotípicamente uniformes; y al ser híbridos son heterocigotos en todos los *loci*. En este sentido, cabe destacar la presencia en heterocigosis del alelo *Pde6b<sup>rd1</sup>*, que proviene de la cepa SJL y en homocigosis causa degeneración retiniana y la consecuente ceguera. El control de la homocigosis de este gen se ha determinado rutinariamente mediante genotipado (véase el apartado 1.4).

### 1.3 Mantenimiento de las colonias

Una vez adquiridas, cada una de las cepas utilizadas fue mantenida en el estabulario de la UIB. Estas cepas se cruzaron entre sí para obtener los animales de experimentación necesarios tal y como se muestra en la Tabla M1. La cepa 5XFAD se mantuvo en un fondo genético híbrido B6/SJL mediante el cruce de ratones 5XFAD y B6/SJL F1. Así mismo, la cepa WT B6/SJL F1 se obtuvo del cruce entre las cepas C57BL6 y SJL.

Cepa	Origen	Cruce
5XFAD	Jackson Laboratories	5XFAD (hembra) x B6/SJL F1 (macho)
B6/SJL F1	-	C57BL6 (hembra) x SJL (macho)
C57BL6/J OlaHsd	Harlan Laboratories	C57BL6 x C57BL6
SJL/J OlaHsd	Harlan Laboratories	SJL x SJL

**Tabla M1. Cruces realizados para el mantenimiento de las colonias**

### 1.4 Genotipado

Al trabajar con un modelo que presenta los transgenes en heterocigosis es necesario comprobar la presencia de estos tras cada nuevo cruce. Además, debe comprobarse la presencia del alelo Pde6b<sup>rd1</sup> en los ratones 5XFAD, para descartar su presencia en homocigosis.

#### 1.4.1 Reactivos

- Tampón de digestión: 0,05 mg/ml Proteinasa K (Promega), 100 mM EDTA (Sigma), 100 mM NaCl (Sigma), 1% (v/v) SDS (Scharlau) en 50 mM Tris-HCl (Sigma) pH 8,0.
- Reactivos para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):
  - Cebadores específicos (Isogen Life Science)
  - 10 mM dNTPs Mix (Biotools)
  - ADN polimerasa 1U/ µl (Biotools)
  - Tampón de reacción 10x con 2mM MgCl<sub>2</sub> (Biotools)
- Tampón de carga para ADN 6X: 0,03% azul de bromofenol (Scharlau), 60% (v/v) glicerol (Scharlau)
- Tampón Tris-Bórico-EDTA (TBE): 90 mM ácido bórico (Sigma), 2,5 mM EDTA (Sigma) en 90 mM Tris-Base (Sigma)
- Geles de agarosa (Pronadisa) al 2,5% (p/v) con bromuro de etidio (Sigma) 0,5 µg/ml en TBE
- Marcador de PCR 100 pb *Low Ladder* (Sigma)

#### 1.4.2 Procedimiento

El genotipado de los animales 5XFAD se realizó a partir de una muestra de cola (extremo apical no superior a 0,5 cm). Tras la obtención de la muestra, esta puede ser almacenada a -20°C hasta su uso. Para la digestión enzimática, se añadió 1 ml de tampón de digestión a cada fragmento de cola, y se dejó incubar 12 h a 55°C en agitación constante. Tras esta incubación, el tejido se ha disgregado y se procede a la inactivación de la proteinasa K mediante una incubación de 30 min a 95°C. Para la reacción de PCR se utilizó una dilución 1/50 de esta muestra en agua.

A la hora de realizar la amplificación por PCR, se utilizó esta reacción general, con los cebadores específicos para cada gen a amplificar:

<b>Componentes de la reacción</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Volumen (µl)</b>
Tampón 10x (con MgCl <sub>2</sub> )	1x	2,5
dNTPs Mix 10 mM	0,25 mM	0,63
Cebadores específicos 10 µM	0,4 µM	1 (cada uno)
ADN Polimerasa 1 U/µl	0,04 U/µl	1
Muestra ADN (dilución 1/50)	-	1
ddH <sub>2</sub> O	-	Hasta 25

**Tabla M2. Estequiometría general para la reacción de PCR en el genotipado.**

Para genotipar las muestras de tejido de nuestros animales, hemos realizado dos reacciones de PCR diferentes; una para testar la presencia de los transgenes APP y PS1 y otra para el gen Pde6b. Los cebadores empelados en estas reacciones, así como el protocolo de ciclos de PCR empleado para estas reacciones se detallan en las Tablas M3 y M4.

<b>Genes diana</b>	<b>Secuencia 5' --&gt; 3' (sentido /antisentido)</b>	<b>Producto de PCR resultante</b>
PS1 humano (sentido) PS1 humano (antisentido)	AAT AGA GAA CGG CAG GAG CA GCC ATG AGG GCA CTA ATC AT	600 pb
APP humano (sentido) APP humano (antisentido)	AGG ACT GAC CAC TCG ACC AG CGG GGG TCT AGT TCT GCA T	377 pb
Control interno (CI) PCR PS1 y APP CI (sentido) CI (antisentido)	CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C	324 pb
Pde6b Mutante (sentido)	AAG CTA GCT GCA GTA ACG CCA TTT	560 pb
Pde6b WT (sentido)	ACC TGC ATG TGA ACC CAG TAT TCT ATC	240 pb
Pde6b Común (antisentido)	AGG ACT GAC CAC TCG ACC AG	-

**Tabla M3. Cebadores específicos para la amplificación de los genes APP, PS1 y Pde6b.**

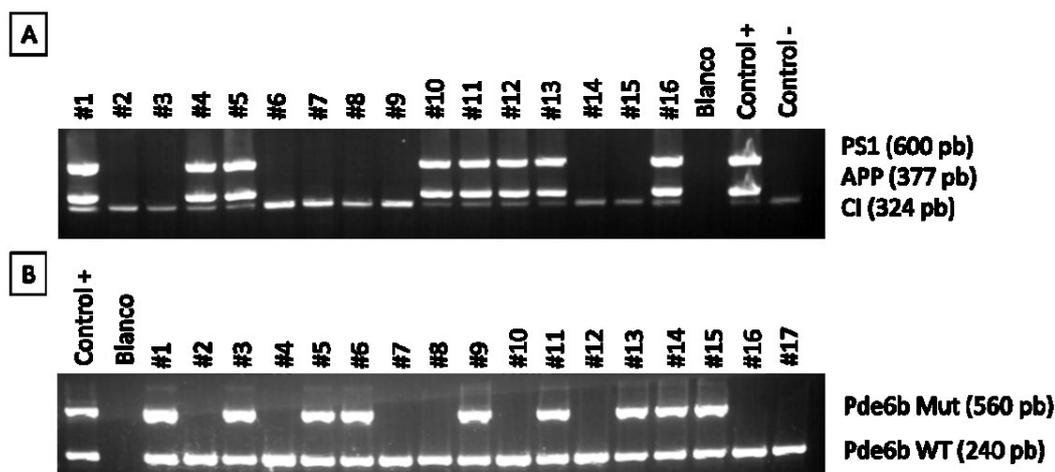
<b>Ciclos</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (min)</b>
1- Activación polimerasa	94	5
2- Desnaturalización ADN	94	0,5
3- Alineamiento cebadores	54 (APP/PS1)	1
	65 (Pde6b)	
4- Elongación	72	1,5
5- Elongación final	72	2
6- Mantenimiento	4	-

\* Repetir pasos 2-4 hasta 35 ciclos

**Tabla M4. Ciclos de temperatura y tiempos de la reacción de PCR.**

Los productos de PCR se analizan en geles de agarosa. Tras la reacción, se añade tampón de carga a las muestras, se cargan 15 µl del producto de PCR en un gel de agarosa al 2,5% con bromuro de etidio y

se someten a electroforesis (100V, 30 min.). Finalmente, las bandas se visualizan en un transiluminador con luz UV (Figura M1).



**Figura M1. Comprobación del resultado de la PCR en gel de agarosa.** (A) En el panel superior visualizamos el resultado de la amplificación conjunta de los genes APP, PS1 y CI. En el Control negativo aparece únicamente la banda correspondiente al el CI (324 pb), mientras que en el Control positivo aparece además del CI, las bandas correspondientes a PS1 y APP (600 y 377 pb respectivamente). En las muestras analizadas observamos la presencia del transgén en el 50%, tal y como cabría esperar según la proporción mendeliana. (B) En el panel inferior visualizamos el resultado de la amplificación del gen Pde6b. En el Control positivo (heterocigoto para el loci Pde6b) aparecen dos bandas: WT de 240 pb y mutada, de 560 pb. Entre las muestras aparecen individuos heterocigotos y homocigotos para el alelo WT, en una proporción del 50%. La selección preferente de progenitores 5XFAD homocigotos para el alelo WT, hace que no aparezcan individuos homocigotos para el gen mutado.

## 2. Tratamientos farmacológicos

### 2.1 Reactivos

- 5% (v/v) etanol (Scharlau)
- Ácido docosahexaenoico- sal sódica (DHA, Medalchemy, SL; España)
- Ácido hidroxido- docosahexaenoico- sal sódica (LP226, Medalchemy, SL; España)

El ácido graso hidroxilado LP226 fue amablemente cedido por Lipopharma Therapeutics (Palma, España).

### 2.2 Procedimiento

En el desarrollo de este trabajo experimental, se han llevado a cabo dos tipos de tratamientos: tratamientos crónicos (4 meses), tratamientos de corta duración (duración inferior a un mes) y tratamientos agudos. La vía de administración fue en todos los casos oral, mediante cánula gastroesofágica.

### 2.3 Tratamientos agudos

Los tratamientos agudos y de corta duración se llevaron a cabo para determinar la toxicidad de los compuestos objeto de estudio en este trabajo. Para ello se utilizó el test de Irwin (Irwin, 1968). Las

especificaciones y características del test se detallan en el apartado 4 del capítulo de Materiales y Métodos.

## 2.4 Tratamientos crónicos

Los tratamientos crónicos se desarrollaron en diferentes tandas experimentales y se llevaron a cabo del mismo modo en todos los casos: los animales recibieron una dosis diaria del vehículo (solución de etanol 5%, 1 ml/kg de peso) o del fármaco (en etanol 5%, 1 ml/kg de peso) durante 5 días a la semana. Estos tratamientos se mantuvieron durante 4 meses, hasta eutanasia de los animales. Durante el último mes de tratamiento se lleva a cabo la prueba comportamental: el Laberinto Radial (LR) de ocho brazos (véanse los detalles en el apartado 5 de Materiales y Métodos).

Se establecieron dos rangos de edad para la realización de los tratamientos:

- Animales de 7 meses (jóvenes), que empezaron a tratarse a los 3 meses de edad hasta los 7 meses.
- Animales de 12 meses (viejos), que se tratan desde los 8 meses hasta los 12.

Nos referiremos a estos grupos como animales de 7 y 12 meses haciendo referencia a la edad a la que se llevó a cabo la valoración comportamental en el LR y se obtuvieron las muestras para los posteriores estudios moleculares. En las Tablas M5 (animales de 7 meses) y M6 (animales de 12 meses) se detallan los tratamientos realizados en este trabajo.

<i>Cepa</i>	<i>Fármaco</i>	<i>Dosis (mg/kg)</i>	<i>Número de animales</i>
WT	Vehículo	-	10
	DHA	20	4
	LP226	20	5
	LP226	200	3
5XFAD	Vehículo	-	9
	DHA	20	3
	LP226	5	5
	LP226	20	7
	LP226	50	7
	LP226	200	4

**Tabla M5. Tratamientos crónicos realizados en ratones macho de 7 meses (jóvenes).** Se detallan la cepa, el fármaco administrado, la dosis y el número de animales usados en cada condición. Todos los animales fueron tratados durante 4 meses, desde los 3 hasta los 7 meses de edad y durante el último mes fueron sometidos a la prueba del LR.

<i>Cepa</i>	<i>Fármaco</i>	<i>Dosis (mg/kg)</i>	<i>Número de animales</i>
WT	Vehículo	-	13
	DHA	20	3
	LP226	20	8
5XFAD	Vehículo	-	11
	DHA	20	4
	LP226	20	9

**Tabla M6. Tratamientos crónicos realizados en machos de 12 meses (viejos).** Se detallan la cepa, el fármaco administrado, la dosis y el número de animales usados en cada condición. Todos los animales fueron sometidos a 4 meses de tratamiento, desde los 8 hasta los 12 meses de edad y durante el último mes se estudió su comportamiento en la prueba del LR.

### 3. Estudio de la toxicidad en embriones de pez cebra

#### 3.1 Fundamento

El pez cebra (*Danio rerio*) tiene un alto potencial como modelo preclínico, tanto para la búsqueda de nuevos compuestos terapéuticos, como para los análisis de toxicidad. De hecho, se utiliza cada vez más como un modelo vertebrado para el descubrimiento de fármacos y para evaluar *in vivo* la seguridad y la toxicidad química, como paso previo a la utilización de modelos mamíferos, como rata o ratones (He et al., 2013). Numerosos estudios han confirmado que el pez cebra y los mamíferos presentan muchos elementos similares en su fisiología como su desarrollo, su metabolismo o diversas vías de señalización. Además, las respuestas del pez cebra a las sustancias tóxicas son altamente predictivas a las respuestas de los mamíferos (He et al., 2014, Wang et al., 2009). Por otro lado, las características propias de esta especie como el pequeño tamaño, el desarrollo embrionario fuera de la madre y la transparencia de los embriones, junto al enorme número de individuos por puesta y los bajos costes de mantenimiento de los individuos adultos lo ha convertido en los últimos años en el modelo de elección para estudios de tipo fenotípico, genético o pruebas toxicológicas.

Respecto a su uso en ensayos toxicológicos, la transparencia de los embriones y el desarrollo fuera de la madre permiten comprobar fácilmente los posibles efectos teratogénicos y embriotóxicos. Además, varios estudios sugieren que los efectos toxicológicos y teratogénicos producidos por diversos productos químicos tienen en muchos casos efectos muy similares en los embriones de pez cebra y en humanos (Yang et al., 2009).

#### 3.2 Reactivos

- Ácido 2-hidroxi-docosaheptaenoico-sal sódica (LP226, Medalchemy, SL; España)
- Dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma)

#### 3.3 Procedimiento

La evaluación de la toxicidad del LP226 en embriones de pez cebra se llevó a cabo por la empresa *Neuron BPH* de acuerdo con las recomendaciones de la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos).

Se añadieron cinco concentraciones de LP226 a diferentes tanques de agua: 1, 3, 10, y 100 mg/ml. Para ello, primero se disolvió el LP226 en DMSO para obtener las soluciones de trabajo, manteniendo la concentración final de DMSO siempre por debajo del 0,1%. Cada concentración de LP226 se probó en 20 embriones diferentes a 24, 48 y 72 horas (25°C). Después de la incubación se determinó el porcentaje de embriones que presentaron mortalidad embrionaria y, a continuación, se evaluó la presencia de efectos subletales, efectos teratogénicos y viabilidad. Se consideraron como efectos subletales la falta de movimiento espontáneo, los déficits de pigmentación y la presencia de edemas o formación de coágulos en los órganos u otras estructuras internas; mientras que en los efectos teratogénicos se incluyeron la deformación de los órganos o estructuras internas, escoliosis y retraso en el crecimiento general.

## 4. Estudio toxicidad en ratones: test de Irwin

### 4.1 Fundamento

El test de Irwin, descrito por Irwin en 1968 (Irwin, 1968) es una prueba para evaluar y cuantificar el estado conductual y fisiológico del ratón y su respuesta a los fármacos. Es la prueba de elección para la valoración preliminar de nuevos fármacos con posible actividad sobre Sistema Nervioso Central (SNC), debido a su sencilla realización, así como a la validez de los datos aportados, haciendo de ella una prueba de gran utilidad antes de proseguir la investigación con experimentos de mayor complejidad. El test se compone de una batería de ensayos que se agrupan en tres grandes grupos: estudios de comportamiento (alerta, aseo, irritabilidad), estudios neurológicos (temblores, convulsiones, ataxia) y estudios relacionados con el Sistema Nervioso Autónomo (salivación, hipotermia, midriasis).

### 4.2 Material y reactivos

- 5% (v/v) etanol (Scharlau)
- Ácido docosahexaenoico-sal sódica (DHA, Medalchemy, SL; España)
- Ácido hidroxi-docosahexaenoico-sal sódica (LP226, Medalchemy, SL; España)
- Test de Irwin: vaso de cristal (10x12,7 cm), jaula de plexiglás (38x84x20 cm), cronómetro, aguja 31-G flexible y sin filo, pinzas, rejilla, alambre, barra para trepar.

El ácido graso hidroxilado LP226 fue amablemente cedido por Lipopharma Therapeutics (Palma, España).

### 4.3 Procedimiento

El test de Irwin se realizó en animales WT, machos, de 7 meses, tratados con diferentes fármacos y dosis (Tabla M7). Los animales se evaluaron a distintos tiempos después de recibir la dosis elegida: 15 min., 30 min., 1h, 2h, 3h, 6 h y 24h. La evaluación se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento establecido por Irwin en 1968, con algunas modificaciones tal como se muestra en la Tabla M8.

<i>Tratamiento</i>	<i>Dosis (mg/kg)</i>	<i>n</i>
5 % etanol	-	6
DHA	5, 20, 50, 100, 200, 500	6 cada dosis
LP226	5, 20, 50, 100, 200, 500	6 cada dosis

**Tabla M7. Tratamientos realizados en los animales que se sometieron al test de Irwin.**

## Materiales y Métodos

<b>Parámetro</b>	<b>Puntuación</b>
<b>Apariencia general y factores físicos</b>	
<i>Peso (g)</i>	Anotar el peso
<i>Presencia de bigotes</i>	0 = Ninguno; 1 = Unos pocos; 2 = La mayoría, pero no todos 3 = Todos
<i>Apariencia del pelaje</i>	0 = Despeinado y desaliñado; 1 = Parcialmente despeinado; 2 = Bien acicalado (normal)
<i>Color de piel de la superficie plantar</i>	0 = Pálido; 1 = Rosa; 2 = Brillante, rojo oscuro
<b>Perfil autónomo</b>	
<i>Micción</i>	0 = No; 1 = Poco; 2 = Cantidad moderada; 3 = Abundante
<i>Defecación</i>	Contar el número de bolos fecales excretados durante un período de 3 min.
<i>Ritmo cardíaco</i>	0 = Lento, bradicardia; 1 = Normal; 2 = Rápido, taquicardia
<i>Ritmo respiratorio</i>	0 = Respiración entrecortada, irregular; 1 = Lento, superficial 2 = Normal; 3 = Hiperventilación
<i>Cierre de párpados</i>	0 = Ojos abiertos; 1 = Ojos 1/2 cerrados; 2 = Ojos cerrados
<b>Perfil comportamental</b>	
<i>Comportamiento en traslado</i>	0 = Coma; 1 = Parálisis prolongada (>10 s), después movimiento leve; 2 = Parálisis prolongada, después movimiento moderado; 3 = Parálisis breve (unos pocos segundos), después movimiento activo; 4 = Parálisis momentánea, después movimiento rápido; 5 = Sin parálisis, movimiento inmediato; 6 = Extremadamente excitado ("maniaco")
<i>Posición corporal</i>	0 = Completamente extendido (sobre el estómago); 1 = Recostado de lado; 2 = Recostado de espalda; 3 = Sentado o en pie; 4 = Levantándose sobre las patas traseras; 5 = Salto vertical repetido
<i>Actividad espontánea</i>	0 = Ninguna, descansando; 1 = Rascado casual, acicalamiento, movimiento lento; 2 = Rascado fuerte, acicalamiento, movimiento moderado; 3 = Fuerte, movimiento rápido; 4 = Extremadamente fuerte, movimiento rápido
<i>Comportamiento extraño</i>	Se anotan los comportamientos anómalos: movimientos cefálicos, lesiones auto infligidas, comportamiento "alucinatorio", movimientos en círculos, movimientos letárgicos, etc.
<i>Respuesta de escape al tacto</i>	0 = No responde; 1 = Suave (respuesta de escape a un golpe fuerte); 2 = Moderado (respuesta rápida a un golpe ligero); 3 = Fuerte (respuesta de escape a la aproximación)
<i>Posición pasiva</i>	0 = Forcejea cuando se le retiene por la cola; 1 = Forcejea cuando se le retiene por el cuello; 2 = Forcejea cuando se le retiene en posición supina; 3 = Forcejea cuando se le retiene de las patas traseras; 4 = No forcejea
<i>Reflejo de llegada</i>	0 = No; 1 = Tras contacto con la nariz; 2 = Tras contacto con las vibrisas; 3 = Antes del contacto con las vibrisas (18 mm); 4 = Extensión fuerte temprana (25 mm)
<i>Elevación pélvica</i>	0 = Marcadamente aplanada; 1 = Apenas toca el suelo; 2 = Normal (3 mm elevación); 3 = Elevada (más de 3 mm)
<i>Elevación de la cola (en movimiento)</i>	0 = Arrastrando; 1 = Extendida horizontalmente; 2 = Elevada (Cola "straub")
<i>Mordedura provocada</i>	0 = Ausente; 1 = Presente
<b>Perfil neurológico</b>	
<i>Piloerección</i>	0 = Ninguno; 1 = Mayoría de pelo erizado
<i>Temblores</i>	0 = Ninguno; 1 = Suaves; 2 = Evidentes
<i>Marcha</i>	0 = Normal; 1 = Fluida pero anormal; 2 = Sólo movimientos limitados; 3 = Incapacidad
<i>Tono corporal</i>	0 = Flácido, tras presionar no vuelve a la normalidad; 1 = Ligera resistencia; 2 = Resistencia extrema, como una tabla
<i>Tono de las extremidades</i>	0 = Sin resistencia; 1 = Resistencia suave; 2 = Resistencia moderada; 3 = Resistencia fuerte 4 = Resistencia extrema
<i>Tono abdominal</i>	0 = Flácido, tras presionar no vuelve a la normalidad; 1 = Ligera resistencia; 2 = Resistencia extrema, como una tabla
<i>Reflejo de giro</i>	0 = Normal; 1-10 = Número de segundos necesarios para girarse
<i>Reflejo pabellón auditivo</i>	0 = Ninguno; 1 = Retirada efectiva, movimiento moderadamente rápido; 2 = Hiperactivo, movimiento repetitivo
<i>Reflejo ante presión plantar</i>	0 = Ninguno; 1 = Retirada leve; 2 = Retirada moderada; 3 = Retirada rápida, movimiento enérgico; 4 = Extensión y flexión repetida y enérgica
<i>Reflejo ante presión en cola</i>	0 = Ninguno; 1 = Retirada leve; 2 = Retirada moderada; 3 = Retirada rápida, movimiento enérgico; 4 = Extensión y flexión repetida y enérgica
<b>Coordinación motora</b>	
<i>Maniobra en alambre</i>	0 = Agarre activo con patas traseras; 1 = Dificultad de agarrarse con las patas traseras; 2 = Incapaz para agarrarse con las patas traseras; 3 = Incapaz de agarrarse con las patas traseras, cae en segundos; 4 = Cae inmediatamente
<i>Fuerza de agarre</i>	0 = No; 1 = Agarre suave, semi-efectivo; 2 = Agarre moderado, efectivo; 3 = Agarre activo, efectivo; 4 = Inusualmente efectivo
<i>Tabla invertida</i>	0-30 = Número de segundos antes de caer
<i>Descenso en barra</i>	0 = Desciende en menos de 30s; 1 = Se gira y asciende por la barra; 2 = Se gira y queda inmóvil; 3 = No se mueve en 30s, o desciende, pero sin llegar abajo; 4 = Se cae

**Tabla M8. Protocolo para la evaluación toxicológica y neurológica en ratones según el test de Irwin.**

## 5. Prueba de comportamiento: Laberinto Radial de ocho brazos

### 5.1 Fundamento

El Laberinto Radial (LR) es una prueba de memoria espacial que permite medir a la vez distintos componentes de la memoria: memoria de trabajo y memoria de referencia. Fue desarrollada por Olton y Samuelson en 1976 (Olton y Samuelson, 1976) y ha sido usada de forma habitual para estudiar la memoria espacial en roedores (Carrillo-Mora et al., 2009). Actualmente es una de las pruebas de elección para comprobar los déficits cognitivos en modelos transgénicos de la EA (Bryan, 2009). Se trata de un laberinto de 8-17 brazos equidistantes que radian desde una plataforma central por la que el animal tiene que desplazarse con el objetivo de obtener una recompensa (agua o comida) en el menor tiempo posible. El animal se orienta gracias a una serie de claves visuales situadas en la habitación, con el propósito de entrar una sola vez en cada brazo y conseguir la recompensa de la forma más eficiente posible. Este laberinto requiere el uso de memoria de trabajo para recordar los brazos ya visitados, lo que exige retener la información a corto plazo; así como el uso de la memoria de referencia, para retener las reglas generales de la prueba a lo largo de los ensayos diarios sucesivos (Olton et al., 1979).

### 5.2 Material

- Laberinto radial de ocho brazos (LE766/8, Panlab SL)
- Pienso en pellets de 45 mg (Dustless Precision Pellets®, BioServ)
- 70 % (v/v) etanol (Scarlau) en agua
- Sistema de video digital, LE 8300 (Smart 2.5.16 con software SEDACOM v 1.3, Panlab)
- Pienso para ratón (A03, PanLab)

### 5.3 Procedimiento

En este trabajo se ha utilizado un LR de ocho brazos fabricado en plexiglás negro. El aparato consta de una zona central con ocho puertas correderas que dan acceso a ocho brazos idénticos. El laberinto está montado sobre un trípode con altura ajustable (hasta 1 m). Cada brazo tiene paredes laterales con una altura mayor en el lado proximal del brazo que en el lado distal, donde encontramos un recipiente rebajado desmontable donde puede colocar la recompensa. El aparato fue colocado a 50 cm del suelo en una habitación cerrada y aislada con pistas visuales en la pared, visibles desde el centro de la plataforma. Estas pistas permanecieron constantes durante todo el proceso experimental. En el techo de la habitación, sobre la plataforma central, se colocó un sistema de video digital con capacidad para seguir los movimientos del animal y así poder monitorizar al animal desde el ordenador durante cada experimento. Además, el movimiento de cada animal fue grabado para su posterior análisis.

Después de cada prueba, el laberinto se lava con una solución de etanol al 70%, para eliminar restos de orina, heces, comida y cualquier tipo de olor, evitando así que el siguiente animal pueda utilizar el olor como guía para completar la prueba.

El **diseño experimental** consta de dos fases: entrenamiento previo y prueba. Ambas se realizaron a la misma hora circadiana (entre las 9:00 y las 13:00) durante la fase iluminada del ciclo luz-oscuridad:

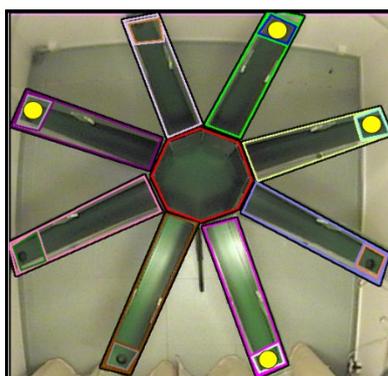
- El **entrenamiento previo** se realiza para familiarizar al animal con el laberinto. Con este propósito, se deposita una recompensa al final de cada uno de los 8 brazos que el animal debe recuperar en un tiempo inferior a 10 minutos. Cada animal es sometido a 6 sesiones durante 3 días (2 sesiones/día). El objetivo de esta primera fase de entrenamiento es familiarizar al ratón

## Materiales y Métodos

con el laberinto (aspecto, textura, ambiente, etc.) y con las reglas generales de la prueba (claves visuales, existencia de recompensa al final de los brazos, etc.)

- Tras el entrenamiento, se pasa a la fase de **prueba**. En este caso, sólo se pone recompensa en cuatro de los ocho brazos del laberinto (Figura M2) y para superar la prueba el animal debe visitar los 4 brazos con premio en un tiempo inferior a 300 segundos. Durante toda la prueba se mantuvieron constantes los brazos con recompensa. En esta fase cada animal es sometido 15 sesiones de prueba durante 3 semanas (5 sesiones/semana).

La recompensa consiste en un pellet de comida de 45 mg, que se coloca al final de cada uno de los brazos que el animal debe visitar. Con el fin de alcanzar el nivel motivacional adecuado los animales se sometieron a restricción dietaria para situarlos entre el 80-85% de su peso corporal y se mantuvieron en este rango de peso hasta finalizar la prueba.



**Figura M2. Visión superior de Laberinto Radial.** Se muestra tal como aparece en el programa Smart al realizar el seguimiento. Aparecen marcados en amarillo los brazos con recompensa durante la prueba.

Para asegurar que los animales se sitúen en el rango de peso adecuado sin que peligre su supervivencia se procedió del siguiente modo:

- Se calculó el peso promedio de cada animal durante el último mes de tratamiento, y se tomó este valor como el 100% del peso del animal.
- Cinco días antes del inicio de los experimentos, se retiró la comida a los animales durante 24h.
- A partir de ese momento, y durante el tiempo que duró la prueba comportamental, se alimentó a los animales en base a la siguiente tabla (Tabla M9), dándoles la ración diaria de pienso tras haber realizado la prueba comportamental, justo después de recibir el tratamiento. Para ello fue necesario llevar un control diario del peso de cada animal.

Edad	Peso del animal (% respecto a su peso inicial)					
	>95%	95-90%	90-85%	85-82,5%	82,5-80%	<80%
	<b>Pienso (g)/día</b>					
7 meses	0	0,5	1	1,5	2	Ad libitum
12 meses	0,5	1	1,5	2	Ad libitum	Ad libitum

**Tabla M9. Ración de pienso diaria.** Durante el desarrollo de la prueba comportamental cada animal recibe una ración de pienso diferente en función de la edad y del rango de peso en el que se encuentran.

Tal como se muestra en la Tabla M9, se sigue un patrón diferente para los grupos de animales de 7 meses (jóvenes) y de 12 meses (viejos). Esta diferencia es debida a que los animales transgénicos de 12 meses son más susceptibles a la restricción dietaria. Así pues, en los animales viejos se evitó que bajaran

del 82,5% del peso comportamental para reducir el estrés de la restricción. En cualquier caso, si durante el desarrollo de la prueba se observó una bajada de peso muy fuerte en cualquiera de los animales, o un descenso de la actividad espontánea, se suprimió la restricción hasta que el animal se recuperase.

Una vez finalizada la tanda experimental, los datos se analizaron mediante el programa Smart (Panlab), lo que nos permitió obtener el tiempo empleado en la prueba, el número de entradas en cada brazo y la distancia recorrida en el laberinto. A partir de estos datos se calculó la velocidad (distancia recorrida/tiempo) y el número de errores, entendiendo como errores en la memoria de trabajo (WME, del inglés *Working Memory Errors*) la entrada repetida en los brazos con recompensa, tras haber entrado una primera vez, y definiendo como errores de la memoria de referencia (RME, del inglés *Reference Memory Errors*) todas las entradas en brazos sin recompensa.

## 6. Eutanasia de animales y disección de tejidos

En los experimentos realizados en este trabajo, el único tejido utilizado ha sido el cerebro. De forma general, en cada tanda experimental se ha destinado el hemiserebro izquierdo a los experimentos bioquímicos y el derecho a los experimentos de inmunohistoquímica (IHC).

### 6.1 Reactivos

- Ketamina (Imalgene 1000<sup>®</sup>, 100 mg/ml solución inyectable, Merial)
- Xilacina (Xilagesic<sup>®</sup>, 20 mg/ml solución inyectable, Calier)
- Suero salino: 0,9% (p/v) NaCl (Scharlau)
- Heparina al 0,033% (Heparina 5%, solución inyectable, Hospia<sup>®</sup>) en suero salino
- Paraformaldehido (PFA) 3,5-4% (tamponado a pH=7 con carbonatos, Scharlau)
- Tampón fosfato 0,1M (PB): 0,1M hidrógeno fosfato de sodio (Sigma), 0,1M dihidrógeno fosfato de sodio (Sigma) pH 7,4
- Solución crioprotectora: 30% (p/v) sacarosa (Scharlau), 0,02% (p/v) azida sódica (Acros) en PB 0,05M
- Bomba peristáltica Rainin Dynamax<sup>®</sup> (Modelo RP1, Rainin)

### 6.2 Procedimiento

Al finalizar la prueba en el LR los animales se mantuvieron una semana con comida ad libitum para permitir la recuperación del peso normal. Durante esta semana recibieron el tratamiento correspondiente, tal como se ha descrito anteriormente. Tras este período, los animales se eutanizaron para la obtención de muestras.

Los animales fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal de ketamina/xilacina (100/10 mg/kg, respectivamente). Tras comprobar la ausencia total de reflejos, todos los animales se perfundieron transcárdicamente con suero salino heparinizado mediante el uso de bomba peristáltica (flujo de 12-14 ml/min para perfundir un total de 180-220 ml).

Al finalizar la perfusión el cerebro se extrajo de la cavidad craneal, y se dividió en dos partes idénticas mediante un corte rostro-caudal a través del surco interhemisférico. El hemiserebro derecho fue fijado en PFA 4%, y el izquierdo diseccionado para aislar las diferentes regiones cerebrales (corteza, hipocampo y

cerebelo). Tras la disección, las regiones fueron congeladas en nitrógeno líquido y mantenidas a -80°C hasta su uso.

El hemisferio conservado en PFA, se mantuvo una semana en la solución en PFA a 4°C. La solución se cambió cada 2 días para asegurar una mejor fijación. Transcurrido este tiempo, se procedió a la conservación y al procesamiento del tejido (véase el apartado 18.3 de este capítulo).

## 7. Extracción de ARN

### 7.1 Fundamento

La extracción de ARN se realizó mediante un kit comercial basado en el procedimiento *RNeasy* (Quiagen), que combina las propiedades de unión selectiva del ARN a una membrana con base de sílice con la elución por velocidad de la tecnología *microspin*. Este procedimiento permite la purificación de hasta 100 µg de ARN de más de 200 bases. En primer lugar, las muestras biológicas se lisan y se homogeneizan en presencia de un tampón altamente desnaturizante que contiene guanidina-tiocianato, que inactiva inmediatamente las RNasas para asegurar la purificación de ARN intacto. Se añade etanol para precipitar los ácidos nucleicos, y la muestra se hace pasar por una columna de centrifugación *RNeasy Mini*, en la que el ARN queda unido a la membrana mientras que el resto de componentes celulares se eluyen. Finalmente, el ARN retenido en la columna se eluye en agua libre de nucleasas. Con el procedimiento *RNeasy*® se purifican todas las moléculas de ARN de más de 200 nucleótidos. El procedimiento proporciona un enriquecimiento para ARN mensajero (ARNm) ya que la mayoría de ARN de menos de 200 nucleótidos (tales como el ARN ribosómico de 5,8S y 5S y el ARN transferente), que en conjunto comprenden el 15-20% del total de ARN, quedan excluidas de forma selectiva.

### 7.2 Reactivos

- Kit de extracción de ARN: RNeasy Mini Kit (Quiagen)
- RNase-Free DNase kit (Quiagen)
- Agua tratada con dietilpírocarbonato (DEPC, Sigma) al 0,1% (p/v)
- Espectrofotómetro Nanodrop-1000 (ThermoFisher Scientific)
- Tampón Tris-Bórico-EDTA (TBE): 90 mM ácido bórico (Sigma), 2,5 mM EDTA (Sigma) en 90 mM Tris-Base (Sigma)
- Geles de agarosa (Pronadisa) al 2,5% (p/v) con bromuro de etidio (Sigma) al 0,5 µg/ml en TBE
- Tampón de carga para ADN 6x: 0,03% azul de bromofenol (Scharlau), 60% (v/v) glicerol (Scharlau)
- Marcador de PCR de 100 pb *Low Ladder* (Sigma)

### 7.3 Procedimiento

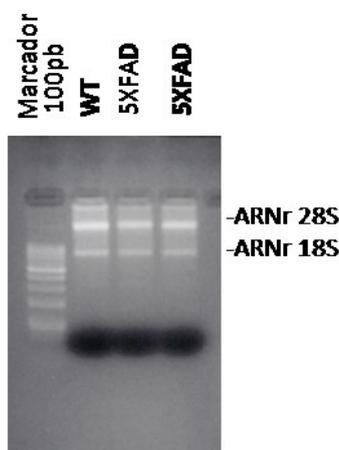
Se homogenizó un hemisferio de cada animal en un tampón de sal de guanidina (tampón RLT, Quiagen) en una proporción 1:20 (p/v) usando un homogenizador de cuchillas (Polytron PT3100). Las muestras se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y después fueron centrifugadas a 10.000 g, a 4°C durante 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se usaron 350 µl (correspondiente a unos 30 mg de tejido) para la extracción de ARN. El resto fue conservado a -80°C.

A continuación, se añadió 1 volumen de etanol al 70%, se mezcló con pipeta y se transfirió todo el volumen a una columna *RNeasy spin* sobre un tubo recolector de 2 ml y se centrifugó a 8.000 g durante 15 s. Se descartó el volumen eluido de la columna y se realizó una digestión en columna del ADN empleando el kit RNase-free DNase kit (Qiagen). Para llevar a cabo esta digestión, en primer lugar, se lavó la columna con 350 µl del tampón RW1 y, a continuación, se añadió la solución de ADNasa (10 µl, 1U/µl) de la solución ADNasa I a 70 µl del tampón RDD®, (Qiagen), sobre la membrana de la columna. Se incubó 15 min a temperatura ambiente (20-30 °C). A continuación, se lavó la columna con 350 µl del tampón RW1 y 500 µl del tampón RPE. Por último, la columna se centrifugó una tercera vez durante 1 minuto a máxima velocidad para eliminar los posibles restos de tampón de lavado.

Finalmente, se colocó la columna en un tubo nuevo libre de nucleasas y se añadió 30-50 µl de agua libre de ARNasas, se incubó durante 2 minutos a RT y se centrifugó durante 1 minuto a 8.000 g para eluir el ARN. La concentración de ARN obtenida y la pureza del mismo (determinada como la razón entre las absorciones a 260/230 y a 260/280 nm) se midió por espectrofotometría con un Nanodrop-1000. La razón de absorbancias 260/280 (longitud de onda a la que absorben los aminoácidos aromáticos) nos permite conocer el nivel de contaminación por proteínas en el ARN purificado. Una razón de 2,1 indica que la muestra de ARN no presenta prácticamente contaminación con proteínas.

### 7.4 Comprobación de la integridad del ARN purificado

Para comprobar la integridad del ARN purificado, las muestras se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio. Posteriormente, el gel se visualizó en un transiluminador UV. En todas las muestras se observaron dos bandas de alto peso molecular correspondientes al ARN ribosómico 28S y 18S, un conjunto de bandas a lo largo de todo el carril correspondiente a los diferentes ARNm, cada uno con su tamaño definido (Figura M3).



**Figura M3. Comprobación de la integridad del ARN en gel de agarosa.** Se aprecian dos bandas de alto peso molecular correspondientes al ARN ribosómico 28S y 18S (ARNr 28S, y ARN 18s) y un conjunto de bandas a lo largo de todo el carril correspondiente a los diferentes ARN mensajeros.

## 8. Retrotranscripción

### 8.1 Fundamento

El ARN es una biomolécula muy inestable debido a la alta afinidad que tienen las ARNasas por este sustrato. Por este motivo, es preferible trabajar con ADN complementario al ARN (ADNc) en lugar del

propio ARN. Este ADNc se genera gracias a la enzima transcriptasa inversa, que sintetiza una hebra de ADN complementaria a un molde de ARN en presencia de un cebador complementario. La selección de estos cebadores se realiza en función del ARN que se desee retrotranscribir.

En el presente trabajo se han empleado cebadores aleatorios, una mezcla de cebadores de 6 nucleótidos que presentan combinaciones aleatorias en los mismos. Esta variante de cebadores, presentan una alta probabilidad de unirse al ARN en diferentes regiones, debido a su corta longitud y su alta diversidad en combinaciones de nucleótidos; por lo que se utilizan para conseguir una retrotranscripción de ARN total.

Después de la retrotranscripción se obtiene un híbrido ARN-ADN que, por degradación del ARN, quedará finalmente como ADN monocatenario.

### 8.2 Material y reactivos

- Agua tratada con DEPC (Sigma) al 0,1% (p/v).
- Kit de retrotranscripción: *High-Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems). El kit contiene tampón RT 10X, *cebadores aleatorios 10X*, dNTPs 25x, MultiScribe RT (500U/μl) y agua libre de ARNasas
- Termociclador (Master cycler gradient, Eppendorf)

### 8.3 Procedimiento

Para realizar la retrotranscripción de ARN total se utilizó un kit suministrado por Applied Biosystems provisto de cebadores aleatorios. La combinación de los reactivos del kit da lugar a una mezcla de reacción 2X que se mezcla con la muestra en una proporción 1:1 para llevar a cabo la retrotranscripción.

Por un lado, se prepara la mezcla de reacción 2X que contiene todos los componentes a excepción de la muestra. Por otro lado, se preparan 4 μg de ARN de las muestras en un volumen final de 50 μl de agua tratada con DEPC. Esta muestra de ARN se desnaturaliza durante 10 minutos a 65°C, y se enfría en hielo para evitar la re-naturalización. Finalmente, se añaden 50 μl de la mezcla de reacción 2X a cada tubo de reacción, y se lleva al termociclador para efectuar un ciclo de temperatura a 25°C durante 10 minutos, seguido de 2 horas a 37°C, y un calentamiento final a 85°C durante 30 segundos para favorecer la degradación de las hebras de ARN. El ADNc así obtenido fue conservado a –80°C hasta su uso.

Con el fin de comprobar que la concentración de ADNc obtenida tras la reacción de retrotranscripción es la misma en todas las muestras, se llevó a cabo la amplificación de un gen *housekeeper* (GAPDH, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenada) mediante PCR en tiempo real (véase en el apartado 9), comparando los niveles de expresión de este gen en cada una de las muestras. El *housekeeper* es un gen que se expresa constitutivamente en la mayoría de los tipos celulares, y su expresión es constante en todas las muestras.

## 9. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

### 9.1 Fundamento

La PCR a tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR) es una técnica de amplificación de ADN que permite monitorizar de forma cuantitativa en cada ciclo de la reacción el nivel de expresión de un ARNm (o ADNc) mediante el uso de fluoróforos y de un termociclador capaz de detectar la fluorescencia en el transcurso de la reacción. Este fluoróforo puede unirse de forma específica al producto de la amplificación mediante

sondas moleculares dependientes de secuencia o, de forma inespecífica, mediante SYBR-green I, que se une inespecíficamente a todo al ADN bicatenario.

En el desarrollo de este trabajo se utilizó SYBR-green I. Este fluoróforo se caracteriza por emitir poca fluorescencia mientras está en solución (no unido al ADN) o cuando el ADN se encuentra desnaturalizado (monocatenario), así como por incrementar notablemente su tasa de emisión fluorescente al unirse al ADN bicatenario. El complejo resultante ADN-SYBR-green I presenta absorción a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 497 nm y un pico de emisión a 520 nm (correspondiente a la zona verde del espectro). Durante la etapa de elongación, cantidades crecientes de este fluoróforo se intercalan en la doble cadena de ADN que se está sintetizando llevando a un aumento de la fluorescencia. Por ello, si la lectura de la fluorescencia emitida se realiza al final de la etapa de hibridación-elongación en cada ciclo de PCR, el incremento de ADN en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida por SYBR-green I.

El principal inconveniente del uso de este fluoróforo es su inespecificidad, ya que se une a cualquier fragmento de ADN bicatenario: productos inespecíficos, dímeros de cebadores, ... Para minimizar estos problemas se deben emplear condiciones de reacción óptimas y cebadores diseñados para ser lo más específicos posible para la diana que se desea amplificar, evitando además que sean complementarios entre sí. Una forma de comprobar la especificidad de producto amplificado es mediante el cálculo de la temperatura de disociación (*melting temperature*,  $T_m$ ) de los fragmentos amplificados durante la PCR en un proceso denominado *curva de disociación (melting curve)*. Cada fragmento amplificado tiene una  $T_m$  característica, que depende sobre todo de su longitud y del porcentaje en G+C. Este procedimiento nos permite comprobar por un lado la especificidad de la reacción, permitiéndonos conocer si la reacción de amplificación dio lugar a un solo producto o a más de uno, así como comprobar si la  $T_m$  del producto amplificado obtenido coincide con la del deseado.

## 9.2 Material y reactivos

- SYBR® Premix Ex Taq (*Perfect Real Time*, Takara), que contiene TaKaRa Ex Taq™ HS, mezcla de dNTP,  $Mg^{2+}$ , SYBR® Green I y el marcador de referencia ROX™
- Cebadores específicos 10 $\mu$ M (Isogen Life Science) (ver Tabla M10)
- Agua destilada y esterilizada
- Termociclador Step One Plus v 2.0 (Applied Biosystems)

## 9.3 Procedimiento

### 9.3.1 Preparación de la reacción

Los cebadores específicos utilizados en este trabajo son los que se muestran en la Tabla M10.

<i>ADNc diana</i>	<i>Cebadores</i>	<i>Secuencia 5' --&gt; 3'</i>
<i>APP</i>	APP humano-murino Fw	CATCATGGTGTGGTGGAG
	APP humano Rv	GCGATAATGAGTAAATCATAAAAC
	APP murino Rv	GGGTGAGTAAATAAACGGAA
<i>GAPDH</i>	GAPDH murino Fw	CCTCGTCCCGTAGACAAAATG
	GAPDH murino Rv	TGAAGGGGTCGTTGATGGC

**Tabla M10. Cebadores específicos para la amplificación de la diana específica.**

Para preparar las reacciones de PCR seguimos los volúmenes especificados en la Tabla M11.

<b>Componentes de la reacción</b>	<b>Volumen (<math>\mu</math>l)</b>
SYBRPremix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2X)	10
Cebadores específicos (sentido-antisentido) 10 $\mu$ M	0,8 cada uno
ROX Reference Dye (50X)	0,4
ADNc (diluido 1/100)	5
Agua	Hasta 20

**Tabla M11. Relación de los reactivos utilizados para la amplificación por RT-qPCR.** El ADNc empleado para la reacción puede usarse sin diluir, en ese caso usamos 1 $\mu$ l. El volumen utilizado de ADNc está en función de la expresión inicial de la diana que se desea amplificar.

Preparamos las reacciones en placas de 96 pocillos compatibles con el termociclador para RT-qPCR (Step One Plus v 2.0) y realizamos la amplificación siguiendo el programa detallado en la Tabla M12:

<b>Ciclos</b>	<b>Temperatura <math>^{\circ}</math>C</b>	<b>Tiempo</b>
1- Activación Taq-polimerasa	50	2 min
2- Desnaturalización ADNc	95	10 min
3- Desnaturalización ADNc	95	15 s
4- Alineamiento cebadores y elongación	60	60 s

\* Repetir pasos 3 y 4 hasta 35 ciclos

**Tabla M12. Ciclos de temperatura y tiempos de la reacción de RT-qPCR para para la amplificación de APP y GAPDH.**

### 9.3.2 Puesta a punto y cuantificación

Para poder cuantificar mediante PCR a tiempo real las cantidades iniciales presentes de un gen diana determinado, nos basamos en el concepto de *Cycle threshold* (Ct) o ciclo umbral, que se define como el ciclo de PCR en el que la curva de amplificación de la diana en cuestión se distingue del ruido de fondo o fluorescencia *background*. El valor de Ct obtenido es directamente dependiente de la cantidad inicial de la diana a amplificar presente en la muestra, y coincide con la fase exponencial de amplificación de la misma dentro de la reacción de PCR. El valor umbral o *threshold* se determina automáticamente por el programa utilizado para el análisis (StepOne v2.0, Applied Biosystems) en función de la fluorescencia de fondo existente una vez ha finalizado el experimento, y debe ser el mismo para todas las muestras dentro de un mismo experimento.

Antes de lanzar un experimento con muestras de animales controles y tratados, se comprueba la eficiencia de reacción del proceso de amplificación y la especificidad de los cebadores en una reacción a pequeña escala donde se compara el valor Ct obtenido en función de la concentración inicial de una muestra dada. La representación del Ct obtenido frente al logaritmo de la concentración de la muestra de partida da lugar a una recta cuya pendiente refleja la eficiencia de amplificación de la reacción para una pareja de cebadores concreta. La ecuación que relaciona la pendiente de esta recta con la eficiencia del proceso (estando el valor de E comprendido entre 1 y 2) se define como:

$$\text{Eficiencia (E)} = 10^{(-1/m)}$$

Siendo (m) la pendiente de la recta formada por los valores de Ct vs el logaritmo (log) de la concentración de partida de la muestra. Por lo tanto, para obtener un valor de eficiencia máxima (E= 2; eficiencia 100%) en el Ct, la pendiente de la representación Ct vs logX<sub>0</sub> debe tener el valor: -3,2. En este trabajo, la eficiencia de amplificación de los genes estudiados siempre fue 95-100%. Por otro lado, dentro

de este ensayo de puesta a punto se incluye también una curva de disociación (*melting*) al final del proceso que nos permite evaluar el grado de especificidad de la reacción y la formación de dímeros de cebadores.

Para la cuantificación de los niveles de expresión iniciales de una diana dada hemos utilizado el método de comparación de Ct usando GAPDH como *housekeeper* (gen de referencia) tanto en las muestras problema como en las control (Livak y Schmittgen, 2001). Entonces, si asumimos que la eficiencia de amplificación del proceso es máxima ( $E=2$ ) en el ciclo Ct, la relación entre la expresión inicial del gen de estudio ( $X_0$ ) y el gen de referencia ( $R_0$ ) vienen dada por la expresión:

$$X_0/R_0 = K \cdot 2^{-\Delta Ct}$$

Donde  $X_0/R_0$  es la cantidad inicial normalizada de la diana estudiada, K es un valor constante definido por la relación  $X_{Ct}/R_{Ct}$  ( $X_{Ct}$ : expresión del gen de estudio en el ciclo Ct;  $R_{Ct}$ : expresión del gen de referencia en el ciclo Ct).  $\Delta Ct$  es la diferencia entre los ciclos *threshold* de la diana y la referencia:  $Ct(X) - Ct(R)$ , todo ello en una muestra determinada.

Finalmente, si se normaliza la relación  $X_0/R_0$  en una muestra dada con respecto al valor  $X_0/R_0$  de una referencia interna, por ejemplo, en nuestro caso, el valor promedio de un grupo de muestras control (normalmente un grupo de animales WT tratados con vehículo), podemos llegar a la conclusión de que las unidades de expresión de la diana estudiada normalizada por el *housekeeper* y relativa a una referencia interna es igual a  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001). Durante el desarrollo de los experimentos de PCR a tiempo real, la reacción del housekeeper se hace en paralelo con la diana estudiada, y nos permite analizar los niveles de expresión de la diana concreta en base a este gen de referencia.

## 10. Extracción de proteínas totales

### 10.1 Fundamento

El método empleado se basa en la diferente solubilidad de las distintas biomoléculas (ARN, ADN, proteínas y lípidos) en disolventes orgánicos (fenol y cloroformo). El proceso comienza con la homogenización del tejido y rotura de las células en presencia de tiocianato de guanidina, un agente caotrópico que rompe las membranas y desnaturaliza las proteínas, incluyendo proteasas, ADNasas y ARNasas. Estas últimas son muy resistentes a la mayoría de agentes físicos, incluso a la temperatura de autoclavado, pero se inactivan en presencia de isotiocianato de guanidina 4M. Tras añadir cloroformo y centrifugar la solución, aparecen tres fases. La fase superior es acuosa, donde está presente el ARN, mientras que el ADN y las proteínas se encuentran en la interfase y fase orgánica, respectivamente.

### 10.2 Reactivos

- Tripure® (Roche)
- Cloroformo (Sigma)
- Isopropanol (categoría de biología molecular, Sigma)
- Etanol absoluto (Scharlau)
- Solución de guanidina (Sigma) 0,3 M en etanol al 95% (v/v, Scharlau)
- Solución de dodecilsulfato sódico al 4% (SDS, Scharlau), 8M Urea (Sigma), en 40 mM Tris-HCl (Sigma) pH 7,5

### 10.3 Procedimiento.

Las áreas cerebrales utilizadas para este tipo de extracción han sido los hipocampos. En primer lugar, se extrajo el tejido de los tubos donde se encontraban conservados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , se pesaron en balanza de precisión y se pasaron a un tubo con capacidad para 2 ml esterilizado en autoclave.

El proceso comienza añadiendo 1 ml del reactivo Tripure® por cada 50-100 mg de tejido. A continuación, se procede a la homogenización de la muestra con un homogenizador de cuchillas (Polytron® PT3100) durante 15 segundos. El homogenado se deja incubar 5 minutos a temperatura ambiente para permitir una disociación completa de los complejos núcleo-proteínas, y posteriormente se añaden 0,2 ml de cloroformo por ml inicial de Tripure® añadido. Esta mezcla se agita fuertemente y de nuevo se deja incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación, se centrifuga a 12.000 g a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos, obteniéndose una solución que contiene tres fases: la fase superior acuosa donde está el ARN, la interfase intermedia con el ADN, y la fase inferior que contiene las proteínas. A partir de la interfase y la fase orgánica obtenidas en el proceso de homogenización con el reactivo Tripure®, procedemos a extraer las proteínas totales. Estas proteínas están desnaturalizadas y las utilizaremos exclusivamente para los estudios de *western blot* (WB).

En primer lugar, se lleva a cabo la precipitación del ADN para evitar la contaminación de la muestra de proteínas. Para ello, se añade etanol absoluto (0,3 ml de etanol por cada ml de reactivo Tripure® usado). Se tapa el tubo y se invierte varias veces para mezclarlo. Después se incuba la muestra durante 2-3 minutos a temperatura ambiente para permitir que el ADN precipite. Se centrifuga la muestra a 2.000 g durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , se retira el sobrenadante (donde están las proteínas) y se pasan a un tubo nuevo. A continuación, las proteínas se precipitan con isopropanol (1,5 ml de isopropanol por cada ml de reactivo Tripure®), se agita invirtiendo el tubo varias veces, se incuba 10-15 minutos a temperatura ambiente y se centrifugan 10 minutos a 12.000 g a  $4^{\circ}\text{C}$ . El precipitado de proteínas se lava con 0,3 M guanidina en 95% (v/v) etanol (2 ml de guanidina por cada ml de reactivo Tripure® inicial) se agita en vórtex y se incuba 20 minutos a temperatura ambiente, para después centrifugar a 7.500 g durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Este proceso se repite dos veces más y luego se realiza un último lavado con 2 ml de etanol absoluto, para eliminar los restos de guanidina. Finalmente, se deja secar el precipitado a  $37^{\circ}\text{C}$  hasta que se evapora todo el alcohol.

Para solubilizar las proteínas, el precipitado se resuspende en urea 8M-SDS 4% tamponado con Tris-HCl pH 7,5. Para ello, se añaden 500  $\mu\text{l}$  de este tampón por cada mililitro inicial de Tripure® utilizado y se incuba toda la noche en agitación a temperatura ambiente, tras lo cual se procede a la determinación de la cantidad de proteína mediante el kit *DC protein assay* (BioRad). Las proteínas solubilizadas se congelan en diferentes alícuotas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

## 11. Cuantificación de proteínas

### 11.1 Fundamento

La determinación de la concentración de proteínas se ha realizado mediante el uso de una variante comercial del método de Lowry, denominado *DC™ (detergent compatible) protein assay*, que permite determinar la concentración de proteínas tras su solubilización con detergentes reduciendo el tiempo del ensayo y aumentando la estabilidad de la reacción.

El ensayo de Lowry (LOWRY et al., 1951) es un método colorimétrico que combina la reacción de iones de cobre con los enlaces peptídicos en un medio alcalino con la oxidación de residuos aromáticos de las proteínas. Esta reacción se da en dos pasos: la reacción entre las proteínas y el cobre en medio

alcalino, y la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu por el complejo cuproproteico en medio ácido, que da lugar a un complejo de color azul intenso con absorbancia máxima a 750 nm.

### 11.2 Reactivos

- Kit DC™ (detergent compatible) protein assay (Bio-Rad)
- Albúmina de suero bovina (BSA, Sigma)
- Lector de placas Fluostar Omega (BMG, Labtech)

### 11.3 Procedimiento

El ensayo se llevó a cabo tal como indican las instrucciones del fabricante. En nuestro caso, el ensayo se realiza en una placa de 96 pocillos.

Primero se preparó la curva estándar, con diluciones que van desde 0,2 mg/ml a 1,4 mg/ml, en un volumen final de 10 µl por duplicado. De forma paralela, se prepararon las muestras (diluyéndolas 1/10 en agua) llevándolas a un volumen de 10 µl. A todas las reacciones se les añadió 25 µl del reactivo A (Tartrato de Cu), y 200 µl del reactivo B (Reactivo de Folin) y se agitó bien la placa. Tras 15 minutos de incubación, se leyó la absorbancia a 750 nm con un lector de placas.

## 12. Fraccionamiento celular: obtención de proteínas solubles y preparación de membranas.

### 12.1 Fundamento

Los extractos de proteínas totales obtenidos a partir de centros cerebrales utilizando el reactivo Tripure® Isolation Reagent (Roche) están constituidos por proteínas totalmente desnaturalizadas y finalmente solubilizadas en SDS 4%-UREA 8M. La utilidad de estas proteínas es principalmente la cuantificación de diferentes marcadores mediante WB (véase el apartado 14). Sin embargo, otras aproximaciones bioquímicas empleadas durante el desarrollo de esta Tesis no permiten partir de estos extractos, sino que requieren tejido fresco o preparaciones de membranas lipídicas.

En este caso realizamos un fraccionamiento simple que consiste en separar las proteínas solubles de origen extracelular y citosólicas del contenido de membranas lipídicas por ultra-centrifugación diferencial. La fracción de membranas obtenida tras homogenizar las cortezas de los animales constituyen una muestra de partida óptima a la hora de estudiar proteínas de membrana o la actividad enzimática implicada en la ruta de producción del β-amiloide.

### 12.2 Reactivos

- Tampón isotónico de trabajo: 0,32M sacarosa (Sigma), 1mM EDTA (Sigma), 1mM EGTA (Sigma) en 20 mM Tris-HCl (Sigma) pH 7,4
- Cóctel de inhibidores de proteasas, Complete, EDTA-free (Roche)

### 12.3 Procedimiento

#### 12.3.1 Aislamiento de la fracción de proteínas solubles (S1)

Para la obtención de las fracciones solubles S1 hemos utilizado cortezas cerebrales, ya que al partir de hipocampos la concentración final de proteínas obtenida es demasiado baja. En primer lugar, tomamos una hemisfera del animal de interés y la homogenizamos en Dounce's (Wheaton) en tampón isotónico frío pH 7,4 (40- 50 mg tejido/ml tampón) más un cóctel completo de inhibidores de proteasas, utilizando 50 pases del pistilo con menor diámetro (paso de luz: 0,089-0,14 mm), y 20 pases del que tiene mayor diámetro (paso de luz: 0,025-0,076 mm). Posteriormente, el homogenizado de corteza se centrifuga a 1.500 g, durante 10 minutos a 4°C, para precipitar núcleos y tejido no disgregado mecánicamente. El precipitado lo descartamos y el sobrenadante lo centrifugamos de nuevo a 40.000 g durante 1 hora a 4°C (LE-80 Ultracentrífuga Beckman). El sobrenadante resultante se centrifuga de nuevo a 100.000 g y el sobrenadante de esta ultracentrifugación constituye la fracción de proteínas solubles extracelular/citosólicas (S1). A las fracciones S1 aisladas se les determina la concentración de proteínas (véase el apartado 10 de este capítulo), para posteriormente obtener alícuotas y congelar a -80°C hasta su uso.

#### 12.3.2 Preparación de membranas lipídicas

Tras aislar la fracción S1, se tomó el pellet de membranas precipitado a 40.000 g y se resuspendió en tampón isotónico con cóctel de inhibidores de proteasas (lavado de las membranas cerebrales). En esta fracción se determinó la concentración de proteínas y se separaron alícuotas 150 µg de proteínas en tubos tipo *ependorf* que se centrifugaron de nuevo a 40.000 g durante 1 hora a 4°C. Finalmente se descartó el sobrenadante y los pellets resultantes se congelaron a -80°C hasta su uso.

## 13. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS

### 13.1 Fundamento

La electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE, del inglés *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) es una técnica de separación de proteínas en un campo eléctrico en función de su peso molecular.

Los geles de poliacrilamida se caracterizan por la concentración total de los dos monómeros (acrilamida y bis-acrilamida), y el porcentaje relativo del agente entrecruzador (bis-acrilamida) frente la concentración total, determinando de forma conjunta el poder resolutivo del gel.

Las muestras proteicas deben prepararse para que puedan cargarse en el gel. La adición de SDS a las muestras y su presencia posterior durante toda la separación (composición del gel y tampón de electroforesis) provoca que las proteínas y sus subunidades se mantengan desnaturizadas y les otorga una carga neta negativa para que cada una se desplace en el gel en base a su tamaño (sin interferencias de la carga proteica propia). El SDS tiene la propiedad de unirse a las cadenas polipeptídicas en una proporción masa:masa constante (1,4 g SDS/g de proteína), de modo que en el complejo SDS-proteína la carga de la proteína queda enmascarada por la de las múltiples moléculas de SDS y ésta es proporcional al tamaño ( $n^{\circ}$  de aminoácidos). Por otro lado, la adición de 2-mercaptoetanol reduce los enlaces disulfuro intra e inter-moleculares, evitando modificaciones en el desplazamiento de las proteínas en el gel.

En el desarrollo de este trabajo se realizaron dos tipos de electroforesis, Glicina-SDS-PAGE (también conocida como Laemmli-SDS-PAGE) y Tricina-SDS-PAGE, ambas basadas en el uso de tampones de

electroforesis con glicina y tricina, respectivamente y que son las dos técnicas electroforéticas más comunes para separar proteínas. Tricina-SDS-PAGE es la técnica de elección para la resolución de proteínas de bajo peso molecular, por debajo de 30 KDa. Así pues, el uso selectivo de una de estas dos técnicas electroforéticas durante la realización del WB hace posible detectar proteínas comprendidas entre 1-300 KDa (Schägger, 2006).

