



Universidad de Navarra
Facultad de Farmacia

**Efectos de la Estimulación Cognitiva en la
Enfermedad de Alzheimer: Implicación de BDNF**

Gorka Gereñu Lopetegi

Efectos de la Estimulación Cognitiva en la Enfermedad de Alzheimer: Implicación de BDNF

Memoria presentada por D^o. Gorka Gereñu Lopetegi para aspirar al grado de Doctor
por la Universidad de Navarra

El presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Farmacología y Toxicología y autorizo su presentación ante el Tribunal que lo ha de juzgar.

Pamplona, Abril de 2013

Fdo: Dr. Francisco Javier Gil Bea

Fdo: Dra. María Javier Ramírez Gil

*"I'm a brain. Watson
The rest of me is a mere appendix"*

*Arthur Conan Doyle (1903)
"Sherlock Holmes-The adventure of the mazarin Stone"*

Nere familiari
Laurari

Y por fin, los agradecimientos. Digo por fin porque eso significa que estoy terminando de escribir la tesis! Ese libro en el que se plasma todo o parte de nuestro trabajo, esfuerzo y esperanza para el futuro, aunque al mismo tiempo supone el final de una etapa. Gracias a los agradecimientos convertimos este resumen de un trabajo de investigación en algo personal, nuestro y en un espejo de lo que a lo largo de este tiempo hemos vivido y sentido. Por eso, aunque sea una de las últimas partes de la tesis que escribo no va a ser nada fácil escribir unas líneas a todas esas personas que me han ayudado, apoyado, enseñado, comprendido, animado, tranquilizado y otras muchas cosas necesarias sin duda, para llevar a buen puerto el tedioso trabajo que conlleva una tesis doctoral.

Lo primero que me gustaría hacer es lanzaros un Muchísimas Gracias-Míla esker a todos/as los/las que habéis participado en esta andadura. Estoy seguro de que el simple hecho de que leáis estas líneas significa que esta tesis (y el que la escribe) os importa al menos un poquito. Espero ser capaz de mostrar al menos sólo una pequeña parte de mi gratitud hacia vosotros/as.

En especial, tengo que agradecer a la Universidad de Navarra y a la Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra la oportunidad que me concedieron de realizar esta tesis doctoral, oportunidad que he intentado aprovechar al máximo.

A la Dra. Berta Lasheras, directora del departamento de Farmacología durante casi toda mi tesis, quiero agradecerle el ánimo y continuas muestras de interés que me ha prestado durante todo este tiempo. Además quiero agradecer a la Dra. Pilar Lostao, por mi primera etapa en la investigación mediante el proyecto de máster y por sus continuas muestras de interés durante toda la tesis.

Pero toda gran Tesis doctoral requiere de un gran director y a falta de uno... dos. Patxi y Mariaja, Mariaja y Patxi. Un agradecimiento muy especial va dirigido a vosotros dos. Porque creo sinceramente que una combinación de los dos, es la combinación perfecta de científico y he tenido la suerte de vivir y

aprender de esa combinación. Mariaja o “jefa” o ahora “super-jefa” quiero agradecerte que confiaras en mí cuando ni siquiera me conocías. Además quiero agradecerte tu cercanía, tan importante en una relación director-doctorando y tu capacidad para hacer fácil lo que no lo es tanto durante toda la tesis. Por último quiero agradecerte este último mes, porque en esta última etapa de la tesis, la más dura de todas, corrección tras corrección, me has ayudado a mejorar algo muy importante en ciencia, la escritura y transmisión de lo que hacemos. No quiero perder esta oportunidad para desearte todo lo mejor en tu nueva y un tanto diferente andadura dentro del departamento, así que mucha suerte!

Patxi, sin duda uno de los agradecimientos más especiales va dirigido a ti. Esta tesis no hubiera sido posible sin ti. Difícilmente un doctorando va a tener la suerte de tener un director de tesis que además de cumplir su cometido profesional (y cumplirlo muy bien por cierto), tenga la virtud de ser compañero de trabajo, compañero de equipo de Squash, confidente en ambas direcciones y amigo. Gracias por estimular mi interés por la ciencia, por dejarme pensar por mí mismo, por el continuo “feedback”, pero también por decir sin tapujos lo que piensas cuando no has estado de acuerdo conmigo. Espero poder seguir manteniendo tu amistad durante mucho tiempo.

Hace ya unos 5 años, era el masterando que trabajaba con ranas del departamento de al lado, entonces “CAFT”, gracias al que conocí el mundo de la ciencia y algunas personas más. Pero una vez terminado el máster, Mariaja me acogió en el departamento de Farmacología, donde todos/as me acogisteis con los brazos abiertos. Por eso, os quiero dar las Mil gracias primero a todos como departamento por estos años, porque este departamento es como una familia en la que también es verdad, los cambios son continuos! Ya que, si miro un momento a mi alrededor, veo el gran cambio que a lo largo de estos años ha experimentado el departamento, hasta un cambio de nombre!, sin embargo el departamento en el que yo he hecho la tesis siempre será “el depar de Farma”.

Por eso, primero gracias a las personas que dotan de alma al departamento. Son las personas que perduran a los vaivenes pasajeros de los

doctorandos y las que hacen que realmente el departamento funcione. A Rosa, gracias por tus muestras de interés, por tu alegría y por la tranquilidad que transmites, una virtud muy necesaria. Gracias a Mari Luz por ser la madre de todos, por ponernos firmes con tus cariñosas reprimendas, pero sobre todo tus continuas muestras de preocupación y de paso por ese montón de cerebros cortados! A Sandra, gracias por pelearte con esa dichosa PCR, pero sobre todo por estos últimos meses de desahogos mutuos, por ofrecerme tu cariño, comprensión y amistad. Me has ayudado un montón. A Guadalupe, gracias por tu alegría, divertida conversación y tus continuas muestras de interés. Gracias a Pili, por ser la eficiencia personificada, por tus interesantes conversaciones y por tener una paciencia inmensa con los pedidos, gracias también a tus compañeras de despacho por estar siempre dispuestas a ayudar cuando tú no podías . A Trini, gracias por transmitir tanto positivismo y alegría en el tiempo que estuviste con nosotros.

Al final, cuando compartes tiempo y experiencias con ciertas personas, son éstas las que más te marcan. Son personas que me vieron llegar y han compartido conmigo gran parte de este camino, me han visto reír, gritar, enfadarme, llorar y han sabido estar ahí todo este tiempo. Espero que estemos cerca o lejos, esta cuadrilla sea para toda la vida. A Eva, gracias por tu cariño, por tus ánimos continuos y por tu total disponibilidad para trabajar siempre. A Mikel, por tu optimismo y alegría a pesar del las horas que pasas en CIFA, y por tu empeño en hacer departamento dentro y fuera de él. A Eli, por tu espontaneidad y gran corazón. A Bea, por ponernos tan fácil la organización de las prácticas y por las largas conversaciones. Maite-ri, Mila esker eskaini didazun laguntza guztiagatik, zure ikuspuntu ezberdinengatik, zure alaitasunagatik eta lanean guztien eredu izateagatik. A Elena, gracias porque aunque no hemos coincidido tanto en el tiempo, la confianza que me has transmitido ha hecho que seas uno de los principales apoyos en el departamento en estos duros meses. A Bárbara, gracias por ser “Barbi”, por tu amistad, tus consejos, tus continuas muestras de cariño y por tu locura contagiosa capaz de animar a cualquiera. A Álvaro, gracias por ser la clase de persona que gana importancia cuando uno más lo necesita, por tus continuos consejos científicos, por transmitirme tu entusiasmo por la ciencia. A Vero,

gracias por ser “una más” de la cuadrilla en un tiempo record!, pero sobre todo por seguir siéndolo.

Siempre hay gente a la que cuesta más expresar con palabras tu agradecimiento por todo lo vivido todo este tiempo. Por eso, a medida que voy avanzando, esto es cada vez más difícil... Lur, gracias por sorprenderme, mucho y para bien. Por ofrecerme tu apoyo, tu alegría pero sobre todo por ser alguien en quien confiar siempre. Ya sólo me faltan las dos galleguiñas... Marta, gracias por todo, que es muchísimo, por estar siempre ahí, por darme tu confianza, tu amistad, hasta por olvidarte de las células y a veces por tu mala leche también! A Lucía, gracias por ser la del ordenador de al lado, con la que al final compartes trabajo, amistad, confidencias, alegrías, penas, en definitiva todo lo que se puede compartir con una amiga.

Turno para el aire nuevo del departamento! María, gracias por ese punto de vista químico necesario y desquiciante a la vez! (jajaja), espero que encuentres en Alemania o donde sea ese postdoc que ahora yo también busco! Manu y Xabi gracias por ser mis compañeros de cuartito en los meses más duros de esta tesis y por vuestros puntos de humor. Os deseo todo lo mejor, Manu en Estocolmo y Xabi con los cometas en toxí. Merche, gracias por tu disponibilidad para ayudarme siempre que lo he necesitado. Te deseo todo lo mejor en tu tesis.

También quisiera agradecer a todas aquellas personas que han pasado temporalmente por el departamento, masterianos, alumnos internos... Especialmente, gracias a Miguel por ser un miembro más del equipo en tan poco tiempo. Gracias, a Irene por tus conversaciones diferentes en el café y por tus muestras de interés.

Mi más sincero agradecimiento también a Rafael Franco y todos los integrantes de nuestro labo en CIMA, por sus sabios consejos y los extensos debates científicos que me han enseñado tanto. Especialmente a Ana, Susana, Carol, Marta y María, por la ayuda ofrecida en los experimentos que me ha tocado hacer en CIMA. June, Mila esker squash-eko raketa nola hartzen den gogorazteagatik...

Todos pertenecemos a un departamento pero yo he tenido la suerte de formar parte de otro, el departamento "CAFT", evidentemente no es porque yo sea muy majo (que también), ha sido gracias a una primera etapa de máster allí y después gracias a Laura y a su cuadrilla del depar. Por eso quiero agradecer a todo el departamento de "CAFT" la disponibilidad de los aparatos, la amabilidad recibida por parte de todos y hasta los planes en los que siempre me habéis incluido como uno más. Gracias a Adri, Tara, Ceci, Blanca, Esti e Itzi por ayudar a evadirme en muchos momentos, porque muchas veces hace falta. Quiero agradecer también a otras personas como Santi, Rodrigo o Patricia (compí de biblioteca) por vuestras muestras de interés desde que nos conocemos. Por último, quiero agradecer especialmente a Asun por estar siempre disponible para lo que sea, ya sea para descansar, trabajar o pedirle un favor.

A las chicas de bioquímica, Marina, María, Antonia, Sara y maider por tener tanta paciencia con nosotros los de farma y el dichoso revelador.

Quisiera agradecer también a mis amigos de la Carrera, a Mikel, Wito, Gutí, Ainhoa, Amaya y Palo porque aunque cada uno haya cogido un rumbo diferente tenemos la suerte de poder juntarnos de vez en cuando. Berezi ki Sergio eta Iosuri eskerrak eman nahi dizkizuet, eza gutu ginenetik hirukotea izan garelako, zuek bezelako lagunak esku bakar baten behatzekin zenbatu daitezkeelako. Gracias también a Salas por tu amistad y esas mediodías de Squash y largas charlas de todo.

No me puedo olvidar de mi cuadrilla de Donosti, agradezco a todos vuestro interés en algo que realmente es totalmente ajeno a vosotros, aunque cuando os hablo de animales, piscinas y plataformas os hace más gracia. Especialmente agradezco a Pablo y Juano porque sé que siempre que lo necesite estaréis ahí.

Zalantzarik gabe nere gurasoak, anaia eta familiak zerikusí handia dute lan honetan. Ez dakit nola eskertu zor dizuedan guztia. Hasiera baten karrerako 5 urteengatik, masterrakin beste urte t´erdí luzatuta. Gero tartean geratu ziren hilabete haiengatik, ze pazientzia!! Ban azkenean emaitza iritsi dela dirudi! Beti nere lana ulertzen sailatzeagatik, ta hortarako berriak

eskaneatu, deitu, edo zeoze egiteagatik. Arkaitz, mila esker Donostira juten naizenean beti plana eskaintzeagatik eta zure kuadrila neri irekitzeagatik. Aita lasai orain mendira gehiagotan jungo gea ta! Eskerrik asko Ama, Igandero lapurtzen ditudan taperrangatik eta beste mila gauzangatik MILA ESKER HIRUROI!! Nere bizitzako pertsonaik garrantzitsuenak zarete, bueno hemen behekoakin batea, bestela haserratuko zaigu...

Nire eskerrak beroenak beti aguantau behar nauen pertsonantzat doaz, Laura edo "ne Mattia". Suerte handia dudalako zurekin egoteaz, beti nerekin egoteagatik, tesi honetan pila bat laguntzeagatik, eman didazun maitasunagatik. Gure historiako zatirik polittinak oraindik iristeko daudelako, zuk askotan uste duzun baino gertuago. Eskerrik asko, bihotz bihotzez.

Gracias a todos vosotros he superado con éxito este reto, adentrarme en el mundo de la investigación, que empezó hace ya más de cuatro años y espero que tenga la oportunidad de seguir, ya que me hace crecer no solo como científico sino también como persona.

ESKERRIK ASKO ZUEN LAGUNTZAGATIK LAN HONETAN!

MUCHAS GRACIAS POR VUESTRA COLABORACIÓN EN ESTE TRABAJO!

Abreviaturas más empleadas

ADDLs: ligandos difusibles derivados del A β

AICD: fragmento carboxi-terminal intracelular de la proteína precursora del β -amiloide

ApoE: apolipoproteína E

APP: proteína precursora del β -amiloide

Arc: proteína asociada a citosqueleto regulada por actividad

A β : péptido β -amiloide

BACE1: β -secretasa

BDNF: factor neurotrófico derivado de cerebro

C83: fragmento carboxilo terminal de la proteína APP de 83 aminoácidos

C99: fragmento carboxilo terminal de la proteína APP de 99 aminoácidos

Cdk5: cinasa dependiente de ciclina 5

CEAFA: confederación española de asociaciones de Familiares afectados por la EA y otras demencias

CMS: estrés crónico suave

CS: estimulación cognitiva

DM: Diabetes Mellitus

EA: enfermedad de Alzheimer

EE: Enriquecimiento ambiental

FAD: enfermedad de Alzheimer de origen familiar

GR: receptor de glucocorticoides

GSK3 β : cinasa glicógeno sintasa 3 β

HPA: eje hipotálamo-pituitario-adrenal

HSP: proteínas de choque térmico

IDE: enzima degradante de la insulina

IMC: índice de masa corporal

JNK: cinasa N-terminal de la c-Jun

LTD: depresión sináptica a largo plazo

LTP: potenciación sináptica a largo plazo

MAP: proteína asociada a microtúbulos

MARK: cinasa reguladora de la afinidad de microtúbulos

MCI: deterioro cognitivo leve

MMP-7: Metaloproteasa de matriz 7

MWM: test del laberinto acuático de Morris

NGF: factor de crecimiento neural

NMDA: receptor N-metil-D-aspartato

NORT: test de reconocimiento de nuevo objeto

NT-3/4: neurotrofina-3/4

ONF: ovillo neurofibrilar

P75NTR: receptor de neurotrofina p75

PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno-1

PHF: filamentos helicoidales pareados

PI3K: fosfoinositol 3 cinasa

PI3P: fosfatidil-inositol-3-fosfato

PKA: cinasa dependiente de adenosín monofosfato cíclico tipo A

PKC: cinasa dependiente de adenosín monofosfato cíclico tipo C

PS: presenilina

PSD95: proteína 95 de la densidad postsináptica

pTau: Tau fosforilada

PVN: núcleo paraventricular

RNA_m: RNA mensajero

tPA: activador tisular del plasminógeno

Trk-A/B/C: receptor cinasa de tropomiosina tipo A/B/C

SNC: sistema nervioso central

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

Abbreviations in English

AD: Alzheimer's disease

ApoE: apolipoprotein E

APP: amyloid precursor protein

Arc: activity-regulated cytoskeleton-associated protein

A β : amyloid β peptide

BACE1: β -secretase

BDNF: brain derived neurotrophic factor

C83: APP carboxy-terminal fragment of 83 aminoacids

C99: APP carboxy-terminal fragment of 99 aminoacids

CMS: chronic mild stress

CNS: central nervous system

CS: cognitive stimulation

DG: dentate gyrus

EE: environmental enrichment

FAD: familial Alzheimer disease

HPA: hypothalamic–pituitary–adrenal

JNK: c-Jun NH₂-terminal kinase

LTD: long term depression

LTP: long term potentiation

MCI: mild cognitive impairment

mRNA: messenger ribonucleic acid

MWM: Morris water maze

NGF: nerve growth factor

NORT: novel object recognition test

NFT: neurofibrillary tangle

O.D.: optical density

PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1

PI3K: phosphoinositide 3-kinase

PSD95: postsynaptic density protein 95

Syn: synaptophysin

tPA: tissue plasminogen activator

WT: wild type

Índice

Capítulo I: Introducción	1
1. Enfermedad de Alzheimer	1
1.1. Epidemiología.....	2
1.2. Patogenia	4
1.2.1. Patología amiloide.....	6
1.2.2. Patología Tau.....	11
1.3. Tratamiento y estrategias terapéuticas	14
1.3.1. Inhibidores de la acetilcolinesterasa	15
1.3.2. Antagonistas NMDA.....	15
1.3.3. Terapias frente al péptido β -amiloide.....	16
1.3.4. Inhibidores de la fosforilación de Tau.....	19
1.3.5. Estrategias neuroprotectoras	19
1.4. Etiología	20
1.4.1. Enfermedad de Alzheimer familiar	20
1.4.2. Enfermedad de Alzheimer esporádica o de aparición tardía.....	21
- Factores de riesgo genéticos	21
- Factores de riesgo ambientales	22
2. Factores protectores en la enfermedad de Alzheimer	26
2.1. Alimentación, dieta y antioxidantes	26
2.2. Actividad física	27
2.3. Actividad intelectual, educacional u ocupacional. Reserva cognitiva.	29
3. Implicación de las neurotrofinas en la enfermedad de Alzheimer	30
3.1. Patología sináptica	31
3.2. Factores Neurotróficos	36
3.2.1. Síntesis y procesamiento	37
3.2.2. Efecto dual de BDNF (proBDNF vs mBDNF).....	37
3.3. Procesamiento Proteolítico de BDNF: Sistema PAI-1-tPA-Plasmina	39
Bibliografía	43
Capítulo II: Planteamiento y Objetivos	83
Capítulo III: Early cognitive stimulation compensates for memory and pathological changes in Tg2576 mice	91

Resumen	95
Abstract	96
1. Introduction.....	97
2. Material and Methods	98
2.1. Animals.....	98
2.2. Cognitive stimulation paradigm	99
2.3. Behavioral test.....	100
2.3.1. Nobel object recognition test (NORT)	100
2.3.2. Morris water maze (MWM)	100
2.4. Biochemical measurements	101
2.4.1. Protein extraction	101
2.4.2. Inmuno-blotting	102
2.4.3. Determination of β -amyloid levels.....	103
2.4.4. Amyloid plaque staning	103
2.5. Statistical analyses	103
3. Results	104
3.1. Effects of cognitive stimulation on memory and synaptic markers	104
3.2. Decreased soluble A β species but constant plaque burden in Tg2576 mice subjected to cognitive stimulation.....	109
3.3. Cognitive stimulation compensates for Tau pathology in Tg 2576 mice.....	112
4. Discussion	115
References	123

Capítulo IV: Altered PAI-1-dependent production of mature BDNF by β -amyloid affects neuron viability and cognitive function 131

Resumen	133
Abstract	134
1. Introduction.....	135
2. Material and Methods	137
2.1. Reagents and antibodies.....	137
2.2. Primary cultures of cortico-hippocampal neurons.....	138
2.3. Animals.....	138
2.4. Studies in human tissue	139

2.5. Cognitive stimulation paradigm	139
2.6. Biochemical measurements	140
2.6.1. Protein extraction	140
2.6.2. Immuno-blotting	140
2.7. MTT cell viability assay.....	140
2.8. Statistical analyses	141
3. Results	142
3.1. A β alters BDNF production and expression of enzymes involved in BDNF maturation “ex vivo”.....	142
3.2. A β -induced of neuronal PAI-1 is JNK/c-jun dependent.....	145
3.3. Selective inhibition of PAI-1 normalizes A β ₂₅₋₃₅ -induced impairments of BDNF.... maturation mediated by tPA-Plasmin	156
3.4. PAI-1 inhibition protects neurons against A β -induced neurotoxicity in an mBDNF dependent manner.....	148
3.5. A paradigm of cognitive stimulation applied to Tg2576 mice prevents high levels of PAI-1 and restores the impaired BDNF maturation.....	152
4. Discussion	154
References	159
Capítulo V: Discusión general	167
Bibliografía	179
Capítulo VI: Conclusiones.....	187

Capítulo I

Capítulo 1

Introducción

1. Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA), causa más frecuente de demencia, es una patología degenerativa cerebral irreversible producida por la pérdida gradual de neuronas, principalmente en el hipocampo y la corteza cerebral. Su etiología no es conocida con exactitud, a pesar de los intensos esfuerzos de la comunidad científica en este campo. La enfermedad puede tener una duración variable, pero generalmente se padece como media a lo largo de unos 10 años aproximadamente. La duración de la enfermedad y la poca eficacia mostrada por los tratamientos disponibles hasta el momento hace necesario el avance en las investigaciones en la EA. Por lo tanto, su mayor conocimiento se torna en necesidad social, más aún en la medida en que el número de ancianos en la sociedad aumenta, ya que la edad es el factor de riesgo más importante para padecer la enfermedad.

Clínicamente, la EA se caracteriza por un deterioro en las funciones cognitivas del paciente relacionado con el deterioro neuronal progresivo e irreversible. En las fases iniciales el paciente presenta trastornos en la memoria de hechos recientes y una incapacidad para realizar tareas cotidianas. Estas incapacidades avanzan progresivamente hacia el total deterioro de las funciones mentales, alteraciones de la personalidad, problemas de conducta e incapacidad para valerse por sí mismo. En fases avanzadas, los pacientes están desorientados y desconocen incluso a sus familiares más próximos. En las últimas etapas de la enfermedad, el enfermo no es capaz de valerse por sí mismo y depende totalmente de sus familiares y/o cuidadores, que deben enfrentarse diariamente a problemas como la desorientación, agitación, agresividad, depresión y otros síntomas como la pérdida de conciencia o dificultades en el lenguaje tanto hablado como escrito.

El nombre de esta patología tiene su origen en el Dr. Alois Alzheimer (1864-1915) (Figura 1), médico alemán que en 1906 atendió en su hospital de Frankfurt a una paciente de 51 años llamada Auguste D. que padecía una nueva enfermedad, caracterizada por gran parte de los síntomas enunciados anteriormente. Los síntomas fueron empeorando gradualmente, hasta tener alucinaciones y pérdida de numerosas funciones mentales. En el examen neuropatológico post-mortem del cerebro de



Fig. 1. Izda.: Alois Alzheimer (1864-1915). Dcha: Auguste D. (1850-1906).

esta mujer se detectaron en la corteza cerebral numerosas placas seniles (estructuras que previamente ya se habían observado en los cerebros de los ancianos, aunque en menor proporción) y ovillos neurofibrilares (ONFs), que fueron descritos por primera vez en la historia. Además, se observó una disminución del volumen cerebral total, pero de manera especial en la región cortical. Este trabajo se publicó en 1907 con el título "Ueber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde" ("Una enfermedad grave característica de la corteza cerebral"). La denominación del cuadro clínico como enfermedad de Alzheimer fue introducida, en 1910, por Kraepelin en la octava edición de su "Manual de psiquiatría".

Actualmente, la estimación del coste global de la demencia aumenta críticamente cada año de manera que en 2007 se registró un gasto de 315 billones de dólares, en 2009 aumentó a 422 billones de dólares y en 2011 fue de 604 billones de dólares americanos (Wimo y col. 2013). A pesar de la dificultad que entraña realizar previsiones fiables, se estima que el coste total de la demencia aumentará un 85% hasta 2030 (Wimo y col. 2013). El factor que determina en mayor medida los costes del gasto sanitario son los cuidados que precisa un paciente anciano discapacitado, que afectan no sólo al propio paciente sino a los familiares que cuidan del enfermo. Este gasto crece de forma exponencial a medida que la enfermedad progresa, por lo que cualquier terapia que consiguiese entorpecer la progresión de la enfermedad podría repercutir significativamente en los costes de la misma. Todo esto, unido a la ausencia de un tratamiento curativo eficaz para la enfermedad, justifica la necesidad de investigar sobre los procesos patológicos que se producen durante la misma, intentando así, con los conocimientos adquiridos, mejorar el diagnóstico precoz diferencial y determinar dianas terapéuticas que puedan fomentar el desarrollo de nuevos fármacos que constituyan un tratamiento curativo de la EA.

1.1.Epidemiología

La edad es el factor de riesgo más importante para sufrir EA (Jorm y Easteal 2000). De hecho, la EA es la principal causa de demencia en la población anciana siendo responsable del 60-80% de los casos (Grundman y col. 2013). Debido al progresivo envejecimiento de la población, la EA se ha convertido, a día de hoy, en uno de los grandes problemas sanitarios de la sociedad actual. Es ampliamente aceptado que existe un aumento

exponencial de las cifras de incidencia y prevalencia de la EA según la edad del paciente. De esta manera, su frecuencia se duplica cada 5-6 años a partir de los 65 años (Prince y col. 2013), de forma que se estima que el 13% de las personas mayores de 65 años y casi la mitad de los mayores de 85 años padece EA. Según las últimas estimaciones, un 0,5% de la población mundial (aproximadamente 35,6 millones) y más de 8 millones de europeos sufren la EA (Prince y col. 2013). Según el censo actualizado de 2010, se estima que 4,7 millones de personas mayores de 65 años padecían la EA, de los cuales 0,7 millones tenían entre 65 y 74 años, 2,3 millones entre 75 y 84 y 1,8 millones eran mayores de 85 años (Hebert y col. 2013). Según datos ofrecidos por la CEAFA (Confederación Española de asociaciones de Familiares afectados por la EA y otras demencias) en el día mundial del Alzheimer de 2012 (21 de septiembre), sólo en España la EA afectaba a más de 600.000 pacientes, cifra de afectados que aumenta hasta los 3,5 millones de personas si se tiene en cuenta a familiares y cuidadores. Si la situación actual no cambia, se teme que la incidencia de esta enfermedad aumente progresivamente hasta convertirse en una gran epidemia, sobre todo en los países desarrollados, de forma que se cree que el número de enfermos a nivel mundial puede llegar a los 66 millones para el año 2030 y a los 115 millones para 2050 (Brookmeyer y col. 2007; Bettens y col. 2013).

El género también ha sido demostrado como factor diferencial en la prevalencia de la EA, ya que se aprecia un riesgo mayor de padecer la enfermedad en las mujeres (en proporción aproximada de 3 a 1) (Carter y col. 2012), en particular entre la población mayor de 85 años. El hecho de que la esperanza de vida en mujeres es más alta, podría estar enmascarando este dato.

Entre un 1 y un 5% de los casos, la EA se considera de origen genético (“Enfermedad de Alzheimer familiar” o FAD en inglés), en el que la enfermedad generalmente se presenta a edades más tempranas. En estos casos la causa de la enfermedad es la presencia de ciertas mutaciones genéticas, que resultan ser suficientes para provocar las manifestaciones clínicas y patológicas de la enfermedad. Sin embargo, en un porcentaje muy elevado de los casos (95-99%) se desconocen la o las causas que producen la EA. Estos casos se denominan “EA esporádica o tardía”. La aparición de los síntomas se producen a edades avanzadas, a partir de los 65 años. La etiología de la EA esporádica es difusa y compleja y su aparición no está provocada por una única causa como desencadenante de la enfermedad. No en vano se han

descrito múltiples factores de riesgo y/o protectores, de carácter genético o ambiental, que afectan a la vulnerabilidad para padecer la enfermedad. Estos factores se desarrollarán en el punto 1.3. de la siguiente introducción.

1.2. Patogenia

Macroscópicamente, el cerebro post-mortem de un paciente de EA revela una marcada atrofia cerebral con respecto a cerebros no enfermos y pacientes con deterioro cognitivo leve (MCI, por sus siglas en inglés) que afecta, principalmente, a áreas cerebrales relacionadas con el aprendizaje y la memoria como el hipocampo, las cortezas temporal, parietal y frontal, y la amígdala (Figura 2). La mayor profundidad de los surcos cerebrales, que corresponde con una reducción en el volumen cerebral, está causada por una importante degeneración neuronal e hipofunción sináptica (Reiner y col. 2012).

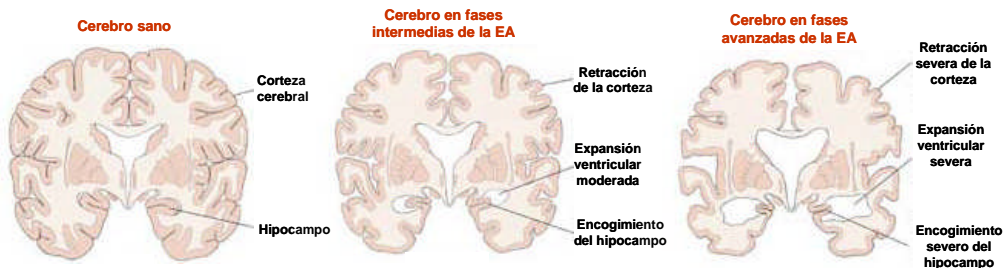


Fig. 2. Características macroscópicas de la EA, aumento de los surcos cerebrales debido a atrofia cerebral. Ilustración de Bob Morreale adaptada al castellano (American Health Assistance Foundation www.ahaf.org/alzheimers).

Histopatológicamente, la EA se caracteriza por dos marcadores neuropatológicos que tradicionalmente han sido utilizados para el diagnóstico post-mortem de la enfermedad y que se localizan principalmente en regiones cerebrales implicadas en procesos de aprendizaje y memoria (Selkoe 2004; Hardy 2006).

- **Placas seniles:** depósitos extracelulares compuestos principalmente por el péptido β -amiloide ($A\beta$) (Figura 3A).

- **ONFs, (o NFTs en inglés):** acúmulos filamentosos helicoidales intracelulares de proteína Tau hiper-fosforilada (Figura 3B).

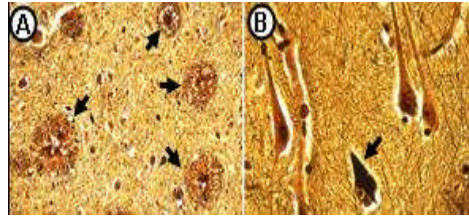


Fig. 3. Principales marcadores histopatológicos de la EA.

A) Placas seniles B) Ovillos neurofibrilares

En los cerebros de los pacientes con EA, los ONFs siguen unos patrones bien establecidos, de manera que aparecen ONFs en los primeros estadios de la enfermedad en la porción medial del lóbulo temporal, concretamente en la corteza entorrinal y en la región hipocámpal, lo cual se corresponde con un déficit de las funciones de aprendizaje y memoria. La presencia de los ONFs se extiende después a áreas asociativas y estructuras subcorticales a medida que avanza la enfermedad, lo que conlleva un avance del deterioro cognitivo del paciente. Sin embargo, las áreas motoras permanecen libres de éstos hasta estadios muy avanzados de la enfermedad (Braak y Braak 1995).

Sin embargo, la distribución de las placas seniles es más aleatoria, ya que, aunque también se localizan en áreas asociativas, su densidad es relativamente menor en regiones clínicamente relevantes como el hipocampo (Braak y Braak 1995), mientras que pueden ser muy abundantes en regiones clínicamente silentes (Arnold y col. 1991). En este sentido, estos últimos años existen numerosos estudios que restan importancia a la formación de placas seniles y otorgan un papel crucial a un estado conformacional anterior del péptido $A\beta$ (el estado conformacional oligomérico de $A\beta$), siendo los oligómeros los impulsores de la neurotoxicidad y neurodegeneración que provocan los síntomas de la enfermedad (ver punto 1.2.1.)

Además de la presencia de las placas seniles y ONFs, la otra característica principal de la EA es la pérdida significativa de neuronas y sinapsis en áreas vulnerables tales como regiones límbicas y corticales (Scheff y Price 2006). Esta pérdida neuronal y de sinapsis afecta especialmente a la comunicación interneuronal y a su eficacia, que se caracteriza histológicamente como una disminución de la densidad de espinas dendríticas (Crews y Masliah 2010; Ricobaraza y col. 2012). Este proceso favorece la aparición de los síntomas clínicos debido a la desconexión de las neuronas entre las distintas áreas cerebrales (Terry y

col. 1981). La disminución de la densidad de espinas dendríticas es el parámetro que más fuertemente correlaciona con el deterioro cognitivo (Cavallucci y col. 2012). Es interesante resaltar que estudios recientes han desvelado que los oligómeros de A β están correlacionados significativamente con la pérdida de espinas dendríticas y con el deterioro cognitivo (Lacor y col. 2007).

Además, diferentes grupos de investigación han puesto de manifiesto que en el hipocampo, la estructura cerebral más afectada en la EA, existe una correlación entre el número de ONFs en el espacio extracelular y el número de neuronas dañadas, postulando que la acumulación de Tau hiper-fosforilada en el interior de la neurona provocaría un fallo global en el funcionamiento celular y posterior muerte neuronal (Braak y col. 1994). La lisis celular sería por tanto la responsable de la liberación de los ovillos en el espacio extracelular (Smith 2002). En este sentido, cabe destacar que el número y la distribución de estos ovillos se correlacionan tanto con el grado de pérdida de neuronas y sinapsis como con el deterioro cognitivo en los pacientes (Buee y col. 2010).

Una de las principales teorías sobre las causas de la EA, descrita hace ya más de 20 años, es la “hipótesis de la cascada del amiloide”, que postula que el evento inicial que finalmente lleva a la neurodegeneración y a la demencia es el desequilibrio entre la producción y el aclaramiento del péptido A β (Glenner y Wong 1984; Hardy y Allsop 1991; Hardy y Selkoe 2002). Por otro lado, existe la teoría de que la hiper-fosforilación de Tau y la degeneración neurofibrilar son las responsables de los trastornos cognitivos que se producen en la EA (Iqbal y Grundke-Iqbal 2005). La patología sináptica también ha sido implicada en la génesis de la EA. En cualquier caso, las principales características patológicas de la EA (patología amiloide, patología Tau y patología sináptica) han dado lugar a diferentes teorías que intentan dar explicación de cuáles son las causas y consecuencias de la EA. Sin embargo, no se ha confirmado la validez de ninguna de ellas.

1.2.1. Patología amiloide

Los péptidos A β son producidos por el corte de la proteína precursora del amiloide (APP). La proteína APP es una proteína transmembrana ubicada a nivel celular cuya función no

está bien establecida, aunque se cree que juega un papel importante en el mantenimiento de la estructura axonal. Posee una porción intracelular pequeña que contiene el extremo carboxilo terminal (c-terminal), una región transmembrana y una porción extracelular relativamente larga (Figueiredo-Pereira y col. 1999) (Figura 4).

El procesamiento proteolítico de la APP puede seguir dos vías metabólicas opuestas (Figura 4):

- Procesamiento NO amiloidogénico: Es el procesamiento que mayoritariamente se da en condiciones no patológicas, donde la enzima α -secretasa corta la porción intermedia correspondiente a la región del péptido $A\beta$, concretamente en la Lys16, dando origen a una proteína larga que se compone de prácticamente toda la región extracelular de la APP y que es excretada al medio extracelular nada más ser cortada (α APPs), y un péptido de 83 aminoácidos denominado C83 (α -CTF) (Yamazaki y col. 1996). Este último es procesado posteriormente por acción de la γ -secretasa produciendo un péptido conocido como p3 y el fragmento C-terminal de la proteína precursora del amiloide (AICD, *amyloid precursor protein intracellular domain*) (Lammich y col. 1999). Se ha descrito que tanto el fragmento α APPs como el C83 poseen efectos beneficiosos en cultivos neuronales que se asocian a la supervivencia celular, interacción célula-matriz intersticial, crecimiento de neuritas, potenciación sináptica y plasticidad neuronal (Shivers y col. 1988; Jin y col. 1994; Perez y col. 1997; Meziane y col. 1998).

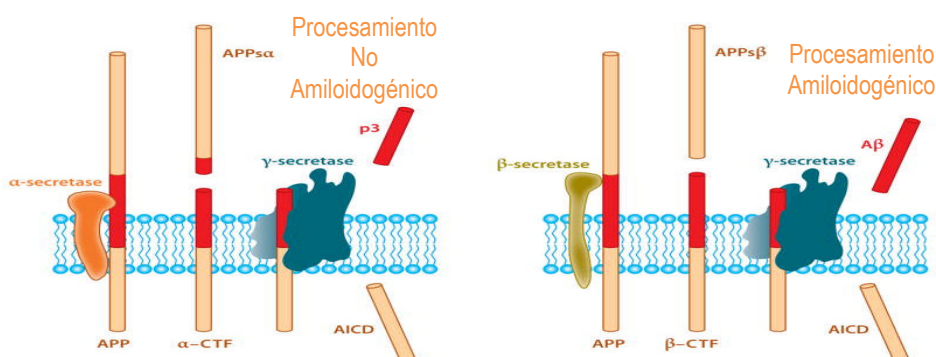


Fig. 4. Procesamiento de la APP. Procesamiento no amiloidogénico: la enzima α -secretasa corta la zona intermedia del péptido $A\beta$, formando una proteína que es excretada al medio extracelular (α APPs), y un péptido de 83 aminoácidos (C83 o α -CTF). Éste es procesado por la γ -secretasa produciendo el péptido p3 y el fragmento C-terminal del APP (AICD). Procesamiento amiloidogénico: La β -secretasa (BACE1) corta por el extremo amino terminal de la región del péptido $A\beta$, generando un fragmento (β APPs), y un péptido de 99 aminoácidos (C99 o β -CTF). Este fragmento sufre un nuevo corte por la γ -secretasa, generándose el AICD y el péptido $A\beta$ (Adaptado de O'Brien y Wong 2011).

- Procesamiento amiloidogénico: En el metabolismo amiloidogénico, la β -secretasa (BACE1) proteoliza el extremo amino terminal de la región del péptido $A\beta$, generando dos fragmentos: uno distal, que se segrega al medio extracelular, conocido como β APPs, y un péptido de 99 aminoácidos unido a la membrana denominado C99 (o β -CTF), que contiene todo el péptido $A\beta$ y el extremo carboxilo de la APP. Este fragmento es internalizado hasta llegar a los lisosomas donde sufre una nueva digestión proteolítica por la γ -secretasa, generándose un péptido de 55-57 aminoácidos (AICD) y el péptido $A\beta$, que puede variar entre 38 y 43 aminoácidos. En humanos, la especie mayoritaria de $A\beta$ es aquella que contiene 40 aminoácidos ($A\beta_{1-40}$) pero, aunque de manera minoritaria (10-15%), la γ -secretasa produce también péptidos de 42 aminoácidos ($A\beta_{1-42}$). En cambio, en determinadas mutaciones familiares de APP, la forma que se produce mayoritariamente es $A\beta_{1-42}$ (Sabbagh y col. 2008). En este sentido, se ha descrito que la relación entre $A\beta_{1-42}$ y $A\beta_{1-40}$ puede ser importante en la etiología de la enfermedad (Mayeux 2003; Wiltfang y col. 2007), ya que la neurotoxicidad inducida por $A\beta_{1-42}$ es mayor que $A\beta_{1-40}$. En las placas de β -amiloide y líquido cefalorraquídeo (CSF) se ha detectado además, la presencia de $A\beta_{1-38}$ (Moro y col. 2012) o $A\beta_{1-43}$ (Welander y col. 2009), más péptidos derivados del procesamiento amiloidogénico de la APP, cuya patogenicidad parece ser también importante en la EA (Sandebing y col. 2013).

Aunque hay una gran controversia en torno a la importancia de los fragmentos derivados de la APP en la patología, sí hay consenso en que el procesamiento amiloidogénico constituye el origen de una serie de alteraciones moleculares desencadenan los eventos patológicos.

Hipótesis de la cascada del amiloide

Según esta hipótesis, en la EA existe un desequilibrio entre la producción y el aclaramiento del péptido $A\beta$ que conduce a una acumulación de éste a nivel cerebral (Selkoe 1997; Sheng y Kim 2002). Esta acumulación conduciría a alteraciones patológicas como la neurotoxicidad, formación de ONFs, estrés oxidativo, inflamación y, finalmente, neurodegeneración (Wirhns y col. 2004)(Figura 5).

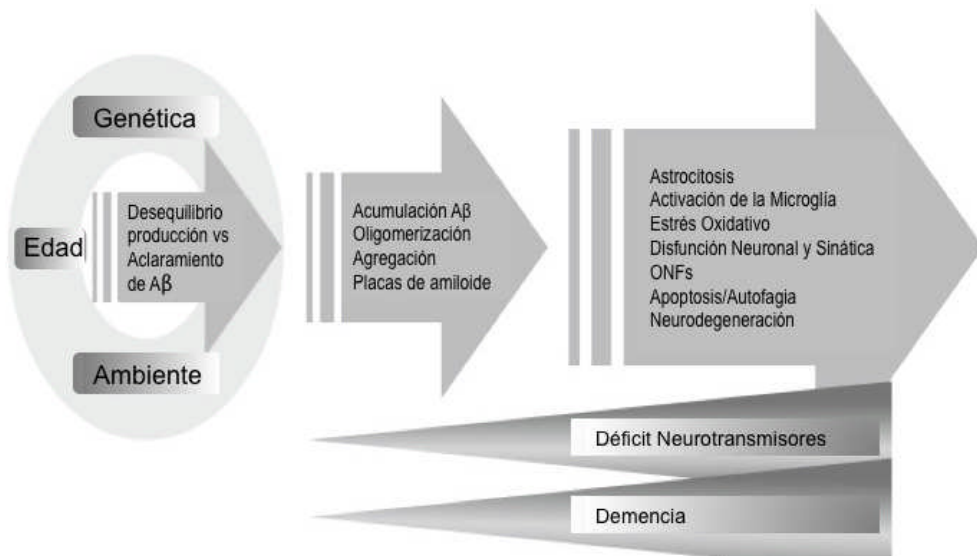


Fig. 5. Hipótesis de cascada del péptido β -Amiloide. Esta teoría presenta la patología amiloide como principal evento patológico de la EA. Son la acumulación, oligomerización y formación de placas de amiloide los que preceden a los eventos neuropatológicos descritos, que además vienen acompañados del déficit de neurotransmisores y de la demencia y deterioro cognitivo en los pacientes.

La hipótesis se sustenta en el componente genético de la EA, ya que se ha comprobado que las mutaciones que presentan los pacientes que padecen EA familiar, ya sea a nivel de la APP o de las presenilinas (proteínas que forman parte del complejo γ -secretasa), conducen a una mayor producción de $A\beta$, lo que conlleva una mayor presencia de oligómeros solubles en primer lugar, estructuras fibrilares insolubles a continuación y finalmente su acumulación en forma de placas de $A\beta$. Además, es conocido que el gen APP se encuentra en el cromosoma 21 del genoma y por ello personas con síndrome de Down (trisomía cromosoma gen 21 del genoma) desarrollan placas de amiloide a una edad muy precoz. También se ha observado en pacientes con EA familiar una duplicación en el locus de la APP (Rovelet-Lecrux y col. 2006). De todas formas, inicialmente se pensó que el $A\beta$ se producía sólo en pacientes de EA, sin embargo, más tarde se comprobó que se produce constitutivamente durante el metabolismo fisiológico celular no patológico (Haass y col. 1992). Por ello, en el caso de la EA de tipo esporádico se plantea que la acumulación de $A\beta$ se debe al déficit en la capacidad de aclaramiento del mismo (Hama y Saido 2005) y no a un aumento en su producción. En este punto es, según esta hipótesis, donde jugarían un papel relevante otros factores. De hecho, diversos estudios han puesto de manifiesto que en cerebros de pacientes afectados de EA se produce una alteración significativa de los mecanismos

encargados de la limpieza de proteínas anómalas tales como el péptido A β y la proteína Tau (Selkoe 2000). Los mecanismos fisiológicos implicados en la eliminación del péptido A β son diversos pero entre ellos se encuentran las endopeptidasas entre las que se encuentran la “enzima degradadora de insulina” o IDE (por sus siglas en inglés) (Behl y col. 2009), la neprilisina (Hemming y col. 2007) o la plasmina (Jacobsen y col. 2008) entre otras.

Durante mucho tiempo se creyó que sólo el A β depositado en placas, y no en forma de oligómeros o fibras, era neurotóxico, sin embargo, actualmente existen numerosos estudios que defienden el papel neurotóxico de fibras y oligómeros solubles (Zempel y col. 2010; Benilova y col. 2012; Eisenberg y Jucker 2012; Stroud y col. 2012). En este sentido, existen trabajos en los que se correlaciona positivamente el déficit cognitivo con el número de placas seniles y otros en los que no (Terry y col. 1991; Dickson y col. 1995; Sloane y col. 1997; Westerman y col. 2002). Lo que sí parece influir en el deterioro cognitivo es la cantidad total de diferentes péptidos A β en pacientes, tanto en forma de oligómeros solubles como en fibras (A β ₁₋₄₃, A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₂ y A β ₁₋₃₈) (Mayeux 2003; Wiltfang y col. 2007; Welander y col. 2009; Moro y col. 2012). Además, la disfunción neuronal, unido a déficits de memoria, aparece antes que la formación de placas (Buttini y col. 2002; Lee y col. 2004). Tanto fibras de A β ₁₋₄₂, como oligómeros difusibles del péptido (*A β -derived diffusible ligands*, ADDLs) también han demostrado tener efectos neurotóxicos y causar alteraciones en la función sináptica (Walsh y col. 2002; Cleary y col. 2005). También se ha publicado que los oligómeros solubles de A β podrían ser los responsables de la inhibición de la potenciación sináptica a largo plazo (LTP) (Walsh y Selkoe 2004). Se observó que el tratamiento con formas oligoméricas de A β en líneas celulares y en cultivos primarios conducía a la muerte celular, con lo que los oligómeros de A β ₁₋₄₂ podrían resultar mucho más tóxicos que los monómeros o el A β ₁₋₄₂ fibrilar (Dahlgren y col. 2002). Por todo ello, es cada vez más aceptado que son los oligómeros (dímeros, trímeros, dodecámero,...) y fibras de A β las responsables de la disfunción neuronal y del deterioro cognitivo que se producen en la EA (Thal y col. 2008; Broersen y col. 2010; Reed y col. 2011).

Por otro lado, la acumulación de A β detectada en la EA no es únicamente extracelular, sino que una parte queda atrapado en la neurona (Oddo y col. 2003; Echeverria y col. 2004; Wirths y col. 2004; Lord y col. 2006) (Figura 6). Esto ocurre porque la APP se localiza en

diversos compartimentos celulares, como en la membrana plasmática, en el aparato de Golgi, en el retículo endoplasmático, o en las membranas de endosomas, lisosomas y mitocondrias. Se puede procesar en cualquiera de esas localizaciones, liberándose el péptido A β directamente al espacio extracelular o al intracelular, donde se ha observado que se acumula más tempranamente que en el espacio extracelular (Billings y col. 2005). Además, la existencia de A β intracelular parece ser más relevante del que en un principio se pensaba (Gouras y col. 2005; LaFerla y col. 2007), ya que la acumulación intraneuronal es el factor de la patología amiloidogénica que mejor correlaciona con la neurodegeneración en la EA y con la aparición y severidad del déficit cognitivo que sufren diferentes modelos animales (Cruz y col. 2006; Knobloch y col. 2007; Lesne y col. 2008).

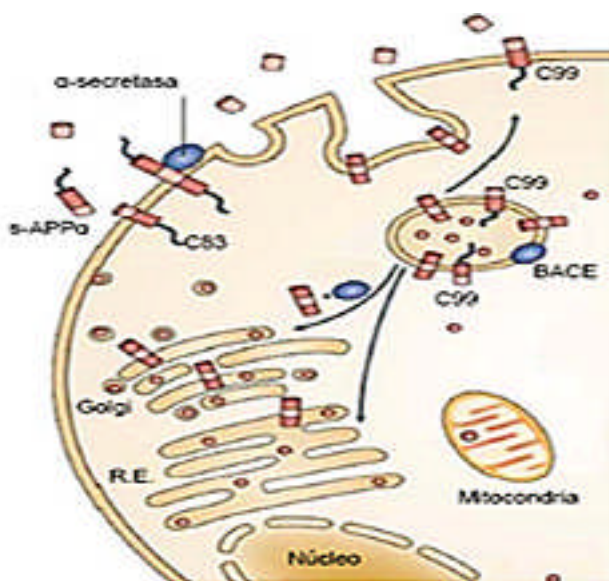


Fig. 6. Lugares de producción de A β . El APP se produce dentro del retículo endoplasmático (RE) y del aparato de Golgi. Una vez producido se dirige a la membrana celular, donde sufrirá el procesamiento amiloidogénico o no amiloidogénico. El APP no procesado se internaliza mediante endosomas. Estos endosomas contienen el enzima β -secretasa (BACE1), que cortará el APP para dar el fragmento C99. Este fragmento se transportará hasta el RE o la membrana celular, donde será procesado por la γ -secretasa para dar el A β , de manera que, tras ser producido, éste péptido podrá acumularse dentro de la célula en mitocondrias, RE, Golgi o en el citosol. (Adaptado de LaFerla y col. 2007).

1.2.2. Patología Tau

La proteína Tau pertenece a una familia de proteínas asociadas a microtúbulos (*microtubule-associated proteins*, MAPs) que se expresa de manera muy abundante en los axones neuronales. Su expresión en otros tipos celulares se limita a astrocitos y oligodendrocitos aunque en ínfimas proporciones. Está localizada en el citosol neuronal donde se une a la tubulina, entre otras proteínas, para la estabilización del citoesqueleto en los axones neuronales. Este hecho le confiere un papel fundamental en la formación y mantenimiento de

ramificaciones neuronales, concretamente en los axones. Se han publicado estudios en los que se afirma la presencia de Tau en exosomas en el espacio extracelular, lo que podría jugar un papel en la propagación de la patología (Saman y col. 2012).

Su grado de fosforilación determina su actividad, cuando está hiper-fosforilada no cumple su función fisiológica, provocando un colapso del sistema de transporte que conduce a una disfunción sináptica y a la muerte neuronal. Esta observación apoya la hipótesis “Tauísta”, la cual postula que esta proteína es la que desencadena toda la batería de efectos moleculares, que luego confluyen en deterioro cognitivo severo y pérdida de memoria (Mudher y Lovestone 2002). De acuerdo a este modelo, la hiper-fosforilación de Tau aumenta su tendencia a agregarse en forma de filamentos helicoidales pareados (*paired helical filaments*, PHF) (Morishima-Kawashima y col. 1995) que posteriormente acabarían dando lugar a los ONFs (Goedert y col. 1991). Esto conduce a la desintegración de los microtúbulos del citoesqueleto celular colapsando el sistema de transporte axonal de la neurona (Figura 7). En estas condiciones, puede darse inicio a las primeras disfunciones sinápticas y conducir finalmente a la muerte neuronal (Stokin y col. 2005; Chun y Johnson 2007). Además, Tau hiper-fosforilada es capaz de inhibir la acción de su forma fisiológica, así como la actividad de las proteínas asociadas a microtúbulos (MAP-1 y MAP-2), induciendo el desensamblaje de los microtúbulos (Alonso y col. 1997; Iqbal y Grundke-Iqbal 2005). Por último, la hiper-fosforilación de Tau parece conferirle resistencia a la proteólisis, lo que contribuiría a la acumulación de ésta en las neuronas con el consiguiente efecto tóxico (Shimura y col. 2004).

En el envejecimiento no patológico, los ONFs, aunque escasos, están presentes y se localizan fundamentalmente a nivel del sistema límbico. Sin embargo, en la EA el número aumenta significativamente y el patrón de localización se expande a zonas temporales medias en dirección a la corteza temporal y de ahí al resto de la corteza (DeKosky 2002).

