

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



ESTUDIO DEL PAPEL NEUROPROTECTOR DE LA LEPTINA EN UN
MODELO ANIMAL DE AMILOIDOSIS

TESIS DOCTORAL DE:

ROCÍO PÉREZ GONZÁLEZ

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

EVA MARÍA CARRO DÍAZ

Madrid, 2013



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

ESTUDIO DEL PAPEL NEUROPROTECTOR
DE LA LEPTINA EN UN MODELO ANIMAL DE
AMILOIDOSIS

Tesis doctoral

Rocío Pérez González

Madrid, 2013



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

ESTUDIO DEL PAPEL NEUROPROTECTOR
DE LA LEPTINA EN UN MODELO ANIMAL DE
AMILOIDOSIS

Memoria para acceder al grado de DOCTOR de:
Rocío Pérez González

Directora:

Eva María Carro Díaz



La Dra. EVA MARÍA CARRO DÍAZ, científica-investigadora del Laboratorio de Neurociencias del Instituto de Investigación del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid,

Certifica que,

Dña. Rocío Pérez González, licenciada en Biología, ha realizado bajo su dirección, en el Laboratorio de Neurociencias del Instituto de Investigación del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid, el trabajo titulado: " Estudio del papel neuroprotector de la leptina en un modelo animal de amiloidosis", considerando que reúne los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor.

Madrid a 27 de Febrero de 2013

VºBº Directora de tesis

Doctorando

Dra. Eva María Carro Díaz

Rocio Pérez González

*A mi familia
y a mis amigos,*

Y finalmente llegó el día, el día que hace unos meses me costaba visualizar y que todavía a día de hoy me cuesta materializar. Por eso, quería agradecer a todas esas personas, que a mi lado a desde la distancia, de una manera o de otra, han contribuido a que este trabajo llegase a su fin.

En primer lugar, sin dudas, y porque realmente se lo merece, quería mostrar mi agradecimiento a mi directora de tesis, la Dra. Eva Carro. Gracias Eva por darme la oportunidad de participar en este proyecto, por tu confianza, por transmitirme tu entusiasmo y por todas tus valiosas enseñanzas. Gracias por tu apoyo y esfuerzo, porque sin ellos, esta tesis no hubiese sido posible.

En segundo lugar, quería agradecer enormemente a mis chicas del labo, esas grandes neurocientíficas y mejores personas. A Agi, por estar siempre dispuesta a ayudarme y a responder a todas mis preguntas, por sus fabulosas clases de inglés, por hacer que las tardes en el labo hayan sido mucho más llevaderas y por todos esos ánimos cuando los necesitaba. A Chelito, por toda su ayuda en el laboratorio y sobre todo por estar siempre pendiente y hacerme sonreír cuando me veía cara de preocupación. A Enara, por encontrar en ella la fuerza de otra predoc para combatir los obstáculos que han ido apareciendo este último año y por todas esas carcajadas que nos hemos echado en el labo. Una mención especial a Desi, con la que tenido la suerte de compartir labo desde el primer momento. Muchas gracias Desi por haberme enseñado tantísimo, por toda tu ayuda y, muy importante, gracias por la gran amistad que me has brindado a lo largo de estos años.

No me quiero olvidar de Teo y Carlos, compañeros de grupo cuando empecé, de los que también aprendí mucho y quienes contribuyeron a que mis inicios fuesen tan memorables.

Agradecer a mi tutora de tesis, la Dra. Pilar Estrada por guiarme durante el desarrollo de este trabajo y contar con su ayuda en todo momento.

También quería mostrar mi más sincero agradecimiento a la doctora María L. de Ceballos, por su colaboración en este trabajo con los experimentos de microglía y también por toda su ayuda con los papeleos previos.

A Xime, gran profesional y amiga, y a Omar, porque sin ellos, una parte esencial de este trabajo, la de la microscopía electrónica no hubiese sido posible.

A la Dra. Janet Hoenicka, por ser la primera en confiar en mí y darme una oportunidad

A los técnicos de microscopía confocal responsables de muchas de las fotos de este trabajo, Begoña y Juan Carlos. Quería especialmente agradecer a Bego toda su ayuda cuando todavía era una principiante con las inmunes, no olvido todos esos valiosos consejos.

A la Dra. Efrat Levy, que me acogió en su laboratorio de Nueva York y contribuyó gratamente a mi formación. Y a la Fundación Cien, por haber hecho posible esa estancia.

A mis primeros compañeritos: A Gaba, que desde el primer día me adoptó en el laboratorio (mum!) y de la que recibí las primeras lecciones científicas. A Adolfo, gran profesor y amigo del que aprendí

AGRADECIMIENTOS

muchísimo. A Lore, excelente compañera y amiga, además de una estupenda profe. Y a Bea (Elfa!), gran amiga que desde el primer día que me echó una mano en todo y a la que tengo que agradecer enormemente sus sabias palabras, que ayudaron a mantenerme arriba en los momentos difíciles.

A todos mis compañeros del centro de investigación, unas bellísimas personas que nunca han dudado en mostrarme su ayuda cada vez que la he necesitado. A los chicos de reuma: Elena G, Elena I, Alicia, María, Regina, Gabriel y Manu; a los de onco: Teresa, Vanesa, Alba y Carlos; y a Inés y JC, esos chicos del fondo siempre dispuestos a echar una mano en todo. Gracias, porque ha sido todo un placer ir a trabajar cada día y encontrarse con vosotros.

A todas las biolocas, Lidia, Marta P, Marta L, Marisa, Majo, Elena, Noe, Steph y Patri, porque me acogieron con mucho cariño en su grupo cuando decidí cambiar la odontología por la biología y porque con ellas compartí cinco de los años más maravillosos de mi vida.

A mis niñas, Nere, Noe y Laura, por hacer que me haya sentido tan querida en mi andadura por la capital, por su apoyo incondicional en todo momento y porque sin ellas en hubiese estado totalmente perdida en esta etapa de la vida.

A mis amigas de Orihuelica: Ana, Susana, Cristi, Estefí y Ana; y a mis compis del piso de Valencia: Marta, Sonia y Carmen. Todas ellas, aunque alejadas del mundo de la ciencia, siempre han estado apoyándome y animándome en todo. También un agradecimiento especial a mi amigo Paquito, que me conoce tan bien que siempre ha estado ahí en los momentos que más lo he necesitado.

A mi familia: a mis padres, que me lo han dado todo y siempre han confiado en mi mostrándome su apoyo en todas las decisiones que he tomado, y a mis hermanicas Ana Belén y Marina, por ser unas personas tan especiales y esenciales en mi vida.

A todos,
Gracias.

Estudio del papel neuroprotector de la leptina en un modelo animal de amiloidosis

Introducción

Numerosos estudios han puesto de relieve una clara asociación entre la obesidad y la incidencia de la enfermedad de Alzheimer (EA) (Profenno y col., 2010; Anstey y col., 2011; Xu y col., 2011). Además, se ha propuesto la hipótesis de que la alteración de la funcionalidad de la leptina representaría un vínculo entre la obesidad y la EA (Lee, 2011). La leptina es una hormona con multitud de funciones generalizadas tanto a nivel central como periférico y posee la capacidad de regular numerosas funciones en el sistema nervioso central (SNC) (Schwartz y col., 2000). En particular, se ha demostrado que la leptina juega un papel fundamental en la modulación de funciones cognitivas superiores como la memoria y el aprendizaje (Farr y col., 2006; Oomura y col., 2006). Por otra parte, cada vez son más claras las evidencias que indican que la leptina previene la acumulación tóxica del péptido β -amiloide ($A\beta$) (Fewlass y col., 2004; Greco y col., 2010) y la proteína tau fosforilada en las neuronas (Greco y col., 2009), y posee la capacidad para mejorar el rendimiento en las distintas tareas de memoria en modelos murinos de la EA (Greco y col., 2010). Estos hallazgos, junto con la inocuidad de la leptina en los seres humanos, hacen de esta hormona u otras moléculas miméticas, un nuevo candidato terapéutico para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la EA. Sin embargo, todavía no están claros muchos de los mecanismos moleculares implicados en las acciones neuroprotectoras de la leptina.

Objetivos

Por todo ello, el principal objetivo de este trabajo fue estudiar los posibles efectos neuroprotectores de la leptina sobre los eventos asociados con la patología de la EA, enfocando el estudio hacia la eficacia de la terapia génica y los mecanismos y vías de señalización implicados. Para ello se realizaron diversas aproximaciones *in vitro* y como modelo *in vivo* de amiloidosis se utilizaron los ratones transgénicos APP/PS1.

Conclusiones

En este estudio se ha demostrado que la terapia génica lentiviral es un método eficaz para la administración de leptina a nivel del SNC en el modelo murino de amiloidosis APP/PS1. La infección resultante provocó la modulación de STAT3, una de las vías de señalización de la leptina. Los resultados obtenidos indicaron que la terapia génica con leptina durante 3 meses fue capaz de reducir la acumulación cerebral de $A\beta$ probablemente mediante la inhibición de expresión de la β -secretasa 1 (BACE1), principal enzima responsable de la generación $A\beta$. Además de este efecto sobre uno de los marcadores neuropatológicos clásicos de la EA, los ratones APP/PS1 tratados con leptina mostraron una reducción

significativa de los niveles de astrogliosis y neurodegeneración, asociada a una mayor plasticidad neuronal, proliferación y diferenciación celular. Como resultado, se produjo una importante atenuación en los déficits cognitivos característicos de los ratones transgénicos APP/PS1. La conclusión final de este trabajo es que la leptina administrada vía terapia génica en este estudio ha demostrado ser un potencial agente terapéutico ejerciendo diversos efectos neuroprotectores sobre los eventos patológicos característicos de la EA.

Referencias

Anstey, K.J., Cherbuin, N., Budge, M., Young, J. (2011). Body mass index in midlife and late-life as a risk factor for dementia: a meta-analysis of prospective studies. *Obes Rev* 12, e426-437.

Farr, S.A., Banks, W.A., Morley, J.E. (2006). Effects of leptin on memory processing. *Peptides* 27, 1420-1425.

Fewlass, D.C., Noboa, K., Pi-Sunyer, F.X., Johnston, J.M., Yan, S.D., Tezapsidis, N. (2004). Obesity-related leptin regulates Alzheimer's Abeta. *FASEB J* 18, 1870-1878.

Greco, S.J., Bryan, K.J., Sarkar, S., Zhu, X., Smith, M.A., Ashford, J.W., Johnston, J.M., Tezapsidis, N., Casadesus, G. (2010). Leptin reduces pathology and improves memory in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 19, 1155-1167.

Greco, S.J., Sarkar, S., Johnston, J.M., Tezapsidis, N. (2009). Leptin regulates tau phosphorylation and amyloid through AMPK in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 380, 98-104.

Lee, E.B. (2011). Obesity, leptin, and Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1243, 15-29.

Oomura, Y., Hori, N., Shiraishi, T., Fukunaga, K., Takeda, H., Tsuji, M., Matsumiya, T., Ishibashi, M., Aou, S., Li, X.L. y col., (2006). Leptin facilitates learning and memory performance and enhances hippocampal CA1 long-term potentiation and CaMK II phosphorylation in rats. *Peptides* 27, 2738-2749.

Profenno, L.A., Porsteinsson, A.P., Faraone, S.V. (2010). Meta-analysis of Alzheimer's disease risk with obesity, diabetes, and related disorders. *Biol Psychiatry* 67, 505-512.

Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Jr., Seeley, R.J., Baskin, D.G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* 404, 661-671.

Xu, W.L., Atti, A.R., Gatz, M., Pedersen, N.L., Johansson, B., Fratiglioni, L. (2011). Midlife overweight and obesity increase late-life dementia risk: a population-based twin study. *Neurology* 76, 1568-1574.

Study of the neuroprotective effects of leptin in an animal model of amyloidosis

Introduction

Several studies to date have addressed the correlation between obesity and risk for Alzheimer's disease (AD) (Profenno et al., 2010; Anstey et al., 2011; Xu et al., 2011) and it has been hypothesized that impairments in leptin function could provide the link between obesity and AD (Lee, 2011). Leptin is a 16 KDa hormone well known for its role in the control of food intake and body weight (Schwartz et al., 2000), however, it is also implicated in a variety of functions in the central nervous system (CNS). Recent studies have reported the potential beneficial effects of leptin as an AD therapeutic agent. Particularly, some studies have demonstrated that leptin facilitates spatial learning and memory (Farr et al., 2006; Oomura et al., 2006) and the anti-amyloidogenic effects of leptin using *in vitro* and *in vivo* models have been shown (Fewlass et al., 2004; Greco et al., 2010). The abilities of leptin to reduce tau phosphorylation in neurons (Greco et al., 2009), and to prevent the cognitive impairments in animal models of EA (Greco et al., 2010) have also been demonstrated. All these findings, along with the non-toxic properties of leptin in patients, make this hormone a therapeutic candidate to treat AD. However, most of the molecular mechanisms involved in the neuroprotective actions of leptin are unknown.

Objectives

The main purpose of this study was to evaluate the possible neuroprotective effects of leptin on the events associated with the AD pathology, focusing the study towards 1) the efficiency of the brain delivery of leptin using the HIV-leptin lentiviral vector, and 2) the mechanisms and signaling pathways involved. To investigate this hypothesis we used *in vivo* and *in vitro* approaches, using APP/PS1 mice as an animal model of amyloidosis, and primary neuron cultures, respectively.

Conclusions

This study demonstrated that gene therapy is an efficient tool for leptin administration within the CNS in the APP/PS1 murine model of amyloidosis. The virally delivered leptin modulated one of the classic signaling pathways of leptin: the JAK-STAT3 pathway. The results indicated that gene therapy with leptin for 3 months reduced accumulation of amyloid- β (A β) deposits in APP/PS1 double-transgenic mice. The inhibitory effect of leptin on A β accumulation was attributable to inhibition by leptin of β -secretase 1 (BACE1) expression. HIV-leptin-treated APP/PS1 mice showed modulation of glial cell activation, improvement of synaptic status in cortical and hippocampal region, and recovery of spatial and non-spatial learning and memory, when compared with control APP/PS1 mice. These results altogether suggest that leptin and related drugs might be of therapeutic benefit in the prevention or treatment of AD.

References

- Anstey, K.J., Cherbuin, N., Budge, M., and Young, J. (2011). Body mass index in midlife and late-life as a risk factor for dementia: a meta-analysis of prospective studies. *Obes Rev* *12*, e426-437.
- Farr, S.A., Banks, W.A., and Morley, J.E. (2006). Effects of leptin on memory processing. *Peptides* *27*, 1420-1425.
- Fewlass, D.C., Noboa, K., Pi-Sunyer, F.X., Johnston, J.M., Yan, S.D., and Tezapsidis, N. (2004). Obesity-related leptin regulates Alzheimer's Abeta. *FASEB J* *18*, 1870-1878.
- Greco, S.J., Bryan, K.J., Sarkar, S., Zhu, X., Smith, M.A., Ashford, J.W., Johnston, J.M., Tezapsidis, N., and Casadesus, G. (2010). Leptin reduces pathology and improves memory in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* *19*, 1155-1167.
- Greco, S.J., Sarkar, S., Johnston, J.M., and Tezapsidis, N. (2009). Leptin regulates tau phosphorylation and amyloid through AMPK in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* *380*, 98-104.
- Lee, E.B. (2011). Obesity, leptin, and Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* *1243*, 15-29.
- Oomura, Y., Hori, N., Shiraishi, T., Fukunaga, K., Takeda, H., Tsuji, M., Matsumiya, T., Ishibashi, M., Aou, S., Li, X.L., *et al.* (2006). Leptin facilitates learning and memory performance and enhances hippocampal CA1 long-term potentiation and CaMK II phosphorylation in rats. *Peptides* *27*, 2738-2749.
- Profenno, L.A., Porsteinsson, A.P., and Faraone, S.V. (2010). Meta-analysis of Alzheimer's disease risk with obesity, diabetes, and related disorders. *Biol Psychiatry* *67*, 505-512.
- Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Jr., Seeley, R.J., and Baskin, D.G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* *404*, 661-671.
- Xu, W.L., Atti, A.R., Gatz, M., Pedersen, N.L., Johansson, B., and Fratiglioni, L. (2011). Midlife overweight and obesity increase late-life dementia risk: a population-based twin study. *Neurology* *76*, 1568-1574.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	21
INTRODUCCIÓN	25
1. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	27
1.1 <i>Definición</i>	27
1.2 <i>Historia</i>	27
1.3 <i>Epidemiología</i>	28
1.4 <i>Sintomatología</i>	30
1.5 <i>Clasificación de la enfermedad</i>	31
1.5.1 <i>Enfermedad de Alzheimer familiar</i>	31
1.5.1.1 <i>Gen APP</i>	32
1.5.1.2 <i>Genes PSEN1 y PSEN2</i>	33
1.5.2 <i>Enfermedad de Alzheimer esporádica</i>	33
1.5.2.1 <i>Factores de riesgo genéticos</i>	33
1.5.2.2 <i>Factores de riesgo exógenos o ambientales</i>	35
1.6 <i>Neuropatología de la enfermedad</i>	37
1.6.1 <i>Péptido amiloide</i>	38
1.6.1.1 <i>Proteína APP</i>	38
1.6.1.1.1 <i>Vía no amiloidogénica</i>	39
1.6.1.1.2 <i>Vía amiloidogénica: generación del péptido Aβ</i>	40
1.6.1.2 <i>El péptido Aβ</i>	41
1.6.2 <i>Placas amiloides</i>	41
1.6.3 <i>Ovillos neurofibrilares</i>	41
1.6.4 <i>Alteraciones sinápticas en la EA</i>	42
1.6.5 <i>Respuestas inflamatorias en la EA</i>	44
1.6.5.1 <i>Activación de la microglía</i>	44
1.6.5.2 <i>Astroglisis reactiva</i>	45
1.6.6 <i>Hipótesis de la cascada amiloide</i>	46
1.7 <i>Tratamiento de la enfermedad de Alzheimer</i>	47
1.7.1 <i>Inhibidores de la colinesterasa</i>	47
1.7.2 <i>Antagonistas del receptor NMDA</i>	47
1.7.3 <i>Terapias emergentes</i>	48
1.8 <i>Modelos animales utilizados en el estudio de la enfermedad de Alzheimer</i>	50
2. LA LEPTINA	51
2.1 <i>Aspectos generales</i>	51
2.2 <i>Receptores de la leptina</i>	53
2.3 <i>Transporte de la leptina hacia el cerebro</i>	53
2.4 <i>Vías de señalización de la leptina</i>	54

2.4.1	Vía de señalización JAK-STAT3	55
2.4.2	Vía de señalización PI3K-Akt	55
2.4.3	Vía de señalización ERK.....	56
2.4.1	Vía de señalización STAT5.....	56
2.5	<i>Funciones de la leptina</i>	57
2.6	<i>La leptina en la EA</i>	58
2.6.1	Efectos de la leptina sobre factores que se ven alterados en la EA	59
2.6.1.1	Plasticidad neuronal.....	59
2.6.1.2	Amiloidogénesis.....	60
2.6.1.3	Fosforilación de tau.....	60
2.6.1.4	Neurogénesis adulta	61
2.6.1.5	Neuroprotección	62
3.	TERAPIA GÉNICA LENTIVIRAL	63
3.1	<i>Generalidades de la terapia génica</i>	63
3.2	<i>Lentivirus</i>	64
	OBJETIVOS	67
	MATERIAL Y MÉTODOS	71
1.	GENERACIÓN DEL LENTIVIRUS QUE SOBREEEXPRESA LEPTINA	73
1.1	<i>Construcción del plásmido de transferencia de leptina</i>	73
1.2	<i>Producción de los vectores lentivirales: HIV-leptina y HIV-vv</i>	76
2.	ENSAYOS IN VITRO	76
2.1	<i>Cultivo primario de neuronas</i>	76
2.2	<i>Transfección del vector lentiviral en cultivo primario de neuronas</i>	77
2.3	<i>Preparación de muestras para el análisis de proteínas</i>	78
2.4	<i>Estudio de la neurogénesis en cultivos primarios de neuronas</i>	78
2.5	<i>Determinación de la longitud de neuritas en cultivos primarios de neuronas</i>	79
2.6	<i>Inmunocitoquímica</i>	80
2.7	<i>Cultivo de microglía</i>	81
2.7.1	Valoración de Nitritos	82
2.7.2	Ensayo de viabilidad celular MTT.....	82
3.	ENSAYOS IN VIVO	83
3.1	<i>Animales de experimentación</i>	83
3.2	<i>Genotipado de los animales transgénicos</i>	83
3.2.1	Digestión de colas para obtención del ADN.....	83
3.2.2	PCR de APP.....	84
3.2.3	PCR de PSEN1.....	84

3.3	<i>Terapia génica con leptina</i>	85
3.4	<i>Tratamiento con BrdU</i>	86
3.5	<i>Comportamiento</i>	86
3.5.1	Test de "El laberinto en T"	87
3.5.2	Test de "El laberinto en cruz elevado"	88
3.5.3	Test de reconocimiento del nuevo objeto	89
3.6	<i>Sacrificio de los animales y recogida de muestras</i>	90
3.7	<i>Muestras humanas</i>	91
3.8	<i>Análisis de proteínas</i>	91
3.8.1	Preparación de las muestras	91
3.8.2	Western-blot.....	91
3.9	<i>Inmunoprecipitación de HA</i>	92
3.10	<i>Preparación de sinaptosomas</i>	92
3.11	<i>ELISA de Aβ-40 y Aβ-42</i>	94
3.12	<i>Determinación de la actividad de BACE1</i>	94
3.13	<i>Valoración de la muerte celular</i>	95
3.14	<i>Técnicas histológicas</i>	95
3.14.1	Inmunofluorescencia	95
3.14.2	Inmunohistoquímica.....	96
3.14.3	Inmunohistoquímica: detección del A β	97
3.14.4	Inmunohistoquímica: detección del BrdU	97
3.14.5	Tinción de placas amilodeas con tioflavina.....	97
3.14.6	Tinción de células en degeneración con Fluoro-Jade B	98
3.15	<i>Técnicas de análisis de imagen</i>	99
3.15.1	Densitometría de placas amiloides.....	99
3.15.2	Densitometría de astrogliosis	99
3.15.3	Determinación del área de astrocitos reactivos asociada a placas.....	99
3.15.4	Cuantificación del número de células BrdU y DCX positivas.....	100
3.16	<i>Microscopía electrónica</i>	100
3.16.1	Preparación del tejido para ME	100
3.16.2	Análisis del número de sinapsis por ME	101
4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	103
	RESULTADOS	105
1.	DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LOS RECEPTORES OB-R Y MEGALINA EN RATONES APP/PS1.....	107
2.	EFICIENCIA DEL VECTOR LENTIVIRAL	108
2.1	<i>Expresión de leptina recombinante in vitro</i>	108

2.2	<i>Expresión de leptina recombinante in vivo</i>	108
2.2.1	Efectos del lentivirus sobre la expresión de proteínas sinápticas	110
2.2.2	Funcionalidad de la leptina expresada por el lentivirus.....	111
3.	EFFECTOS DE LA LEPTINA SOBRE LAS ALTERACIONES COMPORTAMENTALES.....	112
4.	EFFECTOS DE LA LEPTINA SOBRE LA ACUMULACIÓN DE PLACAS AMILOIDEAS	114
5.	EFFECTOS DE LA LEPTINA SOBRE LA PROTEÍNA BACE1	118
6.	EFFECTOS DE LA LEPTINA SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA: ACTIVACIÓN DE ASTROCITOS Y MICROGLÍA	120
7.	EFFECTOS DE LA LEPTINA SOBRE LOS TERMINALES SINÁPTICOS.....	124
7.1	<i>Estudios in vivo</i>	124
7.1.1	Estudio del número de sinapsis por ME.....	124
7.1.2	Estudio bioquímico de las alteraciones sinápticas	128
7.1.2.1	Análisis de Caspasa-3	128
7.1.2.2	Análisis de proteínas sinápticas	129
7.2	<i>Estudios in vitro</i>	131
7.2.1	Análisis de la expresión de sinaptofisina en cultivos primarios neuronales	131
7.2.2	Mecanismo de señalización de la leptina sobre la modulación de sinaptofisina	132
7.2.3	Efecto del bloqueo de la ruta de señalización JAK-STAT3 sobre la expresión de sinaptofisina	133
8.	EFFECTOS DE LE LEPTINA SOBRE LA LONGITUD DE NEURITAS EN CULTIVOS PRIMARIOS NEURONALES.....	134
9.	EFFECTOS DE LE LEPTINA SOBRE LA NEURODEGENERACIÓN Y MUERTE CELULAR.....	141
10.	EFFECTOS DE LE LEPTINA SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR	145
10.1	<i>Estudios in vivo</i>	145
10.2	<i>Estudios in vitro</i>	147
	DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	153
1.	LA TERAPIA GÉNICA COMO VÍA DE ADMINISTRACIÓN CENTRAL DE LEPTINA	156
2.	EFFECTOS DE LA LEPTINA SOBRE MARCADORES PATOLÓGICOS CARACTERÍSTICOS DEL MODELO APP/PS1	157
3.	EFFECTOS DE LA LEPTINA SOBRE LA PLASTICIDAD NEURONAL.....	162
4.	EFFECTOS NEUROPROTECTORES DE LA LEPTINA	167
5.	EFFECTOS NEUROGÉNICOS DE LA LEPTINA	168
	CONCLUSIONES	175
	BIBLIOGRAFÍA	179
	ARTÍCULOS	207

ABREVIATURAS

A β : Péptido β -amiloide
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ADNc: ADN codificante
AMPA: Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico
ANOVA: Análisis de la varianza
APOE: Gen de la apolipoproteína E
ApoE: Apolipoproteína E
APP: Gen de la proteína precursora del péptido amiloide
APP: Proteína precursora del péptido amiloide
ARN: Ácido ribonucleico
BACE1: β -secretasa 1
BHE: Barrera hematoencefálica
BSA: Albúmina de suero bovino
col.: colaboradores
CLU: Gen de la clusterina
CMV: Citomegalovirus
CR1: Gen del receptor complemento 1
CTF α : Fragmento C-terminal α del APP
CTF β : Fragmento C-terminal β del APP
DAB: 3,3'-diaminobenzidina
DMEM: *Dubelcco's modified Eagle medium*
DO: Densidad óptica
EA: Enfermedad de Alzheimer
ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*
ERK: Quinasas reguladas por señales extracelulares
GD: Giro dentado del hipocampo
GFP: Proteína verde fluorescente
GFAP: Proteína de glía fibrilar ácida
GSK3 β : Glucógeno sintasa quinasa 3 β
FBS: Suero fetal bovino
HE: Hematoxilina-Eosina
HIV: Virus de la inmunodeficiencia humana
HIV-leptina: vector lentiviral que sobreexpresa leptina
HIV-vv: vector lentiviral vacío
HRP: Peroxidasa de rábano
icv: Intracerebroventricular
IRS: Sustrato del receptor de insulina
LCR: Líquido cefalorraquídeo
Lys: lisina
LPS: Lipopolisacárido
LTP: Potenciación a largo plazo
LTRs: repeticiones largas terminales
LTD: Depresión a corto plazo
JAK: Tirosin quinasa
JAK2: Tirosin quinasa 2
n: Tamaño muestral
ME: Microscopía electrónica
MHCII: Complejo mayor de histocompatibilidad tipo II

ABREVIATURAS

MTT: Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
mTORC1: serina/treonina quinasa de la vía del blanco de la rapamicina
NMDA: N-metil D-aspartato
6-OHDA: 6-Hidroxidopamina
KDa: Kilodaltons
Kb: Kilobases
p: p-valor
PBS: Tampón fosfato salino
PB: Tampón fosfato
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa
PSD-95: Proteína de membrana post-sináptica de 95 KDa
PSEN1: Gen de la Presenilina 1
PSEN1: Presenilina 1
PSEN2: Gen de la presenilina 2
PSEN2: Presenilina 2
rpm: Revoluciones por minuto
sAPP α : Ectodominio amino-terminal soluble α del APP
sAPP β : Ectodominio amino-terminal soluble β del APP
SEM: Error estándar medio
SNAP-25: Proteína asociada a sinaptosomas de 25 KDa
SNC: Sistema nervioso central
SOCS3: Supresor 3 de señalización de citoquinas
STAT3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3
STAT5: Transductor de señal y activador de la transcripción 5
TBS: Tampón Tris base salino
TTBS: Tampón Tris base salino con Tween20 al 0,05%
Tyr: Tirosina
ZSV: Zona subventricular
ZSG: Zona subgranular

INTRODUCCIÓN

1. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

1.1 *Definición*

La enfermedad de Alzheimer (EA) se define clínicamente como un proceso neurodegenerativo grave cuya prevalencia aumenta con la vejez. Se caracteriza por un inicio insidioso y un deterioro cognitivo y funcional progresivo así como por la aparición, en el transcurso de la enfermedad, de modificaciones en el estado de ánimo y de alteraciones psicóticas y de la conducta. Se trata de la principal causa de demencia asociada al envejecimiento (Morishima-Kawashima y Ihara, 2002). El término demencia se utiliza para describir un síndrome adquirido que se caracteriza por un conjunto de signos y síntomas que producen deterioro persistente de las capacidades cognitivas y alteran la capacidad funcional en personas que no presentan alteración del nivel de conciencia. El deterioro intelectual en adultos con demencia es lo suficientemente grave como para interferir en las relaciones sociales (es importante diferenciar la demencia de las pequeñas pérdidas de memoria que se dan durante el envejecimiento normal). En su conjunto, las demencias se caracterizan por presentar un cuadro clínico con síntomas comunes que difieren en su etiología, edad, forma de presentación, curso clínico y trastornos asociados.

1.2 *Historia*

En 1906, el neuropatólogo y psiquiatra alemán, Alois Alzheimer (1864-1915) (Figura 1), describió las características clínicas y anatomopatológicas de la paciente Auguste D, que a sus 51 años presentaba un trastorno clínico de delirio celotípico y un deterioro progresivo de la memoria, desarrollando finalmente un cuadro de demencia con desorientación, afasia, apraxia, agnosia e incapacidad para realizar las actividades de la vida diaria. Falleció a los 56 años en un estado de demencia avanzada. En la autopsia, el examen anatomopatológico reveló atrofia cerebral global y cambios característicos en sus estructuras internas, tales como “parches” y “nudos de fibras”, fundamentalmente en las neuronas corticales,

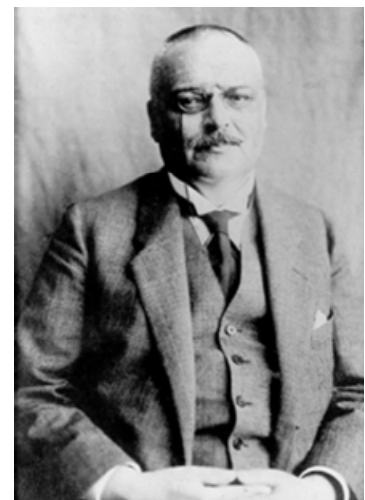


Figura 1. Fotografía de Alois Alzheimer

unas estructuras características que posteriormente fueron identificadas como placas seniles o amiloides y ovillos neurofibrilares.

En 1910, esta enfermedad fue descrita en la octava edición del *Compendium der Psychiatrie* y fue denominada por Emil Kraepelin como Enfermedad de Alzheimer. Unos años más tarde, este término ya estaba establecido y era utilizado por la comunidad científica, incluyendo a Ramón y Cajal, quien lo utilizó en diversos trabajos publicados en la década de 1920 (revisado en Garcia-Marin y col., 2007).

Al principio, la EA fue considerada como una demencia presenil y, aunque su frecuencia fue baja durante la primera mitad del siglo XX, se ha convertido en las últimas décadas en uno de los problemas sociosanitarios más importantes debido a las repercusiones sociales y económicas que conlleva. La elevada prevalencia de este proceso se debe sobre todo al envejecimiento de la población causado por el incremento de la esperanza de vida y la disminución de la mortalidad. Hoy en día se sabe que es una demencia de carácter progresivo e irreversible, que sus causas son desconocidas y actualmente no existe ningún tratamiento eficaz para prevenirla o evitar su progresión.

1.3 *Epidemiología*

La EA constituye el 50-60% de todas las demencias (Selkoe, 2001) siguiéndole en frecuencia la demencia vascular, la demencia de cuerpos de Lewy y una larga lista de enfermedades menos comunes.

Los estudios de prevalencia permiten conocer el número de casos observados en una zona concreta y a partir de ellos orientar la gestión y la planificación de los recursos en una determinada área de salud. Existe un gran número de estudios de prevalencia de la EA en los que a pesar de la utilización de los mismos criterios diagnóstico, las tasas presentan grandes variaciones que sobre todo dependen de la metodología utilizada para el cribado y el ajuste en los criterios diagnósticos. Sin embargo, todos los trabajos señalan un incremento exponencial de la prevalencia con la edad. Se estima que es de aproximadamente un 1% en la población mundial de 60 a 64 años (Fratiglioni y col., 1999; Nestor y col., 2004; Blennow y col., 2006), y un 5% en

los sujetos mayores de 65 años. El número de casos se dobla cada 4 ó 5 años hasta llegar a un tercio de la población mayor de 85 años (prevalencia de 24-33%) y a la mitad de la población de 95 o más años (Fratiglioni y col., 1999; Nestor y col., 2004). La mayoría de los estudios indican mayor prevalencia de la EA en mujeres y añaden que ésta va aumentando a medida que envejece la población. Prácticamente una de cada cinco mujeres de 65 años (un 17.2%) desarrollará demencia mientras que en los hombres esta proporción baja a aproximadamente uno de cada diez (un 9.1%) (Figura 2).

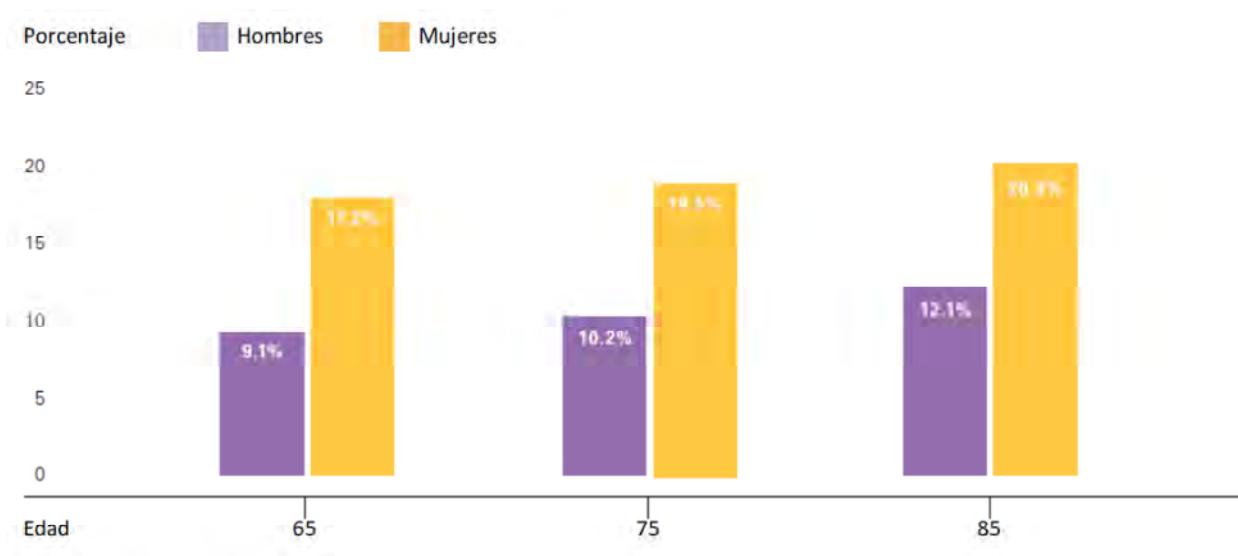


Figura 2. Riesgo de padecer EA según edad y sexo. Modificada del informe *Alzheimer's disease facts and figures 2012* de la asociación americana de Alzheimer.

Las estimaciones de prevalencia realizadas para la EA en los próximos años, aunque sujetas al efecto de muchos factores como la estabilidad temporal de los grupos de mayor edad de la población o los descubrimientos de nuevas terapias, señalan que habrá un incremento de la enfermedad que afectará a la población mundial durante la primera mitad del siglo XXI. A partir de los datos de población de la Organización Mundial de la Salud se ha estimado que en el año 2000, el número de casos de demencia en el mundo era de 25,5 millones y se prevé que en el año 2050 alcance los 114 millones de casos (Wimo y col., 2003).

Actualmente, se calculan unos 650.000 casos en España, 6.000.000 en la Unión Europea y unos 35 millones en el mundo entero, representando la tercera enfermedad más costosa económicamente después de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer y la cuarta causa de incapacidad a nivel mundial. De este modo, las consecuencias de la EA son incalculables, convirtiéndose en un trastorno devastador, no sólo por la pérdida de memoria sino de la capacidad para desarrollar una vida independiente; por otro lado supone graves cargas familiares y sociales, a lo que se añade un alto coste económico en el tratamiento (hasta ahora no curativo) de estos enfermos que requieren una atención integral y continua. Se ha estimado que el coste total que supuso la demencia en la población mundial en el año 2009 fue de 422 billones de dólares americanos (Wimo y col., 2010) lo que correspondería a aproximadamente unos 323 billones de euros.

1.4 *Sintomatología*

La EA se caracteriza por la aparición de alteraciones cognitivas que incluyen no sólo fallos de memoria, sino también en otras áreas cognitivas, como en el uso del lenguaje, percepción, praxis, capacidad para llevar a cabo actividades de la vida cotidiana, resolver problemas, pensar de manera abstracta y realizar juicios, entre otras cosas. Pueden darse episodios paranoides, y también irritabilidad, inquietud e incluso agresiones verbales y/o físicas a otras personas, normalmente del ambiente familiar, especialmente cuando la demencia avanza y el paciente nota una creciente pérdida de control sobre su entorno (Katzman, 1986). También existen alteraciones funcionales (dificultad para realizar actividades laborales y cotidianas), alteraciones conductuales (aparición de ansiedad, depresión, apatía) y alteraciones somáticas como la pérdida de peso. Los síntomas se dividen en tres etapas cuyo desarrollo puede variar de una persona a otra:

-Etapa inicial o leve: al principio, la enfermedad puede pasar desapercibida. Familiares y amigos lo pueden ver como una consecuencia normal del envejecimiento. Aparecen pequeñas pérdidas de memoria (dificultad para recordar conversaciones o hechos recientes). Problemas de comunicación, por ejemplo, no recordar palabras del vocabulario. Apatía general, alejamiento de las relaciones sociales, cambios de humor y ciertos rasgos depresivos. Reducción de la capacidad del juicio y resolución de nuevas situaciones.

-Etapa intermedia o moderada: la enfermedad ya resulta evidente. Aparecen problemas conductuales caracterizados por la ira, paranoia, violencia, alucinaciones y repetición en preguntas y frases. Pérdida de la capacidad de razonamiento, comprensión y coordinación se encuentran visiblemente apáticos y deprimidos. El deterioro avanza con rapidez y los enfermos pueden llegar a perderse en lugares familiares y a no ser capaces de reconocer a familia y amigos.

-Etapa avanzada o grave: todas las funciones cognitivas se encuentran alteradas. Pérdida de la capacidad de comunicación o comunicación con frases inconexas una y otra vez. Presentan incapacidad de reconocimiento de familiares y amigos; ni siquiera son capaces de reconocerse ellos mismos ante el espejo. Se muestran desorientados y los más afectados se olvidan de andar, sentarse y sufren incontinencia. Permanecen horas inmóviles sin actividad y durmiendo. Dejan de ser autónomos y necesitan de ayuda constante. Gritan, lloran o ríen sin motivo y no comprenden cuando se les habla. Pueden llegar a sufrir rigidez, convulsiones y trastornos deglutorios. Muchos de ellos acaban en estado vegetativo.

1.5 *Clasificación de la enfermedad*

La EA se puede clasificar en función de la edad de aparición de los síntomas o en función de la forma de herencia. En cuanto a la edad, se distinguen entre formas preseniles (antes de los 60 años) y formas seniles con aparición de los síntomas a partir de los 60-65 años. En cuanto a la forma de herencia, se distinguen la EA familiar, con herencia autosómica dominante, y la forma esporádica, EA esporádica, que no sigue ningún patrón de herencia mendeliano.

1.5.1 *Enfermedad de Alzheimer familiar*

La EA familiar constituye únicamente del 1-5% de los casos diagnosticados de Alzheimer. También se denomina de inicio temprano porque los síntomas suelen aparecer a partir de los 40 años (Rosenberg, 2000). Actualmente se conocen tres genes implicados en la EA familiar: el gen *APP* (proteína precursora del amiloide), el gen *PSEN1* (*presenilina 1*) y el gen *PSEN2* (*presenilina 2*).

1.5.1.1 *Gen APP*

El gen de la proteína APP se localiza en el cromosoma 21 (21q21.3). Tiene tres isoformas principales resultantes del corte y empalme alternativo: APP695, APP751 y APP770 que contienen 695, 751 y 770 aminoácidos, respectivamente. Las isoformas APP751 y APP770 están expresadas en la mayoría de los tejidos, mientras que APP695 se expresa principalmente en neuronas (Rohan de Silva y col., 1997).

Se sospechó de la implicación de este gen por la asociación entre el Síndrome de Down y la EA, así como por resultados preliminares de estudios de ligamiento, y se confirmó tras encontrar varias mutaciones en una serie de familias con EA de origen británico y japonés. Actualmente se conocen cerca de 30 mutaciones (Bertram y col., 2007; Carrasquillo y col., 2010; Alzgene *database*, <http://www.alzgene.org>), localizadas en los exones 16 y 17, que corresponden a los principales sitios de actuación de las enzimas secretasas. A continuación se citan algunos ejemplos de mutaciones en el gen *APP*:

- "Mutación London", fue la primera que se encontró. Se trata de una mutación puntual que consiste en la sustitución de una valina por una isoleucina en el codón 717, cerca del extremo carboxilo del péptido β -amiloide ($A\beta$) (Goate y col., 1991).

- "Mutación Swedish", son mutaciones en los codones 670 y 671. Fueron descubiertas en dos familias suecas con EA familiar. Consiste en un doble cambio de pares de bases: lisina y metionina son reemplazados por ácido aspártico y leucina, respectivamente, justo delante del extremo N-terminal del péptido $A\beta$ (Mullan y col., 1992).

- "Mutación Flemish", situada en el codón 692. Se trata de la sustitución de una alanina por una glicina dando lugar a un fenotipo mixto entre EA y una angiopatía congofílica (Hendriks y col., 1992).