### 13.2 Materiales

- Tampón de Laemmli 10X: 20% SDS (Scharlau), 1% 2-mercaptoetanol (Scharlau), 70% glicerol (Scharlau), 1% azul de bromofenol (Scharlau) en 625 mM Tris-HCl (Sigma) pH 6,8
- Cristales y moldes para mini-geles, sistema Mini-Protean III (Bio-Rad)
- Sistema de electroforesis "Mini-Protean Tetra cell" (Bio-Rad)

#### Glicina-SDS-PAGE:

- Acrilamida-bis acrilamida (AA-bisAA; 37,5:1) 30% p/v (Sigma)
- Tampón para gel de corrido 3M Tris-HCl (Sigma) pH 8,8
- Tampón para gel de empaque 1M Tris-HCl (Sigma) pH 6,8
- Tetrametiletilendiamina (TEMED, Sigma)
- Persulfato amónico (PSA) al 10% (p/v) (Sigma)
- Tampón de electroforesis de glicina: 190 mM glicina (Sigma), 0,1% (p/v) SDS (Scharlau) en 25 mM Tris-HCl (Sigma); pH 8,6

#### Tricina-SDS-PAGE:

- Acrilamida-bis acrilamida (48% (p/v) AA, Sigma- 1,5% (p/v) bisAA, Sigma)
- Tampón para gel de corrido y empaque 2,5M Tris-HCl (Sigma) pH 8,45
- Tetrametiletilendiamina (TEMED, Sigma)
- Persulfato amónico (PSA) al 50% (p/v) en agua (Sigma)
- Tampón de electroforesis de tricina: 0,1% (p/v) SDS (Scharlau) en 100 mM tricina (Sigma); pH 8,45

### 13.3 Procedimiento

Para preparar geles de poliacrilamida a diferentes concentraciones combinamos los reactivos según la Tabla M13. Una vez combinados todos los reactivos, vertemos la mezcla entre los cristales molde (Bio-Rad) compatibles con el sistema de electroforesis Mini-Protean III (Bio-Rad). Cuando polimeriza el gel de corrido, preparamos el gel de empaque, vertemos el contenido sobre el gel de corrido e introducimos los peines molde suministrados por Bio-Rad. Según los peines utilizados podemos obtener geles con capacidad para 8-15 muestras.

<b>Glicina-SDS-PAGE</b>					
<b>Gel de corrido ("Running gel")</b>			<b>Gel de empaque ("Stacking gel")</b>		
% AA final	7,5%	9,5%	14%	% AA final	4%
H <sub>2</sub> O (ml)	8	7	4,7	H <sub>2</sub> O (ml)	4
AA-bisAA 30 % (ml)	4	5	7,3	AA-bisAA 30 % (ml)	0,8
Tris-base 3M, pH 8,8 (ml)		3,75		Tris-HCl 1M, pH 6,8 (ml)	1
10% SDS (μl)		150		10% SDS (μl)	60
Temed (μl)		20		Temed (μl)	10
PSA 10%(μl)		100		PSA 10% (μl)	100

<b>Tricina-SDS PAGE</b>					
<b>Gel de corrido ("Running gel")</b>			<b>Gel de empaque ("Stacking gel")</b>		
% AA final	16%		% AA final	4%	
H <sub>2</sub> O (ml)	3,04		H <sub>2</sub> O (μl)	3.288	
AA-bisAA (ml)	3,23		AA-bisAA (μl)	404	
Tris-HCl 2,5M, pH 8,45 (μl)	3,6		Tris-HCl 2,5M, pH 8,45 (μl)	1.240	
10% SDS (μl)	94		10% SDS (μl)	60	
Temed (μl)	20		Temed (μl)	10	
PSA 50% (μl)	20		PSA 50%(μl)	15	

**Tabla M13. Relación de reactivos y volúmenes utilizados para la preparación de geles de electroforesis.** *Los geles para electroforesis glicina-SDS-PAGE y tricina-SDS PAGE utilizados en estos experimentos constan de dos fases, un gel de corrido y un gel de empaque (reactivos para la preparación de 2 geles cada una).*

Una vez preparados, los geles se cargan en los soportes y se rellena la cubeta con el correspondiente tampón de electroforesis (glicina o tricina) asegurando el contacto de los geles con el tampón.

Tras su obtención, las muestras de proteínas deben prepararse para que puedan cargarse en el gel. Para ello añadimos el tampón de Laemmli 10X. Esta muestra se carga en los pocillos del gel de empaque, y se procede a realizar la electroforesis. De forma general, las electroforesis de glicina se someten a un amperaje constante, de 20 mA por gel durante 60-120 minutos (varía en función de la concentración del gel de corrido y de la proteína de interés). En cambio, en la electroforesis en tampón de tricina, las muestras se someten a un voltaje constante de 100 V, durante 120 minutos.

## 14. Western Blot

### 14.1 Fundamento

El WB o inmunoblot es una técnica que permite la detección de proteínas específicas a partir de una muestra compleja. Aunque existen muchas variantes de la técnica, la más común se basa en una sucesión de pasos que consisten en la separación de proteínas en función de su peso molecular mediante una electroforesis SDS-PAGE (véase el apartado 13), transferencia de las proteínas a un soporte de trabajo más estable (electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa) y detección de la proteína de interés por medio de anticuerpos, basándose en el reconocimiento específico antígeno-anticuerpo. Posteriormente,

se utiliza un anticuerpo secundario (anclado a peroxidasa o una molécula fluorescente) que reconoce la fracción constante de la inmunoglobulina correspondiente al anticuerpo primario y que nos permite por un lado detectar el anticuerpo primario y, por otro, amplificar la señal (fluorescencia o quimioluminiscencia). La señal detectada de este modo es proporcional a la cantidad de proteína específica en la muestra de partida (Towbin et al., 1979).

### 14.2 Materiales y reactivos

- Sistema de transferencia tipo sándwich, sistema Mini-Protean III (Bio-Rad)
- Tampón de transferencia: 20% (v/v) metanol (Scharlau), 190 mM glicina (Sigma) en 25 mM Tris-Base (Sigma)
- Membranas de nitrocelulosa, diámetro de poro 0,45 micras (Hybond-C extra; Amersham)
- Tampón Tris-Salino (TBS): 50 mM tris-base (Sigma), 150 mM NaCl (Sigma); pH 7,6
- Solución Rojo Ponceau's (Sigma) al 0,1% en ácido acético al 5% (v/v) en agua
- Solución al 0,1% (v/v) de Tween-20 (Sigma) en TBS (T-TBS)
- Solución de bloqueo: 5% (p/v) leche desnatada en polvo, (Bio-Rad), en T-TBS o 5% (p/v) BSA (Sigma) en T-TBS
- Anticuerpo 1º específico (véase la Tabla M15)
- Anticuerpo 2º anti-conejo o anti-ratón (IRDye 800, Li-COR)
- Escáner de fluorescencia Odyssey (Li-Cor)

### 14.3 Procedimiento

Una vez completada la electroforesis (véase el apartado 13) se inicia la electrotransferencia, que consiste en el paso de las proteínas presentes y separadas en el gel a una membrana de nitrocelulosa. Esta membrana tiene una alta capacidad de unión a proteínas, que asegura que las proteínas queden retenidas a ella durante el proceso de transferencia.

Para llevar a cabo este proceso usamos un sistema de sándwich (Bio-Rad) en el que la membrana está estrechamente en contacto con el gel, ambos flanqueados por papel de filtro y esponjas de soporte embebidos en tampón de transferencia, todo sujeto por un casete de plástico que mantiene estrechamente unido el conjunto. La transferencia tiene lugar en una cubeta llena de tampón de transferencia, a corriente constante (350 mA) durante 90 minutos.

Terminada la transferencia, habitualmente observamos las proteínas transferidas en la membrana mediante tinción con rojo Ponceau's (tinción reversible que nos permite comprobar que la transferencia se ha llevado a cabo de forma correcta).

Posteriormente, lavamos la membrana con TBS, y la bloqueamos con leche al 5% en T-TBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Concluido el bloqueo lavamos la membrana en T-TBS, y la incubamos con el anticuerpo primario (en 2,5% leche desnatada en T-TBS) durante toda la noche a 4°C. La relación de los anticuerpos primarios empleados y sus características más relevantes se detallan en la Tabla M14.

<i>Proteína diana</i>	<i>Anticuerpo</i>	<i>Especificidad</i>	<i>Especie huésped</i>	<i>Dilución de trabajo</i>	<i>Peso molecular (KDa)</i>	<i>Casa comercial</i>
<b>A<math>\beta</math></b>	Abeta (clone 82E1)	H-R	Ratón monoclonal	1:5.000	4	IBL
<b>AICD</b>	APPc-term (751-770)	H-R	Conejo policlonal	1:6.000	6	Calbiochem
<b>APP</b>	APPc-term (751-770)	H-R	Conejo policlonal	1:6.000	95-100	Calbiochem
<b>sAPP<math>\alpha</math></b>	sAPP $\alpha$ (clone 2B3)	H-R	Ratón monoclonal	2 $\mu$ g/ml	90	IBL
<b>BACE-1</b>	BACE (z-183)	H-R	Ratón monoclonal	1:500	70	Santa Cruz
<b>C99-C83</b>	APPc-term (751-770)	H-R	Conejo policlonal	1:6.000	12-14	Calbiochem
<b>Presenilina 1</b>	Presenilin 1-Loop	H-R	Ratón monoclonal	1:1000	20	Millipore
<b>Sinaptofisina</b>	Sinaptofisina	H-R	Conejo policlonal	1:20.000	39	Thermo Scientific
<b>Snap-25</b>	Snap 25	H-R	Conejo policlonal	1:1.000	25	Thermo Scientific
<b>Tubulina</b>	$\alpha$ -tubulina	H-R	Ratón monoclonal	1:10.000	50	Sigma-Aldrich

*\*H: humano, R: ratón, Mc: monoclonal, Pc: policlonal*

**Tabla M14. Anticuerpos utilizados en el WB.**

Terminada la incubación con el anticuerpo primario, lavamos la membrana 3 veces con T-TBS (5 minutos por lavado), y a continuación incubamos con el anticuerpo secundario que está acoplado a un fluoróforo que emite en radiación infrarroja (Licor). Todos los anticuerpos secundarios se incuban 1-2 horas a temperatura ambiente en T-TBS, diluidos 1:10.000. Posteriormente la membrana se lava 3 veces con T-TBS durante 5 minutos, y finalmente con TBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras el último lavado, escaneamos la membrana en un escáner de fluorescencia tipo Odyssey, que nos permite detectar la señal específica del anticuerpo secundario. Finalmente, la densidad óptica de las bandas se determinará utilizando el programa informático Image J (1.47 v, National Institutes of Health, USA).

## 15. Tinción con azul coomassie para geles de poliacrilamida:

### 15.1 Fundamento

La tinción con azul de coomassie es un método de tinción de proteínas comúnmente utilizado para teñir geles de acrilamida (Meyer y Lamberts, 1965). Los colorantes de coomassie (R-250 y G-250) se unen a las proteínas a través de interacciones iónicas entre los grupos de ácido sulfónico del colorante y los grupos amino de las proteínas a través de atracciones de Van der Waals. El coomassie R-250 es el más común de los dos, pudiendo detectar hasta 0,1  $\mu$ g de proteína.

### 15.2 Materiales y reactivos

- Solución de tinción (Azul de coomassie): 0,25% (p/v) azul brillante coomassie R-250 (Sigma), 45% (v/v) metanol (Scharlau), 10% (v/v) ácido acético glacial (Scharlau)
- Solución de lavado: 20% (v/v) metanol (Scharlau), 15% (v/v) ácido acético glacial (Scharlau)

### 15.3 Procedimiento

Una vez finalizada la electroforesis SDS-PAGE (véase el apartado 13 de este capítulo), procedimos a teñir el gel con azul de coomassie. Para ello, retiramos el gel del casete y lo colocamos en un recipiente hermético de plástico, añadimos 50 ml de la solución de tinción e incubamos a 22 °C, 12 h, en agitación continua.

Posteriormente desteñimos el gel para visualizar las bandas de proteínas. Para ello, incubamos el gel en 50 ml de solución de desteñir durante una hora; repetimos el procedimiento dos o tres veces más hasta que aparezcan las bandas teñidas de azul y el fondo transparente.

## 16. Ensayo de actividad beta-secretasa

### 16.1 Fundamento

Para realizar este ensayo se solubilizan las membranas lipídicas en el tampón de extracción de elección con la finalidad de extraer BACE-1. El solubilizado obtenido se emplea para realizar el ensayo de actividad, que se basa en la adición de un péptido específico correspondiente a la secuencia de APP donde se produce el corte de la  $\beta$ -secretasa. Este péptido va acoplado a dos fluoróforos: EDANS y DABCYL. En la forma no procesada, la emisión de EDANS está apantallada por la proximidad física de DABCYL, que tiene un pico de absorción a 495nm, coincidiendo con la longitud de onda de emisión de EDANS. El procesamiento del péptido por BACE-1 origina la separación de ambas moléculas, por lo que la emisión de EDANS deja de estar apantallada y es registrada por el lector de fluorescencia. El nivel de fluorescencia detectada a 495nm es proporcional a la actividad proteolítica sobre el péptido en cuestión, y por tanto a la actividad  $\beta$ -secretasa en la muestra analizada.

### 16.2 Reactivos

- Kit para determinación de actividad  $\beta$ -secretasa (Calbiochem)
- Solución 1% (p/v) CHAPS (AppliChem), 1mM EDTA (Sigma), 1mM EGTA (Sigma) en TBS
- Solución 1% (p/v) CHAPS (AppliChem), 0,5% (v/v) SDS (Scharlau), 1mM EDTA (Sigma), 1mM EGTA (Sigma) en TBS
- Solución 1% (p/v) CHAPS (AppliChem), 1% (v/v) DOC (Sigma), 1mM EDTA (Sigma), 1mM EGTA (Sigma) en TBS
- Solución 1% (p/v) CHAPS (AppliChem), 1% (v/v) DOC (Sigma), 2% (v/v) SDS (Scharlau), 1mM EDTA (Sigma), 1mM EGTA (Sigma) en TBS
- *Coctel* de inhibidores de proteasas, Complete, EDTA-free (Roche)
- Inhibidor IV de la  $\beta$ -secretasa (Calbiochem)

### 16.3 Procedimiento

Partimos de preparaciones de membranas de 150  $\mu$ g de proteínas de animales WT y 5XFAD de 7 y 12 meses, tratados con vehículo, LP226 o DHA. Solubilizamos las preparaciones a una concentración de 1 mg/ml de proteínas en el tampón de extracción del kit (Calbiochem) o uno de preparación propia (CHAPS al 1%). La solubilización se llevó a cabo durante 30 minutos en hielo, en presencia de inhibidores de proteasas. A continuación, se centrifugó el solubilizado a 10.000 g y se recuperó el sobrenadante (con las proteínas solubilizadas) con el que se realizó la reacción.

Se tomaron 10  $\mu$ l de cada muestra y se pasaron por duplicado a una placa de 96 pocillos, que se completaron hasta 50  $\mu$ l con tampón de extracción. A continuación, se añadieron 50  $\mu$ l de tampón de reacción 2x. De forma paralela, se preparó un control positivo (sustituimos la muestra por 2  $\mu$ l del enzima purificado, que proporciona el kit), un control inhibido (inhibidor IV de  $\beta$ -secretasa) y dos controles negativos (uno sin muestra y otro sin sustrato). Finalmente se añadieron 2  $\mu$ l del sustrato a todas las reacciones (excepto al control negativo correspondiente) y se incubaron a 37°C durante dos horas, tiempo durante el cual se tomaron las medidas de fluorescencia (con una breve agitación antes de cada lectura). La lectura de fluorescencia se realizó a 510 $\pm$ 10 nm (495-510 nm) cada 5 minutos durante la primera hora y cada 10 minutos durante la segunda, siendo la longitud de onda de excitación 340 $\pm$ 10 nm. El incremento en las pendientes que relacionan la fluorescencia (F) frente al tiempo de incubación ( $\Delta F/\text{min}$ ) refleja la actividad  $\beta$ -secretasa por unidad de tiempo.

La composición del tampón de extracción suministrado con el kit impide cuantificar las muestras por medio de una reacción de Lowry. No obstante, para confirmar que todas las muestras tienen la misma concentración de proteínas, tras la realización del experimento, se realizó una electroforesis y tinción con azul de coomassie (véanse las secciones 12 y 14). Para ello se cargaron 20  $\mu$ l de muestras de cada una de las condiciones testadas en un gel de acrilamida al 9,5%. El gel así teñido se escaneó y la densidad óptica de las proteínas teñidas se cuantificó mediante el programa informático Image J (1.47 v, National Institutes of Health, USA).

### **16.4 Puesta a punto del ensayo de actividad $\beta$ -secretasa**

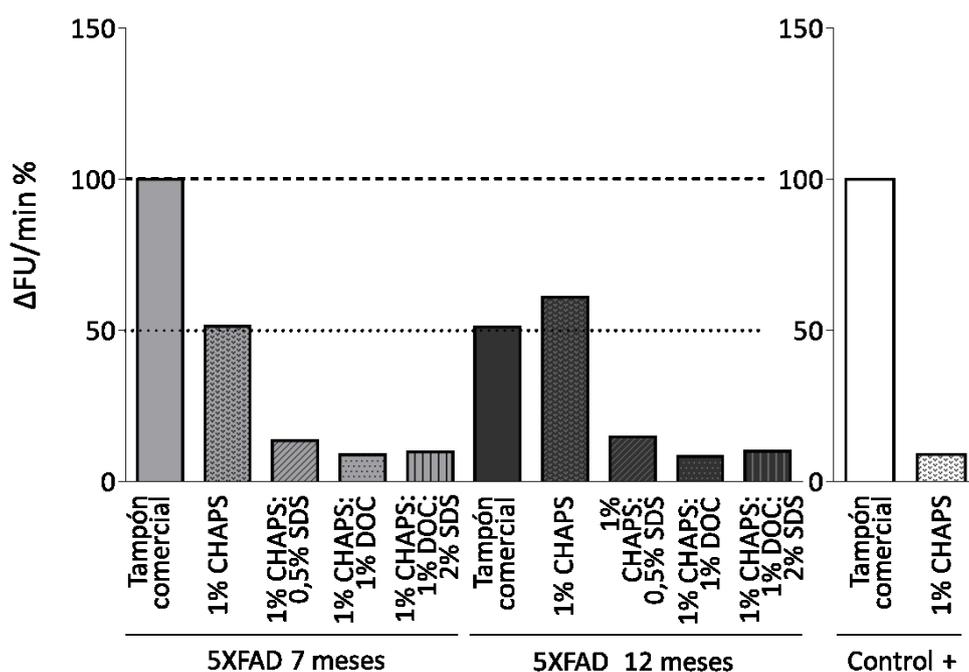
Los resultados que se presentan en la Figura M4 demuestran que la muestra obtenida con el tampón de extracción de Calbiochem presenta una concentración de proteína mucho menor (en torno a 10 veces menos) que el total presente en la muestra de partida (véase la Figura M4 A comparando la condición SDS al 2% respecto al tampón comercial). En consecuencia, los niveles de BACE-1 en estas muestras son muy bajos en comparación con lo inicialmente presente (véase la Figura M4 B comparando la condición SDS al 2% respecto al tampón comercial). Si tenemos en cuenta que el nivel de actividad  $\beta$ -secretasa detectado depende directamente del nivel de BACE-1 presente en la muestra y este, a su vez, depende directamente de la capacidad de solubilización del tampón utilizado, el uso del tampón comercial (Calbiochem) puede llevarnos a subestimar la actividad enzimática realmente presente en las muestras. De hecho, este efecto se magnifica en las muestras cerebrales de animales viejos 5XFAD, como consecuencia del progreso de la patología neurítica (Sanchez-Varo et al., 2012), ya que la solubilización de BACE-1 y otras proteínas de membrana incluidas en neuritis distróficas puede verse comprometida a medida que el animal envejece.

Con la finalidad de obtener una muestra más representativa para evaluar la actividad enzimática de BACE-1, se probaron diferentes combinaciones de otros detergentes que pudiesen ayudarnos a conseguir una mayor solubilización de BACE-1 antes del ensayo de actividad enzimática, especialmente en las muestras de animales 5XFAD viejos (Figura M4). En este sentido, se comprobaron los niveles de proteína solubilizada con diferentes tampones de extracción, además del suministrado por Calbiochem, en preparaciones de membranas de los animales 5XFAD de 7 y 12 meses (Figura M4 A). Se incluyó una muestra solubilizada en SDS al 2% a modo de control de solubilización total. Por otro lado, estas muestras también se analizaron mediante WB para comprobar la cantidad de enzima BACE-1 que se pudo solubilizar en cada una de las condiciones testadas (Figura M4 B). Como era de esperar, las combinaciones de detergentes que tienen una mayor capacidad de solubilización también mostraron mayores niveles de proteína total y de BACE-1 en comparación con la muestra extraída con el tampón comercial (Calbiochem). Por otro lado, los detergentes con mayor capacidad de solubilización también tienen, por lo general, mayor poder desnaturizante, lo que lleva a una pérdida de la actividad enzimática.



En la segunda parte de esta puesta a punto pasamos a evaluar el grado de actividad enzimática presente en cada muestra después de solubilizarla bajo las diferentes condiciones empleadas (véase la Figura M4). En este trabajo se han empleado las condiciones recomendadas por el fabricante y, además, se ha estudiado el mejor tampón de extracción posible que permitiese la mayor solubilización de proteínas con la menor pérdida de actividad posible.

Al analizar el ensayo de actividad  $\beta$ -secretasa (Figura M5) nos fijamos en primer lugar en las muestras de 7 meses. En estas muestras, el mayor valor de actividad  $\beta$ -secretasa se obtuvo con el tampón de extracción comercial. Por lo que respecta a las diferentes mezclas de detergentes, en todos ellos se aprecia una reducción importante en los valores de actividad enzimática, siendo aproximadamente del 50% en el caso de CHAPS al 1%, y cercana al 90% en el resto de condiciones. No obstante, si observamos en la carga proteica de estas muestras (Figura M4 A), vemos que la muestra obtenida con el tampón de extracción comercial presenta una carga proteica mucho menor que el resto, tanto de proteína total como de BACE-1, con una disminución del 80% respecto a una muestra solubilizada en SDS al 2% (control positivo) o CHAPS al 1% (Figura M4). Por otro lado, a pesar del importante aumento conseguido en los niveles de BACE-1 solubilizado al usar las diferentes combinaciones de detergentes, se observó una importante reducción en la actividad enzimática, lo que nos indica que el grado de desnaturalización enzimática que tenemos en estas condiciones debe ser muy alta.



**Figura M5. Ensayo  $\beta$ -secretasa de muestras 5XFAD de 7 y 12 meses solubilizadas con diferentes tampones de extracción.** Todas las muestras de proteína se obtuvieron mediante solubilización de un pellet de membranas de 150  $\mu$ g de proteína cerebrales de animales 5XFAD (7 y 12 meses) en los diferentes tampones utilizados: tampón comercial (Calbiochem), 1% CHAPS, 1% CHAPS: 0,5% SDS, 1% CHAPS: 1% DOC y 1% CHAPS: 1% DOC: 2% SDS. En el ensayo se utilizaron 35  $\mu$ g de proteína por reacción. Se observan grandes variaciones en los niveles de actividad en función del tampón de extracción utilizado y de las muestras, siendo el tampón comercial y el CHAPS al 1% los que dieron mejores resultados. El resto de condiciones testadas dieron valores muy bajos de fluorescencia. El control + (enzima BACE-1 purificado) mostro los valores de actividad más elevados en el tampón comercial, con una reducción del 90% en CHAPS al 1%.

Si analizamos las muestras 5XFAD de 12 meses (Figura M5), en primer lugar, llama la atención la importante reducción en la fluorescencia en 12 meses respecto a 7 meses en las muestras solubilizados con el tampón de extracción comercial. Teniendo en cuenta que durante el envejecimiento de estos animales se produce un incremento en los niveles de BACE-1 (véase el apartado 4.2.1 del capítulo de Resultados), esta reducción es debida a que la extracción de BACE-1 es peor en membranas de animales viejos que jóvenes (véase la Figura M5 B y C). De hecho, la muestra solubilizada con el tampón de extracción se reduce en un 80% respecto a una muestra solubilizada en SDS al 2% en animales jóvenes, y en cerca de un 95% en animales viejos. A continuación, si nos fijamos en las muestras solubilizadas con las diferentes combinaciones de detergentes, vemos la misma reducción en los niveles de fluorescencia que veíamos en las muestras de 7 meses, excepto en la muestra solubilizada con CHAPS al 1%. En este caso, los valores de fluorescencia son muy similares a los obtenidos con el tampón comercial, pese a que, en las muestras de 7 meses observábamos una pérdida de actividad del 50%. Todo ello indica que, en la muestra de 12 meses, el incremento en la solubilización de BACE-1 con CHAPS al 1% es mayor que en 7 meses y compensa el grado de desnaturalización de  $\beta$ -secretasa en animales de 12 meses con mayor fiabilidad que empleando el tampón comercial.

Por todo ello, los tampones de elección para la realización del ensayo han sido el tampón comercial, y CHAPS al 1%; aunque debemos asumir que probablemente con ambos tampones estaremos subestimando la actividad enzimática en los animales 5XFAD, y probablemente de manera más acusada en los de 12 meses.

## **17. Ensayo de actividad $\gamma$ -secretasa**

### **17.1 Fundamento**

El principio metodológico de este ensayo se basa en el uso de los niveles endógenos de los fragmentos C-terminales de APP (sobrexpresada en los animales transgénicos) como sustrato del complejo  $\gamma$ -secretasa para analizar la actividad enzimática de dicho complejo. La actividad del complejo sobre el fragmento C99 da lugar al péptido A $\beta$  y al fragmento AICD (dominio intracelular de APP) que queda como una proteína soluble en el citosol, tomando la producción de AICD como medida de la actividad  $\gamma$ -secretasa.

Durante el desarrollo de este ensayo, se incubaron las membranas a 37°C durante el tiempo óptimo determinado en un tampón citrato ligeramente ácido para promover el procesamiento de C99/C83. La validez de este ensayo requiere conocer los niveles endógenos de AICD presentes en la muestra de partida. Para ello se incluyeron varios controles negativos que permiten determinar los niveles endógenos de AICD presentes en la muestra de partida. Estos controles fueron: 1º: reacción a tiempo cero; 2º: reacción en hielo; 3º: reacción a 37 °C en presencia de un inhibidor específico de la  $\gamma$ -secretasa.

### **17.2 Reactivos**

- Tampón hipotónico de trabajo: 1 mM EGTA (Sigma), 1 mM EDTA (Sigma) en 10 mM Tris-HCl pH7,6
- Tampón citrato: 150 mM citrato sódico (Sigma), pH 6,4 ajustado con ácido cítrico (Sigma)
- Inhibidor X de la  $\gamma$ -secretasa (L-685,458) 1 mM en DMSO (Calbiochem)
- Inhibidor DAPT de la  $\gamma$ -secretasa 1 mM en DMSO (Santa Cruz)
- Inhibidores de proteasas (Roche, no incluye aspartil proteasa)

### 17.3 Procedimiento

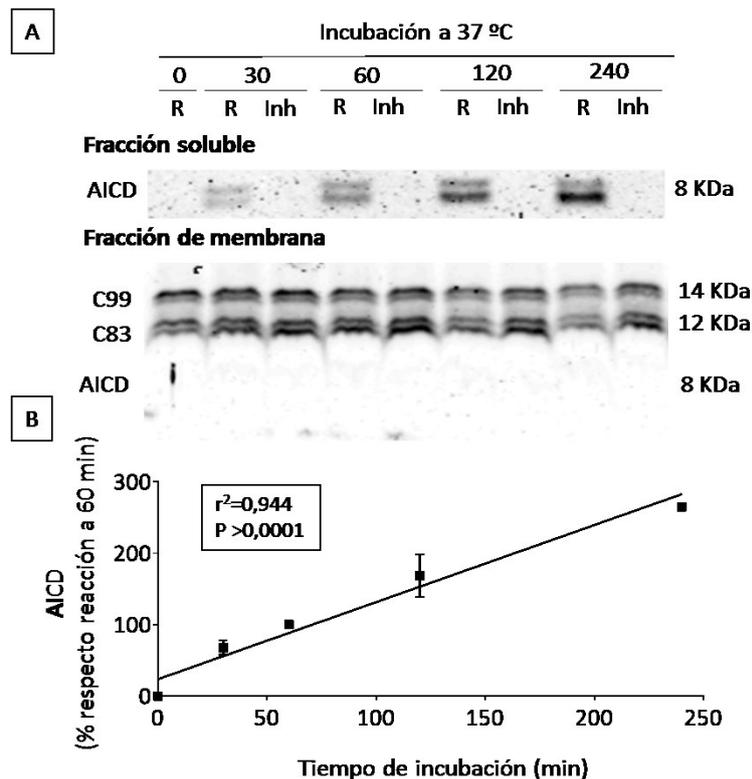
Para realizar el ensayo de actividad enzimática se parte de 150 µg de proteína de membrana obtenida previamente (véase el apartado 12). Cada muestra de membrana se resuspendió en 60 µl de tampón citrato y se incubó a 37°C en presencia de inhibidores de proteasas (el tiempo de incubación varía en función del producto a analizar). Al control negativo correspondiente se le añadió el inhibidor específico de la  $\gamma$ -secretasa a una concentración final 100 µM (5 µl de un stock a 1 mM en DMSO/reacción).

Terminada la incubación a 37°C, las muestras se centrifugaron a 40.000 g durante 1 hora a 4°C. Se tomaron 10 µl del sobrenadante y se analizó por WB (véanse las secciones 13 y 14) la producción específica del fragmento AICD por parte del complejo  $\gamma$ -secretasa. Para visualizar AICD, la muestra fue sometida a una electroforesis en gel de acrilamida al 16% (p/v) en tampón tris-tricina. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y fueron incubadas con el anticuerpo contra APP-CTFs (Tabla M14), que también reconoce AICD que aparece como una banda de ~8 KDa.

### 17.4 Puesta punto del ensayo de actividad enzimática $\gamma$ -secretasa para la detección de AICD

La utilización de este método para el estudio de la actividad enzimática del complejo  $\gamma$ -secretasa sobre la producción de AICD ya había sido puesta a punto anteriormente (Torres et al., 2012), estimando como condiciones óptimas la incubación de una muestra de 150 µg de proteína de membrana durante 2h a 37°C. Sin embargo, debido a que nuestro modelo presenta niveles muy elevados de APP-CTFs y A $\beta$  decidimos comprobar estas condiciones en nuestras muestras. Para ello, se preparó una curva de producción de AICD en función del tiempo. Partimos de una muestra de 150 µg de proteína de membrana que incubamos a 37°C a diferentes tiempos: 30, 60, 120 y 240 minutos. Además, se incluyeron varios controles negativos: los niveles de AICD a tiempo cero (antes de que exista reacción), la producción durante 30, 60, 120 y 240 minutos a 37°C en presencia de 100 µM del Inhibidor X de la  $\gamma$ -secretasa y la producción durante 240 minutos de incubación en hielo (no se muestra). A continuación, se centrifugó la reacción y se analizó el pellet de membranas y el sobrenadante por WB. AICD sólo se observa en el sobrenadante (fracción soluble), mientras que los fragmentos C-terminales, precursores de la reacción, únicamente se encuentran en el precipitado (fracción de membrana).

En la curva de tiempo, observamos como la producción de AICD aumentó con el tiempo sin alcanzar la saturación. A tiempo 0 no detectamos señal específica, como tampoco en las muestras con 100 µM del inhibidor X de la  $\gamma$ -secretasa o la muestra incubada en hielo (Figura M6). Ya que la puesta a punto anterior está acorde con nuestros resultados, tomamos 120 minutos como condiciones óptimas para la detección de AICD.



**Figura M6. Comprobación de las condiciones óptimas para la detección de AICD en el ensayo de actividad enzimática  $\gamma$ -secretasa.** (A) Imagen representativa del WB para AICD y APP-CTFs en la fracción soluble y de membrana de las muestras utilizadas en el ensayo de actividad  $\gamma$ -secretasa (B) Regresión lineal de la producción de AICD a lo largo del tiempo en el ensayo de actividad  $\gamma$ -secretasa. La producción de AICD aumenta de forma lineal al aumentar el tiempo de incubación. Se usaron 150  $\mu$ g de proteínas incubadas a 37°C durante 0, 30, 60, 120 y 240 minutos. Siendo "R" la reacción a 37°C y "Inh" la reacción a 37°C con 100  $\mu$ M del inhibidor X de la  $\gamma$ -secretasa.

## 18. Inmunohistoquímica

### 18.1 Fundamento

La inmunohistoquímica (IHC) es una herramienta de investigación basada en la interacción antígeno-anticuerpo, que se utiliza para localizar antígenos específicos con anticuerpos marcados en las secciones de tejido. En general esta técnica sigue el mismo fundamento que el WB, pero en este caso podemos identificar la localización tisular o citológica específica de los antígenos de interés. Si bien existen múltiples enfoques y cambios en la metodología de IHC, todos los pasos necesarios se pueden agrupar en dos:

La *preparación de la muestra*, que incluye la recolección del tejido y la perfusión, la fijación, el seccionamiento y el bloqueo. Este conjunto de pasos permite mantener el tejido en condiciones óptimas para la detección de la diana específica.

El *marcaje específico*, que permite la detección del antígeno deseado. El método de marcaje más usado es la inmunodetección indirecta en el que se hace uso de dos anticuerpos, uno primario que reconoce el antígeno específico y un secundario que reconoce al anticuerpo primario. Este método permite la amplificación de la señal mediante la unión de varias moléculas del anticuerpo secundario a un solo anticuerpo primario. Finalmente, los productos reactivos inmunes son visualizados mediante un marcaje que puede ser fluorescente o cromogénico. En el primer caso, el anticuerpo se conjuga con un fluoróforo que es detectado por microscopía de fluorescencia. La detección cromogénica se basa en la

actividad enzimática, utilizando generalmente la peroxidasa de rábano o la fosfatasa alcalina, que forman precipitados insolubles y coloreados tras la adición de un sustrato.

- IHC con doble marcaje
- Se trata de una variación interesante de la técnica que nos permite la detección simultánea de dos antígenos diferentes en un mismo corte de tejido. Para diferenciar las distintas reactividades, cada uno de los marcajes debe tener como resultado final una señal diferente; un procedimiento sencillo es emplear el mismo sistema enzimático para ambos antígenos y revelar con un cromógeno distinto en cada caso. En este trabajo hemos empleado el sistema de detección basado en el marcaje con peroxidasa y el revelado consecutivo con el sustrato comercial Vector-SG (color negro-azulado) y con DAB (color marrón).

### 18.2 Reactivos

- PB 0,1M, pH 7,4
- Tampón fosfato-salino (PBS): 10 mM fosfato de sodio (sigma), 0,9% (p/v) cloruro sódico (Sigma)
- Solución de almacenaje\*: 15% (p/v) sacarosa (Sigma), 15% (v/v) etilenglicol (Scharlau) en PB 0,1M, pH 7,4
- Solución crioprotectora: 25% (p/v) sacarosa (Sigma) y 3,5% (v/v) glicerol (Sigma) en PB 0,05 M, pH 7,4\* o 30% (p/v) sacarosa (Sigma) en PBS#
- Solución 0,02% azida sódica (Sigma) en PBS#
- Solución de peróxido de hidrogeno al 3% (v/v) y metanol al 30% (v/v) en PB 0,1M
- Solución de borohidruro de sodio 1% (p/v, Sigma) en PB 0,1M\*
- Kit de bloqueo para avidina y biotina (Vector Laboratories) #
- Tampón Tris-Salino (TBS): 50 mM tris-base (Sigma), 150 mM NaCl (Sigma); pH 7,6
- Solución de BSA (Sigma) al 1% (p/v) en TBS 0,1M + 0,25% (v/v) Triton X-100 (Sigma).
- Anticuerpo primario específico (véase la Tabla M 16)
- Anticuerpo secundario biotinizado de caballo anti-IgG de ratón (Vector Laboratories Ltd.)
- Anticuerpo secundario biotinizado de cabra anti-IgG de conejo (Jackson ImmunoResearch, Stratech Scientific Ltd.)
- VECTASTAIN Elite ABC Kit (Vector Laboratories Ltd.) \*
- ExtrAvidin®\_Peroxidase (Sigma)#
- VECTOR SG Peroxidase Substrate Kit (Vector Laboratories Ltd.) \*
- 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorida (DAB) al 0,022% (p/v) en PBS
- Medio de montaje Entellan (Scharlau)
- Etanol absoluto (Scharlau) al 50 %, 70 %, 96 % y 100 % (v/v).
- Xileno (Scharlau)
- \*Reactivos empleados exclusivamente en el procesamiento de pHH3; # reactivos empleados exclusivamente en el procesamiento de NeuN

### 18.3 Procesamiento del tejido

La técnica IHC se llevó a cabo en colaboración con dos grupos de investigación diferentes, por tanto, existen algunas variaciones en el desarrollo experimental que se detallan durante la descripción del protocolo. En ambos casos, el hemisferio fijado se mantuvo una semana en la solución de PFA a 4°C cambiando la solución cada 2 días para asegurar una mejor fijación. Transcurrido este tiempo, se procedió a la conservación y al procesamiento del tejido.

#### 18.3.1 Procesamiento del tejido para la determinación de pHH3

El análisis de la histona H3 fosforilada (pHH3) y la proteína fibrilar ácida de la glial (GFAP) se llevó a cabo en colaboración con el grupo “*Functional Neuroanatomy*” del Dr. José Julio Rodríguez Arellano, “*IKERBASQUE, Basque Foundation for Science*”, del Departamento de Neurociencias, Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU).

Tras la post-fijación en PFA 4%, los cerebros se lavaron con tampón PBS (10 minutos 3 veces) y se sumergieron en solución de almacenaje (anticongelante) hasta que el órgano se hundió en dicha solución (24-48h). A continuación, los cerebros se guardaron a -20°C (en la solución anticongelante) hasta su procesamiento. Llegado el momento, cada hemisferio se cortó en secciones sagitales de 40-50 µm de grosor, mediante un micrótopo de vibración (VT1000S, Leica, Milton Keynes, UK). Las secciones cerebrales se recogieron en PB 0,1M, y se almacenaron de forma seriada *freefloating* en los pocillos en solución de almacenaje a -20°C hasta su uso. Al realizar la técnica IHC se seleccionaron secciones entre los niveles L 1,20 mm a L 2,16 mm (hipocampo) de acuerdo con el atlas de Paxinos y Franklin de cerebro de ratón (Paxinos y Franklin, 2004).

#### 18.3.2 Procesamiento del tejido para la determinación de NeuN

El análisis de NeuN se llevó a cabo en colaboración con el grupo de la Dra. Antonia Gutiérrez, departamento Biología Celular, Genética y Fisiología de la Facultad de Ciencias del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Universidad de Málaga.

Tras la post-fijación, los cerebros se lavaron con tampón PBS (10 minutos 3 veces) y se crioprotegieron para evitar daños en la estructura del tejido durante el proceso de congelación. La crioprotección se realizó mediante inmersión en solución de crioprotección hasta que el órgano se hundió en dicha solución. A continuación, los cerebros se congelaron con nieve carbónica durante 1 minuto y se almacenaron a -80°C hasta su posterior procesamiento.

Posteriormente, los cerebros se cortaron en un micrótopo de congelación (Leica, CM-1325) en secciones de 50 µm de grosor en plano coronal y se almacenaron de forma seriada *freefloating* en pocillos con PBS y 0,02% de azida sódica (para evitar el crecimiento fúngico). Las secciones se distribuyeron en 7 series, una serie en cada pocillo, de tal forma que, dentro de una serie, los cortes consecutivos distasen entre sí 280 µm, suponiendo una representación rostro-caudal de 1/7 del total del cerebro. Las placas con las secciones seriadas se almacenaron a 4°C durante varios meses, renovando regularmente el tampón PBS con azida sódica. Al realizar la técnica IHC, se seleccionaron secciones entre los niveles L 1,20 mm y L 2,16 mm de acuerdo con el atlas de Paxinos y Franklin de cerebro de ratón (Paxinos y Franklin, 2004).

### 18.4 Protocolo general para IHC con marcaje simple\* o doble marcaje#

De forma general, el protocolo seguido en la técnica IHC es común para las dos tandas experimentales, si bien existen algunas diferencias que se detallan. En el texto que sigue, se marcan con un asterisco (\*) los procedimientos realizados exclusivamente en el procesamiento de pHH3; y con una almohadilla (#) los procedimientos exclusivos del procesamiento de NeuN.

Partiendo de los cortes de tejido crio-conservados:

- Aplicamos un lavado de 10 minutos en tampón PB 0,1M.
- Inactivamos la peroxidasa endógena mediante incubación en 3% (p/v) peróxido de hidrogeno, 30% (v/v) metanol en PB 0,1M, durante 30 minutos.
- Realizamos dos lavados, de 5 minutos cada uno, en tampón PB 0,1M.
- Incubamos las secciones en 1% (p/v) borohidruro de sodio (en PB 0,1M) durante 30 min. para desenmascarar los antígenos\*
- Bloqueamos la avidina y la biotina endógenas, así como las proteínas unidas a biotina, utilizando el Kit de bloqueo (Vector Lab.). Las secciones se incuban tanto en avidina como en biotina durante 30 minutos (entre ambas incubaciones se realiza un lavado en PBS de 10 minutos) #
- Aplicamos un lavado, de 10 minutos en tampón PB 0,1M y a continuación aplicamos dos lavados más con TBS 0,1M durante 5 minutos.
- Incubamos las secciones en solución de bloqueo: 0,5% (p/v) BSA en TBS 0,1M + 0,25% (v/v) Triton X-100 durante 30 min.
- Lavamos las secciones, dos veces en tampón TBS, durante 5 minutos cada uno.
- A continuación, las secciones se incuban en el anticuerpo primario correspondiente bajo las condiciones indicadas en la Tabla M15, en presencia de 0,1% (p/v) BSA en TBS 0,1M + 0,25% (v/v) Tritón X-100.
- Aplicamos dos lavados, de 15 minutos cada uno, en tampón TBS 0,1M.
- Incubamos las secciones en el anticuerpo secundario biotinilado contra IgG de la especie de procedencia del primario, a una dilución 1:400 en 0,1% (p/v) BSA en TBS 0,1M + 0,25% Tritón X-100, durante 60 minutos a temperatura ambiente.
- Realizamos dos lavados, de 15 minutos cada uno, en tampón TBS 0,1M.
- A continuación, las secciones se incuban en una solución del complejo Biotina-Avidina (ABC, 1:200) durante 30 minutos a temperatura ambiente\* o con el complejo estreptavidina-peroxidasa de rábano (1:2000) en 0,2% tritón X-100, durante 90 minutos a temperatura ambiente#.
- Realizamos tres lavados, de 2 minutos cada uno, en tampón TBS 0,1M.
- Finalmente, el producto de la inmunoreacción se visualiza con DAB (NeuN) o, de forma consecutiva, con Vector SG (pHH3) y DAB (GFAP).
- En primer lugar, las secciones se incuban con el cromógeno SG durante 5 minutos (para permitir su penetración en todo el grosor del corte) y se visualiza añadiendo la solución de peróxido de hidrogeno del kit.
- A continuación, incubamos las secciones en DAB al 0,022% en TBS durante 2,5 minutos y posteriormente se añade peróxido de hidrogeno a una concentración final de 0,003%. En el caso de NeuN, donde las secciones se incuban con un único anticuerpo primario, se realiza únicamente el revelado con DAB.
- En ambos casos se observa la intensidad del inmunomarcaje bajo control al microscopio (el tiempo de revelado fue variable en función del anticuerpo y del cromógeno utilizado).

Todos los pasos de incubación y lavado se realizan con agitación constante. Tras el revelado, las secciones se lavan con PBS (2 veces x 10 minutos), se montan en un portaobjetos gelatinizado y se dejan

secar en la estufa a 37°C durante un día. A continuación, las secciones se deshidratan con una serie de soluciones de etanol concentración creciente (50 %, 70 %, 96 % y 100 %) y se aclararon con xileno. Finalmente, se colocan los cubreobjetos utilizando el medio de montaje Entellan®, con cuidado de eliminar posibles burbujas, y se dejan secar durante un día.

<i>Proteína diana</i>	<i>Anticuerpo</i>	<i>Especificidad</i>	<i>Especie huésped</i>	<i>Dilución de trabajo</i>	<i>Casa comercial</i>
<b>GFAP</b>	G3893	H-R	Ratón monoclonal	1:60.000	Sigma-Aldrich
<b>p-HH3</b>	06-570	H-R	Conejo policlonal	1:1.000	Upstate
<b>NeuN</b>	clone A60	R	Ratón monoclonal	1:500	Chemicon

**Tabla M15. Anticuerpos primarios utilizados en los experimentos de IHC con doble marcaje.**

La especificidad de los anticuerpos utilizados ha sido demostrada previamente en IHC y WB (Krishnamoorthy et al., 2006, Eng et al., 2000, Ohno et al., 2007) Para determinar la especificidad de los anticuerpos se realizaron controles negativos por omisión del anticuerpo primario y secundario, resultando en una ausencia total de marcaje.

### **18.5 Determinación y análisis de pHH3.**

Tras el marcaje específico por IHC, las secciones se visualizaron con un microscopio Nikon Eclipse 80i acoplado a una cámara 8001 MicroFiRE con la que se tomaron fotografías de todas ellas. Todas las imágenes fueron tomadas en la intensidad de luz constante y manteniendo los mismos filtros de luz, para asegurar la homogeneidad de las señales grabadas por la cámara.

Al analizar las secciones marcadas con anti-pHH3 y anti-GFAP, se midió la densidad numérica (Nv) de neuronas pHH3-inmunorreactivas en la capa de células granulares (CCG) del giro dentado (GD) del hipocampo, que se determinó como el número de células marcadas por unidad de volumen ( $\#/mm^3$ ) en un conjunto de entre 3 y 12 secciones sagitales no consecutivas por animal. Todos los recuentos se realizaron 3 veces, y se promedió el resultado. El recuento se llevó a cabo de forma manual, visualizando las secciones a través del microscopio. Paralelamente, se evaluó la colocalización de pHH3 con el marcador glial GFAP.

### **18.6 Determinación estereológica de NeuN**

El recuento de la población neuronal inmunomarcada con anti-NeuN en la capa V de la corteza somatosensorial (Figura M7) de ratones WT y 5XFAD se realizó mediante cuantificación estereológica por disector óptico (Jinno y Kosaka, 2006, Trujillo-Estrada et al., 2013).

La estereología es una técnica que combina la probabilidad geométrica y estadística para la cuantificación de las características geométricas de objetos tridimensionales, como el volumen, área, longitud, número y conectividad utilizando información adecuadamente muestreada y basándose en análisis sencillos (Golub et al., 2015). El uso del disector óptico como procedimiento de muestreo está considerado el mejor método para una estimación precisa de la densidad numérica de células (Nv) dado como número de neuronas por volumen ( $células/mm^3$ ). Se trata de un método de estimación del número de perfiles somáticos en un volumen de referencia de la muestra, que en este caso fue de 10  $\mu m$  de grosor por el área de la ventana de conteo.



## 19. Lipidómica

La lipidómica es la ciencia que se dedica al estudio y caracterización del conjunto de los lípidos celulares, las moléculas con las que interactúan y sus funciones en el organismo. A día de hoy, se trata de una ciencia imprescindible para entender el funcionamiento de células y tejidos; no obstante, la caracterización de los lípidos que componen una muestra biológica es una tarea compleja debido a su enorme variedad y variabilidad. Para ello es necesario el uso de técnicas de alto rendimiento: la espectrometría de masas (MS) combinada con técnicas de separación, como la cromatografía líquida (LC), permiten separar e identificar una gran variedad de especies lipídicas de forma fiable, rápida y sensible.

En este trabajo los estudios lipídicos se realizaron en muestra de hemiserebro de animales WT tratados con vehículo y animales 5XFAD tratados con vehículo y LP226 (machos de 7 meses).

### 19.1 Extracción lipídica

#### 19.1.1 Fundamento

El método de Dyer (Bligh y Dyer, 1959) para extracción lipídica es un método simple y rápido para la extracción y purificación de lípidos a partir de muestras biológicas. Se basa en la homogenización del tejido en una mezcla de cloroformo:metanol en tales proporciones que posibilita la formación de un sistema miscible con el agua de los tejidos. La dilución con agua y cloroformo separa el homogenado en dos fases, una superior acuosa (metanol-agua) que contiene las moléculas no-lipídicas, y otra inferior orgánica (clorofórmica) que contiene todos los lípidos. Purificando la capa clorofórmica se puede obtener un extracto lipídico puro.

#### 19.1.2 Reactivos

- Tampón RLT (Qiagen)
- Cloroformo:metanol (1:2, v/v, Scharlau)
- 0,9% (p/v) NaCl (Sigma)
- Cloroformo (Sigma)

#### 19.1.3 Procedimiento

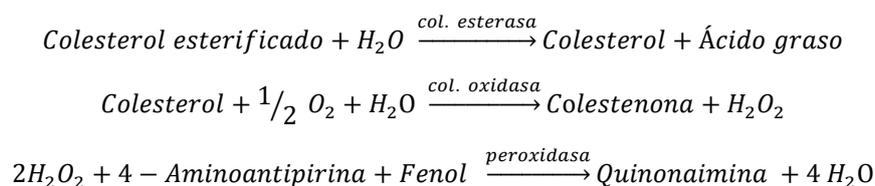
Se homogenizó un hemiserebro de cada animal en un tampón de sal de guanidina (tampón RLT, Qiagen) en una proporción 1:20 usando un homogenizador de cuchillas (Polytron PT3100). Las muestras se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y después fueron centrifugadas a 10.000 g, a 4°C durante 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante y fue conservado a -80°C hasta su uso. El protocolo usado para la extracción lipídica fue ligeramente modificado respecto al original, porque partíamos de una muestra de cerebro previamente homogenizada en tampón RLT.

Por cada 1 ml de muestra se añadieron 3,75 ml de cloroformo: metanol (1:2, v/v), se mezcló bien y se añadieron 1,25 ml de cloroformo. Tras mezclar enérgicamente, se añadieron 1,25 ml de NaCl, se volvió a mezclar y finalmente se centrifugaron las muestras 10 min a 1.000 g. Tras la centrifugación se formaron 2 fases: una acuosa y una orgánica (la que contiene los lípidos). Se recuperó la fase orgánica y se guardó bajo atmosfera de nitrógeno a -80°C hasta su uso.

### 19.2 Determinación del contenido en colesterol

#### 19.2.1 Fundamento

Este método para la determinación de colesterol total se basa en la solubilización de los lípidos en un reactivo acuoso (reactivo A) que contiene los enzimas colesterol esterasa, colesterol oxidasa y peroxidasa. Tanto el colesterol libre como el esterificado presentes en la muestra originan, según las reacciones acopladas descritas a continuación, un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría:



Estas reacciones producen coostenona y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y este último reacciona con el fenol y la aminoantipirina formando una quinonaimina de color rosa con absorbancia a 500 nm de forma proporcional a la concentración de colesterol en la muestra.

#### 19.2.2 Material y reactivos

- Isopropanol (Sigma)
- Kit de determinación del colesterol: colesterol esterasa/peroxidasa (Biosystems)

#### 19.2.3 Procedimiento

El contenido en colesterol se determinó usando un kit enzimático colorimétrico. Los extractos lipídicos se evaporaron bajo un flujo de argón durante 2 horas y después se resuspendieron en isopropanol. El contenido total de colesterol se midió en una alícuota de 10  $\mu\text{l}$  de cada muestra, a la que se le añadió 1 ml del reactivo A del kit. De forma paralela, se realizó una muestra patrón con una concentración conocida de colesterol, y por último se midió la absorbancia de todas las muestras a 500 nm.

La concentración de colesterol en la muestra se determina en base a la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Abs. muestra}}{\text{Abs. patrón}} \times \text{Concentración Patrón} = \text{mg/dL colesterol total}$$

### 19.3 Análisis lipídico por cromatografía de líquidos/espectrometría de masas (LC/MS)

#### 19.3.1 Fundamento

La **cromatografía de líquidos/espectrometría de masas (LC/MS)** es una técnica de química analítica que combina las capacidades de separación física de la cromatografía con la capacidad de análisis de la espectrometría, lo que permite identificar de forma individual cada uno de los lípidos.

La **cromatografía líquida (LC)** es un tipo de cromatografía en columna utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en las interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica. Dentro de la cromatografía líquida, destaca la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*), siendo la HPLC de fase reversa la más usada.

Se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas que resultan de las fuerzas de repulsión entre un disolvente relativamente polar (la fase móvil), un compuesto relativamente apolar (la muestra) y una fase estacionaria apolar, la columna de cromatografía (Lim et al., 1986). Los componentes de la muestra se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones con la fase estacionaria a medida que atraviesan la columna. El tiempo que tarda un compuesto a ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad característica de un compuesto para una determinada fase móvil y estacionaria. Una variación de la HPLC es la cromatografía líquida de ultraresolución (UPLC, *Ultra Performance Liquid Chromatography*), en la que se utilizan columnas con partículas más pequeñas y caudales de mayor presión consiguiendo aumentar la velocidad de ejecución, a la vez que permiten una mayor resolución y mejor sensibilidad en la detección.

La **espectrometría de masas** (MS) permite analizar con gran precisión las masas de una mezcla de compuestos a través de la relación masa-carga ( $m/z$ ) de los iones derivados de la molécula que se van a analizar. El espectrómetro de masas está formado por:

- La *fente de ionización* utilizada para que los compuestos a analizar adquieran carga, como la ionización por electroespray (ESI) o el MALDI (de sus siglas en inglés Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization), que se utilizan generalmente para muestras biológicas líquidas o sólidas.
- El *analizador de masas*, que recibe los iones producidos en la fuente de ionización y los separa de acuerdo a su relación carga-masa. Algunos de estos analizadores son el de tiempo de vuelo (TOF, *time of flight*) o el de triple-cuadrupolo; ambos usados en este trabajo.
- El *detector*, que registra la corriente producida. La señal que llega es normalmente débil, por lo que es necesario un sistema de amplificación.

El uso combinado de HPLC y MS está resultando de gran interés en los análisis lipídicos de muestras biológicas (Schneiter et al., 1999, Dahm et al., 2006).

### 19.3.2 Reactivos

- Fase móvil A: Metanol:agua:ácido fórmico (74:25:1, v/v; Scharlau)
- Fase móvil B: Metanol:ácido fórmico (99:1, v/v; Scharlau)

### 19.3.3 Procedimiento

El análisis de lipídico se llevó a cabo en colaboración con el grupo de la Dra. Josefina Casas, de la "Research Unit on Bioactive Molecules (RUBAM)" del Departamento de Química Biomédica del *Institut de Química Avançada de Catalunya-CSIC*.

Para la cuantificación de fosfolípidos y esfingolípidos se analizaron los extractos lipídicos previamente extraídos (método de Dyer, véase el apartado 19.1) por LC/MC. Este análisis se llevó a cabo en un sistema de cromatografía Aquity UPLC (Waters) con una columna analítica C8 Acquity UPLC *bridged ethylene hybrid* (Waters) de 100 x 2,1 mm de diámetro y 1,7  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, mantenida a 30 °C y dos fases móviles ambas con 5mM de formiato de amonio: fase A, MeOH/H<sub>2</sub>O/HCOOH (74:25:1, v/v); y fase B: MeOH/HCOOH (99:1, v/v). Este sistema cromatográfico se conectó a un espectrómetro de masas con acelerador ortogonal TOF LCT Premier (Waters), operado en modo ionización positiva por electroespray (ESI-TOF-MS). Se obtuvieron espectros de barrido total desde 50 a 1500 Da; los espectros individuales se sumaron para proporcionar datos cada 0,2 s. La reproducibilidad y la precisión en la masa se aseguraron mediante el uso de un spray de referencia independiente a través de la interferencia LockSpray. La cuantificación se llevó a cabo en ventanas de 50 mDa mediante el cromatograma de iones extraídos de cada compuesto, y el rango dinámico lineal se determinó mediante la inyección de mezclas estándar. La identificación positiva de los compuestos se basa en la medición exacta de la masa, con un

error menor a 5 ppm y en los tiempos de retención de la LC en comparación con la de los estándares ( $\pm$  2%).

Para la cuantificación de los lisoesfingolípidos, los extractos se analizaron por LC/MS/MS con un sistema que consta de una bomba 2690 LC Waters Alliance equipado con un automuestreador y conectado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Quattro LC (Micromass). La separación previa se realizó en una columna Purospher STAR-RP-18 (125 x 2 mm, 5  $\mu$ m; Merck) utilizando las mismas fases móviles descritas anteriormente con un caudal de 0,3 ml/min. El gradiente utilizado fue: 0,0 min, 50% B; 2 min 50% B; 7 min, 100% B; 17 min, 100% B; 19 min, 50% B; y 26 min, 50% B. La detección MS/MS se realizó con una interfaz de electrospray operada en modo de ionización positiva, adquiriendo la siguiente reacción que fue la elegida para el seguimiento de las transiciones: C17 d-eritrodihidroesfingosina-1-fosfato, 368-252 Da, 18 eV de energía de colisión; y S1P, 380-264 Da, 16 eV de energía de colisión.

### **20. Análisis estadísticos**

Todos los experimentos mostrados en este trabajo se han repetido al menos dos veces. Los valores representados en las gráficas se corresponden a la media del grupo de animales estudiado  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Generalmente la mayor parte de los resultados se han expresado con respecto al grupo control (WT o 5XFAD de 7 meses). El análisis se ha desarrollado con el programa estadístico GraphPad Prism 6 (v 6.01). En primer lugar, se comprobó que los datos se ajustaban a un modelo de distribución normal o Gaussiana (distribución que asumen los test estadísticos más frecuentemente utilizados). A continuación, comparamos los datos mediante un análisis ANOVA seguido del test "post hoc" Tukey de comparación múltiple para comparar varios grupos entre sí. Todas las comparaciones se realizaron respecto al grupo control, y cuando no se ha seguido esta regla se ha hecho constar. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para un valor de  $p < 0,05$  (intervalo de confianza del 95%)

## *IV. RESULTADOS*

---



## 1. Establecimiento de la dosis terapéutica para el tratamiento con LP226

El desarrollo de nuevos fármacos supone un gran desafío para el campo de la biomedicina. Una vez identificada o diseñada una nueva molécula, es necesario evaluar su actividad biológica para ser usada como posible fármaco. El conjunto de estudios que se llevan a cabo para tal fin se conoce como estudios “Prueba de Principio” y generalmente incluyen estudios *in vitro* e *in vivo*. Estos estudios permiten conocer las dosis eficaces y mecanismos de acción de la molécula desarrollada, así como ciertos aspectos sobre su seguridad toxicológica. Si estos estudios resultan positivos y la molécula se encuentra en la naturaleza, se puede comenzar a usar como complemento alimenticio tras su registro ante la correspondiente agencia. Si la molécula se pretende desarrollar como medicamento, se deben añadir una serie de estudios. Una vez validada la actividad biológica en un modelo de terapia lo más parecido al ser humano posible, se realizan estudios de seguridad farmacológica en animales para determinar la dosis máxima que no causa ningún efecto adverso, la dosis máxima tolerada, la dosis letal mínima (NOAEL, MTD, MLD, respectivamente, por sus siglas en inglés), etc. Estos “estudios preclínicos regulatorios” sirven para determinar las dosis a las que se realizarán los estudios clínicos en humanos para evaluar su seguridad y eficacia (Prueba de Concepto) en pacientes.

Por ello, antes de avanzar en el estudio de la eficacia del LP226 como fármaco para la administración en humanos, es necesario probar su seguridad para el tratamiento en organismos vivos. Este proceso implica establecer una dosis óptima a la que obtener el efecto terapéutico y que, a su vez, permita descartar efectos adversos en los animales.

### 1.1 Evaluación de la toxicidad de LP226 en embriones de pez cebra

El pez cebra (*Danio rerio*) se utiliza cada vez más como un modelo de animal vertebrado para el descubrimiento de fármacos y para evaluar *in vivo* la seguridad y la toxicidad. Numerosos estudios han confirmado que el pez cebra y los mamíferos presentan muchos elementos similares en su fisiología, desarrollo, metabolismo y en diferentes vías de señalización. Además, las respuestas del pez cebra a las sustancias tóxicas son altamente predictivas a las respuestas en mamíferos (He et al., 2014) (véase el apartado 3 de Materiales y Métodos).

En primer lugar, probamos la seguridad del LP226 como fármaco para ser administrado en animales mediante la evaluación de sus efectos letales, subletales y teratogénicos en embriones de pez cebra. Para ello evaluamos tanto la mortalidad y viabilidad de los embriones, como los efectos subletales y teratogénicos, de la exposición al LP226 a las dosis 1, 3, 10, 30, y 100 mg/l (2,7, 8,1, 27,3, 81,8 y 273  $\mu$ M respectivamente) durante 24, 46 y 72 horas.

Se consideraron como parámetros letales: la coagulación de los huevos, el no desprendimiento de la cola, la ausencia de ritmo cardíaco y las irregularidades en la formación de somitas, mientras que la viabilidad embrionaria se contabilizó como el porcentaje de huevos eclosionados con respecto al número inicial de huevos fertilizados. Por otro lado, se consideraron como efectos subletales, la falta de movimiento espontáneo, los déficits de pigmentación y la presencia de edemas o formación de coágulos en los órganos u otras estructuras internas; mientras que en los efectos teratogénicos se incluyeron la deformación de los órganos o estructuras internas, escoliosis y retraso en el crecimiento general.