El estado de fosforilación de una proteína depende del balance entre la actividad de las cinasas y fosfatasa. La proteína Tau puede ser fosforilada en unos 79 residuos de serina/treonina (Goedert y col. 1989). En la EA, al menos 30 de estos residuos se encuentran fosforilados (Gong y col. 2005) por dos tipos diferentes de cinasas: las dirigidas a serina como la cinasa 3 de la glicógeno sintasa (GSK3 β), la cinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5), p38 y la cinasa N-terminal de la c-Jun (JNK), así como las dirigidas a tirosina, como la cinasa

reguladora de la afinidad a microtúbulos (MARK), la cinasa II dependiente de Ca^{2+} /calmodulina tipo 2 (CaMKII) y la cinasa dependiente de adenosin monofosfato cíclico tipo A y C (PKA y PKC, respectivamente) (Morishima-Kawashima y col. 1995; Gong y col. 2005; Avila 2006). Parece ser que estas fosforilaciones a menudo regulan el grado de unión de Tau a los microtúbulos (Busciglio y col. 1995).

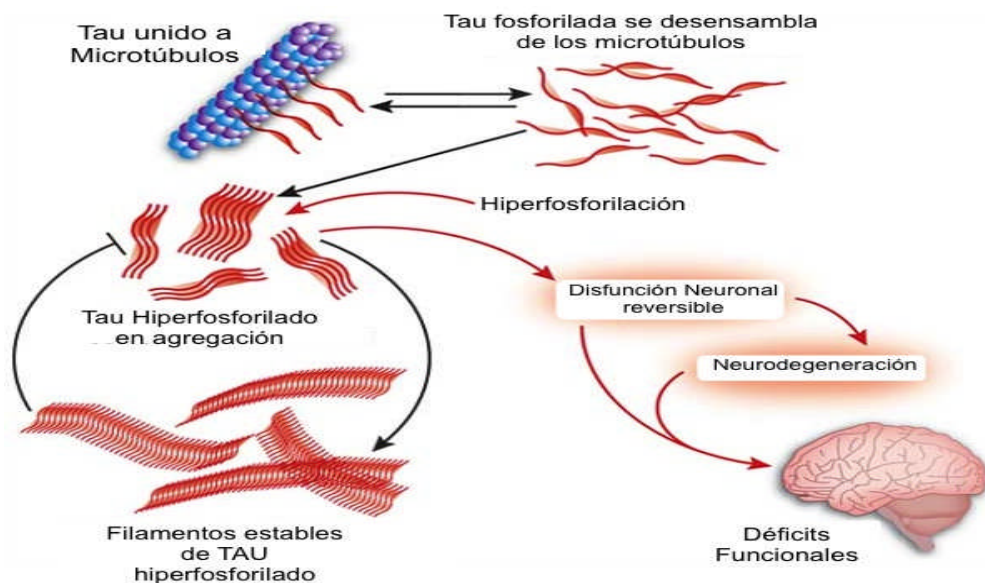


Fig. 7. Alteración de los microtúbulos derivada de la fosforilación de la proteína Tau. Cuando Tau se hiperfosforila se desensambla de los microtúbulos, que se desintegrarán, provocando el colapso el sistema de transporte de la neurona. La hiperfosforilación aumenta su tendencia a agregarse en forma de filamentos helicoidales pareados, que son capaces de enlazarse helicoidalmente formando los ONFs. (Adaptado de (Noble y col. 2005).

La vía de señalización de la fosfoinositol 3 cinasa (PI3K)/phospho-Akt/phospho-GSK3 β es una de las más importantes en la fosforilación de Tau. La PI3K es una proteína implicada en vías de señalización cruciales para la supervivencia celular en un gran número de células, entre las que se encuentran las neuronas (Brunet y col. 2001). El reclutamiento de PI3K a la membrana tras la activación de los correspondientes receptores induce su activación y la consiguiente producción de PI3P, que se une a la proteína Akt promoviendo su fosforilación (pAkt) y activación. pAkt es capaz de fosforilar la GSK3 β en el residuo Ser-9 provocando su inactivación (Yang y col. 2004). La inactivación de la GSK3 β evitaría la fosforilación de Tau mediada por esta cinasa.

La importante implicación de la cinasa GSK3 β en procesos patológicos que se producen en la EA, esporádica o familiar, ha llevado a postular la denominada “hipótesis de la GSK3 β ”. Su importancia es tal que su sobreexpresión provoca, además de la esperada hiperfosforilación de Tau (Hanger y col. 1992; Lovestone y col. 1994; Cho y Johnson 2003), un importante daño en la capacidad de aprendizaje y memoria (Hernandez y col. 2002; Hooper y col. 2007; Hooper y col. 2008), una exacerbación de la respuesta inflamatoria inducida por la microglía alrededor de las placas de amiloide (Rodionova y col. 2007) y la inducción de procesos pro-apoptóticos que conducirían a una pérdida neuronal (Turenne y Price 2001; Baki y col. 2004). Teniendo en cuenta estas consideraciones, GSK3 β se ha establecido como una posible diana terapéutica en la EA (Hooper y col. 2008; Sereno y col. 2009).

Finalmente, cabría destacar que la perspectiva “Tauísta” sugiere que aunque tanto A β como Tau contribuyen a la fisiopatología de la enfermedad, es ésta última quien principalmente produce el deterioro de estructuras y de las funciones neuronales. Sin embargo, se ha observado que cantidades elevadas de A β aumentan la formación de lesiones por Tau fibrilar en modelos animales de EA (Lewis y col. 2001; Oddo y col. 2003), lo que significaría que A β induciría la hiperfosforilación de Tau, pero sería esta última la que promovería el desarrollo de cascadas neurodegenerativas. No obstante, el nexo entre A β y la patología Tau sigue aún sin esclarecerse de manera definitiva.

1.3.Tratamiento y estrategias terapéuticas

Mientras que el diagnóstico de EA se realiza con cierta certeza en la actualidad, el tratamiento de la enfermedad dista mucho de ser curativo. La mayor parte de las investigaciones centradas en encontrar nuevos tratamientos para la EA parten de las patologías amiloide y Tau principalmente. Aunque en menor proporción, existen también potenciales tratamientos alternativos no basados en estas hipótesis. Hasta el momento actual, ningún tratamiento ha resultado efectivo.

Además de los utilizados para el tratamiento de las alteraciones conductuales como antidepresivos o ansiolíticos, los fármacos aprobados que en la actualidad se emplean para el tratamiento sintomático de la EA son:

1.3.1 Inhibidores de la acetilcolinesterasa

Actualmente se encuentran comercializados en España 3 de estos inhibidores: Galantamina, Rivastigmina y Donepezilo. Son los primeros fármacos que se utilizaron para el tratamiento de la EA. Se ha postulado que la degeneración de las neuronas colinérgicas, sobre todo en el prosencéfalo basal, causa una disminución de acetilcolina en las terminales presinápticas de hipocampo y neocórtex, lo que produciría alteraciones en la memoria (Terry and Buccafusco 2003). Los inhibidores de la acetilcolinesterasa aumentan la disponibilidad de acetilcolina en la hendidura sináptica al inhibir la enzima encargada de su degradación, lo que produce un aumento de la función colinérgica de los pacientes de EA.

Este tipo de fármacos se utiliza principalmente como tratamiento a largo plazo sintomático de la EA. Las evidencias derivadas de ensayos clínicos (Lopez y col. 2002) y de imagen sugieren que los inhibidores de la colinesterasa podrían también reducir el procesamiento de APP y proporcionar una cierta neuroprotección (Francis y col. 2005; Mori y col. 2006).

1.3.2. Antagonistas NMDA

La memantina es un antagonista débil y no competitivo del receptor de NMDA. En condiciones normales, el glutamato y el receptor NMDA juegan un papel importante en procesos de aprendizaje y memoria. Sin embargo, bajo condiciones patológicas, como en el caso de la EA, el aumento de la actividad glutamatérgica produce un exceso de la activación de los receptores de NMDA, lo que lleva a una disfunción neuronal. Existen otros antagonistas de los receptores NMDA con potencial explotación terapéutica, como neramoxane, que a pesar de que los resultados en ensayos pre-clínicos fueron esperanzadores, los ensayos clínicos de fase II no han reflejado una mejora significativa de los pacientes (Bannerman y col. 2004).

Por ello, las actuales terapias únicamente están dirigidas al tratamiento sintomático de la EA, no llegando a revertirla en ninguno de los casos. Sin embargo, en los últimos años, se han dado avances que desentrañan con mayor precisión los mecanismos patogénicos de la enfermedad, lo que ha conllevado a un aumento de las estrategias para combatir la

enfermedad y una amplia gama de fármacos en fases clínicas. A continuación se describen las estrategias más importantes (Figura 8).

1.3.3. Terapias frente al péptido β amiloide

Una parte importante de las estrategias terapéuticas actuales para combatir la EA se centran en los marcadores patológicos de la enfermedad, A β y Tau hiper-fosforilada, alrededor de los cuales se han desarrollado numerosos fármacos que mediante mecanismos de acción diferentes podrían frenar el desarrollo de la enfermedad.

- Terapias de Vacunación e Inmunización

Estudios en modelos animales de EA han demostrado que con estas terapias disminuyen la amiloidosis cerebral de los pacientes (Bard y col. 2000; DeMattos y col. 2001). La primera inmunoterapia eficaz fue el compuesto AN1792, que mostró muy buenos resultados tanto en animales (Oddo y col. 2006) como en estudios de eficacia en humanos (Hock y col. 2003). Sin embargo, los efectos beneficiosos de esta terapia están mediados por la activación de la microglía, lo que provocó efectos adversos, como la activación de una respuesta inflamatoria que provocaba encefalopatías en algunos pacientes.

La inmunización activa mediante la administración de A β ₁₋₄₀ completo vía intranasal, obtuvo resultados satisfactorios tanto en animales (Weiner y col. 2000) como en humanos pero además sin la inducción de respuesta inflamatoria. Recientemente, algunas estrategias basadas en inmunización pasiva, como son los fármacos bapineuzumab y solanezumab, mostraron grandes expectativas en estudios pre-clínicos pero fueron denegados en fase III de ensayos clínicos (Grundman y col. 2013).

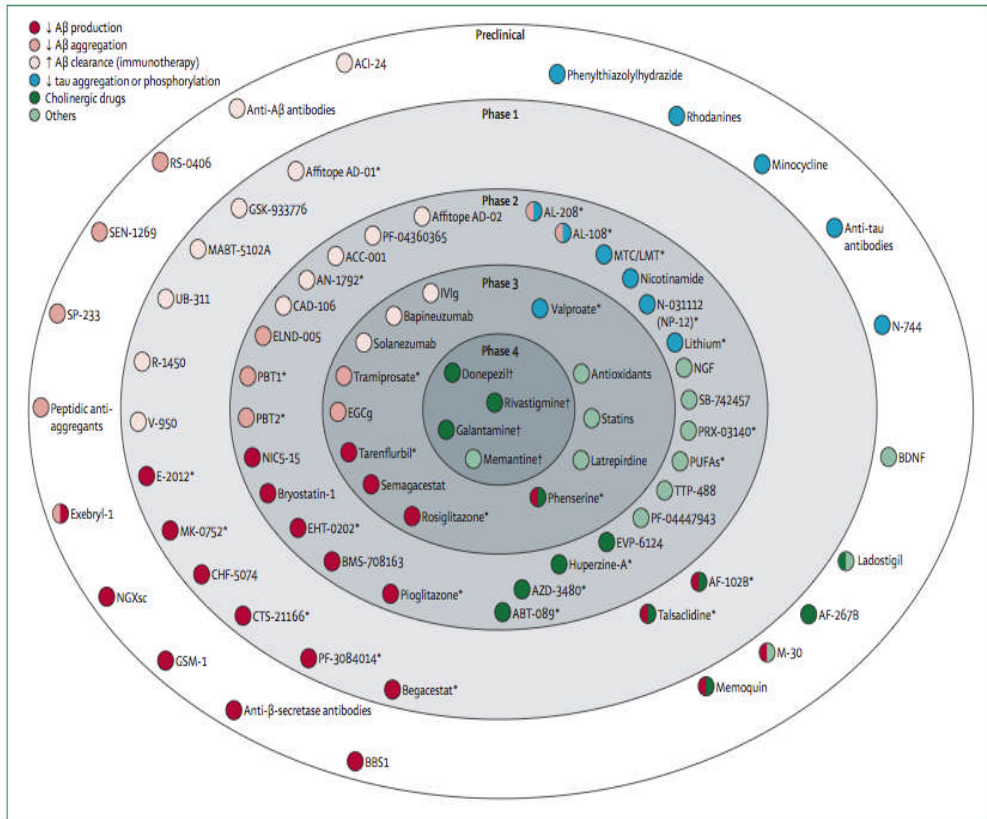


Fig. 8. Desarrollo farmacéutico de nuevos compuestos en la enfermedad de Alzheimer. Fármacos investigados para la terapia de la EA, en diferentes fases clínicas y preclínicas. Los únicos fármacos aprobados actualmente para la EA son la Galantamina, Rivastigmina, Donepezilo y la Memantina (Adaptado de Mangialasche y col. 2010).

- *Inhibidores de β - secretasas*

Se observó que ratones knockout de BACE1 no producen A β ni desarrollan un fenotipo clínico (Luo y col. 2001). Además, los inhibidores BACE1 disminuyen los niveles cerebrales de A β , lo que podría reducir la patología (Chang y col. 2004). En la actualidad existen nuevas moléculas en ensayos clínicos candidatas para el tratamiento de la EA, como el compuesto oral CTS-21166, que se encuentra en fase I (Mangialasche y col. 2010).

- *Inhibidores y moduladores de γ - secretasas*

No está clara la posible utilidad de los inhibidores de la γ -secretasa, ya que debido a su inespecificidad, actúan sobre otros sustratos como Notch (Wolfe 2008), pudiendo producir efectos adversos en el timo, bazo, o el tracto gastrointestinal, además

de en el sistema nervioso central (SNC). Sin embargo, aunque los nuevos inhibidores generados demostraron no afectar a la señalización de Notch (Petit y col. 2001) y poseer una buena tolerancia en ensayos clínicos en fase I (Siemers y col. 2005), fármacos como tarenflurbil han sido desestimados en fase II, al no mostrar mejora alguna en pacientes de EA (Borgegard y col. 2012).

Otros fármacos como Segamacestat y Avagacestat avanzaron hasta la fase III y II respectivamente, de los ensayos clínicos, sin embargo, en agosto de 2010 los resultados no fueron los esperados para el Segamacestat. El Avagacestat, mientras tanto, se rechazó en fase II a finales de 2012. Begacestat es también un candidato que se encuentran en fase II (Martone y col. 2009).

En cuanto a los moduladores de γ -secretasas, el más destacado es el CHF5074 que ha demostrado reducir el número de placas de amiloide y mejorar la memoria mediado por activación microglial. Se encuentra todavía en fase de experimentación.

- Fármacos antiagregantes de $A\beta$

Son fármacos que intentan inhibir el proceso de agregación de $A\beta$. El tramiprosato es un fármaco que evita la agregación manteniéndolo en estado no fibrilar y reduce la muerte inducida por $A\beta_{1-42}$ en cultivos neuronales (Gervais y col. 2007). Además, en animales redujo los niveles tanto de $A\beta_{1-42}$ como de $A\beta_{1-40}$ (Aisen y col. 2006). En humanos, se confirmaron los resultados de la fases pre-clínicas y no generó efectos adversos importantes. Este fármaco ha mostrado un retraso del deterioro cognitivo en los pacientes. Se encuentra en ensayos clínicos de fase III (Mangialasche y col. 2010).

Esta estrategia terapéutica podría ser especialmente relevante para los individuos que poseen $APOE\epsilon 4$ ya que este alelo precisamente acelera la agregación (ver punto 1.4.2 de la presente introducción).

1.3.4. Inhibidores de la fosforilación de Tau

Los candidatos que reducen la fosforilación de Tau al inhibir cinasas tales como Cdk5 y GSK3 β están en fases preclínicas. Sin embargo, la inhibición de una única cinasa podría no ser suficiente para normalizar la fosforilación de Tau, ya que ésta depende de múltiples cinasas (Avila 2006). El Litio es un potente inhibidor “*in vitro*” e “*in vivo*” de la GSK3 β y se ha comprobado que disminuye la fosforilación de Tau y que revierte déficits cognitivos en modelos animales de taupatías. Sin embargo, no se puede utilizar en humanos debido a su naturaleza tóxica (Noble y col. 2005). En la actualidad existen otros fármacos como el NP-12 o el TRX-0237 que se encuentra actualmente en reclutamiento de pacientes en ensayos clínicos de fase III (Panza y col. 2009).

Ante la naturaleza agregante de la proteína Tau, también se está investigando en torno a la inhibición de la agregación de la proteína, e incluso su desagregación una vez agregada, para lo cual, un mejor conocimiento del mecanismo de oligomerización y agregación de la proteína sería necesario.

1.3.5. Estrategias Neuroprotectoras

Las estrategias neuroprotectoras en enfermedades neurodegenerativas se basan en la potenciación de la función sináptica y en el capacidad de los factores neurotróficos de inhibir procesos apoptóticos. Sin embargo, la administración directa de factores neurotróficos no resulta eficaz ya que no atraviesan la barrera hemato-encefálica, por eso mantener o reestablecer los niveles endógenos de estos factores neurotróficos es aún más importante. La disminución de los niveles endógenos del factor de crecimiento nervioso (NGF) o del factor de crecimiento derivado de cerebro (BDNF) puede provocar los déficits cognitivos y pérdida de memoria (Chen y col. 1997). Un posible fármaco neuroprotector para la EA es el xaliproden. Se trata un compuesto no peptídico, que ha demostrado sus efectos neurotróficos en varios modelos de neurodegeneración “*in vivo*” e “*in vitro*” (Lapie y col. 1999). Sin embargo, los resultados en ensayos clínicos no fueron satisfactorios.

1.4. Etiología

La EA constituye una enfermedad con determinados síntomas y signos patológicos comunes. Sin embargo, tal y como ha sido descrito en el punto 1.1. de la presente introducción, sólo un pequeño porcentaje de casos de EA se considera de origen familiar o genético (FAD) y la mayor parte se consideran de origen esporádico.

1.4.1. Enfermedad de Alzheimer familiar

En la EA se han identificado 3 genes, en los que diversas mutaciones pueden provocar la enfermedad. De manera que la aparición de alguna de esas mutaciones en esos genes constituiría causa suficiente para la manifestación de los síntomas clínicos de la enfermedad. Las mutaciones afectan tanto a la formación del péptido amiloide como al proceso de oligomerización del mismo. Los 3 genes en los que se han encontrado mutaciones son los siguientes:

1. Gen que codifica APP, localizado en el cromosoma 21. Las mutaciones son de aparición autosómica dominante. De entre todas ellas destaca la mutación sueca, en la que se sustituyen 2 aminoácidos (lisina-metionina por asparagina-leucina) inmediatamente antes de la secuencia de la proteína amiloide. Generalmente, conllevan a un mayor procesamiento amiloidogénico del APP o a un aumento de la oligomerización del A β . La edad de aparición de la enfermedad es temprana, hacia los 40 años.
2. Gen que codifica la presenilina 1 (PS1), localizado en el cromosoma 14. Se conocen alrededor de 180 mutaciones en este gen causantes de la EA. La edad de aparición de la enfermedad en estos casos es también temprana.
3. Mutación en el cromosoma 1, en el gen que codifica la presenilina 2 (PS2). Se conocen alrededor de 15 mutaciones en este gen causantes de la enfermedad. La penetrabilidad de las mutaciones en este gen es más variable que en PS1, por lo que su edad de aparición también es más variable.

1.4.2. Enfermedad de Alzheimer esporádica o de aparición tardía

La etiología de la EA esporádica es mucho más difusa y compleja, no en vano se han descrito múltiples factores de riesgo y/o protectores, de carácter genético o ambiental, que afectan a la vulnerabilidad para padecer la enfermedad. Además de la edad, los principales factores de riesgo descritos hasta el momento son los siguientes:

- *Factores de riesgo genéticos:* La presencia de ciertos genotipos contribuye a un aumento de la susceptibilidad a la EA, pero no son suficientes por sí mismos para desarrollar la enfermedad. A la cabeza de este conjunto de factores genéticos aparece principalmente el polimorfismo para la apolipoproteína E (ApoE) (Cramer y col. 2012). En concreto, la variante alélica $\epsilon 4$ (ApoE $\epsilon 4$) es capaz de triplicar el riesgo de padecer la enfermedad en el caso de los heterocigotos y multiplicarlo por 15 en el caso de los homocigotos, respecto a los haplotipos ApoE $\epsilon 2$ y ApoE $\epsilon 3$ (Huang 2006). En los últimos años, el desarrollo de la técnica de “estudios de asociación del genoma completo” (GWAS en inglés) ha permitido confirmar que APOE $\epsilon 4$ aumenta el riesgo de padecer la enfermedad (Seshadri y col. 2010; Bettens y col. 2013) así como la identificación de nuevos genes que proporcionan susceptibilidad genética para padecer la EA. Entre ellos, destaca el gen de la Clusterina (CLU), gen que se asoció simultáneamente con la EA en dos estudios independientes (Harold y col. 2009; Lambert y col. 2009). Otros genes asociados con la EA serían CR1 (Biffi y col. 2012), PICALM, EPHA1, ABCA7 (Bettens y col. 2013) y SORL1 (Schellenberg y Montine 2012). Cabe destacar que, como ya se ha señalado anteriormente, la presencia o ausencia de estas mutaciones o variantes alélicas no es causa ni necesaria ni suficiente para que la enfermedad se manifieste, sino que aportan una susceptibilidad asociada a padecerla.

- Factores de riesgo ambientales:

Factores de riesgo vasculares:

- Hipertensión arterial: Diversos estudios han mostrado que la hipertensión arterial incrementa el riesgo de padecer EA (Hachinski y Munoz 1997). Existen, además, estudios clínicos que sugieren la posibilidad de que pacientes con hipertensión tratada presenten menos lesiones neuropatológicas de EA que los no tratados (Hoffman y col. 2009).

Sin embargo, existe una importante controversia en torno al carácter predictivo de la hipertensión arterial en etapas medias de la vida en la aparición de MCI, demencia o EA. De esta manera, existen estudios epidemiológicos que apoyan la hipertensión arterial como valor predictivo o clave en el desarrollo de la enfermedad (Qiu y col. 2009; Ninomiya y col. 2011; Joas y col. 2012) y otras que lo rechazan (Guan y col. 2011).

Se postula que la hipertensión produciría desmielinización isquémica (Tuhim y Levine 2002) y pérdida neuronal hipocampal (Kril y col. 2002), por lo que hay que considerar que la conexión entre hipertensión arterial y EA podría residir en la angiopatía amiloide que ésta produce (Vinters 2001; Greenberg 2002). Además, cabe destacar que en los últimos años se han descubierto en enfermos de Alzheimer y otras demencias (como la demencia vascular o la frontotemporal) pequeñas patologías vasculares o micro-hemorragias que podrían estar contribuyendo a la intensidad de los síntomas provocados por la enfermedad (De Reuck y col. 2012; Scheltens y Goos 2012).

- Enfermedad cardíaca: La enfermedad cardiovascular está asociada a un mayor riesgo de padecer EA, especialmente en personas con aterosclerosis (Newman y col. 2005). El fallo cardíaco y la fibrilación auricular también podrían estar asociados a la demencia.

- Enfermedad cerebrovascular o ictus: Los infartos cerebrales múltiples y recurrentes se han asociado a déficit cognitivo y a la aparición de EA (Purandare y col. 2006; Loitfelder y col. 2012).

Factores de riesgo metabólicos:

● **Hiperlipidemia, Hipercolesterolemia:** Diversos estudios sugieren que puede haber factores asociados con el metabolismo lipídico en la génesis o desarrollo del EA (Whitmer y col. 2005). Una cifra de colesterol elevado hacia los 50 años de edad es un factor de riesgo de MCI en edades más avanzadas, independientemente de su asociación o no a la hipertensión arterial (Kivipelto y col. 2005). Incluso se conoce la asociación de genes del metabolismo del colesterol, como ABCA1, con la EA (Akram y col. 2010). Además, algunos estudios en CSF sugieren que las alteraciones del colesterol y del 24S-hidroxi-colesterol, uno de los marcadores más importantes del metabolismo del colesterol en el cerebro, están asociados con la neurodegeneración y en particular con la acumulación de Tau hiper-fosforilada (Popp y col. 2013). En cuanto a los ácidos grasos, la ingesta moderada o elevada de grasas insaturadas se ha descrito como factor protector (Florent-Bechard y col. 2009), mientras que la ingesta moderada de grasas saturadas incrementa el riesgo de padecer EA (Kalmijn y col. 1997; Morris y col. 2003), sobre todo según la variante alélica ApoE del individuo (Laitinen y col. 2006). Estos ácidos grasos podrían conducir al desarrollo de la enfermedad por diversos mecanismos como la aterosclerosis, el estrés oxidativo o la inflamación.

● **Obesidad:** Se ha demostrado su relación con deterioro cognitivo y demencia (Trakas y col. 2001), quizá asociado a la relación que puede existir entre la obesidad y la enfermedad cardiovascular. Un alto índice de masa corporal (IMC) en la edad adulta se relaciona con un incremento en el riesgo de padecer demencia en la vejez (Kivipelto y col. 2005).

● **Diabetes:** Un gran número de investigaciones ha relacionado la demencia (Stewart y Liolitsa 1999), incluyendo la EA (Biessels y Kappelle 2005), con trastornos metabólicos particularmente con la hiperglicemia y la resistencia a la insulina (Steen y col. 2005; de la Monte y col. 2006). Los primeros estudios epidemiológicos realizados acerca de la relación entre insulina y EA señalan que individuos diabéticos tienen un 70% más de riesgo de desarrollar demencia y EA que los no diabéticos (Xu y col. 2007). Una elevada proporción de afectados por la

EA muestran altos niveles plasmáticos de insulina y baja utilización de glucosa, perfil que es característico de una resistencia a la insulina (Craft y col. 1999). La resistencia a la insulina periférica se ha relacionado además con pérdida de masa gris, atrofia cerebral y déficit cognitivo (Willette y col. 2013). Además de la resistencia a la insulina central, los niveles de insulina se encuentran disminuidos en el SNC en pacientes de EA (Gil-Bea y col 2010). Las similitudes en cuanto a resistencia insulínica periférica y central son tales que algunos autores han optado por renombrar la EA como una Diabetes Mellitus Tipo III (Vignini y col. 2013).

Finalmente, para concluir con los factores de riesgo metabólicos, cabe destacar que tras abordar la obesidad, la hipercolesterolemia y la diabetes por separado, el conocido Síndrome metabólico, que engloba estas 3 patologías, también se ha descrito como factor de riesgo en la EA (Watts y col. 2013).

Factores de riesgo relacionados con el estilo de vida:

- **Estrés:** Hay cada vez más estudios que demuestran una posible relación entre el estrés crónico, los acontecimientos vitales adversos o el estrés post-traumático y la predisposición para padecer EA. De hecho, el hipocampo, región cerebral muy afectada en la EA, es la estructura cerebral que más se ha relacionado con los efectos nocivos del estrés (Bremner y col. 2000; Sapolsky 2000). Se cree que los efectos adversos del estrés en esta región cerebral son mediados principalmente por los receptores de glucocorticoides de baja afinidad, ocupados por las hormonas adrenales que se encuentran en altas concentraciones en situaciones de estrés. En situaciones del estrés crónico, la alteración del eje Hipotálamo-Hipofisario-Adrenal (HPA) y por tanto de los niveles de cortisol se asocia con daño cerebral, con atrofia de las células piramidales de la región CA3 del hipocampo, y con un descenso en la neurogénesis de células granulares lo cual lleva a una reducción del volumen hipocámpal (Sapolsky 1996; McEwen 1999). Por ello, diferentes modelos animales de estrés han sido utilizados para el estudio de la EA como el estrés prenatal, la separación materna o el protocolo de estrés crónico suave. Finalmente, ha sido descrito que una situación de estrés crónico en animales

añosos causa deterioro cognitivo y un aumento en la patología sináptica y amiloide, un situación muy similar a lo que ocurre en la EA (Solas y col. 2010).

- Tabaco: El ser fumador en el momento de inicio de los síntomas de Alzheimer o el haberlo sido con anterioridad multiplica por cinco el riesgo de padecer la EA (Launer y col. 1999). Este riesgo puede estar modulado por el alelo $\epsilon 4$ de ApoE (McCaddon y col. 2002).

- Alcohol: El consumo excesivo de alcohol puede aumentar la probabilidad de padecer demencia (Anstey y col. 2009). Sin embargo, su consumo social puede ser beneficioso para el enfermo en las fases iniciales de la enfermedad (Ruitenber y col. 2002) o incluso puede tener una cierta acción protectora (Huang y col. 2002).

Inflamación:

En cerebros de personas ancianas sanas pueden aparecer pequeños signos de inflamación que podrían considerarse normales debidos a la edad de la persona. Sin embargo, en cerebros de EA la neuroinflamación es un claro signo patológico y molecular. La inflamación se constata en el cerebro como una fuerte activación de la población celular de la glía, compuesta por oligodendrocitos, astrocitos y células microgliales. Existen evidencias de que diferentes péptidos de naturaleza amiloide pueden activar tanto los astrocitos como la microglía (Hu y col. 1998). Esta activación mediaría, al menos en parte, la neurotoxicidad provocada por péptidos A β (Garwood y col. 2011). Diversos estudios han observado que la activación de astrocitos y de la microglía es diferencial según la forma en la que se presente el péptido A β (oligómeros, fibras y placas) tanto en modelos celulares (Sondag y col. 2009) y modelos animales de EA (Heneka y col. 2005) como en humanos (Cagnin y col. 2001). Además, existen trabajos que hacen referencia a la aparición de potentes procesos inflamatorios muy agudos alrededor de las placas seniles y ONFs, y que posiblemente estos procesos sirvan para el aclaramiento patológico (Lee and Landreth 2010). En los últimos años se viene postulando la hipótesis de que procesos neuroinflamatorios crónicos

favoren el desarrollo patológico y la aceleración de la aparición de los síntomas de la EA.

2. Factores protectores en la Enfermedad de Alzheimer

Los factores de riesgo son factores que podrían inducir una susceptibilidad adicional a padecer la enfermedad, pero existen también otros factores que podrían reducir esa susceptibilidad o incluso podrían participar en una posible prevención de la EA; son los denominados factores protectores. Estos factores podrían contrarrestar el efecto de ciertos factores de riesgo o bien actuar directamente sobre los signos patológicos de la EA. Los principales factores protectores descritos hasta el momento son la dieta, una alta actividad física, el desarrollo de las habilidades sociales y finalmente una alta actividad intelectual.

2.1. Alimentación, dieta y antioxidantes

Está bien asentada la base racional biológica del uso de antioxidantes en la prevención y tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas (Packer y col. 1999). Se han descrito acciones protectoras contra la EA de nutrientes como la vitamina E, vitamina C (Farina y col. 2012), ácido lipoico, coenzima Q10, glutatión, polifenoles (Choi y col. 2012) y algunos extractos de plantas (Hwang y col. 2012) en ocasiones ingeridas en solitario y en otras ocasiones en combinación con otras en forma de lo que se denominan dietas antioxidantes (Wiscott y col. 2001). Existen además, estudios en los que la dieta mediterránea muestra efectos beneficiosos en enfermedades que son factores de riesgo de la EA (Estruch y col 2013).

No obstante, también aquí hay necesidad de realizar estudios epidemiológicos prospectivos adecuados para aclarar el papel de la alimentación en el riesgo o protección frente a la EA.

2.2. Actividad física

La relevancia de la actividad física continúa estando a debate, debido a que muchos protocolos de actividad física también incluyen actividades de componente social y mental. De todas formas, en seres humanos se acepta que el ejercicio físico regular, incluso de baja intensidad (como caminar), está asociado a un menor riesgo de demencia y deterioro cognitivo (Larson y col. 2006).

Por lo tanto, una vida físicamente activa contribuye al correcto funcionamiento fisiológico del organismo, e incluso es capaz de atenuar o eliminar la aparición de algunas enfermedades que, como antes hemos apuntado, constituyen factores de riesgo en la EA, como la obesidad, la hipertensión o la hipercolesterolemia. Tanto estudios en animales como en humanos han demostrado que una actividad física moderada o alta tiene un efecto protector ante dichos factores de riesgo (Varady y Jones 2005).

A medida que se ha confirmado la implicación de los factores de riesgo en la mayor parte de los casos de EA, la actividad física ha conseguido paulatinamente ganar un mayor protagonismo en la protección ante el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, se ha estudiado que el ejercicio físico disminuye significativamente los microinfartos cerebrales (detectados en cerebros de EA) (Fernandes y col. 2012).

En los últimos años se ha intentado estudiar el efecto del ejercicio físico, tanto en humanos como en animales, en el riesgo de padecer demencia y EA (Radak y col. 2010). Para ello, se han utilizado protocolos que en la mayoría de los casos no se han limitado al ejercicio físico, sino que se han utilizado modelos de “enriquecimiento ambiental” (environmental enrichment en inglés, EE). Estos modelos utilizan toboganes, ruedas y otros juguetes, de manera que crean un ambiente enriquecido y fomentan el ejercicio físico (Sztainberg y Chen 2010) (Figura 9).



Fig. 9. Jaula empleada en los protocolos de Enriquecimiento Ambiental. Jaula dotada con los objetos necesarios para aplicar el protocolo de EE a los animales de experimentación. Consta de varios objetos, la mayor parte de los cuales pueden considerarse juguetes. En color rosa y en amarillo se observan dos ruedas gracias a la cual los animales realizarán ejercicio físico. El protocolo de EE emularía así los factores de ejercicio físico y el componente de ocio. Sin embargo, no emularía la estimulación cognitiva propiamente intelectual o educacional (Adaptado de Sztainberg y Chen 2010).

En modelos experimentales, los protocolos de EE han demostrado que la actividad física es capaz de atenuar o disminuir el déficit cognitivo y pérdida de memoria (Verret y col. 2013) inducida tras la administración de A β oligomérico (Li y col. 2013) o por el estrés de una separación materna (Xie y col. 2012). Además, el EE también disminuye significativamente los niveles de marcadores patológicos de EA (A β y Tau hiper-fosforilada) (Lahiani-Cohen y col. 2011; Maesako y col. 2012), aumenta la neurogénesis (Mustroph y col. 2012; Speisman y col. 2013) atenúa la inflamación (Stranahan y col. 2012), y todo ello podría contribuir a una mejora cognitiva en modelos animales de la EA (Maesako y col. 2012).

El mecanismo mediante el cual se produce esta mejoría no está claro hasta la fecha, pero parece ser que podría mediar la potenciación sináptica y la mejora de mecanismos de plasticidad sináptica. Los factores neurotróficos tendrían un papel fundamental en la potenciación y plasticidad sináptica y, de hecho, se han observado aumentos significativos en diferentes factores neurotróficos al aplicar este tipo de protocolos (Bechara y Kelly 2013; Birch y col. 2013; Fares y col. 2013).

La utilización de estos protocolos serían válidos para realizar emular un enriquecimiento social/físico de seres humanos. Sin embargo, en estos protocolos no se aborda la estimulación intelectual, educacional u ocupacional, factor de extrema relevancia en el estilo de vida de los seres humanos. Por eso, analizaremos este tipo de factores en el próximo apartado de la presente memoria.

2.3. Actividad intelectual, educacional u ocupacional. Reserva cognitiva.

Se había estudiado mucho la influencia de la educación, nivel de estudios o años de aprendizaje sobre la aparición o no de EA en la vejez pero, entre los factores de estilo y hábitos de vida, no se había prestado atención hasta hace poco a la participación de cada sujeto en actividades intelectuales y físicas durante su vida adulta. Al investigar estas actividades en términos de variedad e intensidad, pudo comprobarse que una mayor actividad se correspondía con menor riesgo de padecer EA (Danner y col. 2001).

Estudios epidemiológicos han sugerido que los individuos con mayor coeficiente intelectual, alta exigencia educacional, como podría ser una prolongada vida académica, el mantenimiento de un nivel ocupacional elevado, o la participación en actividades de ocio tienen un menor riesgo de desarrollar EA (Stern 2006) y otras demencias relacionadas, como la demencia frontotemporal o la esquizofrenia (Kontis y col. 2013).

Una alta actividad cerebral, debido a cualquiera de las razones expuestas anteriormente (actividad ya sea intelectual o física), podría estar potenciando las sinapsis neuronales, induciendo neurogénesis e incluso creando nuevas redes neuronales (van Praag y col. 2000; Brown y col. 2003). Podría también potenciar mecanismos de desarrollo y diferenciación neuronales, como factores neurotróficos (BDNF) (van Praag y col. 2000) confiriendo una resistencia natural a los eventos apoptóticos que sufren los cerebros de pacientes con enfermedades neurodegenerativas (Liu y col. 2013). Esta corriente de pensamiento se ha unificado con el término de “reserva cognitiva”.

La reserva cognitiva está condicionada por factores pasivos o genéticos (volumen cerebral inicial, número de neuronas en el desarrollo, etc...) y por la estimulación cerebral desarrollada a lo largo de la vida o reserva activa (alto nivel educacional, resolución de problemas diferentes en la vida cotidiana, etc...). Se postula que una mayor reserva cognitiva permitiría enmascarar durante más tiempo los síntomas de la EA y otras demencias manteniéndolos en un nivel subclínico (que no se manifiestan) (Stern 2012), por lo que constituiría un factor que retrasa la aparición de la enfermedad aunque el desarrollo patológico de la enfermedad se hubiera establecido igualmente (Figura 10).

Realmente, la mayor parte de las evidencias en torno a esta teoría provienen de estudios epidemiológicos. No existen estudios empíricos llevados a cabo en modelos experimentales que demuestren esta teoría, y mucho menos, no existen evidencias mecanísticas. Para estudiar los posibles efectos de un alta reserva cognitiva se debería inducir una estimulación cognitiva en modelos animales durante una etapa temprana en la vida.

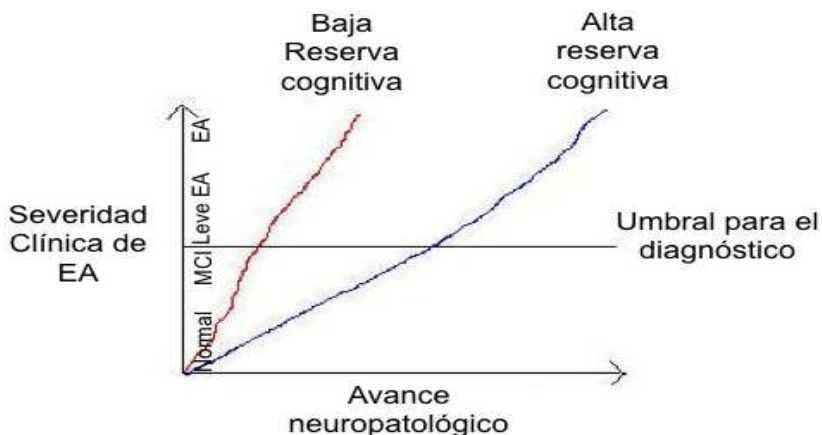


Figura 10. Implicaciones clínicas de la reserva cognitiva en pacientes de EA. Pacientes con baja reserva cognitiva podrían manifestarse como clínicamente dementes cuando la patología de EA es leve. Mientras que, con el mismo grado de patología, pacientes con una reserva cognitiva mayor serían clínicamente normales. En un grado de patología suficientemente alto ambos grupos aparecerían como clínicamente dementes. Aunque todavía en el grupo de alta reserva cognitiva la enfermedad se manifestaría con menor severidad, MCI= Deterioro cognitivo leve; EA= Enfermedad de Alzheimer. (Adaptado de Stern 2012)

3. Implicación de las neurotrofinas en la Enfermedad de Alzheimer

Uno de los principales signos patológicos de la EA junto con la patología amiloide y patología Tau es la pérdida de neuronas y sinapsis. Los factores neurotróficos o neurotrofinas son biomoléculas que juegan un papel clave en la potenciación sináptica y la supervivencia neuronal. Sin embargo, para cumplir las funciones neuronales son necesarias otras proteínas implicadas también en la sinapsis, sin las cuales la acción de los factores neurotróficos no serían suficientes. Por eso, en este apartado antes de centrarnos en la acción y papel en la

EA de los factores neurotróficos, se estudiará la implicación y las posibles consecuencias de esta pérdida y disfunción neuronal, bajo la denominación de patología sináptica.

3.1. Patología sináptica

La pérdida y disfunción sináptica, y la presencia de ONFs, son las características fisiopatológicas de la EA que mejor correlacionan con el grado de déficit cognitivo (Terry 2000). La degeneración sináptica que se produce en la EA se caracteriza por una degeneración progresiva de terminales axónicas (Scheff y col. 2007), una disminución en la expresión de proteínas pre y postsinápticas (Almeida y col. 2005; Ardiles y col. 2012), alteraciones en el número y estructura de espinas dendríticas (Blanpied y Ehlers 2004; Knobloch y Mansuy 2008). Esta pérdida sináptica pone en marcha multitud de mecanismos de compensación en las terminales axónicas para evitar en la medida de lo posible sus efectos negativos sobre la neurona y su comunicación con otras neuronas (DeKosky y Scheff 1990; Scheff y Price 1993; Scheff y col. 1993).

A pesar de que no están claros los mecanismos patológicos que conducen al daño sináptico en la EA, el A β parece jugar un papel clave. La acumulación del péptido A β intraneuronal parece ser uno de los principales responsables de la disfunción sináptica que se produce en la EA (Parodi y col. 2010), y que se correlaciona con el déficit en los fenómenos de aprendizaje y memoria que se observan en diferentes modelos animales de la EA (Westerman y col. 2002). Diferentes investigaciones han revelado que las formas solubles del mismo son capaces de deprimir la transmisión sináptica a través de mecanismos similares a la depresión a largo plazo (LTD), induciendo la fosforilación de los receptores glutamatérgicos tipo AMPA y su endocitosis (Hsieh y col. 2006).

A continuación se describen algunos de los marcadores de plasticidad sináptica que más consistentemente han sido relacionados con la patología de EA:

- Sinaptofisina

La liberación de neurotransmisores es un proceso altamente regulado y que comprende varios pasos: la dirección de las vesículas sinápticas a las zonas presinápticas activas, el anclaje de las vesículas a la membrana celular, la fusión entre la membrana vesicular y la plasmática y el reciclaje de la membrana vesicular (Sudhof 2000). Una de las proteínas claves y de las que más se expresa en este proceso es la sinaptofisina (Rehm y col. 1986). La sinaptofisina fue la primera proteína de vesícula sináptica clonada y desde su descubrimiento en 1985 (Wiedenmann y Franke 1985), muchos laboratorios la han usado como un marcador de neuroplasticidad que permite estudiar la distribución y el número de las sinapsis y/o la integridad general de la expresión de proteínas sinápticas. Sin embargo no se conocía su función exacta hasta que un estudio reveló que regula la cinética de endocitosis de las vesículas sinápticas (Kwon y Chapman 2011). Por lo tanto, se trata de una proteína clave en la liberación de neurotransmisores y como consecuencia también para procesos como LTP, aprendizaje y memoria. Además ratones “knockout” para esta proteína presentan una acentuada disminución de los procesos de plasticidad sináptica (Valtorta y col. 2004).

Diversos estudios han demostrado una pérdida de la proteína sinaptofisina en cerebros de EA (Wakabayashi y col. 1994; Love y col. 2006). Según lo observado, esta pérdida ocurre inicialmente en el giro dentado del hipocampo y se extiende a la corteza frontal a medida que avanza la enfermedad (Masliah y col. 1992).

- Proteína de la densidad post-sináptica PSD95

El A β juega un papel importante en el deterioro de los fenómenos de transmisión sináptica mediada por los receptores glutamatérgicos, ya que además de reducir su expresión, también es capaz de disminuir su internalización en membrana dificultando su estimulación tras la liberación presináptica de glutamato. Este fenómeno bloquearía las vías de señalización dependientes de los receptores glutamatérgicos NMDA y AMPA, que son esenciales para los procesos de aprendizaje y memoria.

PSD95 participa en los procesos de remodelación, maduración y plasticidad sináptica, regulando el reclutamiento y anclaje de las subunidades de los receptores glutamatérgicos (tanto NMDA como AMPA), orientándolos adecuadamente mediante

interacciones con proteínas del citoesqueleto, garantizando la correcta regulación de las vías de señalización activadas por ellos (Niell y col. 2004; Ehrlich y col. 2007) (Figura 11). Por tanto, PSD95 es esencial para la sinapsis y los procesos de plasticidad sináptica que implican cambios en la transmisión glutamatérgica como los asociados a fenómenos de aprendizaje y memoria. Por la estrecha relación entre el PSD95 y la función cognitiva, diversos grupos han estudiado la expresión de esta proteína en cerebros de EA y han observado una disminución de sus niveles tanto en la corteza como en el hipocampo de pacientes con MCI o EA (Love y col. 2006; Rukhsana y col. 2010).

- Receptores NMDA

En la sinapsis, iones como sodio (Na^+), calcio (Ca^{2+}), potasio (K^+) o magnesio (Mg^{2+}) juegan un papel fundamental (Li y Tsien 2009), por lo que es necesaria la presencia de canales iónicos que regulen el flujo de estas sustancias. Los receptores de NMDA se constituyen como complejos proteicos. Típicamente, el complejo receptor NMDA está formado por diferentes subunidades. Concretamente, 2 subunidades de tipo NR1 (tiene 8 subtipos) y otras 2 NR2 (tiene 4 subtipos). Las subunidades NR3 son menos comunes (Petralia 2012).

Funcionalmente son receptores ionotrópicos de glutamato. Esto permite el flujo de iones de Na^+ y Ca^{2+} (hacia dentro de la célula) y de K^+ (hacia fuera de la célula). La regulación del flujo iónico de Ca^{2+} en la sinapsis le otorga un papel fundamental en la plasticidad sináptica y por tanto en procesos de aprendizaje y memoria (Paoletti y Neyton 2007). Además, los receptores NMDA se caracterizan por ser receptores ligando-dependientes. Los ligandos que requieren estos receptores para su funcionamiento son el glutamato (con afinidad por las subunidades NR2), y serina o glicina (con afinidad por las subunidades NR1 o NR3) (Petralia 2012).

Tanto en modelos animales como en pacientes de EA los niveles de expresión de estas subunidades proteicas se encuentran disminuidos (Hynd y col. 2004; Thomas y col. 2006). Además, se ha observado que el péptido $\text{A}\beta$ inhibe la endocitosis y tráfico de las subunidades, afectando por tanto a la sinapsis (Durakoglugil y col. 2009).

- Arc

La LTP es un proceso esencial para el aprendizaje y la formación de la memoria (Bliss y Collingridge 1993; Martin y col. 2000). Para una LTP duradera es fundamental la expresión de mRNA y síntesis de nuevas moléculas que reorganicen la estructura y la composición molecular en el lugar de la sinapsis (Goelet y col. 1986; Sheng y Kim 2002; Pocklington y col. 2006). Para la consolidación de nuevas sinapsis es necesaria la expresión de nuevas proteínas, proporcionando mecanismos para convertir esa sinapsis en persistente. Se han identificado numerosos genes de activación temprana que podrían participar en esta función (Nedivi y col. 1993; Qian y col. 1993; Yamagata y col. 1993). De entre todos ellos, se ha observado que la inducción de la expresión de la proteína Arc (*activity-regulated cytoskeleton associated protein*) en las dendritas tras una estimulación es necesaria para el mantenimiento de la LTP (Link y col. 1995; Lyford y col. 1995; Kuhl y Skehel 1998).

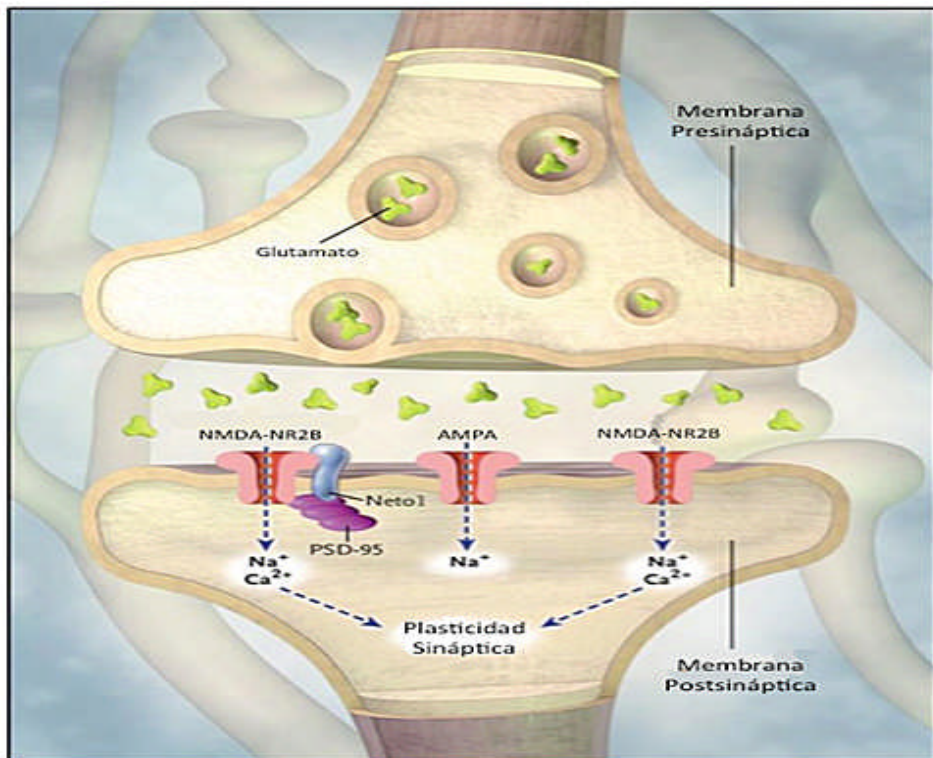


Fig. 11. Representación de la sinapsis. Se pueden observar algunas de las proteínas más importantes de la sinapsis. La terminal pre-sináptica es la representada en la parte superior, pudiéndose observar las vesículas glutamatérgicas. Mientras que la terminal post-sináptica es la representada debajo, donde se observa el complejo PSD95, así como los receptores NMDA y AMPA fundamentalmente. (Adaptado de (Ng y col. 2009))

La consolidación sináptica inducida por Arc depende de la actividad de los receptores NMDA de glutamato y de la cascada de señalización intracelular de las MAP kinasas (MAPK/ERK) (Waltereit y col. 2001). Es destacable también la relación directa existente entre los cambios en Arc y el procesamiento de información en el cerebro (Guzowski y col. 1999). Arc juega un papel importante en la formación de la memoria y, por ello, la expresión de esta proteína ha sido utilizada para describir las vías neuronales que permiten el procesamiento de la información, la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la consolidación de la memoria (Guzowski y col. 2001; Mahlke y Wallhauser-Franke 2004; Burke y col. 2005; Zou y Buck 2006). Además, se ha visto que en cerebros de EA, en concreto en las neuronas que contienen ONFs, los niveles de Arc disminuyen (Ginsberg y col. 2000), lo que podría estar dificultando la consolidación sináptica en estas neuronas.

- *Wnt/β-Catenina*

La función de la cascada de señalización de *Wnt* en la sinapsis ha sido ampliamente estudiada (Toledo y col. 2008). Su función comienza en el desarrollo cerebral (Ciani y Salinas 2005) y es también crucial para la LTP y la plasticidad sináptica en el cerebro adulto (Chen y col. 2006). Actualmente se conocen 19 ligandos *Wnt*. Cuando cualquiera de estos ligandos se une a su receptor, denominado "Frizzled", se produce la activación de la vía que culmina en la inactivación de GSK3β. Esta enzima, cuando está activa, a su vez fosforila y promueve la degradación de la proteína β-catenina, proteína que ancla el citosqueleto a la membrana celular. La inactivación de GSK3β evita la degradación de β-catenina, por lo que tiene un papel destacado en los procesos de plasticidad sináptica. Por el contrario, en ausencia de *Wnt*, los niveles de β-catenina disminuyen, debido a que se fosforila (mediante GSK3β y CK1) (Chen y col. 2000) y posteriormente se degrada en el proteosoma (Dale 1998; Logan y Nusse 2004).