Muy recientemente se ha identificado la primera mutación codificante que protege tanto de la EA como del deterioro cognitivo que ocurre de manera natural en la senescencia (Jonsson y col., 2012). Esta mutación se encuentra junto al lugar de actuación de la enzima β -secretasa

responsable de la generación del péptido A β y tiene como consecuencia la reducción en aproximadamente un 40% de la formación de placas amiloides *in vitro*, hecho que probaría la hipótesis de que una reducción del corte proteolítico de APP por la enzima β -secretasa puede proteger frente a la enfermedad (Jonsson y col., 2012).

1.5.1.2 Genes *PSENI* y *PSEN2*

Los genes que codifican para las proteínas Presenilina1 y Presenilina2 se encuentran localizados en el cromosoma 14 (14q24.3) y en el cromosoma 1 (1q31-q42), respectivamente. Mutaciones en estos genes incrementan la producción de la forma más larga del péptido A β , que es el mayor componente de las placas amiloides. La función de las presenilinas reside en la regulación del procesamiento de APP a través de la interacción con las γ -secretasas, enzimas que cortan el APP. Las presenilinas también están implicadas en la segmentación de los receptores Notch que actúan directamente en la regulación de la actividad de las γ -secretasas o actuando ellas mismas como enzimas proteolíticas, en la estabilización de la β -catenina y en la homeostasis del calcio intracelular. Las mutaciones en estos dos genes (*PSENI* y *PSEN2*) engloban aproximadamente el 95% de los casos de la EA familiar (Hoenicka, 2006).

1.5.2 Enfermedad de Alzheimer esporádica

La EA esporádica es una enfermedad de naturaleza multifactorial, que representaría el 90-95% de los casos, en la que intervendrían factores de riesgo genéticos y también factores de riesgo exógenos o ambientales.

1.5.2.1 Factores de riesgo genéticos

En los factores de riesgo genéticos se incluyen principalmente polimorfismos en el gen de la apolipoproteína E (*APOE*) localizado en el cromosoma 19. El *APOE* presenta en humanos tres isoformas comunes, *APOE2*, *APOE3* y *APOE4* (alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$, respectivamente) distribuidas de forma que la isoforma 3 es la mayoritaria y la 2 y la 4 se consideran variantes (Saunders, 2001). Se sabe que la EA es más frecuente en los sujetos portadores del alelo $\epsilon 4$, especialmente en los casos homocigóticos para dicho alelo, por lo que tener un familiar de primer grado afectado o portar el alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE* constituye un factor de riesgo para la EA (Strittmatter y col., 1993). Por el contrario, se ha postulado un efecto opuesto para el alelo $\epsilon 2$, que tendría por

tanto un papel protector (Benjamin y col., 1994). El gen *APOE* codifica para una apolipoproteína, la apolipoproteína E (ApoE), cuya función principal es transportar lípidos y colesterol en el cuerpo humano (Bell y Zlokovic, 2009). Sin embargo, el mecanismo por el que la proteína ApoE está implicada en la EA no está claro, encontrándose diversas revisiones al respecto (Mahley y col., 1996; Saunders y col., 2000; Martins y col., 2006).

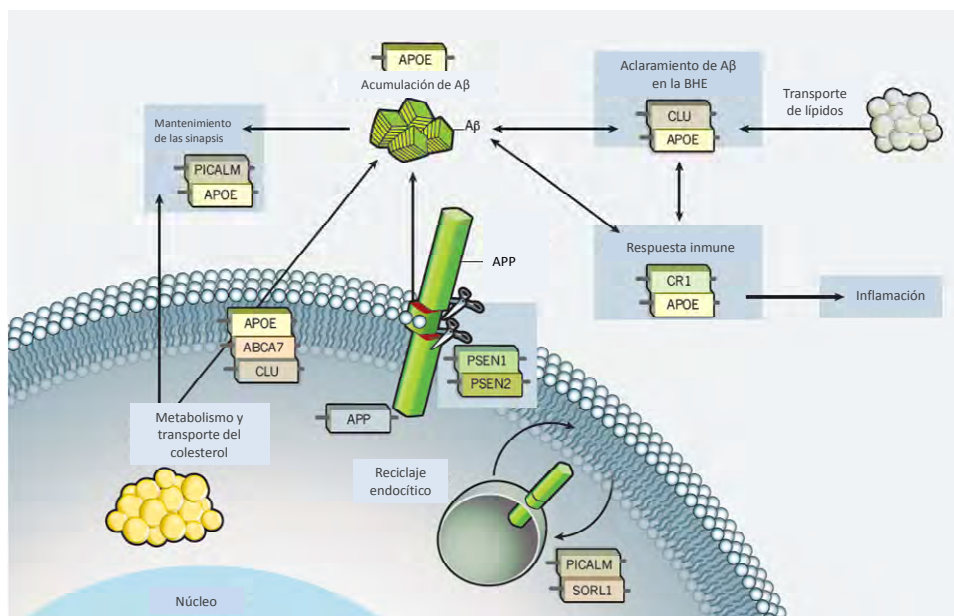


Figura 3. Factores de riesgo genéticos en la EA. Los distintos genes implicados en la EA intervienen en multitud de rutas celulares, hecho que ilustra la complejidad de la enfermedad. Modificada de Eisenstein, 2011.

El papel que juega el gen *APOE* está apoyado por la existencia de variantes en otros genes también relacionados con el metabolismo del colesterol que incrementan el riesgo de padecer EA. Este es el caso del gen *PICALM* (Harold y col., 2009; Naj y col., 2011), que codifica para una proteína que ayuda a la proteína ApoE en el transporte de lípidos, y el gen *ABCA7* (Hollingsworth y col., 2011), también implicado en el transporte del colesterol.

El gen *CLU*, que codifica para la proteína clusterina, es uno de los nuevos factores genéticos más fuertemente asociados con la EA (Lambert y col., 2009; Naj y col., 2011). Se cree que la clusterina está implicada tanto en la agregación del péptido Aβ como en su aclaramiento. Otro factor de riesgo es el receptor complemento 1 (CR1) (Lambert y col., 2009; Naj y col., 2011), un

componente muy importante de la respuesta inmune innata ante una infección, aunque también está relacionado con el aclaramiento del A β circulante. Sin embargo, polimorfismos en los genes *CLU* y *CRI* contribuirían en un 15% al riesgo general de padecer la enfermedad, mucho menos que el riesgo que supondría el gen *APOE*.

En la figura 3 aparecen algunos de los principales factores de riesgo genéticos propuestos hasta la fecha.

1.5.2.2 Factores de riesgo exógenos o ambientales

Los principales factores de riesgo exógenos que se han propuesto para la EA son:

-La edad avanzada: es el factor de riesgo por excelencia ya que la mayoría de los casos de EA aparecen en personas de 65 años o mayores (Amaducci y Tesco, 1994).

-Sexo: las mujeres tienen mayor riesgo de padecer EA (Carter y col., 2012). Además, la severidad de la enfermedad es más acusada en mujeres al presentar mayor deterioro cognitivo que hombres con EA (Irvine y col., 2012).

-Historial familiar: los individuos con un padre, hermano o hermana con EA pueden desarrollar la enfermedad con mayor probabilidad que aquellos que no tienen un familiar de primer grado con EA (Mayeux y col., 1991; Fratiglioni y col., 1993) y aquellos que tienen más de un familiar directo con EA tienen un riesgo mayor de padecer la enfermedad (Lautenschlager y col., 1996).

-Traumatismo craneal: haber sufrido un traumatismo encefálico o una lesión cerebral supone un mayor riesgo de padecer EA y otras demencias. Una lesión cerebral de gravedad moderada está asociada con un riesgo dos veces mayor de desarrollar EA, mientras que lesiones muy graves están asociadas con un incremento de 4,5 veces del riesgo de desarrollo de EA (Plassman y col., 2000; Sivanandam y Thakur, 2012).

-Enfermedades cardiovasculares: el cerebro está irrigado por una de las redes de vasos sanguíneos más extensa del cuerpo humano y cada día hay más evidencias de que la salud mental está fielmente ligada a la salud del corazón y de los vasos sanguíneos. Los factores de riesgo de la enfermedad cardiovascular como la inactividad física, niveles altos de colesterol (Solomon y col., 2009), diabetes (Yaffe y col., 2011), consumo de tabaco (Anstey y col., 2007; Rusanen y col., 2011) y obesidad (Whitmer y col., 2008), están asociados con un mayor riesgo de desarrollo de EA y otras demencias (Pendlebury y Rothwell, 2009). De hecho, algunas de las principales estrategias para la prevención de la demencia incluyen el control de los factores de riesgo vasculares, incluyendo la diabetes, hipertensión, dislipidemia y obesidad (Middleton y Yaffe, 2009).

-Bajo nivel educacional: las personas con un menor nivel educacional tienen menor capacidad de compensación de los daños cognitivos que aparecen en los primeros estadios de la EA (Reiman y Caselli, 1999).

-Dieta: una dieta rica en frutas y verduras en ancianos sanos se ha asociado con un menor estrés oxidativo que en aquellos con menor aporte de estos vegetales. Sin embargo, el efecto que esta disminución del estrés oxidativo tiene sobre el deterioro cognitivo todavía no está muy claro (Polidori y col., 2009). En los últimos años se ha prestado mucha atención a la dieta mediterránea, que es particularmente rica en antioxidantes, vitaminas C y E, ácidos grasos poliinsaturados y componentes polifenólicos. De hecho, muchos estudios *in vitro*, en animales o en la población, han puesto de manifiesto efectos positivos de la dieta mediterránea sobre la prevención de EA, aunque existen controversias al respecto (revisado en Vassallo y Scerri, 2012).

-Obesidad: cada vez un mayor número de evidencias señalan que la obesidad modula enfermedades no vasculares incluyendo la EA (Profenno y col., 2010; Lee, 2011; Anstey y col., 2011; Xu y col., 2011). Diferentes estudios han puesto de manifiesto que la obesidad en la etapa adulta está asociada con un aumento del riesgo de sufrir demencia (Beydoun y col., 2008; Whitmer y col., 2008). Sin embargo, en una edad más cercana a la senescencia, la rápida pérdida de peso también ha sido relacionada con la demencia (Barrett-Connor y col., 1996; Fitzpatrick y

col., 2009). Esta disociación entre resultados se conoce como "la paradoja de la obesidad" (Fitzpatrick y col., 2009). Adicionalmente, y apoyando la idea de que la obesidad aumenta el riesgo de sufrir demencia, se ha visto que un índice de masa corporal elevado afecta a la integridad de las estructuras cerebrales, tanto en ancianos sanos (Raji y col., 2009) como en pacientes con EA o con alteraciones cognitivas (Ho y col., 2010), al observar que la obesidad está asociada con menor volumen cerebral.

-Enfermedades infecciosas: la posible implicación de agentes infecciosos en la etiología de distintas enfermedades de la edad adulta, entre las que se incluye la EA esporádica (Dobson y col., 2003), es cada vez más evidente. A lo largo de los años se han relacionado diferentes agentes infecciosos con la EA al contribuir a la patofisiología de la enfermedad o a los cambios cognitivos. Entre ellos destacan sobre todo infecciones por el virus herpes simple tipo 1 (HSV-1) (Itzhaki, 2004; Bullido y col., 2008).

-Metales: Muchos estudios *in vitro* e *in vivo* han puesto de manifiesto la importancia que juegan metales específicos, como el cobre, hierro y zinc, en diferentes rutas tóxicas que se desarrollan en la EA, ya que parecen mediar la agregación y neurotoxicidad del péptido A β (revisado en Pithadia y Lim, 2012). Además, alteraciones en la homeostasis de los metales se han correlacionado con marcadores específicos de la EA, como el A β o la proteína tau, en el líquido cefalorraquídeo (LCR), sugiriendo que la acumulación de metales en ciertas áreas puede ser responsable de la alteración sistémica presente en la enfermedad (revisado en Squitti, 2012).

1.6 *Neuropatología de la enfermedad*

En la EA subyace un sustrato neurobiológico muy complejo. Su etiología es hasta ahora desconocida y los procesos patológicos responsables de la progresión de los estadios clínicos no se comprenden en su totalidad. Sin embargo, está claro que los mecanismos de comunicación intercelular se encuentran alterados, si no interrumpidos. Estas modificaciones implican a varios neurotransmisores, neuropéptidos y neuromoduladores, con sus correspondientes vías metabólicas, procesamiento de proteínas y elementos del metabolismo celular energético y oxidativo.

A nivel anatómico se producen lesiones macroscópicas como atrofia cerebral, degeneración del hipocampo (asociada con pérdida de memoria), lóbulos frontales, lóbulos parietales, ventrículos laterales y locus ceruleus (asociados con depresión y alteraciones del sueño) (Figura 4), y lesiones microscópicas, principalmente los dos tipos de depósitos proteínicos distintos que son los distintivos más importantes de la enfermedad: los depósitos de A β y los ovillos neurofibrilares, pero también aparecen inflamación, atrofia y pérdida neuronal, alteraciones sinápticas y defectos y pérdida de espinas sinápticas. La degeneración neuronal normalmente implica cambios concomitantes en otras células, como respuestas inflamatorias en astrocitos y en células de la microglía.

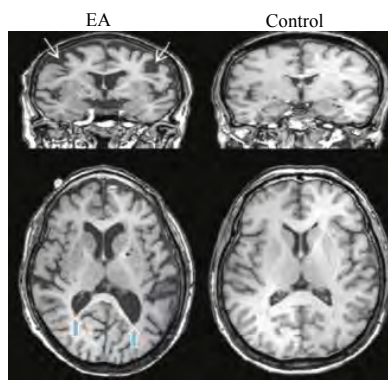


Figura 4. Lesiones macroscópicas de la EA. Imágenes obtenidas a través la técnica de resonancia magnética que muestran los efectos de la EA sobre la morfología cerebral respecto a un cerebro sano. Modificada de Zhang y col., 2012.

1.6.1 Péptido amiloide

1.6.1.1 Proteína APP

La proteína APP pertenece a la familia de proteínas que incluyen la proteína APP-like 1 (APLP1) y la 2 (APLP2) en mamíferos (Wasco y col., 1992; Wasco y col., 1993) todas son proteínas transmembrana de tipo I y son procesadas del mismo modo.

El APP es sintetizado en el retículo endoplasmático y transportado a través del aparato de Golgi hasta el *Trans* Golgi, donde se encuentra la mayor concentración de APP (Hartmann y col., 1997; Xu y col., 1997; Greenfield y col., 1999). El péptido A β se genera tanto en el retículo endoplasmático como en el Golgi/*Trans* Golgi (Greenfield y col., 1999). Desde el *Trans* Golgi el APP puede ser transportado en vesículas secretoras derivadas del mismo *Trans* Golgi hasta la

superficie celular para ser procesado por la α -secretasa para producir una molécula soluble de APP, la sAPP α (Sisodia, 1992), o para ser reinternalizado mediante la vía de degradación endosomal-lisosomal (Nordstedt y col., 1993; Caporaso y col., 1994). Se ha propuesto que el A β también se puede generar en el sistema endosomal/lisosomal (Haass y col., 1993) y en los exosomas (Rajendran y col., 2006; Pérez-González y col., 2012).

Distinguimos dos tipos de vías de procesamiento del APP según el tipo de escisiones que sufre por las proteasas: la vía no amiloidogénica en la que interviene la α -secretasa, y la vía amiloidogénica, protagonizada por la β -secretasa.

1.6.1.1.1 Vía no amiloidogénica

La escisión del APP a través de una α -secretasa evita la formación del péptido A β ya que el sitio de corte de esta proteasa está dentro del dominio A β (entre los residuos Lys16 y Lys17). Como consecuencia de este procesamiento se libera el ectodominio amino-terminal soluble del APP, llamado sAPP α , al lumen extracelular o al lumen vesicular, mientras que un fragmento C-terminal de 83 aminoácidos (CTF α) queda anclado a la membrana para ser procesado por la γ -secretasa y generar un pequeño fragmento N-terminal soluble e hidrofóbico, P83, cuya función normal y papel en la EA, si la tiene, es desconocida, y un fragmento C-terminal unido a la membrana (AICD, o dominio APP intracelular), que podría estar involucrado en la señalización nuclear vía regulación transcripcional y en el transporte axonal a través de su habilidad para asociarse con una gran cantidad de diferentes proteínas. En la figura 5A se muestran los fragmentos proteolíticos del APP generados en la vía no amiloidogénica.

A diferencia del A β , el sAPP α tiene un importante papel en la supervivencia y plasticidad neuronal y es protector frente a la excitotoxicidad (Furukawa y col., 1996; Mattson, 1997). Además, el sAPP α también regula la proliferación de las células madre neuronales y es importante para las primeras etapas del neurodesarrollo (Ohsawa y col., 1999; Caille y col., 2004). La expresión de sAPP α por sí sola es capaz de recuperar las anomalías que presentan los animales deficientes para APP (Ring y col., 2007), sugiriendo que la mayor parte de la función fisiológica del APP está mediada por el sAPP α .

1.6.1.1.2 Vía amiloidogénica: generación del péptido A β

El primer paso necesario para la generación de A β es el corte del APP por una β -secretasa. En los años 1999 y 2000, varios grupos identificaron a la enzima BACE1 (también llamada Asp2 o memapsina2) como la principal β -secretasa (Sinha y col., 1999; Vassar y col., 1999; Yan y col., 1999). BACE1 es una aspartil proteasa transmembrana de tipo I (Sinha y col., 1999; Vassar y col., 1999) que se localiza principalmente en la cara *Trans* Golgi y en compartimentos endosomales.

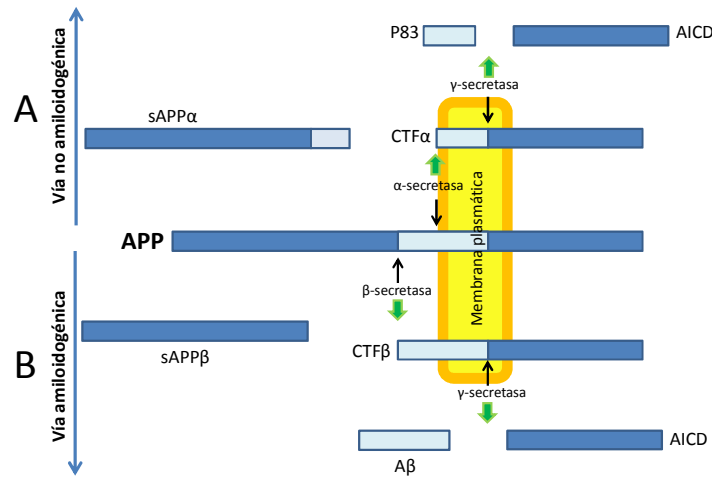


Figura 5. Diagrama esquemático del procesamiento de APP (no está dibujado en proporción). **A**, se muestran los productos de la vía no amiloidogénica: sAPP α , CTF α , P83 y AICD. **B**, procesamiento en la vía amiloidogénica con obtención de A β , CTF β , sAPP β y AICD. Modificada de Zhang y col., 2007.

Tras la actividad β -secretasa sobre el APP se produce un ectodominio N-terminal soluble (sAPP β) y un fragmento C-terminal unido a la membrana (CTF β) (Figura 5B) Este corte se produce más cerca del extremo N-terminal del APP que con la α -secretasa, produciendo un CTF β de 99 residuos aminoacídicos, más largo que el CTF α . Posteriormente a la actividad β -secretasa, el fragmento CTF β es procesado por la γ -secretasa (como ocurre en la vía no amiloidogénica), produciendo un fragmento C-terminal unido a la membrana (AICD), el mismo que en la otra vía, y un fragmento N-terminal soluble, el A β , que dependiendo del punto exacto de corte produce tres formas principales, A β -38, A β -40 y A β -42, de 38, 40 o 42 residuos aminoacídicos, respectivamente. Una vez formados estos péptidos son secretados fuera de las células. Estos monómeros solubles se agregan para formar complejos multiméricos solubles

(dímeros y trímeros de bajo peso molecular) e insolubles (fibrillas y protofibrillas de elevado peso molecular). Las agrupaciones de fibrillas y otras especies intermedias son las que forman parte de las placas amiloides características de la EA.

1.6.1.2 *El péptido A β*

El péptido A β tiene una longitud variable y un tamaño de 4-6 KDa (Glennner y Wong, 1984). El péptido A β -42 es más hidrofóbico que el A β -40, forma agregados y oligómeros con mayor facilidad, y tiende a formar oligómeros estables triméricos y tetraméricos, mientras que el A β -40 no tiene estas propiedades, aunque éste último constituye el 90% del total de A β generado. Algunas especies de oligómeros de A β son lo suficientemente pequeños y solubles como para difundir a través del parénquima cerebral hacia la hendidura sináptica y afectar tanto a la estructura como a la función sináptica, y en último término la supervivencia neuronal (Haass y Selkoe, 2007).

1.6.2 *Placas amiloides*

Las placas amiloides son el resultado de la acumulación extracelular los péptidos A β -40 y A β -42. Aunque se desconocen los mecanismos que contribuyen al proceso de formación de las placas amiloides, se cree que aparece en primer lugar la placa difusa, la cual daría lugar a la placa madura amiloide (Yamaguchi y col., 1994). Una placa difusa estaría constituida principalmente por A β -42 que con el transcurso del tiempo terminaría constituyendo un núcleo sólido de A β -42 al que se incorporarían moléculas de A β -40, así como otros muchos componentes no amiloideos, como ubiquitinas o α -sinucleínas (Yang y col., 2000) para formar la placa madura amiloide (Figura 6). Las placas maduras se tiñen con tinciones específicas para la conformación β -laminar, como es el caso de la tinción Congo-Red y Tioflavina-S, y se encuentran normalmente rodeadas de neuritas distróficas (terminaciones neuronales degeneradas, tanto axonales como dendríticas) y algunas células gliales como astrocitos y microglía activada.

1.6.3 *Ovillos neurofibrilares*

Los ovillos neurofibrilares están formados por parejas de filamentos cruzados helicoidalmente, cuyo componente principal es la proteína asociada a microtúbulos tau (Wischik y col., 1988). La proteína tau, que tiene una función estabilizadora de los microtúbulos, aparece

en los ovillos altamente fosforilada, insoluble y difícilmente degradable. Los ovillos neurofibrilares se presentan principalmente en neuronas piramidales del hipocampo, corteza entorrinal y parahipocampal, núcleos del tronco, y en fases más avanzadas de la enfermedad, en diversas zonas del neocórtex (Corder y col., 2000) (Figura 6).

Está ampliamente reconocido que los depósitos de A β aparecen antes que la acumulación de la proteína tau hiperfosforilada en el cerebro de enfermos con EA. Estudios recientes han puesto de manifiesto que oligómeros solubles de A β son capaces de acelerar la hiperfosforilación de tau (Ma y col., 2009; Zempel y col., 2010; Jin y col., 2011), posiblemente involucrando la vía de señalización Akt- GSK3 β (Glucógeno sintasa quinasa 3 β) (Tokutake y col., 2012). Por otro lado, se ha descrito que la reducción de tau endógena permite paliar las alteraciones cognitivas inducidas por A β en un modelo animal de amiloidosis (Roberson y col., 2007).

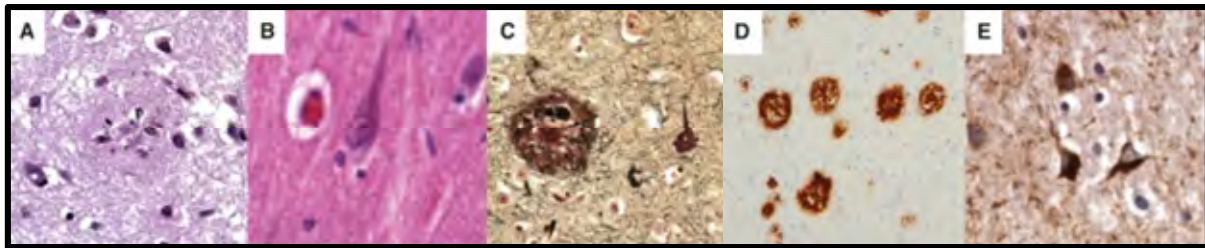


Figura 6. Lesiones microscópicas observadas en la EA. **A**, placas amiloides teñidas con la tinción de rutina Hematoxilina-Eosina (HE) en corteza cerebral. **B**, ovillo neurifibrilar de una neurona piramidal del hipocampo teñido con HE. **C**, tinción de plata que muestra las dos lesiones, placa amiloide y ovillo neurofibrilar. **D**, placas amiloides visualizadas mediante un ensayo de inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo específico anti-A β -42. **E**, ovillos neurofibrilares visualizados con un anticuerpo específico anti-PHF1. Modificada de Serrano-Pozo y col., 2012.

1.6.4 *Alteraciones sinápticas en la EA*

Las sinapsis constituyen la unión intercelular especializada entre neuronas. A través de estos contactos se realiza la transmisión de las señales eléctricas o químicas en el cerebro. El terminal nervioso de las neuronas está lleno de pequeñas vesículas sinápticas implicadas en el almacenamiento y liberación de los neurotransmisores. Estas vesículas están constituidas por proteínas sinápticas, como las sinapsinas, que constituyen las principales proteínas periféricas en la cara citoplasmática de las vesículas, o la sinaptofisina, que es la principal proteína integral de membrana de las vesículas sinápticas.

Las espinas dendríticas son pequeñas protuberancias membranosas de las dendritas donde se localizan las sinapsis. Las sinapsis y las espinas dendríticas son estructuras dinámicas responsables de la plasticidad neuronal que ocurre durante el aprendizaje y la memoria (Kandel y Schwartz, 1982). En términos electrofisiológicos, la plasticidad sináptica se refleja en los procesos que conocemos como potenciación a largo plazo (LTP: *Long-term potentiation*) o depresión a largo plazo (LTD: *Long-term depression*). Una actividad sináptica incrementada, abre los receptores N-metil D-aspartato (NMDA) permitiendo cambios de larga duración en los receptores postsinápticos AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico) y LTP en la transmisión sináptica. Por otro lado, niveles bajos de estimulación sináptica pueden activar los receptores NMDA para producir LTD. A nivel morfológico, la LTP está generalmente asociada con el crecimiento de las espinas dendríticas, mientras que la LTD puede inducir la reducción de receptores postsinápticos AMPA y la pérdida de espinas (Man y col., 2000; Snyder y col., 2001; Zhou y col., 2004). La formación, mantenimiento y plasticidad de las sinapsis se asocia con cambios en la morfología y en el número de espinas (Bourne y Harris, 2008), cambios que están alterados en enfermedades neurodegenerativas como es el caso de la EA (Gouras y col., 2010).

Gran cantidad de estudios han examinado la relación entre grado de déficit cognitivo y número de placas seniles y ovillos neurofibrilares, y mientras que, en general el número de ovillos se correlaciona mejor que el número de placas con la severidad de la demencia, posiblemente las mejores correlaciones estadísticas ocurren entre medidas de densidad sináptica y grado de demencia (DeKosky y Scheff, 1990; Jacobsen y col., 2006; Masliah y col., 2006).

A través de la cuantificación de marcadores sinápticos mediante marcajes inmunohistoquímicos o microscopía electrónica (ME) se han documentado descensos significativos en la densidad sináptica en corteza e hipocampo de cerebros con EA (revisado en Scheff y Price, 2003). Además, el descenso del número de sinapsis y su densidad, parece desproporcionado con relación a la pérdida de células neuronales (DeKosky y Scheff, 1990; Bertoni-Freddari y col., 1996), lo que sugiere que la reducción de los terminales sinápticos puede preceder a la muerte de neuronas en el proceso de la enfermedad. La alteración sináptica en el

hipocampo y en la corteza en las fases iniciales de la EA es atribuida a la presencia de oligómeros de A β (Walsh y Selkoe, 2004; Selkoe, 2008).

1.6.5 *Respuestas inflamatorias en la EA*

Se ha demostrado ampliamente que las respuestas inflamatorias e inmunes pueden tener lugar tanto a nivel del SNC como en la periferia. Las respuestas inmunes e inflamatorias en el SNC se observan en varias enfermedades neurodegenerativas, como la EA, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica, la esclerosis múltiple y el infarto, siendo las células microgliales y los astrocitos las células responsables de esta respuesta inflamatoria.

1.6.5.1 *Activación de la microglía*

A finales de los años 80 se descubrió que la microglía en la corteza cerebral de un sujeto con EA se podía marcar con anticuerpos contra el complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHCII), un marcador clásico de células activadas del sistema inmune (Luber-Narod y Rogers, 1988; Rogers y col., 1988). Actualmente, la microglía está reconocida como la primera línea de defensa ante situaciones de emergencia en el SNC. La microglía está constituida por macrófagos residentes en el cerebro que tienen un papel fundamental en la respuestas inflamatorias e inmunes innatas en diferentes trastornos neurológicos, entre ellos la EA (Mandrekar-Colucci y Landreth, 2010).

La microglía tiene la capacidad de atacar a patógenos potenciales y de eliminar desechos celulares contribuyendo al mantenimiento de un cerebro sano (Wyss-Coray, 2006). Estos mecanismos de apoyo de la microglía han sido enfatizados recientemente en el trabajo de Streit y Xue (Streit y Xue, 2009), donde los autores argumentan que la única microglía "mala" es aquella que está muerta. Sin embargo, encontramos en la literatura muchas referencias de los mecanismos de ataque de la microglía ante una enfermedad neurológica, sugiriendo que nos encontramos ante un campo bastante complejo. Por ejemplo, las células de microglía *in vitro* secretan una gran variedad de factores inflamatorios que afectan a las neuronas vecinas y a sus prolongaciones. Algunos de estos factores son las especies reactivas de oxígeno (Coraci y col., 2002), algunas citoquinas como la interleuquina-1 β , la interleuquina-6, el factor de necrosis tumoral α y el interferon- γ (Lue y col., 2001). Pero además, la microglía también expresa

receptores asociados con la activación de la inflamación, ataque y fagocitosis, como por ejemplo receptores de citoquinas (revisado en Akiyama y col., 2000) entre otros. De hecho, se ha observado un efecto neuroprotector mediado por cannabinoides al bloquear la activación de la microglía en un modelo animal de amiloidosis (Ramirez y col., 2005; Martin-Moreno y col., 2011). Por otro lado, la microglía es capaz también de secretar mediadores anti-inflamatorios y factores de crecimiento como interleuquina-4, interleuquina-10, interleuquina-13 y el factor de crecimiento tumoral β (revisado en Wyss-Coray, 2006; Colton, 2009), tal y como hacen los monocitos en la fase de reconstrucción del tejido tras el ataque inflamatorio. Por todo ello, en las dos últimas décadas ha habido mucha controversia sobre si la activación microglial se debe considerar como una respuesta beneficiosa o perjudicial para el SNC.

Aunque son muchos los posibles estímulos responsables de desencadenar una respuesta inflamatoria en cerebros de pacientes con EA, los agregados de $A\beta$ parecen ser especialmente potentes, como así lo indica la densa acumulación de microglía que expresa MHCII y otros marcadores de activación dentro y alrededor de los depósitos amiloides (Luber-Narod y Rogers, 1988; Rogers y col., 1988). Además, se ha identificado el papel de la microglía en la degradación de la placa amiloide en diferentes estudios (Paresce y col., 1996; Paresce y col., 1997; Kakimura y col., 2002; Takata y col., 2007; Takata y col., 2010).

1.6.5.2 *Astroglisis reactiva*

Los astrocitos son las células esenciales de apoyo en el cerebro. Interaccionan con las neuronas en numerosas funciones como en la secreción y reciclaje de neurotransmisores, la homeostasis, la regulación de la energía metabólica, el remodelamiento sináptico y la modulación del estrés oxidativo. Como la microglía, los astrocitos responden rápidamente a la patología con cambios en su morfología, antigenicidad y función, y sus estados reactivos han sido reconocidos tanto por su potencial beneficioso, como por sus consecuencias destructoras (revisado en Sofroniew y Vinters, 2010). Los astrocitos reactivos llegan a ser hipertróficos mostrando una producción exacerbada de la proteína de glía fibrilar ácida (GFAP) y pudiendo formar cicatrices gliales que dificultan la regeneración de los axones neuronales (Block y Hong, 2005).

En cerebros de pacientes con EA (Sofroniew y Vinters, 2010) y en los de ratones transgénicos modelos de amiloidosis (Carro y col., 2006b; Rodriguez y col., 2009), los astrocitos reactivos ocupan posiciones periféricas a las placas, rodeando los depósitos de A β y algunos estudios sugieren que estos astrocitos reactivos son capaces de captar y degradar el A β (Nagele y col., 2003; Wyss-Coray y col., 2003; Koistinaho y col., 2004).

1.6.6 Hipótesis de la cascada amiloide

En 1992, los investigadores John A. Hardy y Gerald A. Higgins (Hardy y Higgins, 1992) propusieron por primera vez la hipótesis de la cascada amiloide (Figura 7), según la cual la deposición de la proteína amiloide era la principal causa responsable en la aparición de la patología de la EA con aparición de ovillos neurofibrilares, muerte celular, daño vascular y demencia.

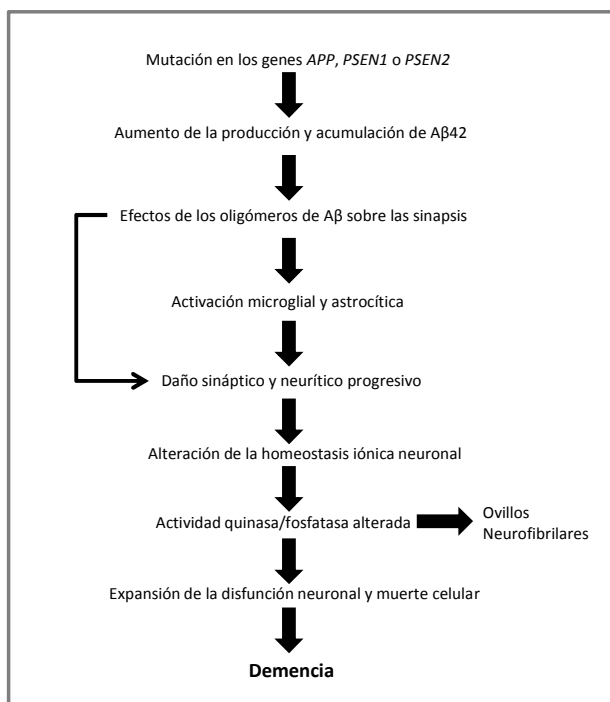


Figura 7. Hipótesis de la cascada amiloide. La flecha lateral izquierda indica que los oligómeros de A β además de activar microglía y astrocitos, también pueden dañar directamente las sinapsis y las neuritas de las neuronas neuronales. Modificada de Hardy y Selkoe, 2002.

Para ello se basaron en la presencia de la patología amiloide en el síndrome de Down, causado por una trisomía en la región del cromosoma 21 que contiene el gen *APP*. El síndrome

de Down cursa sin patología neurofibrilar por lo que concluyeron que no es necesaria la presencia de la proteína tau hiperfosforilada para el inicio de la enfermedad. Esta idea ha sido secundada durante años pero también ha causado bastante controversia.

1.7 *Tratamiento de la enfermedad de Alzheimer*

Actualmente no existe ninguna terapia ni curativa ni preventiva de la EA. Los objetivos clínicos en el tratamiento de la enfermedad son principalmente: (1) aliviar los síntomas cognitivos, (2) aliviar los síntomas comportamentales y psicológicos de la demencia y (3) ralentizar el progreso de la enfermedad. La farmacoterapia actual se centra principalmente sobre los sistemas colinérgico y glutamatérgico y sólo actúa frente a los síntomas, no evita el progreso habitual de la enfermedad.

1.7.1 *Inhibidores de la colinesterasa*

Uno de los principales neurotransmisores encontrados en el espacio sináptico de las neuronas, en regiones cerebrales encargadas de la memoria, es la acetilcolina. En el transcurso de la EA existe una pérdida importante de neuronas colinérgicas que conlleva a una disminución de la transmisión colinérgica (Mangialasche y col., 2010). Los inhibidores de la colinesterasa aumentan la transmisión sináptica colinérgica al inhibir a la enzima acetilcolinesterasa presente en la hendidura sináptica. De esta manera, disminuye la hidrólisis de acetilcolina que es liberada por las neuronas presinápticas. El primer fármaco inhibidor de la colinesterasa que se utilizó fue la tacrina pero actualmente no se utiliza por su descrita toxicidad a nivel hepático. Donezepil, rivastigmina y galantamina son los tres fármacos que se utilizan en la actualidad (Tabla 1).

1.7.2 *Antagonistas del receptor NMDA*

Los receptores NMDA son abundantes en las células piramidales del hipocampo y de la corteza (áreas relacionadas con la cognición, aprendizaje y memoria). El mecanismo implicado en el aprendizaje y memoria conlleva una LTP mediada por el neurotransmisor glutamato a través de la vía del receptor NMDA. La sobreactividad del receptor NMDA por una liberación excesiva de glutamato supone un aumento en la entrada de iones calcio en la célula que causan excitotoxicidad en las neuronas, evento que ha sido relacionado con los problemas de memoria

característicos de la EA (Wenk y col., 2006). La memantina es un antagonista específico, no-competitivo y de afinidad moderada del receptor NMDA (Tabla 1). La rápida cinética de la memantina disminuye la excitotoxicidad de la neurona inducida por el glutamato al mismo tiempo que permite las acciones fisiológicas del glutamato sobre el aprendizaje y la memoria (Witt y col., 2004).

Fármaco	Clase	Dosis (mg/día)	Administración (veces/día)	Absorción afectada por la comida	Metabolismo
Donezepil (Aricept)	Inhibidor de la colinesterasa	5-10	1	No	CYP2D6 CYP3A4
Rivastigmina (Exelon)	Inhibidor de la colinesterasa	3-12	2	Sí	No hepático
Galantamina (Reminyl)	Inhibidor de la colinesterasa	8-32	2	Sí	CYP2D6 CYP3A4
Memantina (Ebixa)	Antagonista del receptor NMDA	5-20	2	No	No hepático

Tabla 1. Fármacos utilizados en el tratamiento de los síntomas de la EA. Modificada de Chu, 2012.

1.7.3 Terapias emergentes

Actualmente, la mayoría de los tratamientos que se están investigando están basados en la hipótesis de la cascada amiloide. Las investigaciones que están en marcha trabajan en moduladores de secretasas, inmunoterapia, agentes anti-inflamatorios, antioxidantes y agentes neuroprotectores (Figura 8), enfocados sobre todo a intentar disminuir la carga de A β , la fosforilación de la proteína tau o ambos. Existen fármacos que pueden actuar sobre la proteína tau pero los intentos de disminuir la carga de A β tienen una tradición más larga.

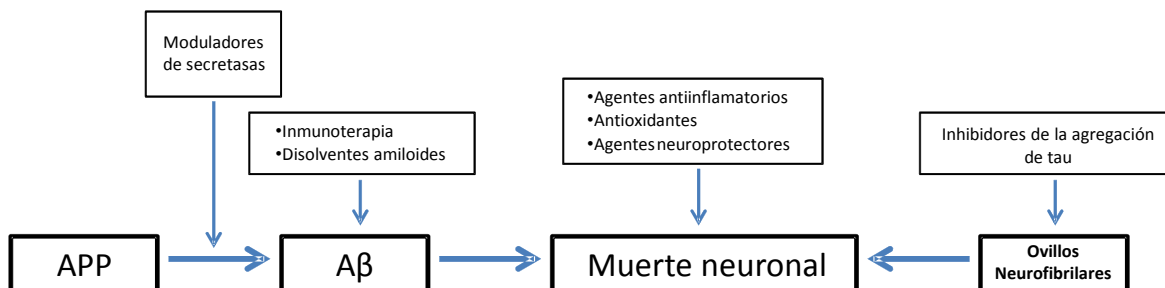


Figura 8. Estrategias y direcciones en la búsqueda de nuevos tratamientos que modifiquen el curso de la EA.

Estas son algunas de las estrategias curativas o neuroprotectoras sobre las que se está investigando:

-Disolventes de A β : se trata por ejemplo de amirapirazoles acilados oligoméricos (Rzepecki y col., 2004) o poli-L-lisinas (Nguyen y col., 2002). Existe un gran interés en la utilización de sustancias químicas que cambien la configuración de la proteína A β , impidan su depósito y faciliten su eliminación, pero estos productos tienen problemas ya que en general son sustancias polares, potencialmente tóxicas, que no penetran bien en el cerebro y que por tanto pueden no ser eficaces.

-Transportadores de A β : por ejemplo, el polietilenglicol. En animales experimentales ha mostrado capacidad de mejorar la acumulación de A β y el trastorno de la función neuronal que se produce tras el traumatismo craneal (Koob y Borgens, 2006).

-Vacunas: suponen la terapia más innovadora de la última década. Consiste en la estimulación del aclaramiento del péptido amiloide mediante la administración del antígeno A β (vacunación activa) o de anticuerpos anti-A β (vacunación pasiva). Han sido varias las vacunas que se han testado en investigación clínica durante los últimos años. La primera vacuna activa, la AN1762 (Fox y col., 2005), estaba compuesta de preagregados de A β junto con un coadyuvante inmunológico, el QS-21. Desafortunadamente este estudio debió de ser suspendido porque un 6% de los pacientes desarrollaron meningo-encefalitis. Sin embargo, pudo demostrarse que el procedimiento podría ser útil puesto que los pacientes que desarrollaron anticuerpos presentaron mejoría clínica. Más tarde aparecieron el Bapineuzumab, compuesto por anticuerpos dirigidos directamente contra la región terminal del A β , y el Solanezumab, que se componía de anticuerpos contra la región media del péptido amiloide. Bapineuzumab previene la acumulación de A β en pacientes con EA de leve a moderada y disminuye los niveles de la proteína tau fosforilada en el LCR (revisado en Panza y col., 2012). Sin embargo, muy recientemente se ha discontinuado el ensayo clínico de administración intravenosa de Bapineuzumab, que ya había alcanzado la fase 3, al no observar mejora cognitiva en los pacientes tratados al comparlos con aquellos a los que se les administró placebo.

-Terapia neuroprotectora y antioxidante: la profundización en las investigaciones sobre neuroprotección, así como la utilización de sustancias antioxidantes constituyen dos puntos clave en el futuro del tratamiento de la EA. De hecho, muchos han sido los ensayos clínicos realizados con factores neurotróficos. Muy recientemente se han publicado los resultados de un ensayo clínico de administración del factor de crecimiento nervioso (NGF: *Nerve growth factor*). En los últimos años han sido diferentes los ensayos realizados mediante la administración de insulina vía intranasal en pacientes con EA (Reger y col., 2006; Djupesland, 2008; Reger y col., 2008a; Reger y col., 2008b; Stein y col., 2011). Además, muy recientemente se han publicado los resultados de un ensayo clínico (Craft y col., 2012) en el que la insulina mejoraba la memoria y otros aspectos del deterioro cognitivo en individuos con EA. En este aspecto, la leptina, una hormona peptídica que ya se ha utilizado de manera exitosa en ensayos clínicos para el tratamiento de diferentes alteraciones metabólicas (Licinio y col., 2004; Lee y col., 2006; Brennan y Mantzoros, 2006), podría tener el potencial para actuar como una molécula neuroprotectora en la EA.