El LP226 tuvo un efecto leve sobre la mortalidad de embriones solo a la concentración más alta, 100 mg/l, produciendo un 20% de mortalidad tras 48h que llegó al 35% a las 72h (Tabla R1 A). En consecuencia, se testó la viabilidad embrionaria a las 72h (Tabla R1 B), y sólo se observaron efectos negativos tras la exposición a la dosis superior, 100 mg/l, mientras que las concentraciones bajas, de 1 a 30 mg/l, se correlacionaron con niveles aceptables de viabilidad embrionaria (entre el 80 y el 100%).

## Resultados

De forma similar, solo se observaron efectos subletales a dosis elevadas de LP226 (100 mg/l) en función del tiempo (del 56 al 77%, a las 48 y 72h), mientras que a dosis más bajas no se observaron (Tabla R1 C). Por el contrario, todas las concentraciones de LP226 mostraron efectos teratogénicos tras una incubación a largo plazo (72h), aunque tras 24h sólo la concentración más alta (100 mg/l) produjo estos efectos (Tabla R1 C).

El principal efecto teratogénico observado fue la deformación de órganos y retraso en el crecimiento. Curiosamente, los efectos teratogénicos revertieron tras exposiciones más largas en una elevada proporción de estos embriones, incluso a altas concentraciones. Concretamente, en presencia de 100 mg/l de LP226, el porcentaje de embriones afectados disminuyó del 100% a las 24 h, al 38% a las 72 h, sugiriendo que estos efectos teratogénicos podrían ser una respuesta aguda al tratamiento, pero sin efectos a largo plazo (Torres et al., 2014). Dado que la terapia contra la EA va destinada a personas usualmente mayores de 65 años, los posibles efectos teratogénicos no se consideran relevantes desde el punto de vista toxicológico, aunque alertan de su posible uso en un futuro en mujeres embarazadas.

LP226 (mg/l)	Tiempo de incubación (h)		
	24	48	72
<b>A. Mortalidad embrionaria</b>			
1	0	0	0
3	0	0	0
10	0	0	0
30	0	0	10
100	20	20	35
<b>B. Viabilidad embrionaria</b>			
1	-	-	100
3	-	-	80
10	-	-	80
30	-	-	94
100	-	-	46
<b>C. Efectos subletales</b>			
1	0	0	0
3	0	0	0
10	0	5	5
30	0	10	0
100	0	56	77
<b>D. Efectos teratogénicos</b>			
1	0	0	5
3	0	0	70
10	5	5	50
30	10	25	100
100	100	66	38

**Tabla R1. Evaluación de los efectos del LP226 en el desarrollo de embriones de pez cebra.** Los datos se expresan como el porcentaje de embriones que mostró alguno de los parámetros estudiados: (A) mortalidad embrionaria, (B) viabilidad embrionaria, (C) efectos subletales: falta de movimientos espontáneos, déficit de pigmentación y aparición de edema o coágulos en órganos internos y (D) efectos teratogénicos: deformación de estructuras internas, escoliosis y retraso en el crecimiento general.

## 1.2 Valoración del efecto tóxico del tratamiento agudo con LP226 y DHA: test de Irwin

El test de Irwin es una prueba que permite la evaluación de los efectos generales de un fármaco en la actividad del SNC y la función fisiológica (Irwin, 1968). Incluye pruebas de valoración del aspecto externo, del comportamiento (alerta, aseo e irritabilidad), así como de los efectos neurológicos generales (temblores, convulsiones, ataxia) y los específicos del sistema nervioso autónomo como salivación, hipotermia o midriasis (el protocolo detallado puede verse en el apartado 4 del capítulo de Materiales y Métodos).

De forma habitual, este test se usa para predecir el potencial de actividad terapéutica de un fármaco y seleccionar las dosis para las pruebas subsiguientes de eficacia, así como para descartar la toxicidad de un fármaco, entendiendo toxicidad como los efectos adversos que aparecen cuando se utilizan dosis altas de un fármaco o hay acumulación del mismo (Roux et al., 2005). En este trabajo, el objetivo de la prueba fue descartar efectos tóxicos del LP226, así como las alteraciones en la función fisiológica que pudiesen interferir en su potencial efecto terapéutico: la mejora cognitiva y neuropatológica en animales modelo de la enfermedad de Alzheimer (EA) en primer término, y en pacientes en el futuro.

En primer lugar, evaluamos la respuesta del grupo control, animales WT de 7 meses tratados con vehículo (5% etanol) por vía oral evaluados tras 0, 15, 30, 60, 180, 360 min y 24h (Tabla R2). De esta forma, se estableció el comportamiento basal de estos animales frente a la batería de pruebas de la que se compone el test. De forma general, vemos que no hubo cambios significativos en la evaluación a lo largo del tiempo, a excepción de los parámetros de peso y defecación, en los que se observó una ligera disminución entre 30 y 60 minutos tras la administración, con posterior recuperación al cabo de 24 horas. Esta variación sería asociable a las características propias de la realización de la prueba, más que a un posible efecto de la administración del vehículo. Por un parte, la seguridad del vehículo utilizado ha sido demostrada con anterioridad (Gad et al., 2006). Además, durante las tres primeras horas (180 min) la evaluación fue continua, lo que puede ocasionar cierto grado de estrés que, a su vez, podría justificar el descenso de peso (Harris, 2015). Además, durante este período de tiempo (hasta los 180 minutos), los animales no se mantienen en su jaula original, por lo que durante este tiempo estuvieron en privación dietaria. En su conjunto, estas circunstancias justificarían la ligera pérdida de peso, y la disminución en el número de defecaciones, observada entre 30 y 60 min.

## Resultados

<b>Control vehículo (n= 8) Media ± SD</b>	CONTROL 0 min	15 min	30 min	60 min	120 min	180 min	360 min	24h
<b>Apariencia general y factores físicos</b>								
Peso (g)	33,4 ± 2,5	33,3 ± 2,7	32,2 ± 2,5	32,4 ± 3,0*	32,3 ± 3,0*	32,1 ± 2,9*	32,3 ± 3,0*	33,1 ± 3,3
Presencia de bigotes	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0
Apariencia del pelaje	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0
Color de piel de la superficie plantar	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
<b>Perfil autónomo</b>								
Micción	0,5 ± 0,5	0,5 ± 0,5	0,3 ± 0,5	0,5 ± 0,5	0,9 ± 0,4	0,6 ± 0,5	0,5 ± 0,5	0,6 ± 0,5
Defecación	4,3 ± 1,4	3,0 ± 0,8*	2,1 ± 1,4*	3,1 ± 1,6*	3,4 ± 1,2*	2,9 ± 1,5*	3,3 ± 1,0*	3,9 ± 1,6
Ritmo cardíaco	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
Ritmo respiratorio	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0
Cierre de párpados	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<b>Perfil comportamental</b>								
Comportamiento en traslado	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0
Posición corporal	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3,1 ± 0,3	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0
Actividad espontánea	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
Comportamiento extraño	no	no	no	no	no	no	no	no
Respuesta de escape al tacto	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	2,9 ± 0,4	2,9 ± 0,4	2,9 ± 0,4	2,9 ± 0,4
Posición pasiva	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,1 ± 0,4	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Reflejo de llegada	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0
Elevación pélvica	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0
Elevación de la cola (en movimiento)	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1,1 ± 0,3	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
Mordedura provocada	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
<b>Perfil neurológico</b>								
Piloerección	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Temblores	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Marcha	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Tono corporal	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
Tono de las extremidades	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0
Tono abdominal	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
Reflejo de giro	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Reflejo pabellón auditivo	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
Reflejo ante presión plantar	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0
Reflejo ante presión en cola	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0
<b>Coordinación motora</b>								
Maniobra en alambre	0 ± 0	0,5 ± 1,4*	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Fuerza de agarre	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0
Tabla invertida	60 ± 0	60 ± 0	60 ± 0	60 ± 0	60 ± 0	60 ± 0	60 ± 0	60 ± 0
Trepar en barra	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,1 ± 0,4	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

**Tabla R2. Test de Irwin.** Valoración en animales WT tratados con una dosis única de vehículo (etanol 5%, 1 ml/kg) por vía oral (v.o.) mediante cánula gastroesofágica. La evaluación se realizó antes de la administración y 15, 30, 60, 120, 180, 360 min y 24h tras la administración del fármaco. Análisis mediante ANOVA de dos vías seguido de test Tukey de comparación múltiple. El asterisco (\*) señala la significación de la diferencia respecto tiempo 0  $p < 0,05$ .

A continuación, analizamos el efecto del tratamiento agudo con LP226 y DHA a las dosis 5, 20, 50, 200 y 500 mg/kg, evaluando el estado de los animales antes de la administración del compuesto (tiempo 0) y 15, 30, 60, 180, 360 min, y 24h post-administración, como se ha mostrado anteriormente para el grupo control. La valoración realizada con cada uno de los grupos de tratamiento se comparó con los resultados del grupo control. En todos los grupos analizados se observó un patrón similar en la evolución del peso y el número de defecaciones, lo que una vez más sugiere que estas variaciones son un artefacto debido a las particularidades de la prueba. En la Tabla R3, se muestra cómo en ningún caso, se observaron cambios en los parámetros evaluados durante la realización de la prueba en comparación al grupo control, descartando así efectos tóxicos agudos del tratamiento. Estos efectos incluyen convulsiones, temblores, alteraciones de la apariencia general, del perfil de comportamental, del perfil neurológico o del perfil del sistema nervioso autónomo de los animales hasta 24h después de la administración del fármaco.

Compuesto	Dosis (mg/kg a.o)				
	5	20	50	200	500
<b>LP226</b>	Sin cambios (n=5)	Sin cambios (n=5)	Sin cambios (n=7)	Sin cambios (n=5)	Sin cambios (n=6)
<b>DHA</b>	Sin cambios (n=6)				

**Tabla R3. Evaluación neurotoxicológica mediante el test de Irwin tras una dosis única de LP226 y DHA.** La evaluación se realizó en 5-7 animales por grupo, justo antes y tras 15, 30, 60, 120, 180, 360 min y 24h de la administración del compuesto LP226 o DHA en animales WT tratados con dosis única a 5, 20, 50, 200 y 500 mg/kg por vía oral (cánula gastroesofágica). El test de Irwin no reveló ningún cambio significativo a ninguna de las dosis estudiadas, en ninguno de los fármacos en comparación a la evaluación del grupo control (tratado con vehículo). Se muestra el número total (n) de animales estudiados en cada condición.

Tras descartar efectos adversos de la administración aguda de LP226 y DHA, pasamos a evaluar los posibles efectos tóxicos por acumulación de estos fármacos en el organismo del animal. Para ello, se mantuvo el tratamiento con las dosis más altas de LP226 y DHA ensayadas hasta el momento (200 y 500 mg/kg) durante 14 días. Durante el trascurso de este tratamiento, se realizó una valoración visual de los animales diariamente antes de recibir la dosis correspondiente, fijándonos especialmente en la presencia de comportamientos considerados indicativos de dolor en roedores: reducción de la ingesta de agua y alimento, pérdida de peso, aislamiento, automutilación, disnea, actividad física aumentada o reducida, pelaje descuidado, piloerección, postura anormal (arqueamiento dorsal) y contracciones musculares involuntarias (Morton y Griffiths, 1985). Transcurridas 24 horas desde la última administración, se procedió de nuevo a la valoración del estado de los animales mediante el test de Irwin (Tabla R4) en comparación con animales control tratados con vehículo.

Este análisis no reveló ningún efecto tóxico del tratamiento ni alteraciones del perfil comportamental, neurológico o autónomo de los animales. Sin embargo, se observaron alteraciones en la apariencia general (apariencia del pelaje y piloerección) en los animales tratados a 500 mg/kg tanto con LP226, como con DHA. Además, la valoración visual de los animales tratados a esta dosis también reveló el deterioro en el aspecto externo de una parte de los animales analizados: falta de acicalamiento, postura anormal (arqueamiento dorsal) o presencia de contracciones abdominales; todos ellos considerados signos indicativos de dolor en roedores (Morton y Griffiths, 1985). Estos resultados nos llevaron a descartar la dosis de 500 mg/kg para estudios posteriores con el fármaco LP226.

14 días	Dosis (mg/kg)	
	200	500
LP226	Irwin	Irwin
	Sin cambios (n=5)	Apariencia general: Pelaje descuidado (3/4) Piloerección (3/4) Resto de parámetros: Sin cambios (n=4)
	Valoración visual	Valoración visual
	Normal (n=5)	Falta acicalamiento (3/4) Postura anormal (2/4) Contracciones abdominales (2/4)
DHA	Irwin	Irwin
	Sin cambios (n=4)	Apariencia general: Pelaje descuidado (2/4) Piloerección (1/4) Resto de parámetros: Sin cambios (n=4)
	Valoración visual	Valoración visual
	Normal (n=4)	Falta acicalamiento (2/4) Postura anormal (2/4) Contracciones abdominales (2/4)

**Tabla R4. Cambios observados en animales WT tras el tratamiento durante 14 días con LP226 o DHA a las dosis de 200 y 500 mg/kg.** El tratamiento se realizó por vía oral mediante cánula gastroesofágica. Los tratamientos a 500 mg/kg provocaron la aparición de signos de dolor aproximadamente en la mitad de los animales. La evaluación del test de Irwin se realizó en comparación con el grupo control (tratado con vehículo), y la valoración visual de los animales se realizó cada día antes de la administración del fármaco. Se presenta el número de animales en los que se detectó algún tipo de alteración durante los 14 días que duró el tratamiento respecto al número total de animales testados.

### 1.3 Efectos de diferentes dosis en un tratamiento crónico con LP226

Una vez establecida la seguridad del tratamiento con LP226 en dosis agudas y en tratamientos a corto plazo, fue necesario evaluar la tolerancia a un tratamiento a largo plazo con este fármaco en animales 5XFAD, modelo de EA empleado en este trabajo. Este tratamiento nos permitió evaluar a la vez la seguridad de un tratamiento crónico (4 meses) y la eficacia del compuesto sobre las capacidades cognitivas. Las dosis seleccionadas fueron 5, 20, 50 y 200 mg/kg. A modo de control, tratamos un grupo de animales WT con 20 y 200 mg/kg. Los tratamientos se mantuvieron durante 4 meses, y se evaluaron los efectos sobre la capacidad cognitiva durante el último mes de tratamiento por medio de una prueba de aprendizaje en un laberinto radial (LR) de ocho brazos.

#### 1.3.1 Valoración comportamental y control del peso

La valoración comportamental se realizó diariamente durante todo el tratamiento mediante un examen visual de los animales antes de la administración del fármaco, fijándonos especialmente en la presencia de comportamientos considerados indicativos de dolor en roedores: reducción de la ingesta de agua y alimento, pérdida de peso, aislamiento, automutilación, disnea, actividad física aumentada o reducida, pelaje descuidado, piloerección, postura anormal (arqueamiento dorsal) y contracciones musculares involuntarias (Morton y Griffiths, 1985).

Esta valoración reveló la ausencia total de cualquier signo de dolor o alteración en el comportamiento detectables a simple vista en los animales WT y 5XFAD que recibieron las dosis de 5, 20 y 50 mg/kg. Sin embargo, en los animales que recibieron la dosis superior, 200 mg/kg, a partir de la segunda semana de tratamiento se detectaron algunos signos de dolor reconocidos, como piloerección y una falta de acicalamiento continuada, dando lugar un pelaje descuidado, así como cambios en la posición corporal (arqueamiento dorsal) y la presencia de contracciones musculares involuntarias en la zona abdominal (véase la Tabla R5), indicativos de un posible efecto adverso del tratamiento crónico. Estas alteraciones se observaron de forma mayoritaria entre las primeras 2-8 semanas y fueron disminuyendo con el transcurso del tratamiento, posiblemente debido a una adaptación a la administración de dosis altas del compuesto.

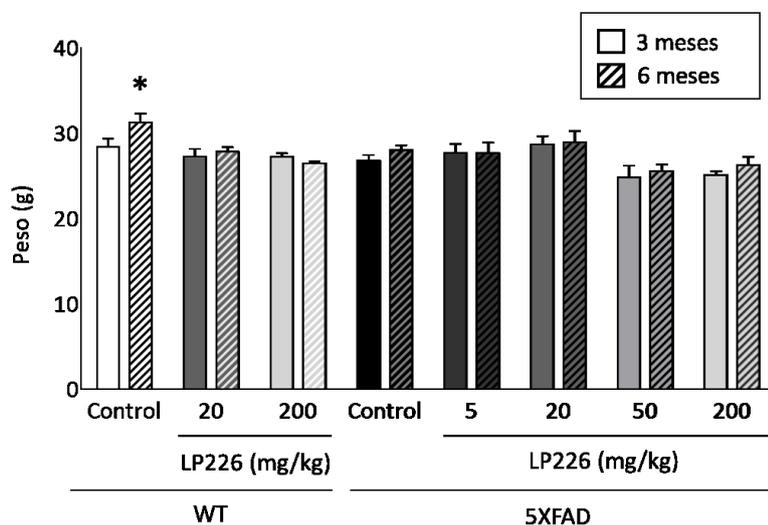
LP226	Dosis (mg/kg)					
	WT		5XFAD			
	20	200	5	20	50	200
<i>Reducción ingesta de agua y comida</i>	0/4	0/3	0/6	0/8	0/6	0/7
<i>Pérdida de peso</i>	0/4	0/3	0/6	0/8	0/6	0/7
<i>Aislamiento social</i>	0/4	0/3	0/6	0/8	0/6	0/7
<i>Automutilación</i>	0/4	0/3	0/6	0/8	0/6	0/7
<i>Disnea</i>	0/4	0/3	0/6	0/8	0/6	0/7
<i>Alteraciones en la actividad física (aumentada o reducida)</i>	0/4	0/3	0/6	0/8	0/6	0/7
<i>Pelaje descuidado</i>	0/4	<b>2/3</b>	0/6	0/8	0/6	<b>4/7</b>
<i>Piloerección</i>	0/4	<b>2/3</b>	0/6	0/8	0/6	<b>3/7</b>
<i>Postura anormal (arqueamiento dorsal)</i>	0/4	<b>1/3</b>	0/6	0/8	0/6	<b>2/7</b>
<i>Contracciones musculares involuntarias</i>	0/4	<b>1/3</b>	0/6	0/8	0/6	<b>3/7</b>

**Tabla R5. Alteraciones físicas provocadas tras el tratamiento crónico con LP226.** La valoración visual de los animales WT y 5XFAD tratados con LP226 a las dosis de 5, 20, 50 y 200 mg/kg por vía oral (mediante cánula gastroesofágica) reveló la aparición de algunos signos de dolor en los animales que recibieron la dosis superior. La evaluación de los parámetros se realizó en comparación con los animales WT y 5XFAD control, tratados con vehículo. Se muestra el número de animales en los que se observaron los parámetros detallados en la tabla durante el transcurso del tratamiento, respecto al número total de animales estudiados.

Al comprobar el peso de los animales a lo largo del tratamiento, no se observaron alteraciones atribuibles a la administración de LP226 en ninguno de los casos. En la Figura R1 se muestra el peso promedio de cada grupo a los 3 meses (antes de iniciar el tratamiento) y a los 6 meses de edad, tras 3 meses de tratamiento. Cabe destacar el aumento significativo de peso que se da en este período de tiempo en los animales WT control, que no se observa en los animales 5XFAD control, indicando una estabilización del peso en el modelo transgénico a partir de los 3 meses. De hecho, estos resultados van en la misma dirección que resultados previos en animales de edad más avanzada, en los que se muestra la estabilización del peso en animales 5XFAD entre los 6 y los 12 meses a diferencia de lo que ocurre con

## Resultados

los WT, que experimentan un aumento de peso en este mismo período (Jawhar et al., 2012). En referencia a los animales tratados con LP226, en todos los casos se observó una estabilización del peso durante el transcurso del tratamiento. Curiosamente, también en los animales WT tratados tanto a 20 como a 200 mg/kg. Posiblemente, los cambios en el aporte lipídico que experimentan estos animales, aumentando la proporción de ácidos grasos insaturados respecto a los saturados, contribuye a la estabilización del peso (Powell et al., 2015, Simopoulos, 2008).



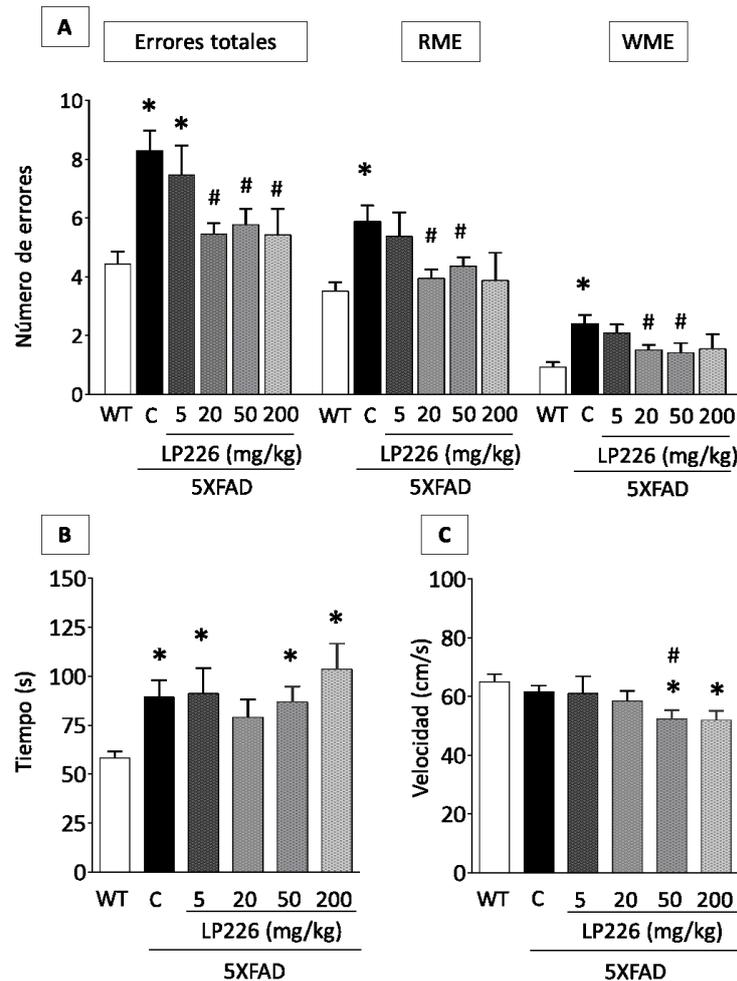
**Figura R1. Evolución del peso corporal de animales WT y 5XFAD durante 3 meses de tratamiento.** Peso promedio de cada grupo a los 3 meses de edad (antes del inicio de los tratamientos) y a los 6 meses de edad, antes de la privación en la ingesta asociada a la prueba del LR. Destaca el aumento de peso con la edad en el grupo WT, y la estabilidad en el resto de grupos. Análisis mediante el test ANOVA de dos vías, seguido de test Tukey de comparación múltiple. El asterisco (\*) indica la significación  $p < 0,05$  al comparar 3 y 6 meses.

### 1.3.2 Evaluación cognitiva, prueba del Laberinto Radial

Tras comprobar los posibles efectos adversos al tratamiento crónico con LP226, se evaluaron los efectos del tratamiento con LP226 sobre el nivel cognitivo de los animales 5XFAD en el LR que permite evaluar la memoria espacial. Brevemente, la prueba consiste en un laberinto de ocho brazos en el que se reparten una serie de recompensas que el animal debe encontrar y que nos permite valorar el estado de la función cognitiva en términos de memoria espacial, en base al número de errores cometidos. Se contabilizó el número total de errores cometidos dentro del laberinto, que reflejan el estado general de la memoria espacial y, que, a su vez, dividimos en dos subtipos: errores asociados a la memoria espacial de trabajo (WME, del inglés *Working Memory Errors*), un tipo de memoria de codificación a corto plazo; y errores asociados a la memoria espacial de referencia (RME, del inglés *Reference Memory Errors*) o memoria a largo plazo. Se entiende como errores tipo WME las entradas repetidas en brazos con recompensa y como errores tipo RME las entradas en brazos sin recompensa (véase el apartado 4 del capítulo de Materiales y Métodos).

Además del número de errores, también se registró el tiempo invertido por cada animal en completar la prueba y la velocidad a la que los animales se movieron dentro del laberinto. La velocidad se calculó a partir del tiempo invertido y de la distancia total recorrida dentro del laberinto (véase el apartado 5 de los Materiales y Métodos) y es un parámetro que nos permitió evaluar de manera indirecta el estado de la función motora de los animales en función del genotipo del animal, de la edad o del tratamiento recibido. La memoria espacial en los animales WT, 5XFAD controles, y 5XFAD tratados con 5, 20, 50 y 200 mg/kg de LP226 se muestra en la Figura R2. En primer lugar, destaca el incremento de errores entre el grupo WT y el grupo 5XFAD, tanto en el número total de errores, como en los errores tipo WME y RME (Figura R2 A). Estos resultados reflejan el acusado deterioro cognitivo que sufren los animales 5XFAD a los

7 meses de edad, y coinciden con resultados previos que describen la pérdida de memoria espacial que sufre este modelo (Oakley et al., 2006, Ohno et al., 2006, Urano y Tohda, 2010, Devi y Ohno, 2010).



**Figura R2. Valoración de la memoria espacial en animales 5XFAD con dosis crecientes de LP226.** Parámetros analizados en el LR en animales de 7 meses WT, tratados con vehículo (n=10), y 5XFAD tratados con vehículo (n=9) y LP226 a 5 (n=5), 20 (n=7), 50 (n=7) y 200 (n=4) mg/kg. (A) El grupo control 5XFAD muestra un aumento significativo del número de errores (totales, RME y WME) respecto al grupo WT. Además, el tratamiento con 20 o 50 mg/kg de LP226 es capaz de revertir esta diferencia. (B) El tiempo de permanencia en el laberinto es mayor en el control 5XFAD, y solo es reducido por el tratamiento a 20 mg/kg. (C) Como consecuencia de los cambios en el tiempo de ejecución y el espacio total recorrido, la velocidad de ejecución fue similar en los animales WT y control 5XFAD y disminuyó de forma progresiva al aumentar la dosis. Las barras muestran el valor promedio de cada grupo  $\pm$  SEM. Análisis mediante ANOVA de una vía seguido de test Tukey de comparación múltiple: \* diferencia respecto WT,  $p < 0,05$ ; # diferencia respecto control 5XFAD,  $p < 0,05$ .

Por otro lado, se estudió la recuperación cognitiva asociada al tratamiento con LP226 en animales 5XFAD tratados a diferentes dosis, comparándolos con los animales control 5XFAD. En este sentido, el grupo que recibió la dosis inferior (5 mg/kg) no presentó ningún cambio significativo en el número de errores cometidos respecto al control 5XFAD (Figura R2 A). Sin embargo, al aumentar la dosis recibida a 20 y 50 mg/kg, observamos un descenso significativo tanto del número de errores totales, como de WME y RME, indicando una mejora en el estado de la memoria espacial en estos animales, tanto a nivel general, como de forma más específica en la memoria de trabajo y en la de referencia. Finalmente, con respecto al grupo tratado a la dosis más alta, 200 mg/kg, se observó una reducción significativa del número de errores totales al comparar con los animales control 5XFAD, indicando de nuevo una mejora en la memoria espacial. No obstante, en este último grupo no se encontraron diferencias en el desglose de

## Resultados

errores RME y WME, probablemente debido a la alta dispersión de los datos que aparece al aumentar la dosis administrada (Figura R2 A).

También se evaluó el tiempo empleado en superar la prueba (Figura R2 B). En este caso, vemos que el tiempo de ejecución fue mucho mayor en el grupo control 5XFAD que en el grupo WT. Este aumento en el tiempo se mantuvo en todos los grupos de animales 5XFAD tratados, excepto en el grupo tratado con 20 mg/kg, donde el tiempo de ejecución disminuyó hasta valores próximos a los obtenidos por el grupo control WT. Para explicar estos resultados, hay que tener en cuenta que el parámetro tiempo es directamente proporcional al número de errores cometidos (los animales invierten menos tiempo en encontrar la recompensa, y por tanto permanecen menos tiempo en el laberinto) e inversamente proporcional a la velocidad de ejecución de la prueba. La velocidad de ejecución (Figura R2 C) es un parámetro que nos permite evaluar el comportamiento locomotor de los animales, y nos sirve de indicativo para valorar la condición motora de los diferentes grupos (Mohaibes et al., 2017). En consecuencia, el tiempo invertido en ejecutar la prueba depende del estado cognitivo de los animales y del estado de la función motora: el tiempo empleado es mayor en los grupos que han cometido más errores (grupos de animales 5XFAD control y tratados con LP226 a 5 mg/kg) y en los que han desarrollado la prueba de forma más lenta (grupos de animales 5XFAD tratados con LP226 a 50 y 200 mg/kg). En este sentido, llama la atención la disminución progresiva de la velocidad de ejecución al aumentar la concentración de LP226 administrada, apareciendo una diferencia significativa respecto al grupo WT a partir de la dosis de 50 mg/kg (Figura R2 C). Si tenemos en cuenta que no observamos ninguna diferencia en la velocidad de ejecución entre el grupo WT y el grupo control 5XFAD, y que, como mínimo hasta los 12 meses de edad se ha descrito un comportamiento locomotor normal en este modelo (Jawhar et al., 2012, Wang et al., 2016), debemos atribuir esta disminución en la velocidad al efecto del fármaco tras un tratamiento crónico de 4 meses con las dosis superiores, 50 y 200 mg/kg.

Acorde a los resultados presentados hasta el momento, se definió la dosis de 20 mg/kg como la más alta con actividad terapéutica y sin efectos adversos detectados. Por lo que se estableció esta dosis como dosis terapéutica para los experimentos posteriores (véase la Tabla R6).

<b>Dosis descartadas (mg/Kg)</b>	
<b>5</b>	Tras la prueba en el LR esta dosis demostró ser insuficiente para inducir una mejora cognitiva en los animales 5XFAD.
<b>50</b>	Pese a que el descenso en el número de errores en el LR fue muy sólido y a que no se observó ninguna alteración durante los meses de tratamiento, el descenso en la velocidad durante la prueba es indicativo de cierto grado de toxicidad (función motora) a largo plazo.
<b>200</b>	Esta dosis mostró rasgos de toxicidad tanto en la valoración visual del estado de los animales, como en el descenso en la velocidad de ejecución. Además, los animales tratados a esta dosis presentaron una mayor variabilidad en la mejora cognitiva (posiblemente debido al peor estado físico).
<b>500</b>	Los resultados obtenidos con el test de Irwin revelaron una posible toxicidad en un tratamiento de 14 días.
<b>Dosis de elección (mg/Kg)</b>	
<b>20</b>	Fue la dosis más alta con actividad terapéutica y sin efectos adversos detectados.

**Tabla R6. Resumen de los motivos que nos llevaron a la elección dosis terapéutica del LP226.**

## **2. Valoración cognitiva de animales WT y 5XFAD tras el tratamiento crónico con LP226**

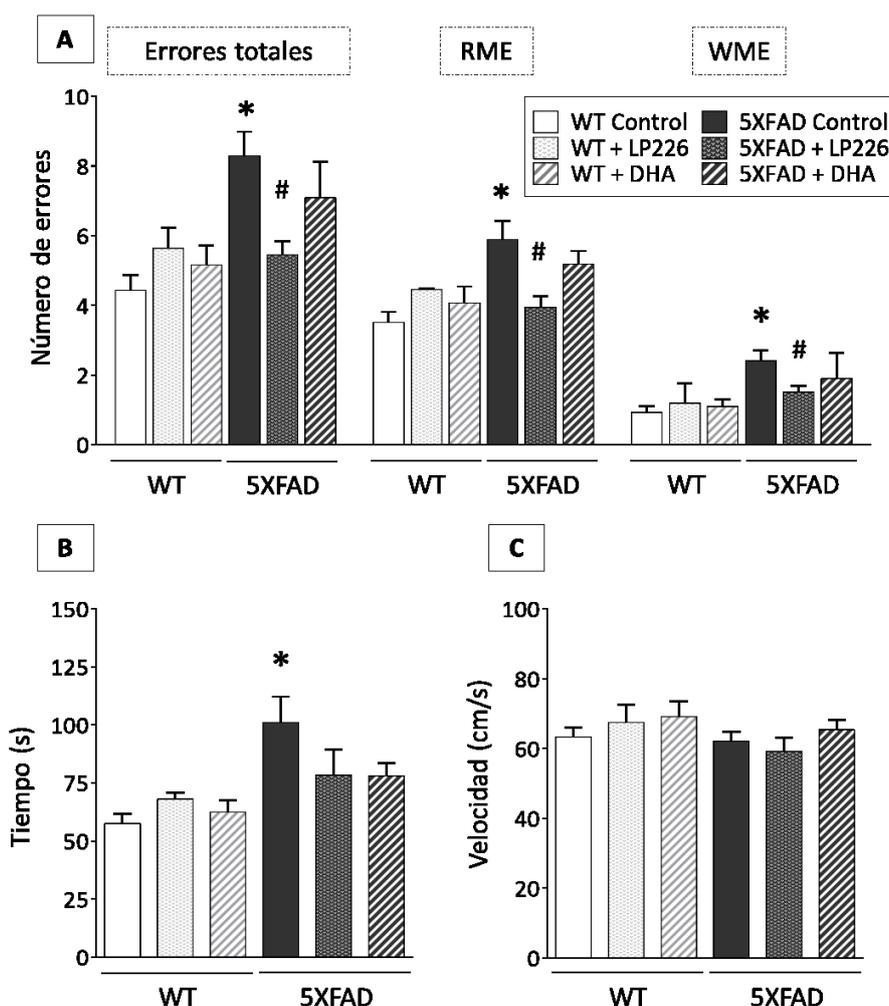
Una vez establecida una dosis terapéutica para el LP226 en base a los estudios de toxicidad y de la eficiencia del compuesto en la recuperación cognitiva, pasamos a evaluarlo en animales WT y 5XFAD junto a la misma dosis de la forma más abundante en la naturaleza del omega-3 C22:6, el DHA. Este tratamiento en paralelo con DHA nos sirve de control para valorar el efecto de nuestro compuesto problema (LP226), ya que, por un lado, nuestro fármaco es una modificación química del DHA, y por otro la efectividad del DHA en la mejora cognitiva de animales modelo de EA ha sido ampliamente demostrada en la literatura (Lim et al., 2005, Hartmann et al., 2007, Green et al., 2007).

Con la finalidad de obtener una visión más amplia de los efectos del LP226 sobre nuestro modelo de EA, realizamos el tratamiento en animales de diferente edad. Basándonos en la evolución cognitiva y neuropatológica que sufren los animales 5XFAD, se optó por un tratamiento en animales de 3 a 7 meses de edad y otro en animales de 8 a 12 meses de edad. En el primer caso, el objetivo fue testar las propiedades del LP226 para prevenir el declive cognitivo asociado al envejecimiento patológico. A los 3 meses de edad, en los animales 5XFAD ha empezado la acumulación del péptido A $\beta$ , pero aún no ha aparecido el deterioro en la memoria espacial o la degeneración sináptica (Oakley et al., 2006) lo que implica una etapa temprana de la enfermedad. Por otro lado, al retrasar la edad de tratamiento, el objetivo era comprobar el efecto neuroprotector del LP226 una vez la patología ya está instaurada. A los 8 meses de edad, el deterioro sináptico y cognitivo ya está establecido y el depósito de A $\beta$  se ha incrementado notablemente. Además, a esta edad se inicia la degeneración neuronal propia de este modelo en el hipocampo y la corteza cerebral (Oakley et al., 2006, Kimura y Ohno, 2009), lo que supone un estadio muy avanzado de la enfermedad. A partir de ahora nos referiremos a estos grupos como animales de 7 meses y 12 meses, haciendo referencia a la edad a la que se llevó a cabo la valoración comportamental en el LR (último mes de tratamiento) y se obtuvieron las muestras para los posteriores estudios moleculares.

### **2.1 Valoración de la memoria espacial en animales de 7 meses tratados con LP226**

Realizamos los tratamientos en machos de 7 meses de edad a los que tratamos con 20 mg/kg de LP226 y DHA. Como hemos dicho, el tratamiento se realizó durante 4 meses (de los 3 a los 7 meses de edad) y durante el último mes de tratamiento llevamos a cabo la prueba comportamental. A continuación, presentamos los resultados de la última semana de prueba.

En primer lugar, evaluamos el resultado de los animales WT en el LR. En este sentido, no se apreciaron diferencias significativas entre el grupo control WT y los grupos WT tratados con LP226 o DHA en ninguno de los parámetros analizados: errores, tiempo o velocidad (Figura R3), lo que demuestra que el compuesto no tiene efecto sobre un estado cognitivo normal. A continuación, en los animales 5XFAD vimos un aumento significativo del número de errores cometidos respecto a los animales WT (Figura R3 A), lo que confirma la pérdida en la memoria espacial que experimenta este modelo a los 7 meses (véase también la Figura R2). Por lo que respecta a los tratamientos en animales 5XFAD, el grupo que recibió LP226 redujo de manera significativa el número de errores cometidos, tanto los totales como los errores de tipo WME y RME, (Figura R3 A), indicando que a esta dosis el tratamiento con LP226 fue capaz de prevenir la pérdida en la memoria espacial de los animales 5XFAD, tanto en la memoria de trabajo como en la de referencia. Curiosamente, en el tratamiento con DHA, no se encontraron diferencias significativas en el número de errores cometidos con respecto al control 5XFAD ni con respecto al grupo control WT.



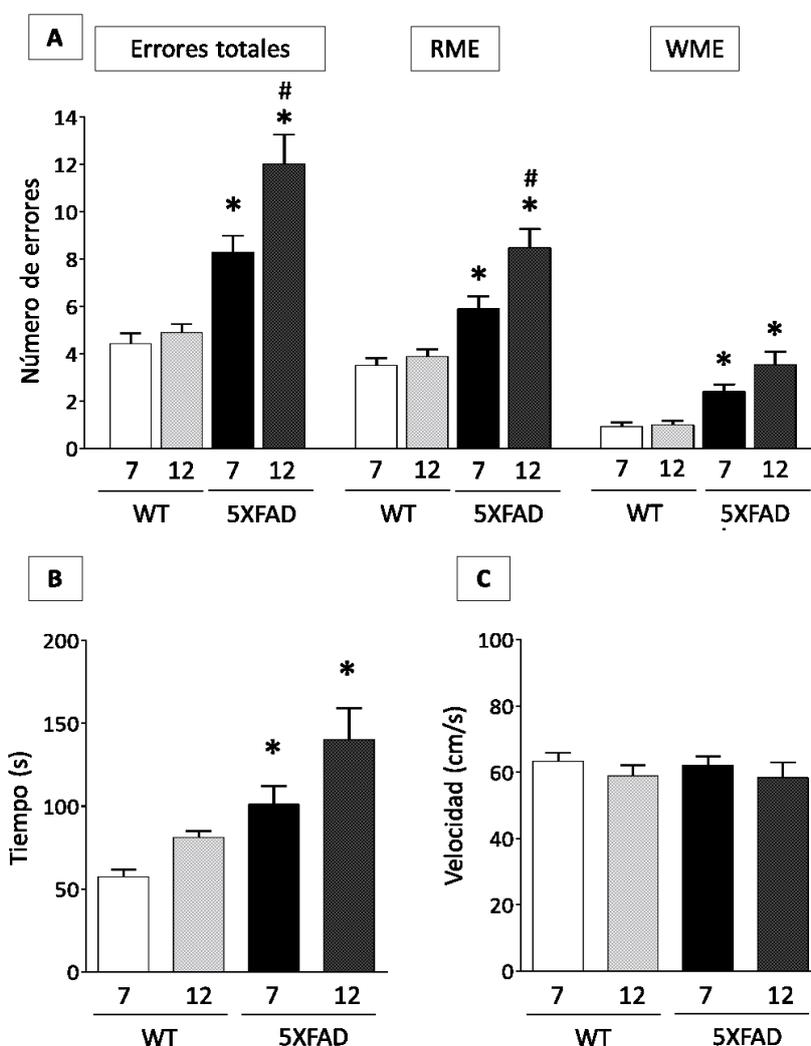
**Figura R3. Evaluación cognitiva de machos 5XFAD de 7 meses tras el tratamiento crónico con LP226.** Parámetros analizados en el LR en machos de 7 meses WT, tratados con vehículo (n=10), LP226 (n=4) o DHA (n=5); y machos 5XFAD tratados con vehículo (n=9), LP226 (n=7) o DHA (n=4) durante 4 meses a una dosis de 20 mg/kg. (A) La evaluación de la memoria espacial en el LR muestra un deterioro en el grupo control 5XFAD que el tratamiento con 20 mg/kg de LP226 es capaz de prevenir. (B) Este deterioro de la memoria del control 5XFAD supone un mayor tiempo de permanencia en el laberinto para completar la prueba. (C) La velocidad de ejecución es muy similar en todos los grupos. Las barras muestran el valor promedio de los animales  $\pm$  SEM. Análisis mediante ANOVA de una vía seguido de test Tukey de comparación múltiple: \*  $p < 0,05$ , diferencia respecto WT; #  $p < 0,05$ , diferencia respecto control 5XFAD.

Por lo que respecta al tiempo invertido en realizar la prueba (Figura R3 B), únicamente el control 5XFAD invirtió un tiempo significativamente superior al resto de grupos. Como hemos comentado en el apartado anterior, el descenso en el número de errores que presentan los animales 5XFAD tratados con LP226, implica una reducción del tiempo de permanencia en el laberinto (Fiol-deRoque et al., 2013). Por último, la velocidad a la que se realizó la prueba por cada uno de los grupos fue similar (Figura R3 C), lo que sugiere un comportamiento locomotor normal de todos los grupos, confirmando que la dosis de 20 mg/kg no afecta a la actividad motora de los animales 5XFAD de 7 meses.

En su conjunto, estos datos demuestran una mejora cognitiva en términos de memoria espacial mediado por LP226, que de hecho es aparentemente mayor al observado en los animales que recibieron el tratamiento con DHA. Sin embargo, aunque bajo las condiciones experimentales empleadas en este trabajo, el tratamiento con DHA aparentemente no se muestra tan eficaz como el LP226; debe tenerse en cuenta que su efecto neuroprotector a nivel cognitivo ya ha sido ampliamente demostrado en trabajos anteriores (Lim et al., 2005, Hartmann et al., 2007, Green et al., 2007).

## 2.2 Evolución de la memoria espacial en los animales de 7 y 12 meses de edad

En el presente trabajo se ha incluido el estudio de comportamiento de animales 5XFAD envejecidos hasta la edad de 12 meses con la finalidad de estudiar la eficacia del compuesto LP226 en un estadio avanzado de la EA. En consecuencia, antes de abordar los resultados de este estudio en animales 5XFAD de 12 meses tratados con LP226, estudiamos cómo evolucionaron los parámetros analizados en el LR entre los 7 y los 12 meses de edad de las cepas WT y 5XFAD (Figura R4).



**Figura R4. Evolución cognitiva entre los 7 y 12 meses en animales WT y 5XFAD.** Parámetros analizados en el LR en machos de 7 meses, WT (n=10) y 5XFAD (n=9), y de 12 meses, WT (n=13) y 5XFAD (n=11). (A) La evaluación de la memoria espacial en el LR muestra un deterioro en el grupo control 5XFAD que aumenta con la edad. (B) El tiempo de permanencia de los animales 5XFAD en el laberinto es superior al de los animales WT (C) El comportamiento locomotor no se ve alterado ni por el genotipo (WT o 5XFAD) ni por la edad (7 o 12 meses), tal y como refleja el mantenimiento de la velocidad de ejecución en todos los grupos. Las barras muestran el valor promedio de los animales  $\pm$  SEM. Análisis mediante ANOVA de una vía seguido de test Tukey de comparación múltiple: \* diferencia respecto WT,  $p < 0,05$ ; # diferencia respecto control 5XFAD,  $p < 0,05$ .

Respecto a los animales WT de 7 y 12 meses, no vimos cambios en ninguno de los parámetros analizados en el LR: el número de errores cometidos (totales, RME y WME), el tiempo empleado en el desarrollo de la prueba y la velocidad (Figura R4 A, B y C). Como era de esperar, podemos concluir que no hay pérdida de memoria espacial en los animales WT de 12 meses, ni a corto ni a largo plazo con respecto a los de 7 meses. De igual forma, el mantenimiento de la velocidad durante la prueba refleja una estabilidad de la actividad locomotora de estos animales entre los 7 y los 12 meses. A diferencia de los

animales 5XFAD, en los animales WT ocurre un proceso de envejecimiento normal en el que generalmente no aparecen deficiencias neurológicas asociadas a la edad hasta los 18-24 meses (Rae y Brown, 2015), por lo que, en los animales WT, el intervalo comprendido entre 7 y 12 meses debe ser considerado como correspondiente a la edad adulta.

Referente al envejecimiento patológico propio de los animales 5XFAD, al comparar los resultados de los animales de 7 y 12 meses de esta cepa, vimos un aumento significativo del número de errores cometidos para completar la prueba (Figura R4 A), demostrando una pérdida cognitiva significativa en términos de memoria espacial. Este deterioro cognitivo es consecuencia de la pérdida sináptica y neuronal asociada al proceso de envejecimiento patológico propio de los animales 5XFAD (Oakley et al., 2006). La evaluación de los dos tipos de errores desglosados, nos permite identificar un incremento en los RME, que reflejan la memoria de referencia, y también en los WME, que reflejan el estado de la memoria de trabajo. Estos resultados coinciden con otros trabajos donde ya se describe la evolución en la pérdida de la memoria de trabajo y de referencia con la edad en el modelo 5XFAD (Wei et al., 2016).

Respecto al tiempo de realización de la prueba (Figura R4 B), vimos un aumento progresivo con la edad de acuerdo con el aumento en el número de errores, aunque solo es significativa la diferencia respecto al grupo WT. Por último, la velocidad a la que se desarrolló la prueba (Figura R4 C) fue muy similar en todos los grupos, ya fuesen WT o 5XFAD de 7 o 12 meses. Estos datos están en consonancia con resultados previos (Jawhar et al., 2012) que describen un comportamiento locomotor normal en animales 5XFAD de 6, 9 y 12 meses sin diferencias con los animales WT de la misma edad.

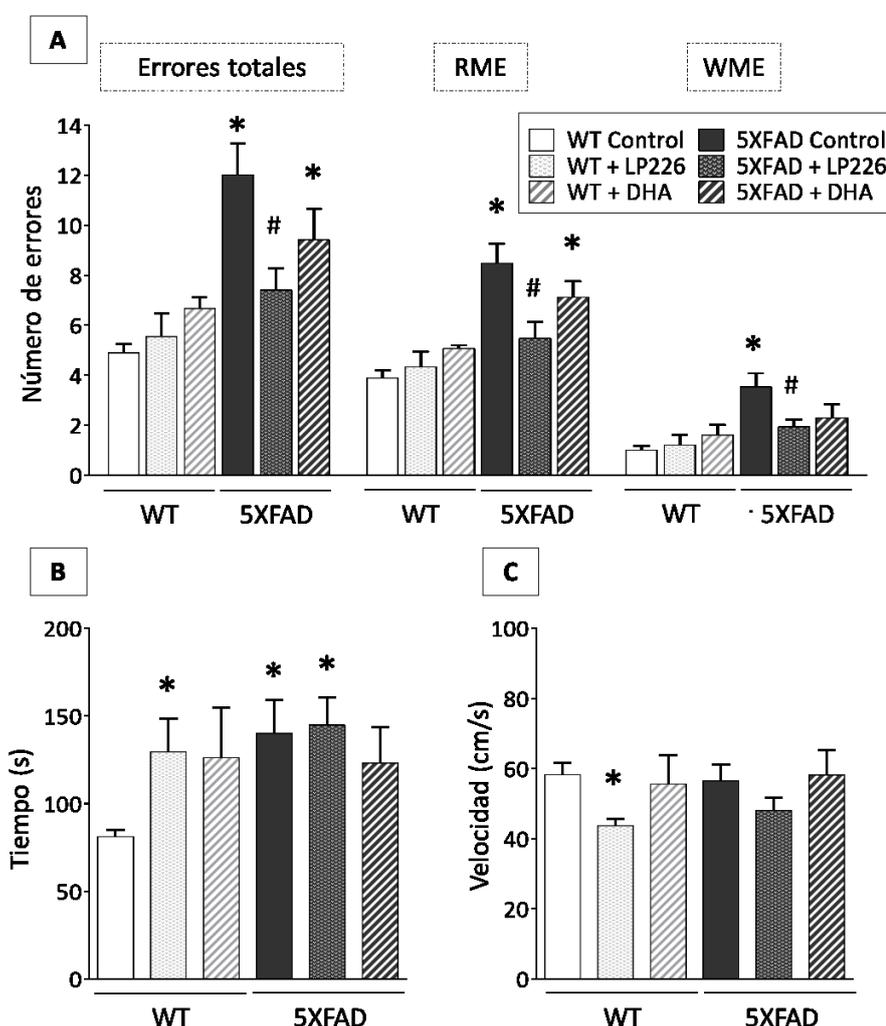
### **2.3 Valoración de la memoria espacial en animales de 12 meses tratados con LP226**

Los diferentes grupos de machos WT y 5XFAD de 12 meses de edad fueron tratados con 20 mg/kg de vehículo, LP226 o DHA durante 4 meses, desde los 8 hasta los 12 meses de edad, y durante el último mes de tratamiento se realizó la prueba comportamental. A continuación, se presentan los resultados de la última semana de prueba.

En relación con el número de errores cometidos (Figura R5 A), por un lado, vemos que no hubo cambios en el número de errores en WT, con o sin tratamiento, tal y como ocurría en los tratamientos realizados en animales WT de 7 meses. Estos datos están en consonancia con el hecho de no encontrar diferencias entre el número de errores cometidos por los animales WT de 7 y 12 meses, ya que al no estar alterada la memoria en estos animales, los tratamientos con LP226 o DHA no mejoran los resultados conseguidos por el grupo control. Si a continuación nos fijamos en el número de errores cometidos por los grupos de animales 5XFAD, vemos de nuevo una reducción significativa en el número de errores que comete el grupo tratado con LP226 respecto al grupo control 5XFAD, tanto en el número de total de errores como en RME y WME, demostrando en este caso que el tratamiento con LP226 es capaz de revertir la pérdida de memoria espacial que experimenta este modelo de EA, incluso si se ha iniciado el tratamiento una vez las deficiencias cognitivas están instauradas. En cambio, los animales que han recibido el tratamiento con DHA muestran un número de errores más elevado, significativamente superior, a los cometidos por el grupo control WT, pero sin diferenciarse estadísticamente del grupo control 5XFAD.

Respecto al tiempo empleado en completar la prueba, este parámetro es significativamente superior en los controles 5XFAD y en los dos grupos tratados con LP226 (WT y 5XFAD) con respecto al control WT. En el control 5XFAD, el aumento en el tiempo de permanencia viene dado por el elevado número de errores cometidos (invierten más tiempo en encontrar los 4 brazos con recompensa). Sin embargo, en los animales tratados con LP226, el número de errores cometidos es muy inferior al control 5XFAD, por lo que este aumento en el tiempo no va asociado a un mayor tiempo invertido en buscar las recompensas, sino a una disminución en la velocidad a la que los animales tratados con LP226 ejecutan la prueba (véase la Figura R5 C). A diferencia de lo que ocurría en animales 5XFAD de 7 meses (véase la

Figura R3), en los animales de 12 meses hemos encontrado un leve descenso en la velocidad en los grupos tratados con LP226. Estos datos podrían ser indicativos de una leve alteración del comportamiento locomotor en los animales de 12 meses tratados LP226. En el resto de grupos, la velocidad de ejecución fue muy similar, tanto entre los controles WT y 5XFAD, como en los animales tratados con DHA.



**Figura R5. Evaluación cognitiva de machos 5XFAD de 12 meses tras el tratamiento crónico con LP226.** Parámetros analizados en el LR en machos de 12 meses WT, tratados con vehículo (n=13), LP226 (n=8) o DHA (n=3) y machos 5XFAD tratados con vehículo (n=11), LP226 (n=9) o DHA (n=4) durante 4 meses a una dosis de 20 mg/kg (A) Se observa un deterioro en la memoria espacial del grupo control 5XFAD que el tratamiento con 20 mg/kg de LP226 es capaz de revertir. (B) Este deterioro supone un mayor tiempo de permanencia en el laberinto para completar la prueba, aunque también se aprecia un aumento en el tiempo de permanencia en los grupos tratados con LP226, debido a un descenso en la velocidad de ejecución. (C) En este sentido, la velocidad es muy similar en todos los grupos, excepto en los animales WT tratados con LP226, que podrían tener alterado el comportamiento locomotor debido al tratamiento. Las barras muestran el valor promedio de los animales  $\pm$  SEM. Análisis mediante ANOVA de una vía seguido de test Tukey de comparación múltiple: \* diferencia respecto WT,  $p < 0,05$ ; # diferencia respecto control 5XFAD,  $p < 0,05$ .

De los resultados aquí presentes podemos concluir que el tratamiento con LP226 es eficaz tanto en el mantenimiento como en la recuperación de las capacidades cognitivas en términos de memoria espacial en animales 5XFAD tratados a 20 mg/kg. Por un lado, el tratamiento con LP226 es capaz de prevenir la pérdida de memoria espacial característica del modelo 5XFAD en animales jóvenes. Estos animales reciben el tratamiento a partir de los 3 meses de edad, cuando el deterioro cognitivo aun no es detectable pero ya se ha iniciado el depósito del péptido A $\beta$  (Oakley et al., 2006). En estos animales el tratamiento con LP226 fue capaz de evitar la pérdida de memoria espacial que sí experimentan los animales control. Por otro lado, en animales de 12 meses, el tratamiento con LP226 también se mostró

significativamente eficaz en la recuperación de la pérdida de memoria en comparación con aquellos animales que recibieron el vehículo. Los resultados obtenidos en este último caso son de especial relevancia, ya que nos encontramos ante la posibilidad de revertir el deterioro cognitivo ya presente en los animales una vez iniciado el tratamiento (Jawhar et al., 2012).

Finalmente, el protocolo utilizado en este trabajo nos ha permitido valorar dos componentes diferenciados de la memoria espacial: la memoria espacial de trabajo o a corto plazo (valorado por los WME) y la memoria espacial de referencia o a largo plazo (valorado por los RME). En este sentido, la mejora cognitiva observada en los animales que han recibido el tratamiento con LP226 se ha producido de forma generalizada, mejorando tanto la memoria a corto plazo, como la memoria a largo plazo. La codificación de la memoria espacial se realiza básicamente en el hipocampo (O'keefe y Nadel, 1978) sin embargo, para la consolidación de la memoria a largo plazo, además del hipocampo es necesaria la implicación de la corteza cerebral (Basu y Siegelbaum, 2015). Nuestros resultados han demostrado que LP226 mejora ambos tipos de memoria, lo que es indicativo de que el efecto de este fármaco no está actuando sólo a nivel hipocampal, sino que también debe actuar a nivel de la corteza cerebral y/u otras estructuras cerebrales implicadas en la consolidación de la memoria.

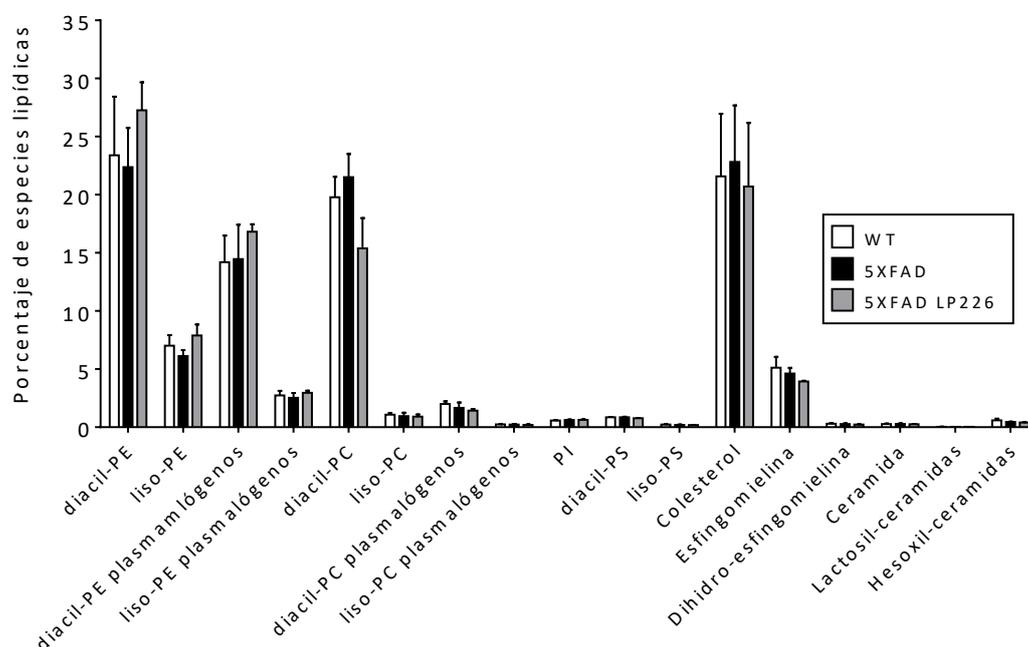
### **3. Estudio del efecto del tratamiento crónico con LP226 en el perfil lipídico de animales 5XFAD**

Una vez demostrada la efectividad del tratamiento con LP226 sobre la recuperación de la memoria espacial en animales 5XFAD, pasamos a estudiar el impacto que tiene el tratamiento crónico con LP226 en el perfil lipídico cerebral de los animales 5XFAD sometidos al tratamiento durante 4 meses.

Por un lado, el hecho de que el fármaco administrado sea un ácido graso poliinsaturado (PUFA, del inglés *polyunsaturated fatty acid*) sugiere que la administración podría inducir cambios en la composición de las membranas cerebrales. En consecuencia, se hace necesario comprobar si su administración provoca algún tipo de cambio en este sentido. Por otro lado, las proteínas humanas sobre-expresadas a nivel neuronal en el modelo 5XFAD (APP y PS1) son proteínas integrales de membrana, por lo que la composición lipídica de la membrana podría regular su función en estos animales. En base a ello, resulta necesario estudiar como fluctúa la composición lipídica de las membranas cerebrales de los animales 5XFAD tratados con LP226. En este sentido analizamos el perfil lipídico de las membranas en el cerebro en animales controles WT y 5XFAD, y animales 5XFAD tratados con LP226 mediante un análisis lipídómico (Figura R6, Tabla R7).

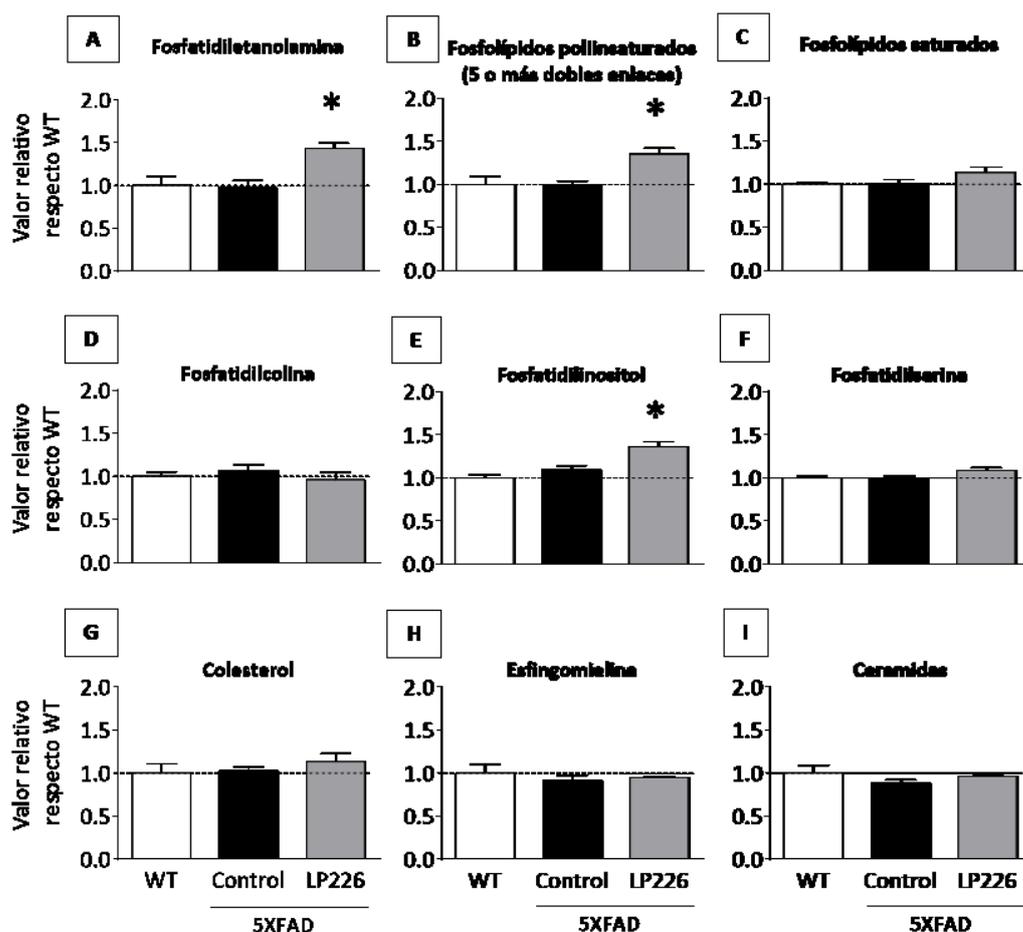
En primer lugar, analizamos la abundancia relativa de cada una de las especies lipídicas en el cerebro de los animales (Figura R6). Los diferentes tipos de fosfatidiletanolaminas (PE) son las más abundantes, ya que constituyen aproximadamente la mitad de los lípidos totales de la membrana en el cerebro de los animales WT y 5XFAD, seguidos por el colesterol, y las especies de fosfatidilcolina (PC). Al comparar el perfil lipídico de los animales 5XFAD respecto a los WT no se apreciaron cambios significativos. Por otro lado, en los animales 5XFAD tratados con LP226 se observó un aumento significativo de la concentración de los fosfolípidos con PUFAs, (aquellos con 5 o más dobles enlaces, por ejemplo, DHA o EPA) sin alterar los niveles de fosfolípidos con ácidos grasos saturados, en comparación con los ratones no tratados WT y 5XFAD (Figura R7). En este sentido, el aumento de fosfolípidos con PUFAs en el cerebro de ratones 5XFAD tratados con LP226 fue debido principalmente al aumento en las especies de PE (Tabla R7). De hecho, el tratamiento con LP226 provocó un aumento significativo cercano al 45% en los niveles totales de PE respecto a los controles 5XFAD y WT (Figura R7). Además, según los datos de abundancia relativa de cada especie lipídica, este incremento en PE en el cerebro de los ratones tratados con LP226 fue debido a un

aumento general de todas las especies de PE analizadas: diacil-PE, liso-PE y sus alquil/alquenil-plasmalógenos (Figura R7).