La vía *Wnt* ha sido relacionada con muchas enfermedades neurodegenerativas como la esquizofrenia o la EA y enfermedades neuropsiquiátricas como el autismo (Moon y col. 2004). En cerebros de EA se ha encontrado una mayor actividad GSK3β y, como consecuencia, niveles disminuidos de β-catenina (Pei y col. 1999). También se observan niveles reducidos de esta proteína en cerebros de pacientes de EA que portan la mutación de la PS1 (Zhang y col. 1998). Diversos estudios también proponen la posible relación entre la

neurotoxicidad inducida por A β y unos menores niveles de β -catenina citoplasmáticos, sugiriendo que una pérdida sostenida de la función *Wnt* podría estar involucrada en la toxicidad neuronal observada en la EA (De Ferrari y Inestrosa 2000; Inestrosa y col. 2002).

- *Factores Neurotróficos (o Neurotrofinas)*

Este punto se desarrolla a continuación, en el punto 3.2. de la presente introducción.

3.2. Factores Neurotróficos

Las neurotrofinas son moléculas que pertenecen a la familia de los factores de crecimiento y se secretan a la matriz extracelular para promover la supervivencia, diferenciación y desarrollo celular (Bibel y Barde 2000). Existen diferentes factores neurotróficos como NGF, Neurotrofina 3 (NT-3), Neurotrofina 4 (NT-4) y BDNF. La principal diferencia entre los factores neurotróficos es la distribución tisular y el receptor mediante el que promueven sus efectos. En este sentido, todas ellas se unen de manera no selectiva al receptor p75NTR, aunque también se unen de manera selectiva a la familia de receptores Trk. En concreto, NGF se une a TrKA, BDNF y NT-4 se unen a TrkB y NT-3 tiene afinidad por TrkC.

Sin embargo, de entre todas las neurotrofinas, en este trabajo de investigación nos centraremos en BDNF, ya que destaca como regulador de la plasticidad sináptica, la supervivencia y diferenciación neuronal y por su amplia distribución en el SNC. Es también una diana clave para el desarrollo de nuevos tratamientos para enfermedades neurodegenerativas (McCaddon y col. 2001). Sin embargo, también cumple funciones importantes en el sistema periférico, como por ejemplo en el sistema cardiovascular (Tasci y col. 2012) o en los tejidos grasos (Cao y col. 2011).

En el SNC, BDNF es crucial para la transmisión dopaminérgica (Guillin y col. 2001), glutamatérgica (Carvalho y col. 2008) y serotoninérgica (Mossner y col. 2000). Además tiene un papel importante en la plasticidad sináptica, así como en procesos cognitivos y formación de nuevas memorias (Schinder y Poo 2000).

3.2.1. Síntesis y procesamiento.

BDNF se sintetiza inicialmente en el retículo endoplasmática como proteína precursora denominada proBDNF de 31 Kda, la cual sufre un corte proteolítico para formar bien una proteína de 28 Kda, llamada BDNF truncada, o bien BDNF maduro (mBDNF), una proteína de aproximadamente 13,5 Kda. mBDNF se obtiene a través del procesamiento proteolítico de proBDNF mediante proteasas como Furina, en el compartimiento Golgi (Mowla y col. 2001), y plasmina (Pang y Lu 2004) o la metaloproteasa 7 (MMP-7) (Lee y col. 2001) en el espacio extracelular. En condiciones fisiológicas, mBDNF se encuentra formando un dímero de unos 27 Kda (Carlino y col. 2012). Por otro lado, para obtener el fragmento de BDNF truncado, proBDNF es procesado por una proteinasa de membrana unida al factor de transcripción 1 (SKI-1) (Seidah y col. 1999). Esta isoforma de BDNF truncada no puede procesarse para dar mBDNF (Figura 12).

3.2.2. Efecto dual de BDNF (proBDNF vs mBDNF)

BDNF ha sido definido clásicamente como una molécula que promueve la supervivencia neuronal. Sin embargo estudios recientes demuestran que BDNF tiene una función dual, puesto que proBDNF es una biomolécula activa que puede desempeñar funciones biológicamente opuestas a mBDNF (Greenberg y col. 2009). Por otro lado, hasta el momento no se ha encontrado ninguna función específica para BDNF truncado, aunque ya existen estudios que aseguran que sus niveles e encuentran alterados en enfermedades neuropsiquiátricas (Dwivedi 2012).

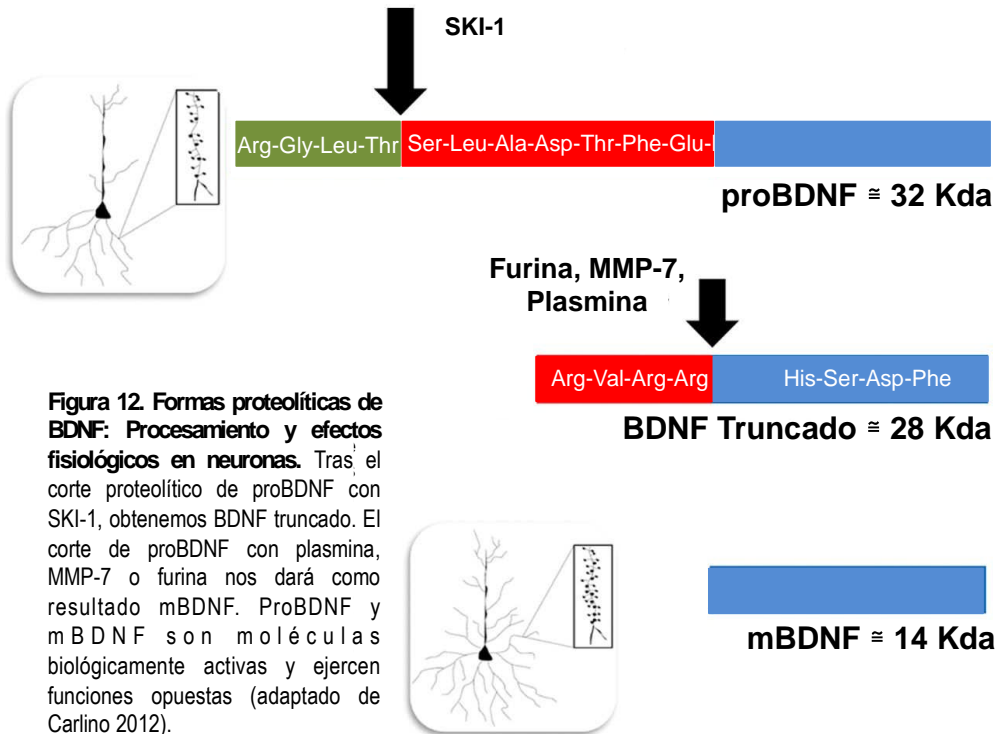
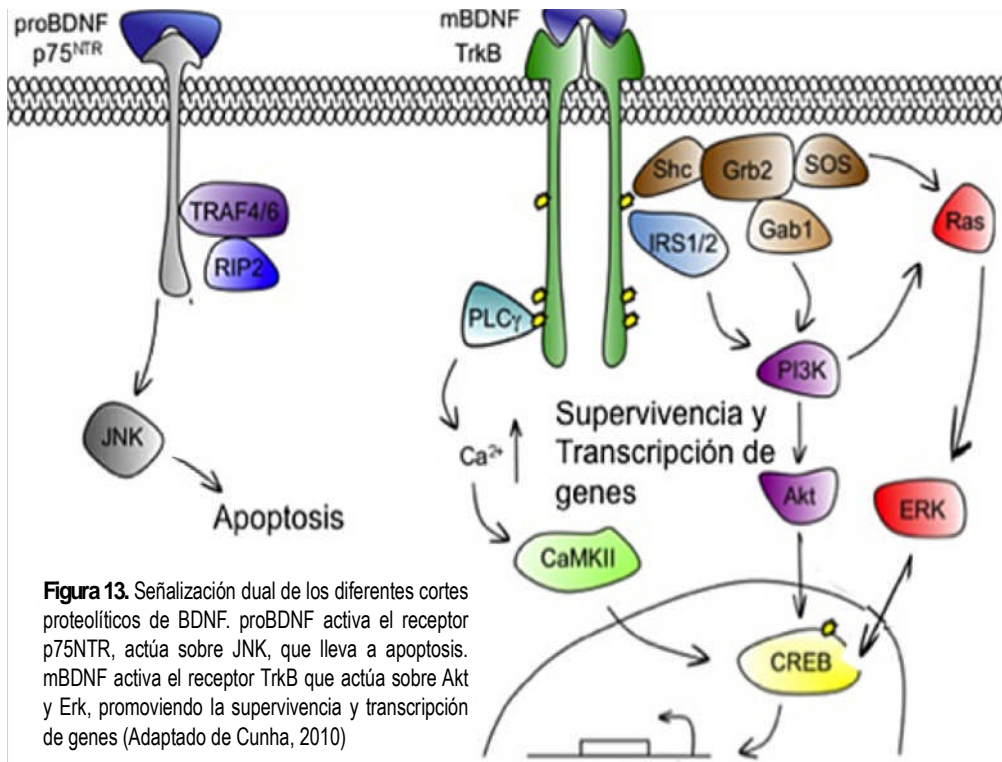


Figura 12. Formas proteolíticas de BDNF: Procesamiento y efectos fisiológicos en neuronas. Tras el corte proteolítico de proBDNF con SKI-1, obtenemos BDNF truncado. El corte de proBDNF con plasmina, MMP-7 o furina nos dará como resultado mBDNF. ProBDNF y mBDNF son moléculas biológicamente activas y ejercen funciones opuestas (adaptado de Carlino 2012).

El efecto dual de BDNF depende de los receptores a los que se unen estas moléculas. La unión específica de mBDNF a TrkB promueve efectos como la supervivencia celular e induce LTP tanto *in vitro* (Patterson y col. 1992) como *in vivo* (Costa-Mattioli y col. 2007; Raymond 2007). Sin embargo, la activación del receptor p75NTR debido a proBDNF o a altos niveles de mBDNF induce la activación de señales apoptóticas (Teng y col. 2005; Koshimizu y col. 2009) y procesos de LTD (Woo y col. 2005). Además, ha sido demostrada la asociación de LTP con el procesamiento de proBDNF a mBDNF (Scamuffa y col. 2006)(Figura 13).

En pacientes de EA y otras demencias, los niveles de mBDNF aparecen disminuidos en corteza prefrontal (Weickert y col. 2003; Peng y col. 2005), lo que podría preceder al deterioro cognitivo que presentan estos pacientes. Con respecto a los niveles de proBDNF, existen tanto estudios que mostraron niveles disminuidos como otros que no detectaron cambios (Weickert y col. 2003; Peng y col. 2005). Además, Wong y cols (Wong y col. 2010) describieron una correlación positiva de la edad con proBDNF y no con mBDNF.



En definitiva, el equilibrio de los niveles de las diferentes formas de BDNF es lo que determinará el efecto de esta molécula sobre el organismo, y por ello, el coeficiente entre mBDNF y proBDNF podría ser una variable fundamental a tener en cuenta.

3.3. Procesamiento proteolítico de BDNF: sistema PAI-1-tPA-Plasmina

El activador tisular del plasminógeno (tPA) es una proteína proteolítica que pertenece a la familia de las serin-proteasas y se expresa fundamentalmente en las células endoteliales. La función principal del tPA es la de promover la ruptura de los coágulos de fibrina en el endotelio vascular. Es por ello por lo que se utiliza en clínica para tratar enfermedades vasculares, como el infarto de miocardio, el ictus o isquemia cerebral.

La función clásica del tPA se desarrolla en el proceso de coagulación de la sangre. Específicamente, el tPA cataliza la conversión de plasminógeno a plasmina. Lo hace rompiendo la cadena única del plasminógeno en dos cadenas. Estas dos cadenas están unidas por un enlace disulfuro y la molécula resultante se denomina plasmina. Será ésta última la que rompa los coágulos de sangre o fibrina. Cuando el organismo sufre una lesión se

sintetiza y secreta el tPA para desbloquear la oclusión producida por la formación de un trombo.

La reducción de la actividad enzimática de tPA provoca hipofibrinólisis, lo que puede provocar una trombosis o embolismo al formarse coágulos de sangre. Sin embargo, el incremento excesivo de actividad enzimática provoca hiperfibrinólisis o falta de coagulación, que se manifiesta con hemorragias, principal efecto adverso del tratamiento con tPA recombinante, por lo que es muy importante la dosis y frecuencia con la que se administra. También se ha propuesto administrar tPA recombinante junto con otros tratamientos para optimizar sus efectos beneficiosos y minimizar sus efectos adversos, como terapia combinada con factores neurotróficos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), o proteasas como MMP-9 (Adibhatla y Hatcher 2008).

La plasmina, además de disolver los coágulos de fibrina, tiene otros sustratos sobre los que actúa, uno de ellos es proBDNF (Pang y col. 2004). Además, la propia proteína A β se ha postulado como sustrato de plasmina, con lo que podría ser un posible tratamiento de la EA debido a su poder de aclaramiento de A β (Jacobsen y col. 2008; Martorana y col. 2012).

Existen otros tipos de activadores del plasminógeno, como el uPA, pero la presencia de tPA es más generalizada en el SNC. Se ha encontrado una alta expresión de tPA durante el desarrollo cerebral embrionario, por lo que parece jugar un papel importante en la plasticidad sináptica.

La implicación de tPA en la modulación de los niveles de factores neurotróficos se ha estudiado en modelos "*in vitro*", en los que, por ejemplo, se han observado incrementos en la expresión de proteínas integrantes de las vías de señalización de neurotrofinas como PI3K/Akt o Raf/MEK/ERK (Lee y col. 2007). También se ha observado experimentalmente que el silenciamiento de tPA, al igual que el de BDNF, lleva a una inhibición de LTP y produce deterioro cognitivo (Pang y Lu 2004).

Por otro lado, estudios recientes han mostrado que en un elevado porcentaje de enfermos de EA se han detectado pequeños accidentes cerebrovasculares o microinfartos (De Reuck y col. 2012). En este sentido, en modelos animales de EA, la inactivación de tPA produce un aumento de los depósitos de fibrina, probablemente porque A β interactúa con la

fibrina e induce su oligomerización (Ahn y col. 2010), lo que se traduce en mayor daño neurovascular y neuroinflamación (Paul y col. 2007).

PAI-1 es una proteína que se secreta a la matriz extracelular y cuya función más importante es la de regular la coagulación y fibrinólisis mediante la inhibición de tPA. Pertenece a la superfamilia de los inhibidores de serin-proteasas (serin-protease inhibitor, o serpin, del inglés) por lo que también es conocida como serpine-1 o neuroserpina. La naturaleza de la unión entre ambos condiciona el efecto fisiológico de su inhibición, ya que la unión de PAI-1 y tPA se trata de una unión estable, promovida en primera instancia por un enlace covalente entre el extremo amino-terminal de la proteasa y la lámina β central de PAI-1. Esta unión induce grandes cambios conformacionales tanto en PAI-1 como en tPA. El resultado es la formación de un complejo proteico que inactiva tPA irreversiblemente (Shore y col. 1995).

Fisiológicamente, PAI-1 cumple otras funciones participando en procesos como la remodelación de la matriz extracelular, la angiogénesis (Teng y col. 2012) o adipogénesis y miogénesis a partir de células madre (Hadadeh y col. 2012).

Los niveles de PAI-1 están aumentados en patologías como obesidad (Kenny y col. 2013), la aterosclerosis (Meijer y col. 2012), el síndrome metabólico e inflamación (Yoshida y col. 2006), todas ellas patologías definidas como factores de riesgo de la EA. Sin embargo, PAI-1 también está aumentado en otras patologías como cáncer (Chorostowska-Wynimko y col. 2004).

En el SNC, PAI-1 aumenta sus niveles de expresión y la inhibición de tPA de manera muy significativa en casos de isquemia cerebral (Zhang y col. 1999). De hecho, un estudio revela la influencia del sistema PAI-1-tPA-Plasmina en modelos "*in vitro*" de daño cerebral (Kim y col. 2011). Otro trabajo reciente ha mostrado que la inhibición de tPA, mediante la formación del complejo tPA-PAI-1, potencia la patología vascular en un modelo murino de isquemia cerebral (Sashindranath y col. 2012). En pacientes con accidentes cerebrovasculares los niveles de PAI-1 están aumentados (Abdullah y col. 2009; Montaner 2009; Xin y col. 2010). Además se han descrito polimorfismos del gen que codifica la proteína PAI-1, que aumentan la susceptibilidad de padecer ictus (Lin y col. 2009; Balcerzyk y col. 2011; de Paula Sabino y col. 2011).

En pacientes de EA la funcionalidad del sistema PAI-1-tPA-Plasmina está disminuida. En concreto, los niveles y actividad de PAI-1 están aumentados, mientras que la actividad de tPA, y a su vez, plasmina, está fuertemente disminuida. Además de la actividad también disminuyen los niveles de tPA y plasmina en enfermos de EA (Fabbro y Seeds 2009). Estudios realizados en líquido cefalorraquídeo de pacientes con EA sugieren PAI-1 como posible diana terapéutica de la EA (Craig-Schapiro y col. 2011), mientras que otros estudios no han constatado los mismos resultados y no han detectado diferencias significativas en el sistema PAI-1-tPA-Plasmina en la EA, debido en parte a la dificultad de detectar plasmina en líquido cefalorraquídeo (Martorana y col. 2012).

El sistema PAI-1-tPA-Plasmina podría influir en la patología de la EA mediante 2 mecanismos de acción diferentes. En primer lugar, como ya ha sido descrito anteriormente, A β es sustrato de plasmina, por lo que la activación de PAI-1 inhibiría la formación de plasmina e imposibilitaría el aclaramiento de A β . En este sentido, se ha detectado que el silenciamiento de PAI-1 provoca una reducción de placas de amiloide en animales modelos de EA (Liu y col. 2011), induciendo además una importante mejora en la memoria espacial de estos animales (Fabbro y col. 2011). En segundo lugar, el sistema PAI-1-tPA-Plasmina podría favorecer el procesamiento de factores neurotróficos, como NGF (Allard y col. 2012) y BDNF (Hsu y Tsai 2010), aumentando la disponibilidad de la forma madura a partir de la precursora, al menos en modelos de estrés, como el modelo de estrés prenatal (Neeley y col. 2011). La acción del sistema PAI-1-tPA-Plasmina ejerce a través de mBDNF, los efectos beneficiosos tanto en plasticidad sináptica, diferenciación celular, como en LTP e incluso en memoria y cognición.

Por lo tanto, la modulación del sistema PAI-1-tPA-Plasmina podría considerarse una potencial diana terapéutica para el tratamiento de la EA y otras demencias relacionadas, más aún por su doble acción de aclaramiento de A β y potente inductor de factores neurotróficos.

Bibliografía

Abdullah, W.Z., Idris, S.Z., Bashkar, S. and Hassan, R. (2009). "Role of fibrinolytic markers in acute stroke." Singapore medical journal **50**(6): 604-609.

Adibhatla, R.M. and Hatcher, J.F. (2008). "Tissue plasminogen activator (tPA) and matrix metalloproteinases in the pathogenesis of stroke: therapeutic strategies." CNS & neurological disorders drug targets **7**(3): 243-253.

Ahn, H.J., Zamolodchikov, D., Cortes-Canteli, M., Norris, E.H., Glickman, J.F. and Strickland, S. (2010). "Alzheimer's disease peptide beta-amyloid interacts with fibrinogen and induces its oligomerization." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **107**(50): 21812-21817.

Aisen, P.S., Saumier, D., Briand, R., Laurin, J., Gervais, F., Tremblay, P. and Garceau, D. (2006). "A Phase II study targeting amyloid-beta with 3APS in mild-to-moderate Alzheimer disease." Neurology **67**(10): 1757-1763.

Akram, A., Schmeidler, J., Katsel, P., Hof, P.R. and Haroutunian, V. (2010). "Increased expression of cholesterol transporter ABCA1 is highly correlated with severity of dementia in AD hippocampus." Brain research **1318**: 167-177.

Allard, S., Leon, W.C., Pakavathkumar, P., Bruno, M.A., Ribeiro-da-Silva, A. and Cuervo, A.C. (2012). "Impact of the NGF maturation and degradation pathway on the cortical cholinergic system phenotype." The Journal of neuroscience **32**(6): 2002-2012.

Almeida, C.G., Tampellini, D., Takahashi, R.H., Greengard, P., Lin, M.T., Snyder, E.M. and Gouras, G.K. (2005). "Beta-amyloid accumulation in APP mutant neurons reduces PSD-95 and GluR1 in synapses." Neurobiology of disease **20**(2): 187-198.

Alonso, A.D., Grundke-Iqbal, I., Barra, H.S. and Iqbal, K. (1997). "Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**(1): 298-303.

Anstey, K.J., Mack, H.A. and Cherbuin, N. (2009). "Alcohol consumption as a risk factor for dementia and cognitive decline: meta-analysis of prospective studies." *The American journal of geriatric psychiatry* **17**(7): 542-555.

Ardiles, A.O., Tapia-Rojas, C.C., Mandal, M., Alexandre, F., Kirkwood, A., Inestrosa, N.C. and Palacios, A.G. (2012). "Postsynaptic dysfunction is associated with spatial and object recognition memory loss in a natural model of Alzheimer's disease." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**(34): 13835-13840.

Arnold, S.E., Hyman, B.T., Flory, J., Damasio, A.R. and Van Hoesen, G.W. (1991). "The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease." *Cerebral cortex* **1**(1): 103-116.

Avila, J. (2006). "Tau phosphorylation and aggregation in Alzheimer's disease pathology." *FEBS letters* **580**(12): 2922-2927.

Baki, L., Shioi, J., Wen, P., Shao, Z., Schwarzman, A., Gama-Sosa, M., Neve, R. and Robakis, N.K. (2004). "PS1 activates PI3K thus inhibiting GSK-3 activity and tau overphosphorylation: effects of FAD mutations." *The EMBO journal* **23**(13): 2586-2596.

Balcerzyk, A., Zak, I., Emich-Widera, E., Kopyta, I., Iwanicki, T., Pilarska, E., Pienczk-Reclawowicz, K., Kacinski, M., Wendorff, J. and Polatynska, K. (2011). "The plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphism in determining the risk of pediatric ischemic stroke--case control and family-based study." *Neuropediatrics* **42**(2): 67-70.

Bannerman, D.M., Deacon, R.M., Brady, S., Bruce, A., Sprengel, R., Seeburg, P.H. and Rawlins, J.N. (2004). "A comparison of *GluR-A*-deficient and wild-type mice on a test battery assessing sensorimotor, affective, and cognitive behaviors." *Behavioral neuroscience* **118**(3): 643-647.

Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R.L., Games, D., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Lieberburg, I., Motter, R., Nguyen, M., Soriano, F., Vasquez, N., Weiss, K., Welch, B., Seubert, P., Schenk, D. and Yednock, T. (2000). "Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter

the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease." Nature medicine **6**(8): 916-919.

Bechara, R.G. and Kelly, A.M. (2013). "Exercise improves object recognition memory and induces BDNF expression and cell proliferation in cognitively enriched rats." Behavioural brain research **245C**: 96-100.

Behl, M., Zhang, Y. and Zheng, W. (2009). "Involvement of insulin-degrading enzyme in the clearance of beta-amyloid at the blood-CSF barrier: Consequences of lead exposure." Cerebrospinal fluid research **6**: 11.

Benilova, I., Karran, E. and De Strooper, B. (2012). "The toxic Aβ oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes." Nature neuroscience **15**(3): 349-357.

Bettens, K., Sleegers, K. and Van Broeckhoven, C. (2013). "Genetic insights in Alzheimer's disease." Lancet neurology **12**(1): 92-104.

Bibel, M. and Barde, Y.A. (2000). "Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system." Genes & development **14**(23): 2919-2937.

Biessels, G.J. and Kappelle, L.J. (2005). "Increased risk of Alzheimer's disease in Type II diabetes: insulin resistance of the brain or insulin-induced amyloid pathology?" Biochemical Society transactions **33**(Pt 5): 1041-1044.

Biffi, A., Shulman, J.M., Jagiella, J.M., Cortellini, L., Ayres, A.M., Schwab, K., Brown, D.L., Silliman, S.L., Selim, M., Worrall, B.B., Meschia, J.F., Slowik, A., De Jager, P.L., Greenberg, S.M., Schneider, J.A., Bennett, D.A. and Rosand, J. (2012). "Genetic variation at CR1 increases risk of cerebral amyloid angiopathy." Neurology **78**(5): 334-341.

Billings, L.M., Oddo, S., Green, K.N., McGaugh, J.L. and LaFerla, F.M. (2005). "Intraneuronal Aβ causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice." Neuron **45**(5): 675-688.

Birch, A.M., McGarry, N.B. and Kelly, A.M. (2013). "Short-term environmental enrichment, in the absence of exercise, improves memory, and increases NGF concentration, early neuronal

survival, and synaptogenesis in the dentate gyrus in a time-dependent manner." *Hippocampus*. In press.

Blanpied, T.A. and Ehlers, M.D. (2004). "*Microanatomy of dendritic spines: emerging principles of synaptic pathology in psychiatric and neurological disease.*" *Biological psychiatry* **55**(12): 1121-1127.

Bliss, T.V. and Collingridge, G.L. (1993). "*A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus.*" *Nature* **361**(6407): 31-39.

Borgegard, T., Jureus, A., Olsson, F., Rosqvist, S., Sabirsh, A., Rotticci, D., Paulsen, K., Klintonberg, R., Yan, H., Waldman, M., Stromberg, K., Nord, J., Johansson, J., Regner, A., Parpal, S., Malinowsky, D., Radesater, A.C., Li, T., Singh, R., Eriksson, H. and Lundkvist, J. (2012). "*First and second generation gamma-secretase modulators (GSMs) modulate amyloid-beta (Abeta) peptide production through different mechanisms.*" *The Journal of biological chemistry* **287**(15): 11810-11819.

Braak, E., Braak, H. and Mandelkow, E.M. (1994). "*A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads.*" *Acta neuropathologica* **87**(6): 554-567.

Braak, H. and Braak, E. (1995). "*Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes.*" *Neurobiology of aging* **16**(3): 271-278.

Bremner, J.D., Narayan, M., Anderson, E.R., Staib, L.H., Miller, H.L. and Charney, D.S. (2000). "*Hippocampal volume reduction in major depression.*" *The American journal of psychiatry* **157**(1): 115-118.

Broersen, K., Rousseau, F. and Schymkowitz, J. (2010). "*The culprit behind amyloid beta peptide related neurotoxicity in Alzheimer's disease: oligomer size or conformation?*" *Alzheimer's research & therapy* **2**(4): 12.

Brookmeyer, R., Johnson, E., Ziegler-Graham, K. and Arrighi, H.M. (2007). "*Forecasting the global burden of Alzheimer's disease.*" *Alzheimer's & dementia* **3**(3): 186-191.

Brown, J., Cooper-Kuhn, C.M., Kempermann, G., Van Praag, H., Winkler, J., Gage, F.H. and Kuhn, H.G. (2003). "*Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis.*" *The European journal of neuroscience* **17**(10): 2042-2046.

Brunet, A., Datta, S.R. and Greenberg, M.E. (2001). "*Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway.*" *Current opinion in neurobiology* **11**(3): 297-305.

Buee, L., Blum, D., Bombois, S., Buee-Scherrer, V., Caillet-Boudin, M.L., Colin, M., Deramecourt, V., Dhaenens, C.M., Galas, M.C., Hamdane, M., Humez, S., Maurage, C.A., Pasquier, F., Sablonniere, B., Schraen-Maschke, S. and Sergeant, N. (2010). "*Molecular actors in Alzheimer's disease: which diagnostic and therapeutic consequences?.*" *Therapie* **65**(5): 401-407.

Burke, S.N., Chawla, M.K., Penner, M.R., Crowell, B.E., Worley, P.F., Barnes, C.A. and McNaughton, B.L. (2005). "*Differential encoding of behavior and spatial context in deep and superficial layers of the neocortex.*" *Neuron* **45**(5): 667-674.

Busciglio, J., Lorenzo, A., Yeh, J. and Yankner, B.A. (1995). "*beta-amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding.*" *Neuron* **14**(4): 879-888.

Buttini, M., Yu, G.Q., Shockley, K., Huang, Y., Jones, B., Masliah, E., Mallory, M., Yeo, T., Longo, F.M. and Mucke, L. (2002). "*Modulation of Alzheimer-like synaptic and cholinergic deficits in transgenic mice by human apolipoprotein E depends on isoform, aging, and overexpression of amyloid beta peptides but not on plaque formation.*" *The Journal of neuroscience* **22**(24): 10539-10548.

Cagnin, A., Brooks, D.J., Kennedy, A.M., Gunn, R.N., Myers, R., Turkheimer, F.E., Jones, T. and Banati, R.B. (2001). "*In-vivo measurement of activated microglia in dementia.*" *Lancet* **358**(9280): 461-467.

Cao, L., Choi, E.Y., Liu, X., Martin, A., Wang, C., Xu, X. and Durrant, M.J. (2011). "*White to brown fat phenotypic switch induced by genetic and environmental activation of a hypothalamic-adipocyte axis.*" *Cell metabolism* **14**(3): 324-338.

Carlino, D., De Vanna, M. and Tongiorgi, E. (2012). "Is Altered BDNF Biosynthesis a General Feature in Patients with Cognitive Dysfunctions?" *The Neuroscientist* : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry. In press.

Carter, C.L., Resnick, E.M., Mallampalli, M. and Kalbarczyk, A. (2012). "Sex and gender differences in Alzheimer's disease: recommendations for future research." *Journal of women's health* **21**(10): 1018-1023.

Carvalho, A.L., Caldeira, M.V., Santos, S.D. and Duarte, C.B. (2008). "Role of the brain-derived neurotrophic factor at glutamatergic synapses." *British journal of pharmacology* **153** Suppl 1: S310-324.

Cavallucci, V., D'Amelio, M. and Cecconi, F. (2012). "Abeta toxicity in Alzheimer's disease." *Molecular neurobiology* **45**(2): 366-378.

Chang, W.P., Koelsch, G., Wong, S., Downs, D., Da, H., Weerasena, V., Gordon, B., Devasamudram, T., Bilcer, G., Ghosh, A.K. and Tang, J. (2004). "In vivo inhibition of Abeta production by memapsin 2 (beta-secretase) inhibitors." *Journal of neurochemistry* **89**(6): 1409-1416.

Chen, J., Park, C.S. and Tang, S.J. (2006). "Activity-dependent synaptic Wnt release regulates hippocampal long term potentiation." *The Journal of biological chemistry* **281**(17): 11910-11916.

Chen, K.S., Nishimura, M.C., Armanini, M.P., Crowley, C., Spencer, S.D. and Phillips, H.S. (1997). "Disruption of a single allele of the nerve growth factor gene results in atrophy of basal forebrain cholinergic neurons and memory deficits." *The Journal of neuroscience* **17**(19): 7288-7296.

Chen, R.H., Ding, W.V. and McCormick, F. (2000). "Wnt signaling to beta-catenin involves two interactive components. Glycogen synthase kinase-3beta inhibition and activation of protein kinase C." *The Journal of biological chemistry* **275**(23): 17894-17899.

Cho, J.H. and Johnson, G.V. (2003). "*Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylates tau at both primed and unprimed sites. Differential impact on microtubule binding.*" *The Journal of biological chemistry* **278**(1): 187-193.

Cho, J.H. and Johnson, G.V. (2004). "*Primed phosphorylation of tau at Thr231 by glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) plays a critical role in regulating tau's ability to bind and stabilize microtubules.*" *Journal of neurochemistry* **88**(2): 349-358.

Choi, D.Y., Lee, Y.J., Hong, J.T. and Lee, H.J. (2012). "*Antioxidant properties of natural polyphenols and their therapeutic potentials for Alzheimer's disease.*" *Brain research bulletin* **87**(2-3): 144-153.

Chorostowska-Wynimko, J., Skrzypczak-Jankun, E. and Jankun, J. (2004). "*Plasminogen activator inhibitor type-1: its structure, biological activity and role in tumorigenesis (Review).*" *International journal of molecular medicine* **13**(6): 759-766.

Chun, W. and Johnson, G.V. (2007). "*The role of tau phosphorylation and cleavage in neuronal cell death.*" *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **12**: 733-756.

Ciani, L. and Salinas, P.C. (2005). "*WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity.*" *Nature reviews. Neuroscience* **6**(5): 351-362.

Cleary, J.P., Walsh, D.M., Hofmeister, J.J., Shankar, G.M., Kuskowski, M.A., Selkoe, D.J. and Ashe, K.H. (2005). "*Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function.*" *Nature neuroscience* **8**(1): 79-84.

Costa-Mattioli, M., Gobert, D., Stern, E., Gamache, K., Colina, R., Cuello, C., Sossin, W., Kaufman, R., Pelletier, J., Rosenblum, K., Krnjevic, K., Lacaille, J.C., Nader, K. and Sonenberg, N. (2007). "*eIF2alpha phosphorylation bidirectionally regulates the switch from short- to long-term synaptic plasticity and memory.*" *Cell* **129**(1): 195-206.

Craft, S., Asthana, S., Newcomer, J.W., Wilkinson, C.W., Matos, I.T., Baker, L.D., Cherrier, M., Lofgreen, C., Latendresse, S., Petrova, A., Plymate, S., Raskind, M., Grimwood, K. and Veith, R.C. (1999). "*Enhancement of memory in Alzheimer disease with insulin and somatostatin, but not glucose.*" *Archives of general psychiatry* **56**(12): 1135-1140.

Craig-Schapiro, R., Kuhn, M., Xiong, C., Pickering, E.H., Liu, J., Misko, T.P., Perrin, R.J., Bales, K.R., Soares, H., Fagan, A.M. and Holtzman, D.M. (2011). "*Multiplexed immunoassay panel identifies novel CSF biomarkers for Alzheimer's disease diagnosis and prognosis.*" *PloS one* **6**(4): e18850.

Cramer, P.E., Cirrito, J.R., Wesson, D.W., Lee, C.Y., Karlo, J.C., Zinn, A.E., Casali, B.T., Restivo, J.L., Goebel, W.D., James, M.J., Brunden, K.R., Wilson, D.A. and Landreth, G.E. (2012). "*ApoE-directed therapeutics rapidly clear beta-amyloid and reverse deficits in AD mouse models.*" *Science* **335**(6075): 1503-1506.

Crews, L. and Masliah, E. (2010). "*Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease.*" *Human molecular genetics* **19**(R1): R12-20.

Cruz, J.C., Kim, D., Moy, L.Y., Dobbin, M.M., Sun, X., Bronson, R.T. and Tsai, L.H. (2006). "*p25/cyclin-dependent kinase 5 induces production and intraneuronal accumulation of amyloid beta in vivo.*" *The Journal of neuroscience* **26**(41): 10536-10541.

Dahlgren, K.N., Manelli, A.M., Stine, W.B., Jr., Baker, L.K., Krafft, G.A. and LaDu, M.J. (2002). "*Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability.*" *The Journal of biological chemistry* **277**(35): 32046-32053.

Dale, T.C. (1998). "*Signal transduction by the Wnt family of ligands.*" *The Biochemical journal* **329** (Pt 2): 209-223.

Danner, D.D., Snowdon, D.A. and Friesen, W.V. (2001). "*Positive emotions in early life and longevity: findings from the nun study.*" *Journal of personality and social psychology* **80**(5): 804-813.

De Ferrari, G.V. and Inestrosa, N.C. (2000). "*Wnt signaling function in Alzheimer's disease.*" *Brain research reviews* **33**(1): 1-12.

de la Monte, S.M., Tong, M., Lester-Coll, N., Plater, M., Jr. and Wands, J.R. (2006). "*Therapeutic rescue of neurodegeneration in experimental type 3 diabetes: relevance to Alzheimer's disease.*" *Journal of Alzheimer's disease* **10**(1): 89-109.

de Paula Sabino, A., Ribeiro, D.D., Domingueti, C.P., Dos Santos, M.S., Gadelha, T., Dusse, L.M., das Gracas Carvalho, M. and Fernandes, A.P. (2011). "*Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G promoter polymorphism and PAI-1 plasma levels in young patients with ischemic stroke.*" *Molecular biology reports* **38**(8): 5355-5360.

De Reuck, J.L., Cordonnier, C., Deramecourt, V., Auger, F., Durieux, N., Bordet, R., Maurage, C.A., Leys, D. and Pasquier, F. (2012). "*Microbleeds in Postmortem Brains of Patients With Alzheimer Disease: A T2*-weighted Gradient-Echo 7.0 T Magnetic Resonance Imaging Study.*" Alzheimer disease and associated disorders. In press.

DeKosky, S.T. (2002). "[*Neurobiology and molecular biology of Alzheimer's disease*]." *Revista de neurologia* **35**(8): 752-760.

DeKosky, S.T. and Scheff, S.W. (1990). "*Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity.*" *Annals of neurology* **27**(5): 457-464.

DeMattos, R.B., Bales, K.R., Cummins, D.J., Dodart, J.C., Paul, S.M. and Holtzman, D.M. (2001). "*Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease.*" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(15): 8850-8855.

Dickson, D.W., Crystal, H.A., Bevona, C., Honer, W., Vincent, I. and Davies, P. (1995). "*Correlations of synaptic and pathological markers with cognition of the elderly.*" *Neurobiology of aging* **16**(3): 285-298; discussion 298-304.

Durakoglugil, M.S., Chen, Y., White, C.L., Kavalali, E.T. and Herz, J. (2009). "*Reelin signaling antagonizes beta-amyloid at the synapse.*" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**(37): 15938-15943.

Dwivedi, Y. (2012). *Brain-Derived Neurotrophic Factor in Suicide Pathophysiology. The Neurobiological Basis of Suicide.* Y. Dwivedi (Eds). Boca Raton (FL).

Echeverria, V., Ducatenzeiler, A., Dowd, E., Janne, J., Grant, S.M., Szyf, M., Wandosell, F., Avila, J., Grimm, H., Dunnett, S.B., Hartmann, T., Alhonen, L. and Cuervo, A.C. (2004). "*Altered mitogen-activated protein kinase signaling, tau hyperphosphorylation and mild spatial learning*

dysfunction in transgenic rats expressing the beta-amyloid peptide intracellularly in hippocampal and cortical neurons." *Neuroscience* **129**(3): 583-592.

Ehrlich, I., Klein, M., Rumpel, S. and Malinow, R. (2007). "*PSD-95 is required for activity-driven synapse stabilization.*" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(10): 4176-4181.

Eisenberg, D. and Jucker, M. (2012). "*The amyloid state of proteins in human diseases.*" *Cell* **148**(6): 1188-1203.

Fabbro, S., Schaller, K. and Seeds, N.W. (2011). "*Amyloid-beta levels are significantly reduced and spatial memory defects are rescued in a novel neuroserpin-deficient Alzheimer's disease transgenic mouse model.*" *Journal of neurochemistry* **118**(5): 928-938.

Fabbro, S. and Seeds, N.W. (2009). "*Plasminogen activator activity is inhibited while neuroserpin is up-regulated in the Alzheimer disease brain.*" *Journal of neurochemistry* **109**(2): 303-315.

Fares, R.P., Belmeguenai, A., Sanchez, P.E., Kouchi, H.Y., Bodennec, J., Morales, A., Georges, B., Bonnet, C., Bouvard, S., Sloviter, R.S. and Bezin, L. (2013). "*Standardized environmental enrichment supports enhanced brain plasticity in healthy rats and prevents cognitive impairment in epileptic rats.*" *PloS one* **8**(1): e53888.

Farina, N., Isaac, M.G., Clark, A.R., Rusted, J. and Tabet, N. (2012). "*Vitamin E for Alzheimer's dementia and mild cognitive impairment.*" *Cochrane database of systematic reviews* **11**: CD002854.

Fernandes, T., Magalhaes, F.C., Roque, F.R., Phillips, M.I. and Oliveira, E.M. (2012). "*Exercise training prevents the microvascular rarefaction in hypertension balancing angiogenic and apoptotic factors: role of microRNAs-16, -21, and -126.*" *Hypertension* **59**(2): 513-520.

Figueiredo-Pereira, M.E., Efthimiopoulos, S., Tezapsidis, N., Buku, A., Ghiso, J., Mehta, P. and Robakis, N.K. (1999). "*Distinct secretases, a cysteine protease and a serine protease, generate the C termini of amyloid beta-proteins Abeta1-40 and Abeta1-42, respectively.*" *Journal of neurochemistry* **72**(4): 1417-1422.

Florent-Bechard, S., Desbene, C., Garcia, P., Allouche, A., Youssef, I., Escanye, M.C., Koziel, V., Hanse, M., Malaplate-Armand, C., Stenger, C., Kriem, B., Yen-Potin, F.T., Olivier, J.L., Pillot, T. and Oster, T. (2009). "*The essential role of lipids in Alzheimer's disease.*" *Biochimie* **91**(6): 804-809.

Francis, P.T., Nordberg, A. and Arnold, S.E. (2005). "*A preclinical view of cholinesterase inhibitors in neuroprotection: do they provide more than symptomatic benefits in Alzheimer's disease?*" *Trends in pharmacological sciences* **26**(2): 104-111.

Friedland, R.P., Fritsch, T., Smyth, K.A., Koss, E., Lerner, A.J., Chen, C.H., Petot, G.J. and Debanne, S.M. (2001). "*Patients with Alzheimer's disease have reduced activities in midlife compared with healthy control-group members.*" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(6): 3440-3445.

Garwood, C.J., Pooler, A.M., Atherton, J., Hanger, D.P. and Noble, W. (2011). "*Astrocytes are important mediators of A β -induced neurotoxicity and tau phosphorylation in primary culture.*" *Cell death & disease* **2**: e167.

Gervais, F., Paquette, J., Morissette, C., Krzywkowski, P., Yu, M., Azzi, M., Lacombe, D., Kong, X., Aman, A., Laurin, J., Szarek, W.A. and Tremblay, P. (2007). "*Targeting soluble A β peptide with Tramiprosate for the treatment of brain amyloidosis.*" *Neurobiology of aging* **28**(4): 537-547.

Gil-Bea, F.J., Solas, M., Solomon, A., Mugueta, C., Winblad, B., Kivipelto, M., Ramirez, M.J. and Cedazo-Minguez, A. (2010). "*Insulin levels are decreased in the cerebrospinal fluid of women with prodromal Alzheimer's disease.*" *Journal of Alzheimer's disease* **22**(2): 405-413.

Ginsberg, S.D., Hemby, S.E., Lee, V.M., Eberwine, J.H. and Trojanowski, J.Q. (2000). "*Expression profile of transcripts in Alzheimer's disease tangle-bearing CA1 neurons.*" *Annals of neurology* **48**(1): 77-87.

Glenner, G.G. and Wong, C.W. (1984). "*Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein.*" *Biochemical and biophysical research communications* **120**(3): 885-890.

Goedert, M., Spillantini, M.G. and Crowther, R.A. (1991). "*Tau proteins and neurofibrillary degeneration.*" *Brain pathology* **1**(4): 279-286.

Goedert, M., Spillantini, M.G., Potier, M.C., Ulrich, J. and Crowther, R.A. (1989). "*Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain.*" *The EMBO journal* **8**(2): 393-399.

Goelet, P., Castellucci, V.F., Schacher, S. and Kandel, E.R. (1986). "*The long and the short of long-term memory--a molecular framework.*" *Nature* **322**(6078): 419-422.

Gong, C.X., Liu, F., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K. (2005). "*Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease.*" *Journal of neural transmission* **112**(6): 813-838.

Gorski, J.A., Balogh, S.A., Wehner, J.M. and Jones, K.R. (2003). "*Learning deficits in forebrain-restricted brain-derived neurotrophic factor mutant mice.*" *Neuroscience* **121**(2): 341-354.

Gouras, G.K., Almeida, C.G. and Takahashi, R.H. (2005). "*Intraneuronal Abeta accumulation and origin of plaques in Alzheimer's disease.*" *Neurobiology of aging* **26**(9): 1235-1244.

Greenberg, M.E., Xu, B., Lu, B. and Hempstead, B.L. (2009). "*New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function.*" *The Journal of neuroscience* **29**(41): 12764-12767.

Greenberg, S.M. (2002). "*Cerebral amyloid angiopathy and dementia: two amyloids are worse than one.*" *Neurology* **58**(11): 1587-1588.

Grundman, M., DiBernardo, A., Raghavan, N., Krams, M. and Yuen, E. (2013). "*2012: A watershed year for Alzheimer's disease research.*" *The journal of nutrition, health & aging* **17**(1): 51-53.

Guan, J.W., Huang, C.Q., Li, Y.H., Wan, C.M., You, C., Wang, Z.R., Liu, Y.Y. and Liu, Q.X. (2011). "*No association between hypertension and risk for Alzheimer's disease: a meta-analysis of longitudinal studies.*" *Journal of Alzheimer's disease* **27**(4): 799-807.

Guillin, O., Diaz, J., Carroll, P., Griffon, N., Schwartz, J.C. and Sokoloff, P. (2001). "*BDNF controls dopamine D3 receptor expression and triggers behavioural sensitization.*" *Nature* **411**(6833): 86-89.

Guzowski, J.F., McNaughton, B.L., Barnes, C.A. and Worley, P.F. (1999). "*Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles.*" *Nature neuroscience* **2**(12): 1120-1124.

Guzowski, J.F., McNaughton, B.L., Barnes, C.A. and Worley, P.F. (2001). "*Imaging neural activity with temporal and cellular resolution using FISH.*" *Current opinion in neurobiology* **11**(5): 579-584.

Haass, C., Schlossmacher, M.G., Hung, A.Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B.L., Lieberburg, I., Koo, E.H., Schenk, D., Teplow, D.B. and et al. (1992). "*Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism.*" *Nature* **359**(6393): 322-325.

Hachinski, V. and Munoz, D.G. (1997). "*Cerebrovascular pathology in Alzheimer's disease: cause, effect or epiphenomenon?*" *Annals of the New York Academy of Sciences* **826**: 1-6.

Hadadeh, O., Barruet, E., Peiretti, F., Verdier, M., Bernot, D., Hadjal, Y., Yazidi, C.E., Robaglia-Schlupp, A., De Paula, A.M., Negre, D., Iacovino, M., Kyba, M., Alessi, M.C. and Binetruy, B. (2012). "*The plasminogen activation system modulates differently adipogenesis and myogenesis of embryonic stem cells.*" *PloS one* **7**(11): e49065.

Hama, E. and Saido, T.C. (2005). "*Etiology of sporadic Alzheimer's disease: somatostatin, neprilysin, and amyloid beta peptide.*" *Medical hypotheses* **65**(3): 498-500.

Hanger, D.P., Hughes, K., Woodgett, J.R., Brion, J.P. and Anderton, B.H. (1992). "*Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase.*" *Neuroscience letters* **147**(1): 58-62.

Hardy, J. (2006). "*A hundred years of Alzheimer's disease research.*" *Neuron* **52**(1): 3-13.

Hardy, J. and Allsop, D. (1991). "*Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease.*" *Trends in pharmacological sciences* **12**(10): 383-388.

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): 353-356.

Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Gerrish, A., Hamshere, M.L., Pahwa, J.S., Moskvin, V., Dowzell, K., Williams, A., Jones, N., Thomas, C., Stretton, A., Morgan, A.R., Lovestone, S., Powell, J., Proitsi, P., Lupton, M.K., Brayne, C., Rubinsztein, D.C., Gill, M., Lawlor, B., Lynch, A., Morgan, K., Brown, K.S., Passmore, P.A., Craig, D., McGuinness, B., Todd, S., Holmes, C., Mann, D., Smith, A.D., Love, S., Kehoe, P.G., Hardy, J., Mead, S., Fox, N., Rossor, M., Collinge, J., Maier, W., Jessen, F., Schurmann, B., van den Bussche, H., Heuser, I., Kornhuber, J., Wiltfang, J., Dichgans, M., Frolich, L., Hampel, H., Hull, M., Rujescu, D., Goate, A.M., Kauwe, J.S., Cruchaga, C., Nowotny, P., Morris, J.C., Mayo, K., Sleegers, K., Bettens, K., Engelborghs, S., De Deyn, P.P., Van Broeckhoven, C., Livingston, G., Bass, N.J., Gurling, H., McQuillin, A., Gwilliam, R., Deloukas, P., Al-Chalabi, A., Shaw, C.E., Tsolaki, M., Singleton, A.B., Guerreiro, R., Muhleisen, T.W., Nothen, M.M., Moebus, S., Jockel, K.H., Klopp, N., Wichmann, H.E., Carrasquillo, M.M., Pankratz, V.S., Younkin, S.G., Holmans, P.A., O'Donovan, M., Owen, M.J. and Williams, J. (2009). "*Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease.*" *Nature genetics* **41**(10): 1088-1093.

Hebert, L.E., Weuve, J., Scherr, P.A. and Evans, D.A. (2013). "*Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census.*" *Neurology*. In press.

Hemming, M.L., Patterson, M., Reske-Nielsen, C., Lin, L., Isacson, O. and Selkoe, D.J. (2007). "*Reducing amyloid plaque burden via ex vivo gene delivery of an Abeta-degrading protease: a novel therapeutic approach to Alzheimer disease.*" *PLoS medicine* **4**(8): e262.

Heneka, M.T., Sastre, M., Dumitrescu-Ozimek, L., Dewachter, I., Walter, J., Klockgether, T. and Van Leuven, F. (2005). "*Focal glial activation coincides with increased BACE1 activation and precedes amyloid plaque deposition in APP[V717I] transgenic mice.*" *Journal of neuroinflammation* **2**: 22.

Hernandez, F., Borrell, J., Guaza, C., Avila, J. and Lucas, J.J. (2002). "*Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express GSK-3beta in the brain but do not form tau filaments.*" *Journal of neurochemistry* **83**(6): 1529-1533.

Hock, C., Konietzko, U., Streffer, J.R., Tracy, J., Signorell, A., Muller-Tillmanns, B., Lemke, U., Henke, K., Moritz, E., Garcia, E., Wollmer, M.A., Umbricht, D., de Quervain, D.J., Hofmann, M., Maddalena, A., Papassotiropoulos, A. and Nitsch, R.M. (2003). "*Antibodies against beta-amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease.*" *Neuron* **38**(4): 547-554.

Hoffman, L.B., Schmeidler, J., Lesser, G.T., Beeri, M.S., Purohit, D.P., Grossman, H.T. and Haroutunian, V. (2009). "*Less Alzheimer disease neuropathology in medicated hypertensive than nonhypertensive persons.*" *Neurology* **72**(20): 1720-1726.

Hooper, C., Killick, R. and Lovestone, S. (2008). "*The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease.*" *Journal of neurochemistry* **104**(6): 1433-1439.

Hooper, C., Markevich, V., Plattner, F., Killick, R., Schofield, E., Engel, T., Hernandez, F., Anderton, B., Rosenblum, K., Bliss, T., Cooke, S.F., Avila, J., Lucas, J.J., Giese, K.P., Stephenson, J. and Lovestone, S. (2007). "*Glycogen synthase kinase-3 inhibition is integral to long-term potentiation.*" *The European journal of neuroscience* **25**(1): 81-86.

Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S. and Malinow, R. (2006). "*AMPA removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss.*" *Neuron* **52**(5): 831-843.

Hsu, C.D. and Tsai, S.J. (2010). "*The tissue plasminogen activator/plasmin system may act through cleavage of pro-BDNF to increase risk of substance abuse.*" *CNS spectrums* **15**(6): 350.

Hu, J., Akama, K.T., Krafft, G.A., Chromy, B.A. and Van Eldik, L.J. (1998). "*Amyloid-beta peptide activates cultured astrocytes: morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release.*" *Brain research* **785**(2): 195-206.

Huang, W., Qiu, C., Winblad, B. and Fratiglioni, L. (2002). "*Alcohol consumption and incidence of dementia in a community sample aged 75 years and older.*" *Journal of clinical epidemiology* **55**(10): 959-964.

Huang, Y. (2006). "*Apolipoprotein E and Alzheimer disease.*" *Neurology* **66**(2 Suppl 1): S79-85.

Hwang, S.H., Shin, E.J., Shin, T.J., Lee, B.H., Choi, S.H., Kang, J., Kim, H.J., Kwon, S.H., Jang, C.G., Lee, J.H., Kim, H.C. and Nah, S.Y. (2012). "*Gintonin, a ginseng-derived lysophosphatidic acid receptor ligand, attenuates Alzheimer's disease-related neuropathies: involvement of non-amyloidogenic processing.*" *Journal of Alzheimer's disease* **31**(1): 207-223.