-Terapia génica: el campo de la terapia génica *in vivo* ha madurado hasta el punto de que existen ensayos clínicos usando esta estrategia en enfermedades neurológicas crónicas, como es el caso de la EA (Tuszynski y col., 2005), mediante la transferencia de genes terapéuticos. Este apartado será descrito en profundidad en el apartado 3.

1.8 *Modelos animales utilizados en el estudio de la enfermedad de Alzheimer*

El progreso en la investigación científica durante las últimas dos décadas ha permitido conocer genes responsables de la susceptibilidad a padecer EA, así como proteínas implicadas en el proceso de patogénesis de la enfermedad. Este hecho ha favorecido profundamente el desarrollo de modelos animales modificados genéticamente (ver <http://www.alzforum.org/res/com/tra> para el listado de los modelos disponibles actualmente) que juegan un papel fundamental a la hora de la caracterización de los mecanismos relacionados con la enfermedad y han estado al frente de la evaluación de nuevos enfoques terapéuticos.

Como la etiología de la EA esporádica es desconocida hasta la fecha, se ha confiado en la utilización de mutaciones genéticas asociadas a la EA familiar para la generación de modelos

animales. Este hecho se basa en que los eventos que ocurren a consecuencia de la mutación son similares en todas las formas de EA, independientemente del tipo de herencia. Aunque no existe un modelo animal que incluya todos los aspectos del espectro de la enfermedad, cada modelo permite el análisis profundo de uno o dos componentes de la enfermedad, hecho que no sería posible o ético con pacientes humanos.

Los ratones transgénicos que sobreexpresan APP desarrollan una patología que es muy similar a la que se encuentra en los cerebros de pacientes con EA. En el año 1995, el grupo del Dr. Games (Games y col., 1995) describió el primer ratón transgénico para APP (PDAPP) que desarrollaba placas amiloides a los 6-9 meses de edad. A partir de ese momento han sido muchos los modelos animales que se han ido desarrollando para la EA, siendo los más extendidos los modelos que expresan la patología amiloide. Las placas amiloides que encontramos en los ratones transgénicos para la EA son muy similares en estructura a las que encontramos en el cerebro humano y también son positivas para los colorantes Tioflavina-S y Congo Red.

En el presente trabajo se utilizó el modelo murino doblemente transgénico APP/PS1, que será descrito en profundidad en la sección de material y métodos.

2. LA LEPTINA

2.1 Aspectos generales

Entre los años 50 y 60, los laboratorios Jackson descubrieron dos cepas de ratón que tenían fenotipos muy similares: obesidad mórbida, resistencia a la insulina, infertilidad y aletargamiento. Estas dos cepas se llamaron "obesa" (*ob/ob*) y "diabética" (*db/db*) (Figura 9) y se conocía que la deficiencia de un sólo gen era responsable de su fenotipo. A principios de los años 70, Douglas Coleman desarrolló una serie de experimentos de parabiosis



Figura 9. Fotografía de un ratón obeso *db/db* (derecha) junto a un ratón normal (izquierda).

(experimentos que requieren la unión quirúrgica de dos ratones mediante anastomosis de la piel desde el hombro hasta la pelvis) y demostró que la cepa *ob/ob* era deficiente en un factor sanguíneo, mientras que *db/db* era deficiente en el receptor para ese factor (Coleman y Hummel, 1973; Coleman, 2010).

A mediados de los años 90, el gen de ratón *ob* fue clonado por el grupo de Jeffrey Friedman, descubriéndose que codificaba para una molécula con un papel crucial en la regulación del peso corporal y de la ingesta, a la que llamaron leptina, del griego, *leptos*, que significa delgado (Zhang y col., 1994). Un año más tarde, Tartaglia y colaboradores aislaron el gen del receptor de la leptina Ob-R (Tartaglia y col., 1995) y poco después se confirmó que la mutación *db/db* en el ratón estaba en el gen *Ob-R* (Chen y col., 1996; Lee y col., 1996).

La leptina es una hormona peptídica de 16 KDa producto del gen *ob*. La secuencia aminoacídica de la leptina, así como los datos cristalográficos (Zhang y col., 1997), indican que la leptina adopta una estructura helicoidal de 3 dimensiones similar a la de algunas citoquinas (Figura 10), como es el caso de la interleuquina-2.

La leptina es sintetizada principalmente por los adipocitos en el tejido adiposo blanco (Zhang y col., 1994), pero también se ha encontrado en placenta (Señaris y col., 1997), estómago (Bado y col., 1998) y cerebro (Wiesner y col., 1999), entre otros tejidos. La leptina modula la disponibilidad de energía metabólica (Schwartz y col., 2000), permite el almacenamiento o movilización de la grasa y es capaz de aumentar la sensibilidad a la insulina (Shimomura y col., 1999). Los roedores obesos, y posiblemente los humanos, son resistentes a la leptina, en algunos casos debido al programa genético o perinatal (resistencia primaria), pero normalmente aparece en respuesta a elevados niveles de leptina (resistencia secundaria). La resistencia secundaria causada por la leptina puede ser el resultado de un transporte reducido de leptina al cerebro o de una regulación a la baja de la señalización de la

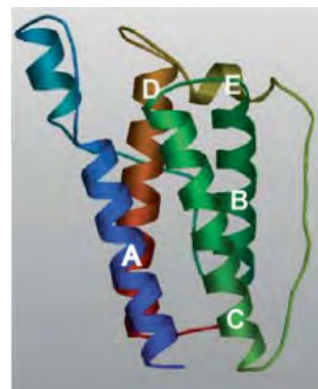


Figura 10. Diagrama de Ribbon que muestra las estructuras secundarias y terciarias de la leptina de ratón. El modelo tridimensional se realizó usando el programa ProMoodIII. Modificada de Denver y col., 2011.

leptina. La insulina y la leptina están estrechamente unidas; de hecho, ambas controlan directamente la actividad de los circuitos neuronales que dirigen los mecanismos de recompensa asociados a la comida (Konner y col., 2009).

2.2 *Receptores de la leptina*

Existen cinco isoformas de receptores de leptina (Ob-R, a-e). Los receptores Ob pertenecen a la familia de receptores interleuquina-6 pertenecientes a la superfamilia de receptores de citoquinas clase I (Lee y col., 1996). Existen tres agrupaciones estructurales de los receptores: cortos (Ob-Ra, c, y d), largos (Ob-Rb) y solubles (Ob-Re) (Hegyi y col., 2004) (Figura 11). Todas estas formas, excepto la Ob-Re, contienen dominios intracelulares truncados (34 aminoácidos de largo para Ob-Ra) comparados con la forma larga (Ob-Rb, 303 aminoácidos). Se piensa que muchas de las acciones fisiológicas de la leptina se deben a la forma larga del receptor de la leptina debido a su mayor habilidad para activar cascadas de señalización. Las formas cortas están menos implicadas en la señalización intracelular activada por la leptina pero en su lugar parecen importantes para mediar la transferencia de la leptina desde la periferia a través de la barrera hematoencefálica (BHE). Estas isoformas exhiben secuencias aminoacídicas intracelulares abreviadas, y tienen una pequeña capacidad de señalización intracelular (Bjorbaek y col., 1997; Fei y col., 1997). Ob-Ra es la isoforma corta mejor caracterizada y se expresa en riñón, pulmón, plexos coroideos y microvasos cerebrales (Tartaglia y col., 1995; Bjorbaek y col., 1997; Fei y col., 1997; Bjorbaek y col., 1998).

Además de los receptores específicos para la leptina, se ha descrito que el receptor multiligando LRP-2 o megalina también es capaz de unirse a la leptina en los plexos coroideos (Dietrich y col., 2008). La megalina también se encuentra presente en neuronas y su expresión está ampliamente distribuida en diferentes zonas cerebrales como la corteza, el hipocampo y el cerebelo (Alvira-Botero y col., 2010).

2.3 *Transporte de la leptina hacia el cerebro*

Se tienen evidencias de que la leptina se transporta hacia el cerebro mediante dos mecanismos distintos. Por un lado un sistema de transporte saturable permite a la leptina

atravesar la BHE mediante el mecanismo de transcitosis mediado por el receptor (Banks y col., 1996). Por otro, se cree que la leptina podría ser transportada hacia el cerebro a través del LCR (Schwartz y col., 1996), ya que en los plexos coroideos, principal lugar productor de LCR, se expresan altos niveles de Ob-Ra (Bjorbaek y col., 1998) y de megalina (Dietrich y col., 2008), receptores que median el transporte de leptina desde la sangre hasta el LCR.

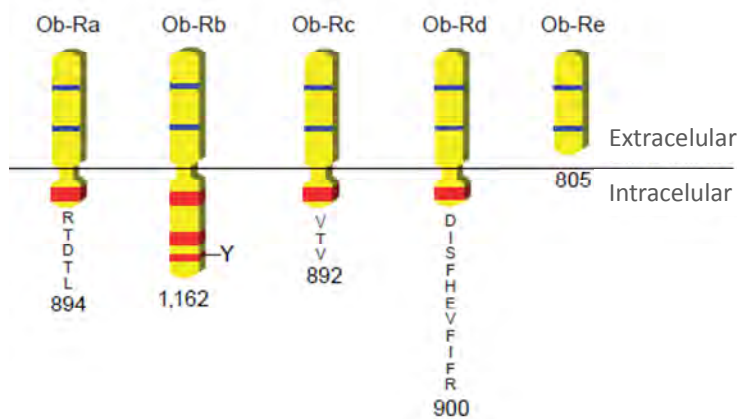


Figura 11. Isoformas del receptor de la leptina en ratones. Todos comparten dominios extracelulares de unión a ligandos idénticos pero difieren en el extremo C-terminal. Cuatro de las cinco isoformas tienen dominios transmembrana pero sólo el receptor Ob-Rb codifica para las proteínas capaces de activar la vía de señalización JAK-STAT3. La isoforma que queda, Ob-Re, está truncada. Las motivos de interacción de las JAK quininas están representados como rectángulos rojos anchos (Caja1) o estrechos (Caja2). Modificada de Friedman y col., 1998.

2.4 Vías de señalización de la leptina

El receptor de leptina largo Ob-Rb no tiene actividad enzimática intrínseca, pero da lugar a señales por medio de una asociación no covalente con la tirosin quinasa 2 (JAK2) de la familia de las JAK quininas (Ihle, 1995; Taniguchi, 1995). El receptor presenta en su dominio intracelular una secuencia rica en prolina denominada Caja1 y una zona entre los aminoácidos 31-36 conocida como Caja2 que permiten la interacción y activación de JAK2 (Figura 11). En las isoformas cortas del receptor de leptina esta Caja2 no se encuentra, lo que explica la falta de actividad de la leptina en animales *db/db*, que debido a una mutación, carecen de Ob-Rb y se procesa en su lugar Ob-Ra (Tartaglia, 1997; White y col., 1997).

La unión de la leptina al receptor altera la conformación del homodímero de Ob-Rb, permitiendo la transfosforilación y activación de las JAK2 intracelulares asociadas al Ob-Rb. La molécula JAK2 activada, fosforila entonces otros residuos tirosina del complejo Ob-Rb-JAK2 para mediar la cascada de señalización. Se ha descrito la existencia de 4 residuos tirosina (Tyr) en el dominio intracelular del Ob-Rb que son fosforilados y participan en la cascada de

señalización de leptina: Tyr¹¹³⁸, Tyr⁹⁸⁵, Tyr⁹⁷⁴ y Tyr¹⁰⁷⁷ (Li y Friedman, 1999; Kloek y col., 2002; Myers y col., 2008).

La activación del receptor de leptina pone en marcha diversas vías de señalización intracelular que se describen a continuación:

2.4.1 *Vía de señalización JAK-STAT3*

La unión de leptina a Ob-Rb activa JAK2, ocasionando la fosforilación de residuos específicos. La fosforilación de Tyr¹¹³⁸ es fundamental en la señalización del receptor ya que recluta el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) al complejo leptina-Ob-Rb-JAK2. De esta forma genera la fosforilación y la posterior translocación de STAT3 como dímero fosforilado al núcleo, para mediar la regulación de la transcripción de genes diana (Bendinelli y col., 2000; Munzberg y col., 2005). Entre los genes regulados por STAT3 está el supresor 3 de señalización de citoquinas (SOCS-3). La molécula SOCS-3 es miembro de la familia de proteínas con dominios SH2 (dominios que contienen sitios específicos de unión para residuos de tirosina fosforilados), y está compuesta por una región amino terminal variable, un dominio central SH2 y un dominio carboxilo terminal llamado caja SOCS. La señalización de la leptina puede ser bloqueada por SOCS-3 (Endo y col., 1997). De hecho, la hiperleptinemia que acompaña a la obesidad incrementa la expresión hipotalámica de SOCS-3 dando lugar a una reducción de la sensibilidad de leptina (Bjorbaek y col., 1999).

2.4.2 *Vía de señalización PI3K-Akt*

La insulina, al igual que la leptina, es una hormona que regula el estado energético de los animales. El receptor de insulina es un dímero, unido por un puente disulfuro, que consta de una subunidad α y una subunidad β . Cuando éste se une a la insulina, el receptor se autofosforila creando un sitio de unión para el sustrato del receptor de insulina (IRS) y el último activa a la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). La leptina puede mediar la fosforilación de IRS y regular la vía de señalización de PI3K (Harvey y col., 2000; Anderwald y col., 2002; Niswender y col., 2004; Ahima, 2005). Muchos estudios han demostrado que la leptina induce la activación de Akt mediante la su fosforilación en el residuo Ser⁴⁷³ (Attoub y col., 2000). La leptina también es

responsable de la activación de la serina/treonina quinasa de la vía del blanco de la rapamicina (mTORC1: *mammalian target of Rapamycin complex 1*) (Cota y col., 2006) a través de la vía PI3K-Akt (Hay y Sonenberg, 2004). mTORC1 es una quinasa conservada a lo largo de la evolución que modula la traducción de varios transcritos de ARN implicados en el crecimiento y proliferación celular. Se ha propuesto que la leptina actúa a través de esta vía en neuronas hipocampales afectando a la densidad filopodial (O'Malley y col., 2007).

2.4.3 Vía de señalización ERK

La señalización vía ERK (quinasas reguladas por señales extracelulares) está mediada en gran parte por el residuo Tyr⁹⁸⁵ del Ob-Rb, aunque también se ha descrito actividad de ERK independiente de la fosforilación del receptor que parece ser inducida vía fosforilación de tirosina de JAK2 (Banks y col., 2000; Bates y Myers, 2003). La fosforilación del residuo Tyr⁹⁸⁵ propicia la unión de SHP-2 que posteriormente se enlaza a GRB-2 y promueve la activación de la cascada de señalización ERK. Este es el primer paso de la vía de señalización canónica de las quinasas reguladas extracelularmente (ERK)-p21-ras (Banks y col., 2000). La activación de ERK por la leptina ha sido relacionada con la fosforilación ribosomal de la proteína S6 y su traducción. Se ha sugerido que esta vía es relevante para los efectos de la leptina a nivel periférico en relación a la función inmune (Fruhbeck, 2006) y a nivel central en el hipocampo en los procesos de LTP que implican a los receptores NMDA (Shanley y col., 2001).

2.4.1 Vía de señalización STAT5

Otra vía descrita es la que implica la fosforilación y la regulación transcripcional de STAT5 por la leptina y está mediada por el residuo Tyr¹⁰⁷⁷, aunque el residuo Tyr¹¹³⁸ también contribuye a la activación de STAT5 (Bjorbaek y Kahn, 2004; Ahima, 2005; Myers y col., 2008). Se ha sugerido que la vía JAK2-STAT5 estaría relacionada con procesos de angiogénesis (Fruhbeck, 2006).

En la figura 12 se muestra un esquema de las vías de señalización mediadas por el receptor Ob-Rb.

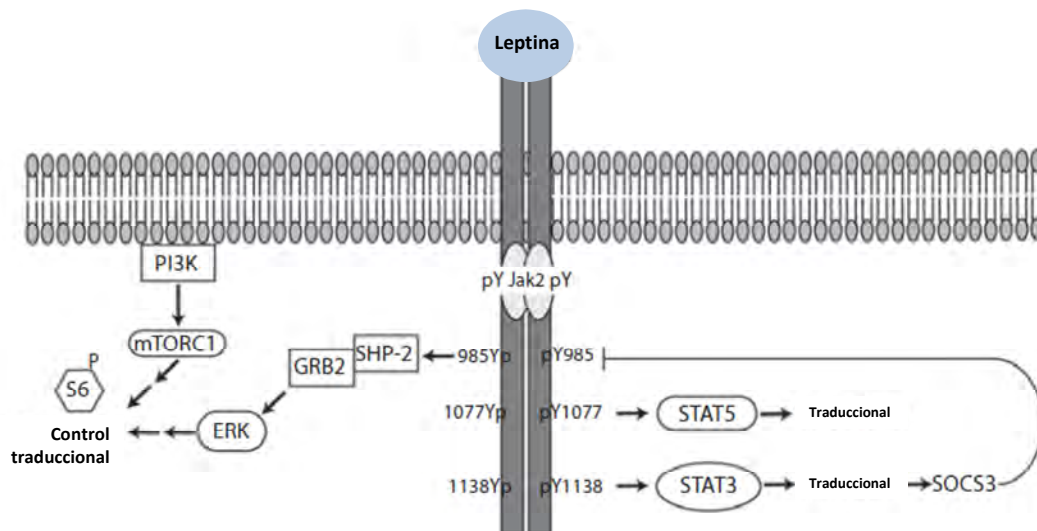


Figura 12. Vías de señalización de la leptina a través del receptor Ob-Rb. El receptor Ob-Rb forma un homodímero en la membrana. La leptina se une al dominio extracelular desencadenando un cambio conformacional en el receptor que activa JAK2, la cual fosforila (representado con una "p") 3 residuos muy conservados de tirosina dentro del dominio citoplasmático de Ob-Rb. Tyr⁹⁸⁵ (Y985) se requiere para la activación de la cascada SHP2/ERK que lleva a la fosforilación de la proteína ribosomal S6 y aumenta su traducción. Tyr¹⁰⁷⁷ (Y1077) se necesita para la señalización de STAT5, mientras que Tyr¹¹³⁸ (Y1138) media la señalización vía STAT3. La proteína STAT3 activa el gen SOCS3 para mediar la inhibición de la señalización vía Y985. El receptor Ob-Rb también activa la ruta PI3K mTORC1, pero el mecanismo no se conoce en su totalidad. Modificada de Denver y col., 2011.

2.5 Funciones de la leptina

La leptina se relaciona con una gran variedad de funciones. La obesidad severa en ratones *ob/ob* y *db/db*, deficientes en leptina o en su receptor, proporciona la primera evidencia de que esta hormona es un regulador importante del balance de energía, jugando un papel clave en un circuito de retroalimentación que permite al cerebro recibir la señal del estado de energía almacenada para poder realizar los ajustes adecuados para mantener una homeostasis en el organismo. La hiperfagia, la disminución del gasto energético y el amplio abanico de alteraciones hormonales permitieron demostrar el efecto de la leptina sobre el control de la ingesta, el gasto energético y sobre todos los ejes neuroendocrinos.

Muchos de los efectos de la leptina se producen por sus acciones a nivel del SNC. La leptina actúa a través de sus receptores en el hipotálamo para llevar a cabo las funciones de control del metabolismo energético (Zhang y col., 1994), lugar donde se observa el mayor nivel de expresión de ARN mensajero de Ob-Rb (Elmqvist y col., 1998; Schwartz y col., 2000; Myers y col., 2008). Pero además, también se han identificado receptores de la leptina, de gran importancia para este trabajo, en células de la corteza y el hipocampo (Couce y col., 1997; Elmquist y col., 1998; Shioda y col., 1998), regiones particularmente vulnerables en la EA.

Uno de los aspectos interesantes sobre las acciones periféricas de la leptina es su papel en el metabolismo de lípidos. La leptina juega un papel importante en la inhibición de la síntesis y el almacenamiento de lípidos (Unger y col., 1999; Ahima y Lazar, 2008). Esta regulación de los niveles celulares y distribución de los ácidos grasos y colesterol puede influir en la fluidez de la membrana lipídica y en la función y localización de los raft lipídicos, en un proceso que varía con la edad (Wood y col., 2002). Se ha especulado que las acciones lipolíticas de la leptina podrían ramificar los raft lipídicos de las membranas celulares afectando a la renovación del péptido A β (Fewlass y col., 2004).

2.6 *La leptina en la EA*

Existen multitud de evidencias que ponen de manifiesto la importancia de las rutas metabólicas en el curso de la EA. En primer lugar, diferentes estudios genéticos han establecido que portadores del alelo *APOE4* son mucho más susceptibles a padecer EA (Strittmatter y col., 1993). En segundo lugar, el efecto de la dieta y la nutrición sobre la prevalencia de EA ha sido bastante bien documentada (Grant, 1999, 2004) y la pérdida de peso se ha observado de manera frecuente en pacientes con EA antes del comienzo de la demencia (Barrett-Connor y col., 1996; Mazzali y col., 2002; Fitzpatrick y col., 2009). A todo esto se le suma el hecho de que la obesidad está asociada con un aumento del riesgo de sufrir demencia (Beydoun y col., 2008; Whitmer y col., 2008). En tercer lugar, en cultivos celulares y en modelos animales se ha demostrado que los lípidos juegan un importante papel en las rutas amiloidogénicas (Puglielli y col., 2003). En cuarto lugar, la mayoría de los pacientes de EA sufren de alguna forma de resistencia a la insulina o hiperinsulinemia o de diabetes tipo II (Fishel y col., 2005). Por último, existen evidencias de que los niveles de la hormona leptina están atenuados en estos pacientes

(Power y col., 2001; Lieb y col., 2009). Por todos estos motivos no es sorprendente que moduladores del colesterol como las estatinas (Sparks y col., 2006), o de la glucosa, como la rosiglidazona (Risner y col., 2006) o la insulina (Craft y col., 2012), se estén desarrollando como potenciales agentes terapéuticos frente a la EA.

Recientemente se han revisado los efectos terapéuticos que potencialmente podría tener la leptina en los diferentes eventos patológicos que tienen lugar en la EA (Carro, 2009) y a continuación se describen en detalle:

2.6.1 *Efectos de la leptina sobre factores que se ven alterados en la EA*

2.6.1.1 *Plasticidad neuronal*

Existen datos que revelan la participación de la leptina en la función de la memoria a través de mecanismos inductores de la sinapsis (Harvey y col., 2005). Además, el grupo de Shanley y colaboradores (Shanley y col., 2001) demostró que la administración de leptina convierte la potenciación a corto plazo de la transmisión sináptica en LTP en la región CA1 del hipocampo mediante la activación de la función de los receptores NMDA a través de las cascadas de señalización de PI3K y ERK. De hecho, los ratones *db/db* que no expresan receptores funcionales de la leptina, muestran afectaciones en LTP y LTD (Li y col., 2002). En otro estudio se observó que las proyecciones neuronales desde el núcleo arcuato del hipotálamo se bloquearon de forma permanente en ratones *ob/ob*, pero el tratamiento con leptina durante el periodo neonatal revirtió estas alteraciones neuroanatómicas (Bouret y col., 2004). Complementando estos resultados se observó que el número de sinapsis excitadoras e inhibitoras en el núcleo arcuato de ratones *ob/ob* fue también diferente al de ratones control, y la aplicación sistémica de leptina normalizó la densidad sináptica (Pinto y col., 2004). También se han observado concentraciones elevadas de proteínas sinápticas, como la sinapsina y la sinaptofisina, después de un tratamiento crónico con leptina durante las dos primeras semanas de vida de ratas neonatales (Walker y col., 2007). Por otro lado, el grupo de O'Malley y colaboradores (O'Malley y col., 2007) demostró que en neuronas hipocampales la leptina aumentaba la motilidad y la densidad de los filopodios dendríticos y que estos cambios estaban asociados con la formación de nuevas conexiones sinápticas (O'Malley y col., 2007).

Existen distintas investigaciones que sugieren que cambios en la dinámica de la actina también están involucrados en la plasticidad sináptica dependiente de la actividad hipocampal (Dillon y Goda, 2005). También se ha sugerido que el remodelamiento estructural de las dendritas y/o las sinapsis es un mecanismo implicado en la LTP hipocampal (Yuste y Bonhoeffer, 2001). En las sinapsis de la región CA1 del hipocampo durante la fase de inducción de la LTP, la leptina liberada de los adipocitos entra en el cerebro, probablemente actuando en concierto con la leptina local para incrementar la LTP promoviendo cambios rápidos en la morfología dendrítica hipocampal e induciendo despolarización de las células (Moult y col., 2009).

2.6.1.2 *Amiloidogénesis*

Se ha postulado que la leptina es capaz de modular la generación de A β a través de una vía bidireccional: (1) reduciendo sus niveles extracelulares a través de la disminución de la actividad de BACE, posiblemente mediante la alteración de la composición lipídica de la membrana de los rafts lipídicos; y (2) aumentando la captación de A β dependiente de ApoE (Fewlass y col., 2004). Experimentalmente se ha observado que la leptina es capaz de reducir los niveles de A β tanto *in vitro* (en neuroblastoma de ratón) como *in vivo* (en ratones transgénicos APP/PS1) (Fewlass y col., 2004). Recientemente se ha confirmado que la leptina tiene la habilidad de reducir los niveles de A β en dos estudios diferentes, uno llevado a cabo por el grupo de Greco y colaboradores (Greco y col., 2010) en el ratón transgénico TgCRND8, tras 8 semanas de tratamiento utilizando una bomba subcutánea de administración de leptina; y otro realizado sobre secciones organotípicas de cerebro de conejo que eran tratadas con dicha hormona (Marwarha y col., 2010).

2.6.1.3 *Fosforilación de tau*

También se ha observado que la leptina es capaz de reducir la fosforilación de tau (Greco y col., 2008). En este estudio la fosforilación de tau fue valorada tras el tratamiento de células neuronales con leptina e insulina y se observó que tanto la leptina como la insulina inducían una reducción de la fosforilación de tau que era dependiente de la concentración y el tiempo, siendo ambas moléculas sinérgicas a concentraciones subóptimas. De forma significativa la leptina fue 300 veces más potente que la insulina en este estudio.

Los hallazgos *in vitro* a partir de cultivos primarios neuronales sugieren que la activación de la proteína quinasa activada por AMP α (AMPK α) mediada por la leptina es la que induce la reducción de la fosforilación de tau implicada en la patogenia de la EA (Greco y col., 2009). Esta enzima también es conocida por su interacción con la GSK3 β que potencialmente puede fosforilar los epítomos susceptibles de fosforilación. Aunque un gran número de quinasas y fosfatasas regulan la fosforilación de tau, GSK3 β es la principal quinasa de tau *in vivo* (Lovestone y col., 1996; Billingsley y Kincaid, 1997) y es activada por A β (Hoshi y col., 1996). Además está descrita la inhibición de la fosforilación de tau a través de la inactivación de GSK3 β por Akt (Hooper y col., 2008). También se ha descrito la acción de la leptina sobre la fosforilación de tau, mediada por la 5-aminoimidazol-4-carboxi-amide ribonucleoside (AICAR) (Greco y col., 2008; Greco y col., 2009).

2.6.1.4 *Neurogénesis adulta*

El SNC en el adulto tiene la capacidad de generar nuevas neuronas de una manera constitutiva a lo largo de la vida. A este proceso se le conoce como neurogénesis adulta. Siempre se había creído que la neurogénesis tan sólo ocurría durante el desarrollo del cerebro, pero en los años 60, estudios pioneros llevados a cabo por Altman y Das (Altman y Das, 1965), proporcionaron evidencias de que nuevas neuronas se podían generar en el cerebro adulto. Bajo condiciones fisiológicas, la zona subgranular (ZSG) del giro dentado y la zona subventricular (ZSV) de los ventrículos laterales, son las únicas zonas neurogénicas que se conocen en el cerebro adulto. En la ZSG, las nuevas neuronas migran a la capa de células granulares del giro dentado proyectando sus axones hacia la región CA3 del hipocampo, donde se integran en el circuito neuronal desarrollando sus propiedades electrofisiológicas y actuando como células maduras y funcionales (Kempermann y col., 2004). En la ZSV, los neuroblastos maduran en su camino hacia el bulbo olfatorio, a través de la vía migratoria rostral, para diferenciarse en interneuronas (Carleton y col., 2003).

Está descrito que la leptina facilita el aprendizaje espacial y la memoria (Li y col., 2002; Farr y col., 2006; Oomura y col., 2006) y se ha propuesto que la neurogénesis adulta podría ser un mecanismo mediador del aprendizaje dependiente del hipocampo (Shors y col., 2001; Shors y col., 2002). En el año 2008, el grupo de Garza y colaboradores (Garza y col., 2008) observaron

que la leptina administrada intraperitonealmente aumentaba la producción de nuevas neuronas en el giro dentado de ratones adultos y también en células progenitoras adultas del hipocampo en cultivo. Debido a que la inhibición de las señales de transducción PI3K-Akt y JAK-STAT3 en células progenitoras adultas hipocampales conducía a una atenuación de los efectos de la leptina sobre la proliferación celular en el hipocampo adulto, se sugirió que las acciones de la leptina podían estar mediadas por mecanismos dependientes de la activación de las vías PI3K-Akt o JAK2-STAT3. Estos resultados corroboran lo expuesto en otros estudios en los que se indicaba que la vía PI3K-Akt transduce señales intracelulares que controlan la proliferación celular de neuronas progenitoras hipocampales (Wang y col., 2006; Peltier y col., 2007).

2.6.1.5 Neuroprotección

Diversos estudios han proporcionado evidencias notables de las propiedades neuroprotectoras de la leptina y han apuntado hacia las posibles aplicaciones terapéuticas relacionadas con el daño neuronal y la neurodegeneración. Un estudio *in vitro* (Zhang y col., 2007) mostró que la leptina atenuó la muerte apoptótica neuronal inducida mediante la privación de oxígeno y glucosa al mismo tiempo. Los autores de este estudio demostraron a través de un modelo animal de isquemia cerebral que la leptina reducía de forma significativa el volumen de la zona infartada. En un estudio similar, el mismo grupo investigó los posibles efectos neuroprotectores de la leptina sobre neuronas dopaminérgicas usando modelos de la enfermedad de Parkinson (Weng y col., 2007) y encontraron que la toxicidad de la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) sobre la línea celular dopaminérgica de ratón MN9D, se atenuaba de forma significativa tras el tratamiento con leptina. Este efecto de rescate de la leptina también se puso de manifiesto con la reducción significativa de las alteraciones comportamentales inducidas por la 6-OHDA. Los resultados de estos estudios son muy interesantes porque indican que en modelos animales de daño isquémico del SNC y de neurodegeneración, la administración de leptina tiene un carácter neuroprotector y sugiere que la leptina podría tener un efecto beneficioso sobre el SNC.

3. TERAPIA GÉNICA LENTIVIRAL

3.1 Generalidades de la terapia génica

La terapia génica consiste en la inserción de genes funcionales en el genoma de un individuo. El principio de la terapia génica no está limitado al reemplazamiento de un gen defectuoso por uno funcional, sino que describe cualquier transferencia de ácido nucleico para tratar o prevenir enfermedades al mismo tiempo que proporciona muchas ventajas frente a otras estrategias terapéuticas convencionales, como el tratamiento a largo plazo de células afectadas en después de una simple aplicación. A lo largo de los años se han desarrollado diferentes sistemas de terapia génica que incluyen vectores virales, vectores sintéticos no virales, como el ácido desoxirribonucleico (ADN) desnudo y liposomas catiónicos (Li y Huang, 2000), sistemas híbridos sintéticos-virales (Kaneda y Morishita, 1999) y la introducción de células manipuladas *ex-vivo* con genes terapéuticos (Tuszynski y col., 2005).

El factor limitante para la inserción exitosa de genes utilizando vectores virales, es la capacidad de transferir de manera eficiente el gen terapéutico deseado en el tejido diana. Los diferentes vectores virales que se han desarrollado, sus ventajas y sus desventajas, se recogen en la tabla 2.

Vector	Tamaño Inseto (Kb)	Expresión	Ventajas	Desventajas
Virus Adeno-Asociado	4.5	Estable	Baja inmunogenicidad; se integra; transduce células postmitóticas	Pequeña capacidad de clonación
Adenovirus	36	Transitoria	Elevada titulación viral; amplio rango de células huésped; transduce células postmitóticas	Inmunogenicidad; no se integra; expresión a corto plazo
Retrovirus	8	Estable	No respuesta inmune contra el vector; se integra	Baja titulación viral; transduce sólo células mitóticas; expresión variable
Lentivirus	8	Estable	Transduce células postmitóticas; alta eficiencia de traducción	Riesgo biológico potencial
Virus Herpes simplex	<30	Estable	Gran capacidad de clonación; transduce células postmitóticas; amplio rango de células huésped	Preocupaciones de seguridad; Expresión a corto plazo; posible inmunogenicidad
Virus Vaccinia	186	Transitoria	Alta expresión; el mejor para estrategias de inmunización	Sólo transduce células postmitóticas; preocupaciones de bioseguridad

Tabla 2. Caracterización de los vectores virales usados en terapia génica. Modificado de Nanou y Azzouz, 2009.

Los vectores que más comúnmente se utilizan en ensayos clínicos de terapia génica son los adenovirus recombinantes y los retrovirus, seguidos de cerca por distintas formas de vectores no virales (Tabla 3).

Vector	Ensayos clínicos de terapia génica (%)
Vector viral	
Adenovirus	25
Retrovirus	22,6
Virus Vaccinia	4,9
Poxvirus	4,5
Virus Adeno-asociado	4
Virus Herpes simplex	3,2
Virus poxvirus + virus vaccinia	2
Lentivirus	0,8
Flavivirus	0,6
Adenovirus-retrovirus	0,2
Vector no viral	
ADN desnudo	18,1
Lipofección	7,6
Transferencia de ARN	1,4
Gen pistola	0,4

Tabla 3. Resumen de los vectores utilizados en ensayos clínicos de terapia génica. Modificado de *Gene therapy trials Worldwide* (2008).

3.2 *Lentivirus*

Los lentivirus son miembros de la familia viral *Retroviridae* (retrovirus que están caracterizados por el uso de la retrotranscriptasa inversa y la integrasa para la inserción estable de la información genómica viral en el genoma del huésped). El genoma lentiviral es una cadena de ácido ribonucleico (ARN) simple de aproximadamente 9,7 Kb que codifica, por orden de orientación, secuencias cis-acting para el empaquetado, transcripción inversa, localización nuclear e integración, así como 9 genes que codifican para distintos tipos de proteínas. Hay genes que codifican para proteínas estructurales (*gag*, *pol* y *env*) que son comunes para todos los retrovirus, para proteínas reguladoras (*rev* y *tat*) esenciales para la replicación del virus, y para proteínas accesorias (*vpu*, *vpr*, *vif* y *nef*) que no son cruciales para su desarrollo *in vitro* pero sí para su replicación *in vivo* y para su patogenicidad. Los lentivirus son capaces de integrarse tanto en células mitóticas como en células post-mitóticas. El hecho de que sean capaces de integrarse en células post-mitóticas, como es el caso de las neuronas, es lo que convierte a los lentivirus en una herramienta de interés clínico para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Los virus pertenecientes al género *Lentivirus* están presentes en primates, como el HIV (virus de la inmunodeficiencia humana) o el SIV (virus de la inmunodeficiencia simia); o especies no primates como el EIAV (virus de la anemia infecciosa equina), el FIV (virus de la inmunodeficiencia felina) o el BIV (virus de la inmunodeficiencia bovina).

Los primeros sistemas de transferencia génica recurrieron a vectores HIV-1 que habían sido inactivados para la replicación, para estudiar diferentes aspectos del ciclo vital de los virus (Page y col., 1990; Parolin y col., 1994). El punto clave llegó con la construcción de vectores que eran capaces de transducir células neuronales no-mitóticas y expresar de manera estable y eficiente el gen terapéutico (Naldini y col., 1996; Blomer y col., 1997). Sin embargo, su uso contemplaba gran preocupación ya que estos vectores derivan directamente de virus humanos altamente patogénicos. Por este motivo se ha trabajado intensamente sobre el genoma del lentivirus para dotar a estos vectores retrovirales de nuevas características que incrementen su bioseguridad. La primera generación de los vectores lentivirales estaba constituida por 3 plásmidos, en los cuales las funciones de empaquetado estaban proporcionadas por un plásmido que codificaba para la envoltura (*env*) y un plásmido que expresaba para todas las pautas de lectura menos *env*, bajo el control del promotor del citomegalovirus (CMV). El vector de transferencia estaba formado por una construcción flanqueada con repeticiones largas terminales (LTRs) y otras secuencias necesarias para el transporte del ARN viral en las células productoras (el elemento de respuesta a Rev, RRE), el empaquetado del genoma y la transcripción inversa. En los plásmidos empaquetadores de segunda generación se eliminaron la mayoría de los genes accesorios (*vif*, *vpr*, *vpu* y *nef*) y sólo se mantuvieron *tat* y *rev* (Zufferey y col., 1999), mientras que en la tercera generación, *tat* también fue eliminado y *rev* era proporcionado por un cuarto plásmido. Por lo tanto, la tercera generación de vectores lentivirales conservan sólo 3 de los 9 genes del HIV-1 y están constituidos por un sistema de 4 plásmidos en lugar de 3 (Dull y col., 1998) (Figura 13), sistema que ofrece grandes ventajas al salvar problemas de riesgo biológico.

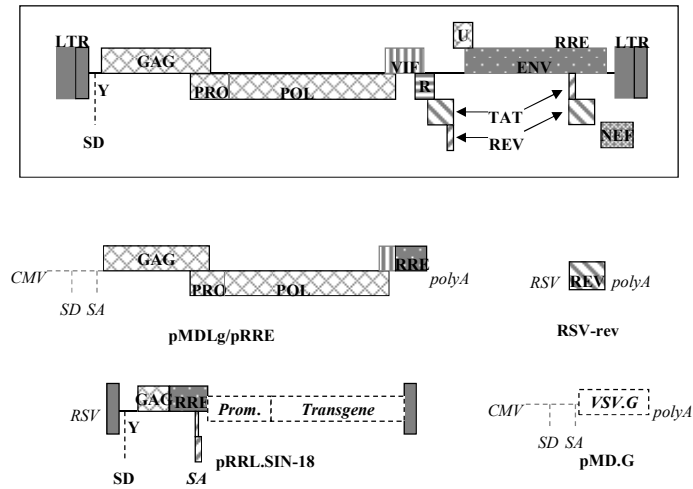


Figura 13. Dibujo esquemático del provirus HIV (arriba) y de las 4 construcciones utilizadas para crear un vector lentiviral de tercera generación (abajo). Modificado de Dull y col., 1998.

OBJETIVOS

Numerosos estudios han puesto de relieve una clara asociación entre la obesidad y la incidencia de la EA. También gran cantidad de estudios han propuesto la hipótesis de que la alteración de la funcionalidad de la leptina representaría un vínculo entre la obesidad y la EA. La leptina es una hormona con multitud de funciones generalizadas tanto a nivel central como periférico y posee la capacidad de regular numerosas funciones en el SNC. En particular, se ha demostrado que la leptina juega un papel fundamental en la modulación de funciones cognitivas superiores como la memoria y el aprendizaje. Por otra parte, cada vez son más claras las evidencias que indican que la leptina previene la acumulación tóxica de A β y tau fosforilada en las neuronas, y posee la capacidad para mejorar el rendimiento en las distintas tareas de memoria en modelos murinos de la EA. Estos hallazgos, junto con la inocuidad de la leptina en los seres humanos, hacen de esta hormona u otras moléculas miméticas, un nuevo candidato terapéutico para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la EA. Sin embargo, todavía no están claros muchos de los mecanismos moleculares implicados en las acciones neuroprotectoras de la leptina.

Por todo ello, el principal objetivo de este trabajo ha sido **estudiar los posibles efectos neuroprotectores de la leptina sobre los eventos asociados con la patología de la EA**, enfocando el estudio en la eficacia de la terapia génica y los mecanismos y vías de señalización implicados. Para ello se realizarán diversas aproximaciones *in vitro* y como modelo *in vivo* de amiloidosis utilizaremos los ratones transgénicos APP/PS1.

En concreto, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Evaluación la eficacia de la terapia génica como vía de administración central de leptina:
 - a. Construcción y generación del vector lentiviral HIV-leptina
 - b. Análisis de la expresión de leptina recombinante mediada por el HIV-leptina *in vitro* e *in vivo*.
2. Estudio de los efectos de la leptina sobre las alteraciones en el comportamiento y memoria características de los ratones APP/PS1.

OBJETIVOS

3. Valoración de los efectos de la leptina sobre marcadores patológicos característicos del modelo animal de amiloidosis, los ratones APP/PS1:
 - a. Estudio de la acumulación de A β en el cerebro de los ratones APP/PS1
 - b. Estudio de los efectos de la leptina sobre la respuesta inflamatoria: activación de astrogliá y microglía.

4. Evaluación de los efectos moduladores de la leptina sobre la plasticidad neuronal en modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* de amiloidosis:
 - a. Valorar los efectos de la leptina sobre la modulación de las sinápsis.
 - b. Determinar los efectos de la leptina sobre la neuritogénesis.

5. Estudio de los efectos neuroprotectores de la leptina en el modelo animal de amiloidosis APP/PS1:
 - a. Estudio de los efectos sobre la degeneración celular
 - b. Estudio de los efectos sobre la muerte celular.

6. Valoración de los efectos neurogénicos de la leptina en modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* de amiloidosis: efectos sobre la proliferación y diferenciación celular.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. GENERACIÓN DEL LENTIVIRUS QUE SOBREENPRESA LEPTINA

Para llevar a cabo los experimentos *in vivo* se desarrolló un vector lentiviral de tercera generación a partir de modificaciones del HIV-1. La producción viral se llevó a cabo por transfección transitoria y posterior empaquetado de los virus en células 293T, una línea de células epiteliales renales humanas transformadas que permiten la replicación episomal de los plásmidos y de la región del promotor. Por último, la concentración de dichas partículas virales se llevó a cabo por ultracentrifugación.

Para el proceso de transgénesis se necesitaron las siguientes construcciones plasmídicas:

- plásmido-REV: comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína Rev del virus del Sarcoma de Rous. Esta proteína promueve la acumulación citoplásmica de los transcritos virales.

- plásmido-RRE: comprende la secuencia de nucleótidos que codifica cualquier elemento de respuesta a Rev, de tal modo que el gen exprese y produzca nuevas partículas virales. En definitiva, este plásmido activa a Rev.

- plásmido-VSV: comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la envuelta del virus de la estomatosis vesicular (VSV). Es el plásmido encargado de la envuelta viral.