**Figura R6. Abundancia relativa de los diferentes tipos de lípidos en el cerebro de ratones WT, 5XFAD y 5XFAD tratados con LP226.** Los datos se presentan como porcentaje de cada especie lipídica en relación al total de lípidos estudiados en los cerebros de ratón. Los lípidos más abundantes son los de la familia PE (diacil-PE, liso-PE y sus alquil/alquenil-plasmalógenos), seguido del colesterol, diacil-PC y esfingomielina. Los animales 5XFAD tratados con LP226 presentan niveles superiores de todos los tipos de PE, mientras que el resto de especies lipídicas, como colesterol, diacil-PC y esfingomielina se muestran ligeramente disminuidas en comparación con los controles WT y 5XFAD a consecuencia de los altos niveles de PE. Las barras representan la media de 3 animales  $\pm$  SEM.

En este sentido, y al analizar en detalle las diferentes especies de PE, se observó que el aumento más importante tuvo lugar en la diacil-PE 40:6, con un incremento entorno al 85% respecto a los animales WT, así como a otros tipos de diacil-PE poliinsaturadas (40:5, 38:5, 38:4, 36:5 y 36:4), que también mostraron aumentos importantes en los animales tratados con LP226. Este resultado encajaría con la presencia de niveles elevados de DHA en los lípidos de membranas después del tratamiento con LP226, ya que la diacil-PE 40:6 puede estar constituida por los ácidos grasos 22:6 (DHA) y 18:0. De hecho, nuestro análisis lipidómico también reveló que la liso-PE 18:0 es la subespecie más abundante entre todos los lípidos liso-PE. Puesto que de forma general en la PE los ácidos grasos saturados se sitúan en la posición C1 del glicerol, y los PUFAs se concentran en la posición C2 (Wood y Harlow, 1969), la diacil-PE 40:6 detectada debería llevar DHA en la posición C2 del glicerol. En este mismo contexto, el análisis de la longitud de la cadena acílica de las subespecies de diacil-PE en el cerebro de los animales 5XFAD (Tabla R7) reveló que en los animales 5XFAD tratados con LP226, los niveles de PE con ácidos grasos de cadena larga (40C) y media (36-38C) aumentó más que las PEs con ácidos grasos de cadena corta (32-34C), con un aumento próximo al 50% y 40%, respectivamente, en comparación con los animales WT. Una vez más, no se observaron diferencias significativas cuando se compararon los ratones control WT y 5XFAD. Todos estos datos demuestran que el tratamiento con LP226 produce una elevación en los fosfolípidos de PE en el cerebro de ratones 5XFAD que contiene preferentemente cadenas acilo poliinsaturadas largas/medias (40:6, 40:5, 38:5, 38:4, 36:5 y 36:4).



**Figura R7. Efecto del LP226 en la composición de los lípidos de membrana en el cerebro de ratones 5XFAD.** Los diagramas de columna muestran los cambios lipídicos relativos en los animales 5XFAD tratados con LP226 (barra gris) y en los animales 5XFAD controles (columna negra) en comparación con el grupo WT (que toma el valor relativo 1, columna blanca). Por medio de LC/MS se analizaron los niveles de: (A) fosfatidiletanolamina (diacil-PE, liso-PE y sus plasmalógenos), (B) fosfolípidos poliinsaturados (con 5 o más dobles enlaces), (C) fosfolípidos saturados, (D) fosfatidilcolina (diacil-PC, liso-PC y sus plasmalógenos), (E) fosfatidilinositol (diacil-PI), (F) fosfatidilserina (diacil-PS y liso-PS), (H) esfingolípidos (esfingomielina y dihidroesfingomielina) y (I) ceramidas (ceramida, lactosil-ceramida y hexosil-ceramidas). Los niveles de (G) colesterol se determinaron mediante un ensayo colorimétrico. Estos datos muestran un aumento significativo de los niveles de PE (A), PI (E) y fosfolípidos con PUFAs (B) en los animales 5XFAD tratados con LP226 en comparación con los animales 5XFAD y WT controles. No se aprecian diferencias remarcables entre los animales 5XFAD y WT para ninguno de los lípidos analizados. Las columnas representan el valor promedio de 3 animales  $\pm$  SEM. Análisis mediante ANOVA de una vía, seguido de test Tukey de comparación múltiple; \*  $p < 0,05$  respecto a WT.

Por último, el tratamiento con LP226 también puede asociarse con un aumento significativo en los niveles de fosfatidilinositol (PI) en el cerebro de los ratones 5XFAD (Figura R7). Por el contrario, no se observaron cambios significativos en otros tipos de fosfolípidos, como PC o fosfatidilserina (PS). Tampoco hubo diferencias significativas en otras clases de lípidos, tales como el colesterol, los esfingolípidos (esfingomielina y dihidroesfingomielina) y las ceramidas (ceramida, hexosilo-ceramidas y lactosil-ceramida). Sin embargo, los elevados niveles de PE detectadas en el cerebro de los ratones 5XFAD tratados con LP226 implican también una disminución en la abundancia relativa de otros lípidos, como el colesterol, el diacil-PC y la esfingomielina (véase la Figura R6).

Subespecies de diacil-PE	WT		5XFAD				5XFAD + LP226		
	Media <sup>1</sup>	SEM <sup>1</sup>	Media <sup>1</sup>	SEM <sup>1</sup>	% cambio <sup>2</sup>		Media <sup>1</sup>	SEM <sup>1</sup>	% cambio <sup>2</sup>
<b>Cadenas acilo cortas</b>	32:0	112	3	105	3	-6,3 ± 3,0 ns	134	3	19,6 ± 3,0 **
	32:1	168	4	205	39	22,2 ± 22,9 ns	240	13	42,5 ± 7,7 ns
	34:1	2.197	148	1.817	71	-17,3 ± 3,2 ns	3.030	188	37,9 ± 8,5 **
	34:2	326	25	372	71	14,4 ± 21,7 ns	402	17	23,5 ± 5,4 ns
	<b>Subtotal</b>	<b>2.803</b>	<b>154</b>	<b>2.500</b>	<b>85</b>	<b>-10,7 ± 3,0 ns</b>	<b>3.805</b>	<b>216</b>	<b>35,7 ± 7,7 **</b>
<b>Cadenas acilo medianas</b>	36:1	3.862	477	3.332	185	-13,7 ± 4,8 ns	5.426	204	40,5 ± 5,3 **
	36:2	3.108	195	2.584	98	-16,9 ± 3,2 ns	4.319	210	39,0 ± 6,8 **
	36:3	274	30	254	27	-7,2 ± 9,9 ns	303	22	10,4 ± 8,2 ns
	36:4	3.184	454	3.416	465	7,3 ± 14,6 ns	5.390	352	69,3 ± 11,0 *
	36:5	201	16	318	69	58,8 ± 34,6 ns	295	11	46,9 ± 5,5 *
	38:1	588	12	441	50	-24,9 ± 8,5 ns	713	53	21,4 ± 9,0 *
	38:2	547	18	389	6	-28,8 ± 1,0 *	593	57	8,5 ± 10,4 ns
	38:4	16.804	2.171	16.670	1.969	-0,8 ± 11,7 ns	24.716	1.072	47,1 ± 6,4 *
	38:5	2.799	135	2.903	143	3,7 ± 5,1 ns	4.579	90	63,6 ± 3,2 ***
	38:6	13.444	2.330	12.244	821	-8,9 ± 6,1 ns	16.532	1.412	23,0 ± 10,5 ns
38:7	244	30	340	100	38,9 ± 40,8 ns	425	19	73,7 ± 7,6 ns	
<b>Subtotal</b>	<b>45.054</b>	<b>5.749</b>	<b>42.891</b>	<b>3.716</b>	<b>-4,8 ± 8,2 ns</b>	<b>63.290</b>	<b>3.171</b>	<b>40,4 ± 7,0 *</b>	
<b>Cadenas acilo largas</b>	40:1	174	13	106	17	-38,9 ± 9,7 ns	160	23	-8,0 ± 13,0 ns
	40:3	2.768	369	2.764	315	-0,2 ± 11,4 ns	4.121	257	48,9 ± 9,3 ns
	40:5	26.517	3.064	26.194	2.062	-1,2 ± 7,8 ns	38.945	2.170	46,9 ± 8,2 *
	40:6	3.289	896	3.901	785	18,6 ± 23,9 ns	6.089	286	85,2 ± 8,7 *
<b>Subtotal</b>	<b>32.747</b>	<b>4.196</b>	<b>32.964</b>	<b>3.137</b>	<b>0,7 ± 9,6 ns</b>	<b>49.314</b>	<b>2.633</b>	<b>50,5 ± 8,0 *</b>	
<b>Total</b>	<b>80.605</b>	<b>10.036</b>	<b>78.356</b>	<b>6.833</b>	<b>-2,8 ± 8,5 ns</b>	<b>116.411</b>	<b>10.334</b>	<b>44,4 ± 7,4 *</b>	

<sup>1</sup> La cuantificación de las subespecies de diacil-fosfatidiletanolamina (PE, media±SEM) se muestra como pmol de lípidos/mg de proteína. <sup>2</sup> El cambio relativo en los animales 5XFAD controles o 5XFAD tratados con LP226 en función de la media a los animales WT, se presenta como media ± SEM.

**Tabla R7. Caracterización por LC/MS de las cadenas acilo de diacil-PE en el cerebro de animales 5XFAD tratados con LP226. El tratamiento con LP226 produce una elevación en los fosfolípidos de PE en el cerebro de ratones 5XFAD que contiene preferentemente cadenas acilo poliinsaturados largas/medias (40:6, 40:5, 38:5, 38:4, 36:5 y 36:4). Análisis mediante ANOVA de una vía, seguido de test Tukey de comparación múltiple; ns: no significativo\* p<0,05 respecto WT.**

En su conjunto, todos los cambios observados en la composición lipídica de la membrana tras el tratamiento con LP226 en los animales 5XFAD pueden influir en las propiedades de la membrana. Por una parte, entre los PUFAs y los esteroides existe una aversión que impulsa hacia la segregación lateral de las especies con PUFAs hacia dominios líquido-desordenados (de composición y estructura opuestos a las regiones tipo *raft*). Además, la longitud y el grado de saturación de estos PUFAs influencia la estructura y la funcionalidad de la membrana de forma que a mayor número de insaturaciones, mayor sería el desorden de la membrana (Wassall y Stillwell, 2009). En este sentido, el aumento de las diferentes especies de PE y de PUFAs como el DHA (altamente insaturado) en la membrana de los animales tratados con LP226, daría lugar a la formación de estructuras líquido-desordenadas y por tanto se reducirían la proporción de regiones tipo *rafts* (Ibarguren et al., 2014). La estructura de la membrana lipídica es de gran relevancia en el desarrollo de la EA, ya que el procesamiento amiloidogénico de APP tiene lugar de forma preferente en las regiones tipo *raft*, mientras que la actividad  $\alpha$ -secretasa se localiza fuera de estas regiones (Vetrivel y Thinakaran, 2010). Por lo tanto, los cambios observados en la membrana debido al tratamiento con LP226 hacia estructuras de membrana de mayor fluidez podría interferir directamente o indirectamente en el procesamiento proteolítico de la proteína APP.

### **4. Estudio del efecto del tratamiento crónico con LP226 en el procesamiento de la proteína precursora de amiloide (APP) en el modelo animal 5XFAD.**

Hasta el momento, hemos demostrado la eficacia del tratamiento con LP226 en la recuperación cognitiva de animales 5XFAD, así como los cambios lipídicos asociados al tratamiento en el cerebro de estos mismos animales. Estos cambios sugieren la existencia de estructuras de membrana de mayor fluidez, donde las proteínas de la membrana serían capaces de interactuar de forma diferente en comparación con las membranas de los animales que no recibieron el tratamiento. Con la finalidad de reconocer los mecanismos implicados en la recuperación cognitiva, y detectar los posibles efectos que tendría la modulación lipídica en el desarrollo de la EA, pasamos a analizar el procesamiento de la proteína APP en nuestro modelo de EA.

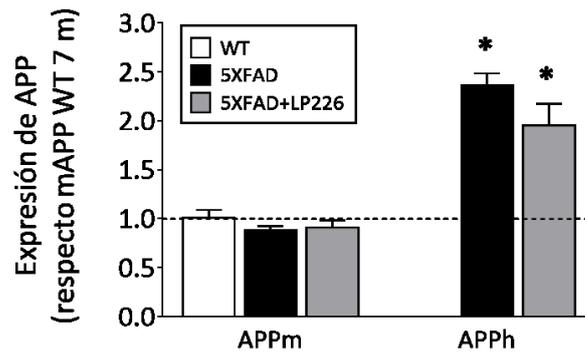
El modelo utilizado en este trabajo, la cepa 5XFAD, es un modelo tipo APP/PS1 que sobre-expresa una forma mutada de las proteínas humanas APP (proteína precursora de amiloide) y PS1 (presenilina 1) en neurona y que consigue replicar varios de los marcadores neuropatológicos de la EA desde edades tempranas, como es la acumulación del péptido A $\beta$  a partir de los 2 meses de edad, la degeneración cognitiva a partir de los 4 meses, la degeneración sináptica y neuronal a los 9 meses, etc. (Oakley et al., 2006) (véase el apartado 1.1. del capítulo de Materiales y Métodos).

Puesto que la proteína APP es una proteína transmembrana y los enzimas implicados en su procesamiento (secretasas) realizan su función en el entorno de la membrana lipídica, resulta de especial interés analizar el efecto que tiene el tratamiento con LP226 en el procesamiento de la proteína APP y en la producción del péptido amiloide. Todos estos estudios se realizaron en machos WT y 5XFAD de 7 y 12 meses, tratados con vehículo (animales control) o 20 mg/kg de LP226 o DHA durante 4 meses.

#### **4.1 Análisis de la expresión y procesamiento de APP en animales 5XFAD tras el tratamiento con LP226**

Al tratarse de una molécula nueva, de síntesis artificial, en primer lugar, debemos comprobar el efecto del tratamiento con LP226 sobre la expresión del transgén humano APP. En nuestro modelo de estudio, la expresión de las proteínas humanas APP y PS1 está bajo control del promotor Thy-1, que produce una alta expresión constitutiva de estas proteínas en neuronas. En consecuencia, es de vital importancia investigar si el tratamiento con alguna droga tiene influencia sobre la expresión de los transgenes, ya que la alteración de esta expresión por el compuesto en estudio podría invalidar el modelo utilizado. Para ello analizamos la expresión por PCR a tiempo real de la proteína APP endógena murina (APP<sub>m</sub>), así como del transgén APP humano (APP<sub>h</sub>). Por un lado, vimos que la expresión del gen endógeno, APP<sub>m</sub>, es igual en los animales WT y 5XFAD (Figura R8). En lo que respecta a la expresión del transgén APP<sub>h</sub>, solamente se detectó en los animales 5XFAD, con una expresión aproximadamente dos veces superior a la del gen endógeno. Por último, en los animales 5XFAD tratados con LP226 no se observaron diferencias significativas en la expresión tanto del gen endógeno como del transgén humano de APP. Comprobamos así que el tratamiento con LP226 no tiene ningún efecto en la expresión de APP, tanto del gen endógeno como del transgén humano (Figura R8).

Por lo que respecta al efecto del DHA sobre la expresión del transgén, el hecho de tratarse de una molécula que se encuentra de forma natural en el cerebro, además en elevadas proporciones (Lauritzen et al., 2016), hace innecesaria esta comprobación. Por otro lado, la existencia de numerosos estudios con modelos murinos de EA tratados con DHA, valida el uso de estos modelos en este tipo de tratamiento (Grimm et al., 2011, Grimm et al., 2013).



**Figura R8. Expresión de APP humano y murino en el cerebro de animales WT y 5XFAD de 7 meses.** La expresión genética de APP murina (APPm) y APP humana (APPh) se determinó mediante PCR a tiempo real usando cebadores específicos. La expresión de APPh sólo se detectó en los animales 5XFAD y no se encontraron diferencias significativas entre los animales 5XFAD tratados con LP226 y los animales 5XFAD control. Además, en los animales 5XFAD, la expresión del gen humano fue muy superior a la del gen murino. Las columnas muestran el valor promedio de 3 animales  $\pm$  SEM. Análisis mediante ANOVA de una vía, seguido de test Tukey de comparación múltiple: \*  $p < 0,05$  respecto APPm WT-7 meses.

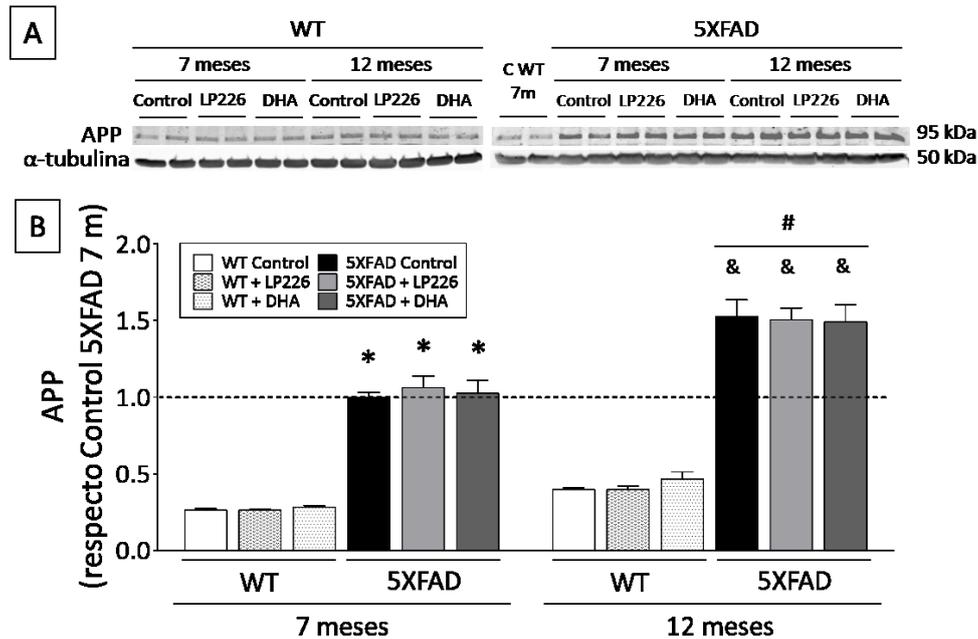
En segundo lugar, comprobamos cuáles son los niveles basales de la proteína APP en los animales WT y 5XFAD de 7 y 12 meses de edad. Para ello, analizamos por *western blot* (WB) extractos de proteínas de hipocampo de animales WT y 5XFAD controles y tratados con LP226 y DHA, en los rangos de edad estudiados, 7 y 12 meses. Por un lado, observamos que los niveles de APP en los animales 5XFAD son mucho mayores que en animales WT. Este incremento está acorde con los resultados de expresión de APP presentados en la Figura R8. Además, cabe destacarse que la proteína APP detectada mediante WB en los animales 5XFAD corresponde a la suma de ambas: APPm y APPh.

En lo que respecta a los animales WT, no se apreció ningún cambio significativo en los niveles de APP tras el tratamiento crónico con LP226 o DHA. Tampoco se apreciaron cambios significativos entre las muestras de 7 y 12 meses de edad. En cambio, en los animales 5XFAD vimos un aumento cercano al 50% en los niveles de APP entre los 7 y los 12 meses. Este incremento está en consonancia con otros trabajos que presentan datos de la acumulación de APP con el envejecimiento en animales transgénicos APP/PS1, debido a la acumulación de la proteína en las neuritas distróficas (Torres et al., 2012). Finalmente, como era de esperar, de acuerdo a los datos de expresión génica, el tratamiento con LP226 o DHA no modifica los niveles de APP en animales 5XFAD, ni en 7 ni en 12 meses de edad (véase la Figura R9).

A continuación, evaluamos el procesamiento de APP en los animales 5XFAD de 7 y 12 meses, y su posible alteración tras el tratamiento crónico con LP226. Brevemente, APP es una proteína transmembrana que es procesada de forma secuencial por una serie de secretasas en el entorno de la membrana. Este procesamiento puede darse por dos vías diferentes: la vía no amiloidogénica, no patogénica, y la vía amiloidogénica, que da lugar a la formación del péptido A $\beta$ . Ambas rutas ocurren de forma normal en condiciones no patológicas. Sin embargo, la última de estas dos está estimulada en la EA (Zhang et al., 2011, Jimenez et al., 2014). En el primer caso, el procesamiento lo inicia la  $\alpha$ -secretasa, que realiza un corte en la parte extracelular de APP, liberando un fragmento soluble conocido como sAPP $\alpha$  y dejando un fragmento APP-C terminal (APP-CTF, del inglés *APP-C terminal fragment*) anclado a la membrana, conocido como C83. En el caso del procesamiento por la vía amiloidogénica, el primer corte lo realiza la  $\beta$ -secretasa, y supone la formación de un fragmento soluble, el sAPP $\beta$  y otro APP-CTF, el fragmento C99. Este último será procesado de nuevo por la  $\gamma$ -secretasa, generando así el péptido A $\beta$  (para más detalles véase el apartado 4 de la Introducción). En este sentido, para abordar el estudio del procesamiento de APP, empezamos analizando por WB los niveles de los fragmentos sAPP $\alpha$ , APP-CTFs y péptido A $\beta$  en muestras de proteína total de hipocampo en animales 5XFAD. A modo de control, se incluyó

## Resultados

una muestra de un animal WT, en la que la presencia de estos fragmentos fue prácticamente indetectable (Figura R10 A).

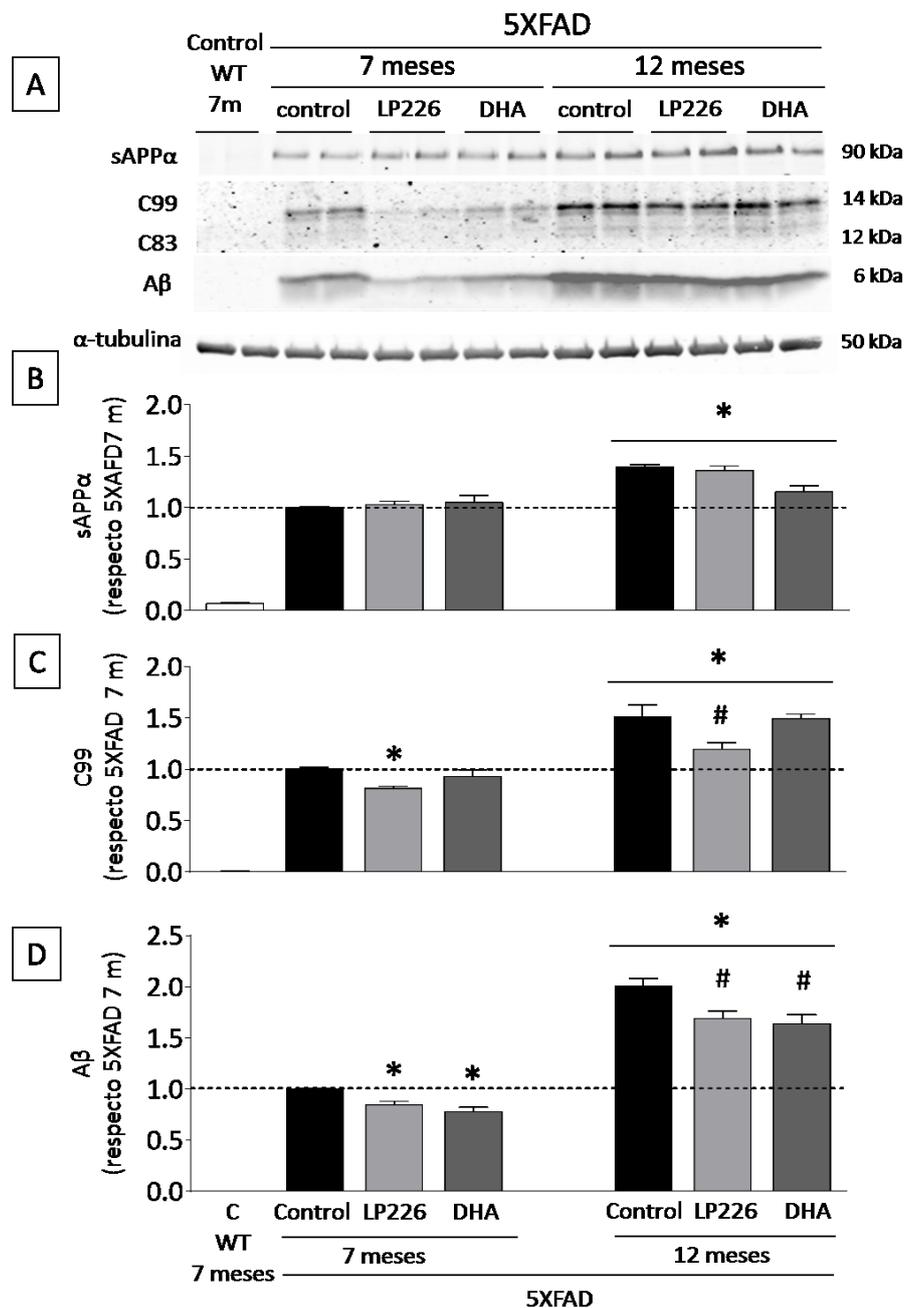


**Figura R9. Niveles de APP en el hipocampo de animales WT y 5XFAD de 7 y 12 meses, controles y tratados con LP226.** (A) WB representativo para la cantidad de APP en animales de 7 y 12 meses controles y tratados con LP226 y DHA (B) Los animales 5XFAD de 7 meses tienen unos niveles de APP hasta 4 veces superior a los animales WT. Con la edad se produce una acumulación del 50% de esta proteína en los animales 5XFAD de 12 meses. El análisis se realizó en muestras de mixtas de 4-6 animales cada una, para cada una de las condiciones testadas. Las columnas muestran el promedio de 3 experimentos  $\pm$  SEM. Análisis mediante ANOVA de una vía, seguido de test Tukey de comparación múltiple: \*  $p < 0,05$  respecto control WT-7 meses; #  $p < 0,05$  respecto control 5XFAD-7 meses; &  $p < 0,05$  respecto control WT-12 meses.

En primer lugar, evaluamos los niveles del fragmento sAPP $\alpha$  (Figura R10 B), producto del procesamiento no amiloidogénico de APP. Por un lado, vemos como a los 7 meses, el nivel de este fragmento se mantuvo estable en todos los grupos, sin verse afectado por el tratamiento crónico con LP226 o DHA. En lo que respecta a la evolución con la edad, se produjo un aumento significativo de aproximadamente un 40% a los 12 meses cuando son comparados con los de 7 meses. Este incremento es esperable en base al aumento de APP asociado a la edad (véase la Figura R9). Al igual que ocurría en animales de 7 meses, en los animales de 12 meses, los niveles de sAPP $\alpha$  se mantuvieron estables con los tratamientos con LP226 y DHA. Estos resultados coinciden con resultados previos obtenidos en una línea estable de neuroblastomas N2a que sobre-expresan APP, donde el tratamiento con LP226 no muestra efecto alguno sobre los niveles de sAPP $\alpha$  (Torres et al., 2014).

Referente a los fragmentos C-terminales (CTFs) generados en el procesamiento de APP, en las muestras de animales 5XFAD observamos una doble banda (fragmento fosforilado y nativo) correspondiente al fragmento C99 (14 KDa) procedente del procesamiento de la APP por parte de la  $\beta$ -secretasa. El fragmento C83 (12 KDa, doble banda, fragmente fosforilado y nativo) generado por el procesamiento  $\alpha$ -secretasa de APP, es minoritario y difícilmente detectable en estas condiciones (véase la Figura R10 A). En este sentido, si nos centramos en el fragmento C99 (Figura R10 C), destaca el descenso entorno al 20% que se aprecia en los animales de 7 meses tratados con LP226. Sin embargo, en los animales tratados con DHA no se aprecian diferencias respecto al control 5XFAD. A continuación, en los animales control de 7 y 12 meses, la cuantificación del fragmento C99 revela un aumento del 50% asociado al envejecimiento de los animales 5XFAD, siguiendo el mismo patrón que hemos visto anteriormente con

los niveles de la proteína APP y del fragmento sAPP $\alpha$ . En estos animales de 12 meses, el tratamiento con LP226 también indujo una leve reducción de los niveles de C99 mientras que el tratamiento con DHA aparentemente no tuvo ningún efecto.



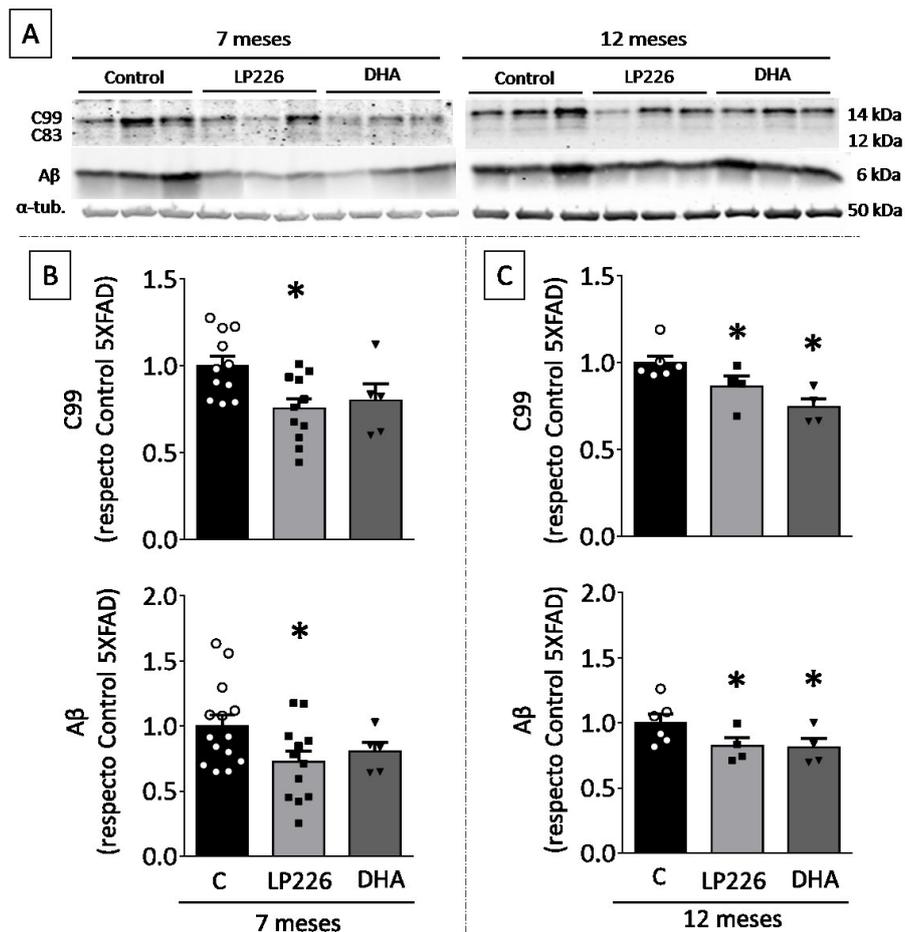
**Figura R10. Estudio del procesamiento de APP en el hipocampo de animales 5XFAD de 7 y 12 meses, tratados con LP226.** (A) WB representativo para sAPP $\alpha$ , APP-CTFs (C99 y C83) y péptido A $\beta$  en animales de 7 y 12 meses controles y tratados con LP226 y DHA. (B) Los niveles de sAPP $\alpha$  aumentan un 40% con la edad, pero se mantienen estables con el tratamiento. (C) Los niveles del fragmento C99 aumentan un 50% en los animales de 12 meses, y en ambos grupos de edad el tratamiento con LP226 reduce los niveles. (D) De igual forma, detectamos un aumento de péptido A $\beta$  en los animales de 12 meses, en este caso cercano al 100%, y el tratamiento con LP226, reduce los niveles tanto en los animales de 7 como de 12 meses. El análisis se ha realizado en muestras mixtas de 4-6 animales cada una, para cada una de las condiciones testadas. Las columnas muestran el promedio de 3 experimentos  $\pm$  SEM. Análisis mediante ANOVA de una vía, seguido de test Tukey de comparación múltiple: \*  $p < 0,05$  respecto control 5XFAD-7 meses; #  $p < 0,05$  respecto control 5XFAD-12 meses.

## Resultados

Por último, analizamos los niveles de A $\beta$ , péptido resultante del procesamiento de C99 por el complejo  $\gamma$ -secretasa (véase la Figura R10 A). En este sentido, vemos como los niveles de A $\beta$  total en los animales de 7 meses experimentaron un descenso significativo en los animales tratados cuando se comparan con el control 5XFAD, tanto para LP226 como DHA (Figura 10 D). En lo referente a los animales de 7 y 12 meses, la cuantificación del péptido A $\beta$  muestra un aumento estadísticamente significativo en los animales de 12 meses, que presentan el doble de carga amiloide que los animales de 7 meses. El tratamiento en los animales viejos también resultó efectivo en la disminución de los niveles de A $\beta$  en las muestras de proteína total, con una reducción significativa en los animales tratados con LP226 y DHA.

En su conjunto, estos resultados sugieren que el tratamiento crónico con LP226 actúa sobre el procesamiento de APP por la vía amiloidogénica, siendo capaz de reducir ligeramente tanto los niveles de C99 como la carga amiloide en animales 5XFAD, indicando de este modo que el fármaco podría estar modulando la  $\beta$ -secretasa. Por lo que respecta al DHA, el efecto en la reducción de los niveles de C99 ya ha sido demostrado con anterioridad en la literatura (Lim et al., 2005), aunque en las condiciones experimentales aquí seguidas no hayamos sido capaces de detectar esta bajada.

El descenso moderado observado en C99 y en A $\beta$ , se estudió en más profundidad analizando los niveles de C99 y del péptido A $\beta$  en muestras de animales individuales, para ver la dispersión de los datos y confirmar los resultados obtenidos en estos primeros experimentos (Figura R11).



**Figura R11. Niveles de C99 y A $\beta$  en el hipocampo de animales WT y 5XFAD de 7 y 12 meses tratados con LP226 y DHA.** (A) WB representativo de los niveles de APP-CTFs y péptido A $\beta$  en animales 5XFAD controles y tratados con LP226 y DHA, a los 7 y 12 meses edad. (B) Los animales de 7 meses tratados con LP226 experimentan una importante reducción en los niveles de C99 y A $\beta$  (C) De igual forma, los animales de 12 meses que han sido tratados con LP226 reducen de forma significativa los niveles de C99 y A $\beta$ . Las columnas muestran el promedio  $\pm$  SEM. Análisis mediante ANOVA de una vía, seguido de test Tukey de comparación múltiple: \*  $p < 0,05$  respecto control WT-7 meses; #  $p < 0,05$  respecto control 5XFAD-7 meses.

El análisis con muestras individuales en los animales 5XFAD de 7 meses confirmó la reducción de los niveles de C99, con una bajada cercana al 25% en los animales tratados con LP226; muy similar a la bajada observada en la carga amiloide, que también experimenta una bajada del 25% respecto a los controles (Figura R11 B). En referencia a los animales tratados con DHA, se observa también una bajada en los niveles tanto de C99, como de A $\beta$ , cercana al 20% en ambos casos (Figura R11 B), aunque el reducido número de animales testados, y la dispersión de los datos, no nos permiten ver cambios significativos. Por otro lado, si nos fijamos en los animales de 12 meses, podemos confirmar la reducción en los niveles de C99 y A $\beta$ , con una reducción cercana al 20% en ambos casos en los animales que han recibido LP226 (Figura R11 C). Por lo que respecta a los animales tratados con DHA, detectamos una bajada de aproximadamente un 25% en los niveles de C99 y cercana al 20% en los niveles de A $\beta$  (Figura R11 C).

En su conjunto estos resultados demuestran una disminución en el procesamiento amiloidogénico de APP en los animales que han recibido un tratamiento crónico con LP226, independientemente de que este tratamiento se haya iniciado a una edad temprana, o en animales con un estadio más avanzado de la patología.

#### **4.2 Estudio de la actividad secretasa implicada en la producción de A $\beta$ en animales 5XFAD tras el tratamiento crónico con LP226**

Una vez estudiados los niveles de los diferentes fragmentos originados en la ruta amiloidogénica tras el tratamiento con LP226, pasamos a analizar los mecanismos que podrían estar participando en la modulación de esta ruta. En este sentido, nuestra hipótesis de trabajo fue que la disminución en los niveles del fragmento C99 podría estar motivado por cambios en el procesamiento de APP por parte de la  $\beta$ -secretasa y, por tanto, la reducción en los niveles del péptido A $\beta$  sería consecuencia de la bajada en los niveles de C99. Para comprobar nuestra hipótesis, en primer lugar se analizaron los niveles de las secretasas implicadas en la ruta amiloidogénica: la proteína BACE-1, considerada la principal enzima con actividad  $\beta$ -secretasa en el cerebro (Vassar et al., 2009) y el fragmento CTF de la proteína PS1, componente del centro activo del complejo  $\gamma$ -secretasa (De Strooper, 2003). Por otro lado, al no haber encontrado diferencias en los niveles del fragmento sAPP $\alpha$  en los animales tratados con LP226 (véase la Figura R10), prescindimos de entrar en un análisis más exhaustivo de esta vía de procesamiento de la proteína APP.

##### **4.2.1 Estudio de los niveles enzimáticos de las secretasas de la vía amiloidogénica**

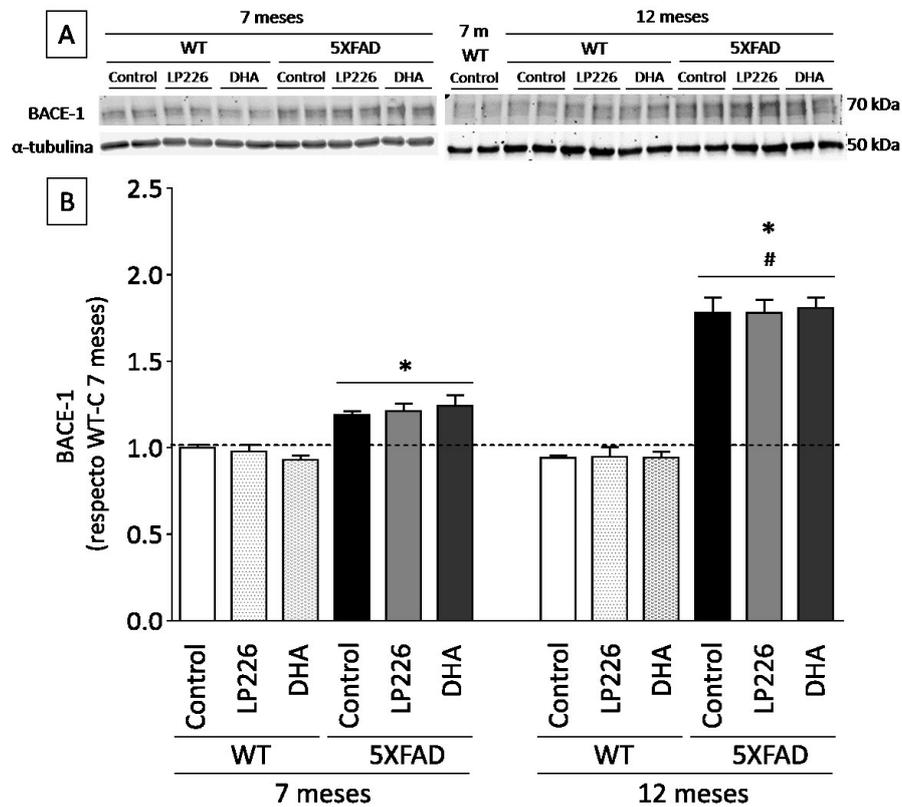
El estudio de los niveles de la proteína BACE-1 madura en muestras de proteína total de hipocampo en animales WT y 5XFAD de 7 y 12 meses, controles y tratados con LP226 y DHA, reveló una banda difusa de aproximadamente 70 KDa que corresponde a la forma madura de BACE-1. Está descrito que la proteína BACE-1 es liberada de su pro-dominio y glicosilada con carbohidratos complejos en el aparato de Golgi, lo que explicaría el aumento en el peso molecular y el aspecto de la banda correspondiente a la forma madura (Vassar et al., 2009).

Los resultados obtenidos en los animales de 7 meses (Figura R12) mostraron un aumento cercano al 20% de la forma madura de BACE-1 en los animales 5XFAD cuando se comparan con los animales WT (Figura R12 A), tal y como ha sido descrito anteriormente en la literatura en los animales 5XFAD (Zhao et al., 2007). En lo que respecta al tratamiento con LP226, no se observan cambios significativos en los niveles de BACE-1 maduro, ni en los animales WT ni en los animales 5XFAD tratados con este compuesto, así como tampoco se aprecian cambios significativos en los grupos tratados con DHA (Figura R12 B). En cuanto a los animales de 12 meses (Figura R12 B), observamos una estabilización de los niveles BACE-1 en los animales WT, independientemente del tratamiento recibido. Respecto a los animales 5XFAD, observamos un incremento cercano al 50% en los niveles de BACE-1 respecto a los animales 5XFAD de 7

## Resultados

meses. De nuevo, no se observaron diferencias significativas en los niveles de BACE-1 en los animales que han recibido el tratamiento con LP226, ni en los que recibieron DHA al comparar con los controles 5XFAD.

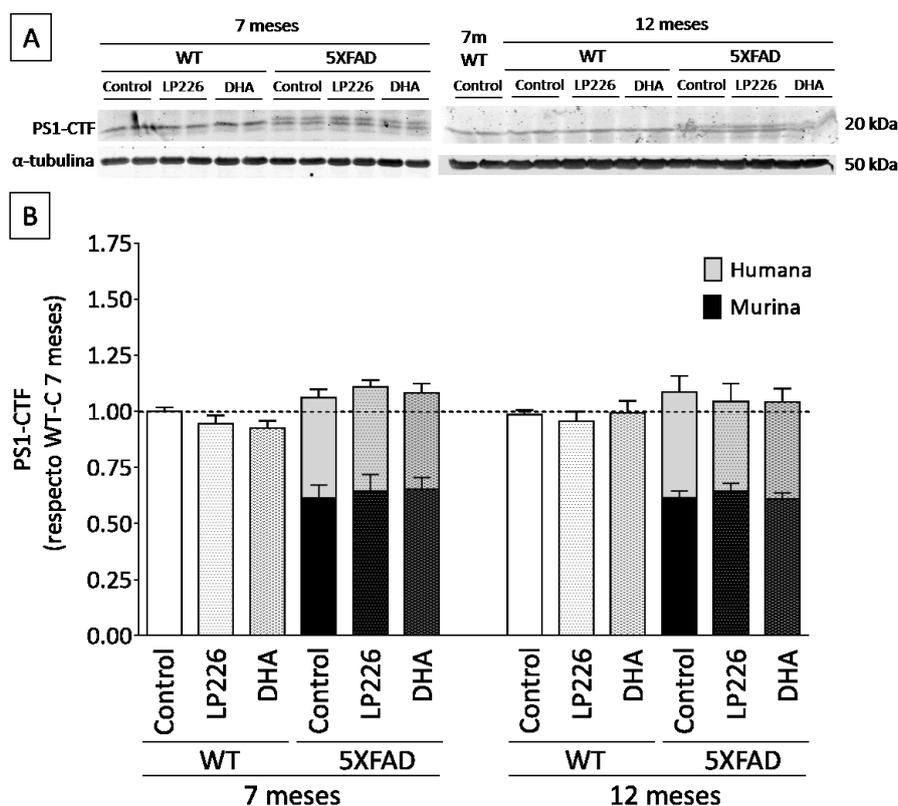
Estos datos demuestran que los niveles de BACE-1 están incrementados en la cepa 5XFAD e indican una acumulación asociada a la edad. Por otro lado, y a la vista de los resultados presentados, descartamos que el tratamiento crónico con LP226 module los niveles de BACE-1 maduro, al igual que ocurre con la molécula nativa, el DHA, como ya había sido descrito anteriormente (Grimm et al., 2011).



**Figura R12. Estudio de BACE-1 por WB en animales WT y 5XFAD de 7 y 12 meses tras tratamiento crónico con LP226.** (A) WB representativo para BACE-1 de WT y 5XFAD de 7 y 12 meses, controles y tratados con LP226 y DHA durante 4 meses. (B) En los animales WT los niveles de BACE-1 se mantienen estables independientemente de la edad. Los animales 5XFAD presentan niveles de BACE-1 superiores a los animales WT y con la edad se produce un aumento significativo. En ningún caso los tratamientos han modulado los niveles de la proteína BACE-1. El análisis se ha realizado en muestras mixtas de 3-6 animales cada uno, para cada una de las condiciones testadas. Las columnas muestran el promedio de 3 experimentos  $\pm$  SEM. Análisis mediante ANOVA de una vía, seguido del test Tukey de comparación múltiple: \*  $p < 0,05$  respecto WT 7 meses; #  $p < 0,05$  respecto 5XFAD 7 meses; &  $p < 0,05$  respecto WT 12 meses.

A continuación, abordamos el estudio de los niveles de la proteína PS1 en las mismas muestras, mediante la cuantificación por WB del fragmento PS1-CTF. Los fragmentos C y N-terminal de PS1 forman parte del centro activo del complejo  $\gamma$ -secretasa (Laudon et al., 2004) y se generan mediante endoproteólisis de la forma completa durante la maduración del complejo (Thinakaran et al., 1996, De Strooper, 2003), por lo que el análisis de PS1-CTF representa una lectura indirecta del complejo  $\gamma$ -secretasa maduro. El anticuerpo utilizado en el WB reconoce el fragmento CTF de la PS1 en torno a 20 KDa. Este fragmento es producto del procesamiento de PS1 por parte de Pen2 dentro del complejo  $\gamma$ -secretasa maduro (Takasugi et al., 2003), en consecuencia, el fragmento CTF de la PS1, sólo se encuentra, a priori, formando parte del complejo  $\gamma$ -secretasa. En los animales WT, el fragmento CTF murino se observa como una única banda en torno a los 20 KDa, mientras que en los animales 5XFAD aparece una segunda banda de movilidad electroforética ligeramente menor a la primera y que corresponde al

fragmento CTF de la forma humana (véase la Figura R13 A) (Thinakaran et al., 1996). En este sentido, en los animales 5XFAD, los niveles de PS1-CTF total comprenden a la suma de la isoforma humana y murina.



**Figura R13. Estudio de PS1-CTF por WB en animales WT y 5XFAD de 7 y 12 meses tratados con LP226 y DHA.** (A) WB representativo para PS1-CTF en muestras de animales WT y 5XFAD de 7 y 12 meses, controles y tratados con LP226 y DHA durante 4 meses. (B) Los niveles de PS1-CTF son similares en los animales WT y 5XFAD tanto a 7 como a 12 meses, sin que se observe un aumento con la edad en ninguna de las dos cepas. En ningún caso se aprecia una modulación de los niveles de PS1-CTF por los tratamientos. El análisis se ha realizado en muestras mixtas de 3-6 animales cada uno, para cada una de las condiciones analizadas. Las columnas muestras el promedio de 3 experimentos  $\pm$  SEM. Análisis mediante ANOVA de una vía, seguido del test Tukey de comparación múltiple.

Los niveles de PS1-CTF fueron muy similares en los animales WT y en los animales 5XFAD de 7 meses, si bien en estos últimos, la isoforma humana representa aproximadamente un 60 % del total. En ningún caso vimos variaciones a causa del tratamiento con LP226, ni en los niveles de PS1-CTF, ni en el porcentaje correspondiente a cada isoforma. De nuevo, el tratamiento con DHA tuvo efectos similares a los observados con el LP226. Por otro lado, en animales de 12 meses, los niveles de PS1 fueron muy similares a los observados a los 7 meses, sin apreciarse un aumento con la edad, ni en los animales WT, ni en los 5XFAD. En lo referente al tratamiento con LP226, al igual que ocurría en los animales de 12 meses, no se observó ninguna diferencia respecto el control o el tratamiento con DHA.

En resumen, los resultados aquí presentados sugieren que el tratamiento con LP226 no modifica los niveles de BACE-1 ni de PS1-CTF que presentan de forma natural tanto los animales WT como los animales 5XFAD. Así pues, el tratamiento no afectaría a los niveles de las principales secretasas implicadas en el procesamiento amiloidogénico de APP.

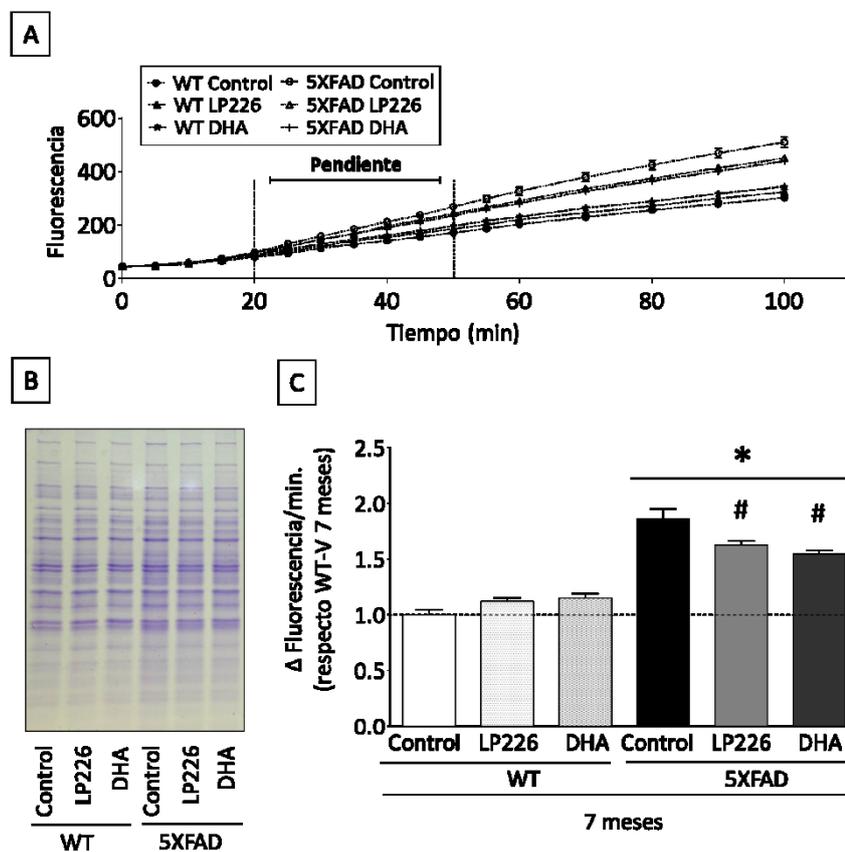
#### 4.2.2 Estudio de la actividad $\beta$ -secretasa

Una vez estudiados los niveles de BACE-1 y PS1-CTF en las muestras de animales tratados con LP226 y DHA, pasamos a analizar la actividad enzimática  $\beta$  y  $\gamma$ -secretasa, así como los cambios asociados al

## Resultados

tratamiento con LP226. En estos estudios se emplearon muestras de corteza cerebral en lugar de hipocampo, ya que para este tipo de experimentos es necesaria la utilización de elevadas cantidades de proteína de membrana extraídas de tejido fresco.

En primer lugar, determinamos la actividad  $\beta$ -secretasa en los animales WT y 5XFAD de 7 meses, controles y tratados con LP226 y DHA. Para esta reacción, empleamos una muestra de proteínas de membrana solubilizadas en un tampón de extracción/lisis (Calbiochem) y le añadimos una concentración saturante de un sustrato exógeno que, una vez procesado por BACE-1, da lugar a un producto que emite fluorescencia a 495 nm (Figura R14 A) (véase el apartado 16 de los Materiales y Métodos). Comprobamos que todas las muestras tenían la misma cantidad de proteína de partida mediante electroforesis de las muestras en un gel SDS-PAGE y tinción con Coomassie (Figura R14 B). Finalmente, cuantificamos el incremento de fluorescencia/unidad de tiempo como medida de la actividad  $\beta$ -secretasa (Figura R14 C). En este sentido, los animales 5XFAD mostraron un aumento significativo de actividad con respecto a los animales WT, mostrando una actividad  $\beta$ -secretasa alrededor a un 80% superior a la del grupo control WT. Estos resultados están en línea con el aumento en los niveles de BACE-1 previamente descritos (véase la Figura R12) y con trabajos previos que demuestran un incremento de actividad  $\beta$ -secretasa en modelos transgénicos de EA (Torres et al., 2012) y en cerebros humanos de pacientes con EA (Ahmed et al., 2010).



**Figura R14. Actividad  $\beta$ -secretasa en la corteza de animales WT y 5XFAD de 7 meses tratados con LP226.** (A) Ensayo de cinética enzimática donde se detecta el incremento de fluorescencia asociado al producto de la reacción en función del tiempo. (B) Muestras mixtas ( $n=3$ ) de cada condición experimental en gel de glicina-SDS-PAGE, teñido con azul de coomassie donde se muestra que todas las muestras presentan la misma cantidad de proteína de partida. (C) Cuantificación de la actividad de la  $\beta$ -secretasa, medida por el incremento de fluorescencia por unidad de tiempo en (A). Se aprecia un aumento significativo de la actividad en los animales 5XFAD que se revierte por el tratamiento con LP226. Ensayo realizado en tampón de lisis comercial (Calbiochem). Se muestra el promedio de cada condición  $\pm$ SEM. Análisis mediante ANOVA de una vía, seguido del test Tukey de comparación múltiple: \*  $p<0,05$  respecto WT 7 meses; #  $p<0,05$  respecto 5XFAD 7 meses.

Por otra parte, el efecto de tratamiento con LP226 (Figura R14 C), no provocó ninguna alteración significativa en la actividad  $\beta$ -secretasa de los animales WT, siendo los niveles de actividad de los animales WT control o tratados con LP226 y DHA prácticamente iguales. Sin embargo, en los animales 5XFAD, se apreció una bajada significativa en los niveles de actividad en el grupo tratado con LP226 respecto al control. De igual forma, también se aprecia una disminución similar en los animales tratados con DHA. Estos resultados demuestran que la bajada en los niveles de C99, previamente detectada en las muestras de los animales 5XFAD tratados con LP226 y DHA, es consecuencia de una disminución en la actividad  $\beta$ -secretasa.

Puesto que este ensayo de actividad está realizado a saturación y, por tanto, es independiente de la concentración del sustrato de partida, los cambios en la actividad  $\beta$ -secretasa podrían estar motivados por cambios en los niveles del enzima BACE-1 presente en la muestra de estudio o por un cambio en la actividad intrínseca de la proteína. El aumento de actividad observado en los animales 5XFAD respecto al control WT estaría promovido por un aumento en los niveles de la forma madura de BACE-1 en estos animales (véase la Figura R12). Sin embargo, en lo que respecta a los animales 5XFAD tratados con LP226, hemos demostrado previamente que los niveles de BACE-1 no están disminuidos en los animales tratados con LP226 (véase la Figura R12). De modo que, el descenso en la actividad  $\beta$ -secretasa en estos animales debería estar motivado por una modulación de la actividad enzimática independiente de la concentración de enzima presente en la muestra. Puesto que BACE-1 es una proteína transmembrana cuya actividad está regulada por los lípidos de membrana (Vetrivel y Thinakaran, 2010), la disminución en la actividad enzimática de BACE-1 inducida por LP226 podría ser consecuencia del cambio en el ambiente lipídico que rodea a la proteína BACE-1.

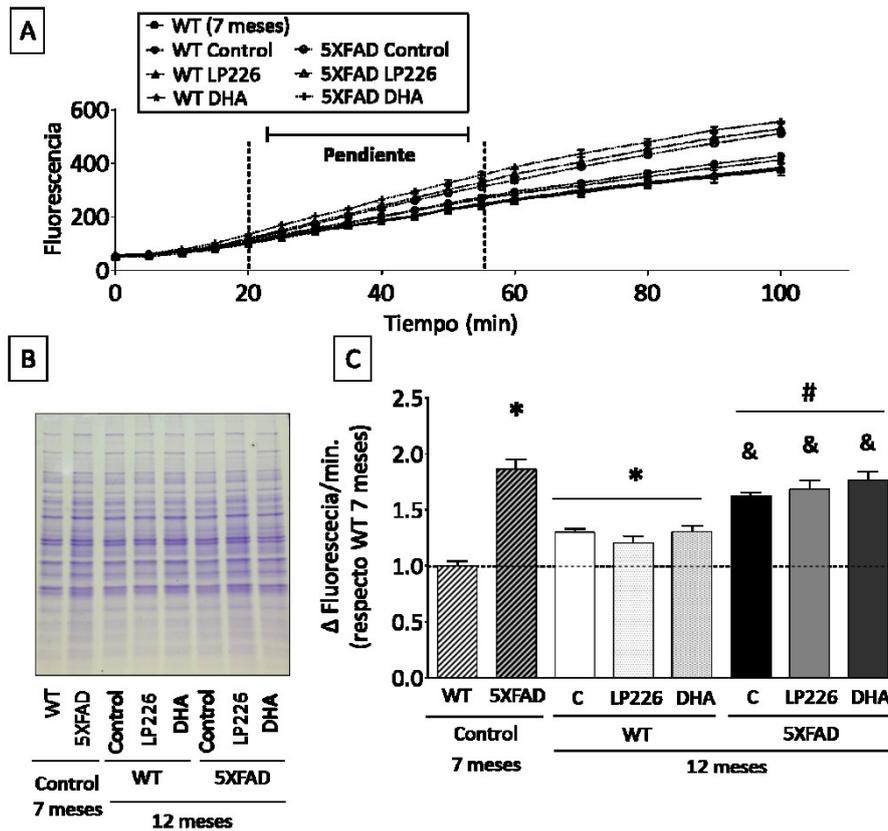
A continuación, pasamos a determinar la actividad  $\beta$ -secretasa en los animales WT y 5XFAD de 12 meses, controles y tratados con LP226 y DHA, siguiendo el mismo procedimiento previamente descrito con los animales de 7 meses, añadiendo al ensayo un control WT y 5XFAD de 7 meses, para estudiar el efecto asociado al envejecimiento (Figura R15). En este sentido, los animales WT de 12 meses, presentaron niveles de actividad algo superiores a los controles WT de 7 meses, aun cuando no hemos detectado aparentemente un aumento los niveles de BACE-1 con el envejecimiento normal de los animales (véase la Figura R12). Como era esperable, en los animales WT no se observó efecto alguno del tratamiento con LP226 o su homólogo no hidroxilado, el DHA. Curiosamente, los animales 5XFAD de 12 meses presentaron valores de actividad mayores que el control WT de 12 meses, aunque con un incremento menor al observado en los animales de 7 meses. De hecho, llama la atención el descenso en los niveles de actividad  $\beta$ -secretasa observado en los animales 5XFAD de 12 meses respecto al control 5XFAD de 7 meses, puesto que previamente hemos demostrado que los niveles de la proteína madura BACE-1 en los animales 5XFAD de 12 meses son superiores a los de 7 meses. Para comprobar si esta disminución de actividad en los animales 5XFAD de 12 meses es un artefacto consecuencia de una menor concentración de proteína en estas muestras, analizamos los niveles de proteína de las muestras empleadas en el ensayo, siendo la carga muy similar en todas las condiciones estudiadas (Figura R15 B). En consecuencia, estos resultados se contradicen, por un lado, con nuestros resultados previos que muestran un incremento asociado a la edad de los animales 5XFAD en los niveles de BACE-1 y, por otro lado, con la bibliografía donde se ha demostrado un aumento en los niveles y actividad  $\beta$ -secretasa asociado a la edad en modelos similares (Torres et al., 2012).

Las condiciones experimentales empleadas para determinar la actividad  $\beta$ -secretasa en membranas cerebrales están condicionadas por las limitaciones propias de usar un kit comercial (Calbiochem). Así, por ejemplo, el tampón de extracción/lisis empleado para la solubilización de las muestras de membrana contiene una composición que nos es desconocida (propiedad de Calbiochem). Sorprendentemente, nuestros datos demostraron que el grado de solubilización de la forma madura de BACE-1 en este tampón es inferior al 20% del total presente en la muestra (véase el apartado 16 de los Materiales y Métodos). Además, nuestros datos también revelaron que los niveles de BACE-1 extraídos con el tampón comercial

## Resultados

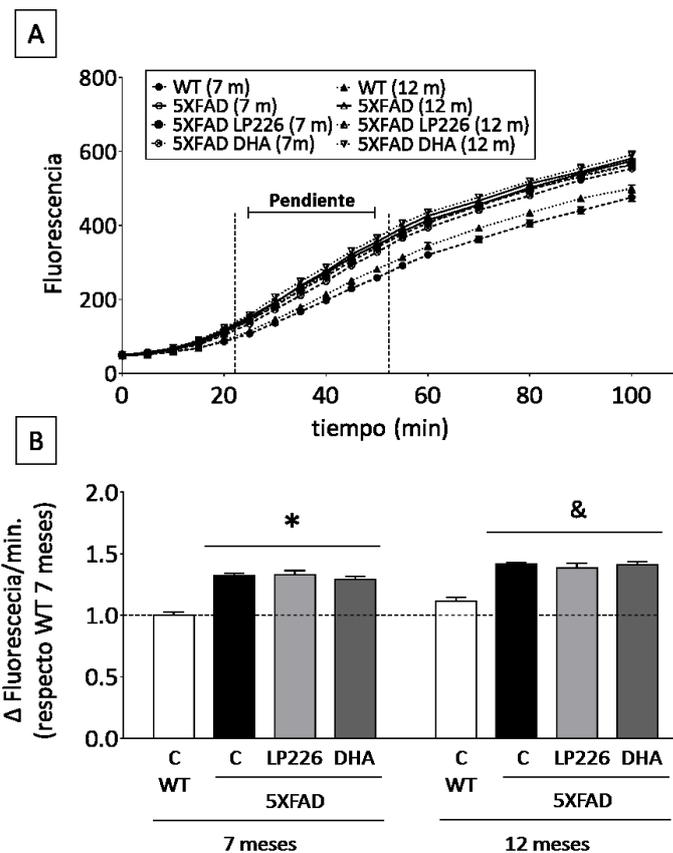
de membranas celulares de 5XFAD de 12 meses es inferior a la extraída de la misma cantidad de membranas 5XFAD de 7 meses (véase la Figura M6 del capítulo de Materiales y Métodos). Este resultado pone de manifiesto que la extracción de BACE-1 de las membranas cerebrales bajo estas condiciones es poco eficiente, especialmente en muestras de 12 meses. Este artefacto podría ser consecuencia de la patología neurítica que acontece en el cerebro de estos animales y que se vería agravada con la edad (Sadleir et al., 2016, Kandalepas et al., 2013). Siendo BACE-1 una de las proteínas afectadas por esta patología axonal, este fenómeno podría explicar la baja eficiencia del tampón comercial a la hora de solubilizar BACE-1 en muestras 5XFAD, especialmente en las de animales de 12 meses. En consecuencia, nuestros datos sugieren que este artefacto metodológico no nos ha permitido determinar los niveles de actividad  $\beta$ -secretasa en animales 5XFAD de 12 meses de forma fidedigna.