Hynd, M.R., Scott, H.L. and Dodd, P.R. (2004). "*Differential expression of N-methyl-D-aspartate receptor NR2 isoforms in Alzheimer's disease.*" *Journal of neurochemistry* **90**(4): 913-919.

Inestrosa, N., De Ferrari, G.V., Garrido, J.L., Alvarez, A., Olivares, G.H., Barria, M.I., Bronfman, M. and Chacon, M.A. (2002). "*Wnt signaling involvement in beta-amyloid-dependent neurodegeneration.*" *Neurochemistry international* **41**(5): 341-344.

Iqbal, K. and Grundke-Iqbal, I. (2005). "*Pharmacological approaches of neurofibrillary degeneration.*" *Current Alzheimer research* **2**(3): 335-341.

Jacobsen, J.S., Comery, T.A., Martone, R.L., Elokdah, H., Crandall, D.L., Oganessian, A., Aschmies, S., Kirksey, Y., Gonzales, C., Xu, J., Zhou, H., Atchison, K., Wagner, E., Zaleska, M.M., Das, I., Arias, R.L., Bard, J., Riddell, D., Gardell, S.J., Abou-Gharbia, M., Robichaud, A., Magolda, R., Vlasuk, G.P., Bjornsson, T., Reinhart, P.H. and Pangalos, M.N. (2008). "*Enhanced clearance of A β in brain by sustaining the plasmin proteolysis cascade.*" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**(25): 8754-8759.

Jin, L.W., Ninomiya, H., Roch, J.M., Schubert, D., Masliah, E., Otero, D.A. and Saitoh, T. (1994). "*Peptides containing the RERMS sequence of amyloid beta/A4 protein precursor bind cell surface and promote neurite extension.*" *The Journal of neuroscience* **14**(9): 5461-5470.

Joas, E., Backman, K., Gustafson, D., Ostling, S., Waern, M., Guo, X. and Skoog, I. (2012). "*Blood pressure trajectories from midlife to late life in relation to dementia in women followed for 37 years.*" *Hypertension* **59**(4): 796-801.

Jorm, A.F. and Easteal, S. (2000). "*Assessing candidate genes as risk factors for mental disorders: the value of population-based epidemiological studies.*" *Social psychiatry and psychiatric epidemiology* **35**(1): 1-4.

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.*" *Annals of neurology* **42**(5): 776-782.

Kenny, S., Gamble, J., Lyons, S., Vlatkovic, N., Dimaline, R., Varro, A. and Dockray, G.J. (2013). "*Gastric expression of plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 is associated with hyperphagia and obesity in mice.*" *Endocrinology* **154**(2): 718-726.

Kim, J.W., Lee, S.H., Ko, H.M., Kwon, K.J., Cho, K.S., Choi, C.S., Park, J.H., Kim, H.Y., Lee, J., Han, S.H., Ignarro, L.J., Cheong, J.H., Kim, W.K. and Shin, C.Y. (2011). "*Biphasic regulation of tissue plasminogen activator activity in ischemic rat brain and in cultured neural cells: essential role of astrocyte-derived plasminogen activator inhibitor-1.*" *Neurochemistry international* **58**(3): 423-433.

Kivipelto, M., Ngandu, T., Fratiglioni, L., Viitanen, M., Kareholt, I., Winblad, B., Helkala, E.L., Tuomilehto, J., Soininen, H. and Nissinen, A. (2005). "*Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer disease.*" *Archives of neurology* **62**(10): 1556-1560.

Knobloch, M., Konietzko, U., Krebs, D.C. and Nitsch, R.M. (2007). "*Intracellular Abeta and cognitive deficits precede beta-amyloid deposition in transgenic arcAbeta mice.*" *Neurobiology of aging* **28**(9): 1297-1306.

Knobloch, M. and Mansuy, I.M. (2008). "*Dendritic spine loss and synaptic alterations in Alzheimer's disease.*" *Molecular neurobiology* **37**(1): 73-82.

Kontis, D., Huddy, V., Reeder, C., Landau, S. and Wykes, T. (2013). "*Effects of Age and Cognitive Reserve on Cognitive Remediation Therapy Outcome in Patients With Schizophrenia.*" *The American journal of geriatric psychiatry* **21**(3): 218-230.

Koshimizu, H., Kiyosue, K., Hara, T., Hazama, S., Suzuki, S., Uegaki, K., Nagappan, G., Zaitsev, E., Hirokawa, T., Tatsu, Y., Ogura, A., Lu, B. and Kojima, M. (2009). "*Multiple functions of precursor BDNF to CNS neurons: negative regulation of neurite growth, spine formation and cell survival.*" *Molecular brain* **2**: 27.

Kril, J.J., Patel, S., Harding, A.J. and Halliday, G.M. (2002). "*Patients with vascular dementia due to microvascular pathology have significant hippocampal neuronal loss.*" *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* **72**(6): 747-751.

Kuhl, D. and Skehel, P. (1998). "*Dendritic localization of mRNAs.*" *Current opinion in neurobiology* **8**(5): 600-606.

Kwon, S.E. and Chapman, E.R. (2011). "*Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons.*" *Neuron* **70**(5): 847-854.

Labie, C., Lafon, C., Marmouget, C., Saubusse, P., Fournier, J., Keane, P.E., Le Fur, G. and Soubrie, P. (1999). "*Effect of the neuroprotective compound SR57746A on nerve growth factor synthesis in cultured astrocytes from neonatal rat cortex.*" *British journal of pharmacology* **127**(1): 139-144.

Lacor, P.N., Buniel, M.C., Furlow, P.W., Clemente, A.S., Velasco, P.T., Wood, M., Viola, K.L. and Klein, W.L. (2007). "*Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease.*" *The Journal of neuroscience* **27**(4): 796-807.

LaFerla, F.M., Green, K.N. and Oddo, S. (2007). "*Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease.*" *Nature reviews. Neuroscience* **8**(7): 499-509.

Lahiani-Cohen, I., Loubopoulos, A., Haber, E., Rozenstein-Tsalkovich, L., Abramsky, O., Grigoriadis, N. and Rosenmann, H. (2011). "*Moderate environmental enrichment mitigates tauopathy in a neurofibrillary tangle mouse model.*" *Journal of neuropathology and experimental neurology* **70**(7): 610-621.

Laitinen, M.H., Ngandu, T., Rovio, S., Helkala, E.L., Uusitalo, U., Viitanen, M., Nissinen, A., Tuomilehto, J., Soininen, H. and Kivipelto, M. (2006). "*Fat intake at midlife and risk of dementia and Alzheimer's disease: a population-based study.*" *Dementia and geriatric cognitive disorders* **22**(1): 99-107.

Lambert, J.C., Heath, S., Even, G., Campion, D., Slegers, K., Hiltunen, M., Combarros, O., Zelenika, D., Bullido, M.J., Tavernier, B., Letenneur, L., Bettens, K., Berr, C., Pasquier, F.,

Fievet, 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., Bossu, P., Piccardi, P., Annoni, G., Seripa, D., Galimberti, D., Hannequin, D., Licastro, F., Soininen, H., Ritchie, K., Blanche, H., Dartigues, J.F., Tzourio, C., Gut, I., Van Broeckhoven, C., Alperovitch, A., Lathrop, M. and Amouyel, P. (2009). "*Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease.*" *Nature genetics* **41**(10): 1094-1099.

Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C. and Fahrenholz, F. (1999). "*Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease.*" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(7): 3922-3927.

Larson, E.B., Wang, L., Bowen, J.D., McCormick, W.C., Teri, L., Crane, P. and Kukull, W. (2006). "*Exercise is associated with reduced risk for incident dementia among persons 65 years of age and older.*" *Annals of internal medicine* **144**(2): 73-81.

Launer, L.J., Andersen, K., Dewey, M.E., Letenneur, L., Ott, A., Amaducci, L.A., Brayne, C., Copeland, J.R., Dartigues, J.F., Kragh-Sorensen, P., Lobo, A., Martinez-Lage, J.M., Stijnen, T. and Hofman, A. (1999). "*Rates and risk factors for dementia and Alzheimer's disease: results from EURODEM pooled analyses. EURODEM Incidence Research Group and Work Groups. European Studies of Dementia.*" *Neurology* **52**(1): 78-84.

Lee, C.Y. and Landreth, G.E. (2010). "*The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain.*" *Journal of neural transmission* **117**(8): 949-960.

Lee, H.Y., Hwang, I.Y., Im, H., Koh, J.Y. and Kim, Y.H. (2007). "*Non-proteolytic neurotrophic effects of tissue plasminogen activator on cultured mouse cerebrocortical neurons.*" *Journal of neurochemistry* **101**(5): 1236-1247.

Lee, K.W., Lee, S.H., Kim, H., Song, J.S., Yang, S.D., Paik, S.G. and Han, P.L. (2004). "*Progressive cognitive impairment and anxiety induction in the absence of plaque deposition in C57BL/6 inbred mice expressing transgenic amyloid precursor protein.*" *Journal of neuroscience research* **76**(4): 572-580.

Lee, R., Kermani, P., Teng, K.K. and Hempstead, B.L. (2001). "Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins." *Science* **294**(5548): 1945-1948.

Lesne, S., Kotilinek, L. and Ashe, K.H. (2008). "Plaque-bearing mice with reduced levels of oligomeric amyloid-beta assemblies have intact memory function." *Neuroscience* **151**(3): 745-749.

Lewis, J., Dickson, D.W., Lin, W.L., Chisholm, L., Corral, A., Jones, G., Yen, S.H., Sahara, N., Skipper, L., Yager, D., Eckman, C., Hardy, J., Hutton, M. and McGowan, E. (2001). "Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP." *Science* **293**(5534): 1487-1491.

Li, F. and Tsien, J.Z. (2009). "Memory and the NMDA receptors." *The New England journal of medicine* **361**(3): 302-303.

Li, S., Jin, M., Zhang, D., Yang, T., Koeglspenger, T., Fu, H. and Selkoe, D.J. (2013). "Environmental Novelty Activates beta2-Adrenergic Signaling to Prevent the Impairment of Hippocampal LTP by Abeta Oligomers." *Neuron* **77**(5): 929-941.

Lin, S., Huiya, Z., Bo, L., Wei, W. and Yongmei, G. (2009). "The plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene -844 A/G and -675 4G/5G promoter polymorphism significantly influences plasma PAI-1 levels in women with polycystic ovary syndrome." *Endocrine* **36**(3): 503-509.

Link, W., Konietzko, U., Kauselmann, G., Krug, M., Schwanke, B., Frey, U. and Kuhl, D. (1995). "Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(12): 5734-5738.

Linnarsson, S., Bjorklund, A. and Ernfors, P. (1997). "Learning deficit in BDNF mutant mice." *The European journal of neuroscience* **9**(12): 2581-2587.

Liu, R.M., van Groen, T., Katre, A., Cao, D., Kadisha, I., Ballinger, C., Wang, L., Carroll, S.L. and Li, L. (2011). "Knockout of plasminogen activator inhibitor 1 gene reduces amyloid beta

peptide burden in a mouse model of Alzheimer's disease." *Neurobiology of aging* **32**(6): 1079-1089.

Liu, Y., Cai, Z.L., Xue, S., Zhou, X. and Wu, F. (2013). "*Proxies of cognitive reserve and their effects on neuropsychological performance in patients with mild cognitive impairment.*" *Journal of clinical neuroscience*. In press.

Logan, C.Y. and Nusse, R. (2004). "*The Wnt signaling pathway in development and disease.*" *Annual review of cell and developmental biology* **20**: 781-810.

Loitfelder, M., Seiler, S., Schwingenschuh, P. and Schmidt, R. (2012). "*Cerebral microbleeds: a review.*" *Panminerva medica* **54**(3): 149-160.

Lopez, O.L., Becker, J.T., Wisniewski, S., Saxton, J., Kaufer, D.I. and DeKosky, S.T. (2002). "*Cholinesterase inhibitor treatment alters the natural history of Alzheimer's disease.*" *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* **72**(3): 310-314.

Lord, A., Kalimo, H., Eckman, C., Zhang, X.Q., Lannfelt, L. and Nilsson, L.N. (2006). "*The Arctic Alzheimer mutation facilitates early intraneuronal A β aggregation and senile plaque formation in transgenic mice.*" *Neurobiology of aging* **27**(1): 67-77.

Love, S., Siew, L.K., Dawbarn, D., Wilcock, G.K., Ben-Shlomo, Y. and Allen, S.J. (2006). "*Premorbid effects of APOE on synaptic proteins in human temporal neocortex.*" *Neurobiology of aging* **27**(6): 797-803.

Lovestone, S., Reynolds, C.H., Latimer, D., Davis, D.R., Anderton, B.H., Gallo, J.M., Hanger, D., Mulot, S., Marquardt, B., Stabel, S. and et al. (1994). "*Alzheimer's disease-like phosphorylation of the microtubule-associated protein tau by glycogen synthase kinase-3 in transfected mammalian cells.*" *Current biology* **4**(12): 1077-1086.

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.*" *Nature neuroscience* **4**(3): 231-232.

Lyford, G.L., Yamagata, K., Kaufmann, W.E., Barnes, C.A., Sanders, L.K., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Lanahan, A.A. and Worley, P.F. (1995). "*Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites.*" *Neuron* **14**(2): 433-445.

Ma, Y.L., Wang, H.L., Wu, H.C., Wei, C.L. and Lee, E.H. (1998). "*Brain-derived neurotrophic factor antisense oligonucleotide impairs memory retention and inhibits long-term potentiation in rats.*" *Neuroscience* **82**(4): 957-967.

Maesako, M., Uemura, K., Kubota, M., Kuzuya, A., Sasaki, K., Hayashida, N., Asada-Utsugi, M., Watanabe, K., Uemura, M., Kihara, T., Takahashi, R., Shimohama, S. and Kinoshita, A. (2012). "*Exercise is more effective than diet control in preventing high fat diet-induced beta-amyloid deposition and memory deficit in amyloid precursor protein transgenic mice.*" *The Journal of biological chemistry* **287**(27): 23024-23033.

Mahlke, C. and Wallhauser-Franke, E. (2004). "*Evidence for tinnitus-related plasticity in the auditory and limbic system, demonstrated by arg3.1 and c-fos immunocytochemistry.*" *Hearing research* **195**(1-2): 17-34.

Mangialasche, F., Solomon, A., Winblad, B., Mecocci, P. and Kivipelto, M. (2010). "*Alzheimer's disease: clinical trials and drug development.*" *Lancet neurology* **9**(7): 702-716.

Martin, S.J., Grimwood, P.D. and Morris, R.G. (2000). "*Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis.*" *Annual review of neuroscience* **23**: 649-711.

Martone, R.L., Zhou, H., Atchison, K., Comery, T., Xu, J.Z., Huang, X., Gong, X., Jin, M., Kreft, A., Harrison, B., Mayer, S.C., Aschmies, S., Gonzales, C., Zaleska, M.M., Riddell, D.R., Wagner, E., Lu, P., Sun, S.C., Sonnenberg-Reines, J., Oganessian, A., Adkins, K., Leach, M.W., Clarke, D.W., Hury, D., Abou-Gharbia, M., Magolda, R., Bard, J., Frick, G., Raje, S., Forlow, S.B., Balliet, C., Burczynski, M.E., Reinhart, P.H., Wan, H.I., Pangalos, M.N. and Jacobsen, J.S. (2009). "*Begacestat (GSI-953): a novel, selective thiophene sulfonamide inhibitor of amyloid precursor protein gamma-secretase for the treatment of Alzheimer's disease.*" *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **331**(2): 598-608.

Martorana, A., Sancesario, G.M., Esposito, Z., Nuccetelli, M., Sorge, R., Formosa, A., Dinallo, V., Bernardi, G., Bernardini, S. and Sancesario, G. (2012). "*Plasmin system of Alzheimer's disease patients: CSF analysis.*" *Journal of neural transmission* **119**(7): 763-769.

Masliah, E., Ellisman, M., Carragher, B., Mallory, M., Young, S., Hansen, L., DeTeresa, R. and Terry, R.D. (1992). "*Three-dimensional analysis of the relationship between synaptic pathology and neuropil threads in Alzheimer disease.*" *Journal of neuropathology and experimental neurology* **51**(4): 404-414.

Mayeux, R. (2003). "*Epidemiology of neurodegeneration.*" *Annual review of neuroscience* **26**: 81-104.

McCaddon, A., Hudson, P., Abrahamsson, L., Olofsson, H. and Regland, B. (2001). "*Analogues, ageing and aberrant assimilation of vitamin B12 in Alzheimer's disease.*" *Dementia and geriatric cognitive disorders* **12**(2): 133-137.

McCaddon, A., Regland, B., Hudson, P. and Davies, G. (2002). "*Functional vitamin B(12) deficiency and Alzheimer disease.*" *Neurology* **58**(9): 1395-1399.

McEwen, B.S. (1999). "*Stress and hippocampal plasticity.*" *Annual review of neuroscience* **22**: 105-122.

Meijer, C.A., Le Haen, P.A., van Dijk, R.A., Hira, M., Hamming, J.F., van Bockel, J.H. and Lindeman, J.H. (2012). "*Activator protein-1 (AP-1) signalling in human atherosclerosis: results of a systematic evaluation and intervention study.*" *Clinical science* **122**(9): 421-428.

Meziane, H., Dodart, J.C., Mathis, C., Little, S., Clemens, J., Paul, S.M. and Ungerer, A. (1998). "*Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice.*" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(21): 12683-12688.

Montaner, J. (2009). "*Blood biomarkers to guide stroke thrombolysis.*" *Frontiers in bioscience* **1**: 200-208.

Moon, R.T., Kohn, A.D., De Ferrari, G.V. and Kaykas, A. (2004). "*WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies.*" *Nature reviews. Genetics* **5**(9): 691-701.

Mori, E., Hashimoto, M., Krishnan, K.R. and Doraiswamy, P.M. (2006). "What constitutes clinical evidence for neuroprotection in Alzheimer disease: support for the cholinesterase inhibitors?" *Alzheimer disease and associated disorders* **20**(2 Suppl 1): S19-26.

Morishima-Kawashima, M., Hasegawa, M., Takio, K., Suzuki, M., Yoshida, H., Watanabe, A., Titani, K. and Ihara, Y. (1995). "Hyperphosphorylation of tau in PHF." *Neurobiology of aging* **16**(3): 365-371; discussion 371-380.

Moro, M.L., Giaccone, G., Lombardi, R., Indaco, A., Uggetti, A., Morbin, M., Saccucci, S., Di Fede, G., Catania, M., Walsh, D.M., Demarchi, A., Rozemuller, A., Bogdanovic, N., Bugiani, O., Ghetti, B. and Tagliavini, F. (2012). "APP mutations in the Abeta coding region are associated with abundant cerebral deposition of Abeta38." *Acta neuropathologica* **124**(6): 809-821.

Morris, M.C., Evans, D.A., Bienias, J.L., Tangney, C.C., Bennett, D.A., Aggarwal, N., Schneider, J. and Wilson, R.S. (2003). "Dietary fats and the risk of incident Alzheimer disease." *Archives of neurology* **60**(2): 194-200.

Mossner, R., Daniel, S., Albert, D., Heils, A., Okladnova, O., Schmitt, A. and Lesch, K.P. (2000). "Serotonin transporter function is modulated by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) but not nerve growth factor (NGF)." *Neurochemistry international* **36**(3): 197-202.

Mowla, S.J., Farhadi, H.F., Pareek, S., Atwal, J.K., Morris, S.J., Seidah, N.G. and Murphy, R.A. (2001). "Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor." *The Journal of biological chemistry* **276**(16): 12660-12666.

Mudher, A. and Lovestone, S. (2002). "Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands?" *Trends in neurosciences* **25**(1): 22-26.

Mustroph, M.L., Chen, S., Desai, S.C., Cay, E.B., DeYoung, E.K. and Rhodes, J.S. (2012). "Aerobic exercise is the critical variable in an enriched environment that increases hippocampal neurogenesis and water maze learning in male C57BL/6J mice." *Neuroscience* **219**: 62-71.

Nedivi, E., Hevroni, D., Naot, D., Israeli, D. and Citri, Y. (1993). "Numerous candidate plasticity-related genes revealed by differential cDNA cloning." *Nature* **363**(6431): 718-722.

Neeley, E.W., Berger, R., Koenig, J.I. and Leonard, S. (2011). "*Prenatal stress differentially alters brain-derived neurotrophic factor expression and signaling across rat strains.*" *Neuroscience* **187**: 24-35.

Newman, A.B., Fitzpatrick, A.L., Lopez, O., Jackson, S., Lyketsos, C., Jagust, W., Ives, D., Dekosky, S.T. and Kuller, L.H. (2005). "*Dementia and Alzheimer's disease incidence in relationship to cardiovascular disease in the Cardiovascular Health Study cohort.*" *Journal of the American Geriatrics Society* **53**(7): 1101-1107.

Ng, D., Pitcher, G.M., Szilard, R.K., Sertie, A., Kanisek, M., Clapcote, S.J., Lipina, T., Kalia, L.V., Joo, D., McKerlie, C., Cortez, M., Roder, J.C., Salter, M.W. and McInnes, R.R. (2009). "*Neto1 is a novel CUB-domain NMDA receptor-interacting protein required for synaptic plasticity and learning.*" *PLoS biology* **7**(2): e41.

Niell, C.M., Meyer, M.P. and Smith, S.J. (2004). "*In vivo imaging of synapse formation on a growing dendritic arbor.*" *Nature neuroscience* **7**(3): 254-260.

Ninomiya, T., Ohara, T., Hirakawa, Y., Yoshida, D., Doi, Y., Hata, J., Kanba, S., Iwaki, T. and Kiyohara, Y. (2011). "*Midlife and late-life blood pressure and dementia in Japanese elderly: the Hisayama study.*" *Hypertension* **58**(1): 22-28.

Noble, W., Planel, E., Zehr, C., Olm, V., Meyerson, J., Suleman, F., Gaynor, K., Wang, L., LaFrancois, J., Feinstein, B., Burns, M., Krishnamurthy, P., Wen, Y., Bhat, R., Lewis, J., Dickson, D. and Duff, K. (2005). "*Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo.*" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(19): 6990-6995.

O'Brien, R.J. and Wong, P.C. (2011). "*Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease.*" *Annual review of neuroscience* **34**: 185-204.

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): 409-421.

Oddo, S., Vasilevko, V., Caccamo, A., Kitazawa, M., Cribbs, D.H. and LaFerla, F.M. (2006). "Reduction of soluble Abeta and tau, but not soluble Abeta alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles." *The Journal of biological chemistry* **281**(51): 39413-39423.

Packer, L., Roy, S. and Dyck, P. (1999). "Alpha-lipoic acid is bioavailable in nerve: Implications for treatment of diabetic polyneuropathy." *Diabetes* **48**: A150-A150.

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 research reviews* **3**(4): 407-430.

Pang, P.T., Teng, H.K., Zaitsev, E., Woo, N.T., Sakata, K., Zhen, S., Teng, K.K., Yung, W.H., Hempstead, B.L. and Lu, B. (2004). "Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity." *Science* **306**(5695): 487-491.

Panza F, Solfrizzi V, Frisardi V, Imbimbo BP, Capurso C, D'Introno A, Colacicco AM, Seripa D, Vendemiale G, Capurso A, Pilotto A. (2009). "Beyond the neurotransmitter-focused approach in treating Alzheimer's disease: drugs targeting beta-amyloid and tau protein." *Ageing clinical and experimental research* **21**(6):386-406.

Paoletti, P. and Neyton, J. (2007). "NMDA receptor subunits: function and pharmacology." *Current opinion in pharmacology* **7**(1): 39-47.

Parodi, J., Sepulveda, F.J., Roa, J., Opazo, C., Inestrosa, N.C. and Aguayo, L.G. (2010). "Beta-amyloid causes depletion of synaptic vesicles leading to neurotransmission failure." *The Journal of biological chemistry* **285**(4): 2506-2514.

Patterson, S.L., Grover, L.M., Schwartzkroin, P.A. and Bothwell, M. (1992). "Neurotrophin expression in rat hippocampal slices: a stimulus paradigm inducing LTP in CA1 evokes increases in BDNF and NT-3 mRNAs." *Neuron* **9**(6): 1081-1088.

Paul, J., Strickland, S. and Melchor, J.P. (2007). "Fibrin deposition accelerates neurovascular damage and neuroinflammation in mouse models of Alzheimer's disease." *The Journal of experimental medicine* **204**(8): 1999-2008.

Pei, J.J., Braak, E., Braak, H., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Winblad, B. and Cowburn, R.F. (1999). "*Distribution of active glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes.*" Journal of neuropathology and experimental neurology **58**(9): 1010-1019.

Peng, S., Wu, J., Mufson, E.J. and Fahnestock, 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.*" Journal of neurochemistry **93**(6): 1412-1421.

Perez, R.G., Zheng, H., Van der Ploeg, L.H. and Koo, E.H. (1997). "*The beta-amyloid precursor protein of Alzheimer's disease enhances neuron viability and modulates neuronal polarity.*" The Journal of neuroscience **17**(24): 9407-9414.

Petit, A., Bihel, F., Alves da Costa, C., Pourquie, O., Checler, F. and Kraus, J.L. (2001). "*New protease inhibitors prevent gamma-secretase-mediated production of Abeta40/42 without affecting Notch cleavage.*" Nature cell biology **3**(5): 507-511.

Petralia, R.S. (2012). "*Distribution of extrasynaptic NMDA receptors on neurons.*" TheScientificWorldJournal **2012**: 267120.

Pfeifer, M., Boncristiano, S., Bondolfi, L., Stalder, A., Deller, T., Staufenbiel, M., Mathews, P.M. and Jucker, M. (2002). "*Cerebral hemorrhage after passive anti-Abeta immunotherapy.*" Science **298**(5597): 1379.

Pocklington, A.J., Cumiskey, M., Armstrong, J.D. and Grant, S.G. (2006). "*The proteomes of neurotransmitter receptor complexes form modular networks with distributed functionality underlying plasticity and behaviour.*" Molecular systems biology **2**: 2006 0023.

Popp, J., Meichsner, S., Kolsch, H., Lewczuk, P., Maier, W., Kornhuber, J., Jessen, F. and Lutjohann, D. (2013). "*Cerebral and extracerebral cholesterol metabolism and CSF markers of Alzheimer's disease.*" Biochemical pharmacology. In press.

Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W. and Ferri, C.P. (2013). "*The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis.*" Alzheimer's & dementia **9**(1): 63-75 e62.

Purandare, N., Voshaar, R.C., Hardicre, J., Byrne, J., McCollum, C. and Burns, A. (2006). "Cerebral emboli and depressive symptoms in dementia." *The British journal of psychiatry* **189**: 260-263.

Qian, Z., Gilbert, M.E., Colicos, M.A., Kandel, E.R. and Kuhl, D. (1993). "Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation." *Nature* **361**(6411): 453-457.

Qiu, C., Winblad, B. and Fratiglioni, L. (2009). "Low diastolic pressure and risk of dementia in very old people: a longitudinal study." *Dementia and geriatric cognitive disorders* **28**(3): 213-219.

Radak, Z., Hart, N., Sarga, L., Koltai, E., Atalay, M., Ohno, H. and Boldogh, I. (2010). "Exercise plays a preventive role against Alzheimer's disease." *Journal of Alzheimer's disease* **20**(3): 777-783.

Raymond, C.R. (2007). "LTP forms 1, 2 and 3: different mechanisms for the "long" in long-term potentiation." *Trends in neurosciences* **30**(4): 167-175.

Reed, M.N., Hofmeister, J.J., Jungbauer, L., Welzel, A.T., Yu, C., Sherman, M.A., Lesne, S., LaDu, M.J., Walsh, D.M., Ashe, K.H. and Cleary, J.P. (2011). "Cognitive effects of cell-derived and synthetically derived Abeta oligomers." *Neurobiology of aging* **32**(10): 1784-1794.

Rehm, H., Wiedenmann, B. and Betz, H. (1986). "Molecular characterization of synaptophysin, a major calcium-binding protein of the synaptic vesicle membrane." *The EMBO journal* **5**(3): 535-541.

Reiner, P., Jouvent, E., Duchesnay, E., Cuingnet, R., Mangin, J.F. and Chabriat, H. (2012). "Sulcal span in Alzheimer's disease, amnesic mild cognitive impairment, and healthy controls." *Journal of Alzheimer's disease* **29**(3): 605-613.

Ricobaraza, A., Cuadrado-Tejedor, M., Marco, S., Perez-Otano, I. and Garcia-Osta, A. (2012). "Phenylbutyrate rescues dendritic spine loss associated with memory deficits in a mouse model of Alzheimer disease." *Hippocampus* **22**(5): 1040-1050.

Rodionova, E., Conzelmann, M., Maraskovsky, E., Hess, M., Kirsch, M., Giese, T., Ho, A.D., Zoller, M., Dreger, P. and Luft, T. (2007). "GSK-3 mediates differentiation and activation of proinflammatory dendritic cells." *Blood* **109**(4): 1584-1592.

Rovelet-Lecrux, A., Hannequin, D., Raux, G., Le Meur, N., Laquerriere, A., Vital, A., Dumanchin, C., Feuillette, S., Brice, A., Vercelletto, M., Dubas, F., Frebourg, T. and Campion, D. (2006). "APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy." *Nature genetics* **38**(1): 24-26.

Ruitenbergh, A., van Swieten, J.C., Wittteman, J.C., Mehta, K.M., van Duijn, C.M., Hofman, A. and Breteler, M.M. (2002). "Alcohol consumption and risk of dementia: the Rotterdam Study." *Lancet* **359**(9303): 281-286.

Rukhsana, J., Perrotta, P.L., Okorodudu, A.O., Petersen, J.R. and Mohammad, A.A. (2010). "Fit-for-purpose evaluation of architect i1000SR immunoassay analyzer." *Clinica chimica acta* **411**(11-12): 798-801.

Sabbagh, M.N., Walker, D.G., Reid, R.T., Stadnick, T., Anand, K. and Lue, L.F. (2008). "Absence of effect of chronic nicotine administration on amyloid beta peptide levels in transgenic mice overexpressing mutated human APP (Sw, Ind)." *Neuroscience letters* **448**(2): 217-220.

Saman, S., Kim, W., Raya, M., Visnick, Y., Miro, S., Jackson, B., McKee, A.C., Alvarez, V.E., Lee, N.C. and Hall, G.F. (2012). "Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease." *The Journal of biological chemistry* **287**(6): 3842-3849.

Sandebing, A., Welander, H., Winblad, B., Graff, C. and Tjernberg, L.O. (2013). "The pathogenic abeta43 is enriched in familial and sporadic Alzheimer disease." *PloS one* **8**(2): e55847.

Sapolsky, R.M. (1996). "Stress, Glucocorticoids, and Damage to the Nervous System: The Current State of Confusion." *Stress* **1**(1): 1-19.

Sapolsky, R.M. (2000). "The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: a primer on neuron death." *Biological psychiatry* **48**(8): 755-765.

Sashindranath, M., Sales, E., Daglas, M., Freeman, R., Samson, A.L., Cops, E.J., Beckham, S., Galle, A., McLean, C., Morganti-Kossmann, C., Rosenfeld, J.V., Madani, R., Vassalli, J.D., Su, E.J., Lawrence, D.A. and Medcalf, R.L. (2012). "The tissue-type plasminogen activator-plasminogen activator inhibitor 1 complex promotes neurovascular injury in brain trauma: evidence from mice and humans." *Brain* **135**(Pt 11): 3251-3264.

Scamuffa, N., Calvo, F., Chretien, M., Seidah, N.G. and Khatib, A.M. (2006). "Proprotein convertases: lessons from knockouts." *FASEB journal* **20**(12): 1954-1963.

Scheff, S.W. and Price, D.A. (1993). "Synapse loss in the temporal lobe in Alzheimer's disease." *Annals of neurology* **33**(2): 190-199.

Scheff, S.W. and Price, D.A. (2006). "Alzheimer's disease-related alterations in synaptic density: neocortex and hippocampus." *Journal of Alzheimer's disease* **9**(3 Suppl): 101-115.

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): 1501-1508.

Scheff, S.W., Sparks, L. and Price, D.A. (1993). "Quantitative assessment of synaptic density in the entorhinal cortex in Alzheimer's disease." *Annals of neurology* **34**(3): 356-361.

Schellenberg, G.D. and Montine, T.J. (2012). "The genetics and neuropathology of Alzheimer's disease." *Acta neuropathologica* **124**(3): 305-323.

Scheltens, P. and Goos, J.D. (2012). "Dementia in 2011: Microbleeds in dementia--singing a different ARIA." *Nature reviews. Neurology* **8**(2): 68-70.

Schinder, A.F. and Poo, M. (2000). "The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity." *Trends in neurosciences* **23**(12): 639-645.

Seidah, N.G., Mowla, S.J., Hamelin, J., Mamarbachi, A.M., Benjannet, S., Toure, B.B., Basak, A., Munzer, J.S., Marcinkiewicz, J., Zhong, M., Barale, J.C., Lazure, C., Murphy, R.A.,

Chretien, M. and Marcinkiewicz, M. (1999). "*Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization.*" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(4): 1321-1326.

Selkoe, D.J. (1997). "*Images in neuroscience. Alzheimer's disease: from genes to pathogenesis.*" *The American journal of psychiatry* **154**(9): 1198.

Selkoe, D.J. (2000). "*Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein.*" *Annals of the New York Academy of Sciences* **924**: 17-25.

Selkoe, D.J. (2004). "*Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases.*" *Nature cell biology* **6**(11): 1054-1061.

Sereno, L., Coma, M., Rodriguez, M., Sanchez-Ferrer, P., Sanchez, M.B., Gich, I., Agullo, J.M., Perez, M., Avila, J., Guardia-Laguarta, C., Clarimon, J., Lleo, A. and Gomez-Isla, T. (2009). "*A novel GSK-3beta inhibitor reduces Alzheimer's pathology and rescues neuronal loss in vivo.*" *Neurobiology of disease* **35**(3): 359-367.

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., Jr., 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. and Breteler, M.M. (2010). "*Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease.*" *JAMA* **303**(18): 1832-1840.

Sheng, M. and Kim, M.J. (2002). "*Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms.*" *Science* **298**(5594): 776-780.

Shimura, H., Schwartz, D., Gygi, S.P. and Kosik, K.S. (2004). "*CHIP-Hsc70 complex ubiquitinates phosphorylated tau and enhances cell survival.*" The Journal of biological chemistry **279**(6): 4869-4876.

Shivers, B.D., Hilbich, C., Multhaup, G., Salbaum, M., Beyreuther, K. and Seeburg, P.H. (1988). "*Alzheimer's disease amyloidogenic glycoprotein: expression pattern in rat brain suggests a role in cell contact.*" The EMBO journal **7**(5): 1365-1370.

Shore, J.D., Day, D.E., Francis-Chmura, A.M., Verhamme, I., Kvassman, J., Lawrence, D.A. and Ginsburg, D. (1995). "*A fluorescent probe study of plasminogen activator inhibitor-1. Evidence for reactive center loop insertion and its role in the inhibitory mechanism.*" The Journal of biological chemistry **270**(10): 5395-5398.

Siemers, E., Skinner, M., Dean, R.A., Gonzales, C., Satterwhite, J., Farlow, M., Ness, D. and May, P.C. (2005). "*Safety, tolerability, and changes in amyloid beta concentrations after administration of a gamma-secretase inhibitor in volunteers.*" Clinical neuropharmacology **28**(3): 126-132.

Sloane, J.A., Pietropaolo, M.F., Rosene, D.L., Moss, M.B., Peters, A., Kemper, T. and Abraham, C.R. (1997). "*Lack of correlation between plaque burden and cognition in the aged monkey.*" Acta neuropathologica **94**(5): 471-478.

Smith, A.D. (2002). "*Imaging the progression of Alzheimer pathology through the brain.*" Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(7): 4135-4137.

Solas, M., Aisa, B., Mugueta, M.C., Del Rio, J., Tordera, R.M. and Ramirez, M.J. (2010). "*Interactions between age, stress and insulin on cognition: implications for Alzheimer's disease.*" Neuropsychopharmacology **35**(8): 1664-1673.

Sondag, C.M., Dhawan, G. and Combs, C.K. (2009). "*Beta amyloid oligomers and fibrils stimulate differential activation of primary microglia.*" Journal of neuroinflammation **6**: 1.

Speisman, R.B., Kumar, A., Rani, A., Pastoriza, J.M., Severance, J.E., Foster, T.C. and Ormerod, B.K. (2013). "*Environmental enrichment restores neurogenesis and rapid acquisition in aged rats.*" *Neurobiology of aging* **34**(1): 263-274.

Steen, E., Terry, B.M., Rivera, E.J., Cannon, J.L., Neely, T.R., Tavares, R., Xu, X.J., Wands, J.R. and de la Monte, S.M. (2005). "*Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes?*" *Journal of Alzheimer's disease* **7**(1): 63-80.

Stern, Y. (2006). "*Cognitive reserve and Alzheimer disease.*" *Alzheimer disease and associated disorders* **20**(2): 112-117.

Stern, Y. (2012). "*Cognitive reserve in ageing and Alzheimer's disease.*" *Lancet neurology* **11**(11): 1006-1012.

Stewart, R. and Liolitsa, D. (1999). "*Type 2 diabetes mellitus, cognitive impairment and dementia.*" *Diabetic medicine* **16**(2): 93-112.

Stokin, G.B., Lillo, C., Falzone, T.L., Brusch, R.G., Rockenstein, E., Mount, S.L., Raman, R., Davies, P., Masliah, E., Williams, D.S. and Goldstein, L.S. (2005). "*Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease.*" *Science* **307**(5713): 1282-1288.

Stranahan, A.M., Martin, B. and Maudsley, S. (2012). "*Anti-inflammatory effects of physical activity in relationship to improved cognitive status in humans and mouse models of Alzheimer's disease.*" *Current Alzheimer research* **9**(1): 86-92.

Stroud, J.C., Liu, C., Teng, P.K. and Eisenberg, D. (2012). "*Toxic fibrillar oligomers of amyloid-beta have cross-beta structure.*" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**(20): 7717-7722.

Sudhof, T.C. (2000). "*The synaptic vesicle cycle revisited.*" *Neuron* **28**(2): 317-320.

Sztainberg, Y. and Chen, A. (2010). "*An environmental enrichment model for mice.*" *Nature protocols* **5**(9): 1535-1539.

Tasci, I., Kabul, H.K. and Aydogdu, A. (2012). "*Brain derived neurotrophic factor (BDNF) in cardiometabolic physiology and diseases.*" *Anadolu kardiyoloji dergisi* **12**(8): 684-688.

Teng, H., Chopp, M., Hozeska-Solgot, A., Shen, L., Lu, M., Tang, C. and Zhang, Z.G. (2012). "*Tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor 1 contribute to sonic hedgehog-induced in vitro cerebral angiogenesis.*" *PloS one* **7**(3): e33444.

Teng, H.K., Teng, K.K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R.D., Kermani, P., Torkin, R., Chen, Z.Y., Lee, F.S., Kraemer, R.T., Nykjaer, A. and Hempstead, B.L. (2005). "*ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin.*" *The Journal of neuroscience* **25**(22): 5455-5463.

Terry, A.V., Jr. and Buccafusco, J.J. (2003). "*The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development.*" *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **306**(3): 821-827.

Terry, R.D. (2000). "*Cell death or synaptic loss in Alzheimer disease.*" *Journal of neuropathology and experimental neurology* **59**(12): 1118-1119.

Terry, R.D., Masliah, E., Salmon, D.P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L.A. and Katzman, R. (1991). "*Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment.*" *Annals of neurology* **30**(4): 572-580.

Terry, R.D., Peck, A., DeTeresa, R., Schechter, R. and Horoupian, D.S. (1981). "*Some morphometric aspects of the brain in senile dementia of the Alzheimer type.*" *Annals of neurology* **10**(2): 184-192.

Thal, D.R., Griffin, W.S. and Braak, H. (2008). "*Parenchymal and vascular Abeta-deposition and its effects on the degeneration of neurons and cognition in Alzheimer's disease.*" *Journal of cellular and molecular medicine* **12**(5B): 1848-1862.

Thomas, C.G., Miller, A.J. and Westbrook, G.L. (2006). "*Synaptic and extrasynaptic NMDA receptor NR2 subunits in cultured hippocampal neurons.*" *Journal of neurophysiology* **95**(3): 1727-1734.

- Toledo, E.M., Colombres, M. and Inestrosa, N.C. (2008). "*Wnt signaling in neuroprotection and stem cell differentiation.*" *Progress in neurobiology* **86**(3): 281-296.
- Trakas, K., Oh, P.I., Singh, S., Risebrough, N. and Shear, N.H. (2001). "*The health status of obese individuals in Canada.*" *International journal of obesity and related metabolic disorders* **25**(5): 662-668.
- Tuhim, S. and Levine, S.R. (2002). "*Hypertension+MRI changes=impaired cognition.*" *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* **72**(6): 690.
- Turenne, G.A. and Price, B.D. (2001). "*Glycogen synthase kinase3 beta phosphorylates serine 33 of p53 and activates p53's transcriptional activity.*" *BMC cell biology* **2**: 12.
- Valtorta, F., Pennuto, M., Bonanomi, D. and Benfenati, F. (2004). "*Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis?*" *BioEssays* **26**(4): 445-453.
- van Praag, H., Kempermann, G. and Gage, F.H. (2000). "*Neural consequences of environmental enrichment.*" *Nature reviews. Neuroscience* **1**(3): 191-198.
- Varady, K.A. and Jones, P.J. (2005). "*Combination diet and exercise interventions for the treatment of dyslipidemia: an effective preliminary strategy to lower cholesterol levels?*" *The Journal of nutrition* **135**(8): 1829-1835.
- Verret, L., Krezymon, A., Halley, H., Trouche, S., Zerwas, M., Lazouret, M., Lassalle, J.M. and Rampon, C. (2013). "*Transient enriched housing before amyloidosis onset sustains cognitive improvement in Tg2576 mice.*" *Neurobiology of aging* **34**(1): 211-225.
- Vignini, A., Giulietti, A., Nanetti, L., Raffaelli, F., Giusti, L., Mazzanti, L. and Provinciali, L. (2013). "*Alzheimer's disease And Diabetes: New Insights and Unifying Therapies.*" *Current diabetes reviews*. In press.
- Vinters, H.V. (2001). "*Cerebral amyloid angiopathy: a microvascular link between parenchymal and vascular dementia?*" *Annals of neurology* **49**(6): 691-693.

Wakabayashi, K., Honer, W.G. and Masliah, E. (1994). "Synapse alterations in the hippocampal-entorhinal formation in Alzheimer's disease with and without Lewy body disease." *Brain research* **667**(1): 24-32.

Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J. and Selkoe, D.J. (2002). "Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo." *Nature* **416**(6880): 535-539.

Walsh, D.M. and Selkoe, D.J. (2004). "Oligomers on the brain: the emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration." *Protein and peptide letters* **11**(3): 213-228.

Waltereit, R., Dammermann, B., Wulff, P., Scafidi, J., Staubli, U., Kauselmann, G., Bundman, M. and Kuhl, D. (2001). "Arg3.1/Arc mRNA induction by Ca²⁺ and cAMP requires protein kinase A and mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase activation." *The Journal of neuroscience* **21**(15): 5484-5493.

Watts, A.S., Loskutova, N., Burns, J.M. and Johnson, D.K. (2013). "Metabolic Syndrome and Cognitive Decline in Early Alzheimer's Disease and Healthy Older Adults." *Journal of Alzheimer's disease*. In press

Weickert, C.S., Hyde, T.M., Lipska, B.K., Herman, M.M., Weinberger, D.R. and Kleinman, J.E. (2003). "Reduced brain-derived neurotrophic factor in prefrontal cortex of patients with schizophrenia." *Molecular psychiatry* **8**(6): 592-610.

Weiner, H.L., Lemere, C.A., Maron, R., Spooner, E.T., Grenfell, T.J., Mori, C., Issazadeh, S., Hancock, W.W. and Selkoe, D.J. (2000). "Nasal administration of amyloid-beta peptide decreases cerebral amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease." *Annals of neurology* **48**(4): 567-579.

Welander, H., Franberg, J., Graff, C., Sundstrom, E., Winblad, B. and Tjernberg, L.O. (2009). "Aβ₄₃ is more frequent than Aβ₄₀ in amyloid plaque cores from Alzheimer disease brains." *Journal of neurochemistry* **110**(2): 697-706.

Westerman, M.A., Cooper-Blacketer, D., Mariash, A., Kotilinek, L., Kawarabayashi, T., Younkin, L.H., Carlson, G.A., Younkin, S.G. and Ashe, K.H. (2002). "The relationship between

Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease." The Journal of neuroscience **22**(5): 1858-1867.

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): 277-281.

Wiedenmann, B. and Franke, W.W. (1985). "*Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles.*" Cell **41**(3): 1017-1028.

Willette, A.A., Coe, C.L., Birdsill, A.C., Bendlin, B.B., Colman, R.J., Alexander, A.L., Allison, D.B., Weindruch, R.H. and Johnson, S.C. (2013). "*Interleukin-8 and interleukin-10, brain volume and microstructure, and the influence of calorie restriction in old rhesus macaques.*" Age. In press.

Wiltfang, J., Esselmann, H., Bibl, M., Hull, M., Hampel, H., Kessler, H., Frolich, L., Schroder, J., Peters, O., Jessen, F., Luckhaus, C., Pernecky, R., Jahn, H., Fiszer, M., Maler, J.M., Zimmermann, R., Bruckmoser, R., Kornhuber, J. and Lewczuk, P. (2007). "*Amyloid beta peptide ratio 42/40 but not A beta 42 correlates with phospho-Tau in patients with low- and high-CSF A beta 40 load.*" Journal of neurochemistry **101**(4): 1053-1059.

Wimo, A., Jonsson, L., Bond, J., Prince, M. and Winblad, B. (2013). "*The worldwide economic impact of dementia 2010.*" Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association **9**(1): 1-11 e13.

Wirhth, O., Multhaup, G. and Bayer, T.A. (2004). "*A modified beta-amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the beta-amyloid peptide--the first step of a fatal cascade.*" Journal of neurochemistry **91**(3): 513-520.

Wiscott, R., Kopera-Frye, K. and Seifert, L. (2001). "*Possible consequences of social drinking in the early stages of Alzheimer disease.*" Geriatric nursing **22**(2): 100-104; quiz 105.

Wolfe, M.S. (2008). "*Inhibition and modulation of gamma-secretase for Alzheimer's disease.*" Neurotherapeutics **5**(3): 391-398.

Wong, J., Hyde, T.M., Cassano, H.L., Deep-Soboslay, A., Kleinman, J.E. and Weickert, C.S. (2010). "*Promoter specific alterations of brain-derived neurotrophic factor mRNA in schizophrenia.*" *Neuroscience* **169**(3): 1071-1084.

Woo, N.H., Teng, H.K., Siao, C.J., Chiaruttini, C., Pang, P.T., Milner, T.A., Hempstead, B.L. and Lu, B. (2005). "*Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression.*" *Nature neuroscience* **8**(8): 1069-1077.

Xie, T., Wang, W.P., Jia, L.J., Mao, Z.F., Qu, Z.Z., Luan, S.Q. and Kan, M.C. (2012). "*Environmental enrichment restores cognitive deficits induced by prenatal maternal seizure.*" *Brain research* **1470**: 80-88.

Xin, H., Li, Y., Shen, L.H., Liu, X., Wang, X., Zhang, J., Pourabdollah-Nejad, D.S., Zhang, C., Zhang, L., Jiang, H., Zhang, Z.G. and Chopp, M. (2010). "*Increasing tPA activity in astrocytes induced by multipotent mesenchymal stromal cells facilitate neurite outgrowth after stroke in the mouse.*" *PloS one* **5**(2): e9027.

Xu, W., Qiu, C., Winblad, B. and Fratiglioni, L. (2007). "*The effect of borderline diabetes on the risk of dementia and Alzheimer's disease.*" *Diabetes* **56**(1): 211-216.

Yamagata, K., Andreasson, K.I., Kaufmann, W.E., Barnes, C.A. and Worley, P.F. (1993). "*Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids.*" *Neuron* **11**(2): 371-386.

Yamazaki, T., Koo, E.H. and Selkoe, D.J. (1996). "*Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. II. Endocytosis, recycling and lysosomal targeting detected by immunolocalization.*" *Journal of cell science* **109** (Pt 5): 999-1008.

Yang, Z.Z., Tschopp, O., Baudry, A., Dummler, B., Hynx, D. and Hemmings, B.A. (2004). "*Physiological functions of protein kinase B/Akt.*" *Biochemical Society transactions* **32**(Pt 2): 350-354.

Yoshida, H., Imaizumi, T., Tanji, K., Sakaki, H., Metoki, N., Sato, Y., Wakabayashi, K., Kimura, H. and Satoh, K. (2006). "*Interleukin-1beta enhances the angiotensin-induced expression of*

plasminogen activator inhibitor-1 through angiotensin receptor upregulation in human astrocytes." Brain research **1073-1074**: 38-47.

Zempel, H., Thies, E., Mandelkow, E. and Mandelkow, E.M. (2010). "*Abeta oligomers cause localized Ca(2+) elevation, missorting of endogenous Tau into dendrites, Tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines.*" The Journal of neuroscience **30**(36): 11938-11950.

Zhang, Z., Hartmann, H., Do, V.M., Abramowski, D., Sturchler-Pierrat, C., Staufenbiel, M., Sommer, B., van de Wetering, M., Clevers, H., Saftig, P., De Strooper, B., He, X. and Yankner, B.A. (1998). "*Destabilization of beta-catenin by mutations in presenilin-1 potentiates neuronal apoptosis.*" Nature **395**(6703): 698-702.

Zhang, Z.G., Chopp, M., Goussev, A., Lu, D., Morris, D., Tsang, W., Powers, C. and Ho, K.L. (1999). "*Cerebral microvascular obstruction by fibrin is associated with upregulation of PAI-1 acutely after onset of focal embolic ischemia in rats.*" The Journal of neuroscience **19**(24): 10898-10907.

Zou, Z. and Buck, L.B. (2006). "*Combinatorial effects of odorant mixes in olfactory cortex.*" Science **311**(5766): 1477-1481.

Capítulo II

Capítulo 2

Hipótesis y Objetivos

Debido al progresivo envejecimiento de la población, las enfermedades neurodegenerativas están adquiriendo un impacto social muy importante. La enfermedad neurodegenerativa de mayor prevalencia es la EA.

La etiología de la EA puede ser de origen genético. Estos casos se denominan FAD y suponen del 1-5% de los casos totales. La mayor parte de los casos (alrededor del 95-99%), se denomina EA esporádica y su aparición está asociada a factores de riesgo. El más importante de los factores de riesgo descritos es la edad. Sin embargo, factores relacionados con el estilo de vida pueden, por el contrario, pueden conferir protección frente a los cambios patológicos ocasionados por la propia enfermedad o por algunos de los factores de riesgo descritos.

Diferentes estilos de vida, como dietas saludables, actividad física e intelectual, son los factores protectores más importantes que pueden retrasar el comienzo de la enfermedad o incluso ejercer una compensación de los síntomas clínicos. Los mecanismos funcionales que subyacen a estos factores protectores no se conocen con exactitud, aunque la nueva hipótesis denominada “reserva cognitiva” consigue dar una explicación. Esta hipótesis defiende que la exposición continua a estos factores protectores durante la vida de un individuo implicaría la generación de circuitos neuronales redundantes que podrían compensar y relevar a los circuitos que con la edad y la patología se ven dañados, y de esta manera, mantendría una función cognitiva más estable aún en circunstancias patológicas.

En este sentido, estudios recientes con técnicas de neuro-imagen han confirmado observaciones previas realizadas en autopsias de cerebros con EA de que existe una patente disparidad entre los rasgos patológicos y los síntomas clínicos en ciertos casos. En estos estudios se revela que comparando dos individuos con cerebros que muestran niveles similares de patología, uno podría estar demente mientras que el otro podría no manifestar deterioro cognitivo.