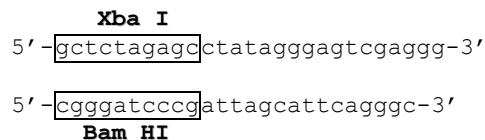
-plásmido de transferencia génica: en nuestro caso, el plásmido que contiene la secuencia aminoacídica de la leptina murina.

1.1 Construcción del plásmido de transferencia de leptina

Para la construcción del plásmido codificante de la proteína leptina de origen murino se partió del plásmido pMET7-SIgK-HA-mouse leptin (Figura 14) que fue donado por el Dr. Lennart Zabeau (Universidad de Ghent, Bélgica) y que contiene el ADN codificante (ADNc) de la leptina murina. El ADNc del plásmido se extrajo mediante su digestión por las enzimas EcoRI y XbaI y posteriormente se amplificó por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la

MATERIAL Y MÉTODOS

siguiente pareja de oligonucleótidos que incluyen los sitios de restricción XbaI y BamHI en los extremos 5' y 3' respectivamente:



La PCR se realizó en el termociclador Advanced primus 96, siguiendo el siguiente protocolo de ciclos: 1 ciclo de desnaturalización durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos para la amplificación del ADNc diana (desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, hibridación a 68°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 30 segundos) y un ciclo de extensión final a 72°C durante 10 minutos.

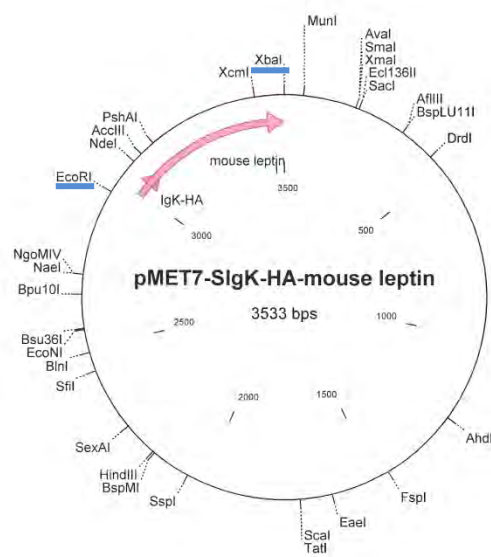


Figura 14. Mapa del plásmido pMET7-SIgK-HA-mouse leptin. Se muestran los sitios de restricción EcoRI y XbaI subrayados en azul. SIgK: señal universal de la inmunoglobulina Kappa/ péptido de secreción. HA: hemaglutinina.

Los productos de la PCR se separaron en geles de agarosa del 1,5 al 2,5% con bromuro de etidio y se visualizaron bajo un iluminador ultravioleta. Estos productos se digirieron con las enzimas de restricción XbaI y BamHI para ser clonados en el vector pRRLsin18.PPT.CMV.eGFP.Wpre (Figura 15), previamente digerido con las enzimas XbaI y

BamHI. Tras la ligación de los extremos con la ligasa T4 se obtuvo el plásmido de leptina pRRLsin18.PPT.CMV.HA-LEPTIN.eGFP.Wpre (Figura 16). El plásmido vacío pRRLsin18.PPT.CMV.eGFP.Wpre, sin el inserto de leptina, fue utilizado para generar el vector que se utilizó como control en todos los experimentos.

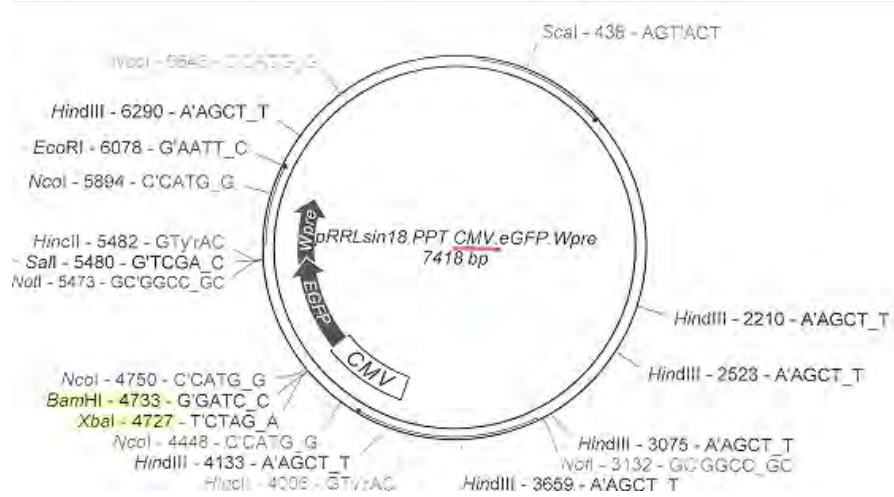


Figura 15. Mapa del plásmido pRRLsin18.PPT.CMV.eGFP.Wpre. Se muestran sobre fondo amarillo los sitios de restricción Xba I y BamHI

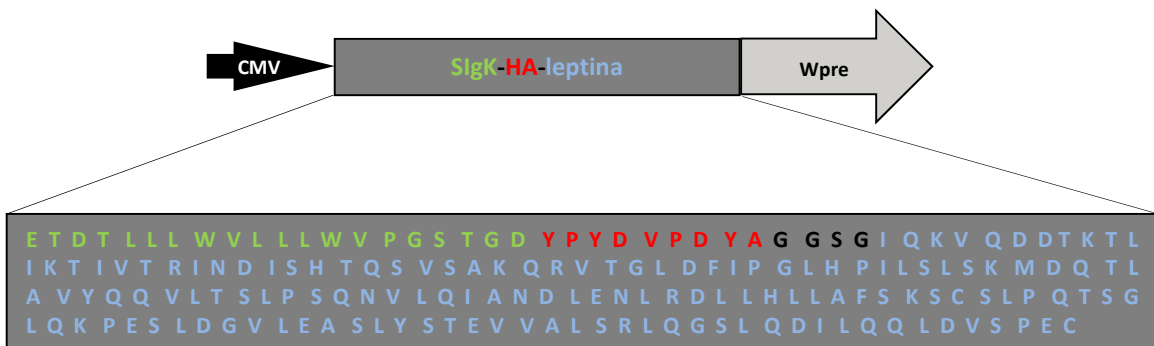


Figura 16. Esquema de la construcción responsable de la expresión de leptina en el plásmido de transferencia. De izquierda a derecha: CMV es el promotor del Citomegalovirus; Sigk-HA-leptina es la secuencia aminoacídica de la leptina recombinante: en verde la cadena kappa de la inmunoglobulina de ratón, en rojo los residuos correspondientes a la hemaglutinina (HA) y en azul los de la leptina de *Mus musculus*; Wpre es un elemento postregulador del virus de la hepatitis.

1.2 *Producción de los vectores lentivirales: HIV-leptina y HIV-vv*

Para la producción de los lentivirus se utilizó el sistema de transfección de 4 plásmidos descrito previamente por Dull y colaboradores (Dull y col., 1998). El plásmido de interés (de leptina o vacío, 13 µg), el de la envoltura (3,75 µg) y los plásmidos empaquetadores (13 µg de RRE y 3,5 µg de REV) se cotransfectaron con CaCl en células 293T embrionarias de riñón humano cultivadas en el medio *Dubelcco's modified Eagle medium* (DMEM, Lonza) suplementado con el 10% de suero fetal bovino (FBS: *fetal bovine serum*), glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 µg/ml. El medio fue sustituido 24 horas después. Finalmente el medio se recogió a las 24 horas siguientes para ser aclarado mediante una ultracentrifugación a 19000 revoluciones por minuto (rpm) durante de 90 minutos y concentrado unas 100 veces a través de una nueva ultracentrifugación a 19000 rpm durante 90 minutos. El *pellet* se resuspendió en tampón fosfato salino (PBS: *phosphate buffered saline*) 1X al 1% en albúmina de suero bovino (BSA: *bovine serum albumin*) y la suspensión viral se almacenó a -80°C hasta el día de su utilización. La titulación viral se determinó mediante un ensayo ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*).

Se obtuvieron así los vectores lentivirales HIV-leptina, responsables de la expresión de leptina recombinante, y los vectores HIV-vv, vacíos, que se utilizaron como control en todos los experimentos.

2. ENSAYOS IN VITRO

2.1 *Cultivo primario de neuronas*

Los cultivos primarios de neuronas corticales e hipocampales se realizaron a partir de embriones de ratas Wistar de 17-18 días. La rata preñada fue sacrificada con CO₂ y sometida a cesárea para la extracción de los embriones. Seguidamente se procedió a la extracción de los cerebros de los embriones a los que se les retiraron las meninges para la posterior disección de la corteza y del hipocampo. Las secciones corticales por un lado y las hipocampales por otro, se incubaron durante 5 minutos en medio Neurobasal (GIBCO™) a 37°C y las células se

disgregaron de forma mecánica utilizando una pipeta *Pasteur* de vidrio a la que se le había redondeado la punta con ayuda de una llama. Las células disgregadas se recogieron por centrifugación a 900 rpm durante 5 minutos. Tras la centrifugación se retiró cuidadosamente el sobrenadante y el *pellet* de células fue resuspendido en medio Neurobasal suplementado con 10% de B27 (GIBCO™), glutamina 0.5 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de streptomycin y fueron sembradas en placas que habían sido recubiertas previamente con poli-L-lisina (1 mg/ml, Sigma-Aldrich). Se utilizaron placas de 6 pocillos para sembrar células con propósitos de análisis de proteínas a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/cm² y placas de 24 pocillos con cubreobjetos circulares para células con fines inmunohistoquímicos a una menor densidad (5×10^4 células/cm² para estudios de análisis de neuritas y 2×10^5 células/cm² para estudios de neurogénesis). Los cultivos fueron mantenidos a 37°C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂ y cultivados durante 7 días antes de la experimentación (Figura 17).

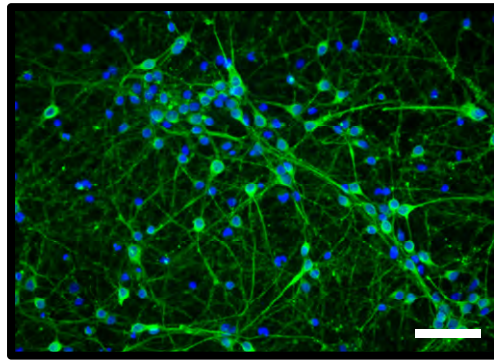


Figura 17. Cultivo primario de neuronas corticales de 7 días. Las células están marcadas con β III-tubulina (verde) y DAPI (azul, núcleos celulares). Barra de calibración = 50 µm.

Las neuronas cultivadas durante 7 días fueron tratadas con leptina (100 nM; Sigma-Aldrich), con el péptido A β -42 en su forma oligomerizada (5 µg/ml; AnaSpec, Inc.), con 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU; 50 µg/mL, Sigma-Aldrich) para estudios de neurogénesis, y con Cucurbitacina I (0,1-10 nM; Calbiochem) para estudios de inhibición de STAT3.

2.2 *Transfección del vector lentiviral en cultivo primario de neuronas*

Para la transfección, el medio Neurobasal que contenía las partículas lentivirales (1 ó 10 µg/ml) y polibreno (8 µg/ml; Sigma, St. Louis, MO), fue añadido a las neuronas corticales que

habían estado 7 días en cultivo. El polibreno es un polímero de carga positiva que facilita la unión de los vectores virales a las células. El medio fue sustituido parcialmente tras 2-3 horas de incubación y totalmente a las 24 horas. Las células fueron incubadas otras 24 horas más y finalmente lisadas para el análisis de proteínas según indica el apartado 2.3.

2.3 Preparación de muestras para el análisis de proteínas

Las neuronas se recogieron utilizando un rascador de células en el tampón de lisis (NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM, EDTA 5 mM, glicerol 10% y Nonidet P40 1%) suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (*Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail*, Roche). Los lisados se centrifugaron durante 10 minutos a 12.000 rpm a 4°C y los sobrenadantes se conservaron para el análisis de proteínas por *Western-blot* (apartado 3.8.2).

2.4 Estudio de la neurogénesis en cultivos primarios de neuronas

Para el estudio de la neurogénesis *in vitro* las neuronas se sembraron en placas de 24 pocillos con cristales cubreobjetos circulares, a una densidad de 2×10^5 células/cm² y se cultivaron durante 7 días. A continuación, se realizaron los tratamientos con leptina (100 nM), oligómeros de A β -42 (5 μ g/ml) o con ambas moléculas, durante distintos tiempos. Se realizaron tratamientos de 72 horas para el estudio de la proliferación celular y otros más largos, de 7 y 14 días, para el estudio de la supervivencia de las células que habían proliferado (Figura 18). Se utilizó el BrdU, un nucleótido sintético análogo a la timidina que se incorpora al ADN de las células que entran en división, que se añadió a los cultivos durante 48 horas a una concentración de 50 μ g/ml (Figura 18). Durante los tratamientos las neuronas fueron mantenidas con un 2% de B27 y al final de los mismos las neuronas se fijaron con paraformaldehído (PFA, Krape S.A) al 4% para la posterior detección inmunocitoquímica de BrdU y de diferentes marcadores celulares (ver apartado 2.6). Para el conteo de las células BrdU positivas en los experimentos de proliferación celular, se tomaron fotos con un aumento de 20X, de 5 campos distintos (a las 12-, 3-, 6-, y 9- posiciones del reloj). Al menos 3 cubres de células de cada tratamiento fueron analizados. El experimento fue llevado a cabo 3 veces.

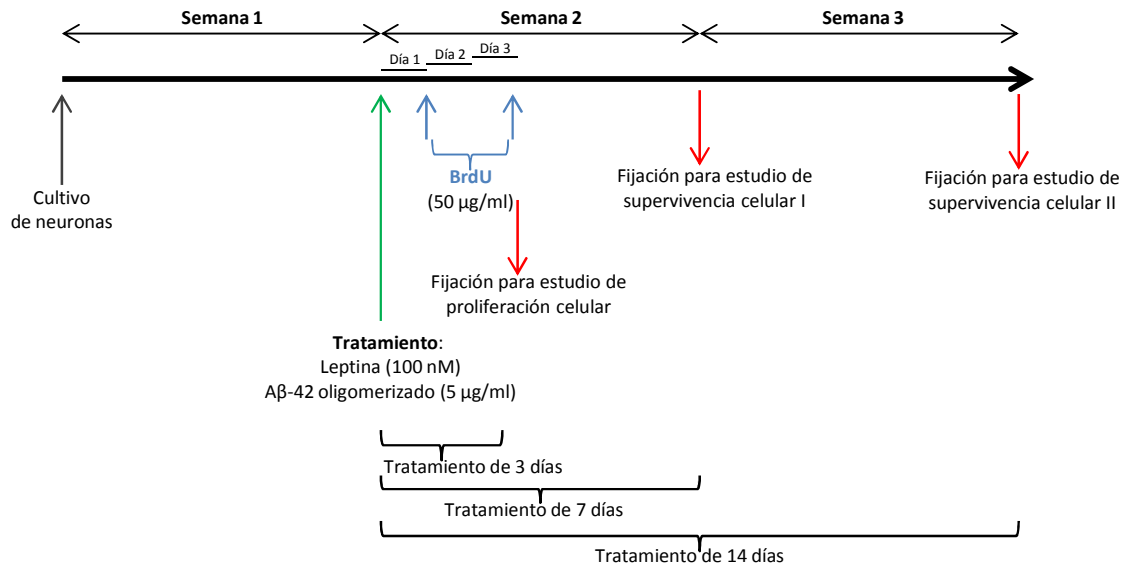


Figura 18. Cronograma del tratamiento de las neuronas primarias para el estudio de la proliferación y supervivencia celular.

2.5 Determinación de la longitud de neuritas en cultivos primarios de neuronas

Para el estudio de la neuritogénesis las neuronas se sembraron en placas de 24 pocillos con cristales cubreobjetos circulares a una densidad de 5×10^4 células/cm². Tras mantener a las células durante 7 días en cultivo, éstas fueron tratadas con leptina (100 nM), oligómeros de Aβ-42 (5 µg/ml) o con el tratamiento conjunto durante 18 o 36 horas (Figura 19) en ausencia de B27.

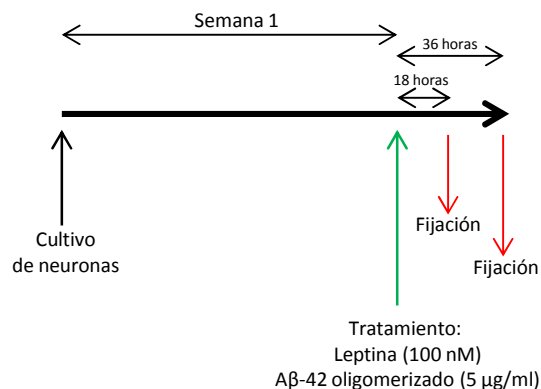


Figura 19. Cronograma del tratamiento de las neuronas primarias para el estudio de la longitud de neuritas.

Al final de los tratamientos las células fueron fijadas con PFA al 4% para comenzar el análisis inmunocitoquímico (apartado 2.6) utilizando un anticuerpo específico anti-Calbindina. Para el análisis morfológico de la longitud de las neuritas se siguió un método adaptado del estudio de Arendt y colaboradores (Arendt y col., 1986). Las imágenes se tomaron con el objetivo de 40X del microscopio de fluorescencia Zeiss Axioplan 2. Se consideró neurita cualquier proyección desde el soma neuronal pudiendo ser tanto axón como dendrita y según el orden de la proyección se distinguió entre neuritas primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias. La longitud de las neuritas fue analizada usando el programa ImageJ 1.43u (*National Institute of Health, USA*) con el plugging NeuronJ especialmente diseñado para este tipo de estudio (Figura 20). Al menos 30 neuronas de cada tratamiento fueron trazadas y analizadas. El experimento fue llevado a cabo 3 veces.

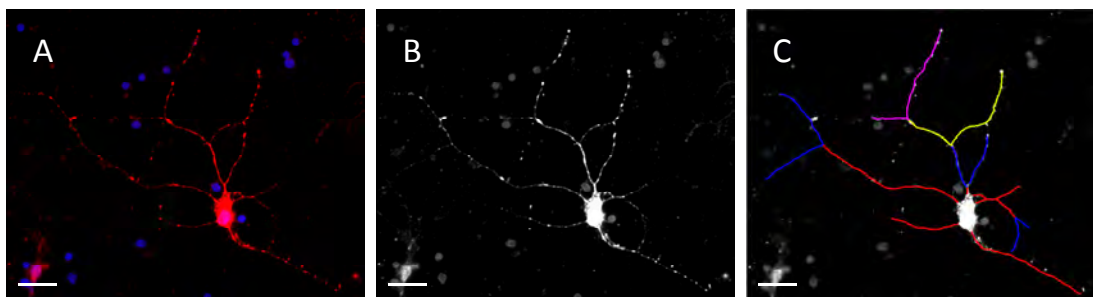


Figura 20. Análisis de la longitud de neuritas con el programa ImageJ y el plugging NeuronJ. Se partió de una imagen de una neurona Calbindina positiva contrateñida con DAPI (A) que fue transformada al modo 8 bits (B) para la realización de los trazados (C) de neuritas primarias (rojo), secundarias (azul), terciarias (amarillo) y cuaternarias (rosa). Barra de calibración = 20 μm .

2.6 Inmunocitoquímica

Para la realización de ensayos de inmunocitoquímica las neuronas fueron fijadas durante 30 minutos con PFA al 4% y lavadas 3 veces en PBS 1X. Para la detección del BrdU se desenmascaró el epítipo incubando con una solución de HCl 2 N con 0,3% del detergente TritónX-100 durante 30 minutos y se realizaron 2 lavados en PBS 1X durante 10 minutos antes de proceder al bloqueo. Las células se bloquearon en PBS 1X con 1% de BSA durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras 3 lavados de 5 minutos en PBS 1X, las células se incubaron con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C. Todos los anticuerpos primarios utilizados se diluyeron en PBS 1X con 0,1% BSA y 0,2% TritonX-100. Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 5

minutos en PBS 1X y las células se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad y se realizaron los tres últimos lavados. Todas las incubaciones y lavados se realizaron en agitación rotacional. Para finalizar el procedimiento montamos los cristales cubreobjetos circulares sobre los portas con FluorSave™ Reagent (Calbiochem).

Los anticuerpos utilizados, sus características y sus diluciones se resumen en las tablas 4 y 5. En todos los experimentos los núcleos celulares fueron teñidos con 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, Sigma-Aldrich).

Anticuerpo	Inmunógeno	Inmunidad	Procedencia y Referencia	Dilución
BrdU	BrdU	Monoclonal rata IgG2a	Abd Serotec (OBT0030S)	1:400
βIII-tubulina	Péptido correspondiente al C-terminal de βIII-tubulina (EAQGPK)	Monoclonal ratón IgG1 (clon 5G8)	Promega (G7121)	1:1000
Calbindina	Calbindina recombinante de rata D-28k	Policlonal conejo anti humano, mono, rata, ratón y pollo	Swant (CB38)	1:500
Doblecortina (DCX)	Péptido correspondiente al extremo C-terminal de la DCX humana	Policlonal cabra anti ratón, rata y humano	Santa Cruz Biotechnology (sc-8066)	1:250
NeuN	Núcleos celulares purificados de cerebro de ratón	Monoclonal ratón IgG1 (clon A60)	Millipore (MAB277)	1:250
GFAP	GFAP purificado de médula espinal de cerdo	Monoclonal ratón IgG1 (clon G-A-5)	Sigma (G 3893)	1:1000

Tabla 4. Anticuerpos primarios utilizados en inmunocitoquímica.

Anticuerpo	Procedencia y Referencia	Dilución
Anticuerpo policlonal burro anti rata IgG conjugado Alexa Fluor 488	Molecular Probes® (A21208)	1:1000
Anticuerpo policlonal burro anti cabra IgG conjugado Alexa Fluor 555	Molecular Probes® (A21432)	1:1000
Anticuerpo policlonal conejo anti ratón IgG conjugado Alexa Fluor 555	Molecular Probes® (A21427)	1:1000

Tabla 5. Anticuerpos secundarios utilizados en inmunocitoquímica.

2.7 Cultivo de microglía

Los ensayos realizados con cultivos de microglía se llevaron a cabo en el Instituto Cajal por la Dra. María de Ceballos. Los cultivos primarios de microglía se prepararon a partir de la

corteza de ratas Wistar neonatales (P0-P1). Las cortezas se disgregaron mecánicamente y se sembraron en frascos de 75 cm² en medio DMEM con alta cantidad de glucosa (Lonza) suplementado con 10% de FBS y 40 µg/ml del antibiótico gentamicina. Las células se cultivaron en una atmósfera del 5% CO₂ a 37°C y se realizaron cambios de medio a las 24 horas y a los 7 y 14 días de iniciar el cultivo. Tras 2 semanas en cultivo, aproximadamente, cuando las células habían alcanzado la confluencia, se sembraron a una densidad de 40.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos cubiertas con poli-L-lisina (10 µg/ml) en medio suplementado sólo con FBS al 10%. Tras 24 horas de incubación el medio se sustituyó por medio fresco con 0,1% FBS las células se trataron con o sin leptina a concentraciones desde 0,25 µg/ml hasta 10 µg/ml, sólo o en combinación con la endotoxina LPS (lipopolisacárido) a una concentración de 300 ng/ml.

2.7.1 *Valoración de Nitritos*

La producción de óxido nítrico (NO) en cultivos de microglía se midió utilizando el ensayo colorimétrico basado en la reacción de Griess (Sigma-Aldrich), que detecta los nitritos (NO₂⁻), un producto estable de la reacción de NO y oxígeno molecular en los sobrenadantes de cultivos celulares. Según recomienda el fabricante, se recogieron 80 µl de cada muestra (medio) y se incubaron con 80 µl del reactivo de Griess durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación se midió la absorbancia a la longitud de onda de 540 nm utilizando un espectrofotómetro con lector de placas. La curva de calibración se realizó con cantidades crecientes de nitrito sódico.

2.7.2 *Ensayo de viabilidad celular MTT*

Para la valoración de la viabilidad celular de las células de microglía se realizó un ensayo basado en el bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT, Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se añadieron 10 µl del reactivo de marcaje MTT a 100 µl del medio de las células de microglía sembradas en placas de 96 pocillos y se incubó durante 4 horas a 37°C y en una atmósfera húmeda para posteriormente añadir la solución de solubilización e incubar toda la noche a temperatura ambiente. Finalmente se midió la absorbancia a la longitud de onda de 550-600 nm (con una longitud de onda de referencia > 650 nm) en un espectrofotómetro con lector de placas.

3. ENSAYOS *IN VIVO*

3.1 *Animales de experimentación*

Para los ensayos *in vivo* se utilizaron ratones macho doblemente transgénicos APP/PS1 (*APP*-swe, *PSEN1*dE9; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, EEUU), un modelo de amiloidosis. Estos ratones expresan la proteína precursora amiloide quimera entre el ratón y el humano (Mo/HuAPP695swe) y la PSEN 1 humana mutada que presenta una delección en el exón 9 (*PSEN1*- dE9) (Scheuner y col., 1996). Ambas mutaciones están dirigidas para expresarse en neuronas del SNC. El transgén humanizado *Mo/HuAPP695* permite a los ratones secretar el péptido A β humano de manera que estos animales presentan placas amiloides a partir de los 3-4 meses de edad en la corteza cerebral (incluyendo el cuerpo calloso) y en el hipocampo, además de gliosis, neuritis distróficas y pérdida de la memoria espacial (Minkeviciene y col., 2008).

Los animales tenían 6 meses de edad al inicio de los experimentos. Como controles se utilizaron ratones no transgénicos. Todos los animales fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) y humedad (55 - 60%), con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y con acceso libre a comida y agua. Se cumplió la normativa indicada en la directiva 2010/63UE del Parlamento Europeo y del Consejo del 22 de Septiembre del 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. Todos los procedimientos fueron realizados en la Unidad de Cirugía Experimental del Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre y fueron aprobados por el comité de bioética de dicho instituto.

3.2 *Genotipado de los animales transgénicos*

3.2.1 *Digestión de colas para obtención del ADN*

La digestión del extremo distal (2-5 mm) de las colas de animales de 21 días de edad se realizó en el tampón de lisis Nid (KCl 1 M, Tris-HCl 1 M pH 8.3, MgCl₂ 1 M, gelatina 10%, Nonidet P40 2,5%, Tween20 2,5% y proteinasa-K 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) calentando y agitando en el Thermomixer compact (Eppendorf) durante 3 horas a 56°C a 1400 rpm y durante 20 minutos a 96°C a 500 rpm. Se eliminaron los restos de la digestión centrifugando durante 1,5 minutos a

8000 rpm a 4°C, conservando sólo el sobrenadante. De cada fragmento de cola se obtuvieron unos 50 µg de ADN, suficientes para múltiples ensayos de genotipado.

3.2.2 PCR de *APP*

Las parejas de oligonucleótidos utilizadas para la amplificación del ADN se recogen en la siguiente tabla:

Oligonucleótido	Secuencia 5' --> 3'	Tipo de oligonucleótido
oIMR3610	AGG ACT GAC CAC TCG ACC AG	Transgén
oIMR3611	CGG GGG TCT AGT TCT GCAT	Transgén
oIMR8744	CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG	Control positivo interno
oIMR8745	GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT	Control positivo interno

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados en la PCR de *APP*

La PCR se realizó en el termociclador Advanced primus 96, siguiendo el siguiente protocolo de ciclos: 1 ciclo de desnaturalización del ADN a 96°C durante 3 minutos seguido de 39 ciclos de amplificación del ADN diana (desnaturalización a 94°C durante 1,5 minutos , hibridación de los oligonucleótidos a 60°C durante 1 minuto y extensión a 72°C durante 1,5 minutos) y un ciclo de extensión final a 72°C durante 4 minutos. Los productos de la PCR se separaron en geles de agarosa. Todos los ratones (transgénicos y no transgénicos) tenían la banda de 200 pares de bases que representa el segmento del gen endógeno. La banda de 377 pares de bases correspondiente al *APP* indicó la presencia del transgén (Figura 21).

3.2.3 PCR de *PSEN1*

Se utilizaron las parejas de oligonucleótidos que se muestran en la siguiente tabla:

Oligonucleótido	Secuencia 5' --> 3'	Tipo de oligonucleótido
oIMR1644	AAT AGA GAA CGG CAG GAG CA	Transgén
oIMR1645	GCC ATG AGG GCA CTA ATC AT	Transgén
oIMR7318	CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT	Control positivo interno
oIMR7339	GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C	Control positivo interno

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en la PCR de *PSEN1*

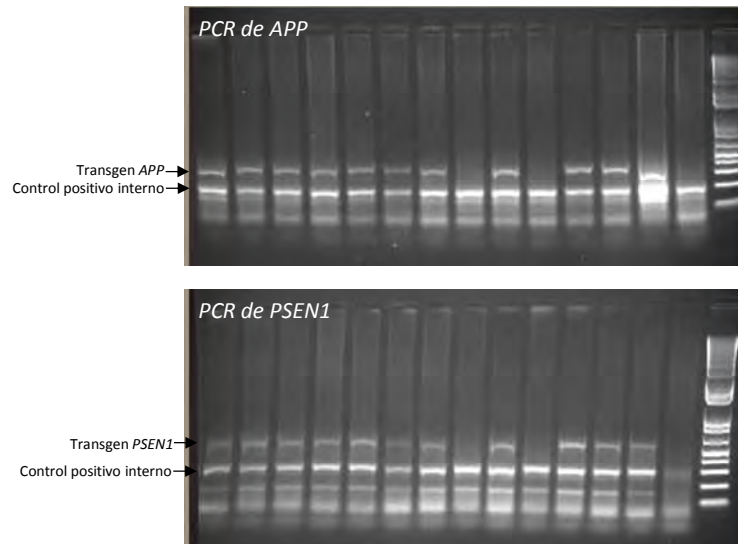


Figura 21. Visualización de los productos de las PCRs de los transgenes *APP* (arriba) y *PSEN1* (abajo) en geles de agarosa. Se muestran las bandas control y las del transgén. A la izquierda de cada uno de los geles aparece el marcador de peso molecular de 1KDa.

La PCR se realizó en el termociclador Advanced primus 96 y llevamos a cabo el mismo programa de ciclos descrito anteriormente para la PCR de *APP*. Separamos los productos de la PCR en un gel de agarosa. Todos los ratones (transgénicos y no transgénicos) tenían la banda de 324 pares de bases que representa el segmento del gen endógeno. La banda de 608 pares de bases correspondía al transgén *PSEN1* (Figura 21).

3.3 *Terapia génica con leptina*

Los vectores lentivirales (HIV-leptina o HIV-vv) se administraron a los ratones transgénicos APP/PS1 mediante una inyección icv. Para ello, los ratones se anestesiaron con isoflurano (Forane®) y se colocaron en un aparato de cirugía estereotáxica (Panlab SL) con adaptador *Cunningham* para ratón (Panlab SL). A continuación se inyectaron 2 μ l de la suspensión del lentivirus por ventrículo lateral a una concentración de 140 g/ml, utilizando una jeringa *Hamilton* a una velocidad de 1 μ l/minuto (Figura 22). Las coordenadas seguidas para la inyección desde el punto Bregma fueron: 0,6 mm posterior, 1,1 mm lateral, 2 mm ventral. También se incluyeron en el experimento ratones control no transgénicos a los que se les realizó una operación simulada *SHAM*. La terapia génica fue de 1 y 3 meses de duración (Figura 23).



Figura 22. Aparato de cirugía estereotáxica. Se muestra al ratón situado en el adaptador (negro) y la jeringa *Hamilton* acoplada en el aparato para la administración icv de los vectores lentivirales.

3.4 *Tratamiento con BrdU*

Durante la última semana de la terapia génica se realizaron las inyecciones de BrdU para el estudio de la proliferación y diferenciación celular en los ratones transgénicos APP/PS1. Los ratones recibieron una inyección intraperitoneal diaria de BrdU a una concentración de 50 mg/kg disuelto en NaCl al 0,9% durante los últimos 7 días de la terapia génica de 1 o 3 meses (Figura 23). La dosis de BrdU empleada fue suficiente para marcar nuevas células en el ratón sin tener ningún efecto tóxico sobre las células proliferantes. A las 24 horas de la última inyección de BrdU los animales fueron sacrificados para la recogida de muestras (Figura 23).

3.5 *Comportamiento*

Durante los 10 últimos días de la terapia génica de leptina de 3 meses, se realizaron los tests de comportamiento a todos los animales incluidos en el grupo experimental: los ratones control y los transgénicos APP/PS1 tratados con HIV-leptina o HIV-vv (Figura 23). Todos los tests se llevaron a cabo entre las 09:00 y las 14:00 horas y fueron realizados a ciegas y por el mismo investigador.

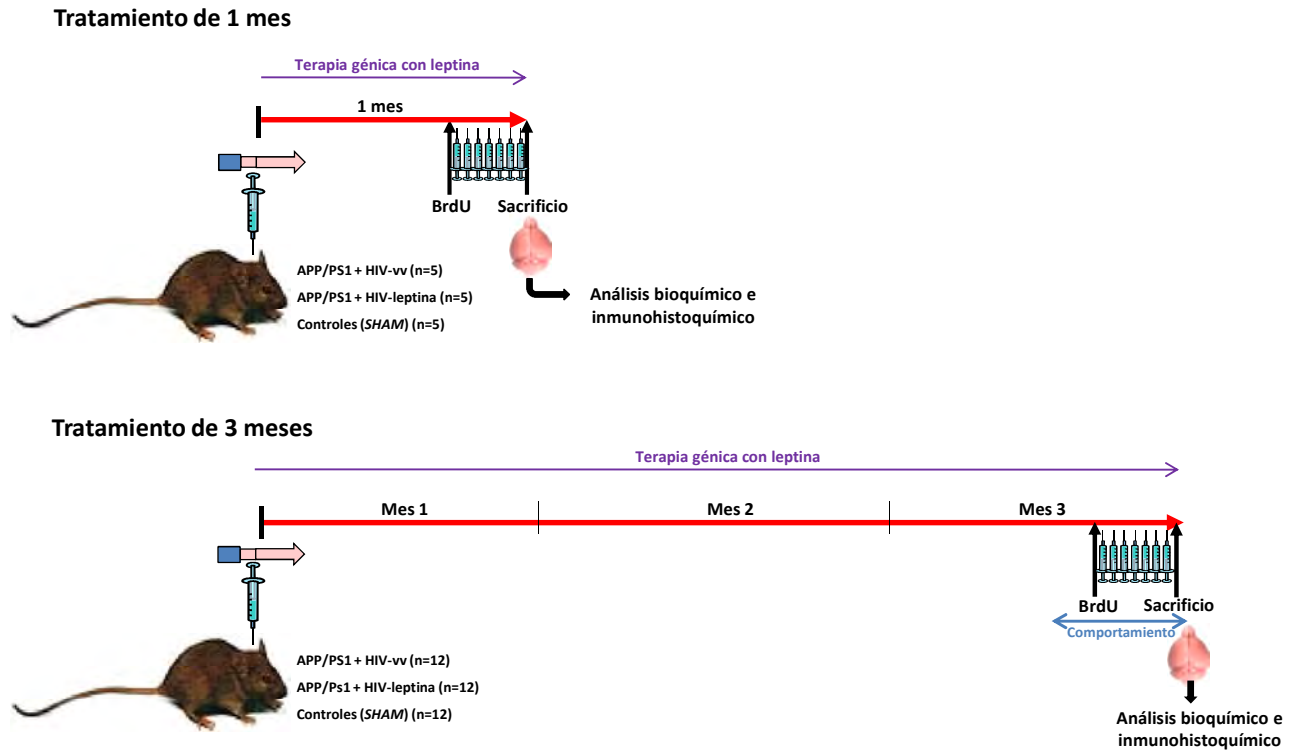


Figura 23. Cronograma del diseño experimental *in vivo* de 1 (arriba) o 3 (abajo) meses de duración. Se indica el tamaño muestral (n) de cada grupo.

En la tabla siguiente se recogen los tests de comportamiento realizados en cada uno de los días:

Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
Laberinto en T	Laberinto en T	Laberinto en T	Laberinto en T	Laberinto en T	Laberinto en T	Laberinto en T	Laberinto en T	Laberinto en T	Reconocimiento del nuevo objeto
			Laberinto en cruz elevado	Laberinto en cruz elevado				Habitación para test de reconocimiento del nuevo objeto	

Tabla 8. Planificación de los tests de comportamiento.

3.5.1 Test de "El laberinto en T"

El laberinto en T es un test que sirve para valorar la capacidad cognitiva de los roedores (Deacon y Rawlins, 2006). Se trata de un laberinto en forma de T dispuesto de manera horizontal con unas dimensiones de 30 x 5 cm por brazo (Figura 24). Los animales empiezan en la base de

la T y se les deja elegir entre uno de los dos brazos que componen la T. En un segundo intento, lo normal es que el roedor tienda a visitar el brazo que no había visitado antes porque se acuerda de que había estado en el otro brazo en el intento anterior. A esto se le conoce como "alternancia espontánea". Esta tendencia se puede reforzar introduciendo al animal hambriento y recompensándolo con su comida preferida si alterna adecuadamente. Esta variación es conocida como "alternancia con recompensa". Tanto la alternancia espontánea como la de recompensa son muy sensibles a la disfunción hipocampal, aunque otras áreas del cerebro están implicadas. En nuestro estudio se utilizó la alternancia espontánea. La prueba se realizó durante 9 días consecutivos, con dos intentos por día, de manera que en el primer intento se bloqueó el brazo derecho en los días pares y en los días impares se bloqueó el izquierdo (Figura 24). Una vez incorporado el ratón en el brazo libre, fue retenido durante un 1 minuto y a continuación se volvió a colocar al principio del brazo central para contar el tiempo que el animal tardaba en optar por entrar al brazo derecho o al izquierdo. A este tiempo se le denomina latencia.



Figura 24. Fotografía del test del laberinto en T. Corresponde al primer intento de un día par con bloqueo del brazo izquierdo.

3.5.2 Test de "El laberinto en cruz elevado"

Realizamos la prueba del laberinto en cruz elevado para evaluar la ansiedad (Rodgers y Dalvi, 1997) y la actividad exploratoria (Kou y col., 2010) de los ratones a estudio. Este laberinto está compuesto por dos brazos abiertos opuestos (30 x 5 cm) y dos brazos cerrados opuestos (30 x 5 x 15 cm) que están conectados por un cuadrado central abierto (5 x 5cm) sujetado por un eje central que mantiene a la estructura elevada del suelo (Figura 25). Esta prueba fue realizada durante los días 4 y 5 del estudio comportamental, 2 horas después de haber realizado la prueba

del laberinto en T. Para ello los animales se colocaron en el centro del laberinto (Figura 25) y durante un tiempo total de 5 minutos se contó el número de veces y el tiempo que los animales permanecían en los brazos abiertos y en los brazos cerrados. Las entradas a los brazos abiertos y su duración reflejan la actividad exploratoria en el área ansiogénica, mientras que las entradas en los brazos cerrados y su duración son un reflejo de la actividad exploratoria en áreas seguras. El ratio entre el número de entradas o su duración en los brazos abiertos y el número de entradas totales a cualquiera de los brazos o su duración es una medida específica de ansiedad.



Figura 25. Fotografía del laberinto en cruz elevado. El ratón aparece en el punto de inicio.

3.5.3 *Test de reconocimiento del nuevo objeto*

Se trata de un test para evaluar la memoria de reconocimiento visual no espacial de los animales mediante el reconocimiento de un nuevo objeto (Dewachter y col., 2002). Esta prueba se realizó en una caja cuadrada con dimensiones de 60 x 60 x 60 cm durante los dos últimos días del comportamiento. El primer día, el animal se habituó en la caja vacía durante 15 minutos (Figura 26). El segundo día, en primer lugar, el animal realizó una entrada de 10 minutos en la caja que contenía uno de los objetos (Figura 26). Transcurridas 3 horas de la exposición al primer objeto, el animal volvió a realizar una entrada de 10 minutos en la caja donde se había incorporado un nuevo objeto (Figura 26). En este momento se evaluó la capacidad de exploración del animal sobre el nuevo objeto. En cada una de las entradas se registró el tiempo que dedicó el ratón a explorar cada uno de los objetos, considerándose como actividad exploratoria la aproximación de la nariz del animal al objeto a una distancia de 1 cm o menor.

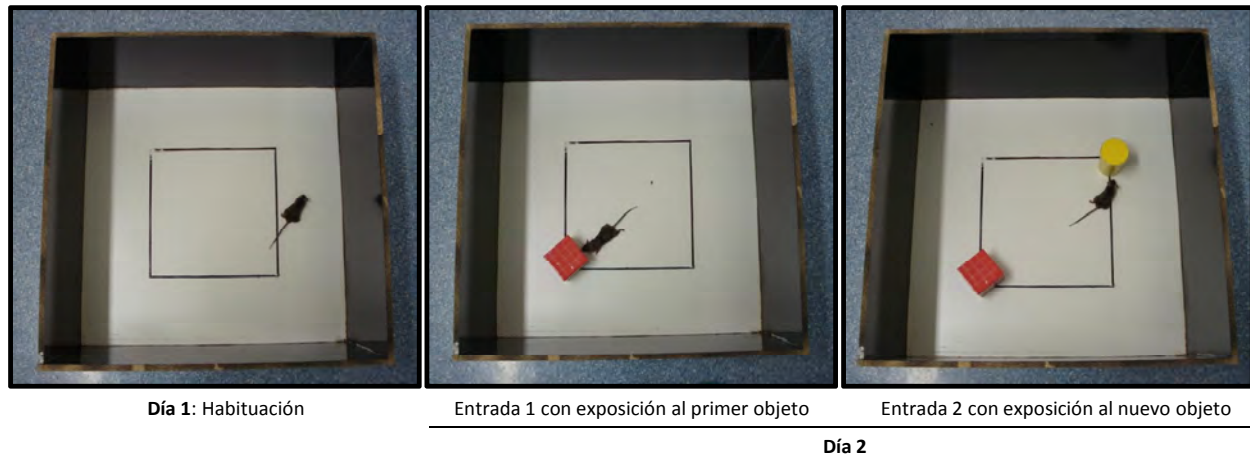


Figura 26. Fotografías del test de reconocimiento de objetos. Se muestra el día 1 (izquierda) y día 2 durante la entrada 1(centro) y la entrada 2 (derecha).

Los datos fueron expresados como el porcentaje de exploración del nuevo objeto con respecto al tiempo total de exploración de la prueba. Este porcentaje es conocido como el índice de reconocimiento.