Con la finalidad de resolver este artefacto metodológico, recurrimos a analizar distintas condiciones de solubilización para mejorar el nivel de extracción de BACE-1 de las membranas cerebrales para la evaluación de la actividad enzimática (véanse las Figuras M5 y M6 de los Materiales y Métodos,). De estos experimentos concluimos que, de todas las condiciones estudiadas, la solubilización de membranas en 1% CHAPS constituye una alternativa preferible a las condiciones usadas hasta el momento porque nos permiten solubilizar un porcentaje mayor de la proteína BACE-1 madura de partida, a la vez que nos permiten evaluar la actividad enzimática en las muestras obtenidas.



**Figura R15. Actividad  $\beta$ -secretasa en la corteza de animales WT y 5XFAD de 12 meses tratados con LP226.** (A) Ensayo de cinética enzimática donde se detecta el incremento de fluorescencia asociado al producto de la reacción en función del tiempo. (B) Muestras mixtas ( $n=3$ ) de cada condición en gel de glicina-SDS-PAGE, teñido con azul de coomassie donde se muestra que todas las muestras presentan la misma cantidad de proteína de partida. (C) Cuantificación de la actividad  $\beta$ -secretasa, medida por el incremento de fluorescencia por unidad de tiempo en (A). Se observa un incremento de la actividad en los animales WT de 12 meses, respecto a los de 7. Sin embargo, los animales 5XFAD de 12 meses, presentan niveles de actividad inferiores al control 5XFAD de 7 meses. Ensayo realizado en tampón comercial (Calbiochem). Se muestra el promedio de cada condición  $\pm$ SEM. Análisis mediante ANOVA de una vía, seguido del test Tukey de comparación múltiple: \*  $p<0,05$  respecto WT 7 meses; #  $p<0,05$  respecto 5XFAD 7 meses; &  $p<0,05$  respecto WT 12 meses.

Partiendo de estas nuevas condiciones experimentales, determinamos de nuevo la actividad  $\beta$ -secretasa en animales de 7 y 12 meses, WT controles y 5XFAD controles y tratados con LP226 y DHA. En este caso, descartamos analizar las muestras de animales WT tratados ya que, por un lado, no hemos visto ningún cambio en estos animales con el tratamiento en ninguno de los parámetros analizados hasta el momento y, por otro, el problema de solubilización de BACE-1 aparece, a priori, solo en los animales 5XFAD durante el proceso de envejecimiento (patología neurítica). En primer lugar, reproducimos de nuevo el aumento de actividad en los animales de 5XFAD de 7 meses respecto a su control WT, aunque en este caso, el incremento fue algo menor al observado anteriormente (véase la Figura R16). En cuanto a los animales de 12 meses, el nivel de actividad de los animales 5XFAD fue mayor al obtenido en las condiciones anteriores. En este caso, el nivel de actividad fue ligeramente superior al encontrado en los animales 5XFAD de 7 meses. Aun con todo, este incremento sigue siendo menor a lo que cabría esperar en base a las diferencias observadas en los niveles de proteína BACE-1 en animales 5XFAD entre 7 y 12 meses (véase la Figura R12).



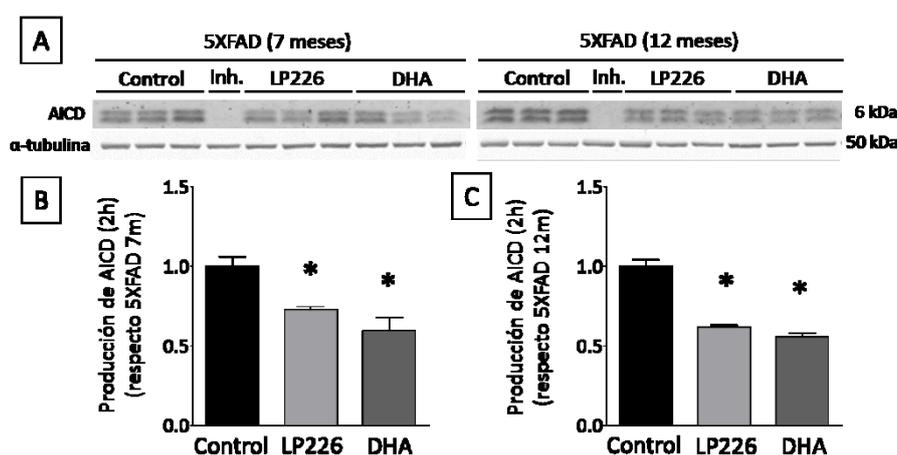
**Figura R16. Actividad  $\beta$ -secretasa en tampón CHAPS en muestras de corteza de animales WT y 5XFAD de 7 y 12 meses tratados con LP226.** (A) Ensayo de cinética enzimática donde se detecta el incremento de fluorescencia asociado al producto de la reacción en función del tiempo. (B) Cuantificación de la actividad  $\beta$ -secretasa, medida por el incremento de fluorescencia por unidad de tiempo en (A). No se observan diferencias significativas entre animales de 7 y 12 meses, así como tampoco se aprecia diferencias en los grupos tratados. Se muestra el promedio de cada condición  $\pm$ SEM. Análisis mediante ANOVA de una vía, seguido del test Tukey de comparación múltiple: \*  $p < 0,05$  respecto WT 7 meses; &  $< 0,05$  respecto WT 12 meses.

Por otro lado, y con respecto a los tratamientos con LP226 y DHA, apreciamos un fenómeno curioso. Bajo estas condiciones, dejamos de observar las diferencias de actividad  $\beta$ -secretasa que previamente habíamos reportado en los animales 5XFAD de 7 meses tratados con LP226 y DHA (véanse las Figuras R4.7 y R4.9). Este resultado pone de manifiesto el papel fundamental que juegan los lípidos de membrana en la regulación de la actividad  $\beta$ -secretasa. En este sentido, las nuevas condiciones experimentales garantizan que la razón detergente (CHAPS)/proteína sea mayor de 3:1. Bajo estas condiciones, se

promueve una solubilización eficiente de las proteínas y, por otro lado, también se fomenta la formación de micelas puras detergente-proteína y detergente-lípido. En consecuencia, la deslipidación de BACE-1 fomentada bajo estas condiciones podría ser responsable de la recuperación de actividad  $\beta$ -secretasa observada en los animales 5XFAD tratados con LP226 y DHA que se muestra en la Figura R16, en comparación con los resultados previos mostrados en la Figura R14. Estos resultados demuestran, por una lado, que bajo unas condiciones de solubilización que fomenten la pérdida del entorno lipídico de las proteínas, el compuesto LP226 no ejerce influencia sobre la actividad  $\beta$ -secretasa (siendo los niveles de BACE-1 constantes entre las diferentes condiciones de tratamiento, véase la Figura R12) y, por otro lado, que bajo condiciones de solubilización más suaves, donde la extracción de proteína de las membranas es menos eficiente (condiciones de Calbiochem, véase el apartado 16 del capítulo de Materiales y Métodos), pero, posiblemente, más respetuosa con el microambiente lipídico que rodea a la proteína, el tratamiento con LP226 es capaz de modular la actividad enzimática de BACE-1. De modo que el mecanismo de acción de LP226 sobre BACE-1 debe ser dependiente de la integridad de la membrana lipídica y de la modulación de su composición y estructura. Así pues, estos resultados podrían explicar cómo se modulan los niveles de C99 y A $\beta$  en los animales 5XFAD tratados con LP226.

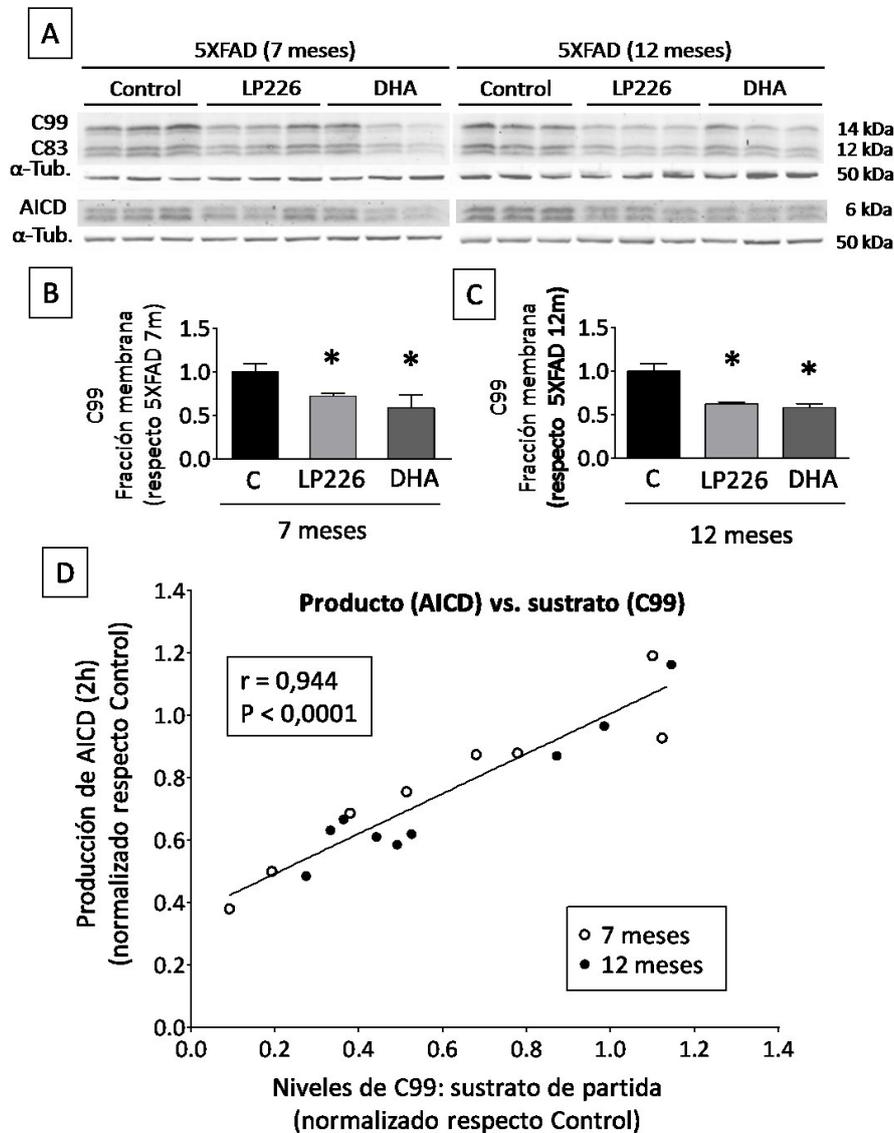
### 4.2.3 Estudio de la actividad $\gamma$ -secretasa

A continuación, y siguiendo con el estudio de la modulación de la ruta amiloidogénica en los animales 5XFAD tratados con LP226, pasamos a analizar el perfil de actividad  $\gamma$ -secretasa de nuestro modelo y comprobar si esta se modula con el tratamiento. Para determinar la actividad  $\gamma$ -secretasa en los animales 5XFAD realizamos un ensayo que no incluye detergentes, a fin de evitar en lo posible la desnaturalización del complejo  $\gamma$ -secretasa, ya que se trata de un sistema enzimático formado por cuatro subunidades que desarrolla su actividad de forma asociada a la membrana (De Strooper, 2003). En estos experimentos, las membranas cerebrales se incubaron a 37°C para favorecer la conversión del sustrato endógeno C99 en el producto AICD (véase el apartado 17 de los Materiales y Métodos). Para estos ensayos empleamos muestras de animales 5XFAD de 7 y 12 meses controles y tratados con LP226 y DHA, excluyendo a los animales WT en los que los niveles de C99 son prácticamente indetectables y por lo tanto no es posible detectar la producción del producto de la reacción (véase la Figura R10).



**Figura R17. Actividad  $\gamma$ -secretasa en la corteza de animales 5XFAD de 7 y 12 meses tras el tratamiento crónico con ácidos grasos omega-3.** (A) WB representativo de los niveles de AICD generados tras un ensayo de 2 horas con muestras de animales 5XFAD de 7 y 12 meses, controles y tratados con LP226 y DHA durante 4 meses. En cada ensayo se duplicó una de las muestras control y se incubó con el inhibidor L-685,458 (Inhibidor-X, 100 $\mu$ M), específico de la  $\gamma$ -secretasa. (B) Producción de AICD en los animales 5XFAD de 7 meses. Los animales tratados con LP226 y DHA mostraron un descenso estadísticamente significativo en la producción de AICD respecto al control (C) Producción de AICD en los animales 5XFAD de 12 meses. De nuevo, los animales tratados con LP226 y DHA mostraron un descenso estadísticamente significativo en la producción de AICD respecto al control. Análisis mediante ANOVA de una vía, seguido del test Tukey de comparación múltiple: \*  $p < 0,05$  respecto control 5XFAD correspondiente.

Los resultados presentados en la Figura R17 muestran un descenso estadísticamente significativo en la producción de AICD en los animales 5XFAD tratados con LP226, tanto a los 7 meses (Figura R17 B) como a los 12 meses (Figura R17 C). El mismo fenómeno se observó en los animales tratados con DHA.



**Figura R18. Relación entre producto y sustrato en el ensayo de actividad  $\gamma$ -secretasa en animales 5XFAD de 7 y 12 meses.** (A) WB representativo de los niveles de APP-CTFs (C99 y C83) de partida y de AICD generados en un ensayo de 2 horas con muestras de animales 5XFAD de 7 y 12 meses, controles y tratados con LP226 y DHA. (B) Representación cuantitativa de los niveles de C99 en la fracción de membrana de animales 5XFAD de 7 meses. Los animales que recibieron un tratamiento crónico con LP226 o DHA muestran niveles significativamente menores del fragmento C99 con respecto a los animales control. (C) Representación cuantitativa de los niveles de C99 en la fracción de membrana de animales 5XFAD de 12 meses. De nuevo, los animales que recibieron un tratamiento crónico con LP226 o DHA muestran una bajada significativa de los niveles de C99 respecto a los animales control. Análisis mediante ANOVA de una vía, seguido del test Tukey de comparación múltiple: \*  $p < 0,05$  respecto control 5XFAD correspondiente. (D) Coeficiente de correlación de Pearson y ajuste de regresión lineal entre la cantidad de AICD producida y los niveles de C99 de partida para cada animal en un ensayo de actividad  $\gamma$ -secretasa. La bajada de AICD observada en los animales que han recibido uno de los tratamientos es debida a la bajada del producto C99 en las muestras de partida.

Este ensayo tiene la particularidad de usar los niveles endógenos de APP-CTFs como sustrato de la reacción. En consecuencia, no se puede controlar la cantidad de sustrato inicial. Debido a ello, la producción de AICD está directamente relacionada con los niveles de C99 de partida en cada una de las muestras. En este sentido, y como ya se ha descrito anteriormente (Figuras R4.3 y R4.4), los niveles de C99 de los animales que recibieron el tratamiento con LP226 o DHA fueron significativamente menores a sus respectivos controles 5XFAD, tanto en los animales de 7 meses (Figura R18 B), como en los de 12 meses (Figura R18 C). Por este motivo, optamos por representar la actividad  $\gamma$ -secretasa (determinada como la producción de AICD) frente a la cantidad de sustrato C99 endógeno (Figura R18 D) presente en la muestra antes de la reacción, determinada mediante WB en muestras de membrana equivalentes a las utilizadas para el ensayo (Figura R18 A). En este sentido, al representar la cantidad de AICD producido versus los niveles de C99 de partida presentes en cada animal, vemos que existe una fuerte correlación entre ambos parámetros, aumentando la actividad  $\gamma$ -secretasa en función de la cantidad de sustrato endógeno C99. Los datos se ajustan a una regresión lineal estadísticamente significativa ( $r^2=0,89$ ;  $P<0,0001$ ) lo que sugiere que la bajada de AICD en los animales 5XFAD que recibieron los tratamientos fue debida a la disminución previa de los niveles del sustrato C99 en las muestras de partida más que a una regulación específica del procesamiento  $\gamma$ -secretasa por parte del compuesto LP226 o DHA.

En conclusión, el tratamiento con LP226 se traduce a nivel cerebral en una disminución del procesamiento  $\beta$ -secretasa que lleva a una disminución en la producción de C99. Esta disminución en los niveles de C99 sería a su vez responsable de una menor producción de  $A\beta$ , sin alterar la actividad específica  $\gamma$ -secretasa en estos animales.

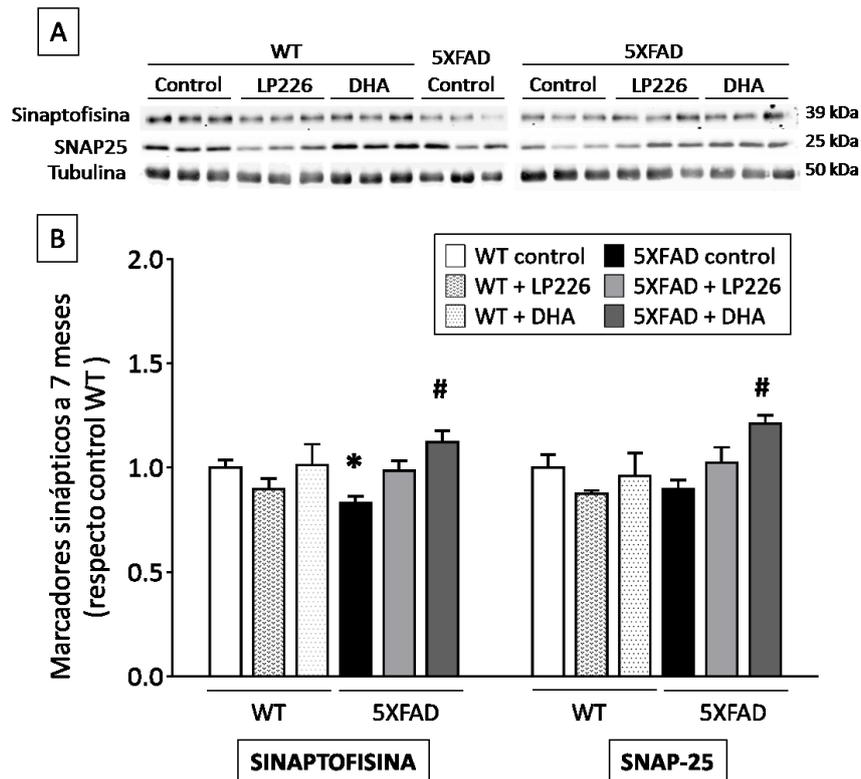
## **5. Estudio del efecto neuroprotector potencial del tratamiento con LP226.**

### **5.1 Evaluación del efecto del tratamiento con LP226 en la pérdida sináptica y la pérdida neuronal de animales 5XFAD**

En el transcurso de este trabajo, hemos presentado la eficiencia del tratamiento con LP226 en la mejora cognitiva de animales 5XFAD, así como la modulación de la actividad  $\beta$ -secretasa provocando una disminución en el procesamiento de APP por la vía amiloidogénica. Por otro lado, un tratamiento eficaz para el tratamiento de la EA, debería ser capaz de evitar o retrasar la degeneración sináptica y la muerte neuronal progresivas asociadas a la patología, ya que en última instancia estos son los principales fenómenos que determinan el declive cognitivo propio de la EA. En consecuencia, en este estudio hemos explorado los efectos del tratamiento con LP226 sobre la degeneración sináptica y neuronal, dos marcadores neuropatológicos de la EA que los animales 5XFAD replican desde los 6 y 9 meses de edad, respectivamente.

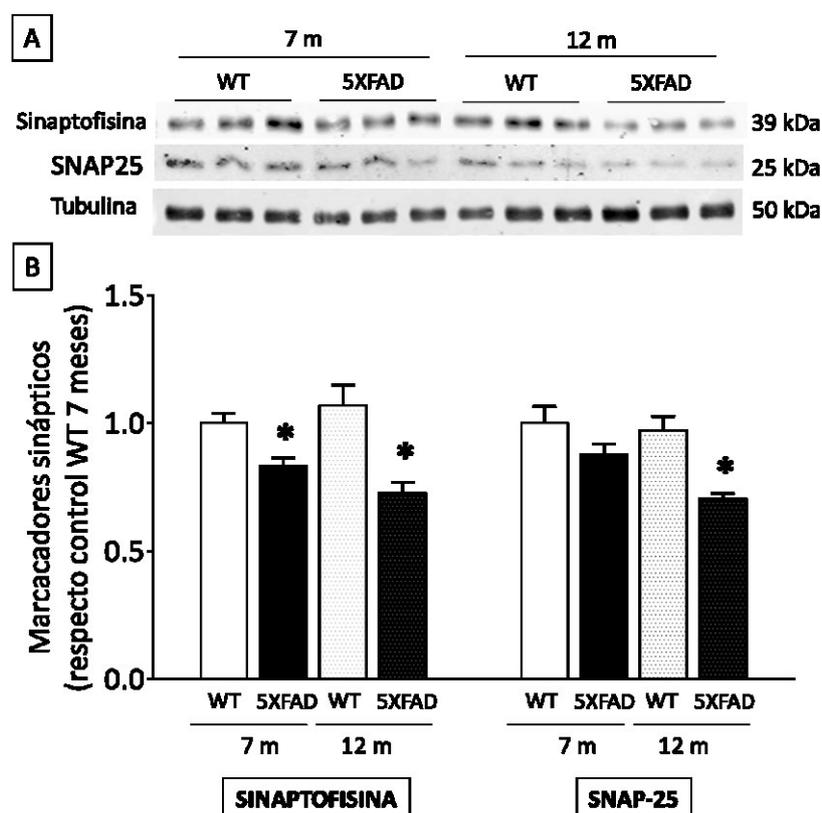
En primer lugar, procedimos a estudiar los niveles de sinaptofisina y SNAP-25, proteínas pre-sinápticas consideradas buenos marcadores para la evaluación de la pérdida sináptica (Zhang et al., 2014). La sinaptofisina es una glicoproteína de las vesículas sinápticas, presente en prácticamente todas las neuronas del cerebro y la médula espinal. Está implicada en la transmisión sináptica participando en la liberación de las vesículas de neurotransmisores (Hinz et al., 2001). Por su parte, SNAP-25 es otra proteína implicada en la sinapsis, que interviene en el acoplamiento y la fusión de las vesículas, mediando en la liberación de neurotransmisores (Sze et al., 2000). De forma general, la reducción en las proteínas sinápticas y el deterioro en la plasticidad sináptica se correlaciona con la pérdida cognitiva en la EA (Shankar y Walsh, 2009).

Al analizar el estado sináptico del hipocampo en los animales de 7 meses se observó una reducción significativa en los animales 5XFAD en comparación con los animales WT (Figura R19), cercana al 17% en sinaptofisina y al 10% (no significativa) en SNAP-25. Si nos centramos en los animales WT, el tratamiento con LP226 o DHA no produjo ningún cambio significativo en ninguno de los marcadores. En cambio, en los animales 5XFAD, el tratamiento con LP226 dio lugar a niveles próximos al de los animales WT en ambos marcadores sinápticos. Por último, en los animales tratados con DHA también observamos una recuperación significativa tanto en sinaptofisina como en SNAP-25, cuando se compararon con los controles 5XFAD.



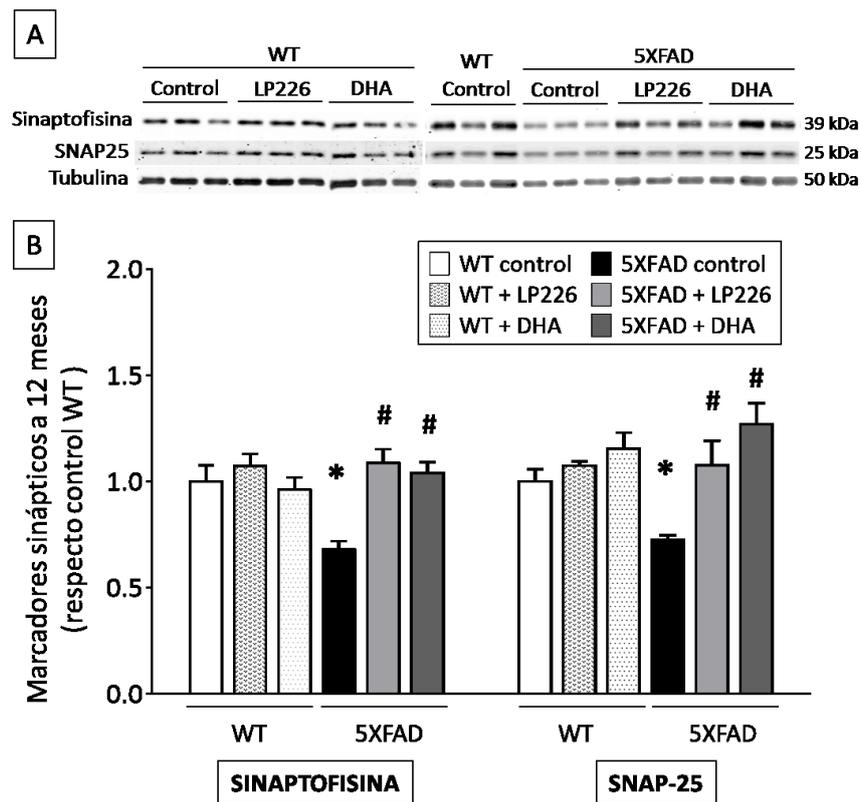
**Figura R19. Marcadores sinápticos en el hipocampo de animales de 7 meses.** (A) WB representativo de sinaptofisina y SNAP-25 en animales WT y 5XFAD de 7 meses, controles y tratados con LP226 y DHA. (B) La sinaptofisina experimenta un descenso moderado en los animales 5XFAD, que con el tratamiento con LP226 y DHA se previenen. SNAP-25 se mantiene más o menos estable en todos los grupos. Las barras muestran el valor promedio de cada grupo  $\pm$  SEM. WT (n=9), WT+LP226 (n=6), WT+DHA (n=4), 5XFAD (n=9), 5XFAD+LP226 (n=7) y 5XFAD+DHA (n=8). Análisis mediante ANOVA de una vía, seguido del test Tukey de comparación múltiple: \*  $p < 0,05$  respecto control WT; #  $p < 0,05$  respecto control 5XFAD.

A continuación, analizamos la evolución de los dos marcadores con la edad. En los animales WT, los niveles de sinaptofisina y SNAP-25 permanecieron estables entre los 7 y los 12 meses, tal y como cabría esperar, ya que en los animales WT no existe un proceso de envejecimiento patológico. Respecto a los animales 5XFAD, tanto a los 7 como a los 12 meses observamos una clara disminución de ambos marcadores en relación a su respectivo control WT, que se acentuó con la edad; de forma que a los 12 meses los niveles de sinaptofisina y SNAP-25 decayeron en torno a un 30% respecto a los controles WT. En este sentido, nuestros resultados coinciden con estudios previos en los que se describe una disminución progresiva en sinaptofisina a partir de los 4 meses de edad, con una reducción en torno al 25% a los 9 meses (Oakley et al., 2006), demostrando de nuevo la importante degeneración sináptica que experimenta el modelo 5XFAD.



**Figura R20. Evolución del estado de los marcadores sinápticos en el hipocampo entre animales de 7 y 12 meses.** (A) WB representativo de sinaptofisina y SNAP-25 en animales WT y 5XFAD de 7 y 12 meses. (B) Ambos marcadores permanecen estables en los animales WT de 7 y 12 meses. Los animales 5XFAD presentan una ligera reducción a los 7 meses, respecto al grupo WT, que se ve exacerbada a los 12 meses, momento en el que presentan una reducción cercana al 30% en ambos marcadores. Las barras muestran el valor promedio de cada grupo  $\pm$ SEM. WT 7-m (n=9), 5XFAD 7-m (n=9), WT 12-m (n=6) y 5XFAD 12-m (n=4). Análisis mediante ANOVA de una vía, seguido del test Tukey de comparación múltiple: \*  $p < 0,05$  respecto control WT; #  $p < 0,05$  respecto control 5XFAD.

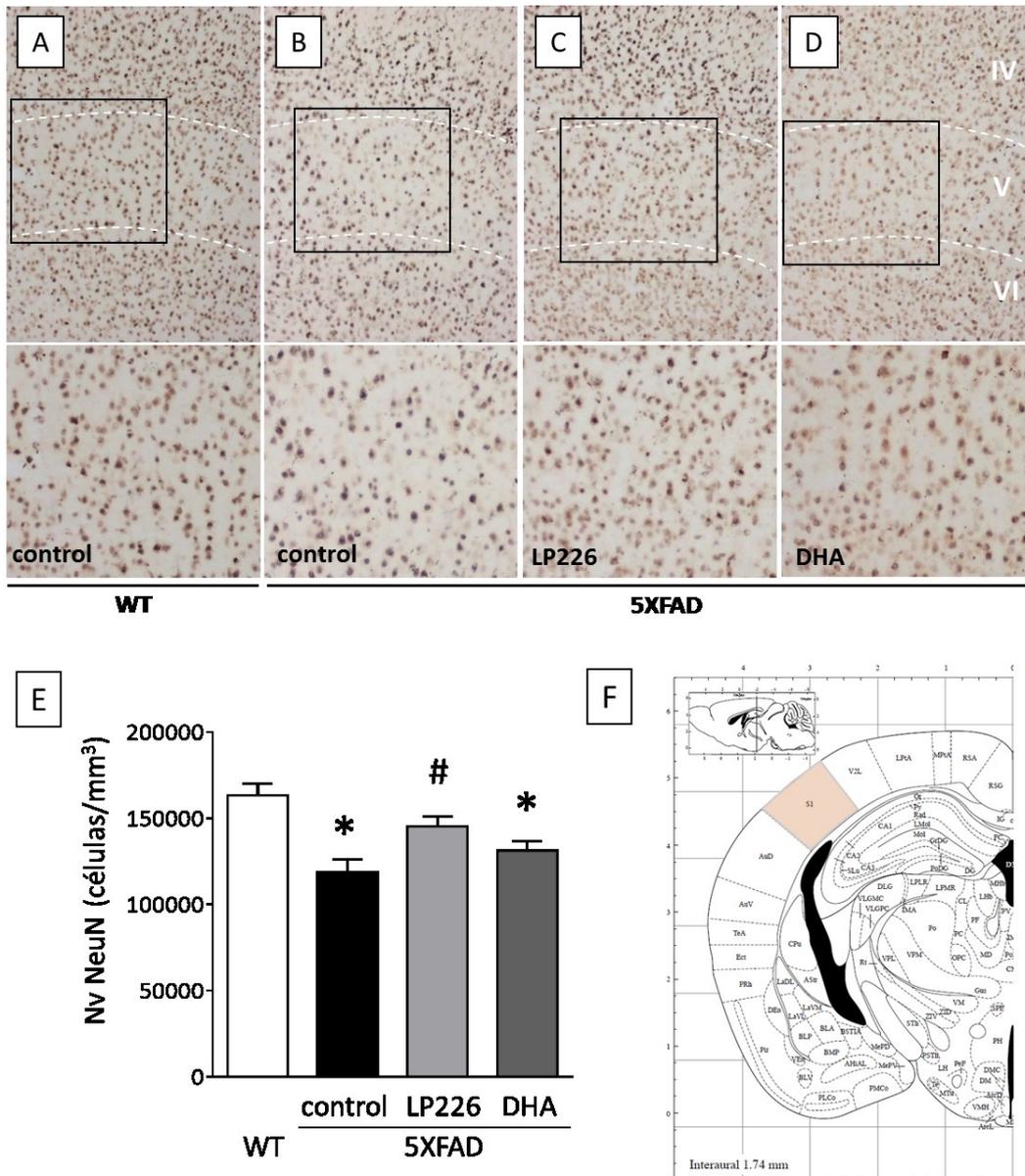
Por último, evaluamos el efecto de los tratamientos en los animales de 12 meses (Figura R21). En los animales WT, el tratamiento con LP226 o DHA no tuvo ningún efecto aparente en la densidad sináptica, al igual que ocurría en los animales de 7 meses. Respecto a los animales 5XFAD, el análisis de los niveles de sinaptofisina y SNAP-25 reveló un importante efecto del tratamiento crónico con LP226, mitigando la reducción de los marcadores sinápticos y recuperando la densidad sináptica propia de los animales WT. El tratamiento con DHA tuvo un efecto similar, revertiendo completamente la pérdida sináptica propia de los animales 5XFAD de 12 meses.



**Figura R21. Marcadores sinápticos en animales de 12 meses.** (A) WB representativo de sinaptofisina y SNAP-25 en animales WT y 5XFAD de 12 meses, controles y tratados con LP226 y DHA. (B) A los 12 meses, el modelo 5XFAD experimenta una importante reducción de ambos marcadores, que los tratamientos con LP226 y DHA son capaces de revertir, volviendo los niveles de sinaptofisina y SNAP-25 al de los animales WT. Las columnas muestran el valor promedio de cada grupo  $\pm$ SEM. WT (n=6), WT+LP226 (n=3), WT+DHA (n=4), 5XFAD (n=4), 5XFAD+LP226 (n=4) y 5XFAD+DHA (n=5). Análisis mediante ANOVA de una vía, seguido del test Tukey de comparación múltiple: \*  $p < 0,05$  respecto control WT; #  $p < 0,05$  respecto control 5XFAD.

A continuación, estudiamos como se ve afectada la densidad neuronal en los animales 5XFAD y los efectos del tratamiento mediante el inmunomarcaje específico de NeuN, una proteína nuclear presente en la mayoría de neuronas del SNC (Figura R22). Puesto que la pérdida neuronal en el modelo 5XFAD empieza a los 9 meses (Oakley et al., 2006), centramos el estudio en nuestro grupo de animales de 12 meses. Estos experimentos fueron desarrollados en colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Antonia Gutiérrez (Universidad de Málaga).

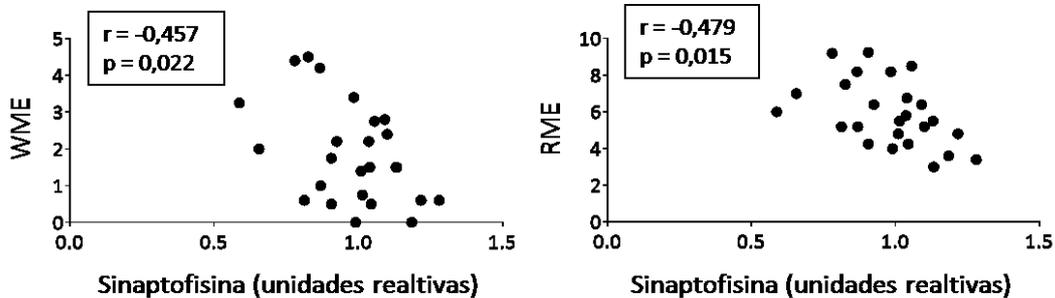
En el modelo 5XFAD se ha descrito la pérdida neuronal únicamente en el subículo y en la corteza somatosensorial. Tras analizar ambas regiones en nuestros animales, observamos que los cambios se apreciaban mejor en la corteza somatosensorial, por lo que en adelante presentamos únicamente estos resultados. En este sentido, el análisis de la densidad neuronal en la capa V de la corteza somatosensorial reveló una importante pérdida neuronal en los animales 5XFAD, tal y como ha sido descrito anteriormente (Oakley et al., 2006, Jawhar et al., 2012), con una reducción de la densidad numérica (Nv) cercana al 30% respecto a los animales WT (Figura R22 A, B y E). En los animales 5XFAD tratados con LP226 durante 4 meses, observamos una prevención significativa de la pérdida neuronal propia del modelo, presentando valores de densidad neuronal próximos al de animales WT (véase la Figura R22 B, C y E). Por otro lado, el DHA también redujo la pérdida neuronal, aunque aparentemente en menor medida que el LP226 (véase la Figura R22 D y E).



**Figura R22. Prevención de la muerte neuronal en animales 5XFAD de 12 meses tratados con LP226.** La identificación de neuronas en la capa V de la corteza somatosensorial primaria se ha llevado a cabo con inmunodetección específica de NeuN en animales de 12 meses (A) WT y 5XFAD (B) control y tratados con (C) LP226 y (D) DHA. (E) La cuantificación por técnicas estereológicas ha revelado una pérdida neuronal cercana al 30% en los animales 5XFAD respecto al grupo WT, que el tratamiento con LP226 es capaz de prevenir significativamente. Las barras representan el promedio de cada grupo  $\pm$  SEM; WT (n=5), 5XFAD (n=5), 5XFAD+LP226 (n=7) y 5XFAD+DHA (n=5). Análisis mediante ANOVA de una vía, seguido del test Tukey de comparación múltiple: \*  $p < 0,05$  respecto WT; #  $p < 0,05$  respecto 5XFAD. (F) Diagrama coronal del cerebro de ratón (Paxinos y Franklin, 2004) donde se muestra la región en la que se ha llevado a cabo el recuento estereológico de la densidad neuronal (S1).

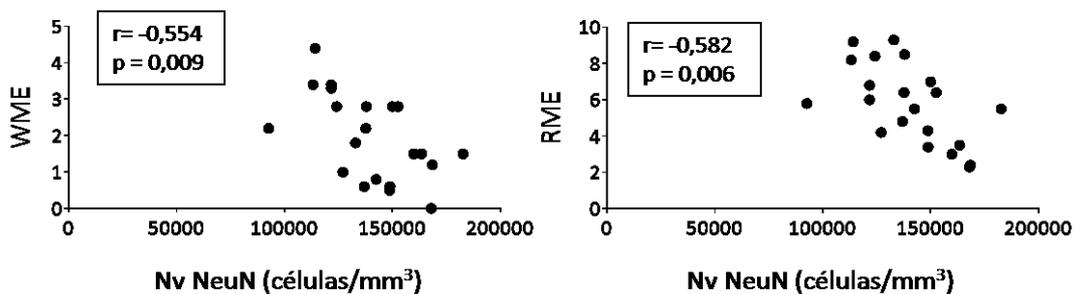
En su conjunto, nuestros resultados indican que el tratamiento con LP226 fue capaz de prevenir la degeneración sináptica y neuronal característica de la EA, en consonancia con la recuperación cognitiva que hemos presentado anteriormente en este trabajo (véanse las Figuras R3 y R5). Por otro lado, la correlación entre los niveles de sinaptofisina y la memoria espacial en roedores ha sido demostrada previamente (Smith et al., 2000). De hecho en pacientes de EA, la reducción en sinaptofisina en la corteza frontal y el hipocampo se correlaciona con las capacidades cognitivas deterioradas (Sze et al., 1997). Por todo ello, hemos relacionado el estado neurodegenerativo de nuestros animales con el estado de la memoria espacial, analizando la correlación existente entre los niveles de sinaptofisina y la densidad

neuronal con el número de errores cometidos en el LR (véase la Figura R5), siendo WME los errores asociados a la memoria de trabajo o a corto plazo y RME los errores asociados a la memoria de referencia o a largo plazo. Realizamos este análisis únicamente en los animales de 12 meses, ya que es el grupo en el que se ven de forma más clara los cambios en sinaptofisina y en el que se ha estudiado la muerte neuronal.



**Figura R23. Correlación lineal entre los niveles de sinaptofisina y memoria espacial en animales de 12 meses.** El número de WME cometidos se correlaciona de forma inversa con los niveles de sinaptofisina en el hipocampo de igual forma a lo que ocurre con el número de RME. Coeficiente de correlación de Pearson.

En primer lugar, la correlación entre los niveles de sinaptofisina en el hipocampo y el número de errores cometidos en el LR (WME y RME) muestra como los niveles más bajos de sinaptofisina correlacionan con un mayor número de errores en la prueba (Figura R23). Esta correlación negativa se da de igual forma para los errores que evalúan el estado de la memoria a corto plazo (WME), como para los que evalúan la memoria a largo plazo (RME), indicando que los dos tipos de memoria se ven afectados por igual por la pérdida sináptica.



**Figura R24. Correlación lineal entre la densidad neuronal y la memoria espacial en animales de 12 meses.** (A) El número de WME cometidos correlaciona de una forma inversamente proporcional con la densidad neuronal en la corteza somatosensorial, (B) de igual forma ocurre con el número de RME, indicando que aquellos animales que realizaron mejor la prueba comportamental presentan también una mayor densidad neuronal.

A continuación, si nos centramos en la densidad neuronal, comprobamos de nuevo como los niveles de densidad neuronal se correlacionan de manera inversa con el número de errores cometidos (Figura R24), de forma que los animales que presentan más células NeuN positivas en corteza somatosensorial coinciden con aquellos que cometen menos errores tipo WME o RME. Por tanto, en estos animales, el mantenimiento de la densidad neuronal coincide con un mejor estado de la memoria espacial, tanto de la memoria a corto plazo como de la memoria a largo plazo.

## 5.2 Evaluación del efecto del tratamiento con LP226 en la proliferación celular en el giro dentado del hipocampo.

Con la intención de incidir en el estudio del mecanismo responsable de la disminución de la degeneración sináptica y la muerte neuronal tras el tratamiento con LP226, decidimos estudiar el estado

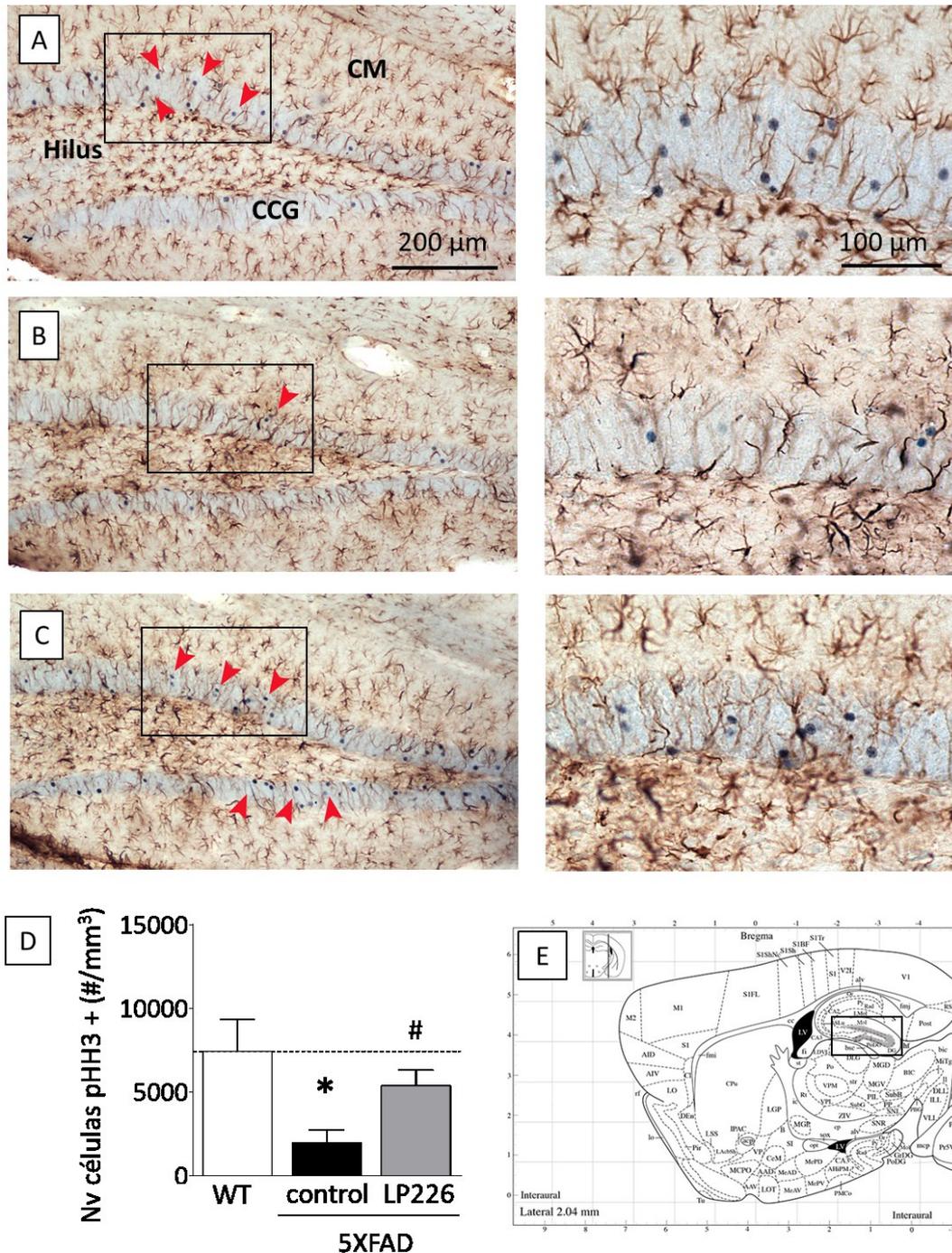
de la proliferación celular en el hipocampo en los animales de 7 meses. Para ello analizamos el estado neurogénico de los animales 5XFAD y el efecto del tratamiento con LP226 en este fenómeno. Estos experimentos fueron desarrollados en colaboración con el grupo de investigación del Dr. José J. Rodríguez Arellano (Universidad del País Vasco-IKERBASQUE).

Para ello se realizó un doble marcaje inmunohistoquímico para microscopia de campo claro con anticuerpos contra la fosfo-histona H3 (Ser-10: pHH3) y anti-GFAP (marcador de astrocitos, utilizado para excluir este fenotipo glial). En eucariotas, durante la mitosis, la histona H3 se fosforila en Ser10 para permitir la condensación de los cromosomas (Goto et al., 1999). Por este motivo, el marcaje de pHH3 se utiliza como un marcador de proliferación mitótica (Rodríguez et al., 2008, Rodríguez y Verkhratsky, 2011).

Tanto en los animales WT como en 5XFAD, se detectó un número consistente de nuevas células, tal y como revela el marcaje de pHH3. Estas células nuevas, muestran la morfología típica de las células neuronales recién generadas, como es una forma irregular y pequeño tamaño, apareciendo de manera ocasional formando pequeñas agrupaciones, tal y como se ha descrito anteriormente en el modelo murino de EA 3xTg-AD (Abrous et al., 2005, Rodríguez et al., 2008, Rodríguez et al., 2011, Mu y Gage, 2011). Sorprendentemente, tanto en los animales WT como en los 5XFAD, la proliferación en el hipocampo no está restringida a la capa basal de la capa de células granulares (CCG) del giro dentado (GD) sino también a las capas apicales. El análisis cuantitativo de la proliferación celular (Figura R25) reveló una reducción significativa en la Nv de células inmunorreactivas para pHH3 (pHH3-IR) en los animales 5XFAD, siendo inferior al 70% en comparación a los animales WT y revelando un descenso sustancial en la ratio de proliferación en los animales transgénicos 5XFAD (Figura R25 D). Este descenso en la Nv de células pHH3-IR fue restaurado gracias el tratamiento crónico con LP226, con un incremento del 270% en comparación a los animales 5XFAD controles (Figura R25 D). De hecho, el número de células pHH3-IR en los animales 5XFAD tratados con LP226, alcanzó valores similares a los observados en los animales WT.

Destaca el hecho de que tras el tratamiento crónico con LP226, las nuevas células se detectaron tanto en la capa suprapiramidal como infrapiramidal de la CCG del GD, mientras que en los animales WT, la gran parte de las células nuevas se localizan en la capa suprapiramidal de la CCG (Figura R25 A-C). Al analizar el fenotipo de las células en proliferación en la CCG del GD, encontramos que las células pHH3-IR raramente co-localizaron con GFAP. De hecho, menos del 2% de las células positivas para pHH3 mostraron fenotipo glial de astrocitos, sugiriendo que las células proliferativas pertenecerían a la línea neuronal, tal y como se ha demostrado previamente en el modelo 3xTg-AD (Rodríguez et al., 2008, Rodríguez et al., 2009, Rodríguez et al., 2011).

Los datos aquí presentes sugieren que el mantenimiento de la capacidad neurogénica propia de animales WT es uno de los posibles mecanismos mediante el cual el tratamiento con LP226 sería capaz de reducir la pérdida sináptica y neuronal previamente descrita en este trabajo.



**Figura R25. Estudio de la proliferación neuronal en el hipocampo.** Doble inmunomarcaje para microscopía de campo claro de pHH3 (azul) y GFAP (marrón) en el giro dentado de animales de 7 meses. (A) WT, (B) 5XFAD y (C) 5XFAD tratado con LP226. (D) El recuento de las células pHH3 positivas en el GD reveló una clara recuperación en la neurogénesis en los animales 5XFAD tratados con LP226, llegando a los valores del control WT. Las células proliferativas raramente co-localizan con GFAP, marcador de células gliales. Las barras representan la media  $\pm$  SEM; WT (n=4), 5XFAD (n=7) y 5XFAD+LP226 (n=7). Análisis mediante ANOVA de una vía, seguido del test Tukey de comparación múltiple: \*  $p < 0,05$  respecto WT; #  $p < 0,05$  respecto 5XFAD. (E) Diagrama sagital del cerebro de ratón (Paxinos y Franklin, 2004) donde se muestra la región en la que se ha llevado a cabo el estudio neurogénico: GD: giro dentado, CM: capa molecular, CCG: capa de células granulares.



## *V. DISCUSIÓN*

---



Clásicamente, las funciones celulares se han asociado a la actividad de proteínas y ácidos nucleicos. Sin embargo, en los últimos años el papel de los lípidos de membrana ha ido ganando importancia, demostrando que los lípidos modulan la localización y actividad de proteínas clave en la transducción de señales asociadas a la membrana, regulando así la fisiología de la célula (Ibarguren et al., 2014). En este sentido, la membrana plasmática contiene diferentes lípidos que forman varios tipos de microdominios de membrana que pueden ser regulados de forma específica por fármacos dirigidos a la bicapa lipídica. En este contexto se ha desarrollado la Terapia Lipídica de Membrana (TLM), un enfoque terapéutico que tiene como objetivo regular la composición y estructura de las membranas celulares como tratamiento a diversas patologías, incluyendo enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad de Alzheimer (EA) (Escribá, 2006).

La TLM se centra en revertir disfunciones celulares a través de la modulación de la localización y actividad de proteínas de señalización y los eventos moleculares posteriores por medio de la regulación de la estructura de bicapa lipídica de la membrana (Ibarguren et al., 2014). Bajo este escenario, se han diseñado varios compuestos basados en la hidroxilación de ácidos grasos naturales que han demostrado una gran eficacia para el tratamiento de varias patologías: el ácido oleico hidroxilado en el tratamiento del glioblastoma (Lladó et al., 2009, Barceló-Coblijn et al., 2011, Terés et al., 2012) o el ácido araquidónico hidroxilado como antiinflamatorio (Lopez et al., 2013). Estos fármacos comparten bases moleculares comunes, en las que la regulación de la estructura de la membrana lipídica es un evento molecular clave que controla las interacciones proteína-lípido y proteína-proteína en dominios definidos con el fin de restaurar los procesos fisiológicos en las células en condiciones patológicas (Ibarguren et al., 2013, Lúcio et al., 2010, Escribá et al., 2015). En este sentido, los ácidos grasos hidroxilados están presentes también de forma natural en el organismo, la mayor parte de ellos en forma de eicosanoides. Por ejemplo, las resolvinas y las protectinas son derivados bioactivos hidroxilados naturales de los ácidos grasos omega-3 EPA y DHA con propiedades anti-inflamatorias conocidas (Weylandt et al., 2012). En relación a la EA, la neuroprotectina D1 (NPD1) es capaz de ofrecer protección contra esta patología al regular la producción del péptido A $\beta$  por las secretasas, desplazando así el procesamiento de APP de la vía amiloidogénica citotóxica hacia la vía no amiloidogénica. Además, participa en la reducción de la expresión de genes proinflamatorios y en la promoción de la supervivencia celular (Stark y Bazan, 2011).

Por todo ello, y en el contexto de la TLM como aproximación terapéutica, en este trabajo se presenta el estudio de un ácido graso hidroxilado de diseño, el ácido 2-hidroxicosahexaenoico (LP226) como tratamiento en la EA.

## **1. Seguridad del tratamiento con LP226**

El desarrollo de nuevos fármacos supone un gran desafío para el campo de la biomedicina. Una vez identificada o diseñada una nueva molécula es necesario evaluar su actividad biológica para ser usada como posible fármaco. En primer lugar, debe comprobarse su seguridad para el tratamiento en organismos vivos y establecer una dosis óptima a la que obtener el efecto terapéutico deseado, descartando posibles efectos adversos graves como resultado de su administración. En este sentido, el pez cebra es una especie que se ha utilizado como modelo en el desarrollo de fármacos y en los estudios de bioseguridad. Al compartir muchos de los órganos y sistemas con los mamíferos, incluyendo los sistemas nervioso, digestivo, reproductor, inmunológico, excretor y cardiovascular, este modelo representa una alternativa viable a los modelos de mamíferos utilizados actualmente en las pruebas de toxicidad y otras investigaciones biológicas (Goldsmith y Jobin, 2012). En los últimos años, se han realizado numerosos estudios que evalúan las capacidades predictivas en humanos de los ensayos de pez cebra examinando grandes bibliotecas de compuestos con perfiles de toxicidad conocidos en mamíferos. Los resultados de estos estudios oscilaron entre el 63% y el 100% de predictibilidad, lo que sugiere que los

mecanismos moleculares subyacentes a la toxicidad de estos compuestos estarían conservados entre el pez cebra y los seres humanos (García et al., 2016, Eimon y Rubinstein, 2009, He et al., 2014).

En el caso que nos ocupa, el LP226 ha demostrado ser una molécula segura en el tratamiento agudo, tanto en pez cebra, como en ratones. En el primer caso, de forma mayoritaria se pudieron descartar efectos letales, subletales y teratogénicos en embriones de pez cebra. Únicamente se apreciaron alteraciones a las dosis más elevadas o en los mayores tiempos de exposición (véase la Tabla R1). La administración en ratones también resultó segura en forma aguda, apareciendo alteraciones únicamente al aumentar a 15 días la duración del tratamiento y sólo en las dosis más altas (500 mg/kg). En este caso, las alteraciones en el aspecto general de los animales se observaron igualmente en los animales tratados con LP226 y con DHA, indicando que el efecto nocivo del tratamiento no sería específico del tratamiento con LP226, sino más bien resultado de la administración de dosis elevadas de un ácido graso omega-3 (véase Tabla R4). Hasta donde sabemos, no se han descrito todavía alteraciones de este tipo en el caso de la administración de DHA en otros estudios. Esto puede venir determinado, bien por la formulación del compuesto o por la técnica de administración del mismo. En nuestro caso, tanto LP226 como DHA se administran en forma de sal sódica mediante una cánula gastroesofágica, mientras que en los estudios descritos en la literatura dosis equivalente a las nuestras de DHA generalmente se administran en forma de etil éster (Hashimoto et al., 2008, Hashimoto et al., 2013, Hashimoto et al., 2015) o como componente del aceite de pescado (Afshordel et al., 2015); aunque lo más frecuente es administrarlo como complemento incluido en la dieta (Arsenault et al., 2011, Teng et al., 2015, Lim et al., 2005). Estas diferencias tanto en la formulación, como en la forma de administración (desde una aproximación farmacológica o más fisiológica), podrían justificar la toxicidad observada en este estudio en relación a otros. En cualquier caso, cabe indicar que el DHA en forma de aceites (triglicéridos o fosfolípidos), de ésteres etílicos (característicos de la industria nutrafarmacéutica) y de ácidos grasos libres (ya sean hidroxilados o no hidroxilados) son formas que aparecen en nuestra dieta y cuya ingesta en humanos ha sido recomendada por la EFSA (European Food Safety Authority), que ha fijado ingestas máximas de 12 gramos al día. Dado que la dosis equivalente a 20 mg/kg en ratón serían unos 2 mg/kg diarios en humanos, las dosis recomendables de LP226 estarían en torno a 200 mg diarios y, por ello, por debajo del límite marcado por la EFSA. Por lo tanto, teniendo en cuenta esta limitación, en general se podría indicar que este PUFA es necesario para nuestra salud.

Al administrar el tratamiento de forma crónica (4 meses) en los animales WT y 5XFAD aparecieron indicios de toxicidad a dosis medio-altas (50 y 200 mg/kg, Tabla R5) que no habían aparecido en los tratamientos durante 15 días, tal como reveló la valoración visual de los animales WT y 5XFAD tratados a 200 mg/kg. Del mismo modo, en este trabajo también hemos interpretado como signo de toxicidad la alteración motora evidenciada por la reducción en la velocidad de ejecución en el laberinto radial de los animales 5XFAD tratados a 50 y 200 mg/kg. Las diferencias observadas entre los tratamientos de 15 días y 4 meses vendrían dadas por el mantenimiento del tratamiento de forma crónica, lo que provocaría una mayor sensibilidad a dosis menores de LP226. Por otro lado, y referente a la comparación con la forma nativa, el DHA, la sensibilidad a dosis altas no ha sido descrita en la literatura, que de forma habitual se administra a dosis más elevadas (200-700 mg/kg). Este hecho podría justificarse de varias formas, incluyendo las diferentes rutas de administración y formulación, o el aumento de la vida media del LP226 en comparación al DHA debido a la hidroxilación en el carbono  $\alpha$ . La hidroxilación de los ácidos grasos hace que estos no se degraden directamente por la vía de la  $\beta$ -oxidación, ya que antes deben ser procesados por una vía secundaria de oxidación de ácidos grasos menos abundante, la  $\alpha$ -oxidación (Vögler et al., 2008). El procesamiento por esta vía actúa como factor limitante en el procesamiento de los ácidos grasos hidroxilados, ya que la lisasa 2-hidroxi-fitoin-CoA, enzima responsable de catalizar la escisión del enlace entre el primer y segundo átomo de carbono, se satura rápidamente a una baja concentración de sustrato (Foulon et al., 2005). Como consecuencia, la vida media de los ácidos grasos  $\alpha$ -hidroxilados sería mayor que la de los ácidos grasos naturales de los que derivan. Este incremento en la vida media del LP226 podría justificar también la toxicidad que hemos observado en este trabajo en los tratamientos a largo plazo, que no se observaron a corto plazo.

## 2. Recuperación cognitiva de los animales 5XFAD tras el tratamiento con LP226

La EA es una enfermedad insidiosa que se caracteriza por un deterioro progresivo de la memoria y de las funciones corticales, que acaba con una pérdida total de las actividades mentales e intelectuales. Los primeros síntomas que se observan en la EA son la desorientación y el deterioro de la memoria, debido a que el hipocampo, que está implicado en el almacenamiento de la memoria y la orientación espacial, es una de las primeras regiones cerebrales afectadas. Los estudios realizados en animales demuestran que se requiere un hipocampo intacto para el aprendizaje y para la retención a largo plazo de algunas pruebas de memoria espacial (Morris et al., 1982). Igualmente, se ha demostrado que las lesiones en el hipocampo se asocian a alteraciones en las tareas que requieren el uso de memoria de trabajo de tipo espacial (Ward et al., 1999b), así como en la consolidación de la memoria a largo plazo (Ward et al., 1999a). Además del hipocampo, la amígdala también está implicada en la codificación de la memoria, participando en la consolidación de sus aspectos emocionales, es decir, en los que califican los resultados de un comportamiento como positivo (reforzador) o negativo (inhibidor). Estos factores son esenciales en la consolidación del aprendizaje y de los nuevos recuerdos (Maren, 1999). No obstante, debe reconocerse que el conocimiento sobre los mecanismos que intervienen en el aprendizaje y el establecimiento de la memoria es aún fragmentario, habiéndose reconocido múltiples procesos diferentes con localizaciones anatómicas muy diversas y con implicaciones ampliamente variables en la temporalidad de la memoria.

En relación con este trabajo, son particularmente interesantes la memoria de trabajo y la memoria de referencia. La primera constituye un sistema de memoria a corto plazo y con capacidad limitada que permite procesar y guardar información de forma temporal, con la que es posible realizar tareas complejas en un momento determinado (Ang y Lee, 2008). Por su parte, la memoria de referencia implica la existencia de información consolidada durante un plazo temporal mayor. La consolidación de la memoria a largo plazo exige la integridad del hipocampo como etapa previa. Concretamente, la memoria espacial a largo plazo es la que conforma el mapa cognitivo, y su recuperación está basada en una estructura jerárquica, de forma que para recordar las características que definen el espacio es necesario hacerlo en base a un orden de importancia (McNamara et al., 1989).