Los trabajos que han abordado el estudio empírico de los factores protectores han utilizado protocolos de “enriquecimiento ambiental” en modelos experimentales de estrés, enfermedades neuro-psiquiátricas y EA y demencias relacionadas. En general, estos estudios han mostrado cómo el enriquecimiento ambiental ha conseguido retrasar y disminuir la pérdida

de memoria y el deterioro cognitivo. Se ha descrito también que el enriquecimiento ambiental puede reducir la expresión de signos patológicos característicos de la EA (patología amiloide y Tau). Entre los mecanismos propuestos por los que el enriquecimiento ambiental pudiera ejercer sus efectos beneficiosos, ha sido descrito que induce un aumento en la expresión de neurotrofinas, en particular BDNF. Dado el importante papel de BDNF en la función neuronal y la plasticidad sináptica, parece evidente que toda terapia, farmacológica o no, que induzca un aumento en la expresión de BDNF podría tener un potencial terapéutico en el tratamiento de la EA.

Sin embargo, es importante destacar que los protocolos de enriquecimiento ambiental se han centrado especialmente en emular el efecto de la actividad física y los estímulos sociales, dejando a un lado la actividad intelectual-cognitiva (humanos-ratones), como altos niveles de educación, especialmente importante en el caso de los seres humanos. Por eso, el objetivo de este trabajo de investigación fue validar un protocolo con el que se pudiera simular una estimulación "intelectual"/cognitiva prolongada, como altos niveles de educación en humanos, en un modelo animal de EA (ratón Tg2576).

Por todo ello, los objetivos concretos de este trabajo fueron:

1. Crear y validar un nuevo modelo de estimulación cognitiva en ratones. El desarrollo de este objetivo queda reflejado en el capítulo 3. Para ello, se llevará a cabo la construcción de diferentes laberintos del tipo Lashley, en los cuales los animales estarán condicionados a aprender el camino adecuado para alcanzar un estímulo positivo. Este entrenamiento cognitivo se realizará durante 8 semanas. Se comprobará que los animales consiguen aprender y memorizar el camino. Para ello, se controlarán el número de errores cometidos y se medirá el tiempo en alcanzar el estímulo.

2. Estudiar el efecto de la estimulación cognitiva sobre el déficit cognitivo y signos patológicos asociados a la EA en un modelo animal de esta enfermedad. El desarrollo de este objetivo queda reflejado en el capítulo 3. Se emplearán animales que sobre-expresan la proteína APP humana (hAPP) con mutación sueca (ratón Tg2576). Tras una exposición

prolongada durante 8 semanas a un protocolo de estimulación cognitiva, se llevarán a cabo las siguientes medidas:

- 1) Se estudiará el estado cognitivo mediante pruebas de comportamiento tales como el laberinto acuático de Morris (MWM) y test de reconocimiento de nuevos objetos (NORT).
- 2) Se caracterizará bioquímica e histológica de los principales rasgos patológicos asociados a la EA, como la disfunción sináptica y patologías amiloide y Tau.

3. Estudiar la influencia del procesamiento proteolítico de la neurotrofina BDNF en los mecanismos protectores de la estimulación cognitiva. El desarrollo de este objetivo queda reflejado en el capítulo 4.

- 1) Se medirán los niveles de proBDNF, mBDNF en modelos “*ex vivo*” y “*in vivo*” de amiloidosis. Los modelos empleados serán: a) Cultivos primarios de neuronas cortico-hipocampales tratadas con el A β . b) Cultivos primarios de neuronas Tg2576 cortico-hipocampales. c) Cerebros de ratón Tg2576 sometidos a estimulación cognitiva.
- 2) Estudiar el/los mecanismos mediante los cuales BDNF pudiera inducir los efectos beneficiosos en la estimulación cognitiva. Para lo cual, se realizarán los siguientes experimentos:
 - a) Se medirán de los niveles de proteínas involucradas en la maduración de BDNF, como tPA y PAI-1 en modelos “*ex vivo*” e “*in vivo*” de patología amiloide. Además, se diseccionará la vía de señalización por la cual A β puede inducir la expresión de la proteína PAI-1 y posterior modulación de tPA en neuronas.
 - b) Se estudiará el papel de PAI-1 y tPA en la maduración de BDNF. En concreto, se valorará el efecto protector de la maduración de BDNF frente a la neurotoxicidad ejercida por A β y se estudiará la relación directa de dicha maduración en los efectos beneficiosos de la estimulación cognitiva frente al déficit cognitivo asociado a la EA.

Capítulo III

Chapter 3

Early cognitive stimulation compensates for memory and pathological changes in Tg2576

Resumen

Altos niveles de educación y la realización de actividades que demanden una alta ocupación cognitiva se han asociado con menor riesgo de padecer la Enfermedad de Alzheimer (EA) y otras demencias. Estudios en modelos animales han demostrado que los protocolos de estimulación cognitiva basados en ambientes enriquecidos, que fomentan la actividad física y la interacción social, son capaces de revertir la pérdida de memoria. En este trabajo, hemos elaborado un nuevo paradigma de estimulación cognitiva (CS), desprovisto de dichos ambientes enriquecidos. Para ello, ratones Tg2576 de 4 meses de edad fueron sometidos a un entrenamiento cognitivo durante 8 semanas. Tras un período de 8 meses sin entrenamiento, se estudiaron los efectos a largo plazo de la CS, examinando el estado cognitivo y los marcadores patológicos de la EA. Las pruebas cognitivas de MWM y NORT mostraron que los déficits de memoria espacial y de reconocimiento observados en los animales Tg2576 fueron revertidos por la CS. Además, se detectaron mayores niveles hipocampales de marcadores sinápticos (PSD95 y NR1) y proteínas implicadas en la consolidación sináptica (Arc, β -catenina). La CS atenuó la patología amiloide reduciendo los niveles de $A\beta_{1-42}$ y del dodecámero de $A\beta$, denominado $A\beta^{*56}$. La disminución de los niveles de la enzima BACE1 y el cociente C99/C93 indicó un descenso del procesamiento amiloidogénico de APP en los ratones Tg2576 sometidos a CS. También se detectaron disminuciones en los niveles de Tau hiper-fosforilada y cinasas de Tau inducidos por la CS. Sin embargo, la CS no indujo cambios moleculares relevantes en animales no transgénicos. Los presentes resultados muestran los efectos beneficiosos de una CS temprana a largo plazo en el deterioro cognitivo y marcadores patológicos de la EA.

Abstract

Education and cognitive occupations is commonly associated to reduced risk of Alzheimer's disease (AD) dementia. Animal studies have demonstrated that cognitive stimulation (CS) achieved by social/physical activities and/or enriched environments compensates for memory decline. We have elaborated a novel paradigm of CS that is devoid of physical/social activity and enriched environments. 4 months-old Tg2576 mice were cognitively trained for 8 weeks and, after a break of 8 months, long-lasting effects of CS on cognitive abilities and AD-like pathology were measured. MWM and NOR tests showed that deficits in spatial and recognition memories were compensated by CS. These outcomes were accompanied by increased levels of hippocampal post-synaptic markers (PSD95 and NR1) and proteins involved in synaptic formation (Arc, β -catenin). CS softened amyloid pathology in terms of reduced levels of $A\beta_{1-42}$ and the dodecameric assembly, referred as $A\beta^{*56}$. CS appeared to affect the APP processing since differences in levels of ADAM17, BACE1 and C99/C83 ratio were found. Tau hyper-phosphorylation and high activities of Tau kinases were also reduced by CS. In contrast, CS did not induce any of these molecular changes in wild-type mice. The present findings suggest beneficial and long-lasting effects of CS early in life on cognitive decline and AD-like pathology.

1. Introduction

Dementia is a syndrome defined by clinical abnormalities in such cognitive abilities as memory, attention and problem solving. The most common form of dementia is Alzheimer's disease (AD). Etiology of sporadic AD (99% of cases) may be the result of the combination of several genetic and environmental factors. Although the pathological traits of AD are present long before patients manifest clinical symptoms, an associative link between them does not have to be necessarily implied. Accordingly, numerous neuroimaging and autopsy observations have brought to light the disparity about clinical and pathological correlates. This lack of association is conceptualised by the hypothesis of "cognitive reserve", and is likely to be regarded as life environmental factors-induced mechanisms that help maintaining the cognitive ability in the face of deleterious AD pathology (Stern 2006). Epidemiological studies have determined education (Koepsell et al. 2008), cognitively complex occupations (Andel et al. 2006; Carlson et al. 2008), leisure activities (Verghese et al. 2003), and to a lesser extent, physical activity (Rovio et al. 2005), as the most important protective factors that can delay or prevent the onset of clinical symptoms. Although little improvement of cognitive function has been observed in humans after "brain training" sessions, further empirical evidences from animal studies are required (Owen et al. 2010).

Murine models of AD and other neurodegenerative diseases have been tested in enriched environment (EE) paradigms that are initially aimed at stimulating cognitive activities. Exposure of EE animal models of AD have reported both prevention of cognitive dysfunction (Jankowsky et al. 2005; Wolf et al. 2006; Costa et al. 2007) or little or no effect on memory (Gortz et al. 2008; Cotel et al. 2012). Some controversies about the effects on amyloid pathology have also been reported (Jankowsky et al. 2003; Arendash et al. 2004; Lazarov et al. 2005). A key question lies on the interpretation of what the EE is modelling. For example, EE may be modelling a normal daily life-style relative to standard housing as a deprivation state instead (Nithianantharajah and Hannan 2006). Another point refers to the complexity of EE protocol. It usually requires the exposition to physical activity, social interaction or enriched environments, therefore making hard the identification of the relative contribution of each factor to the observed cognitive benefits. In this sense, isolated social or physical enrichment were

reported to occur with either insufficient or poor cognitive benefits (Wolf et al. 2006; Cracchiolo et al. 2007; Mirochnic et al. 2009), suggesting that enhanced cognitive stimulation is also required. A paradigm for cognitive enrichment evading other types of sensory-motor stimulations might be developed in order to provide support to the hypothesis formulated by epidemiological data that intellectual occupations contribute to cognitive reserve and, eventually, compensation for AD pathology.

In the present work, we have elaborated and validated a novel protocol for cognitive stimulation (CS) that comprises a long training on problem-solving tasks. The transgenic mice Tg2576 and their wild-type littermates were used to study the long-term effects of cognitive stimulation on AD pathology and cognitive functioning.

2. Material and Methods

2.1. Animals

Sixteen female transgenic mice (Tg2576) over-expressing human amyloid precursor protein (hAPP) carrying the Swedish familial mutation (K670N/M671L) (Hsiao et al. 1996) under the genetic mixed hybrid background C57BL/6/SJL and sixteen wild-type littermates (WT) with the same genetic background were used. At the age of 3 months, mice were housed in standard laboratory cages (43x27x15 cm) in groups of 4. All mice were kept in the same room under controlled temperature ($21\pm 1^{\circ}\text{C}$) and humidity ($55\pm 5\%$) on a 12-h light–dark cycle. Cage bottoms, water bottles and sipper tubes were cleaned twice per week, wire lids were cleaned monthly, and food/water were provided ad libitum. All the animals were handled under the same conditions and by the same experimenters throughout the duration of experiments in order to avoid potential influence on cognition.

As described later in the text, following the assessment of memory function through a short version of Morris water maze, mice were assigned to “cognitive stimulation” (CS) or “naïve” groups in order to create uniform groups in terms of basal cognitive function.

Experimental procedures were conducted in accordance with European and Spanish regulations (2003/65/EC; 1201/2005) and approved by the Ethical Committee of University of Navarra (068-11).

2.2. Cognitive stimulation paradigm

Cognitive stimulation paradigm was aimed at keeping mice cognitively active for a period of 8 weeks. For this purpose, mice were allowed to find and learn the pathway to reach a goal through a Lashley-type maze. The goal consisted of a food stimulus, in particular a piece of wheaten “digestive” biscuit. This paradigm intends to generate response learning, where mice choose the correct sequence of right-left responses depending on which choice led them to the food stimulus in previous trials. The food stimulus reinforces the correct choices. No extra-maze cues were allowed in order to avoid place learning. Cognitive stimulation was induced by exposing mice to solve 8 different problems, one per week. 8 different Lashley-type mazes were manufactured in our lab, having every maze (made of black wooden walls: 27 x 54 x 18 cm) a unique design so that there is only one pathway, different to each other maze, to reach the goal. A schematic illustration of each maze can be seen in Fig. 1A. Animals were trained for 4 days (Monday, Tuesday, Wednesday and Friday) and 2 trials per day in each of the 8 mazes for 8 weeks. Number of entry errors and latency to reach the goal was measured as the main outcomes. Three criteria were applied in order to achieve a stimulus-induced seeking of the goal and attain standard levels of learning among mice: 1) Trial was considered finished only after a mouse that reached the goal stayed the sufficient time to savor the food reward. 2) Mice that did not fulfill the first criterion after expiring the trial time (maximum of 10 min) were gently guided all along the successful path from the start to the goal and forced them to stay there until they savoured the reward. 3) Mice were kept in fasting conditions on Tuesdays and Fridays in order to induce conditioned seeking towards food stimulus. Mice were normally fed on Wednesdays and Thursdays were skipped in order to avoid extended fasting.

Animals subjected to cognitive stimulation are referred as “CS” mice. To discard whether the effects of this training protocol could be attributable to the inherent physical and exploratory activity needed to perform the task, one subset of mice from each genotype was subjected to an open-field environment in order to provide these control animals with a similar

sensory stimulation, which did not require any stimulus-induced response learning (study design shown in Fig. 1B). This animal group, which was referred as “naïve”, was also allowed to taste the same food reward at the end of the trial.

2.3. Behavioural Tests

2.3.1. Novel Object Recognition Test (NORT).

Test was performed as previously described (Aisa et al. 2007). In short, animals were first familiarized with the arena for 30 min and one day after, mice were allowed to explore two identical objects during 5 min. Retention was assessed 1 and 24 hours later, when one object was replaced by a novel one each time. Retention score is expressed as discrimination index (percentage of time exploring the novel object to the total time of object exploration).

2.3.2. Morris Water Maze (MWM).

The maze consisted of a white circular tank (140 cm diameter × 55 cm high) filled with water (20–22°C). Test was performed as previously described (Cuadrado-Tejedor et al. 2011) with some modifications. In the hidden version of the acquisition phase, a 10-cm diameter white platform was positioned 1 cm below the water surface and the tank was surrounded by white curtains showing black geometric cues. In the visible platform version, a black platform was placed 1 cm above the water surface. Time spent to reach the platform (latency) was recorded. Mice were trained in the MWM at two different time points in life; first, a short version of MWM was carried out before the start of the experimental design in order to check whether both WT and Tg2576 mice had similar cognitive abilities; and second, right after the end of training procedures in order to check the its effects on memory.

Prior to the training in the CS paradigm, cognitive behaviour of 4 months-old mice was analysed by a short version of MWM. 3 days prior to the hidden platform phase, a visible platform version was carried out for 3 consecutive days and 4 trials per day with an inter-trial interval of 2 h. Animals that showed floating, thigmotactic, wandering and other behaviours that could affect learning were discarded from the study, and the rest were next trained in the hidden platform version for 3 consecutive days and 4 trials per day with an inter-trial interval of

2 h. The retention phase (no platform) was carried out at the 4th day. Mice were allowed to swim for 60 s and time in the target quadrant was measured. Besides checking the cognitive status of WT and Tg2576 mice before the beginning of training paradigm, the short version of MWM allowed an equally distribution of animals between CS and naïve groups in terms of cognitive abilities.

Just after the 8-week training paradigm, 16 months-old mice were trained for 6 consecutive days and 4 trials per day with an inter-trial interval of 2 h in the hidden platform version. To ensure that memory differences were not due to lack of task learning, mice that did not reach the platform were led to the platform and allowed to stay for 15 s. The visible platform version was avoided since it was performed at the beginning of the study. The retention phase (no platform) was carried out at the 4th and 7th day. Mice were allowed to swim for 60 s and time in the target quadrant was measured.

2.4. Biochemical Measurements

2.4.1. Protein extraction.

16 months-old fasting mice were killed by decapitation. For immune-blotting of most of the proteins in shown in the present work, proteins were extracted from hippocampi after homogenization in HEPES buffer saline (0.2 M NaCl, 2 mM Na₄P₂O₇, 0.1 M HEPES, 10% glycerol, 200 mM, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mM DTT) containing protease and phosphatase inhibitors (NaF, 0.5 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM benzamidine, 10 mg/ml leupeptin, 400 U/ml aprotinin) and 1% NP-40. Homogenates were centrifuged at 14,000 g for 20 min at 4 °C, and supernatant stored at -80 °C.

For immune-blotting of APP-derived fragments, proteins were extracted from hippocampi after homogenization in a buffer containing Tris-HCl (10 mM, pH 7.4), SDS 2% and protease and phosphatase inhibitors. Homogenates were sonicated and centrifuged at 100,000 g for 1 h. Supernatant was stored at -80°C. Protein concentration was determined by Bradford (BIO-RAD, Hercules, CA, USA).

For ELISA determination of A β ₁₋₄₂ and A β ₁₋₄₀ peptides from soluble and insoluble fractions, protein were extracted as follows: hippocampi were homogenized in 4 volumes of Tris-HCl buffer saline (25mM Tris-HCl, 2 mM 1,10-phenanthroline, 5 mM EDTA, 140 mM NaCl, 3 mM KCl, pH 7,4) containing a protease inhibitor cocktail from Roche. Homogenates were centrifuged at 100,000g for 1h at 4 °C. Supernatant contained the “soluble fraction” and pellet contained the “insoluble fraction”. To prepare the insoluble fraction, pellet was dissolved in 4 volumes of ice-cold Guanidine Buffer (5 M guanidine-HCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) diluted 1 : 20. After over-night mixing at room temperature in DPBS buffer containing 5% BSA and 0.03% Tween-20, sample was centrifuged at 20,000 g for 20 min at 4 °C.

2.4.2. Immuno-blotting.

Samples were mixed with equal volume of loading buffer (0.16 M Tris-HCl pH 6.8, 4 % SDS, 20 % glycerol, 0.01 % bromophenol blue, 0.1 M DTT) and ran in SDS-PAGE. Proteins were transferred to BioTrace™ Nitrocellulose membranes (PALL CORPORATION, Port Washington, NY, USA). Gel conditions and primary antibodies are summarized in Table 1. Secondary antibodies conjugated to IRDye 800CW or IRDye 680CW (LI-COR BIOSCIENCES, Lincoln, NE, USA) were diluted to 1/15,000 in TBS with 5% BSA. Bands were visualized using ODYSSEY Infrared Imaging System (LI-COR BIOSCIENCES, Lincoln, NE, USA). β -actin was used as loading control. Results were expressed as O.D. values relative to WT-naïve mice. For APP-derived fragments, samples were mixed with XT sample buffer plus XT reducing agent (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) and boiled for 5 min. Proteins were transferred to PVDF membranes (AMERSHAM BIOSCIENCES, Buckinghamshire, UK). HRP-conjugated secondary antibodies were diluted to 1 : 5000 (DAKO, Glostrup, Denmark). Bands were detected by enhanced chemiluminescence system (ECL, AMERSHAM BIOSCIENCES, Buckinghamshire, UK), and autoradiographic exposure to Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences). Signal was quantified by using Quantity One v.4.6.3 software (BIO-RAD, Hercules, CA, USA).

Note that some proteins bands were obtained as a result of stripping (Stripping buffer, PIERCE, IL, USA) and re-probing the membrane. However, membranes were never reused for more than 4 times (Table 1).

2.4.3. Determination of β -amyloid levels. As afore mentioned, β -amyloid peptides were extracted from both the soluble and insoluble fraction.

Human A β ₁₋₄₂ and A β ₁₋₄₀ levels from Tg2576 samples were measured in duplicate by a sandwich ELISA kit (BIOSOURCE, Chevy Chase, MD, USA) following the manufacturer's instructions. The detection range was 6-1000 pg/mL. Murine A β ₁₋₄₂ from WT samples were analysed in duplicate by a high-sensitive sandwich ELISA kit (DAKO, Glostrup, Denmark). The detection range was 0.5-100 pg/mL.

2.4.4. Amyloid plaque staining.

Left hemispheres from 4 mice per group were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in 0.1M PBS (pH 7.4) for 24 h followed by 10% sucrose solution. Brains were cut into series of 20 μ m slides. Free-floating sections were incubated in 70% formic acid for 10 min, and then blocked with 2% of normal goat serum in PBS with 0.3% Triton X-100 for 30 min prior to incubation with 6E10 primary antibody over-night at 4 °C. Then, sections were incubated with secondary antibody (1:500; SANTACRUZ BIOTECHNOLGY, Santa Cruz, CA, USA) for 2 h in blocking solution, followed by incubation in ABC-Elite HRP (VECTOR LABORATORIES, Burlingame, UK). Reactions were visualized by developing the sections in DAB (VECTOR LABORATORIES, Burlingame, UK). Sections were rinsed in PBS, dehydrated and mounted in DPX (BDH, Poole, UK). For control staining the primary antibody was omitted. 8 sections per hippocampus were processed and captured into images with Nikon Eclipse E800 microscope and Nikon FDX35 camera. Area covered by amyloid plaques was analyzed by Image J v. 1.43u software (NIH Image).

2.5. Statistical analysis

All results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). The outcomes measured in the cognitive stimulation paradigm were analysed by one-way ANOVA (genotype (WT/Tg2576)) with and additional factor (days) as repeated measurement for each week. As no significant interaction between genotype and days was found, main effect of "days" was assessed by one-way ANOVA followed by Tukey test. Biochemical data were evaluated by two-way ANOVA (genotype (WT/Tg2576), training (naïve/CS)). When interaction between factors was significant, single effects were analysed by one-way ANOVA followed by post hoc Tukey test. The value from F of interaction together with the probability associated to the single

comparison was indicated. When no significant interaction between factors was found, main effects were analysed. Statistical analysis of MWM acquisition was performed by two-way ANOVA with an additional factor (days) as repeated measurement. When interaction between factors was found, intra-group differences were checked by one-way ANOVA followed by Tukey test. In those cases where only two groups were compared, data were evaluated by Student's t test. Number of animals per group ranged from 6 to 8. The level of significance was set at $P < 0.05$. All analyses were performed using SPSS 15.0 packages of Windows (IL, USA).

3. Results

3.1. Effects of cognitive stimulation on memory and synaptic markers

Prior to training, cognitive function of mice was tested in a short version of the MWM (3 days of acquisition in the hidden platform version plus a probe trial in the next day). Normal cognitive abilities were confirmed as both WT and Tg2576 showed better escape latencies on the 3rd day of the hidden platform (main effect of "Day"; $F_{(2,45)} = 5.66$, $P < 0.05$ vs 1st day, WT group; $F_{(2,45)} = 3.92$, $P < 0.05$ vs 1st day, Tg2576 group) as well as on the visible platform version (main effect of "Day"; $F_{(2,45)} = 14.04$, $P < 0.01$ vs 1st day, WT group; $F_{(2,45)} = 18.72$, $P < 0.01$ vs 1st day, Tg2576 group) (Fig. S1A-C).

Mice were considered to have achieved a successful performance when latency to reach the goal was significantly reduced from the 1st day to the last (4th). No improvement would have indicated a lack of learning, and therefore, a fail in the purpose of inducing cognitive stimulation. Notably, mice showed improved escape latencies and decreased number or entry errors to find the goal over days (main effect of "day"; Week 1 as a representative example: $F_{(1,28)} = 8.89$, $P < 0.01$ for escape latency; $F_{(1,28)} = 12.33$, $P < 0.01$ for number of entry errors; See Fig. 1C and D). A video recorded the 4th day of week 7 shows a Tg2576 mouse that was able to reach the goal with no entry errors (Supplementary Material). As it can be observed, transgenic animals showed a better performance, which was particularly evident at

week 4 and 5. A possible beneficial effect of β -amyloid on learning at a young age, when levels are not high enough to cause neurodegeneration (Puzzo et al. 2011), can not be ruled out.

After the training sessions mice were kept in standard-housing conditions for 8 months until the age of 16 months-old. Then, effects of CS on memory were assessed by two different behavioural tests: MWM and NORT. These tasks are mainly dependent on spatial and recognition memory, respectively, which are two types of memory largely affected in AD and Tg2576 mice as well (Hsiao et al. 1996; Mouri et al. 2007). This long lag between the end of CS paradigm and the beginning of cognitive characterization is due to the onset of cognitive decline in Tg2576 mice. Despite there are some discrepancies about the onset of spatial memory impairment in Tg2576 mice (Hsiao et al. 1996; Morgan et al. 2000; Westerman et al. 2002), the age of 15-16 months seems to be proper for detecting decline in both types of memories (Tagliatela et al. 2009; Cuadrado-Tejedor et al. 2011).

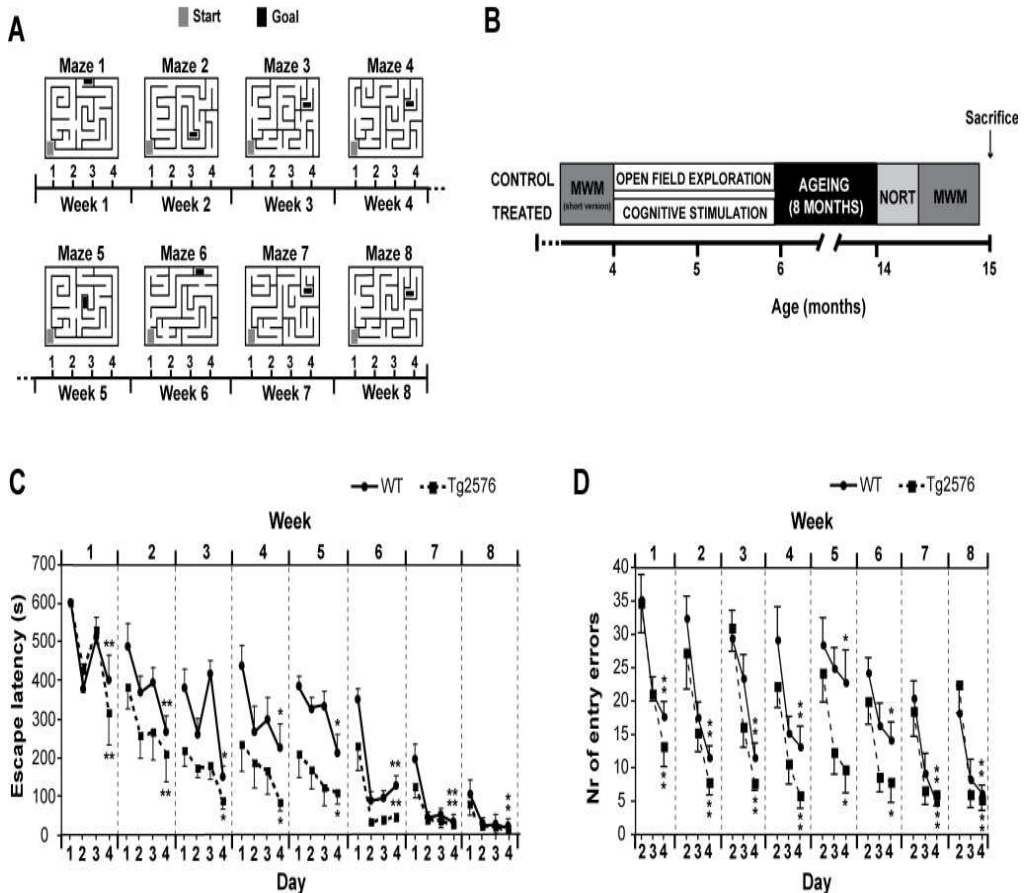


Figure 1. Study design and validation of the cognitive stimulation paradigm. **(A)** A schematic picture of each maze where mice were trained for cognitive stimulation is shown. Note that each maze has a unique design, that there is only one pathway to the goal and that the pathway is different in each maze. Mice were allowed to learn the pathway to reach the goal of every maze, which consisted of a food reward, for 1 week. Numbers from 1 to 4 refer to the days of the week when mice were allowed to explore the maze (1, Monday; 2, Tuesday, 3, Wednesday; 4, Friday). The paradigm for cognitive stimulation included a total of 8 mazes and 8 weeks. **(B)** Sixteen wild-type and sixteen Tg2576 mice at the age of 4 months were subjected to either a CS paradigm for 8 weeks or an open-field exploration for the same period of time. Prior to CS paradigm, animals were subjected to a short version of MWM in order to check their basal cognitive abilities. After CS paradigm, animals were aged for 8 months and then behavioural test (NORT and MWM) were performed. At the age of 16 months, animals were sacrificed and biochemical assessments were carried out. **(C, D)** To validate the induction of cognitive activity by the cognitive stimulation paradigm, escape latency **(C)** and number of entry errors **(D)** to reach the goal and stay the sufficient time to savour the food reward was measured. Mice from both genotypes showed improved escape latencies and decreased number of entry errors in every task (week). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs day 1 **(C)** or vs day 2 **(D)**. Data are expressed as mean \pm S.E.M. WT-naïve, $n = 8$; WT-CS, $n = 8$; Tg2576-naïve, $n = 8$; Tg2576-CS, $n = 8$.

As expected, Tg2576-naïve mice displayed impaired retention memories in the probe trials carried out at day 4 ($F_{(1,26)} = 8.02$, $P < 0.05$ vs WT-naïve; Fig. 2A) and 7 ($F_{(1,26)} = 9.74$, $P < 0.01$ vs WT-naïve; Fig. 2A). Tg2576-naïve mice, which showed similar swimming speed than WT (data not shown), did not achieve significant longer escape latencies during the acquisition phase (Fig. 2B). It is important to note that Tg2576-naïve mice did not show lower escape latencies over days, which means that they were not able to learn the platform location ($F_{(5,35)} =$

1.51, $P = 0.21$), while Tg2576-CS mice did shorten escape latency to platform over days ($F_{(5,30)} = 2.63$, $P < 0.05$; Fig. 2B). No significant differences on escape latencies between groups were found in the visible platform version as well (data not shown). Regarding memory retention, transgenic animals subjected to CS presented better performance in both probe trials, reaching similar retention scores than WT animals (Fig. 2A). In contrast, WT animals subjected to CS did not perform better retention than WT-naïve (Fig. 2A). In the same manner, Tg2576-naïve mice showed impaired object recognition memory as they did not preferentially discriminate in favour of the novel object ($F_{(1,26)} = 8.94$, $P < 0.01$ vs WT-naïve, 1 h; $F_{(1,26)} = 6.22$, $P < 0.01$ vs WT-naïve, 24 h) but, interestingly, Tg2576-CS achieved similar discrimination indexes than WT-naïve mice at both retention times (Fig. 2C).

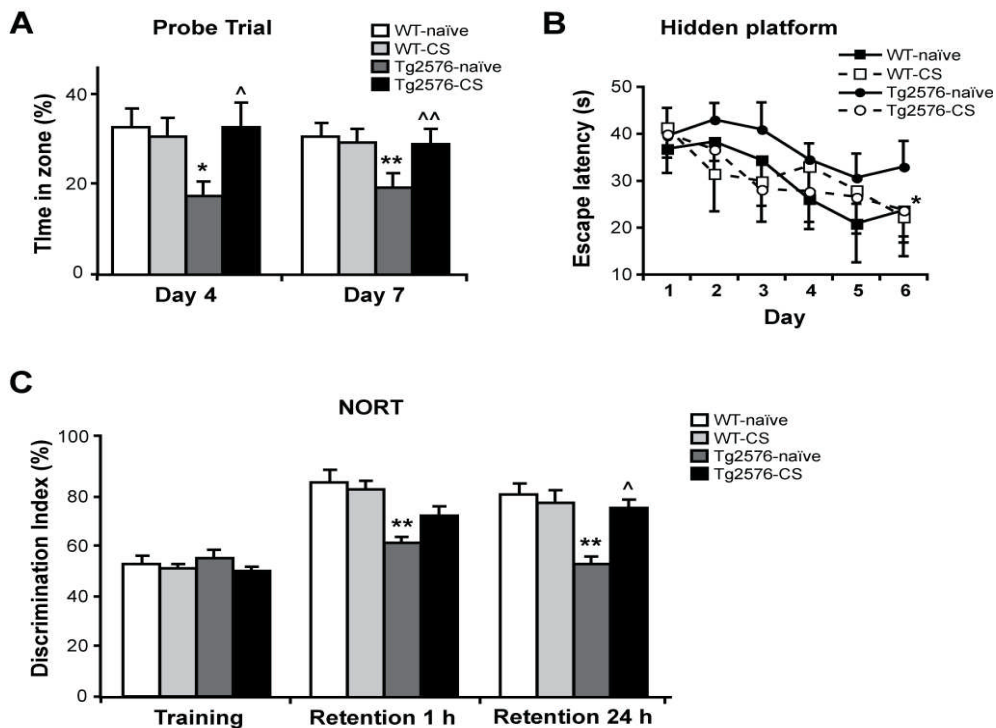


Figure 2. Cognitive stimulation delays the memory deficits observed in 16-month-old Tg2576 mice, as studied by MWM (A-B) and NOR (C) tests. (A) Percentage of time spent in the target quadrant over a total duration of 60 seconds. At both the 4th and 7th day after the beginning of training Tg2576 mice showed impaired retention, which was reverted by cognitive stimulation. (B) In the hidden platform version of acquisition, no significant differences on escape latencies were found between groups. However, while Tg2576-naïve mice did not manage to lower escape latency to find the platform over days, Tg2576-CS as well as WT-naïve and WT-CS mice did. * $P < 0.05$, day 6 vs day 1. (C) Tg2576 mice showed impaired recognition memory, as shown by decreased discrimination index to a novel object, both 1 and 24 h after training with 2 similar objects. Tg2576-CS mice presented a recovered recognition memory, which only reached the level of significance at 24h post-training. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs WT-naïve; [^] $P < 0.05$, ^{^^} $P < 0.01$ vs Tg2576-naïve. Data are expressed as mean \pm S.E.M. WT-naïve, $n = 7$; WT-CS, $n = 8$; Tg2576-naïve, $n = 8$; Tg2576-CS, $n = 7$.

It is well accepted that hippocampal synaptic plasticity is essential for mediating the formation of new memories (Neves et al. 2008). The observed improvement of memory abilities in cognitive-stimulated Tg2576 mice might be thus attributable to different expression levels of long-term activity-associated synaptic proteins. To test this hypothesis, we then assessed the state of several synaptic markers. Pre-synaptic markers were found either unaltered, as the case of synaptophysin, or decreased, as the case of VGLUT-1 ($F(1,21) = 7.74$, $P < 0.05$), but unaffected by CS (Fig. 3A). Interestingly, some proteins recruited into the post-synaptic density as PSD95 and its partner the NR1 subunit of NMDA receptors (Fig. 3B), as well as such proteins involved in synaptic consolidation and formation as Arc and β -catenin (Fig. 3C), were found decreased in Tg2576 mice (PSD95, $F(1,21) = 10.85$, $P < 0.05$; NR1, $F(1,23) = 30.96$, $P < 0.01$; Arc, $F(1,23) = 5.425$, $P < 0.01$; β -catenin, $F(1,23) = 6.26$, $P < 0.05$), but preserved by CS.

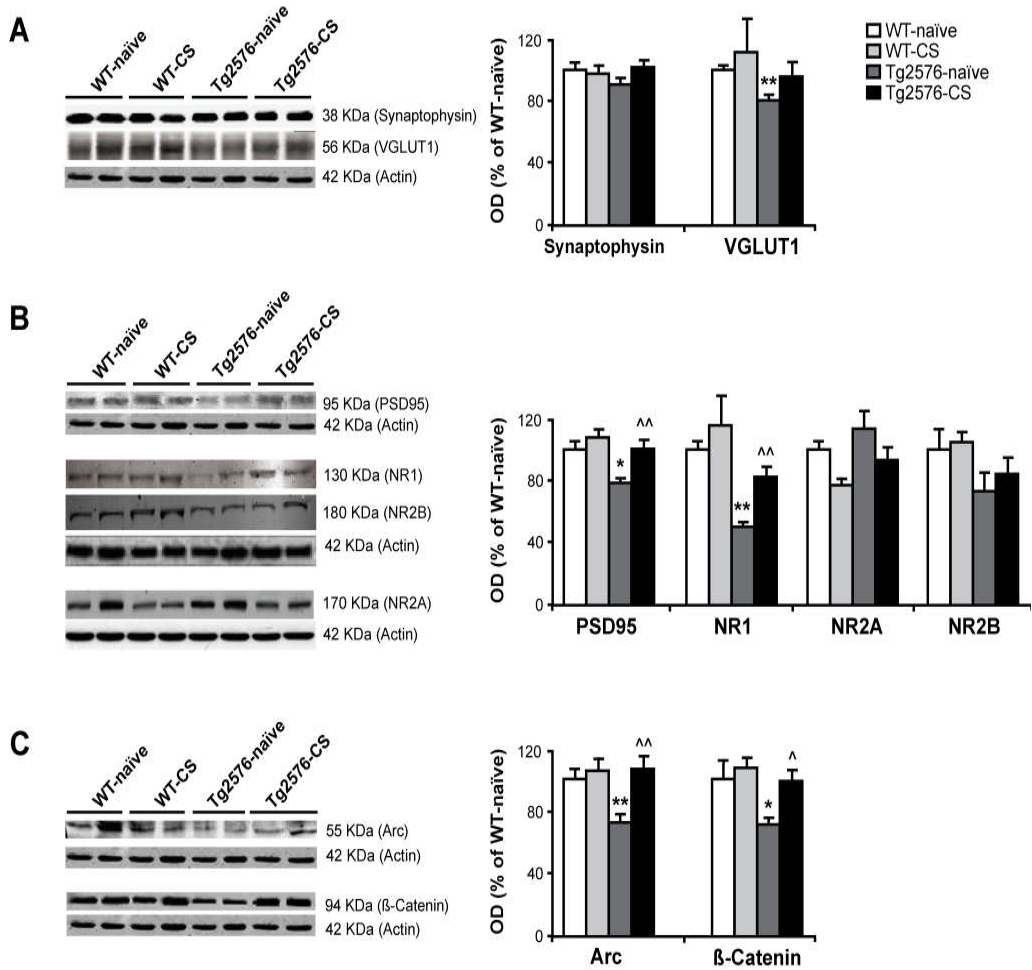


Figure 3. Cognitive stimulation protects from the synaptic pathology observed in 16 months-old Tg2576 mice. Although pre-synaptic markers as synaptophysin or the vesicular transporter VGLUT1 seem to be little or no affected in hippocampus from Tg2576 (A), post-synaptic markers PSD95 and the subunit of NMDA receptors NR1, but not NR2A or NR2B, were found decreased. Levels of PSD95 and NR1 were found significantly increased by CS in Tg2576 mice (B). Hippocampal levels of Arc and β-catenin, which are proteins with an important role in synaptic consolidation and formation, were also found decreased in Tg2576 mice, but recovered after CS (C). Western-blot quantifications are normalized to β-actin levels *P < 0.05, **P < 0.01 vs WT-naïve; ^P < 0.05, ^^P < 0.01 vs Tg2576-naïve. Data are expressed as mean ± S.E.M. WT-naïve, n = 6; WT-CS, n = 6; Tg2576-naïve, n = 6; Tg2576-CS, n = 6-8. OD refers to optical density.

3.2. Decreased soluble Aβ species but constant plaque burden in Tg2576 mice subjected to cognitive stimulation

Accumulating evidence supports soluble Aβ oligomers, rather than Aβ fibrils, as fundamental triggers for the pathological and cognitive symptoms observed in AD (Larson and

Lesne 2012). We found that SDS-soluble $A\beta_{1-42}$ and $A\beta_{1-40}$ levels in cognitive-stimulated Tg2576 mice were reduced by 40% and 20%, respectively, when compared to the naïve group ($t_{(1,12)} = 5.86$, $P < 0.01$ for $A\beta_{1-42}$; $t_{(1,12)} = 2.46$, $P < 0.05$ for $A\beta_{1-40}$; Fig. 4A). Tg2576-CS mice presented unchanged levels of insoluble GuHCl-extracted $A\beta_{1-40}$ and a slight but significant decrease in $A\beta_{1-42}$ ($t_{(1,12)} = 5.72$, $P < 0.01$) (Fig. 4A). In contrast, CS did not appear to affect the levels of murine $A\beta_{1-42}$ in either the soluble or insoluble fraction of WT brains (Fig. 4A).

The total burden of 6E10-immunoreactive amyloid plaques remained similar in both groups as well (Fig. 4B). These results indicate that CS is likely to induce major changes in the levels of soluble $A\beta$, however, fail to provide real information about which $A\beta$ oligomeric assemblies are involved in this process. To solve this drawback, electrophoresis of extracellularly-enriched SDS homogenates was run. Notably, a band around 56-kDa was found in Tg2576 samples but was absent in WT samples when immuno-blotting the membranes with 6E10 antibody (4C). This band, which could presumably correspond to the amyloid dodecamer (also referred as $A\beta^*56$) was found dramatically reduced by 45% in cognitive-stimulated Tg2576 mice ($t_{(1,10)} = 6.19$, $P < 0.01$; Fig. 4C). To discard misinterpretations caused by artefacts, samples were pre-treated with 10% hexafluoroisopropanol (HFIP), an organic solvent that breaks up $A\beta$ oligomers, and immunoblotted again with 6E10 antibody, resulting in the dissolution of the 56-kDa band (Fig. 4C).

Remarkably, levels of soluble $A\beta_{1-42}$ as well as $A\beta^*56$ showed a strong and inverse correlation to both NORT (Pearson's $r = -0.90$, $P < 0.01$; Pearson's $r = -0.70$, $P < 0.01$, respectively) and MWM retention scores (Pearson's $r = -0.78$, $P < 0.01$; Pearson's $r = -0.58$, $P < 0.01$, respectively), suggesting an important link between decreased levels of soluble $A\beta$ species and the CS-induced reversion of cognitive deficits (Fig. 4D).

The reason for such a reduction in the levels of soluble $A\beta$ may be due to a modulation of APP processing. APP-derived fragments and APP secretases were analyzed by immuno-blotting.

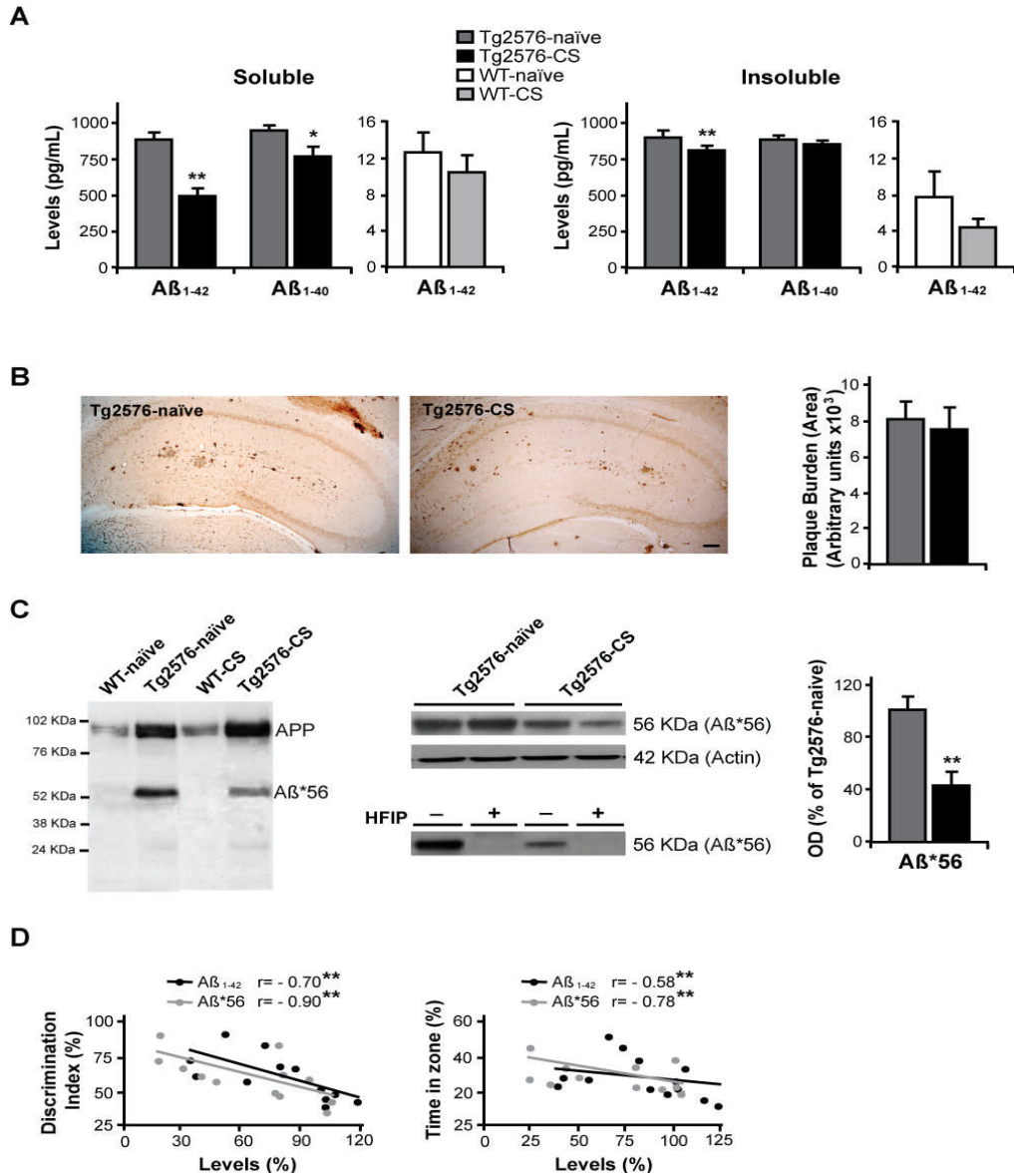


Figure 4. Tg2576 mice exposed to cognitive stimulation shows reduced levels of soluble A β species at the age of 16 months. **(A)** Soluble A β ₁₋₄₀ and, particularly, A β ₁₋₄₂ assessed by ELISA were found significantly decreased in hippocampus of Tg2576-CS mice (left panel). However, only levels of the insoluble species A β ₁₋₄₂ presented a little and significant change (right panel). Levels of both soluble and insoluble murine A β ₁₋₄₂ were found unaltered in WT-CS when compared to WT-naïve mice. WT-naïve, n = 7; WT-CS, n = 7; Tg2576-naïve, n = 8; Tg2576-CS, n = 6. **(B)** Immunostaining with 6E10 antibody did not show any particular change in the amyloid plaque burden between naïve and cognitive-stimulated Tg2576 animals. Scale bar, 100 μ m. Tg2576-naïve, n = 3; Tg2576-CS, n = 3. **(C)** Immunoblotting with 6E10 antibody revealed a band around 56 KDa, which was present in Tg2576 mice but absent in WT mice (left panel). The fact that this band is not present in WT mice and is dissolved by pre-treating samples with HFIP, makes this band likely attributable to the amyloid dodecamer A β *56. A β *56 was strikingly decreased by CS (middle and right panel). Tg2576-naïve, n = 5; Tg2576-CS, n = 6. **(D)** Soluble levels of A β ₁₋₄₂ and A β *56 strongly correlated with memory retention scores at both NOR (Discrimination index; left panel) and MWM tests (Time in target zone; right panel). Pearson's correlation coefficient "r" is shown. Western-blot quantifications are normalized to β -actin levels. *P < 0.05, **P < 0.01 vs Tg2576-naïve. Data are expressed as mean \pm S.E.M. OD refers to optical density.

As expected, Tg2576 mice expressed higher levels of the full-length APP when compared to WT animals ($F_{(1,23)}= 2512.47$, $P < 0.01$). However, whereas full-length APP remained unchanged between Tg2576-naïve and Tg2576-CS (Fig. 5A), levels of β -secretase-derived C-terminal C99 fragment were reduced ($F_{(1,23)}= 11.46$ $P < 0.01$) and the α -secretase-derived C83 fragment increased ($F_{(1,23)}= 5.76$, $P < 0.01$) in Tg2576-CS mice (Fig. 5A). Despite steady-state levels of an enzyme do not always reflect changes in activity; it was found that CS returned the augmented β -secretase BACE1 levels observed in Tg2576-naïve mice to those of WT-naïve animals ($F_{(1,23)}= 8.62$, $P < 0.01$; Fig. 5B), and increased α -secretase ADAM17 ($F_{(1,23)}= 6.72$, $P < 0.05$; Fig. 5B). These results might suggest a shift towards diminished amyloidogenic and augmented non-amyloidogenic processing of APP.

3.3. Cognitive stimulation compensates for tau pathology in Tg2576 mice

As hyper-phosphorylation of tau is a common feature of AD and other neurodegenerative disorders it was next examined whether CS might be beneficial on this pathological event. According to reported data, tau pathology in Tg2576 mice in terms of altered phosphorylation state of tau and its related kinases was observed (Tomidokoro et al. 2001). Immuno-blotting with AT-8 antibody revealed that phosphorylation at Ser202/Thr205 residues was markedly increased in Tg2576-naïve when compared to WT animals ($F_{(1,25)}= 5.30$, $P < 0.05$; Fig 6A and E). Notably, cognitive-stimulated Tg2576 mice showed similar levels of phospho-tau than WT mice (Fig. 6A and D). No differences in total tau levels between experimental groups were found (Fig 6A). The activity of several kinases involved in abnormal tau phosphorylation was next assessed by calculating the ratio between the phosphorylated form and the total level of each kinase. Active GSK-3 β (phospho-Tyr216) was found increased ($F_{(1,23)}= 8.48$, $P < 0.05$; Fig. 6B and F) and inactive form (phospho-Ser9) decreased in Tg2576-naïve mice ($F_{(1,23)}= 4.87$, $P < 0.05$; Fig. 6B and E). CS returned GSK-3 β activity to WT levels (Fig. 6B and E). In addition, despite no differences in Cdk5 levels were detected (Fig. 6B and E), a two-fold increase of the ratio p25/p35 was found in Tg2576-naïve mice ($F_{(1,16)}= 10.17$, $P < 0.01$; Fig. 6B and E), suggesting a higher constitutive activation of Cdk5 in these animals (Patrick et al. 1999). Yet again, Tg2576-CS mice showed similar levels than WT (Fig. 6B and E).

Tau's main function is to modulate the stability of axonal microtubules. Other microtubule-associated proteins (MAPs), such as MAP2A, are able to stabilize microtubules in dendrites as well, and its loss has been associated with dendrite degeneration. Immuno-blotting revealed that MAP2A levels were indeed decreased in Tg2576-naïve when compared to WT mice ($F_{(1,19)} = 4.51$, $P < 0.01$) but recovered in Tg2576-CS group (Fig. 6D and H).