3.6 *Sacrificio de los animales y recogida de muestras*

Al finalizar la terapia génica de 1 o 3 meses de duración los animales fueron anestesiados con isofluorano para ser perfundidos con tampón fosfato (PB: *phosphate buffer*) 0.1 M. Para la perfusión, los animales se colocaron en posición decubito supino sobre una placa adecuada para la recogida de los líquidos de lavado. Se insertó la aguja de la jeringuilla que contenía PB 0.1 M en el ventrículo izquierdo del corazón y, para permitir el escape de la circulación de retorno del líquido de lavado, se realizó una incisión en la aurícula derecha. El tiempo de perfusión para el lavado de cada ratón fue de un tiempo mínimo de 20 minutos. Tras la perfusión, se extrajo el cerebro y se cortó sagitalmente en dos mitades. La corteza y el hipocampo de uno de los hemisferios fueron diseccionados y conservados a -80°C hasta su procesamiento para análisis bioquímicos. El otro hemisferio fue sumergido en PFA al 4% preparado en PB 0.1 M pH 7.4 para su fijación por inversión durante 48-72 horas. El tejido fijado se utilizó para análisis histológicos.

3.7 *Muestras humanas*

Las cortezas pertenecientes a cerebros post mórtem de controles y pacientes con diferentes grados de demencia fueron proporcionadas por el banco de tejidos del Institut de Neuropatologia del IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge.

3.8 *Análisis de proteínas*

3.8.1 *Preparación de las muestras*

Los tejidos (corteza e hipocampo) se lisaron en tampón de lisis (NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM, EDTA 5 mM, glicerol 10% y Nonidet P40 1%) suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (*Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail*, Roche). Para la cuantificación de las proteínas se utilizó al método de *BCA Protein assay kit* (Pierce, Rockford, IL, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para obtener la recta patrón se realizaron diluciones seriadas de BSA para utilizarla como proteína estándar. El resto de concentraciones se determinaron en base a esa recta. Las medidas de absorbancia se realizaron en el espectrofotómetro MultiSkan Ex (Thermo Scientific) para placas de 96 pocillos. Un total de 50 µg de proteína en tampón de carga reductor 4X (Tris HCl 0,125 mM pH 6,8, SDS 5%, glicerol 17%, β-mercaptoetanol 2% (v/v) y azul de bromofenol) se utilizaron por muestra. Las proteínas se calentaron durante 10 minutos a 90°C antes de su carga en el gel.

3.8.2 *Western-blot*

El *Western blot* es una técnica que consiste en una primera fase de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de sulfato dodecyl de sodio (PAGE-SDS) en condiciones reductoras. Se utilizó el sistema de electroforesis Mini-Protean 3 (BioRad). Se cargaron 50 µg de cada muestra y como marcador de masa molecular se utilizó Precision Plus Protein WesternC Standards (Biorad). Se hizo correr el gel inicialmente unos 20 minutos a 70 V hasta que el frente entró en el gel separador y posteriormente a 100 V, tardando aproximadamente 2 horas (el tiempo depende de la concentración de acrilamida del gel). Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de Immobilon™ PVDF (Polyvinylidene Difluoride) (Millipore, Madrid, España). Para ello se utilizó un sistema de electrotransferencia Mini trans-blot (Biorad).

La transferencia se llevó a cabo a un voltaje constante de 50 V durante 90-120 minutos a 4°C. Para realizar la inmunodetección de las proteínas de interés, en primer lugar bloqueamos la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación suave con tampón Tris base salino (TBS: *Tris-buffered saline*) 1X con Tween20 al 0,05% (TTBS) y leche en polvo descremada al 5%. Seguidamente se incubó con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C en agitación, preparado, al menos que el fabricante diga lo contrario, en TTBS 1X con 1% BSA y 0,01% azida sódica. Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 10 minutos en TTBS 1X en agitación suave y a temperatura ambiente, para proceder a la incubación con el anticuerpo secundario conjugado a la peroxidasa de rábano (HRP) diluido en TTBS 1X durante 1 hora, en agitación suave y a temperatura ambiente. Tras 3 lavados en TTBS 1X y 2 lavados en TBS 1X, las proteínas fueron procesadas por quimioluminiscencia con el kit Immun-StarTM WesternCTM (Bio-Rad) y las imágenes fueron reveladas utilizando el Image Quant LAS (GE). Todas las membranas se incubaron con una proteína normalizadora de carga para usarla como patrón interno. Para realizar la densitometría de las bandas se utilizó el programa informático ImageJ 1.43u (*National Institute of Health*, USA). Los anticuerpos utilizados se describen en las tablas 9 y 10.

3.9 *Inmunoprecipitación de HA*

Para la inmunoprecipitación de la proteína HA-leptina se utilizó la sefarosa acoplada a proteína G (GE). En primer lugar, el anticuerpo anti-HA fue acoplado a la proteína G de la sefarosa mediante la incubación de 5 µg del anticuerpo HA (diluido en 200 µl de PBS 1X) con 50 µl de sefarosa durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación rotacional. Tras lavar la muestra se incubó con el lisado de la corteza, conteniendo 200 µg de proteína total, durante toda la noche a 4°C. Al final de la incubación el sobrenadante enriquecido en HA-leptina fue recogido para comenzar la técnica de *Western-blot* (apartado 3.8.2).

3.10 *Preparación de sinaptosomas*

Para la preparación de fracciones enriquecidas en sinaptosomas se utilizó el método descrito por D'Amelio y colaboradores (D'Amelio y col., 2011). Las muestras (corteza e hipocampo) se homogeneizaron en el tampón de lisis: sacarosa 320 mM, HEPES 4 mM ph 7.4, EGTA 1 mM, PMSF 1 mM con inhibidores de proteasas (*Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail*, Roche).

El homogenado se centrifugó a 1000 g durante 10 minutos y el sobrenadante resultante se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos. El *pellet* se lavó en el tampón de lisis centrifugando a 13000 g durante 15 minutos para obtener el *pellet* final que contenía la fracción enriquecida en sinaptosomas. Para el análisis por *Western-blot* de las proteínas de los sinaptosomas el *pellet* se resuspendió en tampón de carga reductor 2X y se realizó el análisis de proteínas tal y como se indica el apartado 3.8.2.

Anticuerpo	Inmunógeno	Inmunidad	Procedencia y Referencia	Dilución
Sinapsina I	Sinapsina I purificada de cerebro bovino	Policlonal conejo anti rata, ratón, bovino y humano	Sigma (S 193)	1:5000
Sinaptofisina	Sinaptofisina de retina de rata	Monoclonal ratón anti humano, ratón, porcino y rata	Millipore (MAB368)	1:1000
PSD-95	Péptido sintético derivado de los residuos 50-150 de PSD-95 de ratón	Policlonal conejo anti humano, ratón y rata	Abcam (ab18258)	1:1000
SNAP-25	Proteína SNAP-25 completa	Monoclonal ratón anti ratón y todos los mamíferos	Abcam (ab24737)	1:1000
Caspasa-3	Péptido sintético de los residuos que rodean el sitio de corte de la caspasa-3 humana	Policlonal conejo anti humano, ratón, rata y mono	Cell Signaling (#9662)	1:1000
p-Stat3	Fosfopéptido sintético de los residuos que rodean a Tyr705 en Stat3 de ratón	Monoclonal conejo anti humano, ratón y rata	Cell Signaling (#9145)	1:2000
BACE1	Péptido sintético correspondiente a la región N-terminal de BACE1 humana	Policlonal conejo anti humano y ratón	Sigma (B 0681)	1:1000
Ob-R	Péptido sintético correspondiente a los aminoácidos 870-894 de la Ob-Ra de ratón.	Monoclonal ratón	Santa Cruz (sc-8391)	1:150
Megalina	Proteína de fusión correspondiente los aminoácidos 87-196 de megalina de ratón	Policlonal ratón	Abcam (ab21849)	1:500
HA	Péptido sintético correspondiente a los aminoácidos 98-106 de HA del virus influenza.	Monoclonal ratón	Sigma (H 3663)	1:250

Tabla 9. Anticuerpos primarios utilizados en *Western-blot*.

Anticuerpo	Procedencia y Referencia	Dilución
Anticuerpo policlonal cabra anti ratón conjugado a HRP	Pierce (31430)	1:10000
Anticuerpo policlonal cabra anti conejo conjugado a HRP	Bio-Rad (170-7515)	1:10000

Tabla 10. Anticuerpos secundarios utilizados en *Western-blot*.

3.11 *ELISA de A β -40 y A β -42*

Para una determinación precisa de los niveles de A β -40 y A β -42 en corteza e hipocampo de los ratones APP/PS1, se utilizaron los ELISAs comerciales (BIOSOURCE) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron homogenizadas en la solución A (Guanidina-HCl 5 M, Tris HCl 50 mM pH 8.0) durante 3-4 horas a temperatura ambiente. A continuación, la muestra se diluyó en la solución B (KCl 0.2 g/l, KH₂PPO₄ 0.2 g/l, NaCl 8.0 g/l, Na₂HPO₄ 1.15 g/l, BSA 5%, Tween20 0.03%) y se centrifugó a 16.000 g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante se utilizó para la realización del ELISA. Se añadieron 50 μ l del anticuerpo de detección, se incubó durante 3 horas, se lavó e incubó de nuevo con 100 μ l del anticuerpo conjugado a HRP durante 20 minutos. A continuación se lavó y se realizó una última incubación con la solución de revelado durante 30 minutos en oscuridad. Las incubaciones se realizaron en agitación y a temperatura ambiente. Finalmente tras añadir la solución de parada se midió la absorbancia a la longitud de onda de 450 nm utilizando el espectrofotómetro MultiSkan Ex (Thermo Scientific) para placas de 96 pocillos. La curva de calibración se realizó con cantidades crecientes del péptido A β -40 o A β -42.

3.12 *Determinación de la actividad de BACE1*

Se utilizó el kit comercial *SensiZyme BACE1 Activity Assay* (Sigma-Aldrich) para determinar la actividad de BACE1 en lisados celulares de corteza e hipocampo preparados en el tampón de lisis: NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM, EDTA 5 mM, glicerol 10% y Nonidet P40 1%, suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (*Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail*, Roche). Para ello se añadieron 100 μ l del lisado a una placa cubierta con el anticuerpo anti-BACE1 y se incubó durante 2 horas a 4°C. A continuación se lavaron los pocillos para proceder a la incubación con 50 μ l del sustrato A toda la noche a temperatura ambiente y en cámara húmeda. El sustrato A es una proenzima que contiene el lugar de acción de BACE1 fusionada a otra proteasa, de manera que cuando ésta es escindida por BACE1 se transforma en una proteasa nueva y activa. Al final de la incubación añadimos 50 μ l de la mezcla del sustrato B y ditiotreitól (DTT) y agitamos la placa durante 20 segundos. El sustrato B es un péptido colorimétrico que es escindido por la nueva proteasa. Finalmente la placa se incubó a temperatura ambiente durante 2-3 horas y se midió la absorbancia a la longitud de onda de 405

nm utilizando el espectrofotómetro MultiSkan Ex (Thermo Scientific) para placas de 96 pocillos. La curva de calibración se realizó con cantidades crecientes de la proteína BACE1.

3.13 *Valoración de la muerte celular*

Para la valoración de muerte celular se partió de lisados de corteza e hipocampo en el tampón de lisis: NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM, EDTA 5 mM, glicerol 10% y Nonidet P40 1%, suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (*Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail*, Roche) y se utilizó el kit *Cell Death Detection ELISA^{PLUS}* (Roche), que detecta la fragmentación del ADN de las células que entran en el proceso apoptótico, siguiendo las instrucciones que recomienda el fabricante. Se añadieron 20 µl del lisado y se incubaron con 80 µl de una solución de anticuerpos anti-histona y anti-ADNpod durante 2 horas en agitación y a temperatura ambiente. Tras los lavados se añadió la solución de revelado y la reacción se paró tras 10-30 minutos. A continuación se midió la absorbancia a la longitud de onda de 405 nm utilizando el espectrofotómetro MultiSkan Ex (Thermo Scientific) para placas de 96 pocillos.

3.14 *Técnicas histológicas*

Los cerebros previamente fijados en PFA al 4% y conservados a 4°C en PB 0.1 M se seccionaron a 50 µm utilizando un vibratomo (Leica) y los cortes se recogieron en PB 0.1 M frío. Todos los anticuerpos utilizados se resumen en las tablas 11 y 12.

3.14.1 *Inmunofluorescencia*

Las secciones de cerebro se bloquearon en PB 0,1 M con BSA al 3% durante 2 horas y se incubaron durante toda la noche con los anticuerpos primarios. Todos los anticuerpos primarios se diluyeron en PB 0.1 M con 0.5% BSA y 0.5% TritónX-100. Tras la incubación con el anticuerpo primario, se lavó 3 veces en PB 0,1 M durante 10 minutos para seguidamente incubar en oscuridad durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario diluido en la misma solución que el primario. Tras la incubación se hicieron 3 lavados de 15 minutos en PB 0,1 M. Todas las incubaciones y lavados se realizaron en agitación rotacional. Para finalizar, los cortes se montaron en los portas y se adhirieron los cubres usando FluorSaveTM Reagent (Calbiochem).

En los estudios de inmunofluorescencia las imágenes fueron tomadas utilizando dos microscopios: un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss MicroImaging, Tec Laim s.a., Madrid, España) con una lámpara de mercurio de alta presión HBO 100 W, objetivos LD plan-neofluar de 2,5X, 10X, 20X, 40X y 63X aumentos y cámara SPOT Cam, que utiliza el programa SPOT 32 Advanced, versión 4.0.4. (Diagnostic Instruments inc., Tec Laim s.a., Madrid, España), y un microscopio confocal (Zeiss LSM 510 Meta scanning laser). Para cada imagen tomada dentro de un mismo estudio se mantuvieron las condiciones de potencia de láser, adquisición y compensación del detector y apertura del poro.

3.14.2 *Inmunohistoquímica*

En primer lugar se bloqueó la peroxidasa endógena del tejido incubando en PBS 1X con 10% metanol y 3% H₂O₂ durante 5 minutos. A continuación se lavó 3 veces durante 10 minutos y bloqueó en PBS 1X con 10% de suero de caballo durante 2 horas. Seguidamente el tejido se incubó con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C. Todos los anticuerpos primarios se prepararon en PBS 1X al 0.1% BSA y 0.2% TritonX-100. Al día siguiente, tras 3 nuevos lavados de 10 minutos en PBS 1X, los cortes se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a biotina, preparado en la misma solución que el primario, durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se reveló por sistema indirecto usando el complejo avidina-biotina peroxidasa (método ABC, Vector Laboratories, CA, USA) preparado en PBS 1X unos 30 minutos antes de su utilización y se visualizó mediante la oxidación de 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Vector Laboratories, CA, USA) como cromógeno. Las secciones se montaron en portas gelatinizados y se dejaron secar toda la noche. Al día siguiente se deshidrataron en alcoholes de graduación creciente (70°, 80°, 96 y 100°, 1 minuto en cada uno) y desengrasaron tras 2 cambios en xileno de 30 minutos. Finalmente se colocaron los cubreobjetos con el medio de montaje rápido con base de tolueno DPX (Panreac Química SA, Barcelona, España).

En los estudios de inmunohistoquímica las imágenes se tomaron utilizando el Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss MicroImaging, Tec Laim S.A., Madrid, España) con objetivos LD plan-neofluar de 2,5x, 10x, 20x, 40x y 63x aumentos y cámara SPOT Cam, que utiliza el programa SPOT 32 Advanced, versión 4.0.4. (Diagnostic Instruments inc., Tec Laim s.a., Madrid, España).

3.14.3 Inmunohistoquímica: detección del A β

Para realizar la inmunohistoquímica de detección del A β , los cortes fueron tratados con ácido fórmico al 88% durante 20 minutos para el desenmascaramiento de los epítomos del péptido y se lavó 2 veces en PBS 1X durante 10 minutos antes comenzar con el protocolo de inmunohistoquímica descrito en el aparato anterior (3.14.2).

3.14.4 Inmunohistoquímica: detección del BrdU

Para la inmunohistoquímica de BrdU, el ADN del tejido se desnaturalizó mediante una incubación de 30 minutos en HCl 2 N a temperatura ambiente y a continuación se lavó 2 veces en PBS 1X durante 10 minutos para empezar con el protocolo de inmunohistoquímica general (apartado 3.14.2).

Anticuerpo	Inmunógeno	Inmunidad	Procedencia y Referencia	Técnica y Dilución
Aβ	Péptido sintético 1-40 conjugado a BSA	Policlonal conejo anti humano	Millipore AB5076	IH 1:500
GFAP	GFAP purificado de médula espinal de cerdo	Monoclonal ratón IgG1 (clon G-A-5)	Sigma (G 3893)	IH 1:10000 IF 1:1000
BrdU	BrdU conjugado a BSA	Monoclonal ratón IgG1	Hybridoma Bank (G3G4)	IH 1:10000
BrdU	BrdU	Monoclonal rata IgG2a	Abd Serotec (OBT0030S)	IF 1:400
βIII-tubulina	Péptido correspondiente al extremo C-terminal de β III-tubulina (EAQGPK)	Monoclonal ratón IgG1 (clon 5G8)	Promega (G7121)	IF 1:1000
DCX	Péptido correspondiente al extremo C-terminal de la DCX humana	Policlonal cabra anti ratón, rata y humano	Santa Cruz Biotechnology (sc-8066)	IF 1:500
NeuN	Núcleos celulares purificados de cerebro de ratón	Monoclonal ratón IgG1 (clon A60)	Millipore (MAB277)	IF 1:250
Ob-R	Péptido sintético correspondiente a los aminoácidos 870-894 de Ob-Ra de ratón.	Monoclonal ratón	Santa Cruz (sc-8391)	IH 1:500
Megalina	Megalina	Policlonal conejo	Dr. Michele Marino Universidad de Pisa, Italia	IH 1:250
HA	Péptido sintético correspondiente a los aminoácidos 98-106 de HA del virus influenza.	Monoclonal ratón IgG1 (clon HA-7)	Sigma (H 3663)	IH 1:500
Lectina de tomate biotilada			Sigma (L0651)	IH 1:150

Tabla 11. Anticuerpos primarios utilizados en. inmunohistoquímica (IH) o. inmunofluorescencia (IF).

3.14.5 Tinción de placas amilodeas con tioflavina

Se utilizó la Tioflavina-S (Sigma-Aldrich Química, Tres Cantos, Madrid, España), una sal de benzotiazol, para visualizar la presencia de agregados amiloides. Para realizar la tinción se

trabajó en oscuridad y los cortes en flotación fueron tratados durante 8 minutos con Tioflavina-S al 0.1% en etanol al 50% y a continuación lavados durante 10 minutos 2 veces en etanol al 80% y 2 veces en agua destilada para finalmente dejar los cortes como mínimo durante 30 minutos en PB 0,1 M a 4°C. Los cortes se montaron en portas gelatinizados y se cubrieron con FluorSave™ Reagent (Calbiochem).

Anticuerpo	Procedencia y Referencia	Técnica y dilución
Anticuerpo caballo anti ratón biotinilado	Vector Laboratories (BA-2000)	IH 1:250
Anticuerpo cabra anti conejo biotinilado	Vector Laboratories (BA-1000)	IH 1:250
Anticuerpo policlonal burro anti ratón IgG conjugado a Alexa Fluor 488	Molecular Probes® (A21202)	IF 1:1000
Anticuerpo policlonal cabra anti conejo IgG conjugado a Texasred	Jackson Immuno Research (111-075-003)	IF 1:1000
Anticuerpo policlonal burro anti cabra IgG conjugado Alexa Fluor 488	Molecular Probes® (A11055)	IF 1:1000

Tabla 12. Anticuerpos secundarios utilizados en inmunohistoquímica (IH) o inmunofluorescencia (IF).

3.14.6 Tinción de células en degeneración con Fluoro-Jade B

El Fluoro-Jade B (Millipore, Temecula, CA) es una fluoresceína polianiónica que se une específicamente a neuronas en degeneración (Schmued y Hopkins, 2000). Para realizar la tinción, en primer lugar, los cortes se montaron en portas gelatinizados (1,5-2% gelatina) y se dejaron secar toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se introdujeron en la estufa durante 30 minutos a 40°C para eliminar los posibles restos de humedad. Tras el secado, los portas se colocaron en cestillos para ser pasados por la siguiente secuencia de soluciones (desde *a* hasta *g*): *a*- NaOH al 1% preparada en etanol al 80% durante 5 minutos; *b*- etanol 70% durante 2 minutos; *c*- agua destilada durante 1 minuto; *d*- KMnO₄ al 0,06% durante 10-20 minutos en agitación; *e*- agua destilada 2 minutos; *f*- Fluoro-Jade B al 0.004% preparado a partir de la solución madre al 0.01% en 0.1% de ácido acético; *g*- 3 lavados de 1 minuto con agua destilada. A continuación se eliminó el exceso de agua apoyando los portas verticalmente sobre una superficie absorbente y éstos se colocaron en una estufa a 50°C durante 5-10 minutos hasta que los cortes estuvieron completamente secos. Finalmente las secciones se desengrasaron durante 1 minuto en xileno y se cubrieron usando el medio de montaje DPX.

3.15 *Técnicas de análisis de imagen*

3.15.1 *Densitometría de placas amiloides*

La densitometría de placas en corteza e hipocampo fue realizada sobre secciones marcadas mediante inmunohistoquímica-DAB con el anticuerpo específico anti-A β . 5 ó 6 secciones de cada animal fueron analizadas. Para ello se tomaron fotografías con un aumento 10X de la corteza (3 o 4 áreas) y del hipocampo y las imágenes se densitometraron utilizando el programa informático libre ImageJ versión 1.43u (*National Institute of Health, USA*).

3.15.2 *Densitometría de astrogliosis*

La densitometría de placas en corteza e hipocampo fue realizada sobre secciones marcadas mediante inmunohistoquímica-DAB con el anticuerpo específico anti-GFAP siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior (3.15.1).

3.15.3 *Determinación del área de astrocitos reactivos asociada a placas*

Para determinar el área de astrocitos reactivos que se concentraban alrededor de las placas amiloides se siguió el protocolo descrito previamente (Carro y col., 2006a). Se realizó una inmunofluorescencia doble utilizando anticuerpos específicos anti-GFAP y anti-A β y 5 ó 6 secciones de cada animal fueron analizadas. Para ello se tomaron 3 o 4 fotografías con el objetivo 40X de diferentes zonas de la corteza y se analizaron con el programa informático ImageJ 1.43u (*National Institute of Health, USA*) para obtener el área de las superficies positivas para GFAP y A β . Los datos se representaron como el ratio entre el área GFAP positiva y el área de la placa. Las dos áreas debían estar dentro de un espacio de referencia. El espacio de referencia es un círculo virtual centrado en el punto medio de la placa, de manera que su radio es dos veces el radio de la placa. Este procedimiento aseguró, en primer lugar, que la medida de la fluorescencia de GFAP estaba realmente asociada a la placa y era proporcional al tamaño de cada placa y, en segundo lugar, que por cualquiera que fuese el tamaño de la placa, los datos representaban la gliosis por unidad de área de placa, de esta manera los datos no dependieron del tamaño relativo de las placas, ya que mientras que las placas pueden variar en tamaño los astrocitos reactivos aparecen muy similares.

3.15.4 Cuantificación del número de células BrdU y DCX positivas

Para la cuantificación del número de núcleos marcados con BrdU o con DCX, se siguió el protocolo descrito por Trejo y colaboradores (Trejo y col., 2001). Se utilizaron una de cada seis secciones desde el extremo rostral hasta el caudal del hipocampo (en coordenadas Bregma: desde -1,06 mm hasta -3,80 mm) (Figura 27). Esta estrategia aseguró que no se contaran más de una vez las mismas células en secciones adyacentes y garantizó que el área del giro dentado analizada para cada animal era constante. El conteo se realizó a partir de las fotografías tomadas con un objetivo de 40X. Las imágenes se ampliaron todo lo necesario para distinguir células individuales de agrupaciones de células.

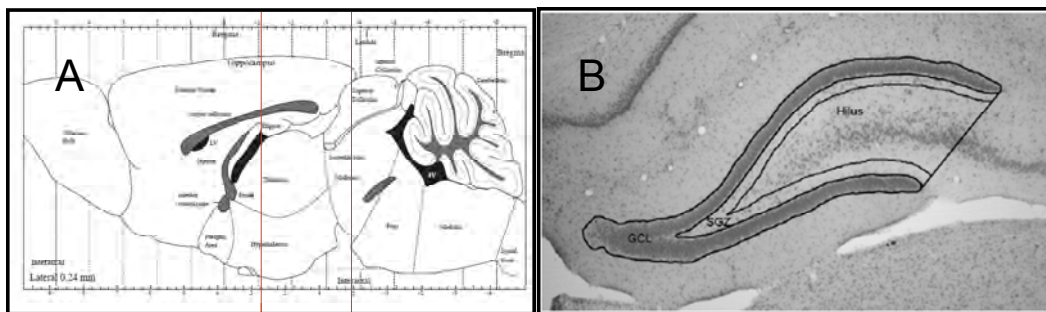


Figura 27. Metodología para el estudio de la proliferación y diferenciación celular *in vivo*. **A**, plano sagital del cerebro de ratón donde se muestra entre las líneas rojas el área definida para realizar el análisis inmunohistoquímico del número de células BrdU positivas. Modificada del atlas estereotáxico de ratón (Paxinos y Franklin, 2001) **B**, región del hipocampo considerada para el conteo de células BrdU+: GLC (capa de células granulares) y SGZ (zona subgranular) del hipocampo.

3.16 Microscopía electrónica

Los estudios de ME fueron realizados por el grupo del Dr. Miguel Garzón en el departamento de Anatomía de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

3.16.1 Preparación del tejido para ME

Los animales fueron anestesiados con Nembutal (100 mg/kg) y perfundidos, en primer lugar, con 100 ml de PB 0,1 M para el lavado, después con 100 ml de una solución de acroleína al 3,8% y PFA al 2% preparada en PB 0,1 M pH 7.4 y finalmente con 50 ml de PFA al 2% en PB 0,1 M. Tras la perfusión se extrajo el cerebro y se post-fijó en PFA 2% toda la noche. Utilizando

el vibratomo Series 3000 (Technical Products International, St. Louis, MO) se aisló el hipocampo realizando cortes de 500 μm y con la ayuda de una lupa y un bisturí se cortaron trapezoides de 1,5 mm^3 de tejido de la zona CA1 del hipocampo (Figura 28). Un total de 3 bloques de tejido por ratón fueron cortados. Cada bloque fue colocado en un vial de cristal, codificado y ciego para cada condición, para ser postfijado en tetraóxido de osmio al 1% en PB 0,1 M durante 2 horas, deshidratado en una serie de etanoles fríos de graduación creciente, e incubado durante 24 horas en una mezcla 1:1 de óxido propileno y resina epoxy (Embed 812, Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA) y, finalmente, durante 12-15 horas en resina epoxy al 100%. Una vez embebidos en la resina epoxy, los bloques se transfirieron a cápsulas de fondo plano con resina epoxy. La posición de cada uno de los 3 bloques que pertenecían a un mismo ratón se ajustó usando un palo de madera para asegurar que cada bloque tuviese una posición relativa diferente a los otros. El tejido fue polimerizado a 60°C durante al menos 48 horas para finalmente ser ultraseccionado en un ultramicrotomo, recogido en rejillas de cobre (nº de malla 400) y analizado con el microscopio electrónico Jeol JEM 1010 a 80KV acoplado a una cámara digital (GATAN BioScan Gatan Inc.).

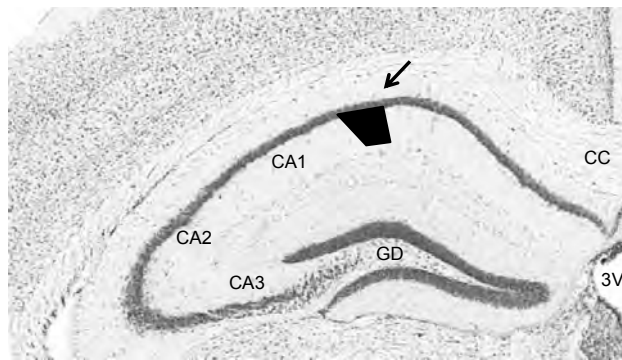


Figura 28. Región del hipocampo utilizada para el estudio de la densidad sináptica por ME. La imagen muestra la región hipocampal (flecha) que fue diseccionada para la obtención del bloque de tejido en forma de trapezoide de 1-1,5 mm^3 perteneciente al área CA1 del hipocampo. GD: giro dentado; CC: cuerpo calloso; 3V: tercer ventrículo.

3.16.2 *Análisis del número de sinapsis por ME*

Se tomaron 30 microfotografías de cada rejilla a 25000 aumentos. Como referencia se utilizó la esquina superior izquierda y la inferior derecha de cada uno de los cuadrantes de la rejilla para asegurarse de no fotografiar 2 veces la misma zona (Figura 29).

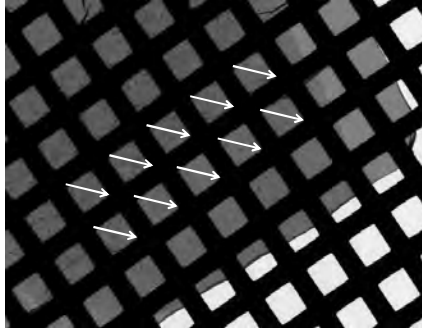


Figura 29. Rejilla de cobre utilizada en ME. El inicio y final de las flechas indican las zonas donde se tomaron las microfotografías.

Se seleccionaron las microfotografías a análisis utilizando un muestreo aleatorio, ciego para cada condición, en el cual 1 de cada 3 microfotografías de cada rejilla fueron seleccionadas. El número total de sinapsis, los perfiles donde esas sinapsis ocurrían (sinapsis en espinas o en tronco dendrítico) y la relación entre el número de sinapsis en espinas y el número de sinapsis totales, se analizaron con el programa ImageJ versión 1.46 (*National Institute of Health, USA*) utilizando un marco imparcial de conteo (Figura 30).

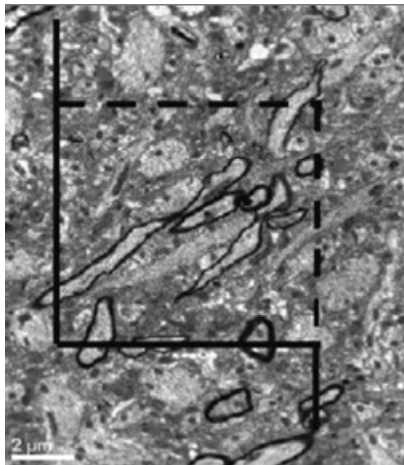


Figura 30. Regla del marco imparcial de conteo: se contaron las sinapsis totalmente incluidas en el marco y aquellas parcialmente incluidas que no tocaban o interseccionaban con las líneas completas del marco. Modificada de Zhang y col., 2008.

La clasificación de los elementos celulares estuvo basada en las descripciones realizadas por Peters y colaboradores (Peters y col., 1991). Las sinapsis asimétricas se identificaron por la presencia de gruesas densidades postsinápticas, mientras que las sinapsis simétricas se identificaron por la presencia de especializaciones finas pre y post-sinápticas. Además, las sinapsis se clasificaron como sinapsis en tronco dendrítico cuando ocurrían en la superficie de la

dendrita, o como sinapsis en espinas, si ocurrían en el terminal bulboso de una protusión relativamente corta ($<2\mu\text{m}$) separada del resto de la dendrita por un cuello o región más estrecha.

La estimación del número de perfiles por unidad de área se hizo por medio del método *size-frequency* (Colonnier y Beaulieu, 1985), siguiendo el protocolo recomendado por DeFelipe y colaboradores (DeFelipe y col., 1999), donde además se demuestra que este método da resultados equiparables al método del disector, pero siendo más eficiente y con una menor variabilidad que este último. Este método ha sido aplicado por otros grupos con resultados similares (Peters y col., 2008).

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS versión 15.0. Se utilizó la prueba T para muestras independientes a la hora de comparar 2 grupos y el Análisis de la Varianza (ANOVA) seguida de un contraste post-hoc para comparaciones múltiples. Cuando no existía homogeneidad de varianzas entre los grupos estudiados, las pruebas de contraste de hipótesis se evaluaron con tests no paramétricos. Se consideraron significativos valores de $p < 0,05$ y los datos se representaron como la media \pm Error estándar medio (SEM).

RESULTADOS

1. Detección inmunohistoquímica de los receptores *Ob-R* y megalina en ratones *APP/PS1*

La existencia previamente descrita de los receptores de leptina, *Ob-R* (Fei y col., 1997; Friedman, 1998) y megalina (Alvira-Botero y col., 2010) en el cerebro murino, fue comprobada en nuestro modelo transgénico *APP/PS1* mediante un ensayo de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos específicos anti-*Ob-R* y anti-megalina. Se observó una buena expresión de estos receptores en neuronas de corteza e hipocampo, regiones de especial interés en nuestro estudio (Figura 31).

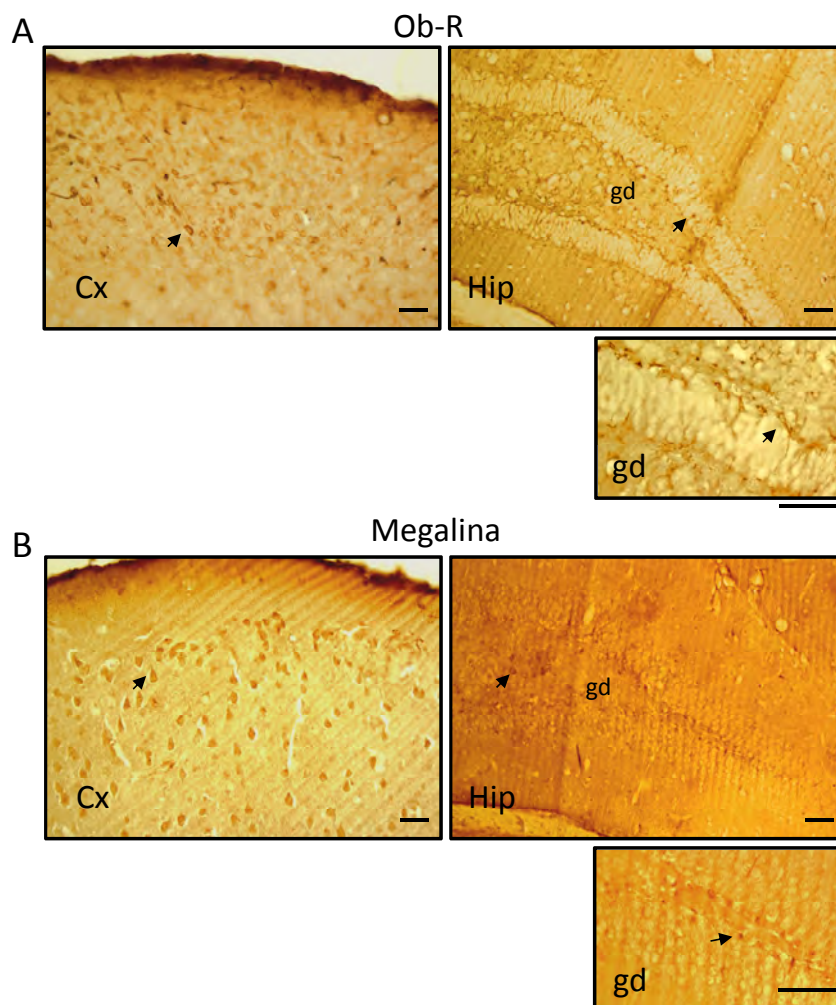


Figura 31. Detección inmuhistoquímica de los receptores *Ob-R* y megalina en ratones *APP/PS1*. Imágenes que muestran la expresión de *Ob-R* (A) y megalina (B) en corteza (Cx) e hipocampo (Hip), con ampliación de la zona del giro dentado (gd). Las flechas indican ejemplos de marcaje positivo en neuronas. Barra de calibración = 50 μ M.

2. Eficiencia del vector lentiviral

2.1 Expresión de leptina recombinante *in vitro*

Antes de llevar a cabo ensayos con animales, se comprobó que la construcción viral HIV-leptina mediaba eficientemente la expresión de leptina en neuronas corticales primarias que habían sido transfectadas con el vector lentiviral. Para ello, se realizó un *Western-blot* de los lisados celulares, utilizando el anticuerpo anti-HA, que reconoce la etiqueta HA de la leptina recombinante expresada por el lentivirus. Se observó una banda de 19,47 kDa correspondiente a la proteína HA-leptina que fue más intensa cuando los virus se transfectaban a una dilución de 10^{-3} (Figura 32).

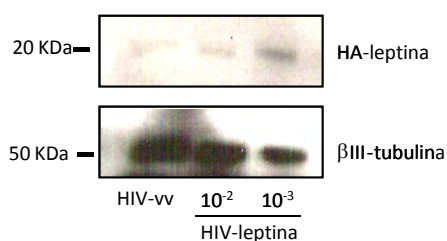


Figura 32. Eficiencia de la expresión de HA-leptina *in vitro*. *Western-blot* de la expresión de HA-leptina y βIII-tubulina (proteína normalizadora de carga) en cultivos de neuronas corticales transfectados con el vector HIV-vv o HIV-leptina a diferentes diluciones.

2.2 Expresión de leptina recombinante *in vivo*

La eficiencia de la transfección también fue testada *in vivo* tras la administración icv del vector lentiviral en los ratones APP/PS1. El lentivirus inyectado a nivel de los ventrículos laterales infectó las células epiteliales de los plexos coroideos (Figura 33A). Aunque la administración del lentivirus vía icv produce principalmente una infección localizada en las células de los plexos coroideos, también se ha visto que la infección puede difundir a otras áreas cerebrales, como el hipocampo y la corteza, como habíamos observado previamente en el laboratorio utilizando un lentivirus responsable de la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP: *Green fluorescent protein*), el HIV-GFP (Figura 34). De manera alternativa, la leptina recombinante sería secretada por las células de los plexos coroideos pudiendo alcanzar otras localizaciones en el cerebro a través de los receptores Ob-R y megalina.

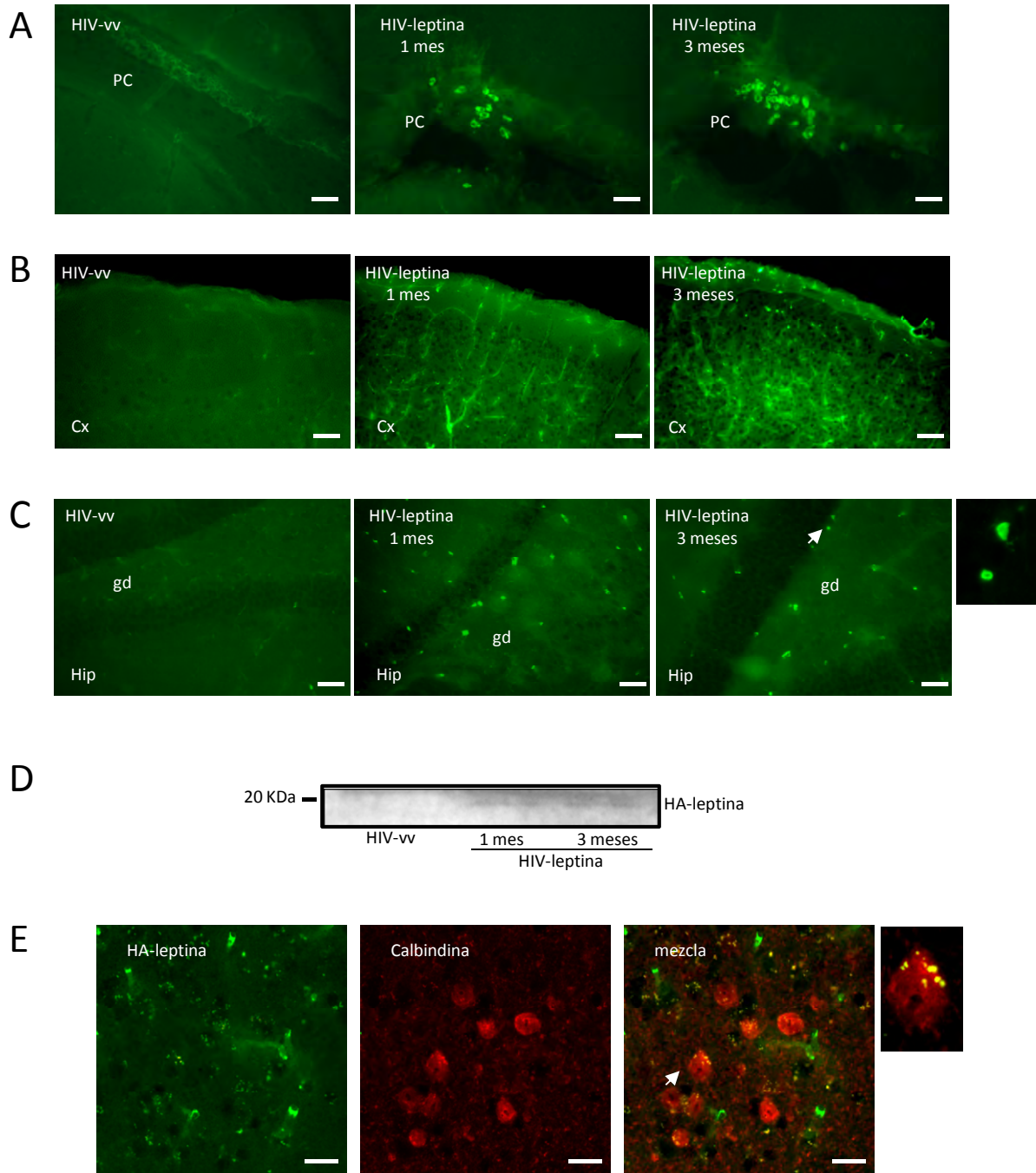


Figura 33. Eficiencia de la expresión de la HA-leptina *in vivo*. Detección por inmunofluorescencia de HA-leptina (verde) en plexos coroideos (A), corteza (B) y giro dentado del hipocampo (C). D, *Western-blot* correspondiente a la inmunoprecipitación de HA-leptina en corteza de ratones transgénicos APP/PS1 tratados con HIV-vv o HIV-leptina (1 y 3 meses). E, inmunofluorescencia doble mostrando HA-leptina (verde) y Calbindina (rojo). PC: plexos coroideos; Cx: corteza; hip (hipocampo); gd (giro dentado). Las flechas indican las zonas que se muestran ampliadas a la izquierda. Barra de calibración = 20 μ M.

En nuestro estudio se confirmó la existencia de leptina recombinante en otras localizaciones cerebrales mediante ensayos de inmunofluorescencia en secciones de cerebro de los ratones transgénicos utilizando un anticuerpo específico anti-HA. Se observó un marcaje positivo en corteza (Figura 33B) e hipocampo (Figura 33C) de ratones APP/PS1 que habían sido tratados con el vector HIV-leptina durante 1 y 3 meses. La especificidad de la inmunoreactividad se confirmó por la ausencia de marcaje en secciones de cerebros control, bien por omisión del anticuerpo primario o bien por inmunofluorescencia de las secciones de cerebros de ratón a los que se les administró HIV-vv. De forma paralela se detectó la expresión de la proteína de fusión HA-leptina en la corteza de los ratones APP/PS1, tanto al mes como a los 3 meses del inicio de la terapia génica, mediante la técnica *Western-blot* (Figura 33D). Adicionalmente y para confirmar la llegada de la leptina recombinante a las neuronas, se llevó a cabo un ensayo de inmunofluorescencia doble utilizando los anticuerpos específicos anti-Calbidina, un marcador de neuronas maduras y anti-HA, observándose colocalización de ambas moléculas en diferentes localizaciones cerebrales, como es el caso de neuronas corticales (Figura 33E).