En este trabajo se ha desarrollado el estudio comportamental por medio de la prueba del laberinto radial, una prueba que depende del buen estado del hipocampo para su correcto desarrollo (Floresco et al., 1997, Becker et al., 1980) y que permite evaluar tanto la memoria de trabajo como la de referencia. La valoración de la memoria espacial en el LR ha revelado claramente el deterioro cognitivo que presenta el modelo 5XFAD a los 7 meses de edad, mostrando incrementos tanto en el número de errores cometidos, como en el tiempo de ejecución en comparación con el grupo WT control. Así pues, a pesar de que no se ha encontrado referencias anteriores en la que se haya estudiado el comportamiento de los animales 5XFAD en el LR, existe una amplia coincidencia entre los resultados de este trabajo y los que describen un empeoramiento de la memoria espacial en 5XFAD mediante otros tipos de pruebas comportamentales: laberinto en Y, laberinto de agua de Morris, etc. (Oakley et al., 2006, Ohno et al., 2006).

Respecto a los tipos de memoria estudiados, el desarrollo de los déficits cognitivos en los modelos de EA muestran patrones de progresión similares a los observados en humanos. En este sentido, los primeros deterioros observables son en la memoria espacial de trabajo (Webster et al., 2013) seguido en el tiempo por el deterioro del aprendizaje asociativo y la memoria de referencia, así como en las tareas de miedo condicionado (Webster et al., 2014). Aunque cronológicamente el deterioro en la memoria de trabajo es anterior al de la memoria de referencia, en los animales 5XFAD de 7 meses, hemos encontrado ambos tipos de memoria afectados por igual (véase la Figura R4). Estos resultados están en consonancia con otros estudios en los que se han analizado ambos tipos de memoria espacial en animales 5XFAD de 4 meses, encontrando alteraciones tanto en la memoria de trabajo como en la memoria de referencia (Wei et al., 2016, Wang et al., 2016). Estos datos demuestran que, en este modelo, el deterioro de la memoria

espacial de referencia se inicia en una etapa muy temprana y cercana al deterioro de la memoria de trabajo. De hecho, los trabajos realizados en animales 5XFAD con fondo genético C57BL6, que se diferencia de nuestro modelo por presentar un fenotipo menos robusto de la patología amiloide (véase, <https://www.jax.org/strain/008730>, observación descrita por *Mutant Mouse Resource y Research Centers supported by NIH -MMRRC*), describen un déficit en la memoria espacial de referencia presente en animales de 12 meses, pero no en animales de 3-6 meses (Bouter et al., 2014). En cambio, en los animales 5XFAD en fondo genético B6SJL (empleados en el presente estudio) a los 3 meses ya se ha descrito el empeoramiento de ambos tipos de memoria espacial, la de trabajo y la de referencia (Wei et al., 2016).

Por otro lado, en este trabajo también se ha estudiado la evolución de los trastornos de la memoria espacial que presentan los animales 5XFAD con la edad. En esta línea, los animales 5XFAD de 12 meses presentan un deterioro cognitivo superior al observado a los 7 meses (véase la Figura R4). Estos hechos demuestran que el deterioro de las capacidades cognitivas del ratón 5XFAD es progresivo, con una clara dependencia de la edad, tal y como había sido descrito anteriormente (Wei et al., 2016, Wang et al., 2016).

Si nos centramos en el efecto del tratamiento con LP226, en este trabajo presentamos como este compuesto es capaz de revertir la pérdida cognitiva propia de los animales 5XFAD en los animales de 7 meses y en los de 12 meses (véanse las Figuras R2.1 y R2.3). En el primer caso, el tratamiento se inicia a los 3 meses de edad, en una etapa muy temprana del desarrollo de la patología del animal, en la que ya se ha iniciado el depósito de A $\beta$  y empieza a aparecer el depósito en forma de placas. En el segundo caso, el tratamiento se inicia a los 8 meses (comienzo tardío del tratamiento). En estos animales el depósito A $\beta$  ya es masivo, se ha iniciado la degeneración sináptica y los animales presentan un avanzado deterioro de la memoria. La aproximación inicial en este trabajo era realizar un tratamiento preventivo en animales que aún no presentasen pérdida de las capacidades cognitivas frente a un tratamiento restaurativo en animales que ya presentasen un marcado deterioro cognitivo, para evaluar el efecto del tratamiento en cada caso (Oakley et al., 2006). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que en los animales 5XFAD de 3 meses ya se aprecian alteraciones tanto en la memoria a corto plazo como en la memoria a largo plazo (Wei et al., 2016). Esto nos lleva a una situación en la que ambos tratamientos se inician en animales que ya presentan deterioro cognitivo. A pesar de ello, los dos grupos de edad siguen representando dos etapas muy distintas de la enfermedad, y en ambos casos, el tratamiento con LP226 es capaz de revertir la pérdida de memoria característica del modelo.

En los animales más jóvenes prácticamente se recuperan los niveles cognitivos de los animales WT en el test del LR. Por otro lado, en los animales 5XFAD de 12 meses, en los que la pérdida cognitiva es mucho mayor, el tratamiento es capaz de reducir el número de errores de forma significativa, aunque, en este caso, sin alcanzarse los niveles de los animales WT. Por último, si comparamos los errores cometidos por los animales 5XFAD controles de 7 meses, y los animales 5XFAD de 12 meses tratados con LP226 vemos que ambos grupos cometen un número muy similar de errores entre sí (comparar las Figuras R2.1 y R2.3). Puesto que el grupo de 12 meses inicia el tratamiento a los 8 meses, estos resultados indicarían que el tratamiento con LP226 sería capaz de frenar el avance del deterioro cognitivo desde el inicio del tratamiento en un estadio avanzado de la enfermedad, aunque sin revertir la pérdida cognitiva ya existente en el momento de inicio del tratamiento. Sin lugar a dudas, el resultado obtenido en animales de 12 meses, con un comienzo del tratamiento de forma tardía, es de especial relevancia clínica puesto que la mayor parte de los casos de Alzheimer se caracterizan por un diagnóstico tardío de la enfermedad, cuando el proceso neurodegenerativo ya es evidente. En consecuencia, estos resultados demuestran que el tratamiento con LP226 puede ser eficaz previniendo el avance del deterioro cognitivo aun cuando comience en un estadio avanzado de la EA.

En ambos casos la mejora cognitiva se produjo de forma generalizada, tanto sobre la memoria de trabajo, como sobre la memoria de referencia. En la codificación de la memoria espacial, el hipocampo es la principal estructura implicada. Sin embargo, en la codificación de la memoria de trabajo espacial, además del hipocampo también está implicada la corteza prefrontal, que participa principalmente en el

almacenamiento temporal de la información y en el procesamiento de eventos de muy corta duración (Yoon et al., 2008). Para la consolidación definitiva de la memoria, como ocurre con la memoria de referencia, es necesaria la participación tanto de la corteza como del hipocampo (Floresco et al., 1997). El hecho de que hayamos observado mejoras en estos dos tipos de memoria en los animales que han recibido el LP226 es indicativo de que el efecto de este compuesto no está actuando sólo a nivel hipocampal, sino que probablemente su efecto sería más amplio, afectando a otras regiones como la corteza cerebral e induciendo una recuperación generalizada de las facultades cognitivas de los animales. El hecho de no observar ningún efecto del tratamiento con LP226 en los animales WT nos indicaría que el tratamiento está actuando de forma selectiva sobre las vías relacionadas o afectadas con la enfermedad y no específicamente sobre los mecanismos fisiológicos que participan en la memoria y el aprendizaje.

En su conjunto, los datos presentados demuestran una mejora cognitiva mediada por LP226 en términos de memoria espacial tanto de trabajo como de referencia, mientras que el tratamiento con DHA no produjo un descenso significativo en el número de errores en el test del LR respecto al grupo control. Un aumento en la vida media del LP226 respecto al DHA, debido a la hidroxilación en el carbono  $\alpha$ , podría justificar en parte la diferencia observada en el efecto de estos dos tratamientos (Vögler et al., 2008). Sin embargo, la comparación estadística de los datos obtenidos con LP226 y DHA no reveló que la eficacia del LP226 fuese significativamente superior a la del DHA. En cualquier caso, vale la pena remarcar que, en los trabajos presentes en la literatura, el tratamiento con DHA se da generalmente en forma de suplemento en la dieta con una dosis equivalente a 200-700 mg/kg, un orden de magnitud superior al de nuestro tratamiento (Arsenault et al., 2011, Afshordel et al., 2015, Lim et al., 2005, Perez et al., 2010), y que bajo estas condiciones, el tratamiento con DHA se muestra siempre eficaz a la hora de prevenir la pérdida cognitiva.

Nuestros resultados demuestran, por tanto, que el tratamiento con LP226 revierte la pérdida cognitiva asociada al envejecimiento patológico de los animales 5XFAD, con independencia de que el tratamiento se inicie de forma temprana o tardía en la enfermedad.

### **3. Modulación lipídica de la membrana**

Las alteraciones lipídicas en el cerebro de pacientes de EA están ampliamente descritas en la literatura, siendo las más relevantes el aumento en los niveles de colesterol y de esfingomielina (Puglielli et al., 2003, Vetrivel y Thinakaran, 2010, Cutler et al., 2004) así como la bajada en los niveles de fosfolípidos como la fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilserina (PS) y ciertos ácidos grasos omega-3 asociados a ellos (Söderberg et al., 1991, Prasad et al., 1998, Han et al., 2001). Ambas alteraciones nos llevan hacia un escenario similar en lo que se refiere a la estructura de las membranas celulares, en el que se fomenta la presencia de estructuras más rígidas (dominios líquido-ordenados). Puesto que tanto APP como las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -secretasas son proteínas de membrana, el procesamiento de APP puede verse afectado por cambios en su composición lipídica. Las condiciones que dan lugar a la formación de estructuras más rígidas podrían favorecer el procesamiento de APP hacia la vía amiloidogénica, mientras que un aumento en la fluidez de la membrana daría lugar a un aumento del procesamiento de APP por la vía no amiloidogénica, por la  $\alpha$ -secretasa (Askarova et al., 2011). Por otro lado, parece ser que las alteraciones en los lípidos de membrana pueden llevar a la disfunción del tráfico vesicular entre la membrana plasmática y los compartimentos intracelulares, dando lugar a la acumulación de vesículas a nivel intracelular, lo que a su vez puede llevar a la formación de neuritas distróficas y a la alteración del procesamiento de APP (Tamboli et al., 2011a, Tamboli et al., 2011b).

El tratamiento con LP226 corrige parte del deterioro lipídico observado en la EA. En este sentido, nuestro análisis lipídico en el cerebro de los animales 5XFAD tratados mostró un incremento en todas las especies de PE, incluyendo la diacil-PE, la liso-PE y sus plasmalógenos, y en las cadenas acilo

poliinsaturadas (fosfolípidos con 5 o más dobles enlaces), de forma similar a los que promueve el tratamiento con DHA en el cerebro de ratón (Wood et al., 2010) o en el plasma en humanos (Ottestad et al., 2012). Concretamente, se observó el aumento de las subclases de diacil-PE (véase la Tabla R7), incrementando de forma más marcada aquellas especies que contienen cadenas acilo de cadena larga (40C) o cadena media (36-38C) que los de cadena corta (32-34C). Cabe destacar que el mayor aumento de las especies de PE en el cerebro de ratones 5XFAD tratados con LP226 se dio en la diacil-PE 40:6, probablemente formado por los ácidos grasos 22:6 (DHA) y 18:0. En la PE, los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, de las siglas en inglés *polyunsaturated fatty acid*) se concentran en la posición 2 del glicerol, mientras que los ácidos grasos saturados son más abundantes en la posición 1. Además, la PE animal tiende a contener proporciones elevadas de ARA y DHA en relación a otros fosfolípidos (Wood y Harlow, 1969). Además del aumento en diacil-PE 40:6, en los animales tratados con LP226 también se observaron aumentos significativos en otras especies de diacil-PE, como 40:5 y 38:5, que posiblemente contienen los PUFAs omega-3 22:5 (DPA) y 20:5 (EPA), que pueden generarse enzimáticamente a partir de las cadenas acilo 22:6 (Wood et al., 2010, Grønn et al., 1991). En este contexto, las modificaciones lipídicas promovidas por el tratamiento con LP226 contrarrestarían los déficits lipídicos asociados a la EA. De hecho, las biopsias de cerebros de EA se caracterizan por la pérdida de las subespecies de diacil-PE (especialmente, 40:6, 38:6 y 38:4) y niveles bajos de lípidos con cadenas acilo largas, a la vez que se produce un aumento de las especies que contienen cadenas acilo cortas, entre otras alteraciones lipídicas (Chan et al., 2012).

La longitud de los ácidos grasos y su grado de saturación son factores determinantes que influyen en la estructura de la membrana y su funcionalidad (Spector y Yorek, 1985). Los fosfolípidos que contienen DHA afectan a la organización de la membrana plasmática, induciendo cambios tanto en los dominios tipo *raft*, como en los *no-raft*. Los *rafts* lipídicos o balsas lipídicas son microdominios de membrana cuya fluidez es mucho menor a la de su entorno y que sirven como plataforma para la señalización celular, la unión ligando-receptor y otras actividades en la célula (Korade y Kenworthy, 2008). Estos tipos de estructuras son centrales en el estudio de la evolución de la EA. Está descrito que APP es procesada por la  $\alpha$ -secretasa fuera de los *rafts* lipídicos y por la  $\beta$ -secretasa en los *rafts* lipídicos. En condiciones patológicas, se ve favorecido el procesamiento de APP de forma secuencial por las  $\beta$  y  $\gamma$ -secretasas dentro de los *rafts* lipídicos, aumentando así el procesamiento amiloidogénico de APP en detrimento del no amiloidogénico (Vetrivel y Thinakaran, 2010, Hicks et al., 2012). Curiosamente, los *rafts* lipídicos obtenidos de cortezas de enfermos de Alzheimer presentan niveles significativamente inferiores de DHA que sus controles sanos de la misma edad, en consonancia con la reducción de DHA observada en el cerebro de pacientes de EA (Martín et al., 2010). Entonces, la disminución en los niveles de PUFAs en los *rafts* lipídicos, con el consecuente aumento proporcional en colesterol y esfingomielina, nos llevaría a una situación en la que se estarían promoviendo el procesamiento amiloidogénico de APP (Askarova et al., 2011). Por otro lado, tales alteraciones lipídicas favorecerían la disfunción del tráfico vesicular entre la membrana plasmática y los compartimentos intracelulares, llevando a la aparición de neuritas distróficas y comprometiendo la viabilidad celular (Runz et al., 2002, Tamboli et al., 2011a, Lazarov et al., 2007). A su vez, la alteración del tráfico intracelular de APP daría lugar a la acumulación de APP en vesículas autofágicas dando lugar de nuevo a una potenciación de la producción de A $\beta$  en las vesículas autofágicas acumuladas (Sanchez-Varo et al., 2012, Torres et al., 2012). Estos eventos neuropatológicos asociados a la alteración de la composición lipídica llevarían en última instancia a la muerte neuronal (Torres et al., 2016)

Por ello, y dado que las propiedades biofísicas y estructurales de la PE y el DHA en las membranas son opuestas a las del colesterol y la esfingomielina, la incorporación de DHA y otros PUFAs en las membranas puede cambiar su estructura, modificando las propiedades de la membrana. La estructura dinámica del DHA y otros PUFAs, hace que las membranas ricas en este ácido graso sean delgadas y presenten niveles elevados de permeabilidad, compresión, fusión y flip-flop (Stillwell, 2006). En este sentido, predicciones matemáticas basadas en resultados experimentales resaltan la importancia que tiene el tamaño de los *rafts* lipídicos y la movilidad lipídica en la maquinaria amiloidogénica, apuntando a

los beneficios potenciales que tendría la normalización de los niveles de esteroides y PUFAs de cadena larga, especialmente el DHA, para retrasar la EA (Santos et al., 2016). Por todo ello, una regulación adecuada de la composición lipídica de la membrana podría revertir los cambios patológicos en la EA.

Por otro lado, bajo las condiciones experimentales desarrolladas en este trabajo y para las especies lipídicas analizadas, no hemos observado alteraciones remarcables en el modelo 5XFAD en comparación con los animales WT, a pesar de que en otros modelos de EA, y recientemente también en el nuestro, se han descrito algunas alteraciones lipídicas (Chan et al., 2012, Tajima et al., 2013, Hong et al., 2016). Si bien, las diferencias en nuestro modelo respecto a otros resultados podrían deberse tanto al procesamiento de las muestras como a las especies lipídicas analizadas o a la edad a la que se ha estudiado, hay que tener en cuenta que, más que las diferencias existentes entre diferentes cepas transgénicas y sus correspondientes controles, resulta interesante evaluar si estos modelos son capaces de reproducir los cambios lipídicos descritos en los enfermos de Alzheimer. En este sentido ha habido muchas discrepancias entre las alteraciones lipídicas observadas en los tejidos de EA procedentes de biopsias post-mortem y los cerebros de modelos de EA (y también entre distintos modelos de EA). De hecho, las alteraciones lipídicas descritas en los modelos normalmente no se corresponden con las alteraciones lipídicas caracterizadas en tejido post-mortem de pacientes de EA (Chan et al., 2012). Por ejemplo, en humanos se ha descrito repetidamente el descenso en las diferentes especies de fosfolípidos y en los niveles de PUFAs como el DHA, tanto en hipocampo como en corteza (Söderberg et al., 1991, Prasad et al., 1998, Igarashi et al., 2011, Chan et al., 2012). Sin embargo, estas alteraciones no se han descrito en los modelos murinos, demostrando que los modelos de EA no reproducen fielmente las alteraciones lipídicas asociadas a la EA (Tajima et al., 2013, Chan et al., 2012, Han et al., 2001, Bascoul-Colombo et al., 2016).

En conclusión, el tratamiento con LP226 influye en la composición lipídica de las membranas cerebrales, aumentando las especies de PE con PUFA de cadena larga, los cuales, de hecho, se ven reducidos de manera significativa en la EA. En consecuencia, tras la normalización de la composición lipídica de la membrana por el tratamiento con LP226, la estructura de la membrana recobraría la presencia de estructuras líquido-desordenadas, lo que finalmente redundaría en la prevención de los eventos neuropatológicos asociados a la EA.

#### ***4. Caracterización de los mecanismos moleculares responsables del procesamiento amiloidogénico tras el tratamiento con LP226***

Otra cuestión abordada experimentalmente en este trabajo residía en conocer cómo se ve afectado el procesamiento de APP por el tratamiento con LP226. El aumento de las especies de PE y PUFAs en la membrana provocan una reducción de los dominios lipídicos líquido-ordenados (Ibarguren et al., 2014), dando lugar a un aumento en la fluidez de la membrana. Se ha demostrado que un aumento de la fluidez de la membrana reduce el procesamiento amiloidogénico de APP, redirigiéndolo hacia la vía no amiloidogénica; al aumentar el procesamiento de APP por parte de la  $\alpha$ -secretasa se produce una reducción en el procesamiento  $\beta$ -secretasa, y finalmente en la producción de A $\beta$  (Askarova et al., 2011).

En las condiciones experimentales aquí presentes hemos detectado una disminución en el procesamiento amiloidogénico tras el tratamiento con LP226 en animales 5XFAD, reflejada por la bajada en los niveles del fragmento C99 y A $\beta$ . Esta reducción debe ser consecuencia probablemente de la reducción en la actividad de BACE-1 en dichos animales (véase la Figura R14). Sin embargo, no hemos observado un aumento en el procesamiento no amiloidogénico a juzgar por los niveles del fragmento sAPP $\alpha$  que permanecieron estables en los animales tratados con respecto a los controles. Aunque es cierto que un artefacto experimental que nos podría impedir detectar esta subida en los niveles de sAPP $\alpha$

tras el tratamiento con LP226, resultados previos obtenidos en una línea neuronal transfectada con APP Swedish (N2aAPP<sup>Sw</sup>) ya revelaron una bajada drástica en la producción de A $\beta$  sin alterar los niveles de sAPP $\alpha$  (Torres et al., 2014). Además, otros autores ya han descrito como la reducción de la actividad de BACE-1 lleva a una disminución de la producción de C99 sin que aumenten los niveles de sAPP $\alpha$  (Devi et al., 2015, Luo et al., 2001). Por lo tanto, estas evidencias apuntan a que el tratamiento crónico con LP226 no produce un incremento en la vía de procesamiento de APP por parte de la  $\alpha$ -secretasa, pero si estamos en condiciones de afirmar que la ruta no amiloidogénica está más favorecida que la amiloidogénica si tenemos en cuenta la disminución en la razón C99/sAPP $\alpha$ .

En este caso, la proteína APP no procesada por BACE-1 debería acumularse, dando lugar a un aumento de los niveles de APP en los animales tratados con LP226 en relación a los controles. Sin embargo, en nuestro modelo existe sobre-expresión del gen APP, lo que lleva a una gran acumulación de la proteína APP desde edades muy tempranas, por lo que resulta sesgado determinar si existe acumulación de APP debida al tratamiento con LP226. Por otro lado, el aumento en sAPP $\alpha$  que se observa en los animales de 12 meses, y que ya había sido descrito anteriormente en el modelo 5XFAD (Devi et al., 2015), sería consecuencia de la acumulación de APP a nivel intracelular, lo que debe traducirse igualmente en mayores niveles de APP en la membrana plasmática. Consecuentemente este escenario nos llevaría a una mayor producción de sAPP $\alpha$  durante el proceso de envejecimiento en los animales 5XFAD. De hecho, el aumento de sAPP $\alpha$  asociado a la edad en animales PS1/APP tiene un efecto neuroprotector (Jimenez et al., 2014) lo que sin duda debe ayudar a explicar el bienestar de nuestros animales a los 12 meses de edad, a pesar del depósito masivo de A $\beta$  que experimentan.

Por lo que se refiere al procesamiento de APP por la vía amiloidogénica, el tratamiento con LP226 ha sido capaz de reducir los niveles del fragmento C99 y de A $\beta$  en los animales 5XFAD tanto de 7 como de 12 meses (Figura R11), de igual forma que ocurre en cultivos celulares de la línea neuronal N2aAPP<sup>Sw</sup> (Torres et al., 2014). Puesto que en trabajos anteriores ha sido descrito que el tratamiento con LP226 no produce cambios ni en el número, ni el tamaño de las placas amiloides (Fiol-deRoque et al., 2013), cabe suponer que la bajada observada en los niveles de A $\beta$  vendría motivada por una reducción del A $\beta$  soluble (intra o extracelular) mientras que los depósitos de A $\beta$  fibrilar no se verían afectados por el tratamiento.

Por otro lado, los ratones 5XFAD de 7 meses presentaron niveles elevados del enzima BACE-1 en comparación con los animales WT, tal y como ha sido descrito previamente (Devi y Ohno, 2010, Ohno et al., 2007, Zhang et al., 2009, Zhao et al., 2007), de igual forma que ocurre en el cerebro de los enfermos de EA esporádica (Yang et al., 2003, Fukumoto et al., 2002, Li et al., 2004). Además, en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con deterioro cognitivo leve también se ha observado un aumento en los niveles de BACE-1 (Zhong et al., 2007). En los animales 5XFAD, la acumulación de la forma madura de BACE-1 es lo que daría lugar al incremento en la actividad  $\beta$ -secretasa en relación con los animales WT, en concordancia con algunos resultados en enfermos y otros modelos de la enfermedad (Zohar et al., 2005, Hébert et al., 2008). En este sentido, el tratamiento con LP226 sería capaz de modular el procesamiento amiloidogénico de APP al reducir la actividad  $\beta$ -secretasa en los animales de 7 meses, tal y como refleja la bajada de actividad de BACE-1, y la reducción en los niveles de C99, todo ello sin alterar los niveles de BACE-1 maduro. Estos resultados demuestran la importancia del entorno lipídico que rodea al enzima en esta modulación. Bajo unas condiciones de solubilización que fomentan la pérdida del entorno lipídico de las proteínas (al solubilizar con 1% CHAPS), el tratamiento con LP226 no ejerce influencia sobre la actividad  $\beta$ -secretasa. Sin embargo, bajo condiciones de solubilización más suaves, donde la extracción de proteína de las membranas es menos eficiente, pero posiblemente más respetuosa con el microambiente lipídico que rodea a la proteína, el tratamiento con LP226 es capaz de modular la actividad enzimática de BACE-1 (véanse las Figuras R4.7 y R4.9).

BACE-1 se localiza predominantemente en compartimentos intracelulares ácidos, como los endosomas y las vesículas trans-Golgi, presentando su centro activo en el lumen (Vassar et al., 2009). Con el desarrollo de la EA, estas vesículas tienden a acumularse en neuritas distróficas, en las que tendría lugar

de forma preferente la actividad de BACE-1 (Pérez-Gracia et al., 2008). De hecho, tanto en animales transgénicos como en humanos, los niveles elevados de BACE-1 se han observado en los alrededores de las placas de A $\beta$ 42, donde se encuentran las neuritas distróficas, co-localizando a su vez con proteínas neuronales (Zhao et al., 2007, Zhang et al., 2009, Yu et al., 2004). Además, con la edad la acumulación de los sustratos de la vía APP/APP-CTFs también tiene lugar de forma preferente en las neuritas distróficas que rodean las placas de A $\beta$ , coincidiendo con la localización intracelular donde tiene lugar la acumulación de vesículas autofágicas (Torres et al., 2012). Acorde con esto, en los animales 5XFAD de 12 meses observamos una acumulación tanto de los sustratos de la vía amiloidogénica (APP y C99), como de BACE-1, respecto a los animales de 7 meses. Por ello, en los animales 5XFAD de 12 meses sería esperable un aumento en la actividad  $\beta$ -secretasa respecto a los de 7 meses, que, sin embargo, en este trabajo no hemos sido capaces de detectar; probablemente como consecuencia de un artefacto metodológico (véase el apartado 16.4 de Materiales y Métodos). De hecho, la propia acumulación de BACE-1 en las neuritas distróficas sería lo que dificultaría la solubilización del enzima sin desnaturalizarlo, provocando que no hayamos sido capaces de medir de forma fiable la actividad enzimática de BACE-1 en el tejido de estos animales. En este sentido, la progresión de la patología neurítica durante el proceso de envejecimiento patológico nos impediría comparar de forma fiable los datos de 7 y 12 meses.

En base a estas evidencias, parece ser que el mecanismo de acción de LP226 sobre BACE-1 sería dependiente de la integridad de la membrana lipídica y de la modulación de su composición y estructura. Así pues, estos resultados ponen de manifiesto el papel fundamental que juegan los lípidos de membrana en la regulación de la actividad  $\beta$ -secretasa, a la vez que explicarían cómo se modulan los niveles de C99 y A $\beta$  en los animales 5XFAD tratados con LP226. De hecho, el aumento de los PUFAs en la membrana provocado por el tratamiento con LP226 reduciría la actividad enzimática de BACE-1, favoreciendo la presencia de APP en las regiones líquido-desordenadas, ya que el procesamiento de APP por parte de la  $\beta$ -secretasa tiene lugar de forma preferente, en los dominios tipo *raft* de la membrana (Vassar et al., 2009).

Respecto a la molécula nativa, el DHA, sus efectos en la modulación del procesamiento de APP en modelos de EA han sido descrito ampliamente en la literatura (Teng et al., 2015, Perez et al., 2010, Oksman et al., 2006, Grimm et al., 2011). De hecho, los cambios observados en los animales 5XFAD tras el tratamiento con DHA son en la misma dirección que los que se dan tras el tratamiento con LP226, sin observarse diferencias significativas entre ambos tratamientos. Además de reducir los niveles de C99 y de A $\beta$ , el DHA al igual que el LP226 es capaz de reducir la actividad de BACE-1, sin alterar los niveles enzimáticos. De hecho, en trabajos anteriores, ya ha sido demostrado el efecto del DHA en la modulación de los niveles del péptido A $\beta$  sin provocar cambios en los niveles la proteína BACE-1 madura (Grimm et al., 2011).

Avanzando en el análisis de la vía de procesamiento amiloidogénico de APP, debemos prestar atención al enzima PS1 y a la actividad  $\gamma$ -secretasa. Nuestros resultados reflejan que los niveles de PS1-CTF que presentan los animales 5XFAD permanecen constantes respecto a los animales WT, y no se ven afectados por la sobreexpresión del transgén humano, aun cuando en la caracterización original del modelo fue descrito un aumento de los niveles de PS1-CTF en los animales 5XFAD de 6 meses, en relación con los animales WT (Oakley et al., 2006, Ohno et al., 2006). En este sentido y reforzando nuestros resultados, ha sido descrito que la sobre-expresión de PS1 en células transfectadas o en otros ratones transgénicos no aumenta el nivel de los fragmentos NTF y CTF de PS1, ya que el procesamiento endoproteolítico del enzima está altamente regulado y es saturable, por lo que el exceso de holoproteína se degradada rápidamente, mayoritariamente por el proteosoma (Thinakaran et al., 1996). Del mismo modo, la sobre-expresión inducida de cualquier de las cuatro subunidades por separado no induce un incremento de la actividad  $\gamma$ -secretasa, sino que es necesario que se sobre-expresen las 4 simultáneamente para que esto ocurra (De Strooper, 2003).

De hecho, los niveles de PS1 se mantuvieron constantes también durante el envejecimiento. Así pues, tanto los animales WT como los 5XFAD de 12 meses presentaron niveles de PS1 similares a los de 7 meses. Si bien esta similitud sería esperable para los animales WT, resulta más extraña en el caso de los animales modelo de EA, ya que, del mismo modo que hemos observado un aumento en APP, en C99, y en BACE-1 a los 12 meses debido posiblemente a su acumulación en vesículas en neuritas distróficas, también cabría encontrar un aumento similar en PS1. De hecho, en otros modelos murinos de la EA ha sido descrito el incremento en PS1-CTF asociado a la edad (Torres et al., 2012, Placanica et al., 2009, Laudon et al., 2004), aunque no se ha descrito en nuestro modelo. Las neuritas distróficas se originan en el cuerpo axonal, donde se acumulan los endosomas tardíos (LE, del inglés *late endosomes*) la mayor parte provenientes del transporte anterógrado. Estos LE no transportarían PS1, ya que mayoritariamente carecen del complejo  $\gamma$ -secretasa hasta que llegan hasta el terminal sináptico, localización principal del complejo  $\gamma$ -secretasa y lugar preferente de la producción de A $\beta$  (Cirrito et al., 2008, Cirrito et al., 2005, Frykman et al., 2010). Por ello, los endosomas tardíos que se encuentran en el cuerpo neuronal y en el axón estarían carentes de complejo  $\gamma$ -secretasa, lo que podría explicar que PS1-CTF no se acumulara en las neuritas distróficas. No obstante, desde el terminal sináptico existe un transporte axonal retrógrado, y estas vesículas sí que podrían transportar complejo  $\gamma$ -secretasa. Para resolver esta cuestión sería necesario un estudio más extenso sobre el transporte y acumulación de PS1 en el modelo 5XFAD. En cualquier caso, e independientemente de la caracterización de los animales 5XFAD, el tratamiento con LP226 o con DHA, no ha cambiado los niveles basales de PS1 ni en los animales WT ni en los 5XFAD, independientemente de la edad (7 o a 12 meses).

Por otro lado, en lo que se refiere a la actividad  $\gamma$ -secretasa en el procesamiento de C99, el tratamiento con LP226 produjo una bajada en dicha actividad, reflejada por la bajada en AICD, de igual forma que ocurrió en el grupo tratado con DHA. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que el tratamiento no modula la actividad específica del complejo  $\gamma$ -secretasa, sino que se trataría de una modulación por sustrato, provocada por un descenso en C99 (el sustrato de la reacción). De hecho, tanto en los animales 5XFAD de 7 meses como en los de 12 meses, los niveles de C99 presentes en la membrana se correlacionan significativamente con la producción de AICD tras el ensayo de actividad enzimática  $\gamma$ -secretasa (véase la Figura R18), indicando que la actividad medida depende directamente de los niveles de sustrato C99 presentes en la muestra de partida. Por lo tanto, al no tratarse de una modulación específica de la actividad enzimática, en principio esta no afectaría otros sustratos de la  $\gamma$ -secretasa. Esto último es de especial relevancia en el campo del tratamiento de la EA, ya que, además de en la vía amiloidogénica, el complejo  $\gamma$ -secretasa participa en el procesamiento de otros sustratos como Notch, caderinas, LDR (receptores de LDL), CD44 y Nectina-1 $\alpha$ , entre otros, que intervienen en varias funciones celulares como la estabilización de  $\beta$ -catenina, la homeostasis del calcio, la adhesión celular, etc.; todas ellas esenciales para la supervivencia celular (Wakabayashi y De Strooper, 2008, Parent y Thinakaran, 2010). Por ello, la inhibición específica del complejo enzimático normalmente se ve acompañada de una disminución en el procesamiento de otros sustratos necesarios para la supervivencia neuronal. En este sentido, ensayos clínicos recientes indican que la inhibición de la  $\gamma$ -secretasa provocaría efectos adversos graves como alteraciones en las funciones cognitivas y cáncer de piel (Coric et al., 2012). De hecho, varios de los estudios con estos inhibidores, incluyendo el avagacestat (Bristol-Myers Squibb), el tarenflurbil (Flurizan, Myriad Genetics) y el semagacestat (Eli Lilly y Co.), todos ellos en ensayos clínicos de Fase III, tuvieron que cancelarse debido a la aparición de estos efectos adversos asociados a la inhibición del complejo  $\gamma$ -secretasa (Coric et al., 2012, Green et al., 2009, Doody et al., 2013, Schor, 2011, Gupta et al., 2013).

### **5. Efecto del tratamiento con LP226 en la degeneración sináptica y neuronal**

Finalmente, en el desarrollo de este trabajo decidimos estudiar el estado de otros de los marcadores neuropatológicos de la EA tras el tratamiento con LP226, como son la reducción de la densidad sináptica,

analizada a partir de los niveles de las proteínas sinápticas sinaptofisina y SNAP25, y la muerte neuronal, que evaluamos a partir de la densidad neuronal tras inmunomarcaje de NeuN. Como hemos comentado en los apartados anteriores, el tratamiento con LP226 sería capaz de recuperar las habilidades cognitivas, así como reducir los niveles de acumulación del péptido A $\beta$ , aparentemente sin alterar el tamaño ni el número de placas (Fiol-deRoque et al., 2013). Además, el tratamiento con LP226 también reduciría los niveles de fosforilación de Tau tanto en cultivos celulares como en los ratones 5XFAD (Torres et al., 2014).

En lo que respecta a la pérdida sináptica, el modelo 5XFAD experimenta una progresiva disminución de la densidad sináptica desde los 4-5 meses, que se agrava con la edad (Oakley et al., 2006). En este sentido, la pérdida sináptica se considera un índice consistente de deterioro cognitivo en la EA ya que el mecanismo celular y molecular de la memoria y el aprendizaje dependen de la integridad de los circuitos sinápticos del hipocampo (Sze et al., 2000). La cuantificación de diferentes proteínas sinápticas se considera un buen parámetro para medir el grado de pérdida de sinapsis (Clare et al., 2010) y, de hecho, se ha demostrado que tanto la reducción de las proteínas sinápticas como el deterioro de la plasticidad sináptica se correlacionan con la disfunción cognitiva en la EA (Shankar y Walsh, 2009). Concretamente, en este trabajo hemos evaluado dos proteínas presinápticas: sinaptofisina y SNAP-25. La sinaptofisina es una glicoproteína que se encuentra en las vesículas presinápticas y participa en la liberación de vesículas de neurotransmisores (Zhang et al., 2014). Por su parte, SNAP-25 es un componente fundamental de la sinapsis que desempeña un papel esencial en la exocitosis y la liberación de neurotransmisores, jugando un papel crítico en el tráfico de los receptores NMDA en la membrana celular y en la regulación de la LTP en el hipocampo (Martin et al., 2000). Una reducción en sinaptofisina indica pérdida de sinapsis y está correlacionada con el deterioro de las capacidades cognitivas en individuos con EA (Sze et al., 1997, Suh et al., 2008). Igualmente, los niveles de SNAP-25 se ven reducidos en la EA (Greber et al., 1999, Furuya et al., 2012, Lue et al., 2015) y esta disminución también se correlaciona con el deterioro cognitivo (Berezki et al., 2016). Sin embargo, la reducción en SNAP 25 no se ha replicado en todos los estudios (Ferrer et al., 1998, Sze et al., 2000), posiblemente porque no todas las proteínas sinápticas se vean afectadas del mismo modo y al mismo tiempo durante el desarrollo de la enfermedad. De hecho, parece ser que en la EA la sinaptofisina sería más vulnerable que SNAP-25 o la syntaxina (proteína sináptica, que participa junto a SNAP-25 en la formación de las vesículas sinápticas), viéndose afectada de forma más temprana durante el desarrollo de la enfermedad (Shimohama et al., 1997, Ferrer et al., 1998, Minger et al., 2001). Igualmente, en modelos animales de la EA se ha descrito la reducción de estas proteínas sinápticas (Ray et al., 2011) aunque existe diferencias al respecto (Calon et al., 2004, Arsenault et al., 2011) debido posiblemente a la diferente evolución neuropatológica que acontece en los diferentes modelos entre sí y con respecto a la pérdida sináptica que se da en los enfermos de Alzheimer.

En relación con nuestro modelo, los animales 5XFAD presentan a los 7 meses una reducción moderada en sinaptofisina, aunque no en SNAP-25. Sin embargo, a los 12 meses, ambos marcadores se vieron reducidos de forma notable, demostrando la progresión de la enfermedad con la edad en el modelo 5XFAD. En este sentido, el tratamiento con LP226 fue capaz de prevenir/revertir la pérdida sináptica, recuperando niveles similares a los que presentan los animales WT, tanto en un estado más inicial de la patología (7 meses), como en un estado más avanzado (12 meses). De igual forma, el tratamiento con DHA recuperó los niveles sinápticos al nivel de los controles WT. De hecho, estudios anteriores ya habían relacionado la administración de una dieta elevada en este omega-3 y el consecuente aumento de DHA en el cerebro con un incremento de PSD-95 (marcador postsináptico), así como del número de espinas dendríticas (Wurtman et al., 2006, Sakamoto et al., 2007). Además, una dieta deficiente en DHA se ha relacionado con una reducción de proteínas post-sinápticas y con déficits cognitivos en un modelo murino de EA, aunque en este caso, sin apreciarse cambios en sinaptofisina (Calon et al., 2004).

Por otro lado, el efecto del LP226 o el DHA sobre el aumento de las proteínas sinápticas, solo se ha observado en los animales 5XFAD, en el sentido de recuperar los niveles basales (WT), pero sin apreciarse cambios en los animales WT tratados con alguno de los dos fármacos. De nuevo y como ya habíamos visto

en el caso de la recuperación de la memoria espacial, el hecho de no observar cambios en los animales WT nos indica que el tratamiento actúa de forma selectiva sobre las vías afectadas en la EA y no sobre los mecanismos fisiológicos básicos responsables de la memoria y el aprendizaje.

En el avance del estudio de los principales marcadores neuropatológicos de la EA y el efecto que tendría el tratamiento con LP226 sobre ellos, pasamos a analizar la pérdida neuronal en los animales 5XFAD. En este modelo se ha descrito una reducción significativa en las neuronas del subículo y la capa 5 de la corteza somatosensorial a partir de los 9 meses (Oakley et al., 2006, Eimer y Vassar, 2013). Por el contrario, no se ha detectado pérdida de neuronas en la capa CA1 del hipocampo. Parece ser que esta diferencia en la pérdida neuronal según la región cerebral estudiada vendría dada por la acumulación intraneuronal de A $\beta$ , apoyando la hipótesis de que las placas extracelulares no juegan un papel relevante en la toxicidad de A $\beta$ . En los animales 5XFAD, las neuronas piramidales de la capa 5 de la corteza, que acumulan cantidades considerables de A $\beta$  desde los 3 meses de edad, sufren una reducción cercana al 40% a los 12 meses de edad. Por el contrario, parece ser que las neuronas de la capa CA1, pese a presentar niveles comparables de expresión de APP transgénica, no acumulan A $\beta$  intraneuronal (Jawhar et al., 2012). De igual forma, en el modelo murino de EA, APP/PS1KI, la pérdida de neuronas sólo se produce en regiones cerebrales que muestran una acumulación intraneuronal de A $\beta$  sin detectarse en aquellas regiones en las que sólo aparecen placas extracelulares, pero no depósito intraneuronal (Breyhan et al., 2009, Christensen et al., 2008, Christensen et al., 2010).

En este trabajo se estudió el efecto del tratamiento con LP226 sobre la densidad neuronal únicamente en los animales de 12 meses, y no a edades más tempranas, analizando el inmunomarcaje específico de NeuN, una proteína neuronal específica de unión al ADN presente en la mayoría de los tipos de neuronas del SNC y periférico (Mullen et al., 1992, Wolf et al., 1996) y que se utiliza como marcador específico de neuronas. Tal y como hemos comentado anteriormente, en el modelo 5XFAD la pérdida neuronal se ha descrito en la capa 5 de la corteza somatosensorial y en el subículo. Sin embargo, al analizar estas dos áreas en nuestros animales, esta reducción fue mucho más acusada en la corteza somatosensorial, por lo que sólo se han mostrado estos resultados. Los animales 5XFAD de 12 meses presentaron una pérdida neuronal similar a la descrita en otros trabajos, en comparación con el grupo WT (Oakley et al., 2006, Jawhar et al., 2012). Por otro lado, los animales tratados con LP226 durante 4 meses muestran una recuperación de la pérdida neuronal, de forma que la densidad neuronal que presentan es comparable a la del grupo WT, indicándonos que el tratamiento con este fármaco sería capaz de frenar la pérdida neuronal propia del modelo y característica de la EA. De hecho, en trabajos anteriores ya demostramos que el tratamiento con LP226 era capaz de proteger a células tipo neuronal contra la toxicidad mediada por A $\beta$  oligomérico o por el NMDA, e incluso inducir la proliferación celular, demostrando así el efecto neuroprotector y neuroregenerador de nuestro compuesto contra la neurotoxicidad propia de la EA (Torres et al., 2014).

En nuestro caso, en los animales 5XFAD (controles y tratados), tanto los niveles de marcadores sinápticos como la densidad neuronal se correlacionaron con el estado de la memoria espacial, indicando la relación existente entre estos eventos y señalando que la recuperación observada en los animales 5XFAD tras el tratamiento con LP226 sería global, al verse reflejada tanto en la recuperación de la memoria como en la recuperación sináptica y neuronal. En el caso del tratamiento con DHA, la recuperación neuronal no fue significativa. Sin embargo, este tratamiento sí que fue eficaz en la recuperación sináptica, sobre todo en lo que respecta a SNAP-25. Lo que sugiere que los mecanismos de acción de ambas moléculas podrían ser diferentes.

En los animales 5XFAD el deterioro de la memoria está relacionado con el inicio de la disfunción sináptica del hipocampo, como niveles reducidos de transmisión basal y una LTP deficiente (Kimura y Ohno, 2009). Con la intención de incidir en el estudio del mecanismo responsable de la disminución de la degeneración sináptica y la recuperación cognitiva tras el tratamiento con LP226, decidimos estudiar el estado de la proliferación neuronal. En este sentido, en los animales 5XFAD de 7 meses detectamos una

disminución significativa de la proliferación celular en el hipocampo de forma similar a lo que se ha descrito en otros modelos murinos de la EA como modelos APP, PS1, APP/PS1 y 3xTgAD (Haughey et al., 2002, Wen et al., 2002, Dong et al., 2004, Rodríguez et al., 2008, Rodríguez et al., 2009, Rodríguez et al., 2011). El deterioro de la proliferación celular en los animales 5XFAD podría deberse a un nivel reducido de factores neurotróficos, como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), que comienza temprano en el curso de la EA humana y a los 3 meses en el modelo 5XFAD (Peng et al., 2005, Devi y Ohno, 2012).

El tratamiento crónico con LP226 reguló positivamente la proliferación celular en el giro dentado del hipocampo llevándola prácticamente hasta los valores normales observados en el cerebro WT. En este sentido, sería posible que este aumento de la proliferación celular en el hipocampo mejorase la red de conexiones hipocampales promoviendo una mejora en la LTP; que está afectada en la EA (Yamin, 2009), dando lugar de esta forma a la mejora observada en el LR. Puesto que tanto el hipocampo como la corteza prefrontal participan en la codificación de la memoria espacial en roedores (Gordon, 2011), la mejora observada tanto en la memoria de trabajo como en la memoria de referencia podría ser un efecto sumatorio debido tanto a la recuperación local del hipocampo, como a la conexión hipocampo-corteza (Vertes et al., 2007). A pesar de que en este trabajo no hemos evaluado el efecto del DHA en la proliferación celular, en los últimos años varios estudios lo han relacionado con la neurogénesis, sugiriendo que este PUFA podría modular la generación de nuevas neuronas funcionales (Su, 2010). El DHA es capaz de promover la proliferación de células madre neuronales en cultivos de células embrionarias, así como la neurogénesis en el hipocampo de ratas adultas y viejas con una mejora en la capacidad de aprendizaje (Kawakita et al., 2006, Dyllal et al., 2010). Además, los ratones transgénicos para los PUFA omega-3, que tienen niveles elevados de DHA, presentan un incremento tanto en la neurogénesis hipocampal como en el crecimiento de neuritas, así como mejoras en el aprendizaje espacial (He et al., 2009). Todo esto indicaría un mecanismo potencial por el cual el LP226, al igual que el DHA, mejoraría la función neuronal en el hipocampo facilitando o promoviendo el aprendizaje y el comportamiento mediante la generación de nuevas neuronas del hipocampo (Su, 2010).

Por otro lado, se ha demostrado que la deficiencia en omega-3 reduce los niveles de BDNF y la señalización a través de TrkB, el receptor de BDNF, de forma proporcional a los niveles de DHA cerebral (Bhatia et al., 2011). Igualmente, la suplementación de PUFAs omega-3 mejora la expresión de BDNF (Katsuki et al., 2009) lo que se correlaciona con un aumento de la neurogénesis en el hipocampo de ratón (Blondeau et al., 2009). Por otra parte, se ha demostrado que el BDNF facilita la LTP (Pang y Lu, 2004, Lu et al., 2008) estableciendo una posible conexión entre DHA, BDNF y LTP. Además, al ser el LP226 un derivado hidroxilado de DHA, como es NPD1, podría poseer una capacidad neuroprotectora (Zhao et al., 2011) y antiapoptótica (Calandria et al., 2012), mejorando el mantenimiento del hipocampo, no sólo como un inductor de la proliferación celular, sino también protegiendo las neuronas existentes, tal como refleja la recuperación neuronal que hemos observado en los animales de 12 meses.

Finalmente, la delección genética de BACE-1 también se ha relacionado con la neurogénesis (Modarresi et al., 2011, Hu et al., 2013), lo que resulta de especial interés puesto que nuestro compuesto actúa de forma similar a como lo hace la delección genética de BACE-1, que en ratones 5XFAD detiene la producción de A $\beta$ , así como su depósito en forma de placas, además de la astrogliosis, los déficits de memoria y más importante aún, previene de la muerte neuronal propia del modelo tanto en la corteza cerebral como en el subículo (Ohno et al., 2007). De modo que la inhibición parcial de BACE-1 mediada por LP226 podría en parte explicar la supervivencia neuronal y la mejora a nivel cognitivo, así como la normalización del proceso neurogénico descrita en el presente trabajo.

### **6. Implicación de los resultados obtenidos con la administración de LP226 para el tratamiento de la EA en humanos**

En su conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo indican que el tratamiento con LP226 es capaz de modular la composición lipídica de las membranas en el cerebro, incrementando los niveles de PE que contienen PUFAs, lo que favorecería la presencia de dominios líquido-desordenados. Este cambio en la composición posibilitaría una estructura de membrana más flexible que no favorece el procesamiento de APP por la vía amiloidogénica. De hecho, esta modificación permitiría regular la actividad de BACE-1, reduciendo así la producción de C99 y en consecuencia del péptido A $\beta$ , tal y como demuestran nuestros resultados en ratones. Además, esta reducción en la vía de procesamiento amiloidogénica de APP reduciría el ambiente citotóxico, restaurando la actividad neurogénica basal y reduciendo la pérdida sináptica, lo que finalmente nos llevaría a una reducción en la pérdida neuronal. Todos estos eventos tendrían finamente el reflejo en la mejora de las capacidades cognitivas.

Por otro lado, en base a las evidencias de las que disponemos, el tratamiento con LP226 sería, como mínimo, tan eficiente como el tratamiento con DHA. Los estudios epidemiológicos sugieren un efecto protector de los PUFAs omega-3 (como el DHA) y del aceite de pescado (una importante fuente de PUFAs omega-3) contra la EA (Wu et al., 2015, Barberger-Gateau et al., 2007, Quinn et al., 2010a). La mayoría de los estudios que evalúan las relaciones entre la ingesta de PUFAs omega-3 y el riesgo de padecer EA sugieren que existe un efecto protector de estos PUFAs omega-3 de cadena larga sobre la incidencia de EA, aunque en el análisis combinado no se alcanzasen diferencias estadísticas significativas. Sin embargo, la evidencia de estos efectos neuroprotectores han alentado una serie de ensayos clínicos para evaluar los efectos de la administración de ácidos grasos omega-3 a pacientes con EA durante un período de tiempo definido, centrándose particularmente en los beneficios cognitivos de DHA y EPA. Estos estudios no han demostrado de forma concluyente los beneficios de la administración de ácidos grasos omega-3 a pacientes con EA, pero sí demuestran que la suplementación con DHA puede representar un enfoque terapéutico plausible para el tratamiento de la disminución cognitiva relacionada con la edad (Quinn et al., 2010a, Freund-Levi et al., 2006, Shinto et al., 2014). Algunas de las discrepancias en los diferentes estudios podrían estar reflejando las diferencias en la fuente de los PUFAs omega-3 administrados a los pacientes, de forma que aquellos que provienen directamente del pescado (generalmente aceite de pescado) serían más eficientes en la prevención de la EA (Torres et al., 2016). En este sentido, el pescado azul también es una buena fuente de vitaminas, aminoácidos esenciales y otros nutrientes, que a su vez podría ser responsable del efecto beneficioso atribuido al pescado en la prevención de la EA. Además, el efecto neuroprotector de la ingesta de pescado también podría atribuirse a los autacoides derivados de PUFAs presentes en el pescado, como las formas hidroxiladas de PUFAs tales como resolvinas (como NPD1) o formas de PUFAs fácilmente transformables en derivados bioactivos que median sus efectos beneficiosos en el SNC (Hong et al., 2005). De hecho, recientemente se ha relacionado el consumo de aceite de pescado con niveles crecientes del DHA total, así como de NPD1 en el cerebro de ratón, sin ninguna modificación de los niveles de DHA libre (no esterificado) en el cerebro (Afshordel et al., 2015). Además, los niveles de NPD1 se reducen drásticamente en el cerebro de EA, incluso más que el propio DHA (Lukiw et al., 2005); sugiriendo que los niveles anormalmente bajos de DHA en la EA estarían acompañados por el deterioro de la conversión de este ácido graso en NPD1 y otras resolvinas. Estos datos ponen de manifiesto un papel central para los derivados bioactivos hidroxilados de PUFAs tipo omega-3 en la prevención y el tratamiento de la EA.

La enzima lipooxigenasa-15 (15-LOX) es clave en la generación de resolvinas de la serie D y de las protectinas. Sin embargo, esta enzima también participa en la conversión del ARA en sus derivados hidroxilados, que son potentes mediadores pro-oxidantes, conocidos por sus efectos pro-inflamatorio y su relación con diversas enfermedades. En este sentido, la caracterización de los niveles de esta enzima en el cerebro en la EA presenta cierta controversia porque, por un lado, se ha descrito una reducción de

los niveles de 15-LOX en el hipocampo y corteza de pacientes con EA (Lukiw et al., 2005), llevando a una reducción en los niveles de NPD1. Sin embargo, por otra parte, otros estudios han descrito un aumento de 15-LOX en la corteza frontal y temporal (Praticò et al., 2004, Rao et al., 2011) y en el líquido cefalorraquídeo (Yao et al., 2005) en pacientes con EA, en ambos casos asociado con un incremento de los derivados hidroxilados pro-inflamatorios del ARA (Schmitz y Ecker, 2008). Entonces, dependiendo del estudio y de la región cerebral estudiada, se han encontrado resultados discrepantes en los niveles de 15-LOX en la EA. Si bien, por un lado, una disminución en los niveles de 15-LOX, justificarían la reducción en la neuroprotección mediada por NPD1, también es cierto que un incremento de sus niveles podría dar lugar a un aumento de los mediadores pro-inflamatorios derivados del ARA en el contexto de la EA.

Por otra parte, y como ya hemos comentado, el DHA y el ARA son sustratos competitivos para las enzimas implicadas en la biosíntesis de autacoides. Estos PUFAs son liberados de los fosfolípidos de membrana por la fosfolipasa A2 (PLA2) y se vuelven accesibles a la conversión por 15-LOX. Dado que comparten las mismas enzimas, existe una competencia por su metabolismo y un exceso de uno provoca una caída sustancial en la conversión del otro (Schmitz y Ecker, 2008). De modo que, en el contexto de la EA, la disminución en los niveles de DHA se traduce en un aumento en la conversión de ARA en factores generalmente pro-inflamatorios, mientras que un aumento del consumo dietético de EPA y DHA resulta en mayores concentraciones de estos ácidos grasos en los fosfolípidos celulares y en una mayor producción de autacoides/eicosanoides omega-3 neuroprotectores y anti-inflamatorios como protectinas y resolvinas (Lee et al., 1985, Healy et al., 2000).

En las dietas occidentales, la ingesta total de grasas, así como la proporción de omega-6 y omega-3 ha cambiado drásticamente desde la revolución industrial, pasando de una proporción de 1-2:1 a aproximadamente 10-20:1. Estas proporciones reflejan cómo, actualmente, las dietas occidentales son deficientes en PUFAs omega-3 (Simopoulos, 2006, Janssen y Kiliaan, 2014). Si tenemos en cuenta que el equilibrio entre la ingesta de omega-6 y omega-3 tiene un fuerte impacto en la salud del cerebro, resulta de vital importancia el mantenimiento de una dieta equilibrada y de una proporción adecuada entre los diferentes PUFAs. De hecho, varios estudios han descrito cómo la proporción de omega-6 y omega-3 en la dieta afecta fuertemente a la producción de autacoides y como el aumento del consumo de PUFAs omega-3 conduce a una reducción de la síntesis de eicosanoides inflamatorios de ARA (omega-6), a la vez que aumenta los niveles de autacoides antiinflamatorios y neuroprotectores derivados de los ácidos grasos omega-3 (Schmitz y Ecker, 2008). Puesto que la maquinaria enzimática responsable de esta conversión es la misma, el aumento de los derivados hidroxilados del ARA de la serie omega-6 implica una disminución de los de la serie omega-3 y viceversa. En este sentido, la regulación al alza del metabolismo de ARA y la producción de citoquinas proinflamatorias se asocia con el daño neuronal en el cerebro EA (Rao et al., 2011). De hecho, se ha descrito el aumento de los niveles de ARA en el cerebro en pacientes con EA (Esposito et al., 2008) y el análisis post-mortem de la corteza frontal de enfermos de EA revela la alteración de los marcadores de la cascada ARA y la regulación positiva de marcadores neuroinflamatorios. Estas evidencias ponen de manifiesto la importancia del equilibrio dietético omega-6/3 para prevenir la EA.

En su conjunto, estas evidencias apoyan la idea de que la generación de segundos mensajeros lipídicos a partir del DHA está alterada en la EA (Lukiw et al., 2005). Entonces, asumiendo que la conversión de DHA en derivados hidroxilados es necesaria para mediar la actividad fisiológica relacionada con el DHA, la disminución en los niveles de DHA, el desajuste en el balance y conversión de los PUFAs omega-6 y omega-3 y las alteraciones en la enzima 15-LOX podrían explicar, al menos parcialmente, por qué la administración de DHA no mejoró la cognición en pacientes con EA.

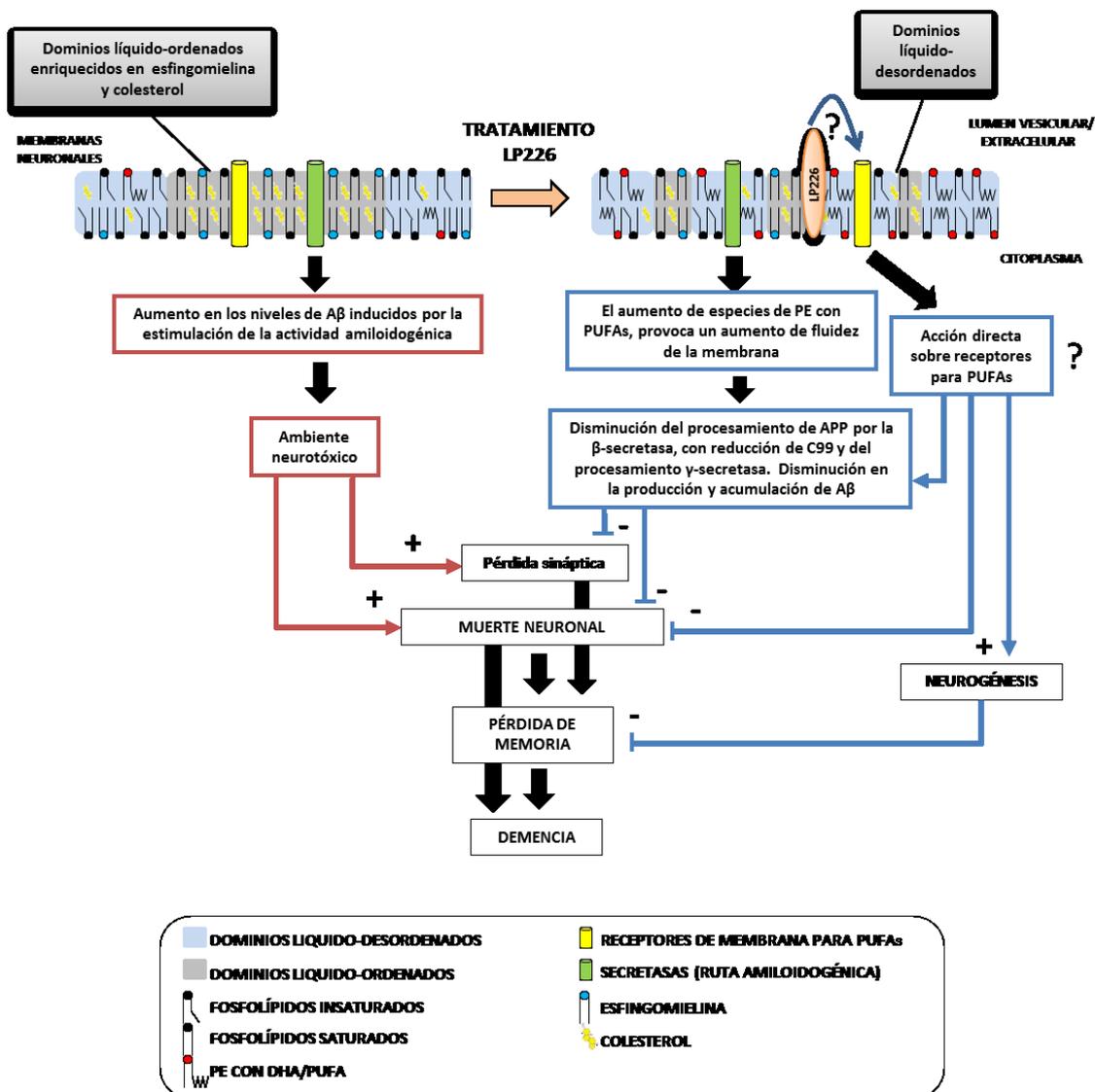
Por todo ello cobra importancia el hecho de que los estudios con DHA en modelos animales fuesen efectivos, pero fallasen al ser trasladados a pacientes. El hecho de que muchos modelos animales no sean capaces de reproducir las alteraciones lipídicas que presentan los cerebros humanos de enfermos de EA, como por ejemplo la disminución en los niveles de DHA (Chan et al., 2012, Tajima et al., 2013), sugiere

que tampoco son capaces de reproducir las alteraciones en la conversión de DHA en sus derivados hidroxilados bioactivos. En ese caso, el tratamiento con DHA sería efectivo en mitigar los efectos que provocan las mutaciones en APP y/o PS1 en los modelos murinos de la EA, pero este efecto no sería trasladable a humanos al tener alterada la vía de conversión de DHA en sus derivados bioactivos. En este sentido, cobra especial relevancia el LP226. Por una parte, el LP226 ha demostrado ser como mínimo tan efectivo como el DHA para revertir alteraciones moleculares y celulares en animales 5XFAD, siendo capaz de modular la actividad  $\beta$ -secretasa, disminuyendo la producción de A $\beta$ , y recuperando tanto los niveles de densidad sináptica como neuronal, así como las capacidades cognitivas. Sin embargo, por otra parte, evidencias acumuladas en el laboratorio nos llevan a pensar que el LP226 se metaboliza por una vía diferente a la que lo hace el DHA. En este sentido, en un modelo transgénico de EA en *Drosophila melanogaster* al tratar con DHA aparece un aumento de DHA y EPA en el cerebro, que no se da al tratar con LP226. En cambio, se detectan una serie de metabolitos que no aparecen al tratar con DHA (Mohaibes et al., 2017). De igual forma ocurre en cultivos celulares donde se producen una serie de metabolitos secundarios que no aparecen al tratar con DHA (resultados no publicados). Estas evidencias reflejarían que estos dos lípidos se metabolizan de forma diferente. En consecuencia, es posible que el LP226 no esté condicionado por los mecanismos fisiopatológicos que llevan a una reducción en los niveles de DHA y sus mediadores. Por tanto, la acción del LP226 a nivel cerebral tendría una vía de actuación diferente, actuando más como un segundo mensajero del DHA que como un suplemento del propio DHA para restaurar los niveles del mismo. En su conjunto, esto sugiere que LP226 podría ser una buena alternativa al DHA para el tratamiento de la EA. De hecho, el LP226 permitió la normalización de los parámetros cognitivos en el modelo 5XFAD de EA, mientras que el DHA no fue eficaz para mejorar significativamente los parámetros cognitivos en estos animales

Entonces, además de en la regulación de la composición y estructura de la membrana lipídica, el LP226 estaría actuando de forma directa sobre la señalización celular. En este sentido, tanto el DHA no esterificado, como las resolvinas y las protectinas pueden unirse a diferentes receptores de ácidos grasos tales como el receptor retinoide X (RXR), receptores acoplados a proteína G (GPCR), receptores activados por proliferador de peroxisoma (PPAR) y proteínas de unión a ácidos grasos (FABP) (Niemoller y Bazan, 2010). Aunque la cascada de señalización exacta mediada por muchas de estas proteínas no ha sido identificada, se cree que el mecanismo de acción tanto del DHA, como sus derivados hidroxilados, implicaría la activación de PPAR $\gamma$ . De hecho, NPD1 promueve la activación de PPAR $\gamma$  en mayor medida que el DHA, por lo que se cree que los efectos neuroprotectores del DHA podrían estar mediados por NPD1 y/u otros derivados hidroxilados bioactivos de DHA (Zhao et al., 2011, Stark y Bazan, 2011). En este sentido, se ha descrito que PPAR $\gamma$  es capaz de reducir la actividad de BACE-1. Esta modulación, daría lugar a una reducción en la producción de A $\beta$ , de la pérdida neuronal y del deterioro cognitivo en un modelo murino de la EA (Katsouri et al., 2011, Katsouri et al., 2016). Por tanto, la bajada de actividad de BACE-1 que experimentan los animales tratados con LP226 podría ser un efecto sumatorio de la modulación lipídica y la regulación de la actividad de BACE-1 mediada por PPAR $\gamma$ . Por otro lado, la activación de PPAR $\gamma$  también se ha relacionado con la modulación de la proliferación y diferenciación de células madre neuronales (Kanakasabai et al., 2012, Wang et al., 2009, Wada et al., 2006) así como con la inducción/protección de la neurogénesis en el hipocampo (Lee et al., 2010, Esposito et al., 2011, Ormerod et al., 2013).