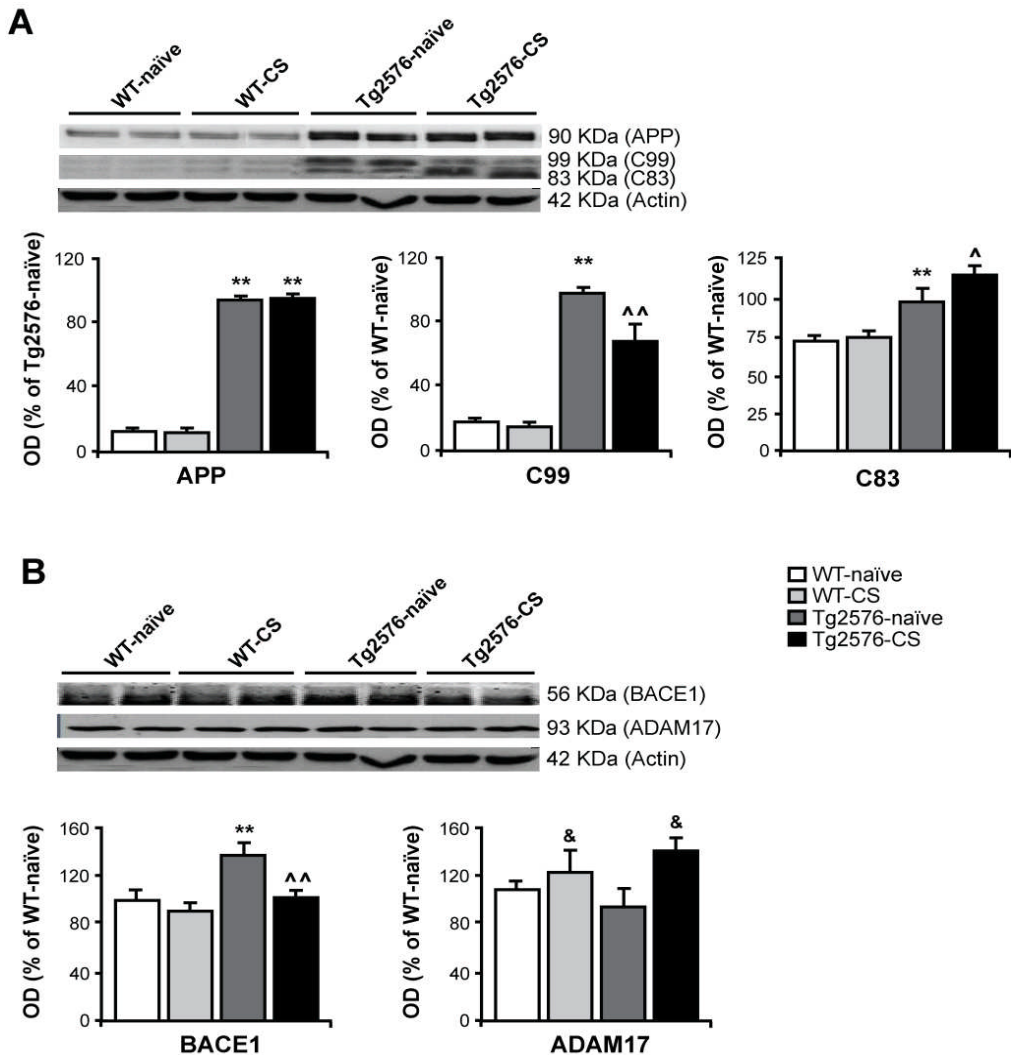


Figure 5. Cognitive stimulation induced changes in APP processing in 16 months-old Tg2576 mice. **(A)** Quantification of APP fragments revealed that Tg2576-CS mice presented lower levels of C99 and higher C83 in hippocampus when compared to naïve transgenic mice. In contrast, full-length APP remained unchanged. **(B)** Tg2576-naïve mice presented higher steady-state levels of the hippocampal β -secretase BACE1 but cognitive stimulation induced a decrease. As well, cognitive stimulation resulted in a subtle but significant increase of the α -secretase ADAM17 in both wild-type and transgenic animals. Quantifications are normalized to β -actin levels. ** $P < 0.01$ vs WT-naïve; $^{\wedge}P < 0.05$, $^{\wedge\wedge}P < 0.01$ vs Tg2576-naïve; $^{\&}P < 0.01$ vs naïve (single effect). Data are expressed as mean \pm S.E.M. WT-naïve, $n = 6$; WT-CS, $n = 7$; Tg2576-naïve, $n = 8$; Tg2576-CS, $n = 6$. OD refers to optical density.

Together these data suggest that CS is able to delay the tauopathy inherent to Tg2576 mouse at the age of 16 months. It is worthy of notice that decreased tau hyperphosphorylation is strongly correlated with reduced A β *56 and A β ₁₋₄₂ (Pearson's $r = 0.683$; $P < 0.05$; Pearson's $r = 0.763$, $P < 0.01$, respectively; data not shown), however, whether cognitive stimulation prevents tau pathology directly or secondary to modulation of amyloid pathology can not addressed in the present work.

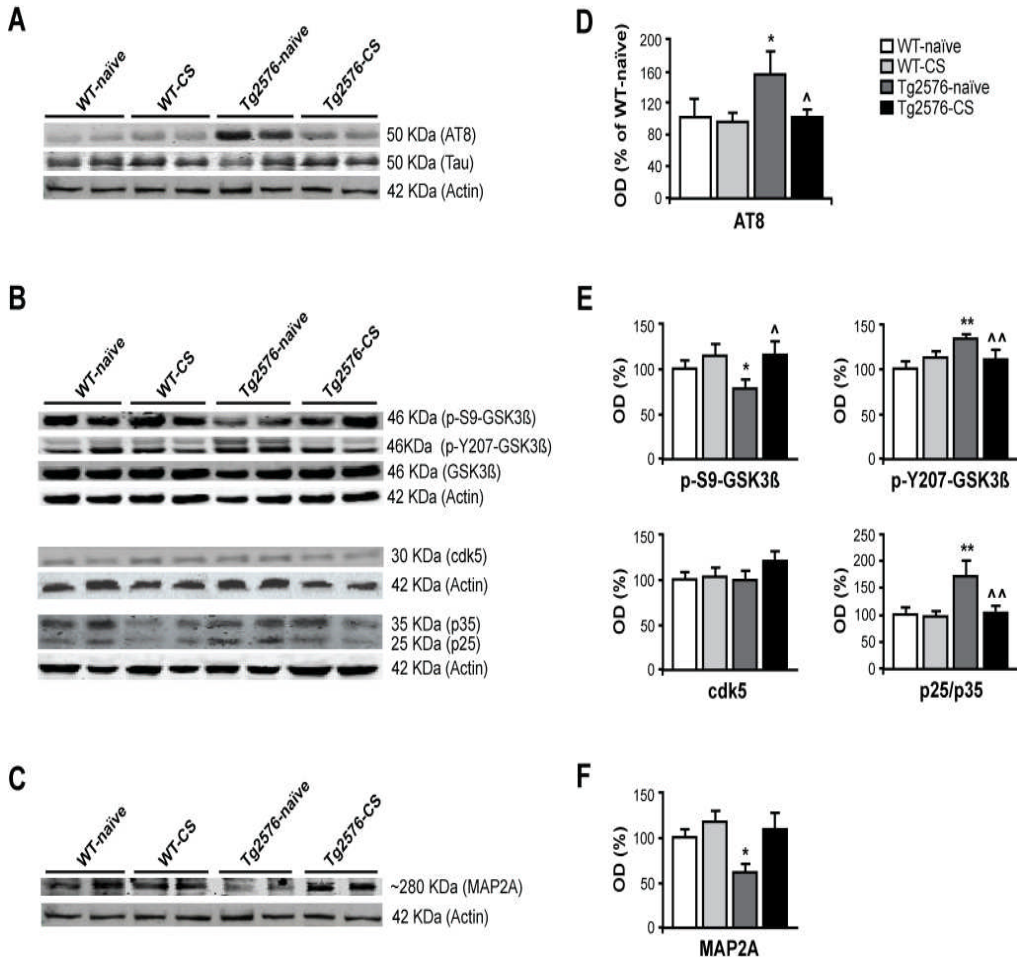


Figure 6. Cognitive stimulation compensates for the tau pathology inherent to 16 months-old Tg2576 mice. **(A, D)** Immuno-blot with monoclonal antibody AT8 revealed that tau phosphorylation at residues S202 and T205 were increased in Tg2576-naive but unchanged in Tg2576-CS mice. **(B, E)** Immuno-blots and quantification of tau kinases that showed altered state of activity. Levels of inactive p-S9-GSK3 β were found decreased and active p-Y207-GSK3 β increased in Tg2576-naive animals, while unchanged in Tg2576-CS mice. The ratio p25/p35, and indicator of cdk5 activity, was also increased in Tg2576-naive mice but unaltered in Tg2576-CS. **(C, F)** Levels of the microtubule-associated protein MAP2A were found decreased in Tg2576-naive animals but recovered in cognitive-stimulated transgenic mice. Quantifications of phospho-proteins are normalized to both total protein and β -actin levels. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs WT-naive; [^] $P < 0.05$, ^{^^} $P < 0.01$ vs Tg2576-naive. Data are expressed as mean \pm S.E.M. WT-naive, $n = 6$; WT-CS, $n = 6$; Tg2576-naive, $n = 6-8$; Tg2576-CS, $n = 6$. OD refers to optical density.

4. Discussion

In the present study, a novel training paradigm for CS, devoid of social, physical or enriched environments, has been elaborated and valued. AD transgenic mice exposed to this training throughout early-life manifested normal cognitive function, reduced synaptic deficit and decreased amyloid/Tau pathology at an older age.

One of the main findings is the simple and striking fact that a transient CS delays the onset of spatial and object recognition memory decline in Tg2576 mice after a lag of 8 months. The reason by which this CS induces strong long-lasting effects on cognitive function might lie in the time frame where CS was applied, since early-life stimulatory events appear to build cognitive reserve more effectively and, therefore, make the brain less susceptible to pathological changes. An “*in vivo*” study has added evidence on this assumption by showing that exposure to a transient stimulation with an enriched environment in early-life reduced the AD-related cognitive deficits more efficiently than exposure later in life (Verret et al. 2013). In contrast to the beneficial effects of CS observed in Tg2576 mice, trained WT mice did not show improved cognitive abilities in any of the tests performed. These observations may indicate that CS fails to provide any supplement against the physiological cognitive decline associated to ageing (Verbitsky et al. 2004), but may instead compensate for the memory loss associated to AD pathogenic processes. A previous study carried out in eleven thousand cognitively healthy humans subjected to “brain training” that failed to report benefits in untrained tasks might support this assumption (Owen et al. 2010).

Given the genotypic nature of Tg2576 mouse, APP should be a major player in the memory dysfunction developed by this transgenic mouse. Although effects of amyloid load on memory may be nonlinear and exhibit saturation (Westerman et al. 2002), data from correlational and experimental studies might suggest a causal role in memory disruption (Chen et al. 2000; Morgan 2003). We have found that cognitive training led to lowered soluble amyloid load while leaving amyloid plaque burden intact. Among the different amyloid assemblies that are present in the soluble fraction, the dodecamer referred as A β *56 were found notably reduced in CS transgenic animals. Previous studies that identified this oligomeric form as being most closely related to memory loss in younger Tg2576 mice (Lesne et al. 2006;

Cheng et al. 2007) imply a potential rationale by which CS might be compensating for the memory decline. Likewise, repeated training in a MWM over a period of 10 months reported similar benefits on the levels of A β *56 and MWM-related memory in the 3xTg-AD transgenic mice (Billings et al. 2007). In contrast to this study, the present work evaluated memory abilities in untrained tasks. Additionally, it was found a strong correlation between levels of A β *56 and retention scores in MWM and NOR tests, which, although far from providing a causal association, confirms the close connection of decreased A β *56 to CS-induced delay of cognitive decline. It is hypothesized that oligomeric A β *56 may rise prior to the formation of amyloid plaques, and therefore act as seeds for plaques (Kayed et al. 2003; Lesne et al. 2006). Speculatively, CS might be reducing A β *56 levels by 1) decreasing the production of monomers; 2) inducing its clearance; or 3) promoting its aggregation into plaques. The fact that training did not alter plaque burden and that A β *56 showed correlation to soluble but not to insoluble levels seems to discard the latter point. In contrast, the fact that CS showed reduced levels of C99 and BACE1, as well as increased the levels of C83 and ADAM17 indicates that the production of monomer might be decreased, thus leaving to reduced formation of the dodecamer. However, the idea that CS may lower A β *56 load by favouring its clearance can not be ruled out. It is important to note that CS likely induced a shift towards a more non-amyloidogenic processing of APP but remained the amyloid plaque burden intact. Although soluble amyloid species were found indeed decreased, the production of those amyloid species that are more prone to aggregate might have not been affected by CS.

Also noteworthy in the present study is that CS compensated for the abnormal Tau phosphorylation and high activities of GSK-3 β and cdk5 found in Tg2576 mice. Although transgenic mice do not suffer from real Tau pathology in terms of neurofibrillar tangles, these animals manifest age-related hyper-phosphorylated Tau-containing neurites and higher activities of various Tau kinases (Othth et al. 2002; Ferrer et al. 2005; Cuadrado-Tejedor et al. 2010). High inter-correlation between levels of A β *56/A β ₁₋₄₂ and phospho-Tau and a lack of CS effect on Tau phosphorylation in WT mice was also observed. These data, together with the increasing evidence of Tau abnormalities as a secondary event to amyloid pathology in the pathogenic continuum of AD (Othth et al. 2002; Hurtado et al. ; Jin et al. 2011), invite to speculate that prevention of Tau pathology by CS is likely to be a consequence of reduced amyloid load.

The strong differences at the molecular level between transgenic mice exposed to CS and naïve conditions after a lag of 9 months are quite striking. Based on previous animal studies, which have suggested that EE can impact a variety of processes involved with amyloid processing (Lazarov et al. 2005; Costa et al. 2007; Mirochnic et al. 2009), it is possible to speculate that CS may have reduced the production of toxic A β species to further induce changes on the development other AD-related pathological events or cognitive impairments. However, biochemical characterization at different time points after the CS paradigm should be carried out in order to accurately assess how big the delay caused by CS intervention could be. It would also be of great interest to understand why CS effects are specific for Tg2576 mice. The observation that CS did not affect levels of murine A β_{1-42} in WT mice implies that CS shows more benefits under particular pathogenic conditions, such as amyloid pathology, than under normal ageing. However, the molecular mechanisms underlying the lowering effects of CS on amyloid need to be elucidated.

EE has been used for several decades to study neuroanatomical and behavioural changes associated with cognitive stimulation. The application of EE to AD animal models has shown beneficial effects on cognitive and pathological symptoms (Jankowsky et al. 2005; Wolf et al. 2006; Costa et al. 2007). However, discrepancies have risen since not all the EE paradigms have been able to reduce memory impairments. For example, shorter durations of EE (2-4 months) failed to improve Y-maze or Barnes maze performances in either TgCRND8 or APP/PS1 mice (Gortz et al. 2008; Cotel et al. 2012). Varying outcomes on amyloid pathology (Jankowsky et al. 2003; Lazarov et al. 2005; Wolf et al. 2006; Cracchiolo et al. 2007; Cotel et al. 2012), have been also reported. Most studies have shown increased or stable amyloid plaque load after an EE ranging from 4 to 6 months (Jankowsky et al. 2005; Wolf et al. 2006; Cotel et al. 2012), but some studies with an EE ranging from 5 to months have found decreased deposition of amyloid (Lazarov et al. 2005; Cracchiolo et al. 2007). It is important to note that the effect on amyloid pathology do not necessarily correlate with cognitive function in most of these studies. EE protocols generally consist of a set of different stimuli as running wheels, coloured tunnels, visual stimulating toys, ladders and group housing (Hu et al. 2010), therefore providing a complex interaction between social abilities, physical skills and anti-stress environments. A novel approach to induce CS in WT and Alzheimer's mice while avoiding enriched environments and social/physical activities has been used and validated. The present findings would thus provide empiric evidence on the relative beneficial and long-lasting

contribution of an early-life CS paradigm on cognitive decline associated to AD and, in particular, on some pathological processes, such as synaptic, amyloid and Tau pathology.

Table 1. Antibodies and conditions used in immuno-blotting experiments

Protein	% Poly-acrylamide	Primary antibody (dilution)	T	Lysis
Buffer				
Arc	10%	ARC (1:1000) ^a	0	HBS
β -catenin	10%	β -catenin (1:1000) ^b	1	HBS
PSD95	10%	PSD95 (1:1000) ^b	2	HBS
Synaptophysin	10%	Synaptophysin (1:500) ^c	3	HBS
APP	Gradient (4-12%) ^h	APP 676-695 (1:2000) ^d	0	Tris-HCl
C99/C83	Gradient (4-12%) ^h	APP 676-695 (1:2000) ^d	0	Tris-HCl
A β *56 (dodecamer)	Gradient (4-12%) ^h	β -amyloid 1-16 (6E10) (1:1000) ^e	1	Tris-HCl
ADAM17	Gradient (4-12%) ^h	ADAM17 (1:1000) ^b	0	HBS
BACE1	Gradient (4-12%) ^h	BACE1 (1:1000) ^c	1	HBS
Phospho-Tau	10%	Phospho-Tau S202/T205 (AT8) (1:500) ^f	0	HBS
Total Tau	10%	Tau (1:1000) ^f	1	HBS
NR1	7.5%	NR1 (1:1000) ^g	0	HBS

Early cognitive stimulation in Tg2576

NR2A	7.5%	NR2A (1:1000) ^g	0	HBS
NR2B	7.5%	NR2B (1:1000) ^g	1	HBS
VGLUT1	10%	VGLUT1 (1:1000) ^g	4	HBS
MAP2A	10%	MAP2 (1:1000) ^g	2	HBS
Cdk5	7.5%	cdk5 (1:1000) ^a	0	HBS
p35/p25	7.5%	p35 (1:1000) ^a	1	HBS
Phospho-GSK3 β Ser9	7.5%	Phospho-GSK3 β S9 (1:1000) ^b	0	HBS
Phospho-GSK3 β Tyr207	7.5%	Phospho-GSK3 β Y207 (1:1000) ^b	1	HBS
Total GSK3 β	7.5%	GSK3 β (1:1000) ^b	2	HBS

^aSANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Santa Cruz, CA, USA; ^bCELL SIGNALLING TECHNOLOGY, Danvers, MA, USA; ^cABCAM, Cambridge, UK; ^dSIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA;

^eCOVANCE, Princeton, NJ, USA; ^fPIERCE, Rockford, IL, USA; ^gMILLIPORE, Billerica, MA, USA; ^hBIO-RAD, Hercules, CA, USA.

"T" refers to the number of Times that membranes were stripped before probing with the corresponding antibody.

HBS, HEPES buffer saline containing protease and phosphatase inhibitors, and NP-40.

Tris-HCl, Tris-HCl buffer containing protease and phosphatase inhibitors, and SDS 2%.

Figure S1

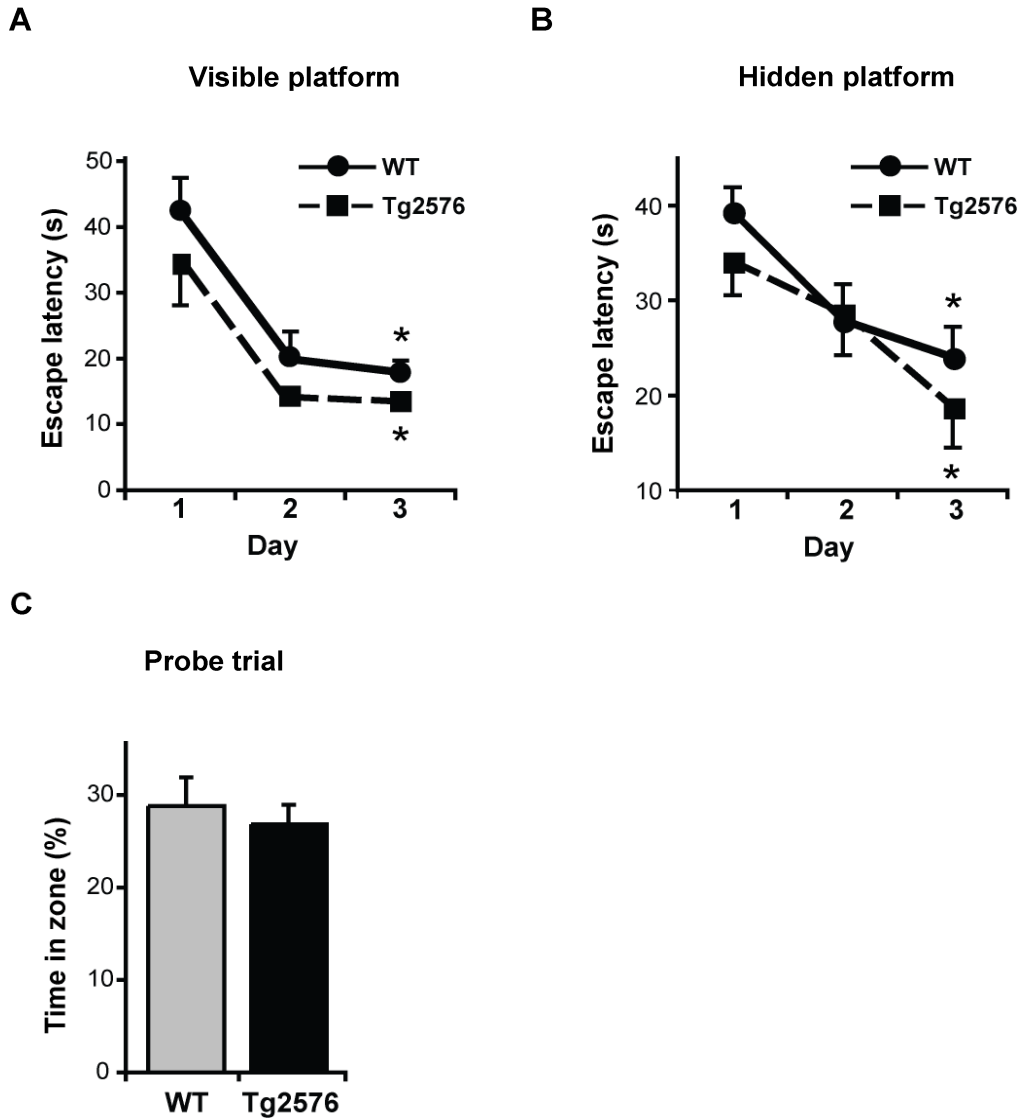


Figure S1. Short version of MWM demonstrates that both groups of animals (Tg2576 and WT) had intact and homogeneous cognitive abilities in terms of spatial memory at the beginning of the study (4 months-old). **(A)** Mice showed better escape latencies in the visible platform version. **(B)** Both groups of animals showed improved escape latencies at the day 3 of acquisition phase (hidden platform) when compared to day 1. **(C)** No differences in retention memories were found between Tg2576 and WT mice. * $P < 0.05$ vs Day 1 (main effect). Data are expressed as mean \pm SEM.

References

- Aisa, B., Tordera, R., Lasheras, B., Del Rio, J. and Ramirez, M.J. (2007). "Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats." *Psychoneuroendocrinology* **32**(3): 256-266.
- Andel, R., Vigen, C., Mack, W.J., Clark, L.J. and Gatz, M. (2006). "The effect of education and occupational complexity on rate of cognitive decline in Alzheimer's patients." *Journal of the International Neuropsychological Society* **12**(1): 147-152.
- Arendash, G.W., Garcia, M.F., Costa, D.A., Cracchiolo, J.R., Wefes, I.M. and Potter, H. (2004). "Environmental enrichment improves cognition in aged Alzheimer's transgenic mice despite stable beta-amyloid deposition." *Neuroreport* **15**(11): 1751-1754.
- Billings, L.M., Green, K.N., McGaugh, J.L. and LaFerla, F.M. (2007). "Learning decreases A beta*56 and tau pathology and ameliorates behavioral decline in 3xTg-AD mice." *The Journal of neuroscience* **27**(4): 751-761.
- Carlson, M.C., Helms, M.J., Steffens, D.C., Burke, J.R., Potter, G.G. and Plassman, B.L. (2008). "Midlife activity predicts risk of dementia in older male twin pairs." *Alzheimer's & dementia* **4**(5): 324-331.
- Chen, G., Chen, K.S., Knox, J., Inglis, J., Bernard, A., Martin, S.J., Justice, A., McConlogue, L., Games, D., Freedman, S.B. and Morris, R.G. (2000). "A learning deficit related to age and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease." *Nature* **408**(6815): 975-979.
- Cheng, I.H., Scearce-Levie, K., Legleiter, J., Palop, J.J., Gerstein, H., Bien-Ly, N., Puolivali, J., Lesne, S., Ashe, K.H., Muchowski, P.J. and Mucke, L. (2007). "Accelerating amyloid-beta fibrillization reduces oligomer levels and functional deficits in Alzheimer disease mouse models." *The Journal of biological chemistry* **282**(33): 23818-23828.
- Costa, D.A., Cracchiolo, J.R., Bachstetter, A.D., Hughes, T.F., Bales, K.R., Paul, S.M., Mervis, R.F., Arendash, G.W. and Potter, H. (2007). "Enrichment improves cognition in AD mice by amyloid-related and unrelated mechanisms." *Neurobiology of aging* **28**(6): 831-844.

Cotel, M.C., Jawhar, S., Christensen, D.Z., Bayer, T.A. and Wirths, O. (2012). "*Environmental enrichment fails to rescue working memory deficits, neuron loss, and neurogenesis in APP/PS1KI mice.*" *Neurobiology of aging* **33**(1): 96-107.

Cracchiolo, J.R., Mori, T., Nazian, S.J., Tan, J., Potter, H. and Arendash, G.W. (2007). "*Enhanced cognitive activity--over and above social or physical activity--is required to protect Alzheimer's mice against cognitive impairment, reduce Abeta deposition, and increase synaptic immunoreactivity.*" *Neurobiology of learning and memory* **88**(3): 277-294.

Cuadrado-Tejedor, M., Hervias, I., Ricobaraza, A., Puerta, E., Perez-Roldan, J.M., Garcia-Barroso, C., Franco, R., Aguirre, N. and Garcia-Osta, A. (2011). "*Sildenafil restores cognitive function without affecting beta-amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease.*" *British journal of pharmacology* **164**(8): 2029-2041.

Ferrer, I., Gomez-Isla, T., Puig, B., Freixes, M., Ribe, E., Dalfo, E. and Avila, J. (2005). "*Current advances on different kinases involved in tau phosphorylation, and implications in Alzheimer's disease and tauopathies.*" *Current Alzheimer research* **2**(1): 3-18.

Gortz, N., Lewejohann, L., Tomm, M., Ambree, O., Keyvani, K., Paulus, W. and Sachser, N. (2008). "*Effects of environmental enrichment on exploration, anxiety, and memory in female TgCRND8 Alzheimer mice.*" *Behavioural brain research* **191**(1): 43-48.

Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F. and Cole, G. (1996). "*Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice.*" *Science* **274**(5284): 99-102.

Hu, Y.S., Xu, P., Pigino, G., Brady, S.T., Larson, J. and Lazarov, O. (2010). "*Complex environment experience rescues impaired neurogenesis, enhances synaptic plasticity, and attenuates neuropathology in familial Alzheimer's disease-linked APP^{swe}/PS1^{DeltaE9} mice.*" *FASEB journal* **24**(6): 1667-1681.

Hurtado, D.E., Molina-Porcel, L., Iba, M., Aboagye, A.K., Paul, S.M., Trojanowski, J.Q. and Lee, V.M. (2010). "*A β accelerates the spatiotemporal progression of tau pathology and augments tau amyloidosis in an Alzheimer mouse model.*" *The American journal of pathology* **177**(4): 1977-1988.

Jankowsky, J.L., Melnikova, T., Fadale, D.J., Xu, G.M., Slunt, H.H., Gonzales, V., Younkin, L.H., Younkin, S.G., Borchelt, D.R. and Savonenko, A.V. (2005). "*Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease.*" *The Journal of neuroscience* **25**(21): 5217-5224.

Jankowsky, J.L., Xu, G., Fromholt, D., Gonzales, V. and Borchelt, D.R. (2003). "*Environmental enrichment exacerbates amyloid plaque formation in a transgenic mouse model of Alzheimer disease.*" *Journal of neuropathology and experimental neurology* **62**(12): 1220-1227.

Jin, M., Shepardson, N., Yang, T., Chen, G., Walsh, D. and Selkoe, D.J. (2011). "*Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration.*" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**(14): 5819-5824.

Kayed, R., Head, E., Thompson, J.L., McIntire, T.M., Milton, S.C., Cotman, C.W. and Glabe, C.G. (2003). "*Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis.*" *Science* **300**(5618): 486-489.

Koepsell, T.D., Kurland, B.F., Harel, O., Johnson, E.A., Zhou, X.H. and Kukull, W.A. (2008). "*Education, cognitive function, and severity of neuropathology in Alzheimer disease.*" *Neurology* **70**(19 Pt 2): 1732-1739.

Larson, M.E. and Lesne, S.E. (2012). "*Soluble Abeta oligomer production and toxicity.*" *Journal of neurochemistry* **120 Suppl 1**: 125-139.

Lazarov, O., Robinson, J., Tang, Y.P., Hairston, I.S., Korade-Mirnic, Z., Lee, V.M., Hersh, L.B., Sapolsky, R.M., Mirnic, K. and Sisodia, S.S. (2005). "*Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice.*" *Cell* **120**(5): 701-713.

Lesne, S., Koh, M.T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C.G., Yang, A., Gallagher, M. and Ashe, K.H. (2006). "*A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory.*" *Nature* **440**(7082): 352-357.

Mirochnic, S., Wolf, S., Staufenbiel, M. and Kempermann, G. (2009). "*Age effects on the regulation of adult hippocampal neurogenesis by physical activity and environmental*

enrichment in the APP23 mouse model of Alzheimer disease." *Hippocampus* **19**(10): 1008-1018.

Morgan, D. (2003). "Learning and memory deficits in APP transgenic mouse models of amyloid deposition." *Neurochemical research* **28**(7): 1029-1034.

Morgan, D., Diamond, D.M., Gottschall, P.E., Ugen, K.E., Dickey, C., Hardy, J., Duff, K., Jantzen, P., DiCarlo, G., Wilcock, D., Connor, K., Hatcher, J., Hope, C., Gordon, M. and Arendash, G.W. (2000). "A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease." *Nature* **408**(6815): 982-985.

Mouri, A., Noda, Y., Hara, H., Mizoguchi, H., Tabira, T. and Nabeshima, T. (2007). "Oral vaccination with a viral vector containing Abeta cDNA attenuates age-related Abeta accumulation and memory deficits without causing inflammation in a mouse Alzheimer model." *FASEB journal* **21**(9): 2135-2148.

Neves, G., Cooke, S.F. and Bliss, T.V. (2008). "Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality." *Nature reviews. Neuroscience* **9**(1): 65-75.

Nithianantharajah, J. and Hannan, A.J. (2006). "Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system." *Nature reviews. Neuroscience* **7**(9): 697-709.

Otth, C., Concha, II, Arendt, T., Stieler, J., Schliebs, R., Gonzalez-Billault, C. and Maccioni, R.B. (2002). "AbetaPP induces cdk5-dependent tau hyperphosphorylation in transgenic mice Tg2576." *Journal of Alzheimer's disease* **4**(5): 417-430.

Owen, A.M., Hampshire, A., Grahn, J.A., Stenton, R., Dajani, S., Burns, A.S., Howard, R.J. and Ballard, C.G. (2010). "Putting brain training to the test." *Nature* **465**(7299): 775-778.

Patrick, G.N., Zukerberg, L., Nikolic, M., de la Monte, S., Dikkes, P. and Tsai, L.H. (1999). "Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration." *Nature* **402**(6762): 615-622.

Puzzo, D., Privitera, L., Fa, M., Staniszewski, A., Hashimoto, G., Aziz, F., Sakurai, M., Ribe, E.M., Troy, C.M., Mercken, M., Jung, S.S., Palmeri, A. and Arancio, O. (2011). "*Endogenous amyloid-beta is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory.*" *Annals of neurology* **69**(5): 819-830.

Rovio, S., Kareholt, I., Helkala, E.L., Viitanen, M., Winblad, B., Tuomilehto, J., Soininen, H., Nissinen, A. and Kivipelto, M. (2005). "*Leisure-time physical activity at midlife and the risk of dementia and Alzheimer's disease.*" *Lancet neurology* **4**(11): 705-711.

Stern, Y. (2006). "*Cognitive reserve and Alzheimer disease.*" *Alzheimer disease and associated disorders* **20**(3 Suppl 2): S69-74.

Tagliabata, G., Hogan, D., Zhang, W.R. and Dineley, K.T. (2009). "*Intermediate- and long-term recognition memory deficits in Tg2576 mice are reversed with acute calcineurin inhibition.*" *Behavioural brain research* **200**(1): 95-99.

Tomidokoro, Y., Ishiguro, K., Harigaya, Y., Matsubara, E., Ikeda, M., Park, J.M., Yasutake, K., Kawarabayashi, T., Okamoto, K. and Shoji, M. (2001). "*Abeta amyloidosis induces the initial stage of tau accumulation in APP(Sw) mice.*" *Neuroscience letters* **299**(3): 169-172.

Verbitsky, M., Yonan, A.L., Malleret, G., Kandel, E.R., Gilliam, T.C. and Pavlidis, P. (2004). "*Altered hippocampal transcript profile accompanies an age-related spatial memory deficit in mice.*" *Learning & memory* **11**(3): 253-260.

Verghese, J., Lipton, R.B., Katz, M.J., Hall, C.B., Derby, C.A., Kuslansky, G., Ambrose, A.F., Sliwinski, M. and Buschke, H. (2003). "*Leisure activities and the risk of dementia in the elderly.*" *The New England journal of medicine* **348**(25): 2508-2516.

Verret, L., Krezmon, A., Halley, H., Trouche, S., Zerwas, M., Lazouret, M., Lassalle, J.M. and Rampon, C. (2013). "*Transient enriched housing before amyloidosis onset sustains cognitive improvement in Tg2576 mice.*" *Neurobiology of aging* **34**(1): 211-225.

Westerman, M.A., Cooper-Blacketer, D., Mariash, A., Kotilinek, L., Kawarabayashi, T., Younkin, L.H., Carlson, G.A., Younkin, S.G. and Ashe, K.H. (2002). "*The relationship between*

Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease." The Journal of neuroscience **22**(5): 1858-1867.

Wolf, S.A., Kronenberg, G., Lehmann, K., Blankenship, A., Overall, R., Staufenbiel, M. and Kempermann, G. (2006). "*Cognitive and physical activity differently modulate disease progression in the amyloid precursor protein (APP)-23 model of Alzheimer's disease.*" Biological psychiatry **60**(12): 1314-1323.

Capítulo IV

Chapter 4

**Impaired PAI-1-dependent BDNF maturation by β -amyloid
affects neuron viability and is associated to cognitive
decline**

Resumen

El factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) es una neurotrofina que se expresa ampliamente SNC. BDNF juega un papel fundamental en la supervivencia neuronal evitando la iniciación de eventos apoptóticos. Estudios recientes han mostrado que BDNF posee una función dual, ya que su precursor (proBDNF) se ha asociado a la activación de procesos apoptóticos y neurodegenerativos, mientras que su forma madura (mBDNF) se ha asociado fundamentalmente a la supervivencia neuronal y a la potenciación sináptica. El objetivo del presente trabajo consiste en estudiar la implicación de la falta de maduración de BDNF en procesos asociados a la EA, como la muerte neuronal y pérdida de memoria, provocados por la patología amiloide. Tanto los hipocampos de ratones Tg2576 como las neuronas cortico-hipocampales primarias de estos ratones o de ratones “wild-type” tratadas con $A\beta_{25-35}$ mostraron una disminución de los niveles de mBDNF y un aumento de los niveles de proBDNF. En estos modelos “*in vivo*” y “*ex vivo*”, la actividad de tPA, proteasa fuertemente implicada en la maduración proteolítica de BDNF dependiente de plasmina, disminuyó muy significativamente. Este hecho se debe al aumento en la expresión de PAI-1, el cual se encarga de la inhibición de tPA. $A\beta_{25-35}$ indujo una fuerte incremento en la expresión de PAI-1 mediada por la estimulación de la actividad transcripcional de JNK/c-Jun. Elevados niveles de PAI-1 fueron detectados también en cerebros de EA. La inhibición de PAI-1 con el compuesto PAI-039 en neuronas primarias provocó un aumento de la maduración de BDNF, y en consecuencia protegió frente al efecto neurotóxico de $A\beta_{25-35}$. La exposición de animales Tg2576 a un protocolo de estimulación cognitiva, el cual ha mostrado tener propiedades beneficiosas frente al deterioro cognitivo en estudios anteriores, se encontró asociado con una mejora de la maduración de BDNF y con unos niveles reducidos de PAI-1. Los resultados obtenidos sugieren la participación de un déficit del procesamiento proteolítico de BDNF en los eventos patológicos de la EA, y permiten sugerir la molécula PAI-1 como posible diana terapéutica.

Abstract

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a neurotrophin widely and ubiquitously expressed in the central nervous system (CNS) that plays a pivotal role in preventing neurons from initiating apoptosis. Recent evidences showed a dual action of BDNF, being the precursor form (proBDNF) associated to neuron death and synaptic weakening while the mature form (mBDNF) to neuron survival and synaptic strengthening. The present study explores whether and how the an altered maturation of BDNF, which would result in less trophic support, could be involved in some Alzheimer's disease (AD)-related traits triggered by amyloid- β ($A\beta$), such as neuronal death and memory dysfunction. Both hippocampi from Tg2576 mice and primary cortico-hippocampal neurons from Tg2576 mice or treated with $A\beta_{25-35}$ showed reduced mBDNF but increased proBDNF levels. In these models, activity of tPA, a protease strongly involved in plasmin-dependent proteolytic maturation of BDNF, was found decreased. This fact is likely due to an increased expression of PAI-1, which sequesters tPA to inhibit its activity. $A\beta$ induced a strong neuronal expression of PAI-1 through the stimulation of JNK-c-Jun transcriptional activity. Post-mortem analyses of human AD brains confirmed higher levels of PAI-1 in situations of amyloid pathology. Inhibition of PAI-1 by PAI-039 in primary neurons resulted in enhanced BDNF maturation and a subsequent protection against $A\beta_{25-35}$ neurotoxicity. Tg2576 mice exposed to a protocol of cognitive stimulation, which has been previously shown to revert memory deficits, presented improved BDNF maturation and related reduction of PAI-1 expression. These data suggest a role of impaired BDNF maturation in the AD pathological events triggered by $A\beta$ and propose PAI-1 as a potential target for intervention.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) shares common traits with other neurodegenerative disorders such as synaptic failure and neuron loss but differs from other types of dementia by the presence of both intracellular accumulation of neurofibrillary tangles and extracellular deposits of amyloid peptides (Hardy and Selkoe 2002). Although the cascade of pathological events that leads to AD might be initiated by complex and specific interactions of life-style habits with genetic risk factors, it is presumed that amyloid- β ($A\beta$) will eventually play a critical role in the pathogenic processes and clinical symptoms. Some authors have argued that $A\beta$ might be produced as protective response to pathological changes rather than being the cause (Castellani et al. 2009), however, familiar AD mutations in genes encoding for $A\beta$ precursor protein (APP) or presenilin 1 and 2 (PS1/PS2), which lead to increased production of $A\beta$, are sufficient to cause the disease (Chartier-Harlin et al. 1991; Rogaev et al. 1995; Sherrington et al. 1995). Since deposits of insoluble $A\beta$ do not seem to account for pathology, as evidenced by lack of correlation of number of amyloid plaques with neuronal loss or severity of cognitive decrements (Arriagada et al. 1992; Davis et al. 1999), disease-causing properties of $A\beta$ should be attributed to soluble intracellular and/or extracellular species of $A\beta$. In this sense, soluble $A\beta$ oligomers are widely reported to be more harmful to neuronal cells than fibrillar aggregates in general (Lambert et al. 1998; Lesne et al. 2006). The mechanisms by which amyloid peptides might exert toxicity have been under profound study during last decades. While intracellular accumulation of $A\beta$ might sequester crucial proteins, extracellular $A\beta$ oligomers appear to bind different types of membrane receptors, as NMDA, insulin, p75 neurotrophin (p75NTR), α 7-nicotinic, prion protein (PrP^c), frizzles and toll-like (TLR2/4/6) receptors, target membrane lipids or change membrane dielectric properties. In general, these interactions have been reported to induce abnormal calcium homeostasis, generate oxidative stress and increase Tau phosphorylation, which activate apoptotic signalling cascades and eventually lead to synaptic and cellular dysfunctions (Yaar et al. 1997; Xie et al. 2002; Lee and Wang 2003; De Felice et al. 2007; Magdesian et al. 2008; Valincius et al. 2008; Lauren et al. 2009; Liu et al. 2012). These observations have implicated apoptosis as an important element of $A\beta$ as disease-causing mechanism.

Neurons, as any type of differentiated cell, require the presence of survival factors to suppress the intrinsic apoptotic machinery and therefore provide the central nervous system (CNS) with proper functioning (Hetman and Xia 2000). Neurotrophins are endogenous molecules that provide the necessary trophic input to protect damaged neurons from a variety of injuries including excitotoxicity, ischemia and neurodegenerative insults (Ichim et al. 2012). Whether a deprivation of trophic support might be a mechanism by which A β could harm neurons is a suggestive question that will be addressed in the present work.

Among all the characterized neurotrophins, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has attracted greatest interest for its wide distribution throughout the CNS and for its antagonistic effects to apoptotic stimuli (Acheson et al. 1995; Numakawa et al. 2010). BDNF is initially synthesized as a precursor protein (proBDNF) and further cleaved to the mature form (mBDNF). Both forms are found extracellularly and may elicit opposite effects. While proBDNF interacts with p75NTR and triggers apoptotic processes (Teng et al. 2005), mBDNF binds to tropomyosin-related kinase-B (TrkB) receptor and promotes survival (Koshimizu et al. 2009). Proteolytic cleavage of proBDNF to mBDNF occurs mainly in the extracellular matrix by plasmin (Pang et al. 2004). Tissue plasminogen-activator (tPA) can activate plasmin to generate mBDNF when is not sequestered by the plasminogen-activator inhibitor-1 (PAI-1; also referred as serpin E1), which inhibits its activity (Declercq et al. 1992). Increased levels of PAI-1 have been found in several disorders, including cardiovascular diseases, obesity, diabetes mellitus type II, metabolic syndrome, cancer and AD among others (Reuning et al. 1998; Juhan-Vague et al. 2003; Alessi and Juhan-Vague 2006; Fabbro and Seeds 2009; Ploplis 2011). The present study will explore whether those increased levels of PAI-1 in AD could be altering the maturation of BDNF and, in consequence, could be participating in the neurodegenerative events of disease. The present results show that A β reduces the production of mBDNF by increasing the expression of PAI-1 in a JNK-dependent way, having consequences on neuronal viability and cognitive function.

2. Material and methods

2.1. Reagents and antibodies

Some commercially available reagents were used for “*in vitro*” experiments. A β ₂₅₋₃₅ (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) was used at 10 μ M. PAI-039 (Axonmedchem, Holland), a PAI-1 inhibitor, was used at 2 μ M and 10 μ M. TrkB/Fc Chimera (R&D systems, MN, USA), a TrkB receptor blocker, was used at 0.3 μ g/mL. SP600125 (SelleckChem, Germany), a JNK1/2 inhibitor, was used at 15 μ M. PD98059 (Tocris Bioscience, UK), a MEK/ERK inhibitor, was used at 10 μ M. Wortmannin (Tocris Bioscience, UK), a PI3K inhibitor, was used at 100nM. For antibodies, see Table 1.

Table 1. Antibodies and conditions used in immuno-blotting experiments

Protein	% PA	Primary antibody (dilution)	T
tPA	7.5%	tPA (1:1000) ^a	0
tPA-PAI-1	7.5%	tPA (1:1000) ^a	0
PAI-1	7.5%	PAI-1 (1:1000) ^a	1
ProBDNF	10%	BDNF (1:500) ^b	0
mBDNF	10%	N-terminal region of mBDNF (1:1000) ^c	0
phospho-JNK	7.5%	phospho-SAPK/JNK(Thr183/Tyr185) (1:1000) ^d	1
Total JNK	7.5%	SAPK/JNK (1:1000) ^d	2
phospho-c-Jun	7.5%	phospho-c-Jun(Ser73) (1:1000) ^d	0
Total c-Jun	7.5%	c-Jun (60A8) (1:1000) ^d	1

^aNOVUS BIOLOGICAL, Colorado, USA; ^bCELL SIGNALLING TECHNOLOGY, Danvers, MA, USA; ^cOSENSE, USA.

PA refers to poly-acrylamide; “T” refers to the number of times that membranes were stripped before probing with the corresponding antibody.

2.2. Primary cultures of cortico-hippocampal neurons

Brains from WT and Tg2576 mice were dissected in HBSS medium (Gibco, CA, USA) in the presence of 1 μ g/ml penicillin/streptomycin (Invitrogen). The tissue was mechanically dissociated in a small volume of Neurobasal medium (Gibco, CA, USA) with B-27 supplement (Gibco, CA, USA) using a sterilized Pasteur pipette. Cortico-hippocampal neurons were used for cell-viability assays (MTT) and for Western Blot assays. They were suspended in Neurobasal Medium (Gibco, CA, USA) containing 2% B-27 supplement (50x special supplement growth factor from Gibco, CA, USA), 1 μ g/ml penicillin/streptomycin and 20mM glutamine, and plated in poly-D-lysine (0.1 mg, Sigma-Aldrich, Germany)-coated 6-well plates (Fisher Scientific) at a density of 3×10^5 cells/well. The cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. Experiments were performed after 14 days “*in vitro*” (DIV). For western-blot analyses, neurons from every pup brain were cultured in one different well in a 6-well plate, and a minimum of 6 wells were used per treatment. For cell survival assays, neurons from every pup brain were cultured in one different 48-well plate, and 12 wells in three different plates were used per treatment.

2.3. Animals

Sixteen month-old female transgenic mice (Tg2576) over-expressing human amyloid precursor protein (hAPP) carrying the Swedish familial mutation (K670N/M671L) under the genetic background C57BL/6/SJL and sixteen 16 month-old wild-type littermates (WT) were used. Mice were housed in groups of four per cage under controlled temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) and humidity ($55 \pm 5\%$) on a 12-h light–dark cycle with free access to food and water. At the end of the cognitive stimulation paradigm, 16 months-old fasting mice were killed by decapitation.

Experimental procedures were conducted in accordance with European and Spanish regulations (2003/65/EC; 1201/2005) and approved by the Ethical Committee of University of Navarra (068-11).

2.4. Studies in human tissue

Brain tissues from 12 AD patients and from 12 normal age-matched cognitively controls (mean age of AD= 81.1 \pm 1.6; mean age of controls= 74.7 \pm 2.7) were obtained from the Oxford Project to Investigate Memory and Ageing/Thomas Willis Oxford Brain Collection, part of the Brains for Dementia Research network. At death, informed consent had been obtained from the patients' next-of-kin before collection of brains. All AD subjects fulfilled CERAD criteria for the neuropathological diagnosis of AD and were staged at Braak V/VI. Controls did not have dementia or other neurological diseases, did not meet CERAD criteria for AD diagnosis, and were staged at Braak 0-II. Frontal (Broadmann Area [BA] 10) cortices were dissected free of meninges. All tissue used had a brain pH>6.1, condition used as an indicator of tissue quality in post-mortem research (Lewis 2002). In these tissue samples, increased levels of A β has been described in AD brains when compared to control brains (Solas et al. 2013).

2.5. Cognitive stimulation paradigm

Cognitive stimulation paradigm was aimed at keeping mice cognitively active for a period of 8 weeks. Cognitive stimulation protocol was performed as previously described (Gerenu et al. 2013). In short, mice were allowed to find and learn the pathway to reach a food stimulus through a Lashley-type maze. This paradigm intends to generate response learning, where mice choose the correct sequence of right-left responses depending on which choice led them to the food stimulus in previous trials. Mice were exposed to solve 8 different mazes, one per week. Number of entry errors and latency to reach the goal was measured as the main outcomes. Animals subjected to cognitive stimulation are referred as "CS" mice. To discard whether the effects of this training protocol could be attributable to the inherent physical and exploratory activity needed to perform the task, one subset of mice from each genotype was subjected to an open-field environment in order to provide these control animals with a similar sensory stimulation, which did not require any stimulus-induced response learning. This animal group was referred as "naïve".

2.6. Biochemical Measurements

2.6.1. Protein extraction.

Hippocampus were dissected and homogenized in lysis buffer containing protease and phosphatase inhibitors (0.2 M NaCl, 0.1 M HEPES, 10% glycerol, 200 mM NaF, 2 mM Na₄P₂O₇, 1% NP40, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM benzamidine, 10 mg/ml leupeptin, 400 U/ml aprotinin). Homogenates were centrifuged at 13,000 rpm for 20 min at 4 °C, and supernatant stored at -80 °C. For human cortical samples, samples were homogenized in the same buffer. Protein concentration was determined by Bradford (BIO-RAD, Hercules, CA, USA).

2.6.2. Immuno-blotting.

Samples were mixed with equal volume of loading buffer (0.16 M Tris-HCl pH 6.8, 4 % SDS, 20 % glycerol, 0.01 % bromophenol blue, 0.1 M DTT) and ran in SDS-PAGE gels. Human samples were run in Criterion™ gels (Bio-Rad, Life Sciences, CA, USA). Proteins were transferred to BioTrace™ Nitrocellulose membranes (Pall Corporation, NY, USA). Gel conditions and primary antibodies are summarized in Table 1. Secondary antibodies conjugated to IRDye 800CW or IRDye 680CW (LI-COR Biosciences, NE, USA) were diluted to 1/10,000 in TBS with 5% BSA. Bands were visualized using ODYSSEY Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, NE, USA). β -actin was used as loading control. Results were expressed as optical density (O.D.) values relative to WT-naïve mice. Note that some proteins bands were obtained as a result of stripping (Stripping buffer, Pierce, IL, USA) and re-probing the membrane. However, membranes were never reused for more than 4 times (Table 1).

2.7. MTT cell viability assay

Cell viability was examined by means of the 3,4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. Wild-type primary neurons treated with A β ₂₅₋₃₅ 10 μ M (Sigma-Aldrich, Germany) or primary neurons from Tg2576 mice were used. Neurons were treated for 24 hours with 2 μ M or 10 μ M of PAI-039 (AxonmedChem, Groningen, Netherlands) and/or recombinant human TrkB/Fc chimera, 0.3 μ g/mL (R&D Systems, MN, USA), PD98059

10 μ M (Sigma-Aldrich, Germany) and/or Wortmanin 100 nM (SelleckChem, Munich, Germany). After treatment, MTT (Sigma-Aldrich, Germany) was dissolved in PBS pH 7.4 at 5 mg/ml, added 10 μ l per 100 μ l of medium to the wells and incubated for 2 h in the cell incubator (5% CO₂ and 37 C). Then, the MTT solution was discarded and DMSO was added to the wells. Aliquots were transferred to a 96-well plate, and absorbance was measured at 595 nm in a plate reader. Results were expressed as percentages of non-treated control cells.

2.8. Statistical analysis

All results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Normality was checked by Shapiro-Wilk's test. After that, data were evaluated by one-way ANOVA or t student test. When required, two-way ANOVA was also performed. In these cases, when interaction between two factors was significant, single effects were analysed by one-way ANOVA followed by post-hoc Tukey's test. The value from F of interaction together with the probability associated to the single comparison was indicated. When no significant interaction between two factors was found, main effects were analysed. In those cases where only two groups were compared, data were evaluated by Student's t test. The extent of correlation between pairs of variables was measured by Pearson (parametric variables) or Spearman (non-parametric variables) correlation coefficients. The level of significance was set at P<0.05 (significant) and P<0.01 (highly significant). All analyses were performed using SPSS 15.0 packages of Windows (IL, USA).

3. Results

3.1. $A\beta$ alters BDNF production and expression of enzymes involved in BDNF maturation “*ex vivo*”

Our initial experiments were focused on determine whether the effect of $A\beta$ could modulate BDNF maturation. For this purpose, primary cortico-hippocampal neurons treated with $A\beta_{25-35}$ peptide for 24 h were used. $A\beta_{25-35}$ peptide was chosen since it is the shortest peptide sequence that retains biological activity comparable with that of full-length $A\beta_{1-42}$ and exhibits large β -sheet aggregated structures (Pike et al. 1995; D'Ursi et al. 2004). 10 μ M of $A\beta_{25-35}$ induced a significant increase in proBDNF levels ($t_{(10)}=-3.148$, $P<0.05$) while decreasing mBDNF levels ($t_{(10)}= 5.501$, $P<0.01$), which resulted in a wide reduction of mBDNF/proBDNF ratio (Fig. 1A). As there is a seemingly effect of $A\beta_{25-35}$ on BDNF processing, we next examined whether $A\beta_{25-35}$ could affect proteases involved in the processing of proBDNF. Free tPA, by activating the extracellular protease plasmin, converts the precursor proBDNF to mBDNF (Pang et al. 2004), but its convertase activity is inhibited when forming a covalent complex with PAI-1. It was found that $A\beta_{25-35}$ decreased the levels of free tPA ($t_{(10)}= 5.651$, $P<0.01$) and increased the tPA bounded to PAI-1 ($t_{(10)}=-5.424$, $P<0.01$). Interestingly, $A\beta_{25-35}$ induced a dramatic increase of PAI-1 ($t_{(10)}=-5.334$, $P<0.01$)(Fig. 1B).