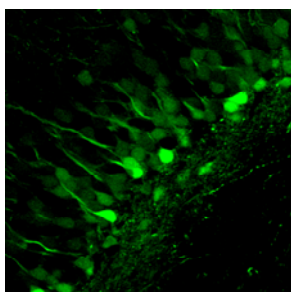


Figura 34. Expresión de GFP en células piramidales hipocampales tras inyección icv de las partículas virales HIV-GFP.

2.2.1 Efectos del lentivirus sobre la expresión de proteínas sinápticas

Para comprobar que la incorporación del lentivirus en las neuronas no afectaba a su funcionalidad, se llevó a cabo un ensayo *Western-blot* para comparar la expresión de las proteínas sinápticas sinapsina I y sinaptofisina en ratones APP/PS1 a los que se le había realizado una operación simulada *SHAM* y en ratones APP/PS1 que habían recibido el vector HIV-vv durante 3 meses. Tras el análisis densitométrico de las bandas obtenidas no se encontraron cambios significativos en la expresión de dichas proteínas ni en corteza (Figura 35A y B) ni en hipocampo (Figura 35C y D).

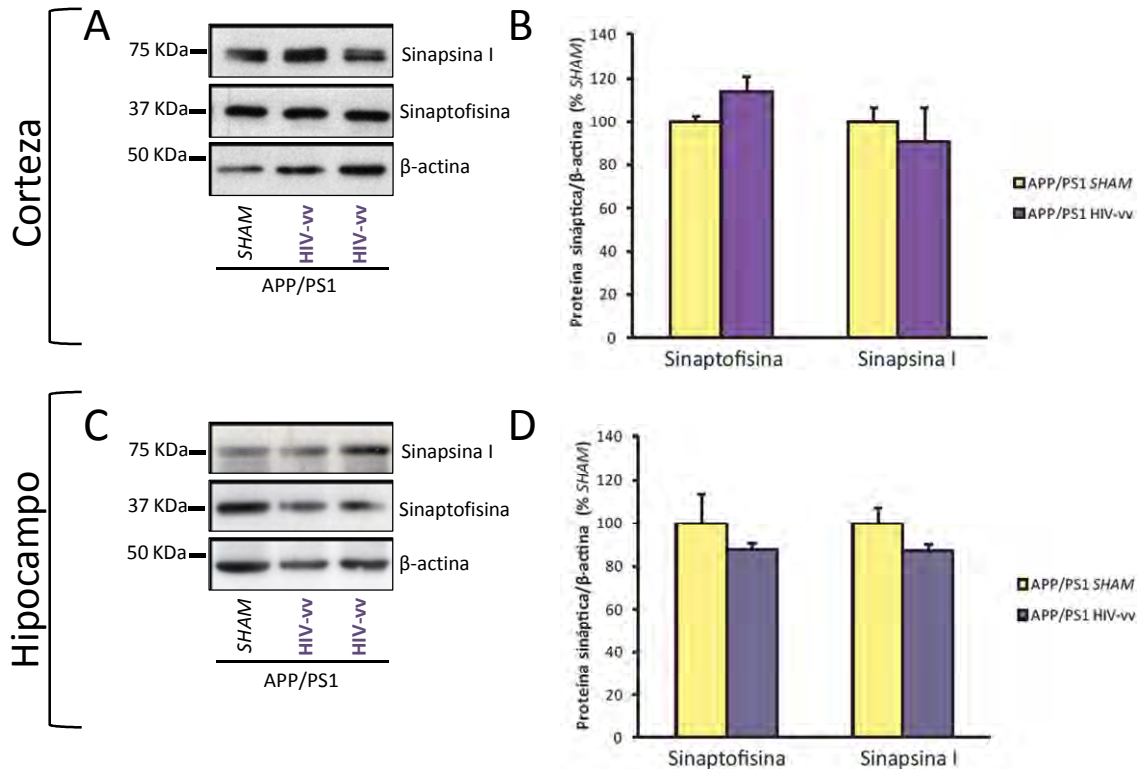


Figura 35. Expresión de las proteínas sinápticas sinaptofisina y sinapsina I en ratones APP/PS1 SHAM y APP/PS1 HIV-vv. *Western-blot* representativo de la expresión de sinaptofisina y sinapsina I en corteza (A) e hipocampo (C). Histogramas que representan la expresión de las proteínas sinápticas en corteza (B) e hipocampo (D). Los datos están expresados como la media \pm SEM (n=4).

2.2.2 Funcionalidad de la leptina expresada por el lentivirus

Una vez determinada la eficiencia de la infección lentiviral, se comprobó la funcionalidad de la leptina recombinante mediada por el lentivirus. Para ello se evaluó una de las vías clásicas de señalización de la leptina: la vía de señalización JAK-STAT3, donde la leptina es responsable de la fosforilación de STAT3. Se observó por *Western-blot* que los niveles de fosforilación de STAT3 (p-STAT3) en los ratones transgénicos APP/PS1 estaban incrementados significativamente ($p < 0.05$) frente a los controles, tanto en la corteza (Figura 36A y B) como en el hipocampo (Figura 36C y D), apoyando resultados descritos recientemente (Wan y col., 2010) donde también se observaba un incremento de los niveles de p-STAT3 en corteza e hipocampo del mismo modelo transgénico. Tras el tratamiento de 3 meses con la leptina recombinante, en lugar de producirse un incremento aún mayor de los niveles de p-STAT3 en los ratones APP/PS1, como esperaríamos *a priori*, se observó una reducción parcial de estos niveles con

respecto a los APP/PS1 tratados con HIV-vv tanto en corteza (Figura 36A y B) como en hipocampo (Figura 36C y D). El significado de este resultado será explorado más adelante en los modelos de experimentación *in vitro*.

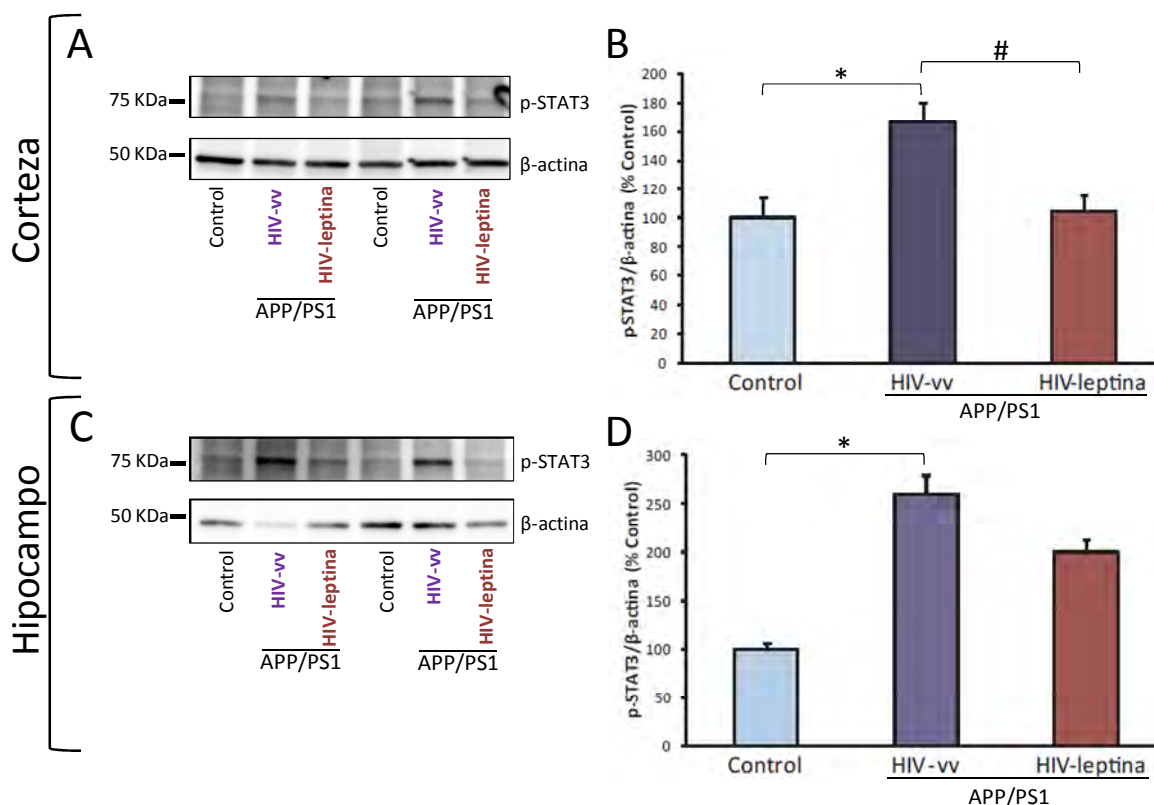


Figura 36. Expresión de p-STAT3 en ratones control y ratones APP/PS1 tratados con HIV-leptina o el vector vacío HIV-vv durante 3 meses. *Western-blot* representativo de la expresión de p-STAT3 en corteza (A) e hipocampo (C). Histogramas correspondientes a la densitometría de la expresión de p-STAT3 en corteza (B) e hipocampo (D). Los datos están expresados como la media ± SEM (n=6). * p<0,05; # p=0.06 (ANOVA, contraste post-hoc HSD de Tukey).

3. Efectos de la leptina sobre las alteraciones comportamentales

Para determinar si, a los 3 meses de la administración del lentivirus, los ratones APP/PS1 que habían sido tratados con el HIV-leptina mostraban una recuperación en el comportamiento y en las alteraciones cognitivas, se llevaron a cabo diferentes tests: el test del laberinto en T, el test del laberinto en cruz elevado y la prueba de reconocimiento del nuevo objeto. Previamente, se había

comprobado en el laboratorio que los ratones APP/PS1 sometidos a una operación simulada *SHAM* y los APP/PS1 inyectados con el HIV-vv, mostraban un comportamiento muy similar en las pruebas mencionadas anteriormente, por lo que para reducir el número de animales de experimentación, sólo se utilizaron como controles los ratones APP/PS1 tratados con el vector vacío HIV-vv.

En el test del laberinto en T se analizó, en primer lugar, el índice de alternancia espontánea observando que el grupo control no transgénico tenía el mayor porcentaje de aciertos, seguido del grupo APP/PS1 tratado con HIV-leptina, siendo el grupo APP/PS1 tratado con el vector vacío el que presentó menor porcentaje de aciertos (controles $73,7 \pm 4,9$ %; APP/PS1-HIV-vv $59,3 \pm 5,3$ %; APP/PS1-HIV-leptina $66,3 \pm 5,1$; valores expresados como la media de aciertos \pm SEM), aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas entre grupos. También se contabilizó la latencia, es decir, el tiempo en segundos que tardaron los animales en tomar la decisión correcta. Se observó una mayor latencia en los ratones transgénicos al compararlos con los controles (Figura 37A), que fue significativa estadísticamente ($p < 0,05$). Este tiempo también se vió reducido de manera significativa ($p < 0,05$) en los ratones APP/PS1 tratados con HIV-leptina al compararlos con los que recibieron HIV-vv (Figura 37A).

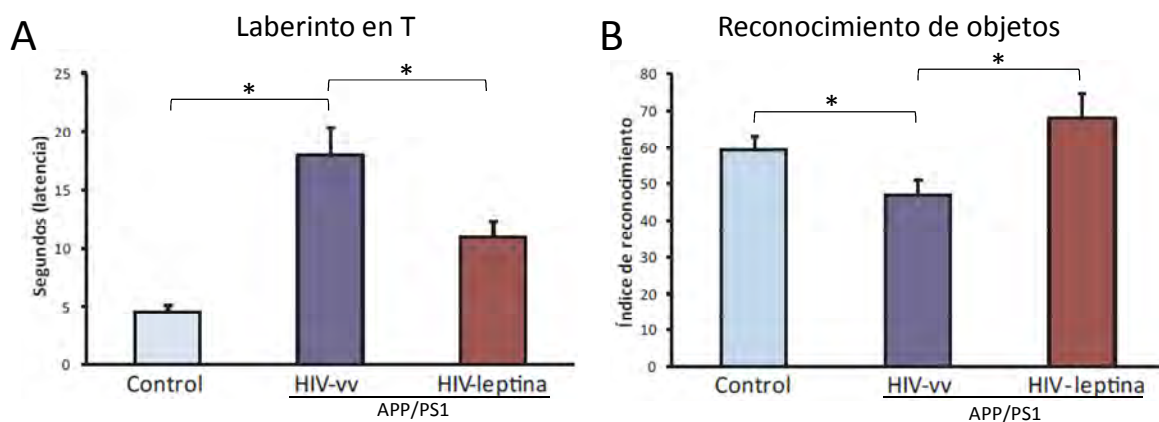


Figura 37. Estudios de comportamiento en ratones control y transgénicos APP/PS1 tratados con HIV-leptina o HIV-vv durante 3 meses. **A**, histograma que muestra el tiempo en segundos (latencia) que tardó el animal en elegir la opción correcta en el test del laberinto en T. **B**, histograma que muestra el índice de reconocimiento en la prueba de reconocimiento del nuevo objeto. Los datos están expresados como las media \pm SEM ($n=8-12$). * $p < 0,05$ (ANOVA, contraste post-hoc HSD de Tukey).

Al valorar la capacidad cognitiva de los ratones a través de la prueba de reconocimiento del nuevo objeto, se observó que el índice de reconocimiento en los ratones transgénicos APP/PS1 estaba significativamente alterado al compararlo con la de los ratones control, y que la capacidad de retención en los APP/PS1 tratados con HIV-leptina se restableció completamente (Figura 37B).

En la prueba del laberinto en cruz elevado se contabilizó el número de entradas en brazos abiertos, el número de entradas en brazos cerrados y el tiempo que permanecían en cada uno de los brazos. Para valorar el estado de ansiedad de los animales, se calculó el ratio entre el número de entradas a los brazos abiertos y el número de entradas totales (brazos abiertos y brazos cerrados); y el ratio entre el tiempo que permanecían en los brazos abiertos y el tiempo total que permanecían en brazos abiertos o cerrados. No se observaron diferencias significativas en los niveles de ansiedad de los diferentes grupos de nuestro diseño experimental. Sin embargo, se detectó un menor número de entradas a los brazos abiertos ($p < 0,05$) y a los cerrados ($p < 0,01$) en los dos grupos de ratones transgénicos con respecto a los controles. También se observó una menor duración en los brazos abiertos ($p < 0,05$) en los ratones APP/PS1 que recibieron el vector vacío al compararlos con los controles. Los relación de datos obtenidos en el test del laberinto en cruz elevado se resume en la siguiente tabla:

Laberinto en cruz elevado	Control	APP/PS1 HIV-vv	APP/PS1 HIV-leptina
Entradas brazos abiertos	3,7 ± 0,4	1,3 ± 0,6*	1,7 ± 0,6*
Entradas brazos cerrados	11,1 ± 1,5	4,1 ± 1,3**	2,8 ± 0,7**
Abiertos/total entradas (%)	26,6 ± 3,6	25,8 ± 10,3	27,0 ± 7,9
Duración brazos abiertos	30,7 ± 5,3	8,3 ± 4,0*	22,8 ± 8,9
Duración brazos cerrados	228,6 ± 22,5	178,2 ± 37,3	210,5 ± 21,6
Abiertos/duración total (%)	12,9 ± 2,6	13,0 ± 10,4	10,9 ± 4,0

Tabla 13. Resultados del test del laberinto en cruz elevado. Los datos están expresados como la media ± SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ respecto al control (ANOVA, contraste post-hoc HSD Tukey).

4. Efectos de la leptina sobre la acumulación de placas amiloideas

Mediante un ensayo de inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo específico anti-A β que reconoce tanto el péptido endógeno (murino) como el transgénico (humano), se evaluaron los

niveles de amiloidosis en ratones APP/PS1 tras 1 (7 meses de edad) o 3 meses (9 meses de edad) de terapia génica con leptina.

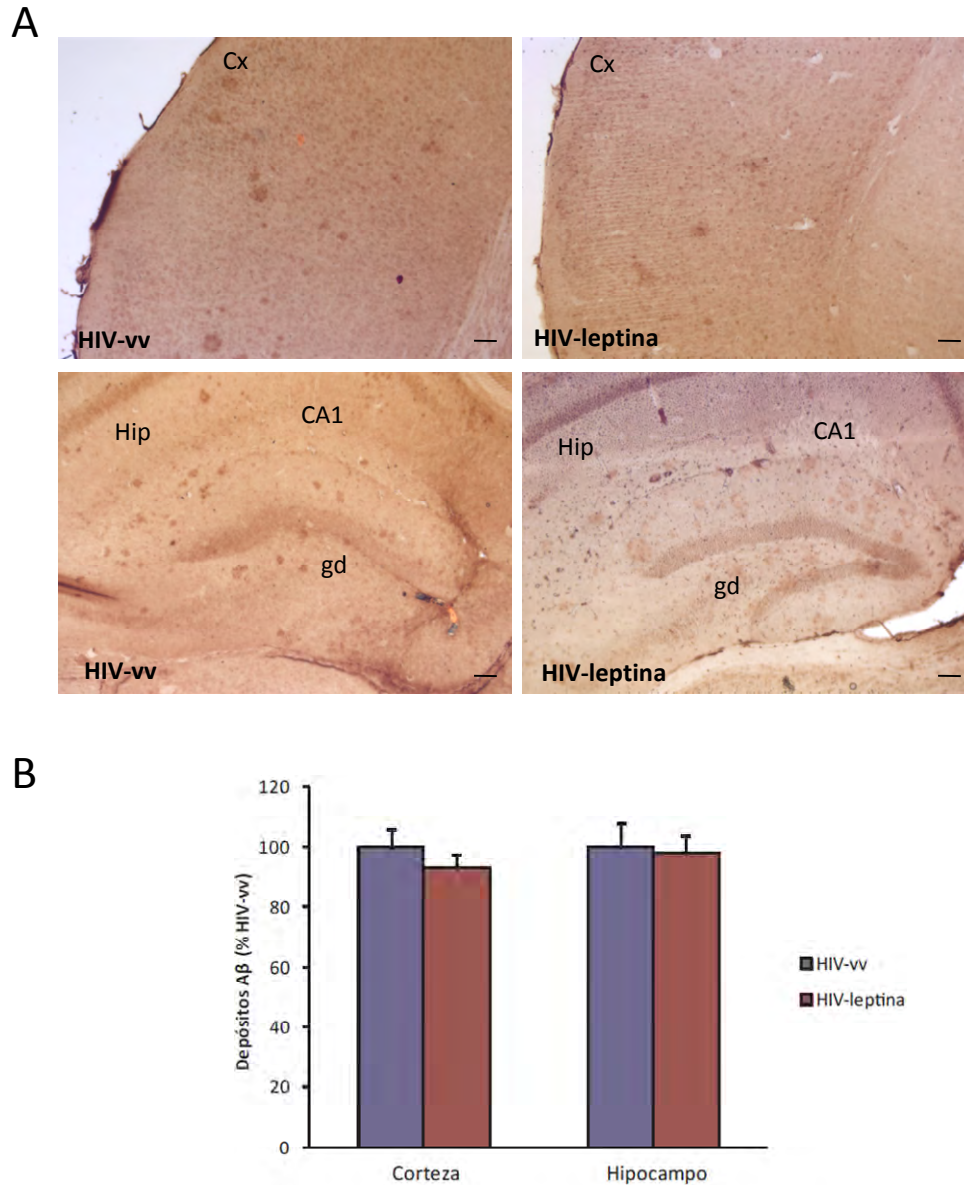


Figura 38. Efecto del HIV-leptina sobre la amiloidosis en ratones transgénicos APP/PS1 tras 1 mes de terapia génica. **A**, detección de placas amiloides en corteza (Cx) e hipocampo (Hip) mediante inmunohistoquímica-DAB tras 1 mes de terapia génica con HIV-leptina en APP/PS1 de 7 meses de edad tratados con HIV-vv o con HIV-leptina. **B**, histograma que representa el área de la corteza afectada por placas amiloides en corteza e hipocampo de los ratones transgénicos tratados con HIV-vv o HIV-leptina. Los datos están expresados como la media \pm SEM (n=5). GD: giro dentado; CA1: región CA1 del hipocampo. Barra de calibración = 20 μ m.

Tras 1 mes de terapia génica con leptina no se observaron cambios significativos en los niveles de amiloidosis de ratones APP/PS1 de 7 meses de edad (Figura 38). Sin embargo, encontramos que el marcaje de A β en el parénquima cerebral de los ratones APP/PS1 se redujo de manera significativa tras 3 meses de tratamiento con el vector HIV-leptina. El análisis densitométrico de las placas amiloides teñidas con el anticuerpo anti-A β (Figura 39A) indicó que tras la administración del vector HIV-leptina, el área del parénquima cerebral positiva para A β se vió reducida. La inmunotinción para A β en ratones APP/PS1 tratados con HIV-leptina reveló una reducción del 34% del área teñida en la corteza cerebral ($p < 0,01$) y del 22% en el hipocampo ($p < 0,05$) (Figura 39A y B).

De manera adicional se llevó a cabo un ensayo de tinción con el colorante Tioflavina-S para detectar depositos de A β confirmando así los resultados inmunohistoquímicos previos, al observar menor número de depósitos y de menor tamaño tras el tratamiento con HIV-leptina (Figura 39C).

Con el objetivo de cuantificar de una manera más precisa los cambios en los niveles de los péptidos amiloides, A β -40 y A β -42, tras el tratamiento con HIV-leptina, se llevó a cabo su cuantificación mediante un ensayo ELISA para cada uno de los péptidos. El resultado fue que los animales tratados con HIV-leptina durante 3 meses mostraron una disminución significativa ($p < 0,05$) de los niveles de A β -42 tanto en corteza como en hipocampo. En cuanto al péptido A β -40, también observamos una tendencia, aunque no estadísticamente significativa, a la disminución de sus niveles tras la terapia génica con leptina en corteza e hipocampo. Los datos obtenidos en los ensayos ELISA se resumen en la siguiente tabla:

	A β -40 (% HIV-vv)	A β -42 (% HIV-vv)
Corteza	42,6 \pm 13,8	26,5 \pm 10,9*
Hipocampo	47,34 \pm 20,89	41,21 \pm 15,19*

Tabla 14: Resultados del ELISA de A β -40 y A β -42 en corteza e hipocampo de los ratones APP/PS1 tras 3 meses de terapia génica con leptina. Los resultados están expresados como la media \pm SEM de los niveles respecto a los transgénicos tratados con HIV-vv, que tendrían el 100%. * $p < 0,05$ (prueba T para muestras independientes).

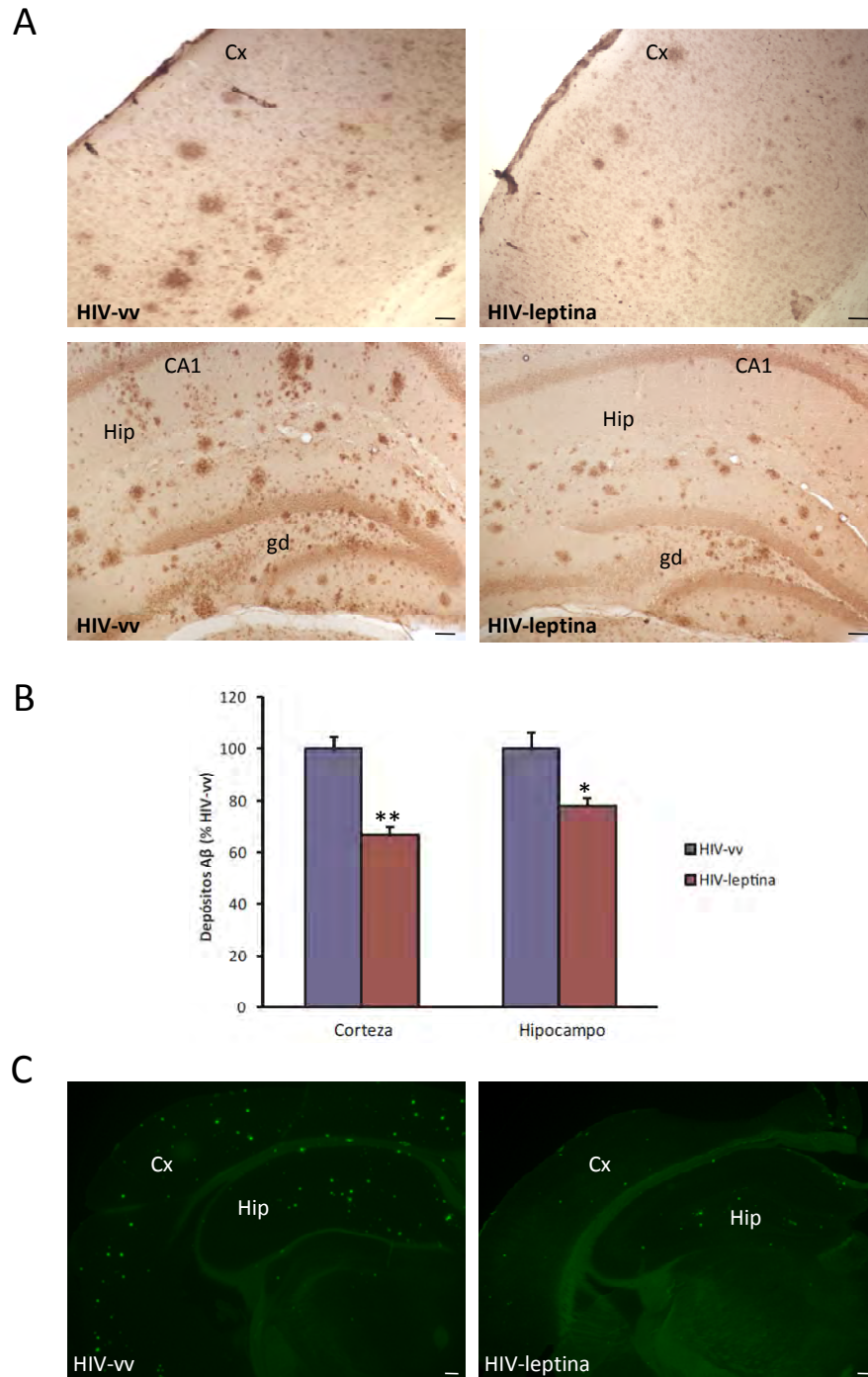


Figura 39. Efecto del HIV-leptina sobre la amiloidosis en ratones transgénicos APP/PS1 tras 3 meses de terapia génica. **A**, detección de placas amiloides en corteza (Cx) e hipocampo (Hip) mediante inmunohistoquímica DAB en ratones APP/PS1 de 9 meses de edad tratados con HIV-leptina o HIV-vv. **B**, histograma que muestra el porcentaje del área afectada por las placas amiloides en corteza e hipocampo. **C**, tinción de placas amiloides con el colorante Tioflavina-S (verde) en ratones APP/PS1 tras 3 meses de terapia génica con HIV-leptina o HIV-vv. gd: giro dentado; CA1: región CA1 del hipocampo. Los datos están expresados como la media \pm SEM (n=8). ** p<0,01; * p<0,05 (prueba T para muestras independientes). Barra de calibración = 20 μ m.

5. Efectos de la leptina sobre la proteína BACE1

Con el fin de investigar el mecanismo implicado en la reducción de las placas amiloides en ratones APP/PS1 tratados con HIV-leptina, se llevó a cabo un ensayo *Western-blot* para la evaluación de la expresión de la enzima BACE, debido a los antecedentes existentes en la literatura que demuestran que la leptina es capaz de regular los niveles de esta proteína (Fewlass y col., 2004).

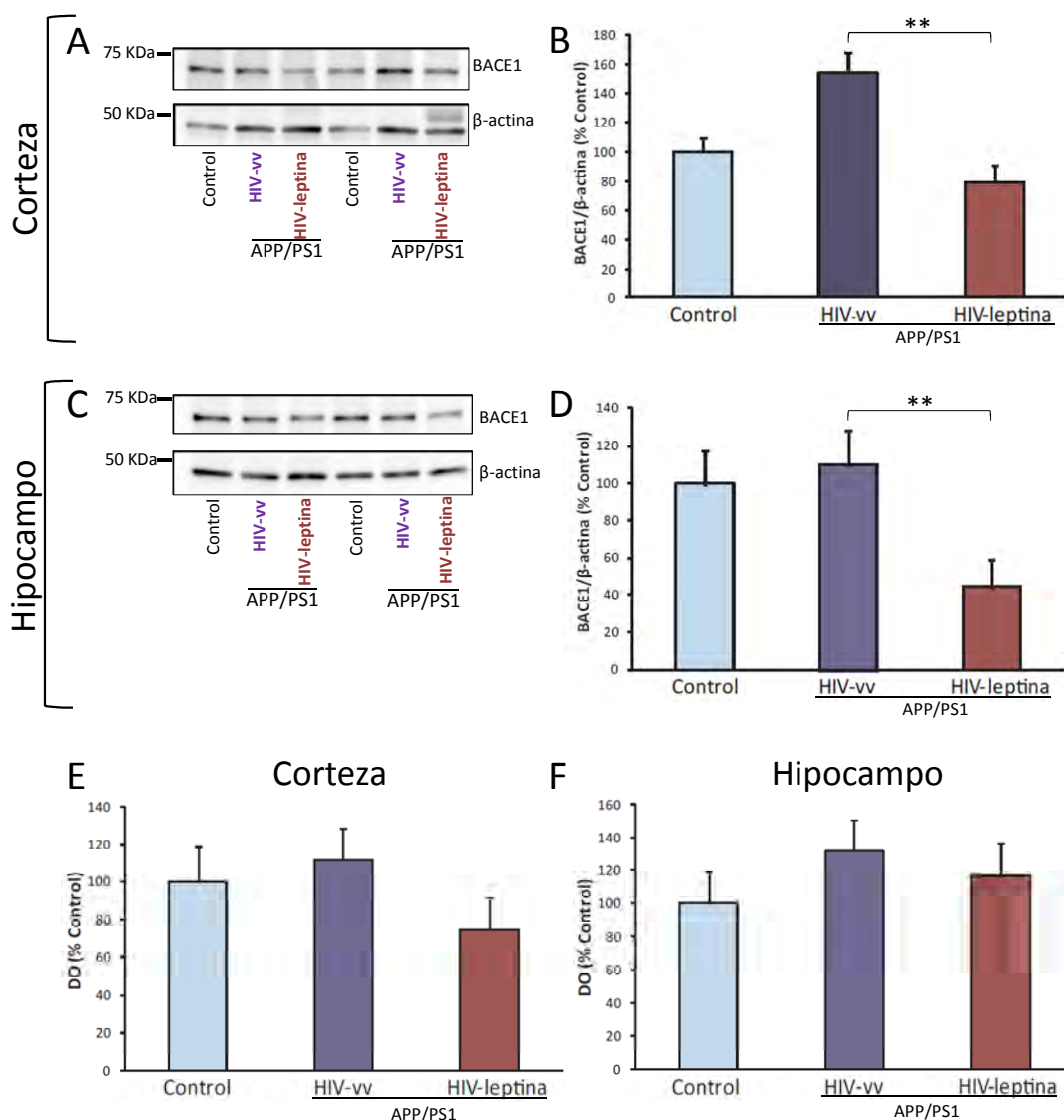


Figura 40. Expresión y actividad de BACE1 en ratones control y APP/PS1 tratados con HIV-vv o HIV-leptina durante 3 meses. *Western-blot* representativo de los niveles de BACE1 en corteza (A) e hipocampo (C). Histograma del análisis densitométrico de la expresión de BACE1 en corteza (B) e hipocampo (D). Histograma de los niveles de actividad de BACE1 medidos por ELISA en corteza (E) e hipocampo (F). DO = densidad óptica. Los datos están expresados como la media \pm SEM. ** $p < 0,01$ (ANOVA, contraste post-hoc HSD de Tukey).

Se observó una disminución significativa ($p < 0,01$) de la expresión de BACE1 tanto en corteza (Figura 40A y B) como en hipocampo (Figura 40C y D) de los ratones transgénicos tratados con HIV-leptina al compararlos con los que habían recibido el vector vacío. No se observaron, sin embargo, diferencias significativas entre los controles no transgénicos y los ratones transgénicos tratados con HIV-vv (Figura 40B y D). Adicionalmente, también se analizaron los niveles de actividad enzimática de BACE1 mediante un ensayo ELISA, no encontrando diferencias significativas entre grupos ni en la corteza (Figura 40E) ni en el hipocampo (Figura 40D).

Con el objetivo de contrastar los resultados obtenidos en relación a la expresión de BACE1 en ratones control y transgénicos, también se evaluó la expresión de BACE1 en muestras de corteza humana de controles y pacientes enfermos con diferentes grados de demencia. Del mismo modo no se encontraron diferencias significativas entre los grupos a estudio (Figura 41).

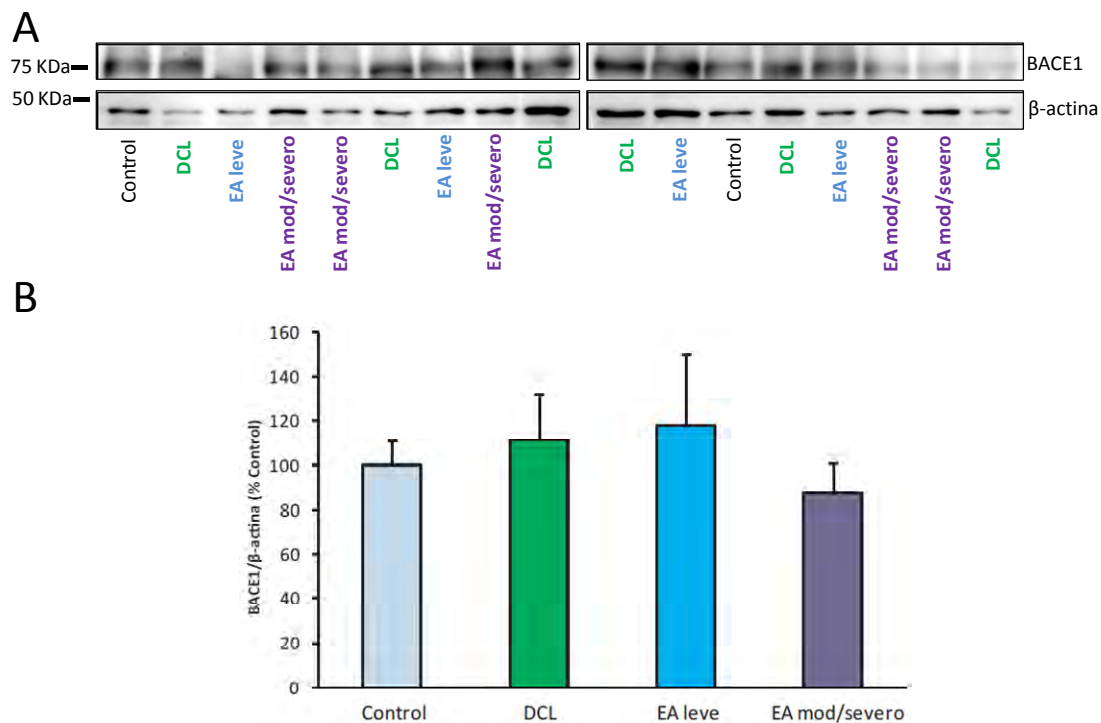


Figura 41. Expresión de BACE1 en muestras de corteza humana de controles y pacientes con diferentes grados de demencia. **A**, *Western-blot* representativo de los niveles de BACE1 en corteza humana de controles y pacientes con diferentes grados de demencia (DCL: deterioro cognitivo leve; EA leve; EA mod/severo). **B**, histograma que representa la expresión de BACE1 en los distintos grupos. Los datos están expresados como la media \pm SEM (n=6-8).

6. Efectos de la leptina sobre la respuesta inflamatoria: activación de astrocitos y microglía

Para el estudio de los efectos de la terapia génica con leptina de 3 meses sobre la respuesta inflamatoria, se analizó en primer lugar la expresión de astrocitos en corteza e hipocampo de ratones control y transgénicos APP/PS1. Para ello se llevó a cabo un ensayo de inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo específico anti-GFAP. Tras densitometrar el área que ocupaban los astrocitos se detectó un aumento significativo ($p < 0,05$) de la expresión de GFAP en la corteza de ratones transgénicos con respecto a los controles no transgénicos (Figura 42A y B). También se observó que este aumento fue más moderado en los ratones APP/PS1 tratados durante 3 meses con HIV-leptina al compararlos con los que recibieron HIV-vv (Figura 42A y B).

En relación a la expresión de astrocitos en el hipocampo, no se detectaron diferencias significativas en la expresión de GFAP entre los diferentes grupos analizados (Figura 42C y D).

Tanto en el cerebro de enfermos de EA, como en modelos transgénicos de amiloidosis existe una infiltración de astrocitos activados en el área de las placas de $A\beta$ (Matsuoka y col., 2001; Carro y col., 2006b). Por esta razón, en nuestro estudio también se analizó el efecto de la terapia génica con HIV-leptina sobre el área que ocupaban los astrocitos reactivos agrupados alrededor de las placas amiloides en la corteza de los ratones transgénicos APP/PS1. Para ello se llevó a cabo un ensayo de inmunofluorescencia doble utilizando los anticuerpos específicos anti- $A\beta$ y anti-GFAP (Figura 43A). Tras el análisis densitométrico se observó una disminución significativa ($p < 0,01$) de la astrogliá reactiva asociada a las placas amiloides en ratones APP/PS1 tratados con HIV-leptina respecto a la encontrada en aquellos que recibieron el vector vacío (Figura 43B).

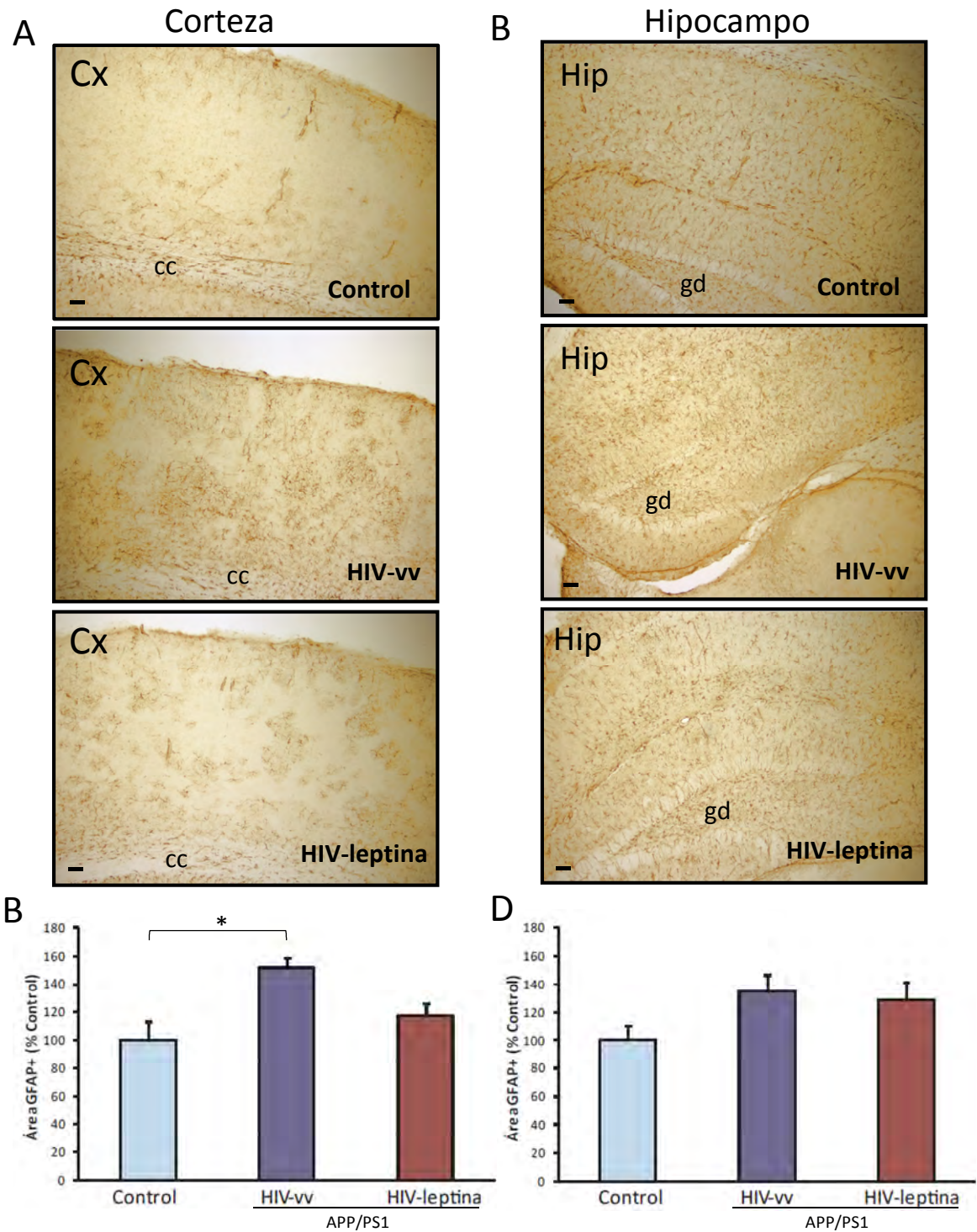


Figura 42. Astrogliosis en corteza e hipocampo de ratones control y APP/PS1 tratados con HIV-leptina o HIV-vv durante 3 meses. Inmunohistoquímica-DAB utilizando un anticuerpo específico anti-GFAP en corteza (Cx, **A**) e hipocampo (Hip, **B**).cc=corpus callosum; gd=giro dentado. Histogramas que muestran el porcentaje de área GFAP+ en corteza (**C**) e hipocampo (**D**). Los datos están expresados como la media ± SEM (n=5). Barra de calibración 50 µm; * p<0,05 (ANOVA, contraste post-hoc HSD de Tukey).