Por todo ello, en el presente trabajo proponemos que el LP226 ejercería su acción a través de 2 vías diferentes (Figura D.1). Por una parte, el tratamiento con LP226 posibilitaría la modulación de la composición de la membrana lipídica. Esta modulación daría lugar a un estado de mayor fluidez de la membrana, que disminuiría el procesamiento amiloidogénico de APP, al modular la actividad de BACE-1 (por el entorno lipídico que rodea al enzima), lo que finalmente, nos llevaría a una reducción del procesamiento  $\gamma$ -secretasa, por reducción de sustrato, dando lugar a una reducción de la producción y acumulación de A $\beta$ . Todo esto provocaría una reducción del ambiente neurotóxico lo que llevaría a una

reducción de la pérdida sináptica y, posiblemente, de la pérdida neuronal, a la vez que contribuiría a normalizar los procesos neurogénicos normales del cerebro adulto.



**Figura D1. Modulación de la composición y estructura de la membrana lipídica por LP226.** El tratamiento con LP226 provoca un aumento de las especies de PE con PUFAs en la membrana, lo que provocaría un cambio en las estructuras de membrana neuronales, aumentando las regiones líquido-desordenadas y aportando una mayor fluidez a la membrana. Estos cambios en la membrana provocarían una disminución del procesamiento de APP por parte de la  $\beta$ -secretasa y, por tanto, una reducción en el procesamiento  $\gamma$ -secretasa de C99, con la consecuente reducción en la producción de A $\beta$ . En un escenario en el que disminuyese la acumulación de A $\beta$ , se vería reducido el ambiente neurotóxico, previniendo la pérdida sináptica y la muerte neuronal. Por otro lado, también existe la posibilidad de que se produzca la unión directa del LP226 sobre receptores para PUFAs, que en parte contribuiría al ambiente neuroprotector e influiría de forma positiva sobre la neurogénesis. En su conjunto, estos dos mecanismos de acción del LP226 contribuirían a reducir la pérdida de memoria, restableciendo las capacidades cognitivas.

Por otro lado, el LP226 podría actuar directamente como lípido bioactivo neuroprotector uniéndose a receptores de membrana o intracelulares, de igual forma que hacen el resto de derivados hidroxilados del DHA. Debido a su acción neuroprotectora, el tratamiento con LP226 ayudaría a mitigar la muerte neuronal e influiría de forma positiva sobre la neurogénesis a través de la activación de PPAR $\gamma$ . A través

## Discusión

---

de este mecanismo también se modularía la actividad  $\beta$ -secretasa ya que PPAR $\gamma$  participa en la regulación de la actividad de BACE-1. Una reducción en BACE-1 contribuiría a la bajada en el procesamiento  $\beta$ -secretasa lo que finalmente llevaría a una reducción de la producción de A $\beta$  por la  $\gamma$ -secretasa.

Finalmente, la acción simultánea de estas vías de actuación del LP226, darían lugar al restablecimiento de las capacidades cognitivas, mitigando la pérdida de memoria propia de la EA.

## *VI. CONCLUSIONES*

---



Las conclusiones generales de la presente Tesis Doctoral son:

1- El compuesto LP226 es un lípido farmacológicamente activo originalmente concebido como una neuroprotectina de diseño, que ejerce su acción a través de la modulación de la composición y la estructura de la membrana lipídica.

2- El tratamiento con LP226 provoca el restablecimiento de las capacidades cognitivas en ratones 5XFAD, tal y como refleja la restauración de la memoria de trabajo y de referencia tras el tratamiento crónico.

3.- El tratamiento crónico con LP226 provoca cambios en la membrana lipídica en el cerebro de los animales 5XFAD, aumentando los niveles de fosfatidiletanolamina que contiene ácidos grasos polinsaturados de cadena larga, entre los que se encuentra posiblemente el DHA, favoreciendo así la formación de dominios líquido-desordenados que otorgan a la membrana mayor fluidez.

4- La modulación de la membrana tras el tratamiento crónico con LP226 reduce el procesamiento amiloidogénico de APP en los animales 5XFAD al modular la actividad de BACE-1 y reducir la producción de C99, lo que finalmente da lugar a una disminución del procesamiento  $\gamma$ -secretasa de C99, disminuyendo así la producción de A $\beta$ .

5- La acción neuroprotectora directa del LP226 influye en la homeostasis celular revirtiendo el proceso neurodegenerativo, mitigando la pérdida sináptica y la muerte neuronal y restaurando la proliferación celular adulta en el hipocampo de los ratones 5XFAD.

6- El conjunto de nuestros resultados abre la posibilidad al desarrollo de moléculas miméticas a las neuroprotectinas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas en humanos como la Enfermedad de Alzheimer.



## *VII. BIBLIOGRAFÍA*

---



- Abrous, D. N., Koehl, M. and Le Moal, M. (2005) 'Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology.', *Physiol Rev*, 85(2), pp. 523-69.
- Afshordel, S., Hagl, S., Werner, D., Röhner, N., Kögel, D., Bazan, N. G. and Eckert, G. P. (2015) 'Omega-3 polyunsaturated fatty acids improve mitochondrial dysfunction in brain aging--impact of Bcl-2 and NPD-1 like metabolites', *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 92, pp. 23-31.
- Ahmed, R. R., Holler, C. J., Webb, R. L., Li, F., Beckett, T. L. and Murphy, M. P. (2010) 'BACE1 and BACE2 enzymatic activities in Alzheimer's disease', *J Neurochem*, 112(4), pp. 1045-53.
- Alberts, B., Wilson, J. H. and Hunt, T. (2008) *Molecular biology of the cell*. 5th ed., Reference ed. edn. New York, N.Y. ; Abingdon: Garland Science.
- Andrews, K. A., Modat, M., Macdonald, K. E., Yeatman, T., Cardoso, M. J., Leung, K. K., Barnes, J., Villemagne, V. L., Rowe, C. C., Fox, N. C., Ourselin, S., Schott, J. M. and Australian Imaging Biomarkers, L. f. F. S. o. A. (2013) 'Atrophy rates in asymptomatic amyloidosis: implications for Alzheimer prevention trials', *PLoS One*, 8(3), pp. e58816.
- Ang, S. Y. and Lee, K. (2008) 'Central executive involvement in children's spatial memory.', *Memory*, 16(8), pp. 918-33.
- Arlt, S., Buchert, R., Spies, L., Eichenlaub, M., Lehmbeck, J. T. and Jahn, H. (2013) 'Association between fully automated MRI-based volumetry of different brain regions and neuropsychological test performance in patients with amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease', *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 263(4), pp. 335-44.
- Arsenault, D., Julien, C., Tremblay, C. and Calon, F. (2011) 'DHA improves cognition and prevents dysfunction of entorhinal cortex neurons in 3xTg-AD mice.', *PLoS One*, 6(2), pp. e17397.
- Askarova, S., Yang, X. and Lee, J. C. (2011) 'Impacts of membrane biophysics in Alzheimer's disease: from amyloid precursor protein processing to a $\beta$  Peptide-induced membrane changes', *Int J Alzheimers Dis*, 2011, pp. 134971.
- Association, A. P. (2013) *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5®)*. American Psychiatric Pub.
- Astarita, G., Jung, K. M., Berchtold, N. C., Nguyen, V. Q., Gillen, D. L., Head, E., Cotman, C. W. and Piomelli, D. (2010) 'Deficient liver biosynthesis of docosahexaenoic acid correlates with cognitive impairment in Alzheimer's disease', *PLoS One*, 5(9), pp. e12538.
- Ballatore, C., Lee, V. M. and Trojanowski, J. Q. (2007) 'Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders', *Nat Rev Neurosci*, 8(9), pp. 663-72.
- Bandaru, V. V., Troncoso, J., Wheeler, D., Pletnikova, O., Wang, J., Conant, K. and Haughey, N. J. (2009) 'ApoE4 disrupts sterol and sphingolipid metabolism in Alzheimer's but not normal brain', *Neurobiol Aging*, 30(4), pp. 591-9.
- Barberger-Gateau, P., Letenneur, L., Deschamps, V., Pérès, K., Dartigues, J. F. and Renaud, S. (2002) 'Fish, meat, and risk of dementia: cohort study.', *BMJ*, 325(7370), pp. 932-3.
- Barberger-Gateau, P., Raffaitin, C., Letenneur, L., Berr, C., Tzourio, C., Dartigues, J. F. and Alpérovitch, A. (2007) 'Dietary patterns and risk of dementia: the Three-City cohort study', *Neurology*, 69(20), pp. 1921-30.
- Barceló, F., Prades, J., Funari, S. S., Frau, J., Alemany, R. and Escribá, P. V. (2004) 'The hypotensive drug 2-hydroxyoleic acid modifies the structural properties of model membranes', *Mol Membr Biol*, 21(4), pp. 261-8.
- Barceló-Coblijn, G., Martin, M. L., de Almeida, R. F., Noguera-Salvà, M. A., Marcilla-Etxenike, A., Guardiola-Serrano, F., Lüth, A., Kleuser, B., Halver, J. E. and Escribá, P. V. (2011) 'Sphingomyelin and sphingomyelin synthase (SMS) in the malignant transformation of glioma cells and in 2-hydroxyoleic acid therapy', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(49), pp. 19569-74.

## Bibliografia

---

- Bascoul-Colombo, C., Guschina, I. A., Maskrey, B. H., Good, M., O'Donnell, V. B. and Harwood, J. L. (2016) 'Dietary DHA supplementation causes selective changes in phospholipids from different brain regions in both wild type mice and the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease', *Biochim Biophys Acta*, 1861(6), pp. 524-37.
- Basu, J. and Siegelbaum, S. A. (2015) 'The Corticohippocampal Circuit, Synaptic Plasticity, and Memory', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(11).
- Baumann, K., Mandelkow, E. M., Biernat, J., Piwnicka-Worms, H. and Mandelkow, E. (1993) 'Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5', *FEBS Lett*, 336(3), pp. 417-24.
- Becker, J. T., Walker, J. A. and Olton, D. S. (1980) 'Neuroanatomical bases of spatial memory', *Brain Res*, 200(2), pp. 307-20.
- Bennett, B. D., Denis, P., Haniu, M., Teplow, D. B., Kahn, S., Louis, J. C., Citron, M. and Vassar, R. (2000) 'A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's beta -secretase', *J Biol Chem*, 275(48), pp. 37712-7.
- Bentahir, M., Nyabi, O., Verhamme, J., Tolia, A., Horr , K., Wiltfang, J., Esselmann, H. and De Strooper, B. (2006) 'Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms', *J Neurochem*, 96(3), pp. 732-42.
- Berezcki, E., Francis, P. T., Howlett, D., Pereira, J. B., H glund, K., Bogstedt, A., Cedazo-Minguez, A., Baek, J. H., Hortob gyi, T., Attems, J., Ballard, C. and Aarsland, D. (2016) 'Synaptic proteins predict cognitive decline in Alzheimer's disease and Lewy body dementia', *Alzheimers Dement*, 12(11), pp. 1149-1158.
- Bhat, N. R. and Thirumangalakudi, L. (2013) 'Increased tau phosphorylation and impaired brain insulin/IGF signaling in mice fed a high fat/high cholesterol diet', *J Alzheimers Dis*, 36(4), pp. 781-9.
- Bhatia, H. S., Agrawal, R., Sharma, S., Huo, Y. X., Ying, Z. and Gomez-Pinilla, F. (2011) 'Omega-3 fatty acid deficiency during brain maturation reduces neuronal and behavioral plasticity in adulthood.', *PLoS One*, 6(12), pp. e28451.
- Billings, L. M., Oddo, S., Green, K. N., McGaugh, J. L. and LaFerla, F. M. (2005) 'Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice.', *Neuron*, 45(5), pp. 675-88.
- Biswas, S. C., Shi, Y., Vonsattel, J.-P. G., Leung, C. L., Troy, C. M. and Greene, L. A. (2007) 'Bim is elevated in Alzheimer's disease neurons and is required for  $\beta$ -amyloid-induced neuronal apoptosis', *Journal of Neuroscience*, 27(4), pp. 893-900.
- Blennow, K., de Leon, M. J. and Zetterberg, H. (2006) 'Alzheimer's disease', *Lancet*, 368(9533), pp. 387-403.
- Blennow, K., Hampel, H., Weiner, M. and Zetterberg, H. (2010) 'Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease', *Nat Rev Neurol*, 6(3), pp. 131-44.
- Bligh, E. G. and Dyer, W. J. (1959) 'A rapid method of total lipid extraction and purification', *Can J Biochem Physiol*, 37(8), pp. 911-7.
- Blondeau, N., Nguemeni, C., Debruyne, D. N., Piens, M., Wu, X., Pan, H., Hu, X., Gandin, C., Lipsky, R. H., Plumier, J. C., Marini, A. M. and Heurteaux, C. (2009) 'Subchronic alpha-linolenic acid treatment enhances brain plasticity and exerts an antidepressant effect: a versatile potential therapy for stroke.', *Neuropsychopharmacology*, 34(12), pp. 2548-59.
- Bottino, C. M., Castro, C. C., Gomes, R. L., Buchpiguel, C. A., Marchetti, R. L. and Neto, M. R. (2002) 'Volumetric MRI measurements can differentiate Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, and normal aging', *Int Psychogeriatr*, 14(1), pp. 59-72.

- Bouter, Y., Kacprowski, T., Weissmann, R., Dietrich, K., Borgers, H., Brauß, A., Sperling, C., Wirths, O., Albrecht, M., Jensen, L. R., Kuss, A. W. and Bayer, T. A. (2014) 'Deciphering the molecular profile of plaques, memory decline and neuron loss in two mouse models for Alzheimer's disease by deep sequencing', *Front Aging Neurosci*, 6, pp. 75.
- Braak, H., Alafuzoff, I., Arzberger, T., Kretschmar, H. and Del Tredici, K. (2006) 'Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry', *Acta Neuropathol*, 112(4), pp. 389-404.
- Braak, H. and Braak, E. (1991) 'Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes', *Acta Neuropathol*, 82(4), pp. 239-59.
- Breyhan, H., Wirths, O., Duan, K., Marcello, A., Rettig, J. and Bayer, T. A. (2009) 'APP/PS1KI bigenic mice develop early synaptic deficits and hippocampus atrophy', *Acta Neuropathol*, 117(6), pp. 677-85.
- Brinkmalm, A., Brinkmalm, G., Honer, W. G., Frölich, L., Hausner, L., Minthon, L., Hansson, O., Wallin, A., Zetterberg, H., Blennow, K. and Öhrfelt, A. (2014) 'SNAP-25 is a promising novel cerebrospinal fluid biomarker for synapse degeneration in Alzheimer's disease', *Mol Neurodegener*, 9, pp. 53.
- Brouwers, N., Slegers, K. and Van Broeckhoven, C. (2008) 'Molecular genetics of Alzheimer's disease: an update', *Ann Med*, 40(8), pp. 562-83.
- Brown, D. A. and London, E. (1998) 'Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes', *J Membr Biol*, 164(2), pp. 103-14.
- Bryan, K. J. 2009. Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease: Behavioral Testing and Considerations. In: Hyoung-gon Lee, G.P., Mark A. Smith, and Gemma Casadesus. (ed.) *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2nd edition. 2nd edition ed. Boca Raton (FL): Buccafusco JJ, editor.
- Bu, G. (2009) 'Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy', *Nat Rev Neurosci*, 10(5), pp. 333-44.
- Cagnin, A., Gerhard, A. and Banati, R. B. (2002) 'In vivo imaging of neuroinflammation', *Eur Neuropsychopharmacol*, 12(6), pp. 581-6.
- Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., Wen, H., Borchelt, D. R., Price, D. L. and Wong, P. C. (2001) 'BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons', *Nat Neurosci*, 4(3), pp. 233-4.
- Cai, Z., Hussain, M. D. and Yan, L.-J. (2014) 'Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease', *International Journal of Neuroscience*, 124(5), pp. 307-321.
- Calandria, J. M., Mukherjee, P. K., de Rivero Vaccari, J. C., Zhu, M., Petasis, N. A. and Bazan, N. G. (2012) 'Ataxin-1 poly-Q-induced proteotoxic stress and apoptosis are attenuated in neural cells by docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1.', *J Biol Chem*.
- Calon, F., Lim, G. P., Yang, F., Morihara, T., Teter, B., Ubeda, O., Rostaing, P., Triller, A., Salem, N., Ashe, K. H., Frautschy, S. A. and Cole, G. M. (2004) 'Docosahexaenoic acid protects from dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model.', *Neuron*, 43(5), pp. 633-45.
- Cameron, B. and Landreth, G. E. (2010) 'Inflammation, microglia, and Alzheimer's disease', *Neurobiol Dis*, 37(3), pp. 503-9.
- Carrillo-Mora, P., Giordano, M. and Santamaría, A. (2009) 'Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents', *Behavioural brain research*, 203(2), pp. 151-164.
- Castellani, R. J., Rolston, R. K. and Smith, M. A. (2010) 'Alzheimer disease.', *Dis Mon*, 56(9), pp. 484-546.
- Chan, R. B., Oliveira, T. G., Cortes, E. P., Honig, L. S., Duff, K. E., Small, S. A., Wenk, M. R., Shui, G. and Di Paolo, G. (2012) 'Comparative lipidomic analysis of mouse and human brain with Alzheimer disease', *J Biol Chem*, 287(4), pp. 2678-88.

## Bibliografía

---

- Chang, W. P., Huang, X., Downs, D., Cirrito, J. R., Koelsch, G., Holtzman, D. M., Ghosh, A. K. and Tang, J. (2011) 'Beta-secretase inhibitor GRL-8234 rescues age-related cognitive decline in APP transgenic mice', *FASEB J*, 25(2), pp. 775-84.
- Chen, S., Averett, N. T., Manelli, A., Ladu, M. J., May, W. and Ard, M. D. (2005) 'Isoform-specific effects of apolipoprotein E on secretion of inflammatory mediators in adult rat microglia', *J Alzheimers Dis*, 7(1), pp. 25-35.
- Chen, Y. R. and Glabe, C. G. (2006) 'Distinct early folding and aggregation properties of Alzheimer amyloid-beta peptides Abeta40 and Abeta42: stable trimer or tetramer formation by Abeta42', *J Biol Chem*, 281(34), pp. 24414-22.
- Cherry, J. D., Olschowka, J. A. and O'Banion, M. K. (2014) 'Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed', *Journal of neuroinflammation*, 11(1), pp. 98.
- Chintamaneni, M. and Bhaskar, M. (2012) 'Biomarkers in Alzheimer's disease: a review', *ISRN Pharmacol*, 2012, pp. 984786.
- Cholerton, B., Baker, L. D. and Craft, S. (2013) 'Insulin, cognition, and dementia', *Eur J Pharmacol*, 719(1-3), pp. 170-9.
- Christensen, D. Z., Bayer, T. A. and Wirths, O. (2010) 'Intracellular A $\beta$  triggers neuron loss in the cholinergic system of the APP/PS1KI mouse model of Alzheimer's disease', *Neurobiol Aging*, 31(7), pp. 1153-63.
- Christensen, D. Z., Kraus, S. L., Flohr, A., Cotel, M. C., Wirths, O. and Bayer, T. A. (2008) 'Transient intraneuronal A beta rather than extracellular plaque pathology correlates with neuron loss in the frontal cortex of APP/PS1KI mice', *Acta Neuropathol*, 116(6), pp. 647-55.
- Cirrito, J. R., Kang, J. E., Lee, J., Stewart, F. R., Verges, D. K., Silverio, L. M., Bu, G., Mennerick, S. and Holtzman, D. M. (2008) 'Endocytosis is required for synaptic activity-dependent release of amyloid-beta in vivo', *Neuron*, 58(1), pp. 42-51.
- Cirrito, J. R., Yamada, K. A., Finn, M. B., Sloviter, R. S., Bales, K. R., May, P. C., Schoepp, D. D., Paul, S. M., Mennerick, S. and Holtzman, D. M. (2005) 'Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo', *Neuron*, 48(6), pp. 913-22.
- Clare, R., King, V. G., Wirefeldt, M. and Vinters, H. V. (2010) 'Synapse loss in dementias', *J Neurosci Res*, 88(10), pp. 2083-90.
- Cleveland, D. W., Hwo, S. Y. and Kirschner, M. W. (1977) 'Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin', *J Mol Biol*, 116(2), pp. 207-25.
- Coric, V., van Dyck, C. H., Salloway, S., Andreasen, N., Brody, M., Richter, R. W., Soininen, H., Thein, S., Shiovitz, T., Pilcher, G., Colby, S., Rollin, L., Dockens, R., Pachai, C., Portelius, E., Andreasson, U., Blennow, K., Soares, H., Albright, C., Feldman, H. H. and Berman, R. M. (2012) 'Safety and tolerability of the  $\gamma$ -secretase inhibitor avagacestat in a phase 2 study of mild to moderate Alzheimer disease', *Arch Neurol*, 69(11), pp. 1430-40.
- Cras, P., van Harskamp, F., Hendriks, L., Ceuterick, C., van Duijn, C. M., Stefanko, S. Z., Hofman, A., Kros, J. M., Van Broeckhoven, C. and Martin, J. J. (1998) 'Presenile Alzheimer dementia characterized by amyloid angiopathy and large amyloid core type senile plaques in the APP 692Ala $\rightarrow$ Gly mutation', *Acta Neuropathol*, 96(3), pp. 253-60.
- Culmsee, C. and Landshamer, S. (2006) 'Molecular insights into mechanisms of the cell death program: role in the progression of neurodegenerative disorders', *Current Alzheimer Research*, 3(4), pp. 269-283.
- Cunnane, S. C., Schneider, J. A., Tangney, C., Tremblay-Mercier, J., Fortier, M., Bennett, D. A. and Morris, M. C. (2012) 'Plasma and brain fatty acid profiles in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease', *J Alzheimers Dis*, 29(3), pp. 691-7.

- Cutler, R. G., Kelly, J., Storie, K., Pedersen, W. A., Tammara, A., Hatanpaa, K., Troncoso, J. C. and Mattson, M. P. (2004) 'Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(7), pp. 2070-5.
- Dahm, F., Nocito, A., Bielawska, A., Lang, K. S., Georgiev, P., Asmis, L. M., Bielawski, J., Madon, J., Hannun, Y. A. and Clavien, P. A. (2006) 'Distribution and dynamic changes of sphingolipids in blood in response to platelet activation', *J Thromb Haemost*, 4(12), pp. 2704-9.
- Davies, P. and Maloney, A. J. (1976) 'Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease', *Lancet*, 2(8000), pp. 1403.
- De Strooper, B. (2003) 'Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex', *Neuron*, 38(1), pp. 9-12.
- De Strooper, B. (2010) 'Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process', *Physiol Rev*, 90(2), pp. 465-94.
- De Strooper, B. and Annaert, W. (2010) 'Novel research horizons for presenilins and  $\gamma$ -secretases in cell biology and disease', *Annu Rev Cell Dev Biol*, 26, pp. 235-60.
- Devi, L. and Ohno, M. (2010) 'Genetic reductions of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and amyloid-beta ameliorate impairment of conditioned taste aversion memory in 5XFAD Alzheimer's disease model mice.', *Eur J Neurosci*, 31(1), pp. 110-8.
- Devi, L. and Ohno, M. (2012) '7,8-dihydroxyflavone, a small-molecule TrkB agonist, reverses memory deficits and BACE1 elevation in a mouse model of Alzheimer's disease.', *Neuropsychopharmacology*, 37(2), pp. 434-44.
- Devi, L., Tang, J. and Ohno, M. (2015) 'Beneficial effects of the  $\beta$ -secretase inhibitor GRL-8234 in 5XFAD Alzheimer's transgenic mice lessen during disease progression', *Curr Alzheimer Res*, 12(1), pp. 13-21.
- Dick, K. J., Eckhardt, M., Paisán-Ruiz, C., Alshehhi, A. A., Proukakis, C., Sibtain, N. A., Maier, H., Sharifi, R., Patton, M. A. and Bashir, W. (2010) 'Mutation of FA2H underlies a complicated form of hereditary spastic paraplegia (SPG35)', *Human mutation*, 31(4), pp. E1251-E1260.
- Dickson, T. C. and Vickers, J. C. (2001) 'The morphological phenotype of beta-amyloid plaques and associated neuritic changes in Alzheimer's disease', *Neuroscience*, 105(1), pp. 99-107.
- Dong, H., Goico, B., Martin, M., Csernansky, C. A., Bertchume, A. and Csernansky, J. G. (2004) 'Modulation of hippocampal cell proliferation, memory, and amyloid plaque deposition in APPsw (Tg2576) mutant mice by isolation stress.', *Neuroscience*, 127(3), pp. 601-9.
- Doody, R. S., Raman, R., Farlow, M., Iwatsubo, T., Vellas, B., Joffe, S., Kieburtz, K., He, F., Sun, X., Thomas, R. G., Aisen, P. S., Siemers, E., Sethuraman, G., Mohs, R., Committee, A. S. D. C. S. S. and Group, S. S. (2013) 'A phase 3 trial of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease', *N Engl J Med*, 369(4), pp. 341-50.
- Dubois, B., Feldman, H. H., Jacova, C., Cummings, J. L., Dekosky, S. T., Barberger-Gateau, P., Delacourte, A., Frisoni, G., Fox, N. C., Galasko, D., Gauthier, S., Hampel, H., Jicha, G. A., Meguro, K., O'Brien, J., Pasquier, F., Robert, P., Rossor, M., Salloway, S., Sarazin, M., de Souza, L. C., Stern, Y., Visser, P. J. and Scheltens, P. (2010) 'Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon', *Lancet Neurol*, 9(11), pp. 1118-27.
- Dubois, B., Feldman, H. H., Jacova, C., Dekosky, S. T., Barberger-Gateau, P., Cummings, J., Delacourte, A., Galasko, D., Gauthier, S., Jicha, G., Meguro, K., O'Brien, J., Pasquier, F., Robert, P., Rossor, M., Salloway, S., Stern, Y., Visser, P. J. and Scheltens, P. (2007) 'Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria', *Lancet Neurol*, 6(8), pp. 734-46.
- Dudchenko, P. A. (2004) 'An overview of the tasks used to test working memory in rodents', *Neurosci Biobehav Rev*, 28(7), pp. 699-709.

## Bibliografía

---

- Duyckaerts, C., Delatour, B. and Potier, M. C. (2009) 'Classification and basic pathology of Alzheimer disease', *Acta Neuropathol*, 118(1), pp. 5-36.
- Dyall, S. C., Michael, G. J. and Michael-Titus, A. T. (2010) 'Omega-3 fatty acids reverse age-related decreases in nuclear receptors and increase neurogenesis in old rats.', *J Neurosci Res*, 88(10), pp. 2091-102.
- Díez-Guerra, F. J. (2010) 'Neurogranin, a link between calcium/calmodulin and protein kinase C signaling in synaptic plasticity', *IUBMB Life*, 62(8), pp. 597-606.
- Eckman, C. B., Mehta, N. D., Crook, R., Perez-tur, J., Prihar, G., Pfeiffer, E., Graff-Radford, N., Hinder, P., Yager, D., Zenk, B., Refolo, L. M., Prada, C. M., Younkin, S. G., Hutton, M. and Hardy, J. (1997) 'A new pathogenic mutation in the APP gene (I716V) increases the relative proportion of A beta 42(43)', *Hum Mol Genet*, 6(12), pp. 2087-9.
- Eehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C. and Simons, K. (2003) 'Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts', *J Cell Biol*, 160(1), pp. 113-23.
- Eimer, W. A. and Vassar, R. (2013) 'Neuron loss in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease correlates with intraneuronal Aβ42 accumulation and Caspase-3 activation', *Mol Neurodegener*, 8, pp. 2.
- Eimon, P. M. and Rubinstein, A. L. (2009) 'The use of in vivo zebrafish assays in drug toxicity screening', *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 5(4), pp. 393-401.
- Eng, L. F., Ghirnikar, R. S. and Lee, Y. L. (2000) 'Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000).', *Neurochem Res*, 25(9-10), pp. 1439-51.
- Ennaceur, A. (2010) 'One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues', *Behav Brain Res*, 215(2), pp. 244-54.
- Escribá, P. V. (2006) 'Membrane-lipid therapy: a new approach in molecular medicine.', *Trends Mol Med*, 12(1), pp. 34-43.
- Escribá, P. V., Busquets, X., Inokuchi, J., Balogh, G., Török, Z., Horváth, I., Harwood, J. L. and Víg, L. (2015) 'Membrane lipid therapy: Modulation of the cell membrane composition and structure as a molecular base for drug discovery and new disease treatment', *Prog Lipid Res*, 59, pp. 38-53.
- Esposito, G., Giovacchini, G., Liow, J. S., Bhattacharjee, A. K., Greenstein, D., Schapiro, M., Hallett, M., Herscovitch, P., Eckelman, W. C., Carson, R. E. and Rapoport, S. I. (2008) 'Imaging neuroinflammation in Alzheimer's disease with radiolabeled arachidonic acid and PET', *J Nucl Med*, 49(9), pp. 1414-21.
- Esposito, G., Scuderi, C., Valenza, M., Togna, G. I., Latina, V., De Filippis, D., Cipriano, M., Carratù, M. R., Iuvone, T. and Steardo, L. (2011) 'Cannabidiol reduces Aβ-induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through PPARγ involvement', *PLoS One*, 6(12), pp. e28668.
- Fahy, E., Cotter, D., Sud, M. and Subramaniam, S. (2011) 'Lipid classification, structures and tools', *Biochim Biophys Acta*, 1811(11), pp. 637-47.
- Farrer, L. A., Cupples, L. A., Haines, J. L., Hyman, B., Kukull, W. A., Mayeux, R., Myers, R. H., Pericak-Vance, M. A., Risch, N. and van Duijn, C. M. (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(16), pp. 1349-56.
- Ferreira-Vieira, T. H., Guimaraes, I. M., Silva, F. R. and Ribeiro, F. M. (2016) 'Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System', *Curr Neuropharmacol*, 14(1), pp. 101-15.
- Ferrer, I., Martí, E., Tortosa, A. and Blasi, J. (1998) 'Dystrophic neurites of senile plaques are defective in proteins involved in exocytosis and neurotransmission', *J Neuropathol Exp Neurol*, 57(3), pp. 218-25.
- Fiala, J. C. (2007) 'Mechanisms of amyloid plaque pathogenesis', *Acta Neuropathol*, 114(6), pp. 551-71.

- Finder, V. H. and Glockshuber, R. (2007) 'Amyloid-beta aggregation', *Neurodegener Dis*, 4(1), pp. 13-27.
- Fiol-deRoque, M. A., Gutierrez-Lanza, R., Terés, S., Torres, M., Barceló, P., Rial, R. V., Verkhatsky, A., Escribá, P. V., Busquets, X. and Rodríguez, J. J. (2013) 'Cognitive recovery and restoration of cell proliferation in the dentate gyrus in the 5XFAD transgenic mice model of Alzheimer's disease following 2-hydroxy-DHA treatment', *Biogerontology*, 14(6), pp. 763-75.
- Flood, D. G., Reaume, A. G., Dorfman, K. S., Lin, Y. G., Lang, D. M., Trusko, S. P., Savage, M. J., Annaert, W. G., De Strooper, B., Siman, R. and Scott, R. W. (2002) 'FAD mutant PS-1 gene-targeted mice: increased A beta 42 and A beta deposition without APP overproduction', *Neurobiol Aging*, 23(3), pp. 335-48.
- Floresco, S. B., Seamans, J. K. and Phillips, A. G. (1997) 'Selective roles for hippocampal, prefrontal cortical, and ventral striatal circuits in radial-arm maze tasks with or without a delay', *J Neurosci*, 17(5), pp. 1880-90.
- Folch, J., Ettcheto, M., Petrov, D., Abad, S., Pedrós, I., Marin, M., Olloquequi, J. and Camins, A. (2015) 'Review of the advances in treatment for Alzheimer disease: Strategies for combating  $\beta$ -amyloid protein', *Neurologia*.
- Foulon, V., Sniekers, M., Huysmans, E., Asselberghs, S., Mahieu, V., Mannaerts, G. P., Van Veldhoven, P. P. and Casteels, M. (2005) 'Breakdown of 2-hydroxylated straight chain fatty acids via peroxisomal 2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase: a revised pathway for the alpha-oxidation of straight chain fatty acids', *J Biol Chem*, 280(11), pp. 9802-12.
- Francis, D. D., Zaharia, M. D., Shanks, N. and Anisman, H. (1995) 'Stress-induced disturbances in Morris water-maze performance: interstrain variability', *Physiol Behav*, 58(1), pp. 57-65.
- Freund-Levi, Y., Eriksdotter-Jönhagen, M., Cederholm, T., Basun, H., Faxén-Irving, G., Garlind, A., Vedin, I., Vessby, B., Wahlund, L. O. and Palmblad, J. (2006) 'Omega-3 fatty acid treatment in 174 patients with mild to moderate Alzheimer disease: OmegaAD study: a randomized double-blind trial.', *Arch Neurol*, 63(10), pp. 1402-8.
- Frykman, S., Hur, J. Y., Frånberg, J., Aoki, M., Winblad, B., Nahalkova, J., Behbahani, H. and Tjernberg, L. O. (2010) 'Synaptic and endosomal localization of active gamma-secretase in rat brain', *PLoS One*, 5(1), pp. e8948.
- Fukumoto, H., Cheung, B. S., Hyman, B. T. and Irizarry, M. C. (2002) 'Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease', *Arch Neurol*, 59(9), pp. 1381-9.
- Furuya, T. K., Silva, P. N., Payão, S. L., Bertolucci, P. H., Rasmussen, L. T., De Labio, R. W., Braga, I. L., Chen, E. S., Turecki, G., Mechawar, N., Mill, J. and Smith, M. A. (2012) 'Analysis of SNAP25 mRNA expression and promoter DNA methylation in brain areas of Alzheimer's Disease patients', *Neuroscience*, 220, pp. 41-6.
- Gad, S. C., Cassidy, C. D., Aubert, N., Spainhour, B. and Robbe, H. (2006) 'Nonclinical vehicle use in studies by multiple routes in multiple species', *Int J Toxicol*, 25(6), pp. 499-521.
- Galasko, D. and Golde, T. E. (2013) 'Biomarkers for Alzheimer's disease in plasma, serum and blood - conceptual and practical problems', *Alzheimers Res Ther*, 5(2), pp. 10.
- Gandy, S. (2005) 'The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease', *J Clin Invest*, 115(5), pp. 1121-9.
- Garcia, G. R., Noyes, P. D. and Tanguay, R. L. (2016) 'Advancements in zebrafish applications for 21st century toxicology', *Pharmacol Ther*, 161, pp. 11-21.
- Ghavami, S., Shojaei, S., Yeganeh, B., Ande, S. R., Jangamreddy, J. R., Mehrpour, M., Christoffersson, J., Chaabane, W., Moghadam, A. R., Kashani, H. H., Hashemi, M., Owji, A. A. and Łos, M. J. (2014) 'Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders', *Prog Neurobiol*, 112, pp. 24-49.

## Bibliografía

---

- Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N. and James, L. (1991) 'Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease', *Nature*, 349(6311), pp. 704-6.
- Goedert, M., Spillantini, M. G., Cairns, N. J. and Crowther, R. A. (1992) 'Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms', *Neuron*, 8(1), pp. 159-68.
- Goldsmith, J. R. and Jobin, C. (2012) 'Think small: zebrafish as a model system of human pathology', *J Biomed Biotechnol*, 2012, pp. 817341.
- Golub, V. M., Brewer, J., Wu, X., Kuruba, R., Short, J., Manchi, M., Swonke, M., Younus, I. and Reddy, D. S. (2015) 'Neurostereology protocol for unbiased quantification of neuronal injury and neurodegeneration', *Front Aging Neurosci*, 7, pp. 196.
- Gordon, J. A. (2011) 'Oscillations and hippocampal-prefrontal synchrony.', *Curr Opin Neurobiol*, 21(3), pp. 486-91.
- Goto, H., Tomono, Y., Ajiro, K., Kosako, H., Fujita, M., Sakurai, M., Okawa, K., Iwamatsu, A., Okigaki, T., Takahashi, T. and Inagaki, M. (1999) 'Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation', *J Biol Chem*, 274(36), pp. 25543-9.
- Greber, S., Lubec, G., Cairns, N. and Fountoulakis, M. (1999) 'Decreased levels of synaptosomal associated protein 25 in the brain of patients with Down syndrome and Alzheimer's disease', *Electrophoresis*, 20(4-5), pp. 928-34.
- Green, K. N. and LaFerla, F. M. (2008) 'Linking calcium to Abeta and Alzheimer's disease', *Neuron*, 59(2), pp. 190-4.
- Green, K. N., Martinez-Coria, H., Khashwji, H., Hall, E. B., Yurko-Mauro, K. A., Ellis, L. and LaFerla, F. M. (2007) 'Dietary docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid ameliorate amyloid-beta and tau pathology via a mechanism involving presenilin 1 levels.', *J Neurosci*, 27(16), pp. 4385-95.
- Green, R. C., Schneider, L. S., Amato, D. A., Beelen, A. P., Wilcock, G., Swabb, E. A., Zavitz, K. H. and Group, T. P. S. (2009) 'Effect of tarenflurbil on cognitive decline and activities of daily living in patients with mild Alzheimer disease: a randomized controlled trial', *JAMA*, 302(23), pp. 2557-64.
- Grimm, M. O., Kuchenbecker, J., Grösgen, S., Burg, V. K., Hundsdörfer, B., Rothhaar, T. L., Friess, P., de Wilde, M. C., Broersen, L. M., Penke, B., Péter, M., Vigh, L., Grimm, H. S. and Hartmann, T. (2011) 'Docosahexaenoic acid reduces amyloid beta production via multiple pleiotropic mechanisms.', *J Biol Chem*, 286(16), pp. 14028-39.
- Grimm, M. O., Zimmer, V. C., Lehmann, J., Grimm, H. S. and Hartmann, T. (2013) 'The impact of cholesterol, DHA, and sphingolipids on Alzheimer's disease', *Biomed Res Int*, 2013, pp. 814390.
- Grønn, M., Christensen, E., Hagve, T. A. and Christophersen, B. O. (1991) 'Peroxisomal retroconversion of docosahexaenoic acid (22:6(n-3)) to eicosapentaenoic acid (20:5(n-3)) studied in isolated rat liver cells', *Biochim Biophys Acta*, 1081(1), pp. 85-91.
- Guesnet, P. and Alessandri, J. M. (2011) 'Docosahexaenoic acid (DHA) and the developing central nervous system (CNS) - Implications for dietary recommendations', *Biochimie*, 93(1), pp. 7-12.
- Gupta, V. B., Gupta, V. K. and Martins, R. (2013) 'Semagacestat for treatment of Alzheimer's disease', *N Engl J Med*, 369(17), pp. 1660-1.
- Gómez-Isla, T., Price, J. L., McKeel, D. W., Morris, J. C., Growdon, J. H. and Hyman, B. T. (1996) 'Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease', *J Neurosci*, 16(14), pp. 4491-500.
- Haass, C. and Selkoe, D. J. (2007) 'Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(2), pp. 101-12.
- Hall, A. M. and Roberson, E. D. (2012) 'Mouse models of Alzheimer's disease', *Brain Res Bull*, 88(1), pp. 3-12.

- Hama, H. (2010) 'Fatty acid 2-Hydroxylation in mammalian sphingolipid biology', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801(4), pp. 405-414.
- Han, X., Holtzman, D. M. and McKeel, D. W. (2001) 'Plasmalogen deficiency in early Alzheimer's disease subjects and in animal models: molecular characterization using electrospray ionization mass spectrometry', *J Neurochem*, 77(4), pp. 1168-80.
- Hardy, J. and Selkoe, D. J. (2002) 'The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics', *Science*, 297(5580), pp. 353-6.
- Hardy, J. A. and Higgins, G. A. (1992) 'Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis', *Science*, 256(5054), pp. 184-5.
- Harris, R. B. (2015) 'Chronic and acute effects of stress on energy balance: are there appropriate animal models?', *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 308(4), pp. R250-65.
- Harry, G. J. (2013) 'Microglia during development and aging', *Pharmacol Ther*, 139(3), pp. 313-26.
- Hartmann, T., Kuchenbecker, J. and Grimm, M. O. (2007) 'Alzheimer's disease: the lipid connection.', *J Neurochem*, 103 Suppl 1, pp. 159-70.
- Hashimoto, M., Inoue, T., Katakura, M., Tanabe, Y., Hossain, S., Tsuchikura, S. and Shido, O. (2013) 'Prescription n-3 fatty acids, but not eicosapentaenoic acid alone, improve reference memory-related learning ability by increasing brain-derived neurotrophic factor levels in SHR.Cg-Lepr(cp)/NDmcr rats, a metabolic syndrome model', *Neurochem Res*, 38(10), pp. 2124-35.
- Hashimoto, M., Katakura, M., Tanabe, Y., Al Mamun, A., Inoue, T., Hossain, S., Arita, M. and Shido, O. (2015) 'n-3 fatty acids effectively improve the reference memory-related learning ability associated with increased brain docosahexaenoic acid-derived docosanoids in aged rats', *Biochim Biophys Acta*, 1851(2), pp. 203-9.
- Hashimoto, M., Shahdat, H. M., Yamashita, S., Katakura, M., Tanabe, Y., Fujiwara, H., Gamoh, S., Miyazawa, T., Arai, H., Shimada, T. and Shido, O. (2008) 'Docosahexaenoic acid disrupts in vitro amyloid beta(1-40) fibrillation and concomitantly inhibits amyloid levels in cerebral cortex of Alzheimer's disease model rats', *J Neurochem*, 107(6), pp. 1634-46.
- Haughey, N. J., Nath, A., Chan, S. L., Borchard, A. C., Rao, M. S. and Mattson, M. P. (2002) 'Disruption of neurogenesis by amyloid beta-peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease.', *J Neurochem*, 83(6), pp. 1509-24.
- He, C., Qu, X., Cui, L., Wang, J. and Kang, J. X. (2009) 'Improved spatial learning performance of fat-1 mice is associated with enhanced neurogenesis and neurogenesis by docosahexaenoic acid', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(27), pp. 11370-5.
- He, J. H., Gao, J. M., Huang, C. J. and Li, C. Q. (2014) 'Zebrafish models for assessing developmental and reproductive toxicity', *Neurotoxicol Teratol*, 42, pp. 35-42.
- He, J. H., Guo, S. Y., Zhu, F., Zhu, J. J., Chen, Y. X., Huang, C. J., Gao, J. M., Dong, Q. X., Xuan, Y. X. and Li, C. Q. (2013) 'A zebrafish phenotypic assay for assessing drug-induced hepatotoxicity', *J Pharmacol Toxicol Methods*, 67(1), pp. 25-32.
- Healy, D. A., Wallace, F. A., Miles, E. A., Calder, P. C. and Newsholm, P. (2000) 'Effect of low-to-moderate amounts of dietary fish oil on neutrophil lipid composition and function', *Lipids*, 35(7), pp. 763-8.
- Heneka, M. T., Carson, M. J., El Khoury, J., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., Petzold, G. C., Town, T., Morgan, D., Shinohara, M. L., Perry, V. H., Holmes, C., Bazan, N. G., Brooks, D. J., Hunot, S., Joseph, B., Deigendesch, N., Garaschuk, O., Boddeke, E., Dinarello, C. A., Breitner, J. C., Cole, G. M., Golenbock, D. T. and Kummer, M. P. (2015) 'Neuroinflammation in Alzheimer's disease', *Lancet Neurol*, 14(4), pp. 388-405.

- Heneka, M. T. and O'Banion, M. K. (2007) 'Inflammatory processes in Alzheimer's disease', *J Neuroimmunol*, 184(1-2), pp. 69-91.
- Herholz, K. and Ebmeier, K. (2011) 'Clinical amyloid imaging in Alzheimer's disease', *Lancet Neurol*, 10(7), pp. 667-70.
- Herrup, K. (2015) 'The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis', *Nat Neurosci*, 18(6), pp. 794-9.
- Herrup, K. and Yang, Y. (2007) 'Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology?', *Nat Rev Neurosci*, 8(5), pp. 368-78.
- Hicks, D. A., Nalivaeva, N. N. and Turner, A. J. (2012) 'Lipid rafts and Alzheimer's disease: protein-lipid interactions and perturbation of signaling', *Front Physiol*, 3, pp. 189.
- Hinz, B., Becher, A., Mitter, D., Schulze, K., Heinemann, U., Draguhn, A. and Ahnert-Hilger, G. (2001) 'Activity-dependent changes of the presynaptic synaptophysin-synaptobrevin complex in adult rat brain', *Eur J Cell Biol*, 80(10), pp. 615-9.
- Hock, B. J. and Lamb, B. T. (2001) 'Transgenic mouse models of Alzheimer's disease', *Trends Genet*, 17(10), pp. S7-12.
- Hodges, H. (1996) 'Maze procedures: the radial-arm and water maze compared.', *Brain Res Cogn Brain Res*, 3(3-4), pp. 167-81.
- Holmes, O., Paturi, S., Ye, W., Wolfe, M. S. and Selkoe, D. J. (2012) 'Effects of membrane lipids on the activity and processivity of purified  $\gamma$ -secretase', *Biochemistry*, 51(17), pp. 3565-75.
- Holtzman, D. M., Morris, J. C. and Goate, A. M. (2011) 'Alzheimer's disease: the challenge of the second century', *Sci Transl Med*, 3(77), pp. 77sr1.
- Honer, W. G. (2003) 'Pathology of presynaptic proteins in Alzheimer's disease: more than simple loss of terminals', *Neurobiol Aging*, 24(8), pp. 1047-62.
- Hong, J. H., Kang, J. W., Kim, D. K., Baik, S. H., Kim, K. H., Shanta, S. R., Jung, J. H., Mook-Jung, I. and Kim, K. P. (2016) 'Global changes of phospholipids identified by MALDI imaging mass spectrometry in a mouse model of Alzheimer's disease', *J Lipid Res*, 57(1), pp. 36-45.
- Hong, S., Tjonahen, E., Morgan, E. L., Lu, Y., Serhan, C. N. and Rowley, A. F. (2005) 'Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) brain cells biosynthesize novel docosahexaenoic acid-derived resolvins and protectins-Mediator lipidomic analysis', *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 78(1-4), pp. 107-16.
- Hossain, S., Hashimoto, M., Katakura, M., Miwa, K., Shimada, T. and Shido, O. (2009) 'Mechanism of docosahexaenoic acid-induced inhibition of in vitro Abeta1-42 fibrillation and Abeta1-42-induced toxicity in SH-SY5Y cells.', *J Neurochem*, 111(2), pp. 568-79.
- Hu, X., He, W., Luo, X., Tsubota, K. E. and Yan, R. (2013) 'BACE1 regulates hippocampal astrogenesis via the Jagged1-Notch pathway', *Cell Rep*, 4(1), pp. 40-9.
- Humpel, C. and Hochstrasser, T. (2011) 'Cerebrospinal fluid and blood biomarkers in Alzheimer's disease', *World J Psychiatry*, 1(1), pp. 8-18.
- Huse, J. T., Pijak, D. S., Leslie, G. J., Lee, V. M. and Doms, R. W. (2000) 'Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase', *J Biol Chem*, 275(43), pp. 33729-37.
- Hébert, S. S., Horré, K., Nicolaï, L., Papadopoulou, A. S., Mandemakers, W., Silahatoglu, A. N., Kauppinen, S., Delacourte, A. and De Strooper, B. (2008) 'Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(17), pp. 6415-20.
- Ibarguren, M., López, D. J., Encinar, J. A., González-Ros, J. M., Busquets, X. and Escribá, P. V. (2013) 'Partitioning of liquid-ordered/liquid-disordered membrane microdomains induced by the

- fluidifying effect of 2-hydroxylated fatty acid derivatives', *Biochim Biophys Acta*, 1828(11), pp. 2553-63.
- Ibarguren, M., López, D. J. and Escribá, P. V. (2014) 'The effect of natural and synthetic fatty acids on membrane structure, microdomain organization, cellular functions and human health', *Biochim Biophys Acta*, 1838(6), pp. 1518-28.
- Igarashi, M., Ma, K., Gao, F., Kim, H. W., Rapoport, S. I. and Rao, J. S. (2011) 'Disturbed choline plasmalogen and phospholipid fatty acid concentrations in Alzheimer's disease prefrontal cortex', *J Alzheimers Dis*, 24(3), pp. 507-17.
- Irwin, S. (1968) 'Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse', *Psychopharmacologia*, 13(3), pp. 222-57.
- Janssen, C. I. and Kiliaan, A. J. (2014) 'Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: the influence of LCPUFA on neural development, aging, and neurodegeneration', *Prog Lipid Res*, 53, pp. 1-17.
- Jawhar, S., Trawicka, A., Jenneckens, C., Bayer, T. A. and Wirths, O. (2012) 'Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal A $\beta$  aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease', *Neurobiol Aging*, 33(1), pp. 196.e29-40.
- Jimenez, S., Baglietto-Vargas, D., Caballero, C., Moreno-Gonzalez, I., Torres, M., Sanchez-Varo, R., Ruano, D., Vizuete, M., Gutierrez, A. and Vitorica, J. (2008) 'Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic', *J Neurosci*, 28(45), pp. 11650-61.
- Jimenez, S., Navarro, V., Moyano, J., Sanchez-Mico, M., Torres, M., Davila, J. C., Vizuete, M., Gutierrez, A. and Vitorica, J. (2014) 'Disruption of amyloid plaques integrity affects the soluble oligomers content from Alzheimer disease brains', *PLoS One*, 9(12), pp. e114041.
- Jinno, S. and Kosaka, T. (2006) 'Cellular architecture of the mouse hippocampus: a quantitative aspect of chemically defined GABAergic neurons with stereology', *Neurosci Res*, 56(3), pp. 229-45.
- Johnson, E. J. and Schaefer, E. J. (2006) 'Potential role of dietary n-3 fatty acids in the prevention of dementia and macular degeneration.', *Am J Clin Nutr*, 83(6 Suppl), pp. 1494S-1498S.
- Joyashiki, E., Matsuya, Y. and Tohda, C. (2011) 'Somnifone improves memory impairments and increases axonal density in Alzheimer's disease model mice, 5XFAD.', *Int J Neurosci*, 121(4), pp. 181-90.
- Kalmijn, S., Launer, L. J., Ott, A., Witteman, J. C., Hofman, A. and Breteler, M. M. (1997) 'Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study', *Ann Neurol*, 42(5), pp. 776-82.
- Kalvodova, L., Kahya, N., Schwille, P., Eehalt, R., Verkade, P., Drechsel, D. and Simons, K. (2005) 'Lipids as modulators of proteolytic activity of BACE: involvement of cholesterol, glycosphingolipids, and anionic phospholipids in vitro', *J Biol Chem*, 280(44), pp. 36815-23.
- Kanakasabai, S., Pestereva, E., Chearwae, W., Gupta, S. K., Ansari, S. and Bright, J. J. (2012) 'PPAR $\gamma$  agonists promote oligodendrocyte differentiation of neural stem cells by modulating stemness and differentiation genes', *PLoS One*, 7(11), pp. e50500.
- Kandalepas, P. C., Sadleir, K. R., Eimer, W. A., Zhao, J., Nicholson, D. A. and Vassar, R. (2013) 'The Alzheimer's  $\beta$ -secretase BACE1 localizes to normal presynaptic terminals and to dystrophic presynaptic terminals surrounding amyloid plaques', *Acta Neuropathol*, 126(3), pp. 329-52.
- Katsouri, L., Lim, Y. M., Blondrath, K., Eleftheriadou, I., Lombardero, L., Birch, A. M., Mirzaei, N., Irvine, E. E., Mazarakis, N. D. and Sastre, M. (2016) 'PPAR $\gamma$ -coactivator-1 $\alpha$  gene transfer reduces neuronal loss and amyloid- $\beta$  generation by reducing  $\beta$ -secretase in an Alzheimer's disease model', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(43), pp. 12292-12297.

## Bibliografía

---

- Katsouri, L., Parr, C., Bogdanovic, N., Willem, M. and Sastre, M. (2011) 'PPAR $\gamma$  co-activator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) reduces amyloid- $\beta$  generation through a PPAR $\gamma$ -dependent mechanism', *J Alzheimers Dis*, 25(1), pp. 151-62.
- Katsuki, H., Kurimoto, E., Takemori, S., Kurauchi, Y., Hisatsune, A., Isohama, Y., Izumi, Y., Kume, T., Shudo, K. and Akaike, A. (2009) 'Retinoic acid receptor stimulation protects midbrain dopaminergic neurons from inflammatory degeneration via BDNF-mediated signaling.', *J Neurochem*, 110(2), pp. 707-18.
- Kawakita, E., Hashimoto, M. and Shido, O. (2006) 'Docosahexaenoic acid promotes neurogenesis in vitro and in vivo.', *Neuroscience*, 139(3), pp. 991-7.
- Kim, H.-Y. (2007) 'Novel metabolism of docosahexaenoic acid in neural cells', *Journal of Biological Chemistry*, 282(26), pp. 18661-18665.
- Kimura, R. and Ohno, M. (2009) 'Impairments in remote memory stabilization precede hippocampal synaptic and cognitive failures in 5XFAD Alzheimer mouse model.', *Neurobiol Dis*, 33(2), pp. 229-35.
- Korade, Z. and Kenworthy, A. K. (2008) 'Lipid rafts, cholesterol, and the brain', *Neuropharmacology*, 55(8), pp. 1265-73.
- Krishnamoorthy, T., Chen, X., Govin, J., Cheung, W. L., Dorsey, J., Schindler, K., Winter, E., Allis, C. D., Guacci, V., Khochbin, S., Fuller, M. T. and Berger, S. L. (2006) 'Phosphorylation of histone H4 Ser1 regulates sporulation in yeast and is conserved in fly and mouse spermatogenesis.', *Genes Dev*, 20(18), pp. 2580-92.
- Krstic, D. and Knuesel, I. (2013) 'Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease', *Nat Rev Neurol*, 9(1), pp. 25-34.
- Kruer, M. C., Paisán-Ruiz, C., Boddart, N., Yoon, M. Y., Hama, H., Gregory, A., Malandrini, A., Woltjer, R. L., Munnich, A. and Gobin, S. (2010) 'Defective FA2H leads to a novel form of neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA)', *Annals of neurology*, 68(5), pp. 611-618.
- Kása, P., Rakonczay, Z. and Gulya, K. (1997) 'The cholinergic system in Alzheimer's disease', *Prog Neurobiol*, 52(6), pp. 511-35.
- LaFerla, F. M., Green, K. N. and Oddo, S. (2007) 'Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease.', *Nat Rev Neurosci*, 8(7), pp. 499-509.
- Lai, A. Y. and McLaurin, J. (2010) 'Mechanisms of amyloid-Beta Peptide uptake by neurons: the role of lipid rafts and lipid raft-associated proteins', *Int J Alzheimers Dis*, 2011, pp. 548380.
- Lambert, J. C., Heath, S., Even, G., Campion, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., Combarros, O., Zelenika, D., Bullido, M. J., Tavernier, B., Letenneur, L., Bettens, K., Berr, C., Pasquier, F., Fiévet, N., Barberger-Gateau, P., Engelborghs, S., De Deyn, P., Mateo, I., Franck, A., Helisalmi, S., Porcellini, E., Hanon, O., de Pancorbo, M. M., Lendon, C., Dufouil, C., Jaillard, C., Leveillard, T., Alvarez, V., Bosco, P., Mancuso, M., Panza, F., Nacmias, B., Bossù, P., Piccardi, P., Annoni, G., Seripa, D., Galimberti, D., Hannequin, D., Licastro, F., Soininen, H., Ritchie, K., Blaché, H., Dartigues, J. F., Tzourio, C., Gut, I., Van Broeckhoven, C., Alperovitch, A., Lathrop, M., Amouyel, P. and Investigators, E. A. S. D. I. (2009) 'Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease', *Nat Genet*, 41(10), pp. 1094-9.
- Laudon, H., Mathews, P. M., Karlström, H., Bergman, A., Farmery, M. R., Nixon, R. A., Winblad, B., Gandy, S. E., Lendahl, U., Lundkvist, J. and Näslund, J. (2004) 'Co-expressed presenilin 1 NTF and CTF form functional gamma-secretase complexes in cells devoid of full-length protein', *J Neurochem*, 89(1), pp. 44-53.
- Launer, L. J., White, L. R., Petrovitch, H., Ross, G. W. and Curb, J. D. (2001) 'Cholesterol and neuropathologic markers of AD: a population-based autopsy study', *Neurology*, 57(8), pp. 1447-52.

- Lauritzen, L., Brambilla, P., Mazzocchi, A., Harsløf, L. B., Ciappolino, V. and Agostoni, C. (2016) 'DHA Effects in Brain Development and Function', *Nutrients*, 8(1).
- Lazarov, O., Morfini, G. A., Pigino, G., Gadadhar, A., Chen, X., Robinson, J., Ho, H., Brady, S. T. and Sisodia, S. S. (2007) 'Impairments in fast axonal transport and motor neuron deficits in transgenic mice expressing familial Alzheimer's disease-linked mutant presenilin 1', *J Neurosci*, 27(26), pp. 7011-20.
- Ledesma, M. D. and Dotti, C. G. (2006) 'Amyloid excess in Alzheimer's disease: what is cholesterol to be blamed for?', *FEBS Lett*, 580(23), pp. 5525-32.
- LeDoux, J. (2003) 'The emotional brain, fear, and the amygdala', *Cell Mol Neurobiol*, 23(4-5), pp. 727-38.
- Lee, C. H., Choi, J. H., Yoo, K. Y., Park, O. K., Moon, J. B., Sohn, Y., Cho, J. H., Hwang, I. K. and Won, M. H. (2010) 'Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, decreases immunoreactivity of markers for cell proliferation and neuronal differentiation in the mouse hippocampus', *Brain Res*, 1329, pp. 30-5.
- Lee, J. E. and Han, P. L. (2013) 'An update of animal models of Alzheimer disease with a reevaluation of plaque depositions', *Exp Neurobiol*, 22(2), pp. 84-95.
- Lee, T. H., Hoover, R. L., Williams, J. D., Sperling, R. I., Ravalese, J., Spur, B. W., Robinson, D. R., Corey, E. J., Lewis, R. A. and Austen, K. F. (1985) 'Effect of dietary enrichment with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function', *N Engl J Med*, 312(19), pp. 1217-24.
- Li, R., Lindholm, K., Yang, L. B., Yue, X., Citron, M., Yan, R., Beach, T., Sue, L., Sabbagh, M., Cai, H., Wong, P., Price, D. and Shen, Y. (2004) 'Amyloid beta peptide load is correlated with increased beta-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(10), pp. 3632-7.
- Lim, C. K., Li, F., Rideout, J. M., Wright, D. J. and Peters, T. J. (1986) 'Assaying erythrocyte haem biosynthetic enzyme activities by high-performance liquid chromatography with the advanced automated sample processor', *J Chromatogr*, 371, pp. 293-8.
- Lim, G. P., Calon, F., Morihara, T., Yang, F., Teter, B., Ubeda, O., Salem, N., Frautschy, S. A. and Cole, G. M. (2005) 'A diet enriched with the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid reduces amyloid burden in an aged Alzheimer mouse model.', *J Neurosci*, 25(12), pp. 3032-40.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> Method', *Methods*, 25(4), pp. 402-8.
- Lladó, V., Terés, S., Higuera, M., Alvarez, R., Noguera-Salva, M. A., Halver, J. E., Escribá, P. V. and Busquets, X. (2009) 'Pivotal role of dihydrofolate reductase knockdown in the anticancer activity of 2-hydroxyoleic acid', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(33), pp. 13754-8.
- Lopez, D. H., Fiol-deRoque, M. A., Noguera-Salvà, M. A., Terés, S., Campana, F., Piotto, S., Castro, J. A., Mohaibes, R. J., Escribá, P. V. and Busquets, X. (2013) '2-hydroxy arachidonic acid: a new non-steroidal anti-inflammatory drug', *PLoS One*, 8(8), pp. e72052.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J. (1951) 'Protein measurement with the Folin phenol reagent', *J Biol Chem*, 193(1), pp. 265-75.
- Lu, Y., Christian, K. and Lu, B. (2008) 'BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory?', *Neurobiol Learn Mem*, 89(3), pp. 312-23.
- Lue, L. F., Schmitz, C. T., Serrano, G., Sue, L. I., Beach, T. G. and Walker, D. G. (2015) 'TREM2 Protein Expression Changes Correlate with Alzheimer's Disease Neurodegenerative Pathologies in Post-Mortem Temporal Cortices', *Brain Pathol*, 25(4), pp. 469-80.