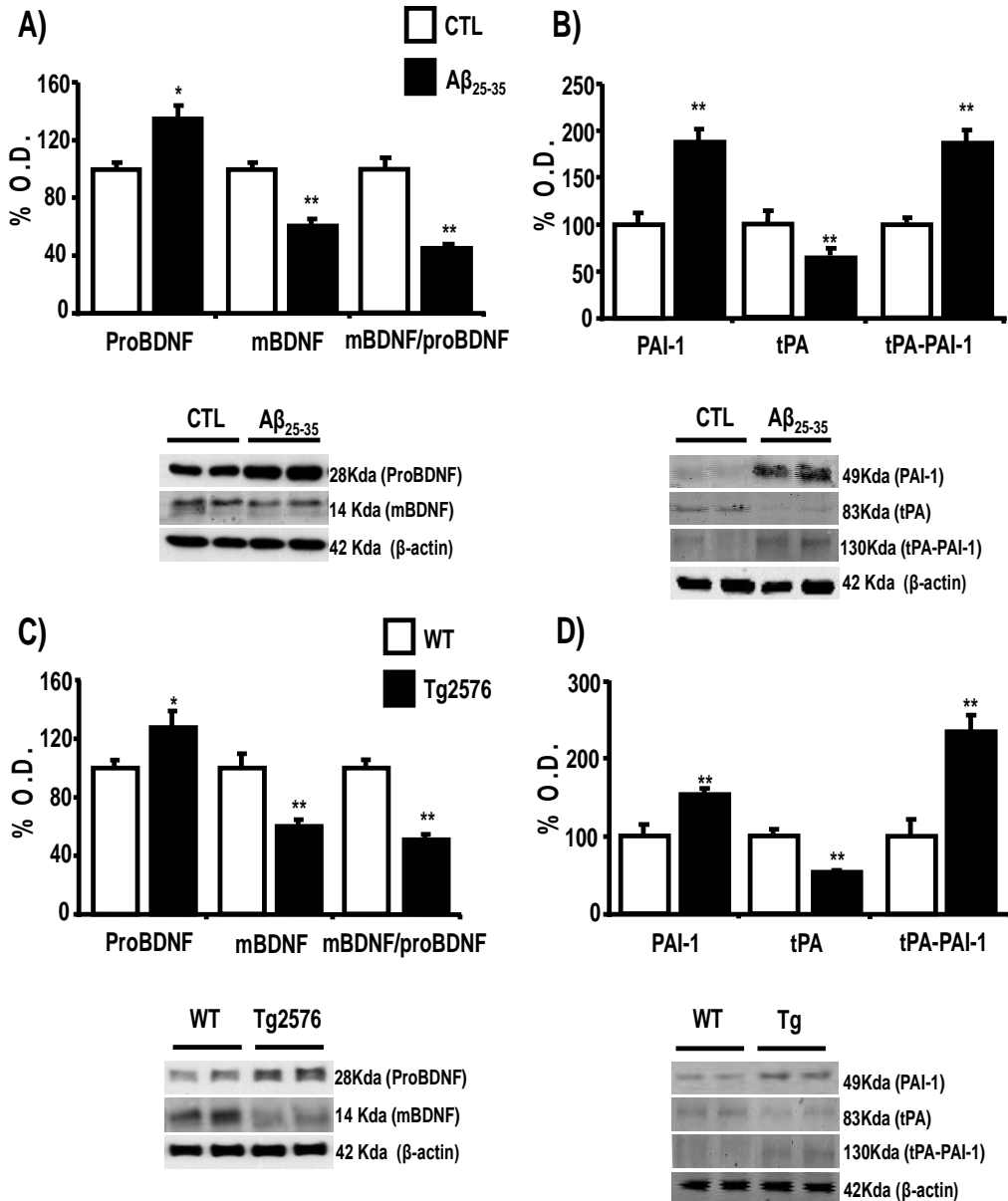


Figure 1. A β impairs BDNF maturation and increases levels of PAI-1 protein in primary cortico-hippocampal neurons. **(A)** At DIV 14, 24 h-treatment with A β_{25-35} (10 μ M) in wild-type (WT) primary neurons resulted in increased levels of proBDNF, but decreased levels of mBDNF and mBDNF/proBDNF ratio. **(B)** This treatment also induced higher levels of PAI-1 protein, more tPA bound to PAI-1 but less free tPA. **(C)** In primary neurons from Tg2576 mice, basal levels of proBDNF were found increased, while both mBDNF and ratio were found decreased when compared to neurons from WT mice. **(D)** Similarly, Tg2576 neurons showed higher levels of PAI-1 protein, higher levels of tPA bound to PAI-1 and lower free tPA. Data are expressed as mean \pm S.E.M. Histograms show percentage of optical density (O.D.) values of control (CTL) or WT. Six wells per treatment were used (Neurons from every pup brain were cultured in one different well). *P<0.05 vs CTL or WT; **P<0.01 vs CTL or WT.

These observations were confirmed in primary cortico-hippocampal neurons from hAPPswe over-expressing mice (Tg2576) when compared to wild-type. Primary neurons over-expressing hAPPswe displayed increased proBDNF ($t_{(10)} = -2.532$, $P < 0.05$), decreased mBDNF ($t_{(10)} = 5.836$, $P < 0.01$), decreased tPA ($t_{(12)} = 2.610$, $P < 0.05$) and increased PAI-1 ($t_{(10)} = -12.596$, $P < 0.01$) and PAI-1-tPA complex ($t_{(10)} = -4.980$, $P < 0.01$) (Fig. 1C and D). Hippocampal samples from 16 month-old Tg2465 mice presented similar alterations in BDNF processing (higher levels of proBDNF, $t_{(12)} = -3.534$, $P < 0.05$ vs WT mice; lower levels of mBDNF, $t_{(12)} = 4.449$, $P < 0.01$ vs WT mice), which were also accompanied by decreased tPA ($t_{(12)} = 2.610$, $P < 0.05$), and increased PAI-1 ($t_{(12)} = -4.718$, $P < 0.01$) and PAI-1-tPA complex levels ($t_{(12)} = -5.603$, $P < 0.01$) when compared to WT mice (Fig. 2).

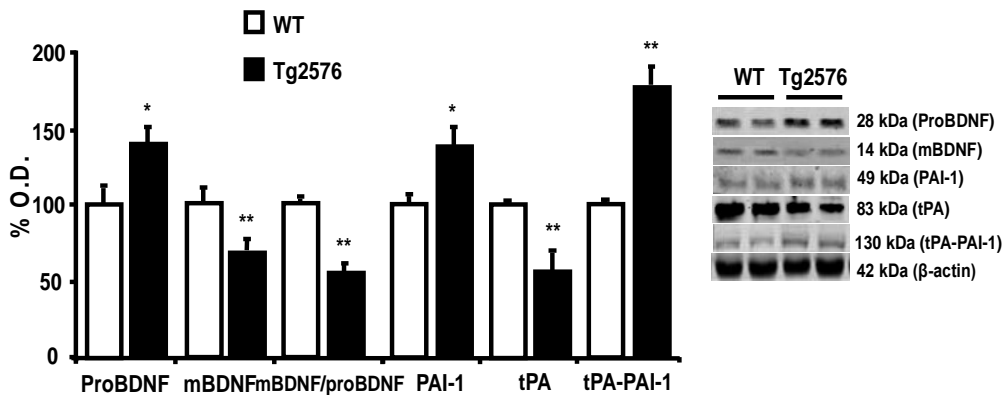


Figure 2. Impaired BDNF maturation and increased levels of PAI-1 protein in brains from Tg2576 mice. 16 month-old Tg2576 mice showed increased levels of proBDNF, and decreased mBDNF and ratio in hippocampus when compared to wild-type (WT) animals. These animals also presented increased levels of PAI-1 protein, as well as increased levels of tPA-PAI-1 complex and decreased free tPA. * $P < 0.05$ vs WT; ** $P < 0.01$ vs WT. Data are expressed as mean \pm S.E.M. Histograms show percentage of optical density (O.D.) values of WT. Six Tg2576 and six WT mice were used.

An exploration of the cortical region BA10 from AD patients revealed that both PAI-1 and PAI-1-tPA complex are significantly increased when compared to age-matched controls ($t_{(21)} = 2.659$, $P < 0.05$ for PAI-1; $t_{(21)} = 2.871$, $P < 0.01$ for tPA-PAI-1 complex) (Fig. 3). In AD samples, it was found a significant correlation between enhanced levels of $A\beta_{1-42}$ and either levels of PAI-1 (Spearman's $\rho = 0.701$, $P < 0.05$, $n = 8$) or levels of tPA-PAI-1 complex (Spearman's $\rho = 0.810$, $P < 0.01$, $n = 8$).

3.2. A β -induced increased expression of neuronal PAI-1 is JNK/c-Jun-dependent

Among the different active transcription binding sites contained in the PAI-1 promoter region, the activator protein (AP-1) site mediates a major role in the induction of PAI-1 expression (Keeton et al. 1991). We next checked whether the observed increased expression of PAI-1 in response to A β could be mediated by c-Jun, which forms the AP-1 transcription factor in combination with c-fos and is activated by c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK). Cortico-hippocampal primary neurons were treated with A β_{25-35} together with a specific inhibitor of JNK activity (SP600125). Since MAPK/ERK pathway can regulate the activity of a broad range of transcription factors, a specific inhibitor of MEK1/2 (PD98059) was also used in order to check whether A β -induced increased PAI-1 could be dependent on other transcriptional activities. BDNF processing and levels of PAI-1 were measured 1 h or 24 h after treatment.

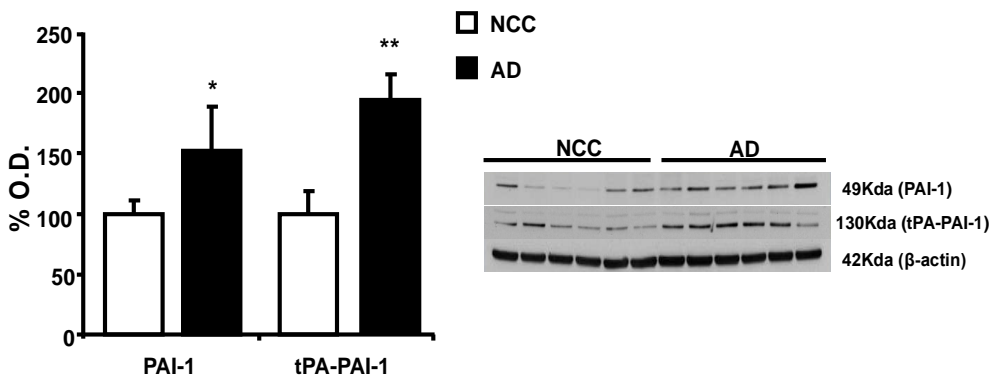


Figure 3. Increased levels of PAI-1 and tPA-PAI-1 complex in post-mortem samples from AD patients. Both levels of PAI-1 protein and tPA bound to PAI-1 were found increased in frontal cortices from AD patients when compared to age-matched normal cognitive controls. * $P < 0.05$ vs CTL; ** $P < 0.01$ vs Control. Data are expressed as mean \pm S.E.M. Histograms show percentage of optical density (O.D.) values of Control. Twelve AD and twelve control brains were used.

At 1 h treatment, A β_{25-35} induced subtle but significant increases of activated phospho-JNK1 ($F_{(3,15)} = 3.864$, $P < 0.05$ vs Control) and phospho-c-Jun ($F_{(3,15)} = 8.294$, $P < 0.01$ vs Control), together with increased levels of PAI-1 ($F_{(3,15)} = 8.404$, $P < 0.01$ vs Control). The JNK1/2 inhibitor SP600125 (15 μ M), but not the MEK1/2 inhibitor PD98059 (20 μ M), restored the activated state of c-Jun to basal levels ($P < 0.01$ vs A β_{25-35}), as well as the expression of PAI-1 ($P < 0.01$ vs A β_{25-35}) (Fig. 4A). At this time point, A β_{25-35} prompted higher levels of mBDNF ($F_{(3,15)} = 4.024$, $P < 0.05$ vs Control), which were reverted by SP600125 ($P < 0.05$ vs A β_{25-35}) and PD98059 ($P < 0.05$ vs A β_{25-35}) (Fig. 4B).

At 24 h treatment, A β_{25-35} induced a significant activation, noticeably higher than that observed after 1 h, of JNK1 ($F_{(3,14)}= 21.861$, $P<0.01$ vs Control), JNK2 ($F_{(3,14)}= 13.153$, $P<0.01$ vs Control) and c-Jun ($F_{(3,1)}= 16.582$, $P<0.01$ vs Control), and increased levels of PAI-1 ($F_{(3,14)}= 54.449$, $P<0.01$ vs Control). While SP600125 inhibitor reverted all these A β_{25-35} -induced changes ($P<0.01$ vs A β_{25-35} for phospho-JNK1/2, phospho-c-Jun and PAI-1), PD98059 inhibitor showed an additional increased effect on JNK1, JNK2 and c-Jun activities, as well as on PAI-1 levels ($P<0.01$ vs A β_{25-35} for phospho-JNK1 and phospho-JNK2, phospho-c-Jun and PAI-1) (Fig. 4C). At this time point, A β_{25-35} showed an expected increase of proBDNF levels ($F_{(3,15)}= 3.598$, $P<0.05$ vs Control) and decrease of mBDNF levels ($F_{(3,15)}= 14.524$, $P<0.05$ vs Control). SP6001125 inhibitor returned proBDNF ($P<0.01$ vs A β_{25-35}) and mBDNF ($P<0.01$ vs A β_{25-35}) to similar levels than those observed in the control-treated group (Fig. 4D).

3.3. Selective inhibition of PAI-1 normalizes A β_{25-35} -induced impairments of BDNF maturation mediated by tPA-plasmin

In our hands, previous experiments brought to light that A β impairs BDNF maturation, and that this impairment might be linked to altered PAI-1 expression and subsequent failure of tPA/plasmin cleaving activity. To add further support about the role of PAI-1 on the lack of BDNF maturation induced by A β , a selective and specific inhibitor of PAI-1 (PAI-039) was used (Hetman and Xia 2000) on cortico-hippocampal primary neurons. As observed in Fig. 5A, inhibition of PAI-1 with PAI-039 (2 μ M) led to an unexpected reduction of PAI-1 levels after A β_{25-35} treatment ($F_{(1,24)}= 4.928$, $P<0.01$ for A β_{25-35} +PAI-039 vs A β_{25-35} , $P<0.01$ for A β_{25-35} vs Control), as well as an increase of free tPA ($F_{(1,24)}= 6.619$, $P<0.01$ for A β_{25-35} +PAI-039 vs A β_{25-35} , $P<0.01$ for A β_{25-35} vs Control) and tPA-PAI-1 complex ($F_{(1,24)}= 14.798$, $P<0.01$ for A β_{25-35} +PAI-039 vs A β_{25-35} , $P<0.01$ for A β_{25-35} vs Control). Interestingly, PAI-039 was able to restore the A β_{25-35} -mediated decreased levels of mBDNF ($F_{(1,24)}= 9.270$, $P<0.01$ for A β_{25-35} +PAI-039 vs A β_{25-35} , $P<0.01$ for A β_{25-35} vs Control) to those of Control-treated neurons, as well as the mBDNF/proBDNF ratio ($F_{(1,24)}= 14.173$, $P<0.01$ for A β_{25-35} +PAI-039 vs A β_{25-35} , $P<0.01$ for A β_{25-35} vs Control) (Fig. 5B).

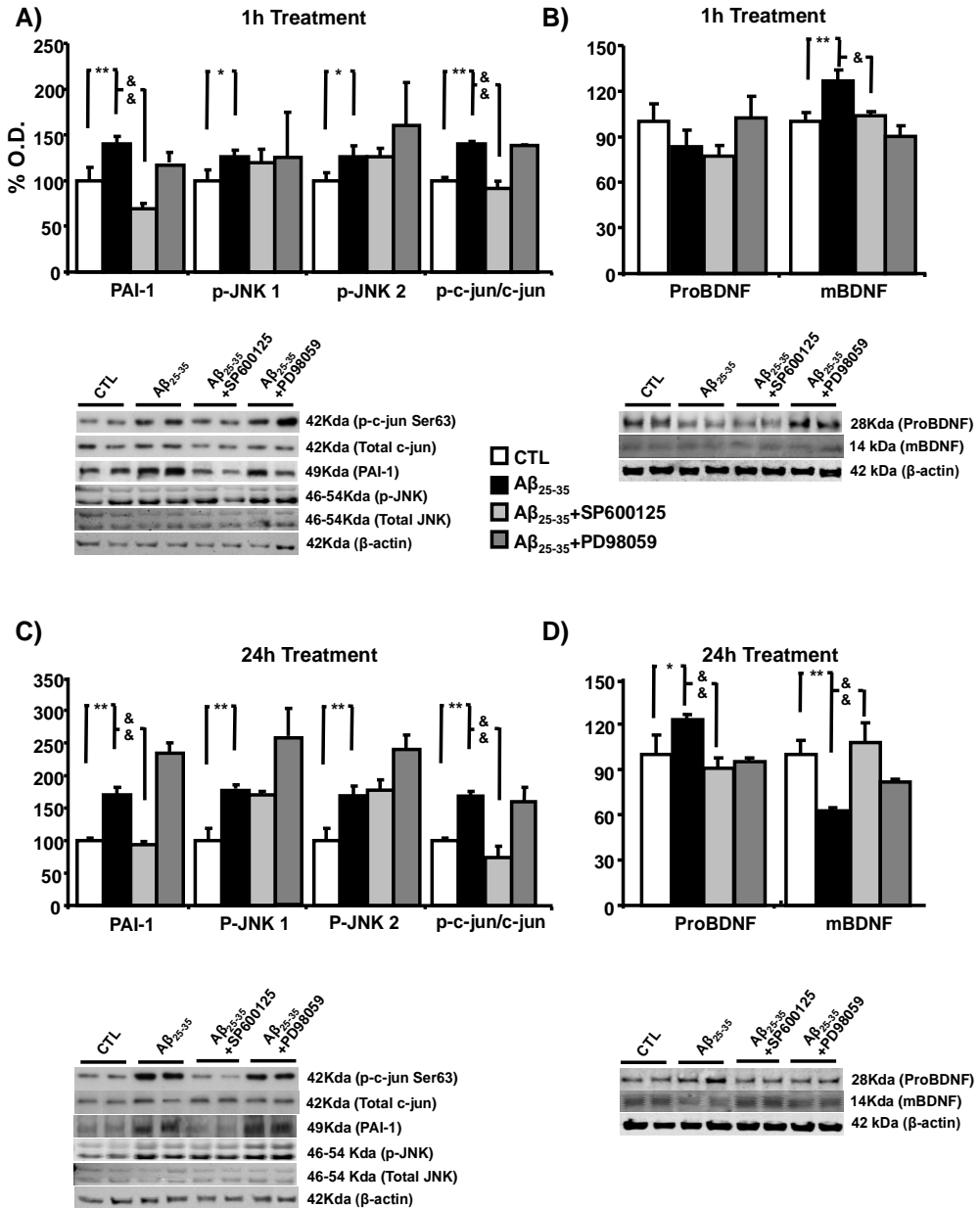


Figure 4. $A\beta_{25-35}$ -induced increased expression of PAI-1 is mediated by JNK-c-jun transcriptional activity. **(A)** At DIV 14, 1 h-treatment with $A\beta_{25-35}$ (10 μ M) in wild-type (WT) primary neurons resulted in an increase of PAI-1 levels that was accompanied by increased state of phosphorylated JNK1/2 and c-jun. Inhibition of JNK by SP600125 (15 μ M), but not inhibition of MEK by PD98059 (10 μ M) decreased levels of phosphorylated c-jun together with protein levels of PAI-1. At this short time, levels of mBDNF were found increased by $A\beta_{25-35}$ and decreased by SP600125. **(B)** 24 h-treatment with $A\beta_{25-35}$ (10 μ M) induced stronger increases in protein levels of PAI-1 and phosphorylated state of JNK1/2 and c-jun. Again, these increases were reverted by SP600125. PD98059 potentiated the effects of $A\beta_{25-35}$. As expected, 24 h-treatment with $A\beta_{25-25}$ increased the levels of proBDNF and reduced mBDNF, although SP600125 treatment returned their levels to those of $A\beta$ non-treated controls (CTL). Data are expressed as mean \pm S.E.M. Histograms show percentage of optical density (O.D.) values of control (CTL). Six wells per treatment were used (Neurons from every pup brain were cultured in one different well). * $P < 0.05$ vs CTL; ** $P < 0.01$ vs CTL; & $P < 0.05$ vs $A\beta_{25-35}$; && $P < 0.01$ vs $A\beta_{25-35}$.

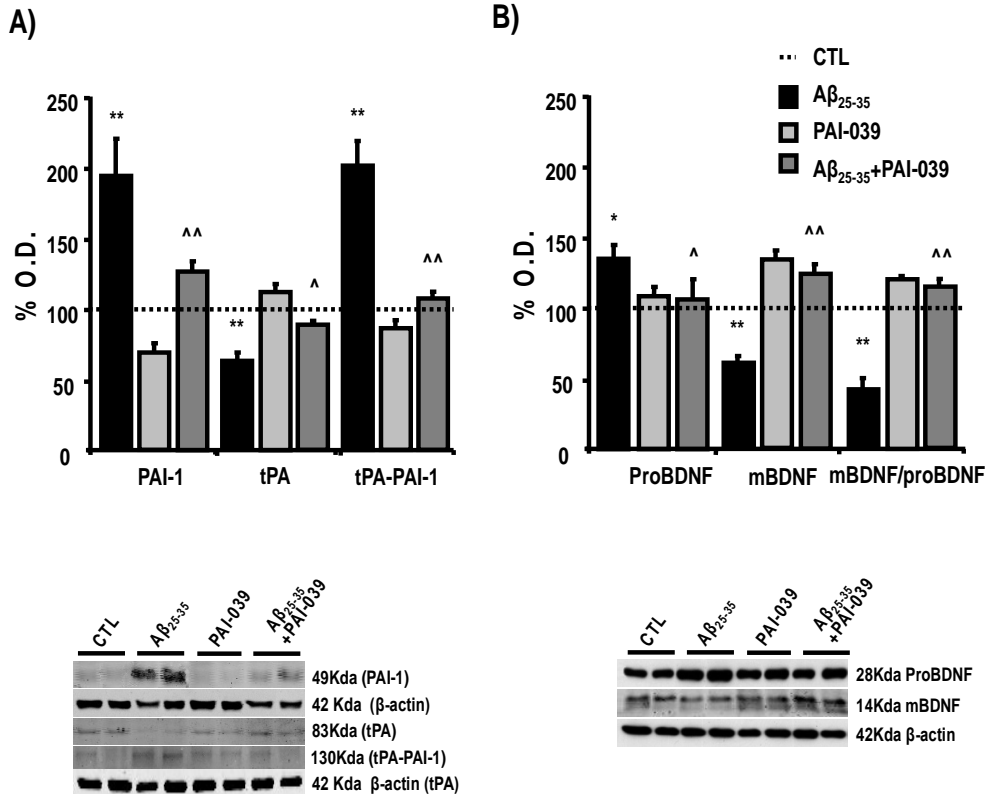


Figure 5. Inhibition of PAI-1 restores A β_{25-35} -induced impairment of BDNF maturation. **(A)** At DIV 14, 24 h-treatment with A β_{25-35} (10 μ M) resulted in increased levels of PAI-1 and increased levels of tPA bound to PAI-1 but decreased levels of free tPA in cortico-hippocampal primary neurons. Inhibition of PAI-1 by the specific and selective inhibitor PAI-039 (2 μ M) restored them to levels similar to those of control (CTL) group. **(B)** PAI-039 also restored the A β_{25-35} -induced increased levels of proBDNF and reduced levels of mBDNF as well as the ratio to CTL levels. Data are expressed as mean \pm S.E.M. Histograms show percentage of optical density (O.D.) values of control (CTL). *P<0.05 vs CTL; **P<0.01 vs CTL; ^P<0.05 vs A β_{25-35} ; ^^P<0.01 vs A β_{25-35} .

3.4. PAI-1 inhibition protects neurons against A β -induced neurotoxicity in an mBDNF-dependent manner

Since A β appears to impair the production of neuronal mBDNF and PAI-1 inhibition restores mBDNF to basal levels, further experiments were developed to test whether PAI-1 inhibition could render neurons less vulnerable to “*ex vivo*” A β toxicity, and if so, whether this neuroprotection could be dependent on mBDNF. Cortico-hippocampal primary neurons from Tg2576 mice or A β_{25-35} -exposed primary neurons from WT mice were treated with PAI-039 and/or TrkB/Fc chimera, which acts as antagonist for TrkB receptor by binding and sequestering mBDNF.

$A\beta_{25-35}$ treatment reduced viability of WT primary neurons ($F_{(1,28)} = 17.012$, $P < 0.01$ vs Control) but PAI-039 (2 μ M) reverted $A\beta$ -induced neurotoxicity ($P < 0.01$ for $A\beta_{25-35}$ +PAI-039 vs $A\beta_{25-35}$). However, a higher concentration of PAI-039 (10 μ M) showed neurotoxic effects by inducing a critical decrease of neuronal viability ($F_{(1,18)} = 6.587$, $P < 0.05$ vs Control) (Fig 6A). When mBDNF was sequestered by the addition of TrkB/Fc chimera (0.3 μ g/mL), the protection of PAI-039 (2 μ M) against $A\beta_{25-35}$ -induced damage in terms of reduced viability was fully abolished ($F_{(7,33)} = 9.872$, $P < 0.01$ for $A\beta_{25-35}$ +PAI-039+TrkB/Fc vs $A\beta_{25-35}$ +PAI-039) (Fig. 6B). MEK-ERK and PI3K-Akt, two major downstream pathways involved in TrkB receptor signalling, were inhibited in order to reinforce the idea that mBDNF is relevant in the protection exerted by PAI-1 inhibition against $A\beta$ -induced neurotoxicity. Inhibition of MEK1/2 by PD98059 (10 μ M) significantly reverted the protection observed by PAI-039 against $A\beta_{25-35}$ ($F_{(10,41)} = 8.193$, $P < 0.01$ for $A\beta_{25-35}$ +PAI-039+PD98059 vs $A\beta_{25-35}$ +PAI-039). However, inhibition of PI3K by wortmannin (100 nM) failed to revert that protection (Fig. 6C).

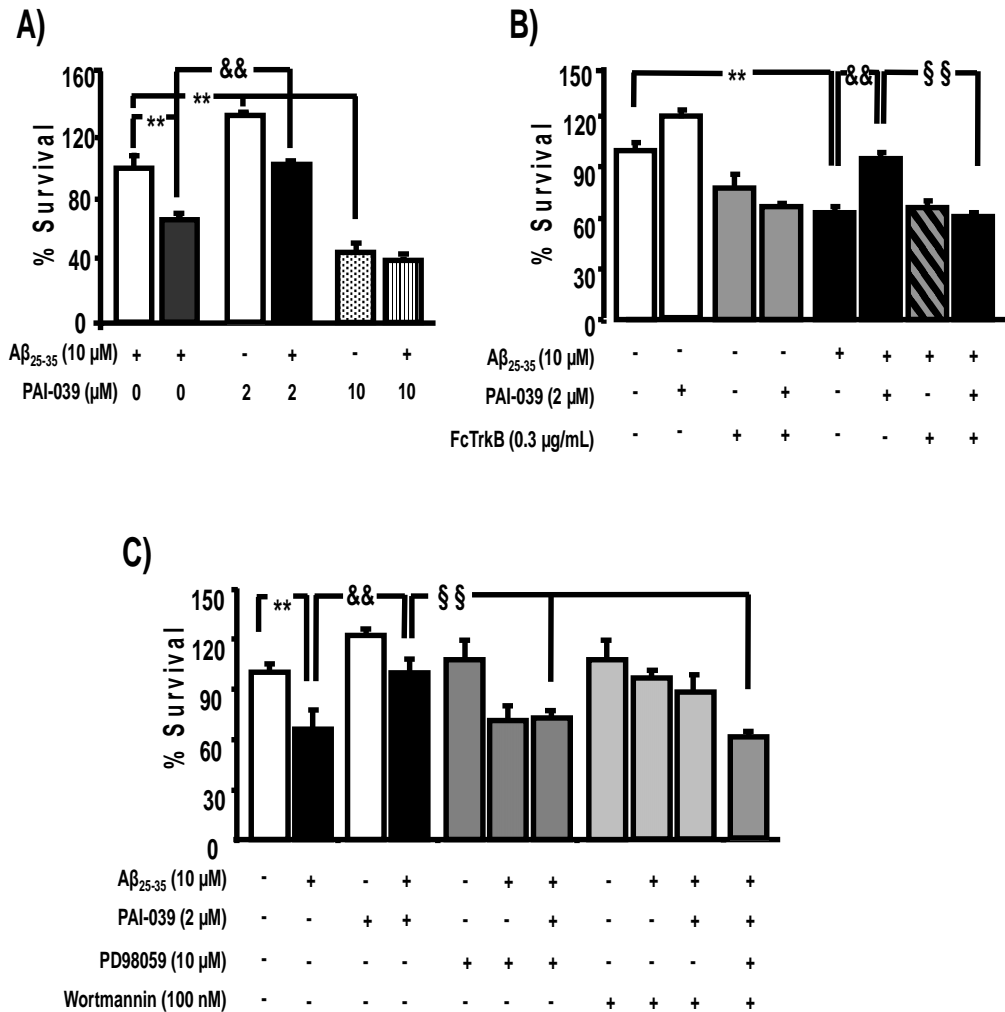


Figure 6. Reduction of neuronal viability by A β_{25-35} is dependent on PAI-1 expression and subsequent decline of mature BDNF production. **(A)** At DIV 14, cortico-hippocampal primary neurons showed reduced viability in the MTT assay after 24 h-treatment with A β_{25-35} . Reduced viability was reverted by 2 μ M of PAI-039 but potentiated by a higher concentration of PAI-039 (10 μ M). **(B)** PAI-039-mediated protection against A β_{25-35} neurotoxicity was abolished when sequestering mBDNF by the recombinant chimera TrkB/Fc (0.3 μ g/mL). **(C)** PAI-039-mediated protection against A β_{25-35} neurotoxicity was abolished after inhibition of MEK by PD98059 (10 μ M) but not after PI3K inhibition by wortmannin (100 nM). Data are expressed as mean \pm S.E.M. Histograms show percentage of optical density (O.D.) values of non-treated control group. **P<0.01 vs non-treated control; &&P<0.01 vs A β_{25-35} ; §§P<0.01 vs A β_{25-35} +PAI-039.

As Fig. 7 shows, similar outcomes were achieved in Tg2576 primary neurons. In short, only the lower dose of PAI-039 improved neuronal viability ($t_{(1,25)} = -4.666$, $P < 0.01$) (Fig. 7A), but that effect was fully reverted by TrkB/Fc chimera ($F_{(3,24)} = 24.487$, $P < 0.01$ for PAI-

039+TrkB/Fc vs PAI-039) (Fig. 7B) or PD98059/wortmaninn treatments ($F_{(7,41)}= 10.560$, $P<0.01$ for PAI-039+PD98059/wortmaninn vs PAI-039) (Fig. 7C).

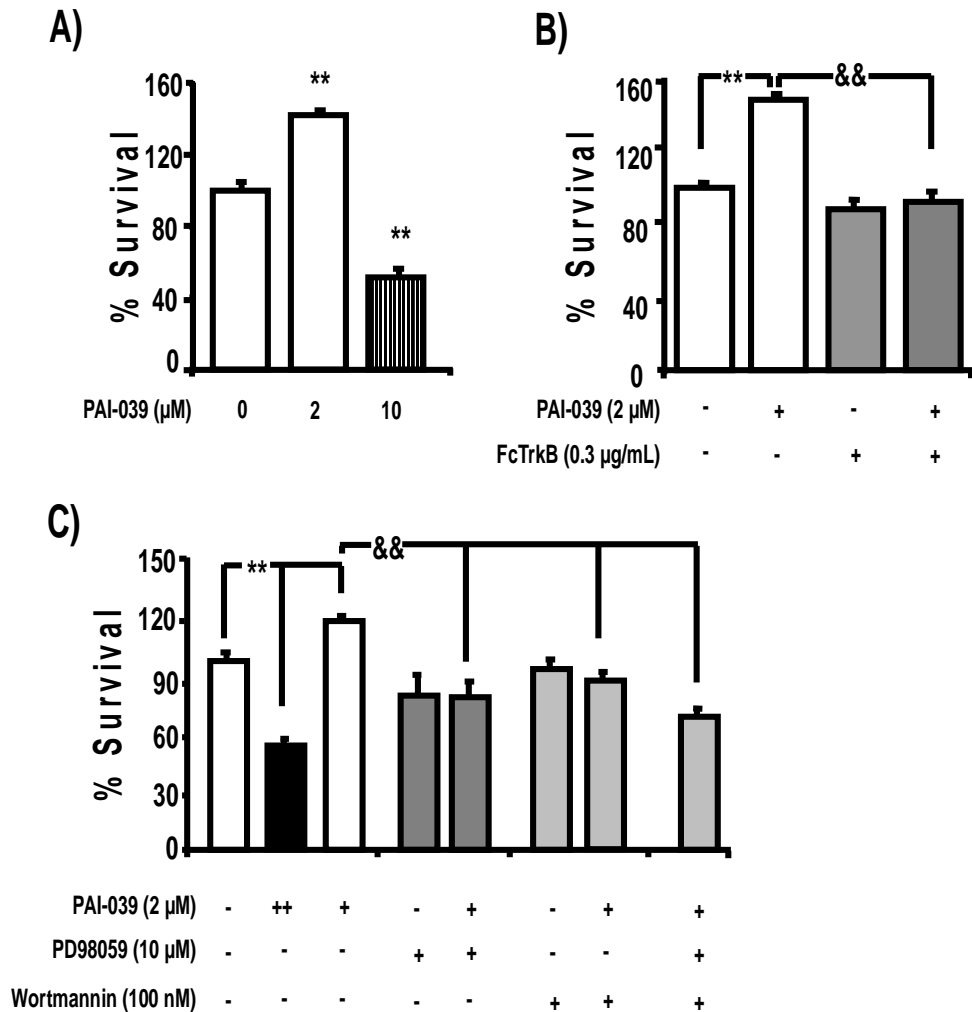


Figure 7. Reduction viability in Tg2576 cortico-hippocampal neurons is dependent on PAI-1 expression and subsequent decline of mature BDNF production. **(A)** At DIV 14, Tg2576 primary neurons treated with $2 \mu\text{M}$ of PAI-039 showed increased viability in the MTT assay. In contrast, a higher concentration of PAI-039 ($10 \mu\text{M}$) induced showed reduced viability in Tg2576 neurons. **(B)** The increased viability mediated by PAI-039 ($2 \mu\text{M}$) was abolished when sequestering mBDNF by the recombinant chimera TrkB/Fc ($0.3 \mu\text{g/mL}$). **(C)** The increased viability mediated by PAI-039 ($2 \mu\text{M}$) was blocked after inhibition of MEK by PD98059 ($10 \mu\text{M}$) and after PI3K inhibition by wortmannin (100 nM) as well. Data are expressed as mean \pm S.E.M. Histograms show percentage of optical density (O.D.) values of non-treated control group. Six wells per treatment were used (Neurons from every pup brain were cultured in one different well). ** $P<0.01$ vs non-treated control; && $P<0.01$ vs PAI-039.

3.5. A paradigm of cognitive stimulation applied to Tg2576 mice prevents high levels of PAI-1 and restores the impaired BDNF maturation

It has been recently shown by own group that a cognitive stimulation (CS) protocol, which consists of a 8-week training on response-learning tasks in non-enriched environments, induced a significant effect on the cognitive decline associated to the amyloid pathology in Tg2576 mice. In particular, CS induced better retention scores in the Morris water maze (MWM) test and higher discrimination indexes in the novel object recognition test (NORT) (Gerenu et al. 2013). We explored whether the beneficial effects of this CS paradigm could be accompanied by restored maturation of BDNF.

Interestingly, CS re-established the reduced production of mBDNF observed in Tg2576 mice ($F_{(1,26)}=11.850$, $P<0.01$ vs Tg2576-naïve), as well as the ratio mBDNF/pro-BDNF ($F_{(1,46)}=49.665$, $P<0.01$ vs Tg2576-naïve). Also interesting was the effect of CS on PAI-1 levels and tPA activity. As expected, CS induced a significant reduction of PAI-1 protein levels ($F_{(1,26)}=14.269$, $P<0.01$ vs Tg2576-naïve), together with a increase of free tPA ($F_{(1,26)}=4.498$, $P<0.01$ vs Tg2576-naïve) but a decrease of PAI-1-bound tPA ($F_{(1,26)}=17.315$, $P<0.01$ vs Tg2576-naïve) (Fig. 8A). In parallel, Tg2576 mice exposed to CS shown decreased levels of phospho-JNK1/2 ($F_{(1,26)}=37.403$, $P<0.01$) as well as phospho-c-Jun ($P<0.05$) when compared to naïve-treated animals (Fig. 8B). It is of particular interest to mention that levels of phospho-JNK were strongly and negatively correlated to mBDNF (r and P and n), and that discrimination index at NORT showed negative correlation to PAI-1 levels (Pearson's $r=-0.723$, $P<0.01$, $n=23$) and positive correlation to mBDNF levels (Pearson's $r=0.635$, $P<0.01$, $n=23$).

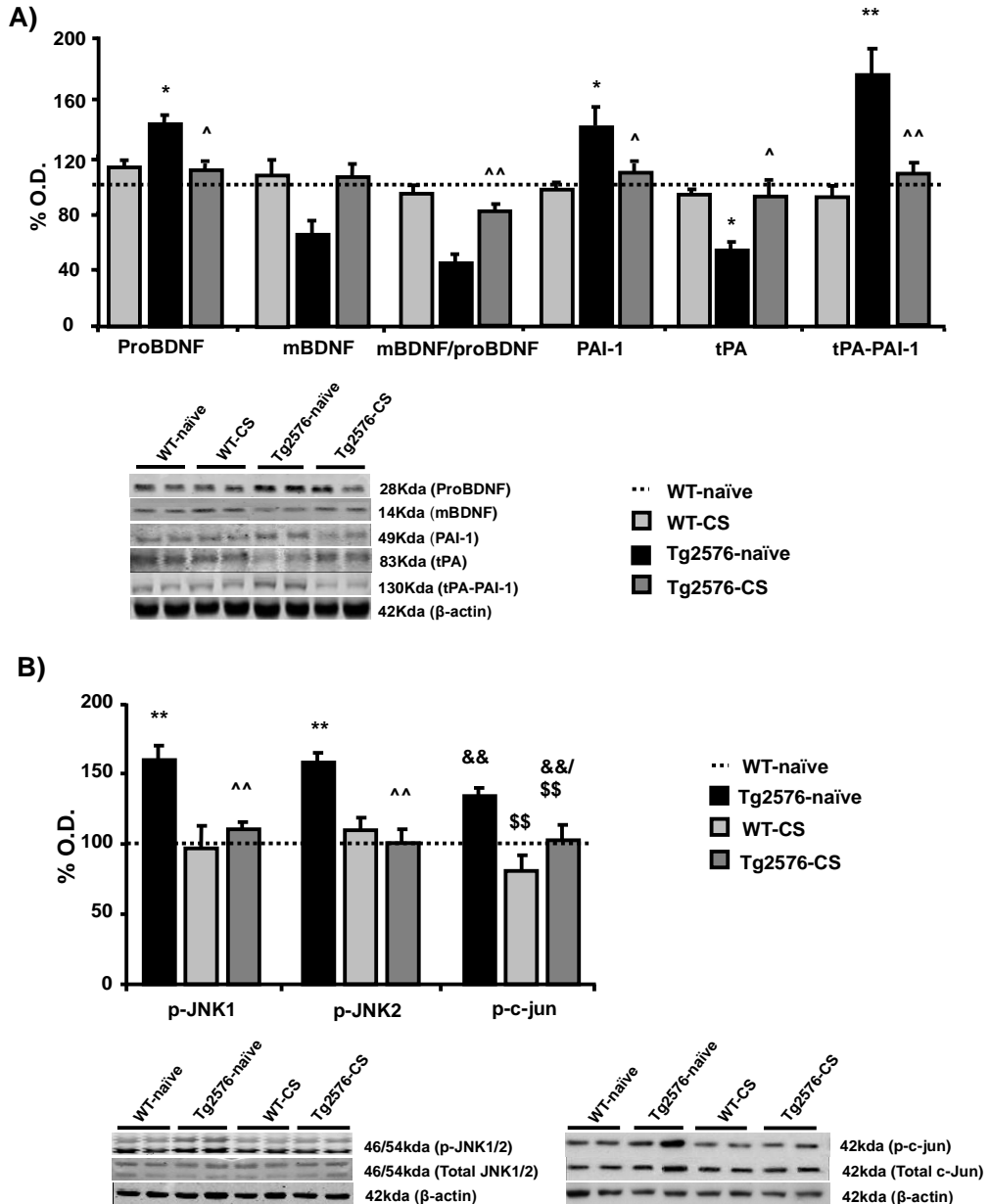


Figure 8. Increased PAI-1 and reduced mature BDNF might be involved in the cognitive deficits associated to over-expression of hAPP^{swe} in the Tg2576 mouse. (A) 16 month-old Tg2576 mice (Tg2576-naïve) showed increased levels of proBDNF, and decreased mBDNF and ratio in hippocampus when compared to wild-type (WT)-naïve animals. These animals also presented increased levels of PAI-1 protein, as well as increased levels of tPA-PAI-1 complex and decreased free tPA. Tg2576 mice exposed to cognitive stimulation (Tg2576-CS), a protocol that was able to compensate for cognitive deficits (Gerenu et al. 2013) showed recovered levels of proBDNF, mBDNF, PAI-1 and free tPA. (B). 16 month-old Tg2576-naïve mice also presented a higher phosphorylated state of both JNK1/2 and c-jun proteins when compared to WT-naïve mice. However, CS protocol was able to reduce the phosphorylation state of both proteins to similar levels of those from WT-naïve animals. Data are expressed as mean \pm S.E.M. Histograms show percentage of optical density (O.D.) values of WT-naïve group. Six animals in each group were used. *P<0.05 vs WT-naïve; **P<0.01 vs WT-naïve; ^P<0.05 vs Tg2576-naïve; ^^P<0.01 vs Tg2576-naïve; &&P<0.01 vs WT (single effect for Tg2576); \$\$P<0.01 vs naïve (single effect of CS).

4. Discussion

A novel mechanism by which amyloid- β peptide might induce its pathological effects on AD has been proposed in the present work. Our current results have shown that A β leads to a decreased proteolytical maturation of BDNF by neurons. This proteolytical shift toward higher proBDNF and lower mature BDNF levels appeared to mediate the A β -associated neurotoxicity. In contrast to its precursor, proBDNF, mature BDNF participates in many events that are all generally considered to be beneficial to neuronal survival and function (Park and Poo 2013). In this sense, experimental data have shown that BDNF deficiency leads to increased vulnerability to neurotoxic insults and neurodegeneration (Yu et al. 2008; Ye et al. 2012). Initial post-mortem analyses of AD brains added observations on particular lower levels of BDNF in those brain areas exhibiting extensive neurodegenerative processes, as hippocampus, cortex and basal forebrain (Phillips et al. 1991; Peng et al. 2005). Interestingly, the reduced levels of BDNF correlated with clinical scores of AD (Peng et al. 2005). Further experimental work has supported and elucidated the effect of A β on BDNF down-regulation by demonstrating that is specific to the aggregation state of A β into large oligomers (Peng et al. 2009) and that is dependent on A β -induced dys-regulation of calcium and cAMP signals (Espana et al. 2010). However, whether A β might be involved in the post-translational processing of BDNF and subsequent availability of the mature form to neurons has been less explored. One previous study reported that oligomeric A β interfered with the proteolytic conversion of proBDNF to mature BDNF, resulting in the inhibition of synaptic AMPA receptor delivery (Zheng et al. 2010).

In the present study, a mechanism by which A β might be disrupting the maturation of BDNF has been proposed. The peptidic fragment corresponding to the amino acid 25 to 35 of A β , which exhibits large β -sheet aggregated structures comparable to oligomeric A β , triggered a rapid and strong expression of PAI-1 by primary cortico-hippocampal neurons that was dependent on JNK-c-Jun transcriptional activity. The participation of JNK and c-Jun in the A β -mediated expression of PAI-1 is not surprising since the activation of neuronal JNK by A β is widely demonstrated (Morishima et al. 2001) and the PAI-1 promoter contains responsive elements to c-Jun transcription factor (Descheemaeker et al. 1992). Increased levels of PAI-1

led to reduced levels of mature BDNF by a higher sequestration of tPA and, therefore, reduced tPA activity, which in turn is likely to decrease the activity of plasmin, the protease most involved in BDNF processing (Pang et al. 2004). These data were strengthened by the higher levels of PAI-1 and lower tPA activity found in samples with vast amyloid pathology, both in hippocampus from 16 month-old Tg2576 mice and in frontal cortex from AD patients. Comparable observations regarding the increased levels of PAI-1 together with lower tPA activity have been achieved in brain samples from APP/PS1 mice and AD patients (Descheemaeker et al. 1992; Fabbro and Seeds 2009; Liu et al. 2011), although measures of these parameters in CSF samples from AD patients have shown no change (Martorana et al. 2012). Previous evidence supported the role of PAI-1 in inhibiting tPA activity on AD pathology. In particular, it has been shown that either PAI-1-deficiency or small-molecule inhibition of PAI-1 in APP-overexpressing mice led to rapid amyloid clearance and reduced cognitive deficits through a mechanism that involves A β proteolytic degradation by increased tPA and plasmin activity (Jacobsen et al. 2008; Fabbro et al. 2011; Liu et al. 2011).

We instead focused on the potential role that PAI-1 might exert on AD pathogenesis by impairing the maturation of BDNF and subsequent withdrawal of trophic support to neurons. In this sense, inhibition of PAI-1 by the small-molecule PAI-039 increased the levels of free tPA and offered protection to cortico-hippocampal neurons against A β -induced neurotoxicity by prompting the production of mature BDNF. It is important to underline that one of most important mechanisms by which A β mediate cell death, JNK-c-Jun pathway (Morishima et al. 2001), has been observed to induce PAI-1 expression and subsequent impairment of BDNF maturation. Interestingly, protection of PAI-1 inhibition against A β -induced neurotoxicity was abolished when mature BDNF was captured by recombinant TrkB/Fc chimera or when TrkB signalling was arrested by inhibition of its main downstream player ERK1/2. Due to the apoptotic nature of proBDNF when bound to p75^{NTR} (Teng et al. 2005), it is also important to consider a potential action of the reduced levels of proBDNF in the neuroprotective effects induced by PAI-1 inhibition. Contrarily to these findings, some authors have found that PAI-1, rather than withdraw trophic support, offers neuroprotection to neurons (Soeda et al. 2008; Cho et al. 2013). One explanation for this controversy could be that PAI-1 would be preventing the cell death induced by high activity levels of tPA. It is known that under certain circumstances where tPA is up-regulated (i.e. stroke), its ability to induce plasmin-dependent neuronal survival

and plasticity (Pang et al. 2004) would be masked by an interaction with NMDA receptors that eventually induces excitotoxicity (Nicole et al. 2001). Hence, it is not surprising that the neurotoxicity exerted by a high concentration of PAI-1 inhibitor per se in our hands might be due to too much facilitation of tPA activity that could mediate excitotoxic events.

Besides its potent actions on neuronal survival and functioning, it cannot be ignored the relevant participation of BDNF maturation in synaptic plasticity and learning and memory processes. While proBDNF has been link to enhanced long-term depression (Woo et al. 2005), mature BDNF is implicated in late-phase long-term potentiation and long-term memory (Pang et al. 2004). In this study, we used a novel paradigm for cognitive stimulation that was applied to Tg2576 mice before the onset of amyloid deposition and cognitive decline and was able to compensate for deficits in spatial and recognition memories late in life (Gerenu et al. 2013). Notably, the chronic stimulation of cognitive function by this paradigm induced significant increases of mature BDNF together with decreases of proBDNF in hippocampus. It is widely accepted that neuronal activity plays a pivotal role in synaptic plasticity and memory processes by modulating the expression of mainly such neurotrophins as BDNF (Lu 2003). Accordingly, several works have reported increased levels of BDNF expression in mice brains after stimulating their cognitive abilities in enriched environments (Branchi et al. 2006; Kuzumaki et al. 2011). Of particular relevance is our finding that the cognitive simulation-induced restoration of impaired BDNF maturation observed in Tg2576 mice was related to reduced levels of PAI-1 and higher levels of free and active tPA in hippocampus. This result is in agreement with a previous study that showed increased tPA and mature BDNF levels in mice exposed to enriched housing (Obiang et al. 2011), with the difference that the protocol for cognitive stimulation used in the present study is devoid of any kind of enriched environments. Taken together, these data suggests a potential role of PAI-1 in mediating impairment of BDNF maturation and subsequent cognitive dysfunction associated to AD.

PAI-1 is a multi-functional protein that not only regulates fibrinolysis through inactivation of plasminogen but also modulates several events that have direct effects on cell function. Its function is so ambiguous that different studies have evidenced its connection with both the prevention and worsening of various disease states. In particular, elevated levels of PAI-1 protein have been long associated to the development and progression of cardiovascular diseases, obesity, diabetes mellitus type II, metabolic syndrome and cancer (Reuning et al.

1998; Juhan-Vague et al. 2003; Alessi and Juhan-Vague 2006; Ploplis 2011). More recently, elevated PAI-1 and following reduced tPA activity has been reported in AD brains (Fabbro and Seeds 2009), although its relevance in AD pathogenesis is not clear. The present study demonstrates that pathological levels of A β are able to prompt enhanced PAI-1 expression, which in turn leads to decreased tPA activity and impaired maturation of BDNF by neurons. This mechanism has been shown to affect neuronal function and survival, and might take part in the cascade of events involved in AD-associated memory decline. Thus, we propose PAI-1 as a potential target for intervening the pathological progression of AD and its consequent declination of memory deficits.

References

Acheson, A., Conover, J.C., Fandl, J.P., DeChiara, T.M., Russell, M., Thadani, A., Squinto, S.P., Yancopoulos, G.D. and Lindsay, R.M. (1995). "A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death." *Nature* **374**(6521): 450-453.

Alessi, M.C. and Juhan-Vague, I. (2006). "PAI-1 and the metabolic syndrome: links, causes, and consequences." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **26**(10): 2200-2207.

Arriagada, P.V., Growdon, J.H., Hedley-Whyte, E.T. and Hyman, B.T. (1992). "Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease." *Neurology* **42**(3 Pt 1): 631-639.

Branchi, I., D'Andrea, I., Fiore, M., Di Fausto, V., Aloe, L. and Alleva, E. (2006). "Early social enrichment shapes social behavior and nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor levels in the adult mouse brain." *Biological psychiatry* **60**(7): 690-696.

Castellani, R.J., Lee, H.G., Siedlak, S.L., Nunomura, A., Hayashi, T., Nakamura, M., Zhu, X., Perry, G. and Smith, M.A. (2009). "Reexamining Alzheimer's disease: evidence for a protective role for amyloid-beta protein precursor and amyloid-beta." *Journal of Alzheimer's disease* **18**(2): 447-452.

Chartier-Harlin, M.C., Crawford, F., Houlden, H., Warren, A., Hughes, D., Fidani, L., Goate, A., Rossor, M., Roques, P., Hardy, J. and et al. (1991). "Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene." *Nature* **353**(6347): 844-846.

Cho, H., Joo, Y., Kim, S., Woo, R.S., Lee, S.H. and Kim, H.S. (2013). "Plasminogen activator inhibitor-1 promotes synaptogenesis and protects against abeta(1-42)-induced neurotoxicity in primary cultured hippocampal neurons." *The International journal of neuroscience* **123**(1): 42-49.

D'Ursi, A.M., Armenante, M.R., Guerrini, R., Salvadori, S., Sorrentino, G. and Picone, D. (2004). "Solution structure of amyloid beta-peptide (25-35) in different media." *Journal of medicinal chemistry* **47**(17): 4231-4238.

Davis, D.G., Schmitt, F.A., Wekstein, D.R. and Markesbery, W.R. (1999). "Alzheimer neuropathologic alterations in aged cognitively normal subjects." *Journal of neuropathology and experimental neurology* **58**(4): 376-388.

De Felice, F.G., Velasco, P.T., Lambert, M.P., Viola, K., Fernandez, S.J., Ferreira, S.T. and Klein, W.L. (2007). "A β oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine." *The Journal of biological chemistry* **282**(15): 11590-11601.