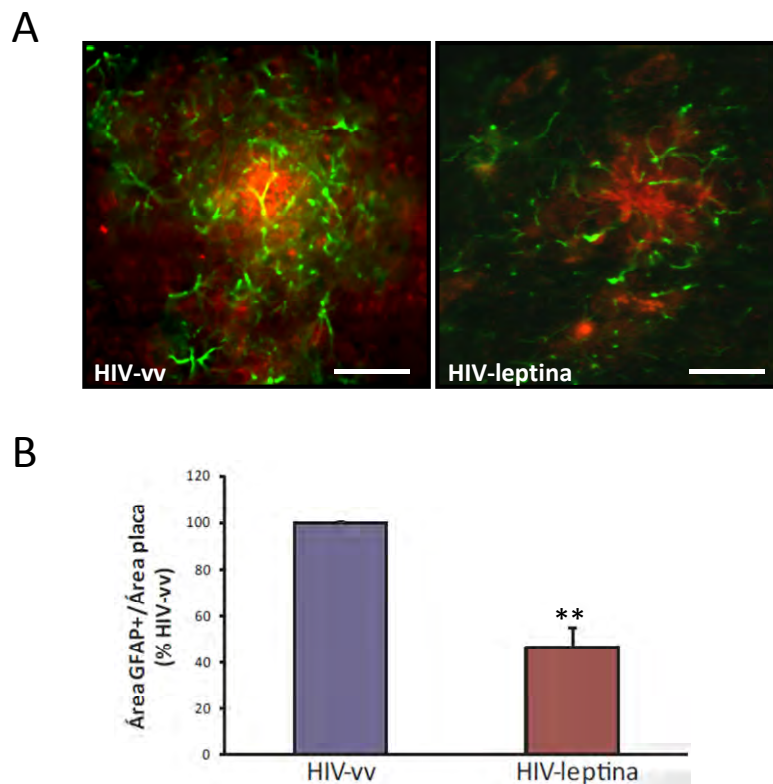


Figura 43. Efecto del HIV-leptina sobre la astrogliosis asociada a placas amiloides en corteza de ratones APP/PS1 tras 3 meses de terapia génica. **A**, inmunofluorescencia doble mostrando astrocitos reactivos (verde) y placas amiloides (rojo) en ratones APP/PS1 tratados con HIV-leptina o HIV-vv. **B**, histograma que representa el área en porcentaje que ocupan los astrocitos reactivos alrededor de las placas amiloides. Los datos están expresados como la media \pm SEM (n=5-6). ** $p < 0,01$ (prueba T para muestras independientes). Barra de calibración = 20 μ m.

En relación a la microglía *in vivo*, utilizando la lectina como marcador de microglía (Acarin y col., 1994; Ramirez y col., 2005; Rodriguez y col., 2010), parece que la leptina activó las células microgliales, a juzgar por el mayor área cerebral teñida con lectina de tomate como marcador de microglía (Figura 44A), aunque no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Figura 44B).

Para comprobar esta posible activación microglial por parte de la leptina se recurrió, como modelo experimental *in vitro*, a los cultivos primarios de microglía tratados con la endotoxina LPS. Se observó que la leptina produjo un aumento en la respiración mitocondrial (ensayo MTT) de células microgliales, siendo este efecto dosis-dependiente en el rango de 1.25-10 μ g/ml (Figura 45A). De forma paralela se produjo un incremento en la liberación de nitritos (ensayo de

Griess) en el medio de cultivo (Figura 45B). Es interesante observar que bajas concentraciones de leptina (0,25-1 μ g/ml), que no alteran la respiración mitocondrial ni la generación de nitritos en los cultivos microgliales, son capaces de contrarrestar la generación de nitritos inducida por el LPS (Figura 45C). En resumen parece que la leptina ejercería un papel dual, por una parte induce la activación microglial en altas concentraciones, pero en concentraciones más bajas es capaz de bloquear un proceso inflamatorio.

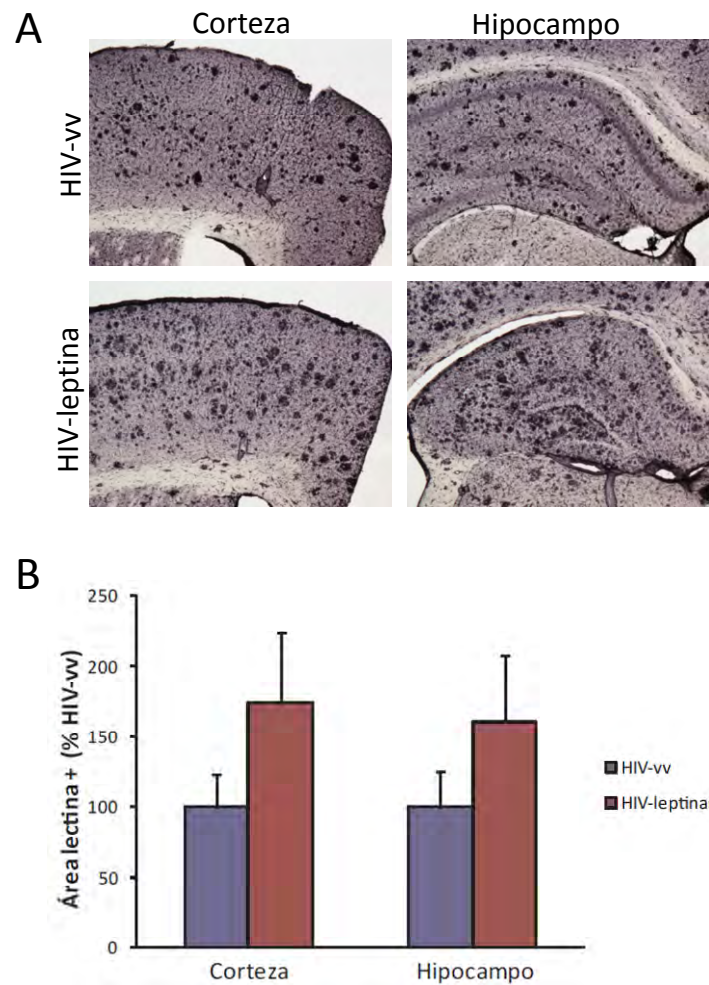


Figura 44. Efectos del HIV-leptina sobre la activación microglial en ratones APP/PS1 tras la terapia génica de 3 meses. **A**, detección de la microglía activada mediante el marcaje con lectina de tomate en ratones APP/PS1 tratados con HIV-leptina o HIV-vv. **B**, histograma que se representa el porcentaje del área positiva para el marcaje con lectina de tomate en los ratones transgénicos APP/PS1 tratados con HIV-vv o HIV-leptina. Los datos están representados como la media \pm SEM (n=8).

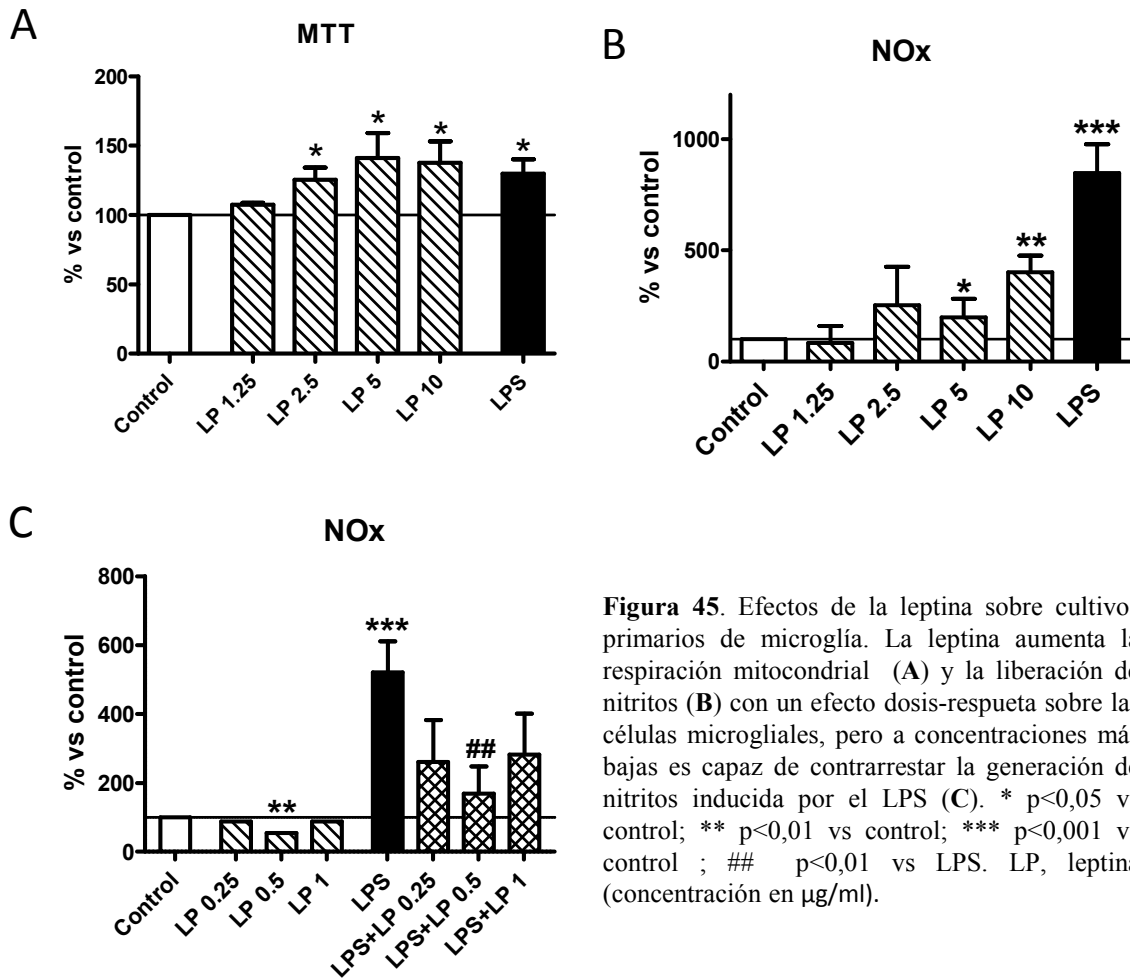


Figura 45. Efectos de la leptina sobre cultivos primarios de microglía. La leptina aumenta la respiración mitocondrial (A) y la liberación de nitritos (B) con un efecto dosis-respuesta sobre las células microgliales, pero a concentraciones más bajas es capaz de contrarrestar la generación de nitritos inducida por el LPS (C). * p<0,05 vs control; ** p<0,01 vs control; *** p<0,001 vs control ; ## p<0,01 vs LPS. LP, leptina (concentración en µg/ml).

7. Efectos de la leptina sobre los terminales sinápticos

7.1 Estudios in vivo

7.1.1 Estudio del número de sinapsis por ME

Para determinar si el deterioro cognitivo en los ratones transgénicos APP/PS1 y la recuperación después del tratamiento con HIV-leptina estaba asociado con alteraciones sinápticas se evaluó la densidad de sinapsis en el hipocampo de los ratones bajo experimentación. Para ello se llevó a cabo la cuantificación de las sinapsis en las neuronas

piramidales CA1 del hipocampo dorsal de ratones control y ratones APP/PS1 utilizando la ME. El área total que se analizó en cada grupo experimental fue de $35280 \mu\text{m}^2$ (en cada uno de los animales que componen cada grupo se estudió un área de $8820 \mu\text{m}^2$). En general se observó que los 3 grupos tenían un gran predominio de sinapsis asimétricas (promedio del porcentaje de sinapsis asimétricas en cada grupo: Control: $97.67\% \pm 0.73\%$; APP/PS1-HIV-vv: $97.48\% \pm 1.16\%$; APP/PS1-HIV-leptina: $98.78\% \pm 1.10\%$), razón por la cual no se discriminó el tipo de sinapsis (simétricas o asimétricas) en la estimación de la cantidad de sinapsis por unidad de área. También se observó que la mayoría de los contactos sinápticos ocurrían entre terminales axónicos y espinas dendríticas.

Antes de proceder a comparar nuestros 3 grupos experimentales, y a consecuencia de que, hasta la fecha no existen referencias en la literatura en relación a la densidad sináptica en los ratones transgénicos APP/PS1, se comparó exclusivamente la densidad sináptica entre los grupos control y transgénico APP/PS1. Para ello, el número total de sinapsis, el número de sinapsis que ocurrían en espinas, el número de sinapsis que ocurrían en troncos dendríticos y el porcentaje de sinapsis en espinas respecto a las sinapsis totales, fueron evaluadas. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 15. Interesantemente se observó que en el modelo transgénico existía una disminución significativa ($p < 0,05$) en el número de sinapsis que ocurrían en las espinas dendríticas con respecto a las sinapsis totales (Tabla 15).

Una vez determinada la existencia de una alteración del número de sinapsis en espinas respecto al total de sinapsis en los ratones transgénicos, se exploró la capacidad de la terapia génica de 3 meses con leptina en revertir estas anomalías.

	Control	APP/PS1
N° total de sinapsis/μm^3	$1,52 \pm 0,12$	$1,23 \pm 0,13$
N° sinapsis en espinas/μm^3	$1,34 \pm 0,12$	$1,04 \pm 0,12$
N° sinapsis en tronco/μm^3	$0,17 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,02$
% sinapsis en espinas	$88,40 \pm 0,66$	$83,94 \pm 1,30^*$

Tabla 15. Perfiles sinápticos en la región CA1 del hipocampo de ratones control y transgénicos APP/PS1. Los valores están expresados como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ (prueba no paramétrica U de Mann Whitney).

De esta manera, tras calcular el porcentaje de contactos sinápticos en espinas respecto al total de sinapsis, se apreció que el mayor porcentaje de sinapsis con espinas aparecía en el grupo control, siendo menor en el grupo APP/PS1 que recibió HIV-vv y mejorando en el grupo APP/PS1 tratado con HIV-leptina (Figura 46), aunque no se detectaron diferencias significativas ($p=0,077$) entre los grupos estudiados tras analizar los resultados con el test Kruskal-Wallis para muestras no paramétricas.

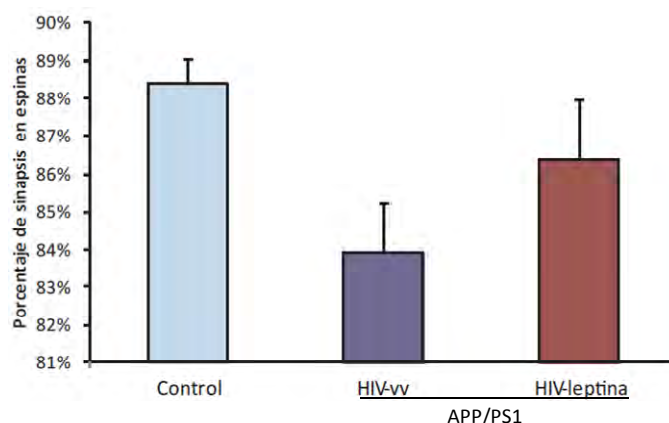


Figura 46. Sinapsis en espinas en la región CA1 del hipocampo de ratones control y APP/PS1 tratados con HIV-leptina o HIV-vv durante 3 meses. El histograma muestra el porcentaje de sinapsis en espinas con respecto al total de las sinapsis. Los datos están representados como la media \pm SEM. $p=0,077$ (prueba no paramétrica Kruskal-Wallis).

En relación a las características morfológicas se observó que las estructuras sinápticas en el grupo control no transgénico estaban más organizadas que en los grupos transgénicos que presentaban en general mayor desorganización y signos de dilatación de las diferentes formaciones (Figura 47). Los ratones del grupo control presentaban una amplia cantidad de sinapsis entre terminales axónicos y espinas dendríticas (Figura 47A y B). En el grupo APP/PS1 que recibió el vector vacío en general se observaron menos sinapsis entre terminales axónicos y espinas. La mayoría de las sinapsis observadas fueron entre terminales y troncos dendríticos (Figura 47C y D). En cuanto a los ratones transgénicos que recibieron el vector HIV-leptina se observó generalmente que el tejido era heterogéneo con zonas donde había varias sinapsis en espinas dendríticas (similar al control) y otras donde predominaban las sinapsis con troncos dendríticos (similar al grupo APP/PS1 HIV-vv) (Figura 47E y F).

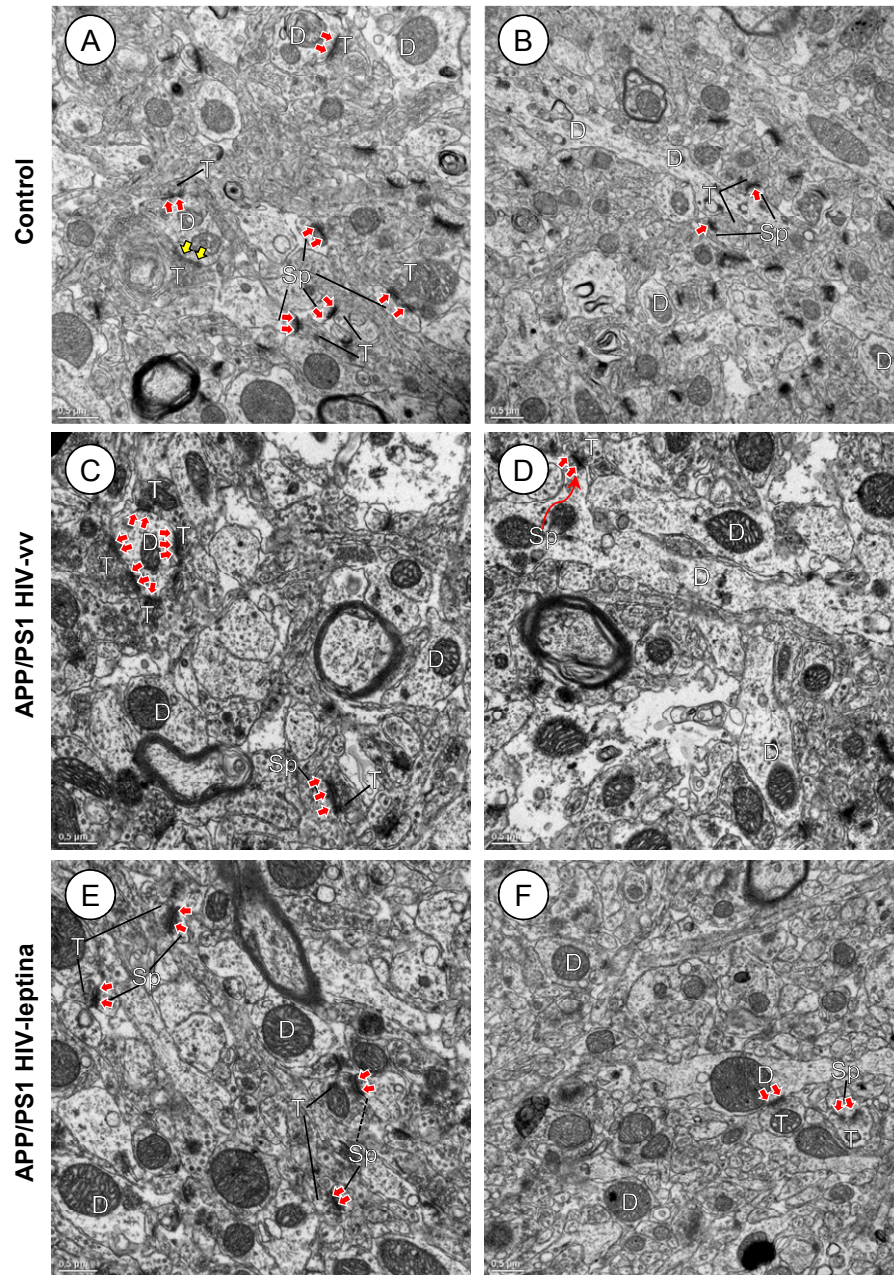


Figura 47. Microfotografías representativas de ME que muestran las sinapsis en la región CA1 de ratones control y transgénicos APP/PS1 tratados con el vector HIV-leptina o el vector vacío HIV-vv. **A**, troncos dendríticos (D) hacen contactos sinápticos primordialmente asimétricos (flechas rojas) con diversos terminales axónicos (T), aunque ocasionalmente se observan sinapsis simétricas (flechas amarillas). **B**, se observan tanto dendritas cortadas longitudinal como transversalmente (D) y se aprecian contactos sinápticos asimétricos entre espinas (Sp) y terminales (T). **C**, una dendrita (D) hace varios contactos sinápticos (flechas rojas) con diversos terminales. Se observan dendritas que no hacen contactos sinápticos y una espina (Sp) que hace una sinapsis asimétrica con un terminal (T). **D**, se observa como se origina una espina dendrítica (Sp) desde un tronco dendrítico (D) (flecha curva roja). Esta espina hace una sinapsis asimétrica con un terminal (T). Se observan varios troncos dendríticos (D). **E**, contactos sinápticos asimétricos (flechas rojas) entre espinas (Sp) y terminales (T). Se observan diversos troncos dendríticos uno de ellos cortado transversalmente donde se forma una espina dendrítica (línea punteada). En esta espina hay una sinapsis asimétrica. **F**, sinapsis asimétrica (flechas rojas) entre una dendrita cortada longitudinalmente (D) y un terminal (T). Además una sinapsis en hendidura en una espina (Sp).

7.1.2 *Estudio bioquímico de las alteraciones sinápticas*

Con el propósito de explorar los mecanismos bioquímicos responsables del posible efecto de la leptina sobre la densidad sináptica, se evaluaron los niveles de varias proteínas implicadas en la plasticidad sináptica neuronal tanto en la corteza como el hipocampo de los animales a estudio.

7.1.2.1 *Análisis de Caspasa-3*

Un estudio muy reciente ha demostrado la existencia de una mayor expresión de la proteína caspasa-3 en sinaptosomas aislados del hipocampo del modelo transgénico de amiloidosis Tg2576 (D'Amelio y col., 2011) con respecto a ratones control. Según este estudio, el aumento de la proteína caspasa-3 estaría correlacionado con la degeneración de espinas sinápticas y el deterioro de la memoria dependiente del hipocampo. En base a estos resultados se examinó la expresión de caspasa-3 en sinaptosomas extraídos de corteza e hipocampo de ratones control y transgénicos APP/PS1 tratados con (HIV-leptina) o sin leptina (HIV-vv) durante 3 meses mediante *Western-blot*. Tras el análisis densitométrico de las bandas se observó en corteza un aumento de la expresión de procaspasa-3 ratones transgénicos APP/PS1 con respecto a controles ($p < 0,01$) y que este aumento se vió reducido de forma significativa en los ratones tratados con HIV-leptina al compararlos con el grupo tratado con HIV-vv ($p < 0,05$) (Figura 48A y B). La expresión de caspasa-3 activada de 17 y 19 KDa fue indetectable en corteza por *Western-blot* (Figura 47A).

En relación al hipocampo, se observó un ligero incremento de los niveles de procaspasa-3 en los ratones transgénicos tratados con el vector vacío con respecto a los controles, aunque no se alcanzó la significación estadística ($p = 0.069$) (Figura 48C y D). Sin embargo, tras el análisis densitométrico de la expresión de las caspasas activadas de 17 y 19 KDa, se observó un aumento significativo de los niveles en los ratones transgénicos tratados con el vector HIV-vv al compararlos con los controles no transgénicos (Figura 48C y E). Este aumento fue más moderado en los APP/PS1 tratados con el vector lentiviral HIV-leptina, aunque no se alcanzó una diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos transgénicos ($p = 0.063$) (Figura 48C y E).

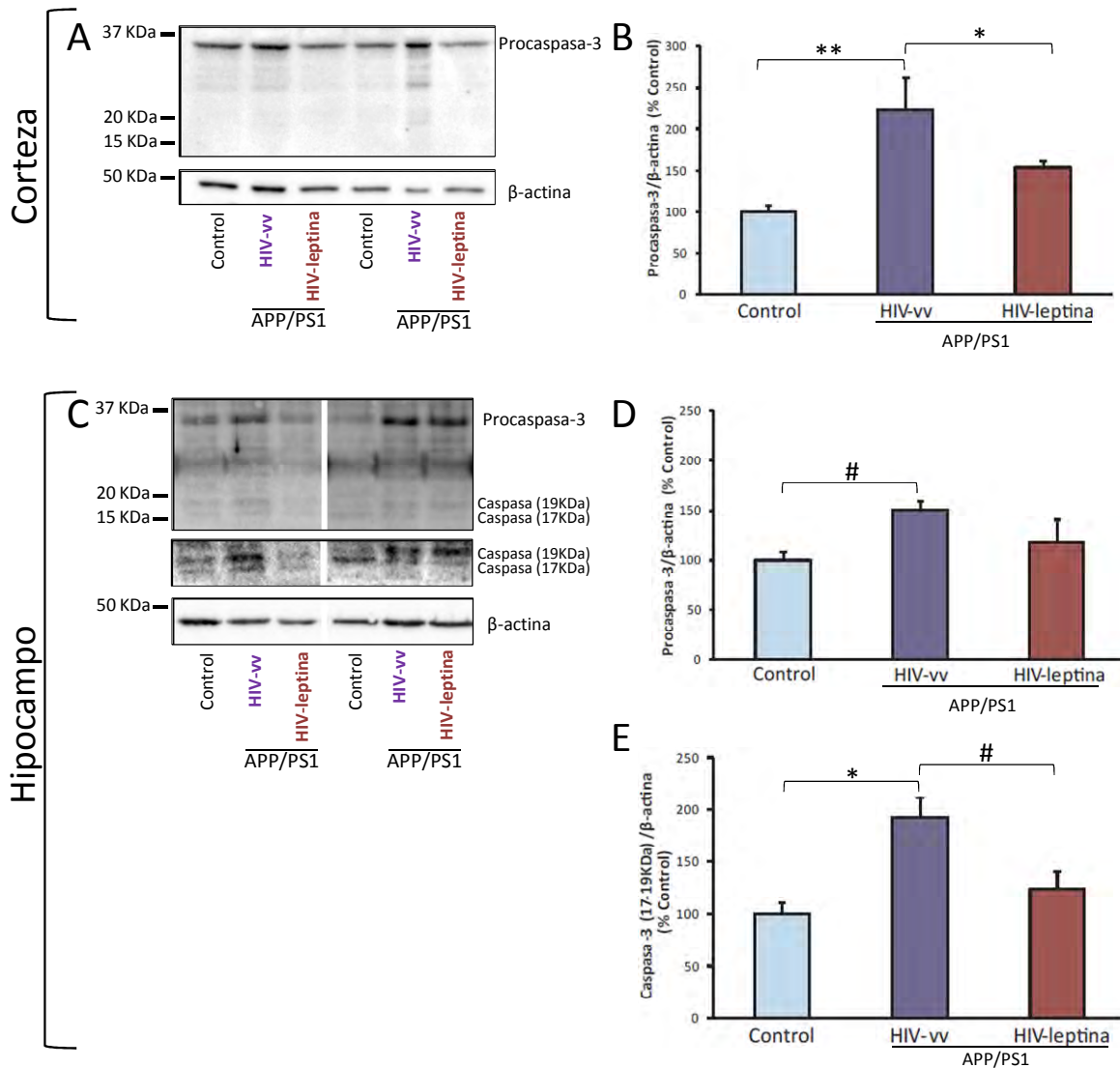


Figura 48. Expresión de caspasa-3 en sinaptosomas de ratones control y APP/PS1 tratados con HIV-vv o HIV-leptina durante 3 meses. **A**, *western-blot* representativo de la expresión de procaspasa-3 y la proteína normalizadora de carga β -actina en corteza. **B**, histograma correspondiente a la expresión de procaspasa-3 en corteza. **C**, *western-blot* representativo de la expresión de procaspasa-3, caspasas activadas de 17 y 19 KDa (aparecen sobreexpuestas abajo para una mejor identificación) y β -actina. **D**, histograma que representa la expresión de procaspasa-3 en hipocampo. **E**, histograma que representa la expresión de caspasa-3 activada en hipocampo. Los datos están expresados como la media \pm SEM (n=6). * p<0,05; **p<0,01; # p=0.06 (ANOVA, contraste post-hoc HSD de Tukey)

7.1.2.2 Análisis de proteínas sinápticas

Para investigar si los cambios en la expresión de caspasa-3 podían traducirse en modificaciones sinápticas a nivel molecular, se llevó a cabo la evaluación de la expresión de 4

proteínas sinápticas en las preparaciones de sinaptosomas: la proteína de membrana post-sináptica de 95 KDa (PSD-95: *post-synaptic density protein 95*), como marcador post-sináptico; y las proteínas sinapsina I, sinaptofisina y la asociada a los sinaptosomas de 25 KDa (SNAP-25: *Synaptosomal-associated protein 25*), como marcadores presinápticos. Para ello se llevaron a cabo diferentes ensayos de *Western-blot*.

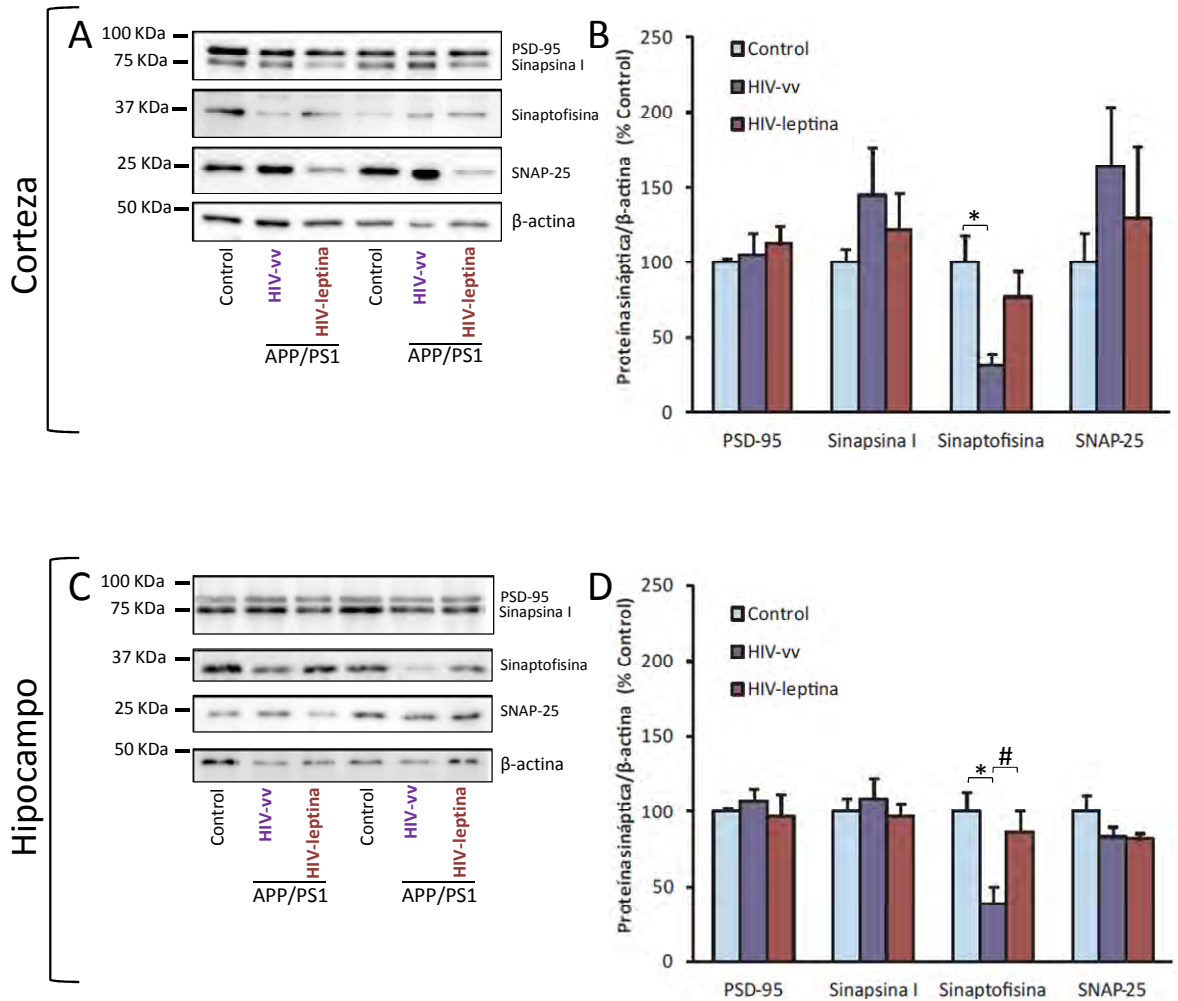


Figura 49. Expresión de proteínas sinápticas en sinaptosomas de ratones control y APP/PS1 tratados con HIV-leptina o el vector vacío HIV-vv durante 3 meses. *Western-blot* representativo de la expresión de sinapsina, PSD-95, sinaptofisina, SNAP-25 y la proteína normalizadora de carga β -actina en corteza (A) e hipocampo (C). Histograma que representa la expresión de las diferentes proteínas sinápticas en corteza (B) e hipocampo (D). Los datos están expresados como la media \pm SEM (n=6); * p<0,05; # p=0.056 (ANOVA, contraste post-hoc HSD de Tukey).

Tras el análisis densitométrico de las bandas correspondientes a cada una de las proteínas, no se detectaron diferencias significativas en la expresión de las proteínas sinápticas PSD-95,

sinapsina I y SNAP-25 ni en corteza ni en hipocampo de ratones transgénicos y controles (Figura 49). Sin embargo, se observó que los niveles de sinaptofisina se reducían de forma significativa ($p < 0,05$) en la corteza de ratones APP/PS1 con respecto a los controles y que este efecto era parcialmente revertido tras el tratamiento HIV-leptina, aunque no se alcanzó la significación estadística (Figura 49A y B). En el hipocampo también se detectó una reducción de expresión de sinaptofisina en ratones APP/PS1 con respecto a los controles ($p < 0,05$) (Figura 49C y D) y un restablecimiento casi completo de los niveles de sinaptofisina tras el tratamiento de 3 meses con HIV-leptina. Este resultado rozó la significación estadística ($p = 0,056$).

7.2 Estudios *in vitro*

7.2.1 Análisis de la expresión de sinaptofisina en cultivos primarios neuronales

A raíz de los resultados obtenidos *in vivo* en los que se detectó una disminución de los niveles de expresión de la proteína sinaptofisina en ratones APP/PS1, se llevaron a cabo estudios para determinar si, tanto la leptina como el péptido A β , eran capaces de regular la expresión de sinaptofisina *in vitro*. Antes de la realización de estos estudios, se comprobó que las neuronas corticales cultivadas *in vitro* eran capaces de responder a la leptina administrada exógenamente a través de sus receptores. Para ello, se realizaron ensayos *Western-blot* en lisados de neuronas corticales y se observó la expresión del receptor de leptina Ob-R (Figura 50A) y de megalina (Figura 50B).

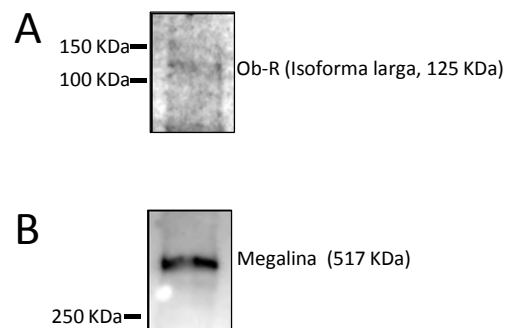


Figura 50. *Western-blot* de los receptores Ob-R (A) y megalina (B) en cultivos primarios de neuronas corticales.

Los cultivos primarios de neuronas fueron tratados con leptina (100 nM), oligómeros de A β -42 (5 μ g/ml) y con el tratamiento de ambas moléculas durante 48 horas y se observó un incremento significativo ($p < 0,05$) en la expresión de la proteína sináptica de un $55,7 \pm 22,2$ % (media \pm SEM) en cultivos neuronales que habían sido tratados con leptina con respecto a neuronas control (Figura 51C y D).

Tras evaluar los niveles de sinaptofisina cuando las neuronas eran expuestas a los oligómeros de A β -42 o al tratamiento conjunto de leptina y oligómeros A β -42, se detectó una ligera disminución de sinaptofisina tras la exposición al agente tóxico amiloide (aunque la diferencia no alcanzó la significación estadística) y la reversión de este efecto cuando se administraba el tratamiento conjunto de leptina y A β -42, observando diferencias significativas ($p < 0,05$) en la expresión de sinaptofisina entre las neuronas tratadas con A β -42 y las tratadas con el tratamiento conjunto (Figura 51C y D).

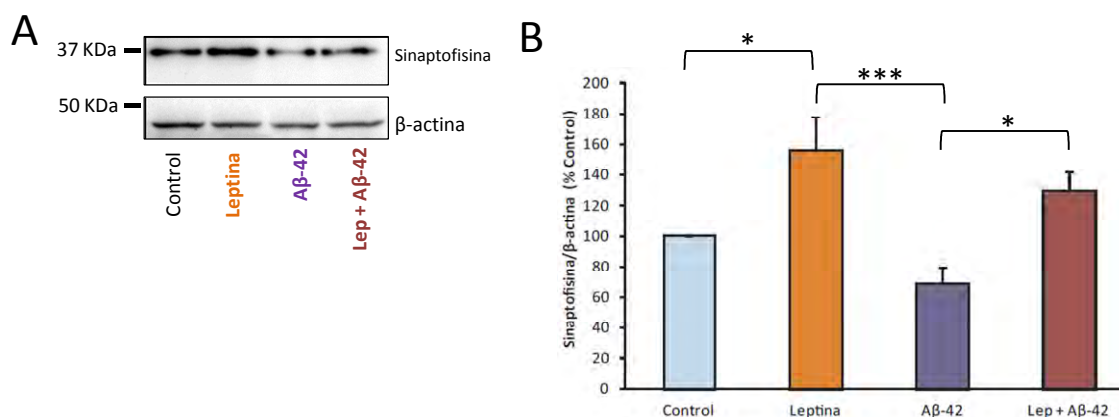


Figura 51. Expresión de sinaptofisina en cultivos primarios de neuronas tratados con leptina (100 nM), oligómeros A β -42 (5 μ g/ml) y el tratamiento conjunto durante 48 horas. **A**, *Western-blot* representativo de la expresión de sinaptofisina. **B**, histograma que representa la expresión de sinaptofisina. Los valores están representados como la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ (ANOVA, contraste post-hoc LSD de Fisher).

7.2.2 Mecanismo de señalización de la leptina sobre la modulación de sinaptofisina

Como hemos mencionado anteriormente, la leptina es capaz de activar diferentes rutas de señalización que requieren fosforilación. Para determinar qué tipo de señalización podía estar implicada en la modulación de la expresión de sinaptofisina, se evaluó la fosforilación de STAT3 sobre el residuo Tyr⁷⁰⁵ mediante un ensayo *Western-blot* en lisados de neuronas que habían sido tratadas con leptina (100 nM), oligómeros de A β -42 (5 μ g/ml) o con el tratamiento conjunto durante 48 horas, utilizando un anticuerpo específico anti-p-STAT3 (Figura 52A).

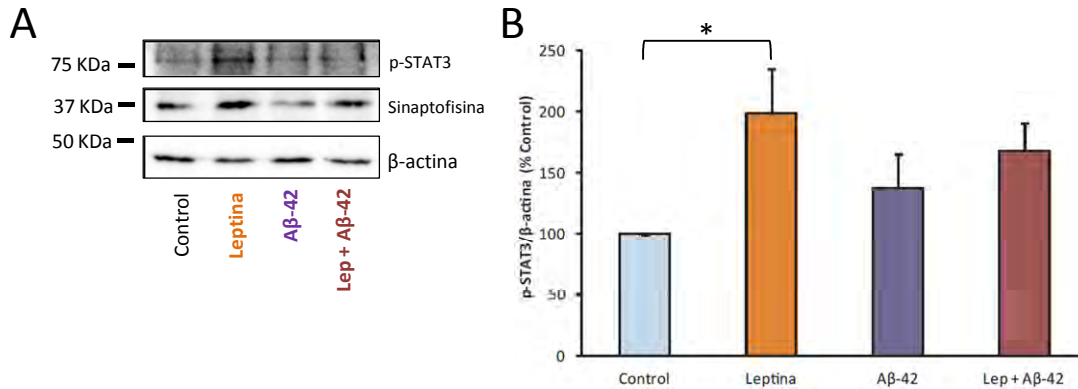


Figura 52. Efecto de la leptina sobre la fosforilación de STAT3 en cultivos primarios de neuronas. **A**, *western-blot* representativo de la expresión de p-STAT3, sinaptofisina y β-actina tras 48 horas de tratamiento con leptina, oligómeros Aβ-42 y el tratamiento conjunto. **B**, histograma del análisis densitométrico de la expresión de p-STAT3. Los valores están representados como la media ± SEM de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$ (ANOVA, contraste post-hoc LSD de Fisher).

Tras el análisis densitométrico de las bandas se observó que los niveles basales de fosforilación de STAT3 eran moderados y que el tratamiento con leptina era capaz de aumentar la fosforilación de STAT3 en un $99,6 \pm 35,9$ % (media ± SEM) con respecto al control, de una manera significativa ($p < 0,05$) (Figura 52B). Sin embargo, en presencia de Aβ-42, la leptina no modificó significativamente los niveles de p-STAT3 (Figura 52B). Este hecho ayudaría a explicar porqué en nuestro modelo transgénico APP/PS1, la leptina recombinante no aumentó los niveles de fosforilación de STAT3 en los resultados que presentamos en el apartado 2.2.2.

7.2.3 Efecto del bloqueo de la ruta de señalización JAK-STAT3 sobre la expresión de sinaptofisina

Para confirmar que la activación de STAT3 mediante su fosforilación, era una de las posibles vías implicadas en los efectos sinaptogénicos de la leptina, los cultivos primarios de neuronas fueron incubados con diferentes concentraciones (0,1-10 nM) de un inhibidor de STAT3, la Cucurbitacina I, durante 4 horas. Tras la realización del ensayo *Western-blot* para la detección de p-STAT3, se observó una inhibición prácticamente completa de la fosforilación de STAT3 a todas las dosis (Figura 53A). En el siguiente ensayo, las neuronas fueron preincubadas con Cucurbitacina I (10 nM) durante 4 horas y tratadas seguidamente con leptina (100 nM) durante 48 horas. Tras la realización del *Western-blot* (Figura 53B) se observó que el pretratamiento con

Cucurbitacina I produjo la inhibición de la fosforilación de STAT3 en todos los casos y redujo la expresión de sinaptofisina tanto en las neuronas control como las tratadas con leptina, no encontrando diferencias entre los grupos (Figura 53C).