- Lukiw, W. J., Cui, J. G., Marcheselli, V. L., Bodker, M., Botkjaer, A., Gotlinger, K., Serhan, C. N. and Bazan, N. G. (2005) 'A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease.', *J Clin Invest*, 115(10), pp. 2774-83.
- Luo, Y., Bolon, B., Kahn, S., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Denis, P., Fan, W., Kha, H., Zhang, J., Gong, Y., Martin, L., Louis, J. C., Yan, Q., Richards, W. G., Citron, M. and Vassar, R. (2001) 'Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation', *Nat Neurosci*, 4(3), pp. 231-2.
- Lyness, S. A., Zarow, C. and Chui, H. C. (2003) 'Neuron loss in key cholinergic and aminergic nuclei in Alzheimer disease: a meta-analysis', *Neurobiol Aging*, 24(1), pp. 1-23.
- López-Álvarez, J. and Agüera Ortiz, L. F. (2015) 'Nuevos criterios diagnósticos de la demencia y la enfermedad de Alzheimer: una visión desde la psicogeriatría', *Psicogeriatría*, 5(1), pp. 3-14.
- Lúcio, M., Lima, J. L. and Reis, S. (2010) 'Drug-membrane interactions: significance for medicinal chemistry', *Curr Med Chem*, 17(17), pp. 1795-809.
- Ma, Q. L., Teter, B., Ubeda, O. J., Morihara, T., Dhoot, D., Nyby, M. D., Tuck, M. L., Frautschy, S. A. and Cole, G. M. (2007) 'Omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid increases SorLA/LR11, a sorting protein with reduced expression in sporadic Alzheimer's disease (AD): relevance to AD prevention.', *J Neurosci*, 27(52), pp. 14299-307.
- Maccioni, R. B., Muñoz, J. P. and Barbeito, L. (2001) 'The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders', *Arch Med Res*, 32(5), pp. 367-81.
- Maccioni, R. B., Rojo, L. E., Fernández, J. A. and Kuljis, R. O. (2009) 'The role of neuroimmunomodulation in Alzheimer's disease', *Ann N Y Acad Sci*, 1153, pp. 240-6.
- Mahley, R. W., Weisgraber, K. H. and Huang, Y. (2006) 'Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(15), pp. 5644-51.
- Mandelkow, E. M., Drewes, G., Biernat, J., Gustke, N., Van Lint, J., Vandenheede, J. R. and Mandelkow, E. (1992) 'Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau', *FEBS Lett*, 314(3), pp. 315-21.
- Mapstone, M., Cheema, A. K., Fiandaca, M. S., Zhong, X., Mhyre, T. R., MacArthur, L. H., Hall, W. J., Fisher, S. G., Peterson, D. R., Haley, J. M., Nazar, M. D., Rich, S. A., Berlau, D. J., Peltz, C. B., Tan, M. T., Kawas, C. H. and Federoff, H. J. (2014) 'Plasma phospholipids identify antecedent memory impairment in older adults', *Nat Med*, 20(4), pp. 415-8.
- Maren, S. (1999) 'Long-term potentiation in the amygdala: a mechanism for emotional learning and memory.', *Trends Neurosci*, 22(12), pp. 561-7.
- Martin, S. J., Grimwood, P. D. and Morris, R. G. (2000) 'Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis', *Annu Rev Neurosci*, 23, pp. 649-711.
- Martins, I. J., Berger, T., Sharman, M. J., Verdile, G., Fuller, S. J. and Martins, R. N. (2009) 'Cholesterol metabolism and transport in the pathogenesis of Alzheimer's disease', *J Neurochem*, 111(6), pp. 1275-308.
- Martins, I. J., Hone, E., Foster, J. K., Sünram-Lea, S. I., Gnjec, A., Fuller, S. J., Nolan, D., Gandy, S. E. and Martins, R. N. (2006) 'Apolipoprotein E, cholesterol metabolism, diabetes, and the convergence of risk factors for Alzheimer's disease and cardiovascular disease', *Mol Psychiatry*, 11(8), pp. 721-36.
- Martín, V., Fabelo, N., Santpere, G., Puig, B., Marín, R., Ferrer, I. and Díaz, M. (2010) 'Lipid alterations in lipid rafts from Alzheimer's disease human brain cortex', *J Alzheimers Dis*, 19(2), pp. 489-502.
- Masters, C. L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C. C., Sperling, R. A. and Cummings, J. L. (2015) 'Alzheimer's disease', *Nat Rev Dis Primers*, 1, pp. 15056.

- Mattson, M. P. and Magnus, T. (2006) 'Ageing and neuronal vulnerability', *Nat Rev Neurosci*, 7(4), pp. 278-94.
- McGeer, P. L. and McGeer, E. G. (2001) 'Polymorphisms in inflammatory genes and the risk of Alzheimer disease', *Arch Neurol*, 58(11), pp. 1790-2.
- McKhann, G. M., Knopman, D. S., Chertkow, H., Hyman, B. T., Jack, C. R., Kawas, C. H., Klunk, W. E., Koroshetz, W. J., Manly, J. J., Mayeux, R., Mohs, R. C., Morris, J. C., Rossor, M. N., Scheltens, P., Carrillo, M. C., Thies, B., Weintraub, S. and Phelps, C. H. (2011) 'The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease', *Alzheimers Dement*, 7(3), pp. 263-9.
- McNamara, T. P., Hardy, J. K. and Hirtle, S. C. (1989) 'Subjective hierarchies in spatial memory.', *J Exp Psychol Learn Mem Cogn*, 15(2), pp. 211-27.
- Meyer, T. S. and Lamberts, B. L. (1965) 'Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips', *Biochim Biophys Acta*, 107(1), pp. 144-5.
- Minger, S. L., Honer, W. G., Esiri, M. M., McDonald, B., Keene, J., Nicoll, J. A., Carter, J., Hope, T. and Francis, P. T. (2001) 'Synaptic pathology in prefrontal cortex is present only with severe dementia in Alzheimer disease', *J Neuropathol Exp Neurol*, 60(10), pp. 929-36.
- Modarresi, F., Faghihi, M. A., Patel, N. S., Sahagan, B. G., Wahlestedt, C. and Lopez-Toledano, M. A. (2011) 'Knockdown of BACE1-AS Nonprotein-Coding Transcript Modulates Beta-Amyloid-Related Hippocampal Neurogenesis', *Int J Alzheimers Dis*, 2011, pp. 929042.
- Mohaibes, R. J., Fiol-deRoque, M. A., Torres, M., Ordinas, M., López, D. J., Castro, J. A., Escribá, P. V. and Busquets, X. (2017) 'The hydroxylated form of docosahexaenoic acid (DHA-H) modifies the brain lipid composition in a model of Alzheimer's disease, improving behavioral motor function and survival', *Biochim Biophys Acta*.
- Morishima-Kawashima, M. and Ihara, Y. (2002) 'Alzheimer's disease: beta-Amyloid protein and tau', *J Neurosci Res*, 70(3), pp. 392-401.
- Morley, J. E. and Banks, W. A. (2010) 'Lipids and cognition.', *J Alzheimers Dis*, 20(3), pp. 737-47.
- Morris, M. C., Evans, D. A., Bienias, J. L., Tangney, C. C., Bennett, D. A., Wilson, R. S., Aggarwal, N. and Schneider, J. (2003) 'Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease.', *Arch Neurol*, 60(7), pp. 940-6.
- Morris, R. G., Garrud, P., Rawlins, J. N. and O'Keefe, J. (1982) 'Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions.', *Nature*, 297(5868), pp. 681-3.
- Morton, D. B. and Griffiths, P. H. (1985) 'Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment', *Vet Rec*, 116(16), pp. 431-6.
- Mu, Y. and Gage, F. H. (2011) 'Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease.', *Mol Neurodegener*, 6, pp. 85.
- Mullan, M. (1991) 'A genetic defect causing Alzheimer's disease', *Br J Hosp Med*, 45(3), pp. 131.
- Mullen, R. J., Buck, C. R. and Smith, A. M. (1992) 'NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates', *Development*, 116(1), pp. 201-11.
- Nicolson, G. L. and Ash, M. E. (2014) 'Lipid Replacement Therapy: a natural medicine approach to replacing damaged lipids in cellular membranes and organelles and restoring function', *Biochim Biophys Acta*, 1838(6), pp. 1657-79.
- Niemoller, T. D. and Bazan, N. G. (2010) 'Docosahexaenoic acid neurolipidomics', *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 91(3-4), pp. 85-9.

## Bibliografía

---

- Nilsberth, C., Westlind-Danielsson, A., Eckman, C. B., Condron, M. M., Axelman, K., Forsell, C., Sten, C., Luthman, J., Teplow, D. B., Younkin, S. G., Näslund, J. and Lannfelt, L. (2001) 'The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation', *Nat Neurosci*, 4(9), pp. 887-93.
- Nixon, R. A. and Cataldo, A. M. (2006) 'Lysosomal system pathways: genes to neurodegeneration in Alzheimer's disease', *J Alzheimers Dis*, 9(3 Suppl), pp. 277-89.
- Nixon, R. A. and Yang, D. S. (2011) 'Autophagy failure in Alzheimer's disease--locating the primary defect', *Neurobiol Dis*, 43(1), pp. 38-45.
- Norfray, J. F. and Provenzale, J. M. (2004) 'Alzheimer's disease: neuropathologic findings and recent advances in imaging', *AJR Am J Roentgenol*, 182(1), pp. 3-13.
- O'keefe, J. and Nadel, L. (1978) *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford: Clarendon Press.
- Oakley, H., Cole, S. L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J., Van Eldik, L., Berry, R. and Vassar, R. (2006) 'Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation.', *J Neurosci*, 26(40), pp. 10129-40.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M. P., Akbari, Y. and LaFerla, F. M. (2003) 'Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction.', *Neuron*, 39(3), pp. 409-21.
- Ohno, M. (2009) 'Failures to reconsolidate memory in a mouse model of Alzheimer's disease.', *Neurobiol Learn Mem*, 92(3), pp. 455-9.
- Ohno, M., Chang, L., Tseng, W., Oakley, H., Citron, M., Klein, W. L., Vassar, R. and Disterhoft, J. F. (2006) 'Temporal memory deficits in Alzheimer's mouse models: rescue by genetic deletion of BACE1.', *Eur J Neurosci*, 23(1), pp. 251-60.
- Ohno, M., Cole, S. L., Yasvoina, M., Zhao, J., Citron, M., Berry, R., Disterhoft, J. F. and Vassar, R. (2007) 'BACE1 gene deletion prevents neuron loss and memory deficits in 5XFAD APP/PS1 transgenic mice', *Neurobiol Dis*, 26(1), pp. 134-45.
- Ohno, M., Sametsky, E. A., Younkin, L. H., Oakley, H., Younkin, S. G., Citron, M., Vassar, R. and Disterhoft, J. F. (2004) 'BACE1 deficiency rescues memory deficits and cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease.', *Neuron*, 41(1), pp. 27-33.
- Oksman, M., Iivonen, H., Högges, E., Amtul, Z., Penke, B., Leenders, I., Broersen, L., Lütjohann, D., Hartmann, T. and Tanila, H. (2006) 'Impact of different saturated fatty acid, polyunsaturated fatty acid and cholesterol containing diets on beta-amyloid accumulation in APP/PS1 transgenic mice.', *Neurobiol Dis*, 23(3), pp. 563-72.
- Olazarán, J., Gil-de-Gómez, L., Rodríguez-Martín, A., Valentí-Soler, M., Frades-Payo, B., Marín-Muñoz, J., Antúnez, C., Frank-García, A., Acedo-Jiménez, C., Morlán-Gracia, L., Petidier-Torregrossa, R., Guisasola, M. C., Bermejo-Pareja, F., Sánchez-Ferro, Á., Pérez-Martínez, D. A., Manzano-Palomo, S., Farquhar, R., Rábano, A. and Calero, M. (2015) 'A blood-based, 7-metabolite signature for the early diagnosis of Alzheimer's disease', *J Alzheimers Dis*, 45(4), pp. 1157-73.
- Olton, D. S., Becker, J. T. and Handelman, G. E. (1979) 'Hippocampus, space, and memory', *Behavioral and Brain Sciences*, 2(03), pp. 313-322.
- Olton, D. S. and Samuelson, R. J. (1976) 'Remembrance of places passed: Spatial memory in rats', *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 2(2), pp. 97-116.
- Ormerod, B. K., Hanft, S. J., Asokan, A., Haditsch, U., Lee, S. W. and Palmer, T. D. (2013) 'PPAR $\gamma$  activation prevents impairments in spatial memory and neurogenesis following transient illness', *Brain Behav Immun*, 29, pp. 28-38.

- Ossenkoppele, R., Schonhaut, D. R., Baker, S. L., O'Neil, J. P., Janabi, M., Ghosh, P. M., Santos, M., Miller, Z. A., Bettcher, B. M., Gorno-Tempini, M. L., Miller, B. L., Jagust, W. J. and Rabinovici, G. D. (2015) 'Tau, amyloid, and hypometabolism in a patient with posterior cortical atrophy', *Ann Neurol*, 77(2), pp. 338-42.
- Oster, T. and Pillot, T. (2010) 'Docosahexaenoic acid and synaptic protection in Alzheimer's disease mice.', *Biochim Biophys Acta*, 1801(8), pp. 791-8.
- Ottestad, I., Hassani, S., Borge, G. I., Kohler, A., Vogt, G., Hyötyläinen, T., Orešič, M., Brønner, K. W., Holven, K. B., Ulven, S. M. and Myhrstad, M. C. (2012) 'Fish oil supplementation alters the plasma lipidomic profile and increases long-chain PUFAs of phospholipids and triglycerides in healthy subjects', *PLoS One*, 7(8), pp. e42550.
- Pang, P. T. and Lu, B. (2004) 'Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF.', *Ageing Res Rev*, 3(4), pp. 407-30.
- Pappolla, M. A., Bryant-Thomas, T. K., Herbert, D., Pacheco, J., Fabra Garcia, M., Manjon, M., Girones, X., Henry, T. L., Matsubara, E., Zambon, D., Wolozin, B., Sano, M., Cruz-Sanchez, F. F., Thal, L. J., Petanceska, S. S. and Refolo, L. M. (2003) 'Mild hypercholesterolemia is an early risk factor for the development of Alzheimer amyloid pathology', *Neurology*, 61(2), pp. 199-205.
- Parent, A. T. and Thinakaran, G. (2010) 'Modeling presenilin-dependent familial Alzheimer's disease: emphasis on presenilin substrate-mediated signaling and synaptic function', *Int J Alzheimers Dis*, 2010.
- Pastor, P., Roe, C. M., Villegas, A., Bedoya, G., Chakraverty, S., García, G., Tirado, V., Norton, J., Ríos, S., Martínez, M., Kosik, K. S., Lopera, F. and Goate, A. M. (2003) 'Apolipoprotein Epsilon4 modifies Alzheimer's disease onset in an E280A PS1 kindred', *Ann Neurol*, 54(2), pp. 163-9.
- Paxinos, G. and Franklin, K. B. J. (2004) *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. 2nd edn. London: Academic.
- Peng, G. P., Feng, Z., He, F. P., Chen, Z. Q., Liu, X. Y., Liu, P. and Luo, B. Y. (2015) 'Correlation of hippocampal volume and cognitive performances in patients with either mild cognitive impairment or Alzheimer's disease', *CNS Neurosci Ther*, 21(1), pp. 15-22.
- Peng, S., Wu, J., Mufson, E. J. and Fahnstock, M. (2005) 'Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer's disease.', *J Neurochem*, 93(6), pp. 1412-21.
- Perez, S. E., Berg, B. M., Moore, K. A., He, B., Counts, S. E., Fritz, J. J., Hu, Y. S., Lazarov, O., Lah, J. J. and Mufson, E. J. (2010) 'DHA diet reduces AD pathology in young APP<sup>swe</sup>/PS1 Delta E9 transgenic mice: possible gender effects', *J Neurosci Res*, 88(5), pp. 1026-40.
- Perez-Nievas, B. G., Stein, T. D., Tai, H. C., Dols-Icardo, O., Scotton, T. C., Barroeta-Espar, I., Fernandez-Carballo, L., de Munain, E. L., Perez, J., Marquie, M., Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Lowe, V., Parisi, J. E., Petersen, R. C., Ikonovic, M. D., López, O. L., Klunk, W., Hyman, B. T. and Gómez-Isla, T. (2013) 'Dissecting phenotypic traits linked to human resilience to Alzheimer's pathology', *Brain*, 136(Pt 8), pp. 2510-26.
- Placanica, L., Zhu, L. and Li, Y. M. (2009) 'Gender- and age-dependent gamma-secretase activity in mouse brain and its implication in sporadic Alzheimer disease', *PLoS One*, 4(4), pp. e5088.
- Poirier, J. (2000) 'Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. A role in amyloid catabolism', *Ann N Y Acad Sci*, 924, pp. 81-90.
- Poirier, J. (2005) 'Apolipoprotein E, cholesterol transport and synthesis in sporadic Alzheimer's disease', *Neurobiol Aging*, 26(3), pp. 355-61.
- Pottier, C., Hannequin, D., Coutant, S., Rovelet-Lecrux, A., Wallon, D., Rousseau, S., Legallic, S., Paquet, C., Bombois, S., Pariente, J., Thomas-Anterion, C., Michon, A., Croisile, B., Etcharry-Bouyx, F., Berr, C., Dartigues, J. F., Amouyel, P., Dauchel, H., Boutoleau-Bretonnière, C., Thauvin, C., Frebourg, T.,

- Lambert, J. C., Campion, D. and Collaborators, P. G. (2012) 'High frequency of potentially pathogenic SORL1 mutations in autosomal dominant early-onset Alzheimer disease', *Mol Psychiatry*, 17(9), pp. 875-9.
- Powell, M. L., Pegues, M. A., Szalai, A. J., Ghanta, V. K., D'Abramo, L. R. and Watts, S. A. (2015) 'Effects of the Dietary  $\omega$ 3: $\omega$ 6 Fatty Acid Ratio on Body Fat and Inflammation in Zebrafish (*Danio rerio*)', *Comp Med*, 65(4), pp. 289-94.
- Prades, J., Alemany, R., Perona, J. S., Funari, S. S., Vögler, O., Ruiz-Gutiérrez, V., Escribá, P. V. and Barceló, F. (2008) 'Effects of 2-hydroxyoleic acid on the structural properties of biological and model plasma membranes', *Mol Membr Biol*, 25(1), pp. 46-57.
- Prasad, M. R., Lovell, M. A., Yatin, M., Dhillon, H. and Markesbery, W. R. (1998) 'Regional membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease', *Neurochem Res*, 23(1), pp. 81-8.
- Praticò, D., Zhukareva, V., Yao, Y., Uryu, K., Funk, C. D., Lawson, J. A., Trojanowski, J. Q. and Lee, V. M. (2004) '12/15-lipoxygenase is increased in Alzheimer's disease: possible involvement in brain oxidative stress', *Am J Pathol*, 164(5), pp. 1655-62.
- Price, D. L. and Sisodia, S. S. (1998) 'Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models', *Annu Rev Neurosci*, 21, pp. 479-505.
- Prince, M. J. (2015) *World Alzheimer Report 2015: the global impact of dementia: an analysis of prevalence, incidence, cost and trends*.
- Proitsi, P., Kim, M., Whitley, L., Pritchard, M., Leung, R., Soininen, H., Kloszewska, I., Mecocci, P., Tsolaki, M., Vellas, B., Sham, P., Lovestone, S., Powell, J. F., Dobson, R. J. and Legido-Quigley, C. (2015) 'Plasma lipidomics analysis finds long chain cholesteryl esters to be associated with Alzheimer's disease', *Transl Psychiatry*, 5, pp. e494.
- Puglielli, L., Tanzi, R. E. and Kovacs, D. M. (2003) 'Alzheimer's disease: the cholesterol connection', *Nat Neurosci*, 6(4), pp. 345-51.
- Puzzo, D., Lee, L., Palmeri, A., Calabrese, G. and Arancio, O. (2014) 'Behavioral assays with mouse models of Alzheimer's disease: practical considerations and guidelines', *Biochem Pharmacol*, 88(4), pp. 450-67.
- Pérez-Gracia, E., Torrejón-Escribano, B. and Ferrer, I. (2008) 'Dystrophic neurites of senile plaques in Alzheimer's disease are deficient in cytochrome c oxidase', *Acta Neuropathol*, 116(3), pp. 261-8.
- Quinn, J. F., Raman, R., Thomas, R. G., Yurko-Mauro, K., Nelson, E. B., Van Dyck, C., Galvin, J. E., Emond, J., Jack, C. R., Weiner, M., Shinto, L. and Aisen, P. S. (2010a) 'Docosahexaenoic acid supplementation and cognitive decline in Alzheimer disease: a randomized trial', *JAMA*, 304(17), pp. 1903-11.
- Quinn, J. F., Raman, R., Thomas, R. G., Yurko-Mauro, K., Nelson, E. B., Van Dyck, C., Galvin, J. E., Emond, J., Jack, C. R., Weiner, M., Shinto, L. and Aisen, P. S. (2010b) 'Docosahexaenoic acid supplementation and cognitive decline in Alzheimer disease: a randomized trial.', *JAMA*, 304(17), pp. 1903-11.
- Rae, E. A. and Brown, R. E. (2015) 'The problem of genotype and sex differences in life expectancy in transgenic AD mice', *Neurosci Biobehav Rev*, 57, pp. 238-51.
- Rao, J. S., Rapoport, S. I. and Kim, H. W. (2011) 'Altered neuroinflammatory, arachidonic acid cascade and synaptic markers in postmortem Alzheimer's disease brain', *Transl Psychiatry*, 1, pp. e31.
- Rapp, A., Gmeiner, B. and Hüttinger, M. (2006) 'Implication of apoE isoforms in cholesterol metabolism by primary rat hippocampal neurons and astrocytes', *Biochimie*, 88(5), pp. 473-83.
- Ray, B., Chauhan, N. B. and Lahiri, D. K. (2011) 'The "aged garlic extract:" (AGE) and one of its active ingredients S-allyl-L-cysteine (SAC) as potential preventive and therapeutic agents for Alzheimer's disease (AD)', *Curr Med Chem*, 18(22), pp. 3306-13.

- Reiman, E. M. and Caselli, R. J. (1999) 'Alzheimer's disease', *Maturitas*, 31(3), pp. 185-200.
- Reisberg, B., Doody, R., Stöffler, A., Schmitt, F., Ferris, S., Möbius, H. J. and Group, M. S. (2003) 'Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease', *N Engl J Med*, 348(14), pp. 1333-41.
- Reitz, C. and Mayeux, R. (2014) 'Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers', *Biochem Pharmacol*, 88(4), pp. 640-51.
- Roberts, S. B., Ripellino, J. A., Ingalls, K. M., Robakis, N. K. and Felsenstein, K. M. (1994) 'Non-amyloidogenic cleavage of the beta-amyloid precursor protein by an integral membrane metalloendopeptidase', *J Biol Chem*, 269(4), pp. 3111-6.
- Rocchi, A., Pellegrini, S., Siciliano, G. and Murri, L. (2003) 'Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review', *Brain Res Bull*, 61(1), pp. 1-24.
- Rodríguez, J. J., Jones, V. C., Tabuchi, M., Allan, S. M., Knight, E. M., LaFerla, F. M., Oddo, S. and Verkhratsky, A. (2008) 'Impaired adult neurogenesis in the dentate gyrus of a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease.', *PLoS One*, 3(8), pp. e2935.
- Rodríguez, J. J., Jones, V. C. and Verkhratsky, A. (2009) 'Impaired cell proliferation in the subventricular zone in an Alzheimer's disease model.', *Neuroreport*, 20(10), pp. 907-12.
- Rodríguez, J. J., Noristani, H. N., Olabarria, M., Fletcher, J., Somerville, T. D., Yeh, C. Y. and Verkhratsky, A. (2011) 'Voluntary running and environmental enrichment restores impaired hippocampal neurogenesis in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease.', *Curr Alzheimer Res*, 8(7), pp. 707-17.
- Rodríguez, J. J. and Verkhratsky, A. (2011) 'Neurogenesis in Alzheimer's disease.', *J Anat*, 219(1), pp. 78-89.
- Rosenberg, R. N. (2000) 'The molecular and genetic basis of AD: the end of the beginning: the 2000 Wartenberg lecture', *Neurology*, 54(11), pp. 2045-54.
- Roux, S., Sablé, E. and Porsolt, R. D. (2005) 'Primary observation (Irwin) test in rodents for assessing acute toxicity of a test agent and its effects on behavior and physiological function', *Curr Protoc Pharmacol*, Chapter 10, pp. Unit 10.10.
- Roychaudhuri, R., Yang, M., Hoshi, M. M. and Teplow, D. B. (2009) 'Amyloid beta-protein assembly and Alzheimer disease', *J Biol Chem*, 284(8), pp. 4749-53.
- Runz, H., Rietdorf, J., Tomic, I., de Bernard, M., Beyreuther, K., Pepperkok, R. and Hartmann, T. (2002) 'Inhibition of intracellular cholesterol transport alters presenilin localization and amyloid precursor protein processing in neuronal cells', *J Neurosci*, 22(5), pp. 1679-89.
- Rushworth, J. V., Griffiths, H. H., Watt, N. T. and Hooper, N. M. (2013) 'Prion protein-mediated toxicity of amyloid- $\beta$  oligomers requires lipid rafts and the transmembrane LRP1', *J Biol Chem*, 288(13), pp. 8935-51.
- Sadleir, K. R., Kandalepas, P. C., Buggia-Prévo, V., Nicholson, D. A., Thinakaran, G. and Vassar, R. (2016) 'Presynaptic dystrophic neurites surrounding amyloid plaques are sites of microtubule disruption, BACE1 elevation, and increased A $\beta$  generation in Alzheimer's disease', *Acta Neuropathol*, 132(2), pp. 235-56.
- Sakamoto, T., Cansev, M. and Wurtman, R. J. (2007) 'Oral supplementation with docosahexaenoic acid and uridine-5'-monophosphate increases dendritic spine density in adult gerbil hippocampus', *Brain Res*, 1182, pp. 50-9.
- Sanchez-Varo, R., Trujillo-Estrada, L., Sanchez-Mejias, E., Torres, M., Baglietto-Vargas, D., Moreno-Gonzalez, I., De Castro, V., Jimenez, S., Ruano, D., Vizuete, M., Davila, J. C., Garcia-Verdugo, J. M., Jimenez, A. J., Vitorica, J. and Gutierrez, A. (2012) 'Abnormal accumulation of autophagic vesicles correlates with axonal and synaptic pathology in young Alzheimer's mice hippocampus', *Acta Neuropathol*, 123(1), pp. 53-70.

- SantaCruz, K. S., Sonnen, J. A., Pezhouh, M. K., Desrosiers, M. F., Nelson, P. T. and Tyas, S. L. (2011) 'Alzheimer disease pathology in subjects without dementia in 2 studies of aging: the Nun Study and the Adult Changes in Thought Study', *J Neuropathol Exp Neurol*, 70(10), pp. 832-40.
- Santos, G., Díaz, M. and Torres, N. V. (2016) 'Lipid Raft Size and Lipid Mobility in Non-raft Domains Increase during Aging and Are Exacerbated in APP/PS1 Mice Model of Alzheimer's Disease. Predictions from an Agent-Based Mathematical Model', *Front Physiol*, 7, pp. 90.
- Schaeffer, E. L., Figueiro, M. and Gattaz, W. F. (2011) 'Insights into Alzheimer disease pathogenesis from studies in transgenic animal models.', *Clinics (Sao Paulo)*, 66 Suppl 1, pp. 45-54.
- Scheff, S. W. and Price, D. A. (2003) 'Synaptic pathology in Alzheimer's disease: a review of ultrastructural studies', *Neurobiol Aging*, 24(8), pp. 1029-46.
- Scheff, S. W., Price, D. A., Schmitt, F. A., DeKosky, S. T. and Mufson, E. J. (2007) 'Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment', *Neurology*, 68(18), pp. 1501-8.
- Scheltens, P., Blennow, K., Breteler, M. M., de Strooper, B., Frisoni, G. B., Salloway, S. and Van der Flier, W. M. (2016) 'Alzheimer's disease', *Lancet*, 388(10043), pp. 505-17.
- Schliebs, R. and Arendt, T. (2011) 'The cholinergic system in aging and neuronal degeneration', *Behav Brain Res*, 221(2), pp. 555-63.
- Schmitz, G. and Ecker, J. (2008) 'The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids', *Prog Lipid Res*, 47(2), pp. 147-55.
- Schneider, F., Baldauf, K., Wetzels, W. and Reymann, K. G. (2014) 'Behavioral and EEG changes in male 5xFAD mice', *Physiol Behav*, 135, pp. 25-33.
- Schneider, J. A., Arvanitakis, Z., Leurgans, S. E. and Bennett, D. A. (2009) 'The neuropathology of probable Alzheimer disease and mild cognitive impairment', *Ann Neurol*, 66(2), pp. 200-8.
- Schneiter, R., Brügger, B., Sandhoff, R., Zellnig, G., Leber, A., Lampl, M., Athenstaedt, K., Hrstnik, C., Eder, S., Daum, G., Paltauf, F., Wieland, F. T. and Kohlwein, S. D. (1999) 'Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular species composition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species en route to the plasma membrane', *J Cell Biol*, 146(4), pp. 741-54.
- Schor, N. F. (2011) 'What the halted phase III  $\gamma$ -secretase inhibitor trial may (or may not) be telling us', *Ann Neurol*, 69(2), pp. 237-9.
- Schägger, H. (2006) 'Tricine-SDS-PAGE', *Nat Protoc*, 1(1), pp. 16-22.
- Selkoe, D. J. (2001a) 'Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy', *Physiol Rev*, 81(2), pp. 741-66.
- Selkoe, D. J. (2001b) 'Clearing the brain's amyloid cobwebs', *Neuron*, 32(2), pp. 177-80.
- Selkoe, D. J. (2008) 'Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior', *Behav Brain Res*, 192(1), pp. 106-13.
- Selkoe, D. J. and Hardy, J. (2016) 'The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years', *EMBO molecular medicine*, 8(6), pp. 595-608.
- Selznick, L. A., Holtzman, D. M., Han, B. H., Gökden, M., Srinivasan, A. N., Johnson, E. M. and Roth, K. A. (1999) 'In situ immunodetection of neuronal caspase-3 activation in Alzheimer disease', *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 58(9), pp. 1020-1026.
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E. and Hyman, B. T. (2011) 'Neuropathological alterations in Alzheimer disease', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 1(1), pp. a006189.
- Seshadri, S., Fitzpatrick, A. L., Ikram, M. A., DeStefano, A. L., Gudnason, V., Boada, M., Bis, J. C., Smith, A. V., Carassquillo, M. M., Lambert, J. C., Harold, D., Schrijvers, E. M., Ramirez-Lorca, R., Debette, S., Longstreth, W. T., Janssens, A. C., Pankratz, V. S., Dartigues, J. F., Hollingworth, P., Aspelund, T.,

- Hernandez, I., Beiser, A., Kuller, L. H., Koudstaal, P. J., Dickson, D. W., Tzourio, C., Abraham, R., Antunez, C., Du, Y., Rotter, J. I., Aulchenko, Y. S., Harris, T. B., Petersen, R. C., Berr, C., Owen, M. J., Lopez-Arrieta, J., Varadarajan, B. N., Becker, J. T., Rivadeneira, F., Nalls, M. A., Graff-Radford, N. R., Campion, D., Auerbach, S., Rice, K., Hofman, A., Jonsson, P. V., Schmidt, H., Lathrop, M., Mosley, T. H., Au, R., Psaty, B. M., Uitterlinden, A. G., Farrer, L. A., Lumley, T., Ruiz, A., Williams, J., Amouyel, P., Younkin, S. G., Wolf, P. A., Launer, L. J., Lopez, O. L., van Duijn, C. M., Breteler, M. M., Consortium, C., Consortium, G. and Consortium, E. (2010) 'Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease', *JAMA*, 303(18), pp. 1832-40.
- Shaikh, S. R. (2012) 'Biophysical and biochemical mechanisms by which dietary N-3 polyunsaturated fatty acids from fish oil disrupt membrane lipid rafts', *J Nutr Biochem*, 23(2), pp. 101-5.
- Shankar, G. M. and Walsh, D. M. (2009) 'Alzheimer's disease: synaptic dysfunction and A $\beta$ ', *Mol Neurodegener*, 4, pp. 48.
- Sharma, S., Rakoczy, S. and Brown-Borg, H. (2010) 'Assessment of spatial memory in mice', *Life Sci*, 87(17-18), pp. 521-36.
- Shepardson, N. E., Shankar, G. M. and Selkoe, D. J. (2011a) 'Cholesterol level and statin use in Alzheimer disease: I. Review of epidemiological and preclinical studies', *Arch Neurol*, 68(10), pp. 1239-44.
- Shepardson, N. E., Shankar, G. M. and Selkoe, D. J. (2011b) 'Cholesterol level and statin use in Alzheimer disease: II. Review of human trials and recommendations', *Arch Neurol*, 68(11), pp. 1385-92.
- Shimohama, S., Kamiya, S., Taniguchi, T., Akagawa, K. and Kimura, J. (1997) 'Differential involvement of synaptic vesicle and presynaptic plasma membrane proteins in Alzheimer's disease', *Biochem Biophys Res Commun*, 236(2), pp. 239-42.
- Shinto, L., Quinn, J., Montine, T., Dodge, H. H., Woodward, W., Baldauf-Wagner, S., Waichunas, D., Bumgarner, L., Bourdette, D., Silbert, L. and Kaye, J. (2014) 'A randomized placebo-controlled pilot trial of omega-3 fatty acids and alpha lipoic acid in Alzheimer's disease', *J Alzheimers Dis*, 38(1), pp. 111-20.
- Simons, K. and Ikonen, E. (1997) 'Functional rafts in cell membranes', *Nature*, 387(6633), pp. 569-72.
- Simopoulos, A. P. (2006) 'Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases', *Biomed Pharmacother*, 60(9), pp. 502-7.
- Simopoulos, A. P. (2008) 'The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases', *Exp Biol Med (Maywood)*, 233(6), pp. 674-88.
- Sisodia, S. S. (1992) 'Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(13), pp. 6075-9.
- Sisodia, S. S., Koo, E. H., Beyreuther, K., Unterbeck, A. and Price, D. L. (1990) 'Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing', *Science*, 248(4954), pp. 492-5.
- Small, D. H. (2008) 'Network dysfunction in Alzheimer's disease: does synaptic scaling drive disease progression?', *Trends Mol Med*, 14(3), pp. 103-8.
- Small, S. A. and Duff, K. (2008) 'Linking A $\beta$  and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis', *Neuron*, 60(4), pp. 534-42.
- Smith, T. D., Adams, M. M., Gallagher, M., Morrison, J. H. and Rapp, P. R. (2000) 'Circuit-specific alterations in hippocampal synaptophysin immunoreactivity predict spatial learning impairment in aged rats', *J Neurosci*, 20(17), pp. 6587-93.
- Snowdon, D. A. and Study, N. (2003) 'Healthy aging and dementia: findings from the Nun Study', *Ann Intern Med*, 139(5 Pt 2), pp. 450-4.
- Solà, C., Mengod, G., Ghetti, B., Palacios, J. M. and Triarhou, L. C. (1993) 'Regional distribution of the alternatively spliced isoforms of beta APP RNA transcript in the brain of normal, heterozygous

- and homozygous weaver mutant mice as revealed by in situ hybridization histochemistry', *Brain Res Mol Brain Res*, 17(3-4), pp. 340-6.
- Spector, A. A. and Yorek, M. A. (1985) 'Membrane lipid composition and cellular function', *J Lipid Res*, 26(9), pp. 1015-35.
- Stark, D. T. and Bazan, N. G. (2011) 'Neuroprotectin D1 induces neuronal survival and downregulation of amyloidogenic processing in Alzheimer's disease cellular models', *Mol Neurobiol*, 43(2), pp. 131-8.
- Stillwell, W. (2006) 'The role of polyunsaturated lipids in membrane raft function', *Scandinavian Journal of Food and Nutrition*, 50(sup2), pp. 107-113.
- Strittmatter, W. J., Saunders, A. M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G. S. and Roses, A. D. (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(5), pp. 1977-81.
- Su, H. M. (2010) 'Mechanisms of n-3 fatty acid-mediated development and maintenance of learning memory performance.', *J Nutr Biochem*, 21(5), pp. 364-73.
- Su, J. H., Cummings, B. J. and Cotman, C. W. (1998) 'Plaque biogenesis in brain aging and Alzheimer's disease. II. Progressive transformation and developmental sequence of dystrophic neurites', *Acta Neuropathol*, 96(5), pp. 463-71.
- Su, J. H., Zhao, M., Anderson, A. J., Srinivasan, A. and Cotman, C. W. (2001) 'Activated caspase-3 expression in Alzheimer's and aged control brain: correlation with Alzheimer pathology', *Brain research*, 898(2), pp. 350-357.
- Suh, G. H., Jung, H. Y., Lee, C. U., Choi, S. and Group, K. G. S. (2008) 'Economic and clinical benefits of galantamine in the treatment of mild to moderate Alzheimer's disease in a Korean population: a 52-week prospective study', *J Korean Med Sci*, 23(1), pp. 10-7.
- Suzuki, N., Cheung, T. T., Cai, X. D., Odaka, A., Otvos, L., Eckman, C., Golde, T. E. and Younkin, S. G. (1994) 'An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants', *Science*, 264(5163), pp. 1336-40.
- Swerdlow, R. H. and Khan, S. M. (2004) 'A "mitochondrial cascade hypothesis" for sporadic Alzheimer's disease', *Med Hypotheses*, 63(1), pp. 8-20.
- Sze, C. I., Bi, H., Kleinschmidt-DeMasters, B. K., Filley, C. M. and Martin, L. J. (2000) 'Selective regional loss of exocytotic presynaptic vesicle proteins in Alzheimer's disease brains', *J Neurol Sci*, 175(2), pp. 81-90.
- Sze, C. I., Troncoso, J. C., Kawas, C., Mouton, P., Price, D. L. and Martin, L. J. (1997) 'Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer disease', *J Neuropathol Exp Neurol*, 56(8), pp. 933-44.
- Söderberg, M., Edlund, C., Kristensson, K. and Dallner, G. (1991) 'Fatty acid composition of brain phospholipids in aging and in Alzheimer's disease', *Lipids*, 26(6), pp. 421-5.
- Tajima, Y., Ishikawa, M., Maekawa, K., Murayama, M., Senoo, Y., Nishimaki-Mogami, T., Nakanishi, H., Ikeda, K., Arita, M., Taguchi, R., Okuno, A., Mikawa, R., Niida, S., Takikawa, O. and Saito, Y. (2013) 'Lipidomic analysis of brain tissues and plasma in a mouse model expressing mutated human amyloid precursor protein/tau for Alzheimer's disease', *Lipids Health Dis*, 12, pp. 68.
- Takami, M., Nagashima, Y., Sano, Y., Ishihara, S., Morishima-Kawashima, M., Funamoto, S. and Ihara, Y. (2009) 'gamma-Secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of beta-carboxyl terminal fragment', *J Neurosci*, 29(41), pp. 13042-52.

- Takasugi, N., Tomita, T., Hayashi, I., Tsuruoka, M., Niimura, M., Takahashi, Y., Thinakaran, G. and Iwatsubo, T. (2003) 'The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex', *Nature*, 422(6930), pp. 438-41.
- Tamboli, I. Y., Hampel, H., Tien, N. T., Tolksdorf, K., Breiden, B., Mathews, P. M., Saftig, P., Sandhoff, K. and Walter, J. (2011a) 'Sphingolipid storage affects autophagic metabolism of the amyloid precursor protein and promotes Abeta generation', *J Neurosci*, 31(5), pp. 1837-49.
- Tamboli, I. Y., Tien, N. T. and Walter, J. (2011b) 'Sphingolipid storage impairs autophagic clearance of Alzheimer-associated proteins', *Autophagy*, 7(6), pp. 645-6.
- Tandon, A. and Fraser, P. (2002) 'The presenilins', *Genome Biol*, 3(11), pp. reviews3014.
- Tanzi, R. E. (2005) 'The synaptic Abeta hypothesis of Alzheimer disease', *Nat Neurosci*, 8(8), pp. 977-9.
- Taylor, D. R. and Hooper, N. M. (2007) 'Role of lipid rafts in the processing of the pathogenic prion and Alzheimer's amyloid-beta proteins', *Semin Cell Dev Biol*, 18(5), pp. 638-48.
- Teng, E., Taylor, K., Bilousova, T., Weiland, D., Pham, T., Zuo, X., Yang, F., Chen, P. P., Glabe, C. G., Takacs, A., Hoffman, D. R., Frautschy, S. A. and Cole, G. M. (2015) 'Dietary DHA supplementation in an APP/PS1 transgenic rat model of AD reduces behavioral and A $\beta$  pathology and modulates A $\beta$  oligomerization', *Neurobiol Dis*, 82, pp. 552-60.
- ter Laak, H. J., Renkawek, K. and van Workum, F. P. (1994) 'The olfactory bulb in Alzheimer disease: a morphologic study of neuron loss, tangles, and senile plaques in relation to olfaction', *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 8(1), pp. 38-48.
- Terés, S., Lladó, V., Higuera, M., Barceló-Coblijn, G., Martin, M. L., Noguera-Salvà, M. A., Marcilla-Etxenike, A., García-Verdugo, J. M., Soriano-Navarro, M., Saus, C., Gómez-Pinedo, U., Busquets, X. and Escribá, P. V. (2012) '2-Hydroxyoleate, a nontoxic membrane binding anticancer drug, induces glioma cell differentiation and autophagy', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(22), pp. 8489-94.
- Thal, D. R., Rüb, U., Orantes, M. and Braak, H. (2002) 'Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD', *Neurology*, 58(12), pp. 1791-800.
- Thinakaran, G., Borchelt, D. R., Lee, M. K., Slunt, H. H., Spitzer, L., Kim, G., Ratovitsky, T., Davenport, F., Nordstedt, C., Seeger, M., Hardy, J., Levey, A. I., Gandy, S. E., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Price, D. L. and Sisodia, S. S. (1996) 'Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo', *Neuron*, 17(1), pp. 181-90.
- Thompson, P. M., Hayashi, K. M., de Zubicaray, G., Janke, A. L., Rose, S. E., Semple, J., Herman, D., Hong, M. S., Dittmer, S. S., Doddrell, D. M. and Toga, A. W. (2003) 'Dynamics of gray matter loss in Alzheimer's disease', *J Neurosci*, 23(3), pp. 994-1005.
- Toda, T., Noda, Y., Ito, G., Maeda, M. and Shimizu, T. (2011) 'Presenilin-2 mutation causes early amyloid accumulation and memory impairment in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease', *J Biomed Biotechnol*, 2011, pp. 617974.
- Tohda, C., Nakada, R., Urano, T., Okonogi, A. and Kuboyama, T. (2011) 'Kamikihito (KKT) rescues axonal and synaptic degeneration associated with memory impairment in a mouse model of Alzheimer's disease, 5XFAD', *Int J Neurosci*, 121(12), pp. 641-8.
- Toledo, J. B., Xie, S. X., Trojanowski, J. Q. and Shaw, L. M. (2013) 'Longitudinal change in CSF Tau and A $\beta$  biomarkers for up to 48 months in ADNI', *Acta Neuropathol*, 126(5), pp. 659-70.
- Torres, M., Busquets, X. and Escribá, P. V. (2016) 'Brain Lipids in the Pathophysiology and Treatment of Alzheimer's Disease'.
- Torres, M., Jimenez, S., Sanchez-Varo, R., Navarro, V., Trujillo-Estrada, L., Sanchez-Mejias, E., Carmona, I., Davila, J. C., Vizueté, M., Gutierrez, A. and Vitorica, J. (2012) 'Defective lysosomal proteolysis and axonal transport are early pathogenic events that worsen with age leading to increased APP

- metabolism and synaptic Abeta in transgenic APP/PS1 hippocampus', *Mol Neurodegener*, 7, pp. 59.
- Torres, M., Price, S. L., Fiol-Deroque, M. A., Marcilla-Etxenike, A., Ahyauch, H., Barceló-Coblijn, G., Terés, S., Katsouri, L., Ordinas, M., López, D. J., Iburguren, M., Goñi, F. M., Busquets, X., Vitorica, J., Sastre, M. and Escribá, P. V. (2014) 'Membrane lipid modifications and therapeutic effects mediated by hydroxydocosahexaenoic acid on Alzheimer's disease', *Biochim Biophys Acta*, 1838(6), pp. 1680-92.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) 'Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9), pp. 4350-4.
- Troncoso, J. C., Sukhov, R. R., Kawas, C. H. and Koliatsos, V. E. (1996) 'In situ labeling of dying cortical neurons in normal aging and in Alzheimer's disease: correlations with senile plaques and disease progression', *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 55(11), pp. 1134-1142.
- Trujillo-Estrada, L., Jimenez, S., De Castro, V., Torres, M., Baglietto-Vargas, D., Moreno-Gonzalez, I., Navarro, V., Sanchez-Varo, R., Sanchez-Mejias, E., Davila, J. C., Vizuete, M., Gutierrez, A. and Vitorica, J. (2013) 'In vivo modification of Abeta plaque toxicity as a novel neuroprotective lithium-mediated therapy for Alzheimer's disease pathology', *Acta Neuropathol Commun*, 1, pp. 73.
- Tuppo, E. E. and Arias, H. R. (2005) 'The role of inflammation in Alzheimer's disease', *Int J Biochem Cell Biol*, 37(2), pp. 289-305.
- Turner, R. S. (2001) 'Alzheimer's disease in man and transgenic mice: females at higher risk', *Am J Pathol*, 158(3), pp. 797-801.
- Urano, T. and Tohda, C. (2010) 'Icariin improves memory impairment in Alzheimer's disease model mice (5xFAD) and attenuates amyloid  $\beta$ -induced neurite atrophy', *Phytother Res*, 24(11), pp. 1658-63.
- Van Cauwenberghe, C., Van Broeckhoven, C. and Sleegers, K. (2015) 'The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspectives', *Genetics in Medicine*, 18(5), pp. 421-430.
- Van Gassen, G. and Annaert, W. (2003) 'Amyloid, presenilins, and Alzheimer's disease', *Neuroscientist*, 9(2), pp. 117-26.
- van Groen, T., Liu, L., Ikonen, S. and Kadish, I. (2003) 'Diffuse amyloid deposition, but not plaque number, is reduced in amyloid precursor protein/presenilin 1 double-transgenic mice by pathway lesions', *Neuroscience*, 119(4), pp. 1185-97.
- van Meer, G., Voelker, D. R. and Feigenson, G. W. (2008) 'Membrane lipids: where they are and how they behave', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(2), pp. 112-24.
- Vardy, E. R., Catto, A. J. and Hooper, N. M. (2005) 'Proteolytic mechanisms in amyloid-beta metabolism: therapeutic implications for Alzheimer's disease', *Trends Mol Med*, 11(10), pp. 464-72.
- Vassar, R. (2001) 'The beta-secretase, BACE: a prime drug target for Alzheimer's disease', *J Mol Neurosci*, 17(2), pp. 157-70.
- Vassar, R. (2014) 'BACE1 inhibitor drugs in clinical trials for Alzheimer's disease', *Alzheimers Res Ther*, 6(9), pp. 89.
- Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M. A., Biere, A. L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J. C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G. and Citron, M. (1999) 'Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE', *Science*, 286(5440), pp. 735-41.

- Vassar, R., Kovacs, D. M., Yan, R. and Wong, P. C. (2009) 'The beta-secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential', *J Neurosci*, 29(41), pp. 12787-94.
- Vereecken, T. H., Vogels, O. J. and Nieuwenhuys, R. (1994) 'Neuron loss and shrinkage in the amygdala in Alzheimer's disease', *Neurobiol Aging*, 15(1), pp. 45-54.
- Vertes, R. P., Hoover, W. B., Szigeti-Buck, K. and Leranth, C. (2007) 'Nucleus reuniens of the midline thalamus: link between the medial prefrontal cortex and the hippocampus.', *Brain Res Bull*, 71(6), pp. 601-9.
- Vetrivel, K. S. and Thinakaran, G. (2010) 'Membrane rafts in Alzheimer's disease beta-amyloid production', *Biochim Biophys Acta*, 1801(8), pp. 860-7.
- Villemagne, V. L., Fodero-Tavoletti, M. T., Masters, C. L. and Rowe, C. C. (2015) 'Tau imaging: early progress and future directions', *Lancet Neurol*, 14(1), pp. 114-24.
- Vögler, O., López-Bellan, A., Alemany, R., Tofé, S., González, M., Quevedo, J., Pereg, V., Barceló, F. and Escriba, P. V. (2008) 'Structure-effect relation of C18 long-chain fatty acids in the reduction of body weight in rats', *Int J Obes (Lond)*, 32(3), pp. 464-73.
- Wada, K., Nakajima, A., Katayama, K., Kudo, C., Shibuya, A., Kubota, N., Terauchi, Y., Tachibana, M., Miyoshi, H., Kamisaki, Y., Mayumi, T., Kadowaki, T. and Blumberg, R. S. (2006) 'Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated regulation of neural stem cell proliferation and differentiation', *J Biol Chem*, 281(18), pp. 12673-81.
- Wakabayashi, T. and De Strooper, B. (2008) 'Presenilins: members of the gamma-secretase quartets, but part-time soloists too', *Physiology (Bethesda)*, 23, pp. 194-204.
- Waldemar, G., Dubois, B., Emre, M., Georges, J., McKeith, I. G., Rossor, M., Scheltens, P., Tariska, P., Winblad, B. and EFNS (2007) 'Recommendations for the diagnosis and management of Alzheimer's disease and other disorders associated with dementia: EFNS guideline', *Eur J Neurol*, 14(1), pp. e1-26.
- Walsh, D. M. and Selkoe, D. J. (2007) 'A beta oligomers - a decade of discovery', *J Neurochem*, 101(5), pp. 1172-84.
- Wang, L., Guo, L., Lu, L., Sun, H., Shao, M., Beck, S. J., Li, L., Ramachandran, J., Du, Y. and Du, H. (2016) 'Synaptosomal Mitochondrial Dysfunction in 5xFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease', *PLoS One*, 11(3), pp. e0150441.
- Wang, R., Wang, B., He, W. and Zheng, H. (2006) 'Wild-type presenilin 1 protects against Alzheimer disease mutation-induced amyloid pathology', *J Biol Chem*, 281(22), pp. 15330-6.
- Wang, S. H., Sun, Z. L., Guo, Y. J., Yuan, Y. and Li, L. (2009) 'PPARgamma-mediated advanced glycation end products regulation of neural stem cells', *Mol Cell Endocrinol*, 307(1-2), pp. 176-84.
- Ward, M. T., Oler, J. A. and Markus, E. J. (1999a) 'Hippocampal dysfunction during aging I: deficits in memory consolidation.', *Neurobiol Aging*, 20(4), pp. 363-72.
- Ward, M. T., Stoelzel, C. R. and Markus, E. J. (1999b) 'Hippocampal dysfunction during aging II: deficits on the radial-arm maze.', *Neurobiol Aging*, 20(4), pp. 373-80.
- Wassall, S. R. and Stillwell, W. (2009) 'Polyunsaturated fatty acid-cholesterol interactions: domain formation in membranes', *Biochim Biophys Acta*, 1788(1), pp. 24-32.
- Watson, A. D. (2006) 'Thematic review series: systems biology approaches to metabolic and cardiovascular disorders. Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems', *J Lipid Res*, 47(10), pp. 2101-11.
- Webster, S. J., Bachstetter, A. D., Nelson, P. T., Schmitt, F. A. and Van Eldik, L. J. (2014) 'Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models', *Front Genet*, 5, pp. 88.

- Webster, S. J., Bachstetter, A. D. and Van Eldik, L. J. (2013) 'Comprehensive behavioral characterization of an APP/PS-1 double knock-in mouse model of Alzheimer's disease', *Alzheimers Res Ther*, 5(3), pp. 28.
- Wehner, J. M. and Radcliffe, R. A. (2004) 'Cued and contextual fear conditioning in mice', *Curr Protoc Neurosci*, Chapter 8, pp. Unit 8.5C.
- Wei, Z., Chen, X. C., Song, Y., Pan, X. D., Dai, X. M., Zhang, J., Cui, X. L., Wu, X. L. and Zhu, Y. G. (2016) 'Amyloid  $\beta$  Protein Aggravates Neuronal Senescence and Cognitive Deficits in 5XFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease', *Chin Med J (Engl)*, 129(15), pp. 1835-44.
- Wen, P. H., Shao, X., Shao, Z., Hof, P. R., Wisniewski, T., Kelley, K., Friedrich, V. L., Ho, L., Pasinetti, G. M., Shioi, J., Robakis, N. K. and Elder, G. A. (2002) 'Overexpression of wild type but not an FAD mutant presenilin-1 promotes neurogenesis in the hippocampus of adult mice.', *Neurobiol Dis*, 10(1), pp. 8-19.
- West, M. J., Kawas, C. H., Stewart, W. F., Rudow, G. L. and Troncoso, J. C. (2004) 'Hippocampal neurons in pre-clinical Alzheimer's disease', *Neurobiol Aging*, 25(9), pp. 1205-12.
- Weylandt, K. H., Chiu, C. Y., Gomolka, B., Waechter, S. F. and Wiedenmann, B. (2012) 'Omega-3 fatty acids and their lipid mediators: towards an understanding of resolvin and protectin formation', *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 97(3-4), pp. 73-82.
- Whitmer, R. A., Sidney, S., Selby, J., Johnston, S. C. and Yaffe, K. (2005) 'Midlife cardiovascular risk factors and risk of dementia in late life', *Neurology*, 64(2), pp. 277-81.
- Winblad, B., Amouyel, P., Andrieu, S., Ballard, C., Brayne, C., Brodaty, H., Cedazo-Minguez, A., Dubois, B., Edvardsson, D. and Feldman, H. (2016) 'Defeating Alzheimer's disease and other dementias: a priority for European science and society', *The Lancet Neurology*, 15(5), pp. 455.
- Wolf, H. K., Buslei, R., Schmidt-Kastner, R., Schmidt-Kastner, P. K., Pietsch, T., Wiestler, O. D. and Blümcke, I. (1996) 'NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology', *J Histochem Cytochem*, 44(10), pp. 1167-71.
- Wolfe, M. S. (2007) 'When loss is gain: reduced presenilin proteolytic function leads to increased Abeta42/Abeta40. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease', *EMBO Rep*, 8(2), pp. 136-40.
- Wood, J. T., Williams, J. S., Pandarinathan, L., Janero, D. R., Lammi-Keefe, C. J. and Makriyannis, A. (2010) 'Dietary docosahexaenoic acid supplementation alters select physiological endocannabinoid-system metabolites in brain and plasma', *J Lipid Res*, 51(6), pp. 1416-23.
- Wood, R. and Harlow, R. D. (1969) 'Structural studies of neutral glycerides and phosphoglycerides of rat liver', *Arch Biochem Biophys*, 131(2), pp. 495-501.
- Woodhouse, A., Dickson, T. C., West, A. K., McLean, C. A. and Vickers, J. C. (2006) 'No difference in expression of apoptosis-related proteins and apoptotic morphology in control, pathologically aged and Alzheimer's disease cases', *Neurobiology of disease*, 22(2), pp. 323-333.
- Wu, S., Ding, Y., Wu, F., Li, R., Hou, J. and Mao, P. (2015) 'Omega-3 fatty acids intake and risks of dementia and Alzheimer's disease: a meta-analysis', *Neurosci Biobehav Rev*, 48, pp. 1-9.
- Wu, Y. T., Fratiglioni, L., Matthews, F. E., Lobo, A., Breteler, M. M., Skoog, I. and Brayne, C. (2016) 'Dementia in western Europe: epidemiological evidence and implications for policy making', *Lancet Neurol*, 15(1), pp. 116-24.
- Wurtman, R. J., Ulus, I. H., Cansev, M., Watkins, C. J., Wang, L. and Marzloff, G. (2006) 'Synaptic proteins and phospholipids are increased in gerbil brain by administering uridine plus docosahexaenoic acid orally', *Brain Res*, 1088(1), pp. 83-92.
- Xiang, Y., Lam, S. M. and Shui, G. (2015) 'What can lipidomics tell us about the pathogenesis of Alzheimer disease?', *Biol Chem*, 396(12), pp. 1281-91.

- Yamamoto, S., Wajima, T., Hara, Y., Nishida, M. and Mori, Y. (2007) 'Transient receptor potential channels in Alzheimer's disease', *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1772(8), pp. 958-967.
- Yamin, G. (2009) 'NMDA receptor-dependent signaling pathways that underlie amyloid beta-protein disruption of LTP in the hippocampus.', *J Neurosci Res*, 87(8), pp. 1729-36.
- Yang, L., Ho, N. Y., Alshut, R., Legradi, J., Weiss, C., Reischl, M., Mikut, R., Liebel, U., Müller, F. and Strähle, U. (2009) 'Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals', *Reprod Toxicol*, 28(2), pp. 245-53.
- Yang, L. B., Lindholm, K., Yan, R., Citron, M., Xia, W., Yang, X. L., Beach, T., Sue, L., Wong, P., Price, D., Li, R. and Shen, Y. (2003) 'Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease', *Nat Med*, 9(1), pp. 3-4.
- Yang, Q., Alemany, R., Casas, J., Kitajka, K., Lanier, S. M. and Escibá, P. V. (2005) 'Influence of the membrane lipid structure on signal processing via G protein-coupled receptors', *Mol Pharmacol*, 68(1), pp. 210-7.
- Yao, Y., Clark, C. M., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. and Praticò, D. (2005) 'Elevation of 12/15 lipoxygenase products in AD and mild cognitive impairment', *Ann Neurol*, 58(4), pp. 623-6.
- Ye, S., Huang, Y., Müllendorff, K., Dong, L., Giedt, G., Meng, E. C., Cohen, F. E., Kuntz, I. D., Weisgraber, K. H. and Mahley, R. W. (2005) 'Apolipoprotein (apo) E4 enhances amyloid beta peptide production in cultured neuronal cells: apoE structure as a potential therapeutic target', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(51), pp. 18700-5.
- Yoon, T., Okada, J., Jung, M. W. and Kim, J. J. (2008) 'Prefrontal cortex and hippocampus subserve different components of working memory in rats', *Learn Mem*, 15(3), pp. 97-105.
- Yu, W. H., Kumar, A., Peterhoff, C., Shapiro Kulnane, L., Uchiyama, Y., Lamb, B. T., Cuervo, A. M. and Nixon, R. A. (2004) 'Autophagic vacuoles are enriched in amyloid precursor protein-secretase activities: implications for beta-amyloid peptide over-production and localization in Alzheimer's disease', *Int J Biochem Cell Biol*, 36(12), pp. 2531-40.
- Zarow, C., Lyness, S. A., Mortimer, J. A. and Chui, H. C. (2003) 'Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in Alzheimer and Parkinson diseases', *Arch Neurol*, 60(3), pp. 337-41.
- Zhang, F. X., Sun, Q. J., Zheng, X. Y., Lin, Y. T., Shang, W., Wang, A. H., Duan, R. S. and Chi, Z. F. (2014) 'Abnormal expression of synaptophysin, SNAP-25, and synaptotagmin 1 in the hippocampus of kainic acid-exposed rats with behavioral deficits', *Cell Mol Neurobiol*, 34(6), pp. 813-24.
- Zhang, X. M., Cai, Y., Xiong, K., Cai, H., Luo, X. G., Feng, J. C., Clough, R. W., Struble, R. G., Patrylo, P. R. and Yan, X. X. (2009) 'Beta-secretase-1 elevation in transgenic mouse models of Alzheimer's disease is associated with synaptic/axonal pathology and amyloidogenesis: implications for neuritic plaque development', *Eur J Neurosci*, 30(12), pp. 2271-83.
- Zhang, Y. W., Thompson, R., Zhang, H. and Xu, H. (2011) 'APP processing in Alzheimer's disease.', *Mol Brain*, 4, pp. 3.
- Zhao, J., Fu, Y., Yasvoina, M., Shao, P., Hitt, B., O'Connor, T., Logan, S., Maus, E., Citron, M., Berry, R., Binder, L. and Vassar, R. (2007) 'Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 levels become elevated in neurons around amyloid plaques: implications for Alzheimer's disease pathogenesis', *J Neurosci*, 27(14), pp. 3639-49.
- Zhao, Y., Calon, F., Julien, C., Winkler, J. W., Petasis, N. A., Lukiw, W. J. and Bazan, N. G. (2011) 'Docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 induces neuronal survival via secretase- and PPAR $\gamma$ -mediated mechanisms in Alzheimer's disease models.', *PLoS One*, 6(1), pp. e15816.
- Zheng, H. and Koo, E. H. (2011) 'Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein', *Mol Neurodegener*, 6(1), pp. 27.

## Bibliografía

---

- Zhong, Z., Ewers, M., Teipel, S., Bürger, K., Wallin, A., Blennow, K., He, P., McAllister, C., Hampel, H. and Shen, Y. (2007) 'Levels of beta-secretase (BACE1) in cerebrospinal fluid as a predictor of risk in mild cognitive impairment', *Arch Gen Psychiatry*, 64(6), pp. 718-26.
- Zhu, X., Perry, G. and Smith, M. A. (2005) 'Insulin signaling, diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease', *J Alzheimers Dis*, 7(1), pp. 81-4.
- Zhu, X., Su, B., Wang, X., Smith, M. A. and Perry, G. (2007) 'Causes of oxidative stress in Alzheimer disease', *Cell Mol Life Sci*, 64(17), pp. 2202-10.
- Zohar, O., Pick, C. G., Cavallaro, S., Chapman, J., Katzav, A., Milman, A. and Alkon, D. L. (2005) 'Age-dependent differential expression of BACE splice variants in brain regions of tg2576 mice', *Neurobiol Aging*, 26(8), pp. 1167-75.