Declerck, P.J., De Mol, M., Vaughan, D.E. and Collen, D. (1992). "Identification of a conformationally distinct form of plasminogen activator inhibitor-1, acting as a noninhibitory substrate for tissue-type plasminogen activator." *The Journal of biological chemistry* **267**(17): 11693-11696.

Descheemaeker, K.A., Wyns, S., Nelles, L., Auwerx, J., Ny, T. and Collen, D. (1992). "Interaction of AP-1-, AP-2-, and Sp1-like proteins with two distinct sites in the upstream regulatory region of the plasminogen activator inhibitor-1 gene mediates the phorbol 12-myristate 13-acetate response." *The Journal of biological chemistry* **267**(21): 15086-15091.

Espana, J., Valero, J., Minano-Molina, A.J., Masgrau, R., Martin, E., Guardia-Laguarta, C., Lleo, A., Gimenez-Llort, L., Rodriguez-Alvarez, J. and Saura, C.A. (2010). "beta-Amyloid disrupts activity-dependent gene transcription required for memory through the CREB coactivator CRT1." *The Journal of neuroscience* **30**(28): 9402-9410.

Fabbro, S., Schaller, K. and Seeds, N.W. (2011). "Amyloid-beta levels are significantly reduced and spatial memory defects are rescued in a novel neuroserpin-deficient Alzheimer's disease transgenic mouse model." *Journal of neurochemistry* **118**(5): 928-938.

Fabbro, S. and Seeds, N.W. (2009). "Plasminogen activator activity is inhibited while neuroserpin is up-regulated in the Alzheimer disease brain." *Journal of neurochemistry* **109**(2): 303-315.

Gerenu, G., Dobarro, M., Ramirez, M.J. and Gil-Bea, F.J. (2013). "Early cognitive stimulation compensates for memory and pathological changes in Tg2576 mice." *Biochimica et biophysica acta* **1832**(6): 837-847.

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): 353-356.

Hetman, M. and Xia, Z. (2000). "Signaling pathways mediating anti-apoptotic action of neurotrophins." *Acta neurobiologiae experimentalis* **60**(4): 531-545.

Ichim, G., Tauszig-Delamasure, S. and Mehlen, P. (2012). "Neurotrophins and cell death." *Experimental cell research* **318**(11): 1221-1228.

Jacobsen, J.S., Comery, T.A., Martone, R.L., Elokdah, H., Crandall, D.L., Oganessian, A., Aschmies, S., Kirksey, Y., Gonzales, C., Xu, J., Zhou, H., Atchison, K., Wagner, E., Zaleska, M.M., Das, I., Arias, R.L., Bard, J., Riddell, D., Gardell, S.J., Abou-Gharbia, M., Robichaud, A., Magolda, R., Vlasuk, G.P., Bjornsson, T., Reinhart, P.H. and Pangalos, M.N. (2008). "Enhanced clearance of A β in brain by sustaining the plasmin proteolysis cascade." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**(25): 8754-8759.

Juhan-Vague, I., Alessi, M.C., Mavri, A. and Morange, P.E. (2003). "Plasminogen activator inhibitor-1, inflammation, obesity, insulin resistance and vascular risk." *Journal of thrombosis and haemostasis* : JTH **1**(7): 1575-1579.

Keeton, M.R., Curriden, S.A., van Zonneveld, A.J. and Loskutoff, D.J. (1991). "Identification of regulatory sequences in the type 1 plasminogen activator inhibitor gene responsive to transforming growth factor beta." *The Journal of biological chemistry* **266**(34): 23048-23052.

Koshimizu, H., Kiyosue, K., Hara, T., Hazama, S., Suzuki, S., Uegaki, K., Nagappan, G., Zaitsev, E., Hirokawa, T., Tatsu, Y., Ogura, A., Lu, B. and Kojima, M. (2009). "Multiple functions of precursor BDNF to CNS neurons: negative regulation of neurite growth, spine formation and cell survival." *Molecular brain* **2**: 27.

Kuzumaki, N., Ikegami, D., Tamura, R., Hareyama, N., Imai, S., Narita, M., Torigoe, K., Niikura, K., Takeshima, H., Ando, T., Igarashi, K., Kanno, J., Ushijima, T. and Suzuki, T. (2011). "*Hippocampal epigenetic modification at the brain-derived neurotrophic factor gene induced by an enriched environment.*" *Hippocampus* **21**(2): 127-132.

Lambert, M.P., Barlow, A.K., Chromy, B.A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T.E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K.L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C.E., Krafft, G.A. and Klein, W.L. (1998). "*Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1-42 are potent central nervous system neurotoxins.*" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(11): 6448-6453.

Lauren, J., Gimbel, D.A., Nygaard, H.B., Gilbert, J.W. and Strittmatter, S.M. (2009). "*Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers.*" *Nature* **457**(7233): 1128-1132.

Lee, D.H. and Wang, H.Y. (2003). "*Differential physiologic responses of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors to beta-amyloid1-40 and beta-amyloid1-42.*" *Journal of neurobiology* **55**(1): 25-30.

Lesne, S., Koh, M.T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C.G., Yang, A., Gallagher, M. and Ashe, K.H. (2006). "*A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory.*" *Nature* **440**(7082): 352-357.

Lewis, D.A. (2002). "*The human brain revisited: opportunities and challenges in postmortem studies of psychiatric disorders.*" *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **26**(2): 143-154.

Liu, R.M., van Groen, T., Katre, A., Cao, D., Kadisha, I., Ballinger, C., Wang, L., Carroll, S.L. and Li, L. (2011). "*Knockout of plasminogen activator inhibitor 1 gene reduces amyloid beta peptide burden in a mouse model of Alzheimer's disease.*" *Neurobiology of aging* **32**(6): 1079-1089.

Liu, S., Liu, Y., Hao, W., Wolf, L., Kiliaan, A.J., Penke, B., Rube, C.E., Walter, J., Heneka, M.T., Hartmann, T., Menger, M.D. and Fassbender, K. (2012). "*TLR2 is a primary receptor for*

Alzheimer's amyloid beta peptide to trigger neuroinflammatory activation." *Journal of immunology* **188**(3): 1098-1107.

Lu, B. (2003). "BDNF and activity-dependent synaptic modulation." *Learning & memory* **10**(2): 86-98.

Magdesian, M.H., Carvalho, M.M., Mendes, F.A., Saraiva, L.M., Juliano, M.A., Juliano, L., Garcia-Abreu, J. and Ferreira, S.T. (2008). "Amyloid-beta binds to the extracellular cysteine-rich domain of Frizzled and inhibits Wnt/beta-catenin signaling." *The Journal of biological chemistry* **283**(14): 9359-9368.

Martorana, A., Sancesario, G.M., Esposito, Z., Nuccetelli, M., Sorge, R., Formosa, A., Dinallo, V., Bernardi, G., Bernardini, S. and Sancesario, G. (2012). "Plasmin system of Alzheimer's disease patients: CSF analysis." *Journal of neural transmission* **119**(7): 763-769.

Morishima, Y., Gotoh, Y., Zieg, J., Barrett, T., Takano, H., Flavell, R., Davis, R.J., Shirasaki, Y. and Greenberg, M.E. (2001). "Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand." *The Journal of neuroscience* **21**(19): 7551-7560.

Nicole, O., Docagne, F., Ali, C., Margaille, I., Carmeliet, P., MacKenzie, E.T., Vivien, D. and Buisson, A. (2001). "The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling." *Nature medicine* **7**(1): 59-64.

Numakawa, T., Suzuki, S., Kumamaru, E., Adachi, N., Richards, M. and Kunugi, H. (2010). "BDNF function and intracellular signaling in neurons." *Histology and histopathology* **25**(2): 237-258.

Obiang, P., Maubert, E., Bardou, I., Nicole, O., Launay, S., Bezin, L., Vivien, D. and Agin, V. (2011). "Enriched housing reverses age-associated impairment of cognitive functions and tPA-dependent maturation of BDNF." *Neurobiology of learning and memory* **96**(2): 121-129.

Pang, P.T., Teng, H.K., Zaitsev, E., Woo, N.T., Sakata, K., Zhen, S., Teng, K.K., Yung, W.H., Hempstead, B.L. and Lu, B. (2004). "Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity." *Science* **306**(5695): 487-491.

Park, H. and Poo, M.M. (2013). "*Neurotrophin regulation of neural circuit development and function.*" *Nature reviews. Neuroscience* **14**(1): 7-23.

Peng, S., Garzon, D.J., Marchese, M., Klein, W., Ginsberg, S.D., Francis, B.M., Mount, H.T., Mufson, E.J., Salehi, A. and Fahnstock, M. (2009). "*Decreased brain-derived neurotrophic factor depends on amyloid aggregation state in transgenic mouse models of Alzheimer's disease.*" *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **29**(29): 9321-9329.

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.*" *Journal of neurochemistry* **93**(6): 1412-1421.

Phillips, H.S., Hains, J.M., Armanini, M., Laramée, G.R., Johnson, S.A. and Winslow, J.W. (1991). "*BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease.*" *Neuron* **7**(5): 695-702.

Pike, C.J., Walencewicz-Wasserman, A.J., Kosmoski, J., Cribbs, D.H., Glabe, C.G. and Cotman, C.W. (1995). "*Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity.*" *Journal of neurochemistry* **64**(1): 253-265.

Ploplis, V.A. (2011). "*Effects of altered plasminogen activator inhibitor-1 expression on cardiovascular disease.*" *Current drug targets* **12**(12): 1782-1789.

Reuning, U., Magdolen, V., Wilhelm, O., Fischer, K., Lutz, V., Graeff, H. and Schmitt, M. (1998). "*Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis (review).*" *International journal of oncology* **13**(5): 893-906.

Rogaev, E.I., Sherrington, R., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., Chi, H., Lin, C., Holman, K., Tsuda, T. and et al. (1995). "*Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene.*" *Nature* **376**(6543): 775-778.

Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., Tsuda, T., Mar, L., Foncin, J.F., Bruni, A.C., Montesi, M.P., Sorbi, S., Rainero, I., Pinessi, L., Nee, L., Chumakov, I., Pollen, D., Brookes, A., Sanseau, P., Polinsky, R.J., Wasco, W., Da Silva, H.A., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., Tanzi, R.E., Roses, A.D., Fraser, P.E., Rommens, J.M. and St George-Hyslop, P.H. (1995). "Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease." *Nature* **375**(6534): 754-760.

Soeda, S., Koyanagi, S., Kuramoto, Y., Kimura, M., Oda, M., Kozako, T., Hayashida, S. and Shimeno, H. (2008). "Anti-apoptotic roles of plasminogen activator inhibitor-1 as a neurotrophic factor in the central nervous system." *Thrombosis and haemostasis* **100**(6): 1014-1020.

Solas, M., Francis, P.T., Franco, R. and Ramirez, M.J. (2013). "CB2 receptor and amyloid pathology in frontal cortex of Alzheimer's disease patients." *Neurobiology of aging* **34**(3): 805-808.

Teng, H.K., Teng, K.K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R.D., Kermani, P., Torkin, R., Chen, Z.Y., Lee, F.S., Kraemer, R.T., Nykjaer, A. and Hempstead, B.L. (2005). "ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin." *The Journal of neuroscience* **25**(22): 5455-5463.

Valincius, G., Heinrich, F., Budvytyte, R., Vanderah, D.J., McGillivray, D.J., Sokolov, Y., Hall, J.E. and Losche, M. (2008). "Soluble amyloid beta-oligomers affect dielectric membrane properties by bilayer insertion and domain formation: implications for cell toxicity." *Biophysical journal* **95**(10): 4845-4861.

Woo, N.H., Teng, H.K., Siao, C.J., Chiaruttini, C., Pang, P.T., Milner, T.A., Hempstead, B.L. and Lu, B. (2005). "Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression." *Nature neuroscience* **8**(8): 1069-1077.

Xie, L., Helmerhorst, E., Taddei, K., Plewright, B., Van Bronswijk, W. and Martins, R. (2002). "Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor." *The Journal of neuroscience* **22**(10): RC221.

Yaar, M., Zhai, S., Pilch, P.F., Doyle, S.M., Eisenhauer, P.B., Fine, R.E. and Gilchrist, B.A. (1997). "Binding of beta-amyloid to the p75 neurotrophin receptor induces apoptosis. A

possible mechanism for Alzheimer's disease." The Journal of clinical investigation **100**(9): 2333-2340.

Ye, X., Tai, W. and Zhang, D. (2012). "*The early events of Alzheimer's disease pathology: from mitochondrial dysfunction to BDNF axonal transport deficits.*" Neurobiology of aging **33**(6): 1122 e1121-1110.

Yu, L.Y., Saarma, M. and Arumae, U. (2008). "*Death receptors and caspases but not mitochondria are activated in the GDNF- or BDNF-deprived dopaminergic neurons.*" The Journal of neuroscience **28**(30): 7467-7475.

Zheng, Z., Sabirzhanov, B. and Keifer, J. (2010). "*Oligomeric amyloid- β inhibits the proteolytic conversion of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), AMPA receptor trafficking, and classical conditioning.*" The Journal of biological chemistry **285**(45): 34708-34717.

Capítulo V

Capítulo 5

Discusión General

En la presente tesis doctoral se ha diseñado y validado un nuevo protocolo de estimulación cognitiva (CS), desprovisto de ambientes enriquecidos, ejercicio físico o interacción social. Este paradigma ha permitido corroborar el efecto beneficioso de la CS como factor protector, sobre el déficit cognitivo en la EA, así como en los eventos patológicos asociados a esta enfermedad. Además, se ha mostrado un posible mecanismo mediante el cual la CS puede ejercer sus efectos y, con ello, se plantea una nueva estrategia terapéutica para la EA..

En general, los efectos beneficiosos del enriquecimiento ambiental en cognición y signos patológicos de la EA están ampliamente reconocidos en diferentes modelos animales de la EA (Wolf y col 2006; Costa y col 2007). Sin embargo, no todos los protocolos de enriquecimiento ambiental han demostrado ejercer los mismos efectos sobre la patología amiloide (Lazarov y col 2005; Wolf y col 2006; Cracchiolo y col 2007; Cotel y col 2012) o la función cognitiva (Wolf y col 2006; Costa y col 2007; Cracchiolo y col 2007; Gortz y col 2008; Cotel y col 2012). Los protocolos de enriquecimiento ambiental consisten generalmente en la combinación de diferentes estímulos (Hu y col 2010) para conseguir un ambiente en el que se combinen las habilidades sociales, físicas y ambientes anti-estrés. En la presente tesis doctoral se ha utilizado y validado un método novedoso para inducir un entrenamiento cognitivo en un modelo experimental de EA, evitando la combinación de ambientes enriquecidos, actividades físicas o interacciones sociales. El modelo de CS empleado en esta tesis doctoral se basa en los laberintos de tipo Lashley (Lashley-type maze). Estos laberintos se emplearon ya en los años 80 en experimentos de aprendizaje de animales no transgénicos (Ahroon 1976). Incluso se han utilizado como prueba de comportamiento para estudiar el estado cognitivo de los animales (Hendrich y col 1984). Más recientemente, un estudio empleó el MWM, en intervalos de 3 meses, para entrenar cognitivamente a animales transgénicos (Billings y col 2007). Sin embargo, en la presente tesis doctoral, la prueba de entrenamiento cognitivo no se basa en una repetitividad de la prueba de evaluación, lo que dota a los resultados obtenidos de una mayor fiabilidad en torno al estado cognitivo real de los animales. La reducción del número de errores y del tiempo que emplean los animales en llegar al estímulo positivo a medida que avanza el entrenamiento confirma el entrenamiento de la actividad cognitiva de los animales. Además, como dicho entrenamiento está condicionado por un estímulo positivo, la prueba no supone ningún estrés añadido para los animales. Los

resultados obtenidos constituyen una prueba empírica de los beneficios que un paradigma de CS de larga duración aplicado en edades tempranas de la vida podría ejercer sobre los signos patológicos característicos de la EA y el deterioro cognitivo asociado a ellos.

Uno de los principales hallazgos de este trabajo consiste en que una CS a edades tempranas (4 meses) es capaz de compensar los déficits de memoria de reconocimiento y espacial que muestran los ratones Tg2576 a partir de los 16 meses de edad (edad a la que estos animales manifiestan deterioro cognitivo). La razón por la cual esta CS induce efectos significativos a largo plazo sobre la función cognitiva podría ser la edad en que se aplicó dicho protocolo, ya que a edades tempranas el cerebro tiene la capacidad de responder con mayor eficacia a estímulos sensoriales para la formación de nuevas redes neuronales. Esta adaptación del cerebro, que consiste fundamentalmente en la potenciación de eventos neurogénicos y sinaptogénicos, es conocida con el nombre de reserva cognitiva y ha sido catalogada como un fuerte factor protector frente a los cambios patológicos de la EA (Steffener y Stern 2012; Stern 2012). Un estudio *"in vivo"* ha defendido esta hipótesis, mostrando que en el modelo Tg2576, la exposición a una estimulación en un ambiente enriquecido a edades tempranas redujo los déficits cognitivos relacionados con la EA de una forma más eficaz que una exposición a edades más avanzadas (Verret y col 2013). Es importante destacar de los presentes resultados que, mientras en ratones transgénicos añosos se observaron efectos beneficiosos, los ratones WT no mostraron una mejora significativa en las capacidades cognitivas. Estas observaciones pueden indicar que la CS no aporta ningún efecto beneficioso ante el deterioro cognitivo fisiológico asociado al envejecimiento (Verbitsky y col 2004), pero en su lugar, pueden compensar la pérdida de memoria asociada a procesos patológicos como la EA. Un estudio longitudinal llevado a cabo en una población de once mil individuos cognitivamente sanos podría apoyar esta hipótesis, ya que al someterlos a un protocolo de "entrenamiento cerebral", estos individuos no mostraron mejoras significativas en pruebas cognitivas que no habían sido usadas durante dicho "entrenamiento cerebral" (Owen y col 2010).

Dada la naturaleza genotípica del ratón Tg2576 (sobre-expresión de la proteína APP humana con mutación sueca), parece razonable asociar los déficits cognitivos detectados en este ratón a su inherente patología amiloide. En este sentido, nuestros resultados muestran que la CS logró disminuir los niveles de A β soluble, hecho que se vio estrechamente correlacionado con la mejora cognitiva. Por el contrario, la CS no afectó a la carga de A β

insoluble, dejando también intacto el número de placas de amiloide. Los resultados obtenidos se apoyan en estudios en los que se defienden las especies solubles de A β como causantes del daño sináptico, neurodegeneración y posterior deterioro cognitivo (McLean y col 1999; Kaye y col 2003), y en observaciones que han evidenciado la falta de asociación de las placas amiloides con el desarrollo de las manifestaciones clínicas (Arriagada y col 1992; Serrano-Pozo y col 2011). La fracción soluble de A β está formada por monómeros, oligómeros y fibras, pero las especies oligoméricas son las que en diversos estudios se clasifican como las más neurotóxicas (Kaye y col 2003; Cheng y col 2007; Zheng y col 2010). Nuestros experimentos mostraron una disminución de los niveles de A β *56, dodecámero de A β , en animales Tg2576 sometidos a CS, que, a su vez, se vio correlacionada con una mejora de la retención de memoria en el MWM y del índice de discriminación en el NORT. Este dato es de particular importancia debido a que el dodecámero A β *56 ha sido descrito como el oligómero que produce mayores efectos en el deterioro cognitivo tanto en modelos animales de EA como en humanos (Lesné y col 2006; Billings y col 2007; Cheng y col 2007). Estas observaciones, a pesar de no establecer una relación causal, apoyan una asociación de la disminución de A β *56 con la mejora cognitiva inducida por la CS. Con los presentes resultados no se puede aportar una explicación a la fuerte reducción de A β *56 mediada por la CS. Sin embargo, es preciso especular que la CS podría estar disminuyendo los niveles de A β *56 mediante: 1) limitación de la producción de monómeros; 2) inducción de su aclaramiento; 3) favoreciendo su agregación en placas. Sin embargo, la tinción inmuno-histoquímica de A β reveló que el número de placas no se había alterado por la CS, lo que hace descartar este último punto. Por el contrario, los reducidos niveles de C99 y BACE1 y el aumento de C83 y ADAM17 indican que el procesamiento amiloidogénico está disminuido y, por tanto, la producción del monómero podría estar disminuida. Asimismo, una posible mediación de ciertos procesos de aclaramiento de A β por la CS podría contribuir indudablemente al descenso de los niveles de A β *56.

A pesar de que el modelo Tg2576 no desarrolla NFTs, sí presenta un aumento de los niveles de fosforilación de Tau asociado a la edad y a la alta actividad de cinasas de Tau (Oth y col 2002; Ferrer y col 2005; Cuadrado-Tejedor y col). Resulta llamativa, además, la reversión de los altos niveles de fosforilación de Tau y actividad de cinasas de Tau (como GSK3 β y cdk5) inducida por la CS en animales Tg2576. Se observó que los niveles de fosforilación de Tau estaban correlacionados tanto con A β *56 como con A β ₁₋₄₂. Es importante resaltar que la

CS no afectó ni a los niveles de fosforilación de Tau ni a la actividad de sus cinasas asociadas al envejecimiento en ratones WT. Estos datos, junto con la asunción cada vez más aceptada de que la patología Tau constituye un evento secundario de la patogenia de la EA (Oth y col 2002; Hurtado y col 2010; Jin y col 2011), hacen pensar que el efecto de la CS en la patología Tau podría ser una consecuencia directa de la reducción de la carga amiloide.

Hasta el momento, una importante carencia hasta el momento de los estudios de enriquecimiento ambiental, ha sido la disección de los mecanismos implicados en sus efectos beneficiosos sobre los signos y síntomas de la EA. En este sentido cabe destacar los cambios moleculares detectados en modelos animales de enriquecimiento ambiental en las neurotrofinas. De hecho, varias publicaciones apoyan la potenciación de las funciones cognitivas a través de la inducción de la expresión de BDNF y otras neurotrofinas en animales estimulados en ambientes enriquecidos (Branchi y col 2006; Kuzumaki y col 2011). Sin embargo, debido a que hasta el momento no se han utilizado protocolos que emulen exclusivamente las situaciones de CS, los mecanismos mediante los cuales la CS pudiera ejercer sus efectos beneficiosos no son conocidos. Por eso, encontrar cambios moleculares relevantes inducidos por la CS que pudieran compensar los efectos neurodegenerativos de A β podría suponer un comienzo para la descripción de un nuevo mecanismo a través del cual actuar en la EA. Debido al importante papel que juegan los factores neurotróficos en la funcionalidad y supervivencia neuronal, y en los procesos de memoria y aprendizaje, se decidió abordar el estudio de la implicación de BDNF en los efectos mediados por la CS, ya que se trata de uno de los factores neurotróficos más específicos del SNC.

Durante los últimos años, la actividad y función del factor neurotrófico BDNF se ha estudiado en profundidad, lo cual ha llevado al conocimiento de su actividad dual. Se ha descrito que, mientras proBDNF induce cascadas de señalización apoptótica y LTD (Woo y col 2005), mBDNF es crucial en el mantenimiento de una correcta función neuronal, y en la formación de nuevas memorias a través de la inducción de LTP (Pang y col 2004). En este sentido, datos experimentales han mostrado que la deficiencia en mBDNF provoca un aumento de la vulnerabilidad ante agentes neurotóxicos y eventos neurodegenerativos (Yu y col 2008; Ye y col 2012). Además, el análisis post-mortem de cerebros de EA revela que los niveles de BDNF disminuyen en regiones donde la neurodegeneración es especialmente acusada, como el hipocampo, corteza y prosencéfalo basal (Phillips y col 1991; Peng y col 2005). Curiosamente, se ha descrito que la reducción de la expresión de BDNF en el cerebro

está correlacionada con parámetros clínicos de EA (Peng y col 2005). Algunos trabajos de investigación defienden que esa disminución de BDNF es dependiente del estado de agregación de A β (Peng y col 2009) y de la desregulación de señales de Ca²⁺ y cAMP (España y col 2010). Sin embargo, la posible implicación de A β sobre el procesamiento post-traducciona l de BDNF, en concreto, su maduración, no ha sido estudiada en detalle hasta el momento. Existe un único estudio previo mostrando que los oligómeros de A β favorecen la inhibición del receptor AMPA mediante disminución del procesamiento proteolítico BDNF (Zheng y col 2010).

En nuestro paradigma de CS, la estimulación continuada de las funciones cognitivas logró inducir de manera significativa un aumento de mBDNF, a la vez que una disminución de los niveles de proBDNF en el hipocampo de ratones Tg2576. Probablemente, el aumento de la maduración del factor neurotrófico BDNF podría estar involucrado en los efectos beneficiosos mostrados por la CS, tales como la mejora de la patología sináptica y la mejora cognitiva (Lu 2003). Sin embargo, experimentos de "loss-of-function" deberán ser realizados en un futuro para aportar claridad a esta hipótesis.

La siguiente cuestión abordada en este trabajo fue la de estudiar si los niveles disminuidos de A β soluble y el aumento de la maduración de BDNF observados tras el protocolo CS pudieran tener una conexión causa-efecto. Para ello, se utilizó en neuronas primarias cortico-hipocampales, el fragmento peptídico del aminoácido 25 al 35 de A β (A β ₂₅₋₃₅), que al agregarse forma láminas β comparables a las de los oligómeros solubles de A β . Los resultados mostraron que A β provocó una disminución del procesamiento proteolítico de BDNF, y por tanto, de su maduración. La alteración de este procesamiento proteolítico se tradujo, así, en un aumento en los niveles de proBDNF y una disminución de los niveles de mBDNF.

Un dato interesante fue encontrar que A β ₂₅₋₃₅ inducía una rápida y fuerte expresión de PAI-1 dependiente de la actividad transcripcional de JNK/c-Jun. Este dato sugiere la existencia de un mecanismo por el cual unos altos niveles de A β podrían estar alterando la maduración de BDNF, y consecuentemente, favoreciendo los procesos neurodegenerativos. Plasmina y MMP-7 (ambas extracelulares), y furina (intracelular) son las proteasas capaces de inducir el procesamiento proteolítico de BDNF (Carlino y col 2012). La plasmina es la principal proteasa extracelular y su actividad está regulada por el sistema PAI-1-tPA. Elevados niveles de PAI-1 implican un mayor secuestro de tPA y por lo tanto, una reducción de la actividad de tPA. Por

tanto, en última instancia, tPA es la que en última instancia regula la actividad de plasmina, y en consecuencia, el procesamiento de BDNF (Pang y col 2004).

En la presente tesis, se observaron niveles aumentados de PAI-1 y niveles aumentados de tPA inactivo (unido a PAI-1) tanto en hipocampos de ratones Tg2576 de 16 meses de edad como en corteza frontal de pacientes de EA. Otros estudios apoyan estos resultados al mostrar elevados niveles de PAI-1 junto con disminución de actividad de tPA en cerebros de otros modelos animales de EA (APP/PS1) y también en pacientes de EA (Fabbro y Seeds 2009; Fabbro y col 2011; Liu y col 2011). Aunque también se han medido estos parámetros en CSF de pacientes con EA, no se han detectado cambios significativos (Martorana y col 2012). La disminución de los niveles hipocampales de mBDNF en los animales Tg2576 se encontró acompañada de un aumento en los niveles de PAI-1 y una disminución de los niveles de tPA libre y activo. El hecho de que la aplicación del protocolo de CS consiguiera restablecer estos valores invita a especular sobre la potencial implicación de la maduración de BDNF mediada por tPA/plasmina en los efectos beneficiosos que la CS ejerce en la función cognitiva. Los presentes resultados son similares a los mostrados en un estudio previo que describe un aumento en los niveles de tPA y mBDNF en animales sometidos a un protocolo de EE (Obiang y col 2011), con la diferencia de que el protocolo de CS utilizado en la presente tesis doctoral no implica ningún tipo de estímulo ambiental enriquecedor.

Diversas investigaciones han estudiado la implicación de PAI-1 en la EA mediante la inhibición de tPA. Concretamente, la inhibición de PAI-1 con pequeñas moléculas o la deficiencia de PAI-1 en animales que sobre-expresan APP inducen un aclaramiento de A β y reducen los déficits cognitivos. Por lo tanto, el mecanismo que subyace a este aclaramiento de A β se debe a una degradación proteolítica mediada por tPA/plasmina (Jacobsen y col 2008; Fabbro y col 2011; Liu y col 2011). Sin embargo, el presente trabajo se centra el papel que PAI-1 ejerce en la patología EA mediante sus efectos en la maduración de BDNF y, por tanto, en el soporte trófico de las neuronas. En este sentido, la inhibición de PAI-1 con PAI-039 elevó los niveles de tPA activo y protegió a neuronas cortico-hipocampales frente a la neurotoxicidad inducida por A β ₂₅₋₃₅. Esta protección fue mediada por un aumento en la producción de mBDNF, ya que el secuestro de mBDNF por la adición de la proteína quimérica TrkB revirtió esta neuroprotección. Debido a la naturaleza pro-apoptótica de proBDNF, cabe tener en consideración que los niveles disminuidos de proBDNF tras la inhibición de PAI-1 también podrían haber favorecido la neuroprotección frente a A β . A pesar de que los presentes

resultados muestran un efecto neuroprotector de la inhibición de PAI-1, algunos autores también han descrito una acción neuroprotectora de la propia actividad de PAI-1 (Soeda y col 2008; Cho y col 2013). Esta controversia podría ser debida a la neuroprotección que PAI-1 ejerce en aquellas situaciones en las que hubiera excesivos niveles de tPA activo y plasmina. Una sobre-activación de plasmina induce excitotoxicidad al interactuar con receptores NMDA (Nicole y col 2001). Es por ello que tampoco debe sorprender la neurotoxicidad que se obtuvo al utilizar altas concentraciones de PAI-039, ya que una mayor inhibición de PAI-1 y por tanto, una desmesurada activación de tPA, podría haber desencadenado los efectos excitotóxicos descritos. En su conjunto, estos datos proponen la implicación de PAI-1, a través de la modificación de la maduración de BDNF, en los efectos neurodegenerativos asociados a la EA del péptido A β .

PAI-1 es un proteína multi-funcional que, además de regular la fibrinólisis al inhibir plasmina, regula también otros procesos que tienen efectos directos en la función celular. La funcionalidad de PAI-1 resulta tan ambigua que se han publicado datos apoyando tanto el carácter preventivo como negativo de PAI-1 en diferentes patologías. Concretamente, elevados niveles de PAI-1 se han asociado con la aparición y desarrollo de patologías cardiovasculares, obesidad, síndrome metabólico y cáncer (Reuning y col 1998; Juhan-Vague y col 2003; Alessi y Juhan-Vague 2006; Ploplis 2011). Recientemente, y como ya se ha dicho anteriormente, se han detectado niveles elevados de PAI-1 acompañados de niveles disminuidos de tPA activo en cerebros de pacientes de EA (Fabbro y Seeds 2009). No obstante, la relevancia que esta alteración pudiera tener en la patología de la EA no ha sido abordada en profundidad. Este trabajo demuestra que niveles patológicos de A β son capaces de inducir un aumento de los niveles de PAI-1, que mediante la inhibición de tPA/plasmina, limitará la disponibilidad de mBDNF en neuronas. Se ha demostrado que este mecanismo afecta a la función y supervivencia neuronal y puede formar parte de la cascada de eventos implicados en el déficit cognitivo asociado a la EA.

En definitiva, en el presente trabajo de investigación se ha diseñado y validado un nuevo modelo de CS temprana para animales de experimentación, intentando simular altos niveles educacionales u ocupacionales en humanos. Este paradigma consiguió 8-9 meses después del entrenamiento cognitivo, compensar los déficits de memoria espacial y de reconocimiento, así como disminuir los signos patológicos asociados a la EA en animales Tg2576. Entre ellos, cabe destacar la disminución de los niveles totales de la fracción soluble

de A β y, en particular, la disminución de los niveles del dodecámero A β *56 y su fuerte asociación con el estado cognitivo de los animales. Por otra parte, se ha propuesto como mecanismo subyacente a los efectos beneficiosos de la CS el aumento de la maduración del factor neurotrófico BDNF. La disminución del procesamiento de BDNF inducido por el péptido A β hizo abordar el estudio de un nuevo mecanismo por el que A β pudiera estar ejerciendo sus efectos neurodegenerativos en la EA. La implicación de PAI-1 en este mecanismo llevó a proponer PAI-1 como posible diana terapéutica para el tratamiento de la EA y sus déficits cognitivos asociados.

Bibliografía

Ahroon, J.K. (1976). "Performance characteristics of maze learning in mice selected for high and low brain weight." *Journal of comparative and physiological psychology* **90**(12): 1184-1190.

Alessi, M.C. and Juhan-Vague, I. (2006). "PAI-1 and the metabolic syndrome: links, causes, and consequences." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **26**(10): 2200-2207.

Arriagada, P.V., Growdon, J.H., Hedley-Whyte, E.T. and Hyman, B.T. (1992). "Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease." *Neurology* **42**(3 Pt 1): 631-639.

Billings, L.M., Green, K.N., McGaugh, J.L. and LaFerla, F.M. (2007). "Learning decreases A beta*56 and tau pathology and ameliorates behavioral decline in 3xTg-AD mice." *The Journal of neuroscience* **27**(4): 751-761.

Branchi, I., D'Andrea, I., Fiore, M., Di Fausto, V., Aloe, L. and Alleva, E. (2006). "Early social enrichment shapes social behavior and nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor levels in the adult mouse brain." *Biological psychiatry* **60**(7): 690-696.

Carlino, D., De Vanna, M. and Tongiorgi, E. (2012). "Is Altered BDNF Biosynthesis a General Feature in Patients with Cognitive Dysfunctions?" *The Neuroscientist*. In press.

Cheng, I.H., Scearce-Levie, K., Legleiter, J., Palop, J.J., Gerstein, H., Bien-Ly, N., Puolivali, J., Lesne, S., Ashe, K.H., Muchowski, P.J. and Mucke, L. (2007). "Accelerating amyloid-beta fibrillization reduces oligomer levels and functional deficits in Alzheimer disease mouse models." *The Journal of biological chemistry* **282**(33): 23818-23828.

Cho, H., Joo, Y., Kim, S., Woo, R.S., Lee, S.H. and Kim, H.S. (2013). "Plasminogen activator inhibitor-1 promotes synaptogenesis and protects against abeta(1-42)-induced neurotoxicity in primary cultured hippocampal neurons." *The International journal of neuroscience* **123**(1): 42-49.

Costa, D.A., Cracchiolo, J.R., Bachstetter, A.D., Hughes, T.F., Bales, K.R., Paul, S.M., Mervis, R.F., Arendash, G.W. and Potter, H. (2007). "*Enrichment improves cognition in AD mice by amyloid-related and unrelated mechanisms.*" *Neurobiology of aging* **28**(6): 831-844.

Cotel, M.C., Jawhar, S., Christensen, D.Z., Bayer, T.A. and Wirths, O. (2012). "*Environmental enrichment fails to rescue working memory deficits, neuron loss, and neurogenesis in APP/PS1KI mice.*" *Neurobiology of aging* **33**(1): 96-107.

Cracchiolo, J.R., Mori, T., Nazian, S.J., Tan, J., Potter, H. and Arendash, G.W. (2007). "*Enhanced cognitive activity--over and above social or physical activity--is required to protect Alzheimer's mice against cognitive impairment, reduce Abeta deposition, and increase synaptic immunoreactivity.*" *Neurobiology of learning and memory* **88**(3): 277-294.

Cuadrado-Tejedor, M., Hervias, I., Ricobaraza, A., Puerta, E., Perez-Roldan, J.M., Garcia-Barroso, C., Franco, R., Aguirre, N. and Garcia-Osta, A. (2011). "*Sildenafil restores cognitive function without affecting beta-amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease.*" *British journal of pharmacology* **164**(8): 2029-2041.

Espana, J., Valero, J., Minano-Molina, A.J., Masgrau, R., Martin, E., Guardia-Laguarta, C., Lleo, A., Gimenez-Llort, L., Rodriguez-Alvarez, J. and Saura, C.A. (2010). "*beta-Amyloid disrupts activity-dependent gene transcription required for memory through the CREB coactivator CRT1.*" *The Journal of neuroscience* **30**(28): 9402-9410.

Fabbro, S., Schaller, K. and Seeds, N.W. (2011). "*Amyloid-beta levels are significantly reduced and spatial memory defects are rescued in a novel neuroserpin-deficient Alzheimer's disease transgenic mouse model.*" *Journal of neurochemistry* **118**(5): 928-938.

Fabbro, S. and Seeds, N.W. (2009). "*Plasminogen activator activity is inhibited while neuroserpin is up-regulated in the Alzheimer disease brain.*" *Journal of neurochemistry* **109**(2): 303-315.

Ferrer, I., Gomez-Isla, T., Puig, B., Freixes, M., Ribe, E., Dalfo, E. and Avila, J. (2005). "*Current advances on different kinases involved in tau phosphorylation, and implications in Alzheimer's disease and tauopathies.*" *Current Alzheimer research* **2**(1): 3-18.

Gortz, N., Lewejohann, L., Tomm, M., Ambree, O., Keyvani, K., Paulus, W. and Sachser, N. (2008). "Effects of environmental enrichment on exploration, anxiety, and memory in female *TgCRND8 Alzheimer mice*." Behavioural brain research **191**(1): 43-48.

Hendrich, C.E., Jackson, W.J. and Porterfield, S.P. (1984). "Behavioral testing of progenies of *Tx* (hypothyroid) and growth hormone-treated *Tx* rats: an animal model for mental retardation." Neuroendocrinology **38**(6): 429-437.

Hu, Y.S., Xu, P., Pigino, G., Brady, S.T., Larson, J. and Lazarov, O. (2010). "Complex environment experience rescues impaired neurogenesis, enhances synaptic plasticity, and attenuates neuropathology in familial Alzheimer's disease-linked *APP^{swe}/PS1^{DeltaE9} mice*." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **24**(6): 1667-1681.

Hurtado, D.E., Molina-Porcel, L., Iba, M., Aboagye, A.K., Paul, S.M., Trojanowski, J.Q. and Lee, V.M. (2010). "*A β* accelerates the spatiotemporal progression of tau pathology and augments tau amyloidosis in an Alzheimer mouse model." The American journal of pathology **177**(4): 1977-1988.

Jacobsen, J.S., Comery, T.A., Martone, R.L., Elokdah, H., Crandall, D.L., Oganessian, A., Aschmies, S., Kirksey, Y., Gonzales, C., Xu, J., Zhou, H., Atchison, K., Wagner, E., Zaleska, M.M., Das, I., Arias, R.L., Bard, J., Riddell, D., Gardell, S.J., Abou-Gharbia, M., Robichaud, A., Magolda, R., Vlasuk, G.P., Bjornsson, T., Reinhart, P.H. and Pangalos, M.N. (2008). "Enhanced clearance of *A β* in brain by sustaining the plasmin proteolysis cascade." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**(25): 8754-8759.

Jin, M., Shepardson, N., Yang, T., Chen, G., Walsh, D. and Selkoe, D.J. (2011). "Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce *Tau* hyperphosphorylation and neuritic degeneration." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **108**(14): 5819-5824.

Juhan-Vague, I., Alessi, M.C., Mavri, A. and Morange, P.E. (2003). "Plasminogen activator inhibitor-1, inflammation, obesity, insulin resistance and vascular risk." Journal of thrombosis and haemostasis **1**(7): 1575-1579.

Kayed, R., Head, E., Thompson, J.L., McIntire, T.M., Milton, S.C., Cotman, C.W. and Glabe, C.G. (2003). "*Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis.*" *Science* **300**(5618): 486-489.

Kuzumaki, N., Ikegami, D., Tamura, R., Hareyama, N., Imai, S., Narita, M., Torigoe, K., Niikura, K., Takeshima, H., Ando, T., Igarashi, K., Kanno, J., Ushijima, T. and Suzuki, T. (2011). "*Hippocampal epigenetic modification at the brain-derived neurotrophic factor gene induced by an enriched environment.*" *Hippocampus* **21**(2): 127-132.

Lazarov, O., Robinson, J., Tang, Y.P., Hairston, I.S., Korade-Mirnic, Z., Lee, V.M., Hersh, L.B., Sapolsky, R.M., Mirnic, K. and Sisodia, S.S. (2005). "*Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice.*" *Cell* **120**(5): 701-713.

Lesne, S., Koh, M.T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C.G., Yang, A., Gallagher, M. and Ashe, K.H. (2006). "*A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory.*" *Nature* **440**(7082): 352-357.

Liu, R.M., van Groen, T., Katre, A., Cao, D., Kadisha, I., Ballinger, C., Wang, L., Carroll, S.L. and Li, L. (2011). "*Knockout of plasminogen activator inhibitor 1 gene reduces amyloid beta peptide burden in a mouse model of Alzheimer's disease.*" *Neurobiology of aging* **32**(6): 1079-1089.

Lu, B. (2003). "*BDNF and activity-dependent synaptic modulation.*" *Learning & memory* **10**(2): 86-98.

Martorana, A., Sancesario, G.M., Esposito, Z., Nuccetelli, M., Sorge, R., Formosa, A., Dinallo, V., Bernardi, G., Bernardini, S. and Sancesario, G. (2012). "*Plasmin system of Alzheimer's disease patients: CSF analysis.*" *Journal of neural transmission* **119**(7): 763-769.

McLean, C.A., Cherny, R.A., Fraser, F.W., Fuller, S.J., Smith, M.J., Beyreuther, K., Bush, A.I. and Masters, C.L. (1999). "*Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease.*" *Annals of neurology* **46**(6): 860-866.

Nicole, O., Docagne, F., Ali, C., Margaille, I., Carmeliet, P., MacKenzie, E.T., Vivien, D. and Buisson, A. (2001). "*The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling.*" *Nature medicine* **7**(1): 59-64.

Obiang, P., Maubert, E., Bardou, I., Nicole, O., Launay, S., Bezin, L., Vivien, D. and Agin, V. (2011). "*Enriched housing reverses age-associated impairment of cognitive functions and tPA-dependent maturation of BDNF.*" *Neurobiology of learning and memory* **96**(2): 121-129.

Otth, C., Concha, I., Arendt, T., Stieler, J., Schliebs, R., Gonzalez-Billault, C. and Maccioni, R.B. (2002). "*AbetaPP induces cdk5-dependent tau hyperphosphorylation in transgenic mice Tg2576.*" *Journal of Alzheimer's disease* **4**(5): 417-430.

Owen, A.M., Hampshire, A., Grahn, J.A., Stenton, R., Dajani, S., Burns, A.S., Howard, R.J. and Ballard, C.G. (2010). "*Putting brain training to the test.*" *Nature* **465**(7299): 775-778.

Pang, P.T., Teng, H.K., Zaitsev, E., Woo, N.T., Sakata, K., Zhen, S., Teng, K.K., Yung, W.H., Hempstead, B.L. and Lu, B. (2004). "*Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity.*" *Science* **306**(5695): 487-491.

Peng, S., Garzon, D.J., Marchese, M., Klein, W., Ginsberg, S.D., Francis, B.M., Mount, H.T., Mufson, E.J., Salehi, A. and Fahnstock, M. (2009). "*Decreased brain-derived neurotrophic factor depends on amyloid aggregation state in transgenic mouse models of Alzheimer's disease.*" *The Journal of neuroscience* **29**(29): 9321-9329.

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.*" *Journal of neurochemistry* **93**(6): 1412-1421.

Phillips, H.S., Hains, J.M., Armanini, M., Laramée, G.R., Johnson, S.A. and Winslow, J.W. (1991). "*BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease.*" *Neuron* **7**(5): 695-702.

Ploplis, V.A. (2011). "*Effects of altered plasminogen activator inhibitor-1 expression on cardiovascular disease.*" *Current drug targets* **12**(12): 1782-1789.

Reuning, U., Magdolen, V., Wilhelm, O., Fischer, K., Lutz, V., Graeff, H. and Schmitt, M. (1998). "*Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis (review)*." International journal of oncology **13**(5): 893-906.

Serrano-Pozo, A., Frosch, M.P., Masliah, E. and Hyman, B.T. (2011). "*Neuropathological alterations in Alzheimer disease*." Cold Spring Harbor perspectives in medicine **1**(1): a006189.

Soeda, S., Koyanagi, S., Kuramoto, Y., Kimura, M., Oda, M., Kozako, T., Hayashida, S. and Shimeno, H. (2008). "*Anti-apoptotic roles of plasminogen activator inhibitor-1 as a neurotrophic factor in the central nervous system*." Thrombosis and haemostasis **100**(6): 1014-1020.

Steffener, J. and Stern, Y. (2012). "*Exploring the neural basis of cognitive reserve in aging*." Biochimica et biophysica acta **1822**(3): 467-473.

Stern, Y. (2012). "*Cognitive reserve in ageing and Alzheimer's disease*." Lancet neurology **11**(11): 1006-1012.

Verbitsky, M., Yonan, A.L., Malleret, G., Kandel, E.R., Gilliam, T.C. and Pavlidis, P. (2004). "*Altered hippocampal transcript profile accompanies an age-related spatial memory deficit in mice*." Learning & memory **11**(3): 253-260.

Verret, L., Krezymon, A., Halley, H., Trouche, S., Zerwas, M., Lazouret, M., Lassalle, J.M. and Rampon, C. (2013). "*Transient enriched housing before amyloidosis onset sustains cognitive improvement in Tg2576 mice*." Neurobiology of aging **34**(1): 211-225.

Wolf, S.A., Kronenberg, G., Lehmann, K., Blankenship, A., Overall, R., Staufenbiel, M. and Kempermann, G. (2006). "*Cognitive and physical activity differently modulate disease progression in the amyloid precursor protein (APP)-23 model of Alzheimer's disease*." Biological psychiatry **60**(12): 1314-1323.

Woo, N.H., Teng, H.K., Siao, C.J., Chiaruttini, C., Pang, P.T., Milner, T.A., Hempstead, B.L. and Lu, B. (2005). "*Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression*." Nature neuroscience **8**(8): 1069-1077.

Ye, X., Tai, W. and Zhang, D. (2012). "*The early events of Alzheimer's disease pathology: from mitochondrial dysfunction to BDNF axonal transport deficits.*" *Neurobiology of aging* **33**(6): 1122 e1121-1110.

Yu, L.Y., Saarma, M. and Arumae, U. (2008). "*Death receptors and caspases but not mitochondria are activated in the GDNF- or BDNF-deprived dopaminergic neurons.*" *The Journal of neuroscience* **28**(30): 7467-7475.

Zheng, Z., Sabirzhanov, B. and Keifer, J. (2010). "*Oligomeric amyloid- β inhibits the proteolytic conversion of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), AMPA receptor trafficking, and classical conditioning.*" *The Journal of biological chemistry* **285**(45): 34708-34717.

Capítulo VI

Capítulo 6

Conclusiones

1.- En la presente tesis doctoral se ha diseñado y validado un nuevo paradigma de estimulación cognitiva. Este modelo experimental de estimulación cognitiva es un modelo alternativo a los clásicos protocolos de enriquecimiento ambiental en los que en los que la actividad física y la interacción social son los principales estímulos.

2.- El paradigma de estimulación cognitiva, aplicado a una edad temprana, compensó el deterioro cognitivo que el modelo animal de enfermedad de Alzheimer (ratón Tg2576) muestra a los 16 meses de edad en las pruebas de laberinto acuático de Morris (MWM) y de reconocimiento de nuevos objetos (NORT). Estos resultados ponen de manifiesto el papel preventivo que una alta actividad cognitiva podría tener en la manifestación de los síntomas clínicos de la Enfermedad de Alzheimer.

3.- El paradigma de estimulación cognitiva aumentó los niveles de marcadores sinápticos, como PSD95 y NR1, y proteínas que participan en la formación y consolidación de nuevas sinapsis, como Arc y β -catenina, en animales Tg2576 de 16 meses. Por lo tanto, la reversión de la patología sináptica, característica de este modelo animal y de la propia Enfermedad de Alzheimer, podría contribuir a la mejora cognitiva detectada en este grupo experimental.

4.- La patología amiloide, característica de los ratones Tg2576, fue disminuida significativamente por la estimulación cognitiva. Los cambios más relevantes se detectaron en los niveles de A β en la fracción soluble, mientras que los niveles de A β en la fracción insoluble y la densidad de placas de amiloide se mantuvieron intactos. En concreto, la reducción del péptido A β ₁₋₄₂ y del dodecámero de A β , A β *56, así como la robusta correlación de éste último con la retención en el MWM y con el índice de discriminación en el NORT indican que los efectos beneficiosos de este paradigma

frente al deterioro cognitivo pudieran ser debidos a la disminución de ciertas especies solubles de A β .

5.- Los efectos del paradigma de estimulación cognitiva en la patología amiloide podrían estar mediados por la reducción del procesamiento amiloidogénico de la proteína APP, puesto que se observó una reducción de la enzima BACE1, principal β -secretasa, un aumento de la metaloproteasa ADAM17, principal α -secretasa, además de una reducción del cociente entre los fragmentos C99 y C83, derivados del procesamiento de APP.

6.- La patología Tau, uno de los mecanismos principales de neurodegeneración y deterioro cognitivo en la Enfermedad de Alzheimer, se atenuó significativamente por la estimulación cognitiva, probablemente mediada por la disminución de la patología A β descrita anteriormente. Así, el paradigma de estimulación cognitiva redujo significativamente los niveles de fosforilación de Tau y la actividad de cinasas de Tau, como cdk5 y GSK3 β .

7.- El paradigma de estimulación cognitiva no indujo cambios a nivel molecular ni funcional en ratones "wild-type". Estos resultados indicarían que si bien la estimulación cognitiva contribuye a la mejora cognitiva asociada a la patología de la Enfermedad de Alzheimer, sin embargo, no aporta beneficio alguno al envejecimiento no patológico.

8.- El déficit de maduración de BDNF asociado a la patología amiloide en ratones Tg2576 de 16 meses fue compensado por la estimulación cognitiva, al inducir un aumento de los niveles de mBDNF y una disminución de los de proBDNF. Por otro

lado, estudios en cultivos primarios de neuronas demostraron que el péptido A β induce una alteración de la maduración de BDNF, al disminuir los niveles de mBDNF y aumentar los de proBDNF. Por ello, el aumento de la disponibilidad de mBDNF se ha propuesto como mecanismo subyacente a los efectos beneficiosos de la estimulación cognitiva frente a la patología amiloide.

9.- A β_{25-35} indujo un aumento en la expresión de PAI-1 mediante un mecanismo en el que está implicada la vía JNK/c-Jun. Este aumento permite la unión de PAI-1 a tPA, inactivando tPA. La inhibición de PAI-1 resultó en la activación de tPA (aumento de tPA libre), lo cual promovió la maduración de BDNF y, por tanto, aumentó la disponibilidad de mBDNF. Estos resultados sugieren que el aumento de la expresión de PAI-1 inducido por niveles patológicos de A β alteran el procesamiento proteolítico necesario para la maduración de BDNF.

10.- La inhibición de PAI-1 protegió de la neurotoxicidad inducida por A β_{25-35} en neuronas primarias. Tanto el secuestro de mBDNF por la proteína quimérica TrkB/Fc como el bloqueo parcial de la señalización del receptor TrkB mediante la inhibición de ERK (PD08059) revirtió dicha protección. Estos resultados sugieren que el déficit de disponibilidad de mBDNF inducido por un aumento de PAI-1 podría estar implicado en la neurotoxicidad ejercida por A β .

11.- Los resultados obtenidos en animales de experimentación sugieren que la estimulación de la función cognitiva en edades tempranas es suficiente para compensar el desarrollo de ciertos fenómenos patológicos característicos de la Enfermedad de Alzheimer, como las patologías amiloide, Tau y sináptica, y con ello, el deterioro cognitivo, en edades avanzadas. Además, la demostración empírica de que el déficit en la disponibilidad de BDNF maduro, inducido por niveles altos de PAI-1,

juega un papel importante en las acciones neurodegenerativas del péptido A β , sugiere que la alteración de este mecanismo podría subyacer a los efectos beneficiosos de la estimulación cognitiva. Los resultados de la presente tesis doctoral apoyan la hipótesis de que la manipulación farmacológica de la maduración de BDNF mediante a inhibición de PAI-1, podría suponer una nueva diana terapéutica para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