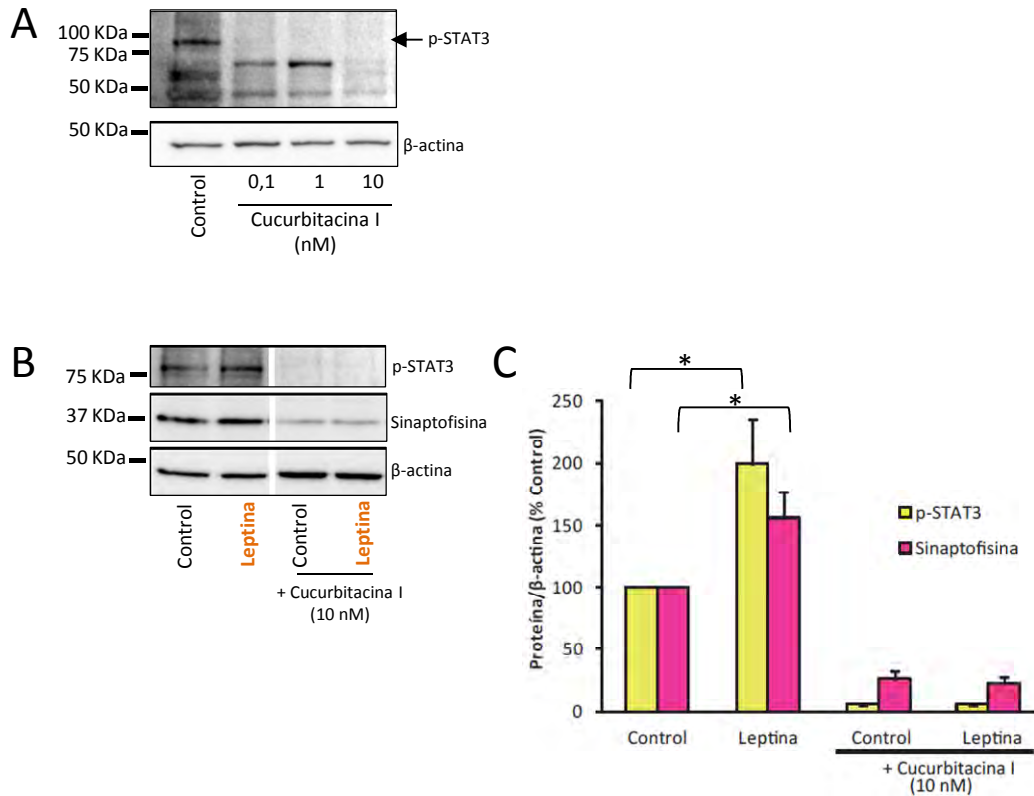


Figura 53. Inhibición de la fosforilación de STAT3 en cultivos primarios de neuronas. **A**, *western-blot* de la expresión de p-STAT3 tras la preincubación con el inhibidor Cucurbitacina I (0,1-10 nM) durante 4 horas . **B**, *western-blot* representativo de p-STAT3 y sinaptofisina tras preincubación con el inhibidor Cucurbitacina I (10 nM) durante 4 horas y posterior incubación con leptina (100 nM) durante 48 horas. **C**, Histograma del análisis densitométrico de la expresión de p-STAT3 y sinaptofisina. Los valores están representados como la media ± SEM de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$ (ANOVA, contraste post-hoc LSD de Fisher).

8. Efectos de la leptina sobre la longitud de neuritas en cultivos primarios neuronales

Se ha descrito que en la cascada de eventos que ocurren en la EA, la disminución de las sinapsis conlleva a una disminución de la neuritogénesis (Walsh y Selkoe, 2004) y por ello en

nuestro estudio se llevaron a cabo análisis para determinar si la leptina y el A β -42 tenían algún efecto modulador sobre la longitud de neuritas en cultivos primarios de neuronas de corteza e hipocampo. Para ello, tras el tratamiento de 18 o 36 horas con leptina (100 nM), oligómeros de A β -42 (5 μ g/ml) o el tratamiento conjunto, las células fueron marcadas mediante un ensayo de inmunocitoquímica utilizando el anticuerpo anti-Calbindina (que permite visualizar la red neuronal en neuronas maduras) y analizadas para determinar la longitud total de las neuritas de las células neuronales, distinguiendo entre neuritas totales, primarias, secundarias, terciarias y también cuaternarias cuando fue necesario (Figura 20).

Tras analizar la longitud total de neuritas en neuronas corticales que habían sido tratadas durante 18 horas no se detectaron cambios significativos tras los diferentes tratamientos al compararlos con el control (Figura 54A y B). Sin embargo, sí se detectó que tanto en el tratamiento con leptina como en el tratamiento conjunto de leptina y A β -42 se estimulaba de manera significativa ($p < 0,05$) la proyección de neuritas secundarias al compararlas con el control (Figura 54A y B)

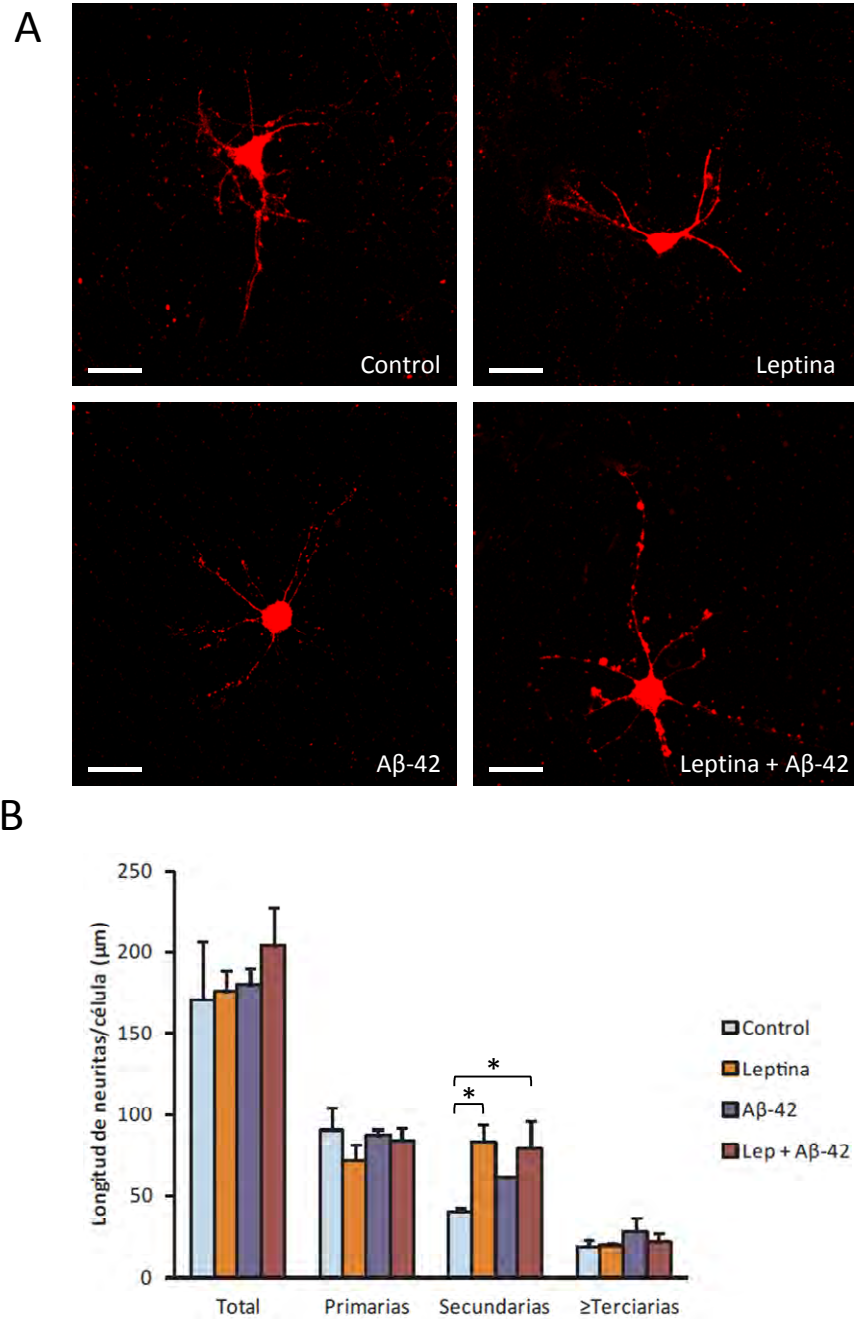


Figura 54. Longitud de neuritas en neuronas corticales tras 18 horas de tratamiento. **A**, imágenes representativas de neuronas corticales marcadas con anti-Calbindina tras 18 horas de tratamiento (Leptina 100 nM, Aβ-42 5μg/ml y el tratamiento conjunto). Barra de calibración = 20 μm. **B**, histograma que representa la longitud media de neuritas de cada grupo distinguiendo entre neuritas totales, primarias, secundarias y ≥ terciarias. Los valores están representados como la media ± SEM de 3 experimentos independientes. ** p<0,01; * p<0,05 (ANOVA, contraste post-hoc LSD de Fisher).

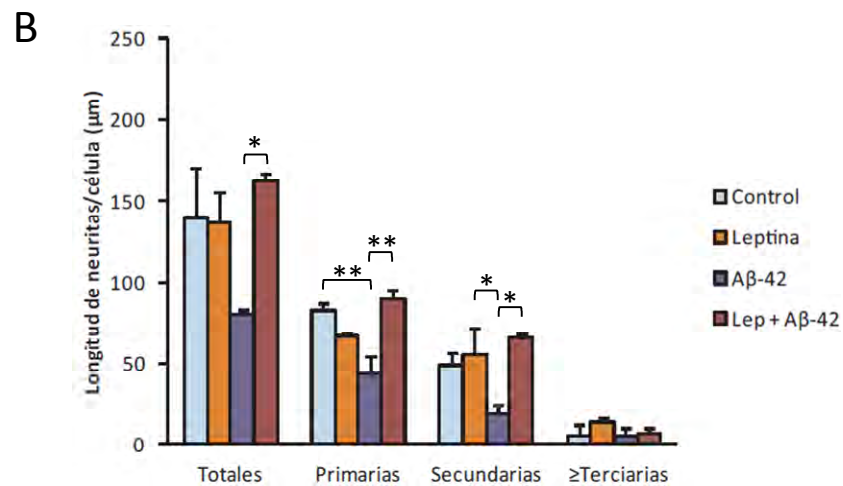
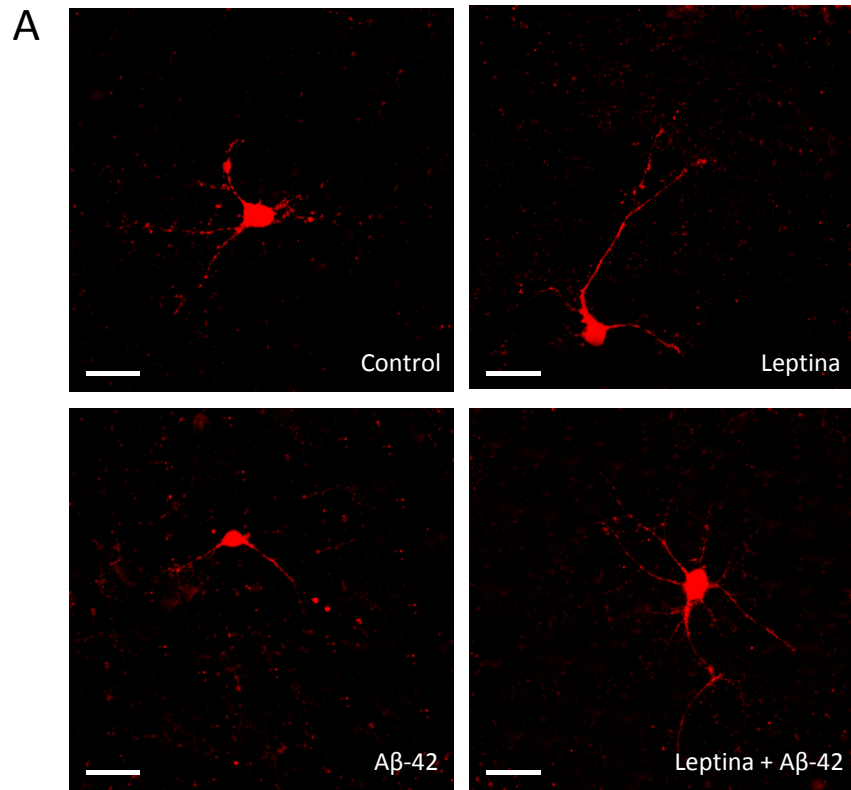


Figura 55. Longitud de neuritas en neuronas corticales tras 36 horas de tratamiento. **A**, imágenes representativas de neuronas corticales marcadas con anti-Calbindina tras 36 horas de tratamiento (Leptina 100 nM, Aβ-42 5 µg/ml y el tratamiento conjunto). Barra de calibración = 20 µm. **B**, histograma que representa la longitud media de neuritas de cada grupo distinguiendo entre neuritas totales, primarias, secundarias y ≥ terciarias. Los valores están representados como la media ± SEM de 3 experimentos independientes. ** p<0,01; * p<0,05 (ANOVA, contraste post-hoc LSD de Fisher).

Al prolongar el tratamiento hasta 36 horas, se observó que las neuritas de neuronas corticales estaban afectadas por los efectos tóxicos del A β -42 al presentar una reducción significativa del 43% de su longitud total ($140,1 \pm 30 \mu\text{m}$ en neuronas control comparado con $80,9 \pm 2,1 \mu\text{m}$ en neuronas tratadas con A β -42) (Figura 55A y B) y mientras que, el tratamiento con leptina no modificaba la neuritogénesis, si rescataba a las células de esta reducción en la longitud causada por el péptido amiloide, tras el tratamiento conjunto de leptina y A β -42 (Figura 55A y B). Se observó el mismo patrón tras analizar de forma individualizada las neuritas primarias, donde se encontró una reducción en longitud del 47% tras el tratamiento con el péptido amiloide ($83,1 \pm 4,6\% \mu\text{m}$ en neuronas control frente a $44 \pm 10,6\% \mu\text{m}$ en neuronas expuestas a A β -42). En el caso de las neuritas secundarias se observó la misma tendencia aunque en este caso se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las neuronas tratadas con A β -42 con respecto a las tratadas con leptina y nuevamente la administración conjunta de leptina revirtió el efecto tóxico del A β de forma significativa ($p < 0,05$) (Figura 55A y B). No se detectaron diferencias en la longitud de neuritas terciarias entre grupos (Figura 55B).

En relación a las neuronas hipocampales, tras 18 horas de tratamiento se observó como la leptina tendía a incrementar la longitud total de neuritas en las neuronas primarias aunque no se detectaron diferencias significativas entre grupos tras el análisis estadístico (56A y B). Sin embargo, al igual que ocurría en la neuronas corticales, se observó que la leptina estaba estimulando significativamente la proyección de neuritas secundarias tanto en el grupo tratado sólo con leptina ($p < 0,01$) como en el grupo de neuronas expuesto al tratamiento conjunto ($p < 0,05$) ($70,6 \pm 4\% \mu\text{m}$ en neuronas control frente a $111,7 \pm 5\% \mu\text{m}$ en neuronas expuestas a la leptina y $98,6 \pm 2,6 \mu\text{m}$ en neuronas expuestas a la leptina y A β -42) (Figura 56A y B).

Tras el tratamiento de 36 horas en neuronas hipocampales se observó una reducción significativa ($p < 0,05$) del 23,6% en la longitud total de neuritas de las neuronas tratadas con A β -42 ($199,2 \pm 12,3\% \mu\text{m}$ en neuronas control frente a $152,2 \pm 2,2\% \mu\text{m}$ en neuronas expuestas al tóxico amiloide) (Figura 57A y B). Esta reducción fue contrarrestada por la leptina en las neuronas sometidas tratamiento conjunto de leptina y A β -42 ($p < 0,05$) (Figura 57A y B). Al analizar de forma individualizada la longitud de neuritas primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias no se detectaron diferencias significativas entre grupos (Figura 57B).

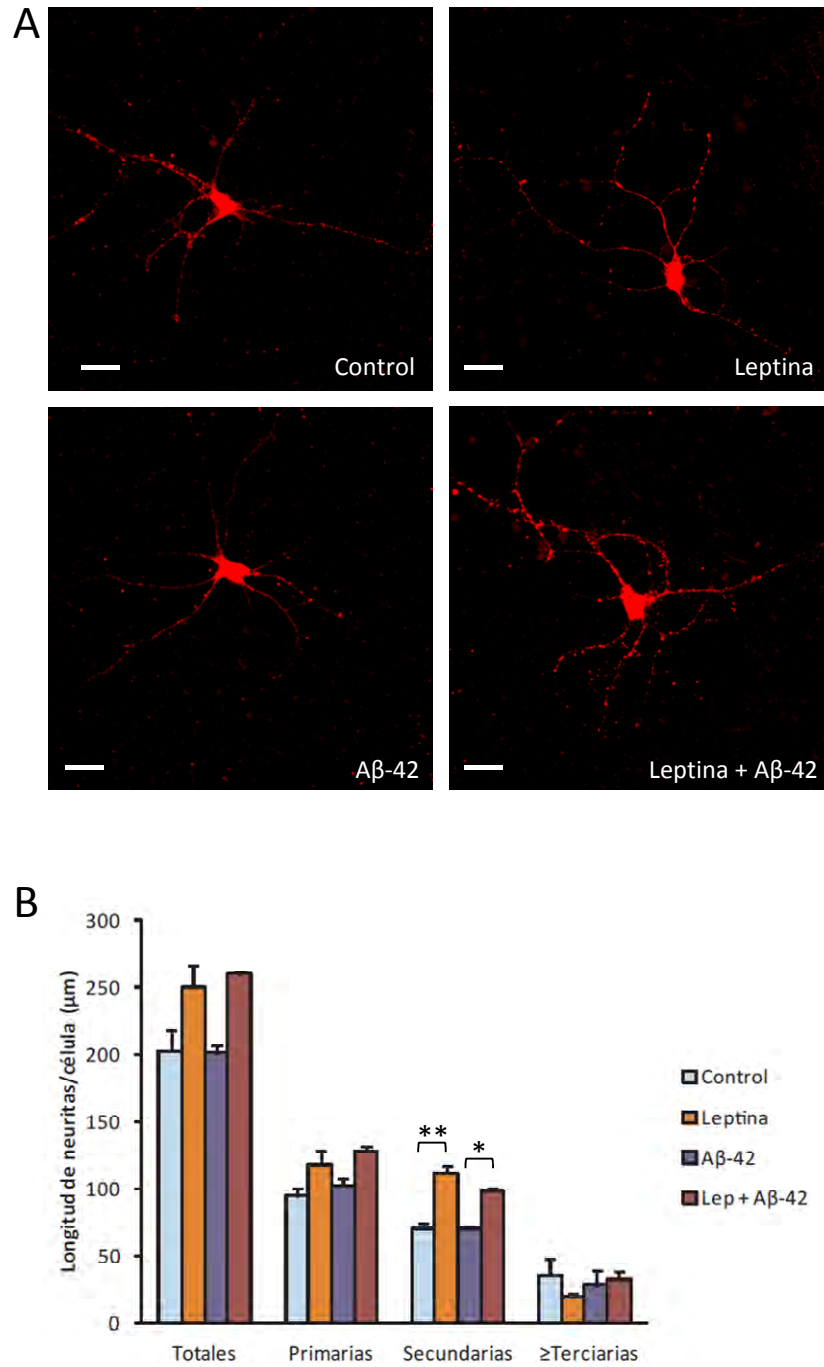


Figura 56. Longitud de neuritas en neuronas hipocampales tras 18 horas de tratamiento. **A**, imágenes representativas de neuronas hipocampales marcadas con anti-Calbindina tras 18 horas de tratamiento (Leptina 100 nM, Aβ-42 5 μg/ml y el tratamiento conjunto). Barra de calibración = 20 μm. **B**, histograma que representa la longitud media de neuritas de cada grupo distinguiendo entre neuritas totales, primarias, secundarias y ≥ terciarias. Los valores están representados como la media ± SEM de 3 experimentos independientes. ** p<0,01; * p<0,05 (ANOVA, contraste post-hoc LSD de Fisher).

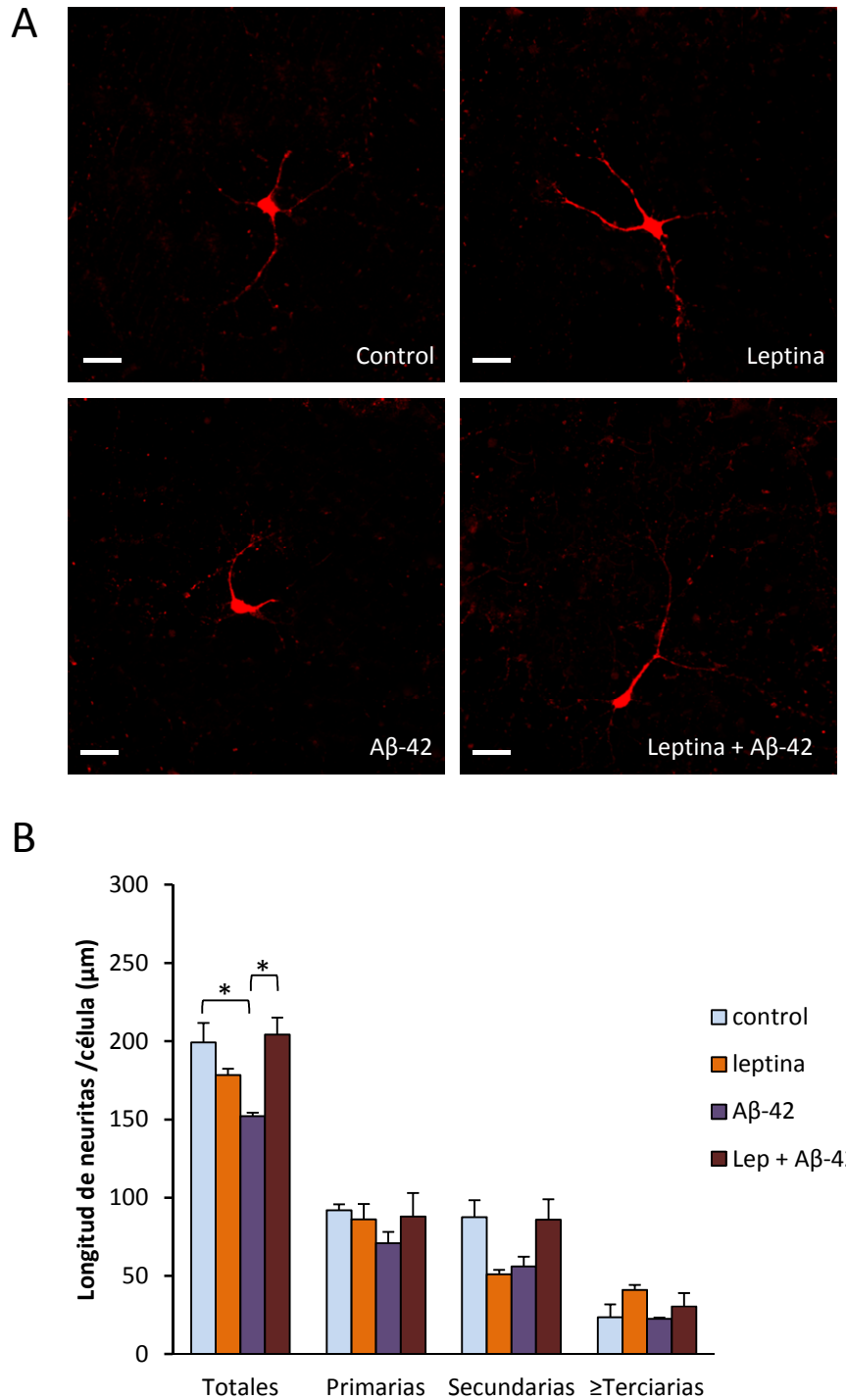


Figura 57. Longitud de neuritas en neuronas hipocampales tras 36 horas de tratamiento. **A**, imágenes representativas de neuronas hipocampales marcadas con anti-Calbindina tras 36 horas de tratamiento (Leptina 100 nM, Aβ-42 5 µg/ml y el tratamiento conjunto). Barra de calibración = 20 µm. **B**, histograma que representa la longitud media de neuritas de cada grupo distinguiendo entre neuritas totales, primarias, secundarias y terciarias. Los valores están representados como la media ± SEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$ (ANOVA, contraste post-hoc LSD de Fisher).

9. Efectos de la leptina sobre la neurodegeneración y muerte celular

Se ha descrito que los oligómeros de A β interfieren en la función sináptica al ocasionar daños estructurales en las sinapsis, seguida de la correspondiente neurodegeneración y, finalmente, muerte celular (Walsh y Selkoe, 2004).

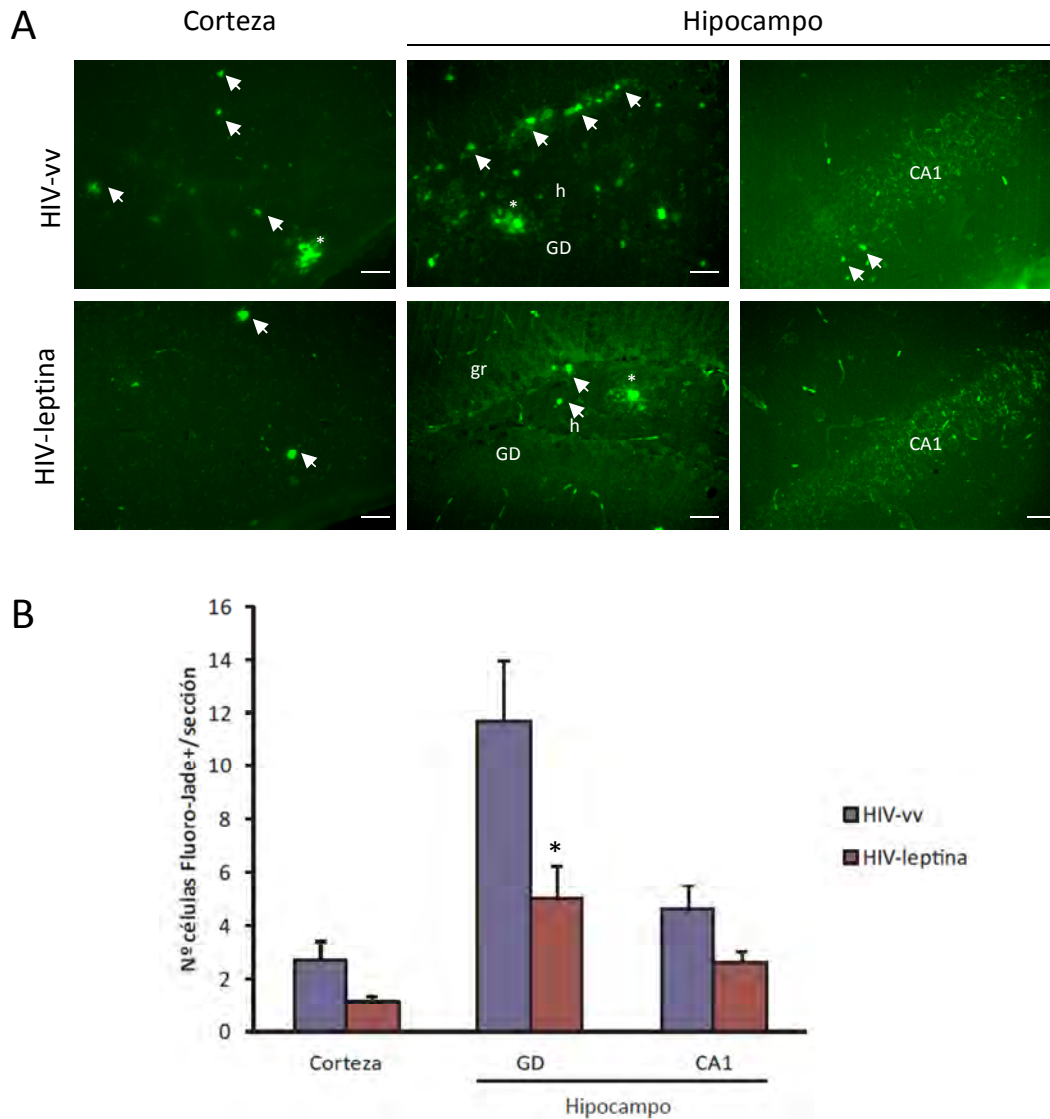


Figura 58. Efecto del HIV-leptina sobre el marcaje del Fluoro-Jade B en el cerebro de ratones APP/PS1 tras 3 meses de terapia génica. **A**, imágenes que muestran la tinción fluorescente de Fluoro-Jade B (verde), de izquierda a derecha, en corteza, giro dentado y región CA1 del hipocampo. Fluoro-Jade B no sólo tiñe células en degeneración (flechas), sino también placas amiloides (arteriscos). **B**, histograma que muestra el número de células Fluoro-Jade positivas en las diferentes regiones del cerebro. Los datos están expresados como la media \pm SEM (n=6-7). * p<0,05 (prueba T para muestras independientes). gr: capa de células granulares del giro dentado; h: hilus. GD: giro dentado. Barra de calibración = 20 μ m.

En nuestro modelo experimental *in vivo* se llevaron a cabo diferentes estrategias para explorar los procesos de neurodegeneración y muerte celular. En primer lugar, se evaluó el porcentaje de células en proceso de degeneración tanto en corteza como en hipocampo (giro dentado y región CA1) utilizando la tinción de Fluoro-Jade B, que tiñe específicamente neuronas en degeneración, sobre secciones de cerebro de ratones APP/PS1 tratados con HIV-leptina o HIV-vv durante 3 meses. No se evaluaron en este ensayo los controles no transgénicos ya que estudios previos en el laboratorio pusieron de manifiesto un marcaje nulo o insignificante de Fluoro-Jade B en estos ratones. El número de células en degeneración que resultaron positivas para Fluoro-Jade B en el giro dentado del hipocampo de animales APP/PS1 tratados con HIV-leptina durante 3 meses disminuyó de forma significativa con respecto a los transgénicos tratados con el vector vacío ($p < 0,05$) (Figura 58A y B). En la corteza y en la región CA1 del hipocampo no se detectaron diferencias significativas en el número de células Fluoro-Jade B positivas, aunque sí se observó una tendencia hacia la disminución tras la terapia génica de 3 meses con leptina (Figura 58A y B).

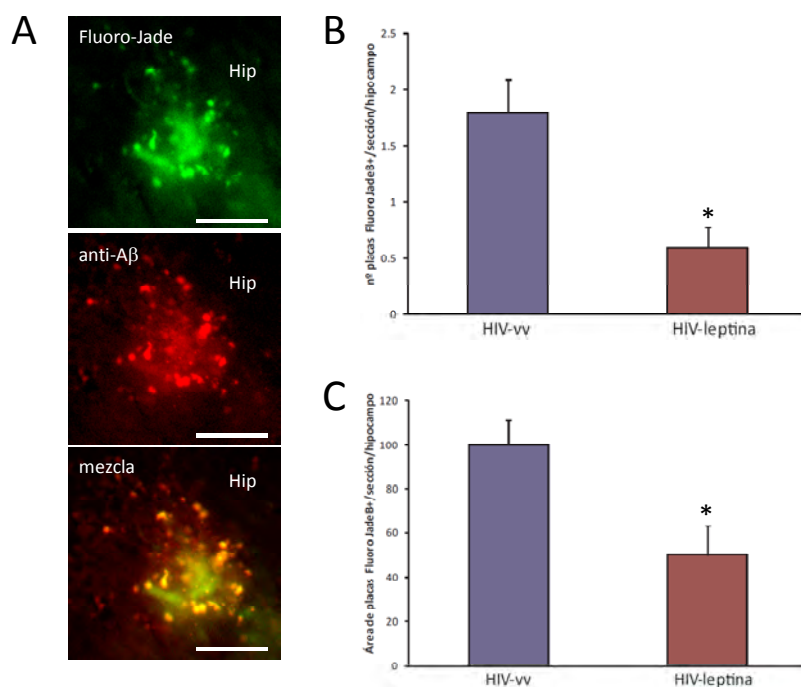


Figura 59. Efecto del HIV-leptina sobre las placas amiloides Fluoro-Jade B positivas en el hipocampo de ratones APP/PS1 tras 3 meses de terapia génica. **A**, imágenes que muestran la tinción fluorescente de Fluoro-Jade B (verde), la tinción de placas amiloides (rojo) y la colocalización de ambos marcajes (amarillo). Barra de calibración = 20 μ m. Histograma correspondiente al número (**B**) y área (**C**) de las placas amiloides positivas para Fluoro-Jade B en el hipocampo de ratones APP/PS1 tras el tratamiento con HIV-vv o HIV-leptina. * $p < 0,05$ (prueba T para muestras independientes)

Por otra parte, a través de un ensayo de inmunofluorescencia doble, se observó que el marcaje de Fluoro-Jade B colocalizaba de manera consistente con la tinción de placas de A β en el hipocampo de ratones APP/PS1 (Figura 59A). Tras el conteaje y el análisis densitométrico de las placas Fluoro-Jade B positivas se detectó una importante reducción tanto en el número (Figura 59B) como en el tamaño (Figura 59C) de estas placas en el hipocampo de los ratones APP/PS1 tratados con HIV-leptina. Estos resultados apoyarían los hallazgos previos donde se observó una reducción de amiloidosis en ratones APP/PS1 tras el tratamiento de 3 meses con HIV-leptina (Figura 39).

El estudio de la muerte celular se realizó, en primer lugar, evaluando el nivel de fragmentación del ADN tanto en corteza como en hipocampo de ratones control y transgénicos APP/PS1 tratados con o sin leptina utilizando un kit comercial de Roche. Tras analizar los resultados del ensayo se detectó una disminución significativa ($p < 0,05$) de la fragmentación del ADN en corteza de ratones APP/PS1 tratados con HIV-leptina, con respecto a los tratados con HIV-vv (Figura 60A), sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en el hipocampo (Figura 60B).

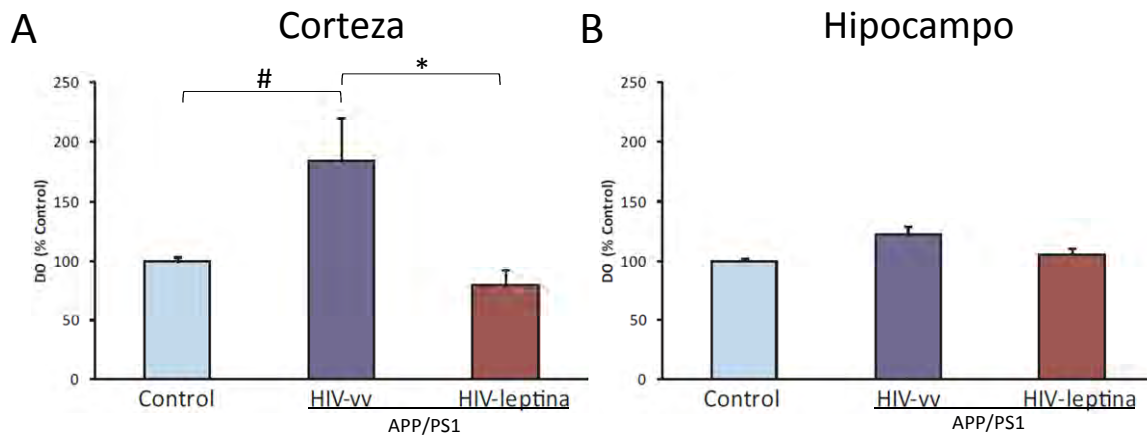


Figura 60. Valoración de la muerte celular en ratones control y transgénicos APP/PS1 tratados con HIV-leptina o HIV-vv durante 3 meses. Histograma correspondiente al ensayo ELISA de detección de fragmentación del ADN en corteza (A) e hipocampo (B). Los datos están expresados como la media \pm SEM ($n=6$). * $p < 0,05$; # $p=0,06$ (ANOVA, contraste post-hoc HSD de Tukey).

Adicionalmente, los niveles de expresión de la caspasa-3 fueron evaluados tras la realización de un ensayo *Western-blot* y se detectó un aumento significativo ($p < 0,01$) de los niveles de

expresión de procaspasa-3 en corteza de los transgénicos HIV-vv con respecto a los controles (Figura 61A y B). Además, se observó que este aumento de expresión se atenúa en los ratones APP/PS1 de una manera significativa ($p < 0,05$) (Figura 61A y B) tras la terapia génica con leptina de 3 meses de duración. No se detectaron diferencias significativas en la expresión de procaspasa-3 en el hipocampo de los distintos grupos (Figura 61C y D).

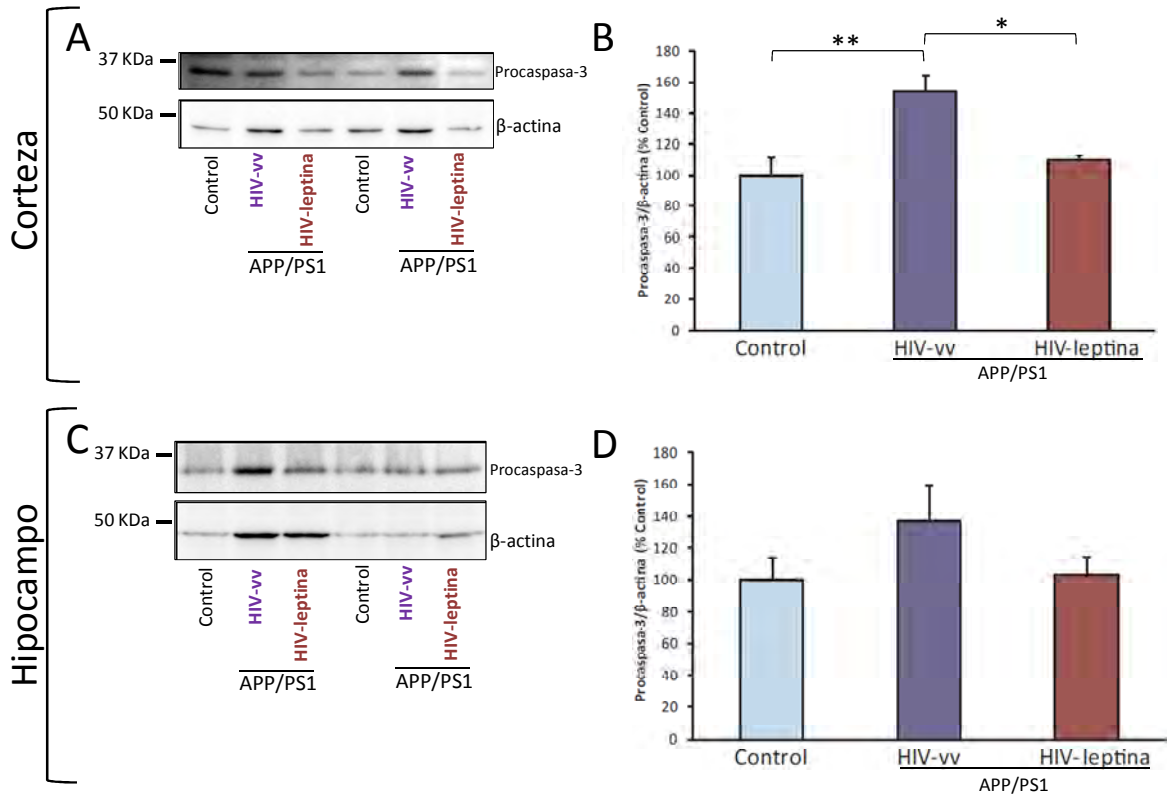


Figura 61. Estudio de la expresión de caspasa-3 en ratones control y ratones APP/PS1 tratados con HIV-leptina o HIV-vv durante 3 meses. *Western-blot* representativo de la expresión de procaspasa-3 en corteza (A) e hipocampo (C). Histogramas que representan la expresión de procaspasa-3 en corteza (B) e hipocampo (D). Los datos están expresados como la media \pm SEM ($n=6$). ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ (ANOVA, contraste post-hoc HSD de Tukey).

10.Efectos de la leptina sobre la proliferación y diferenciación celular

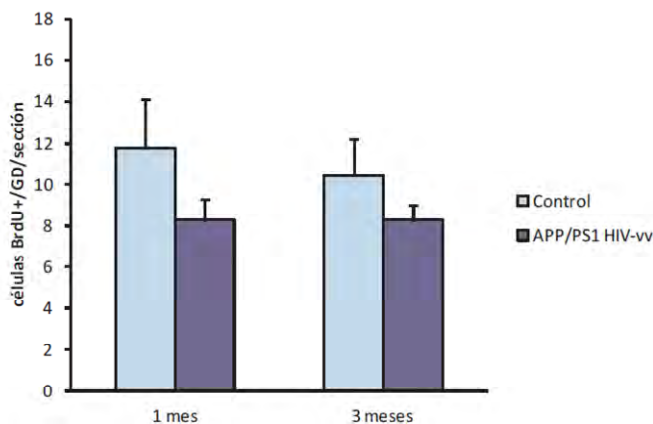


Figura 62. Proliferación celular en el giro dentado de ratones control y ratones APP/PS1 tras la administración del vector lentiviral HIV-vv durante 1 (7 meses de edad) y 3 meses (9 meses de edad). El histograma muestra el número de núcleos BrdU positivos identificados en el giro dentado del hipocampo. Los datos están expresados como la media \pm SEM (n=8-14).

10.1 Estudios *in vivo*

En un estudio previo en nuestro laboratorio, se exploró la proliferación celular en el giro dentado del hipocampo de ratones controles no transgénicos y transgénicos APP/PS1 de 6 meses de edad tratados con el vector vacío HIV-vv durante 1 y 3, no encontrando diferencias significativas entre los grupos tras cuantificar el número de células BrdU positivas en el giro dentado del hipocampo (Figura 62).

Por esta razón, en nuestro diseño experimental sólo se evaluó la proliferación celular en ratones transgénicos APP/PS1 tratados con la construcción lentiviral HIV-leptina o con el vector vacío (HIV-vv), tras la administración de BrdU durante la última semana de la terapia génica de 1 y 3 meses de duración. Las células creadas *de novo* se detectaron a través de un ensayo de inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo específico anti-BrdU y se observó un marcaje positivo de células que se distribuyeron a lo largo de la capa de células granulares y la zona subgranular del giro dentado (Figura 63A y C). Tras el conteo de las células BrdU positivas se observó un ligero incremento en el número de núcleos positivos en el giro dentado del hipocampo de animales que habían sido tratados con HIV-leptina durante 1 mes al compararlos con los que recibieron el vector vacío. Este incremento no llegó a ser significativo estadísticamente (Figura 63B). Sin embargo, tras un tratamiento más largo de 3 meses de duración, sí se detectó un aumento significativo ($p < 0,01$), de más de 1,5 veces, en el número de núcleos BrdU positivos en los ratones APP/PS1 que habían sido tratados con HIV-leptina con respecto a los tratados con el vector vacío (Figura 63D).

RESULTADOS

A continuación, fue conveniente explorar si el aumento en la proliferación celular detectado tras la terapia génica con leptina de 3 meses de duración implicaba la formación de nuevas neuronas. Para ello se llevó a cabo un ensayo de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo específico anti-DCX en secciones cerebrales de ratones tratados con los vectores virales durante 3 meses (Figura 64A). Tras la determinación del número de células DCX positivas, indicativas de neuronas inmaduras, se detectó un incremento significativo ($p < 0,05$) de estos tipos celulares en el giro dentado del hipocampo de ratones APP/PS1 tratados con HIV-leptina al compararlos con aquellos a los que se le había administrado el vector vacío (Figura 64B).

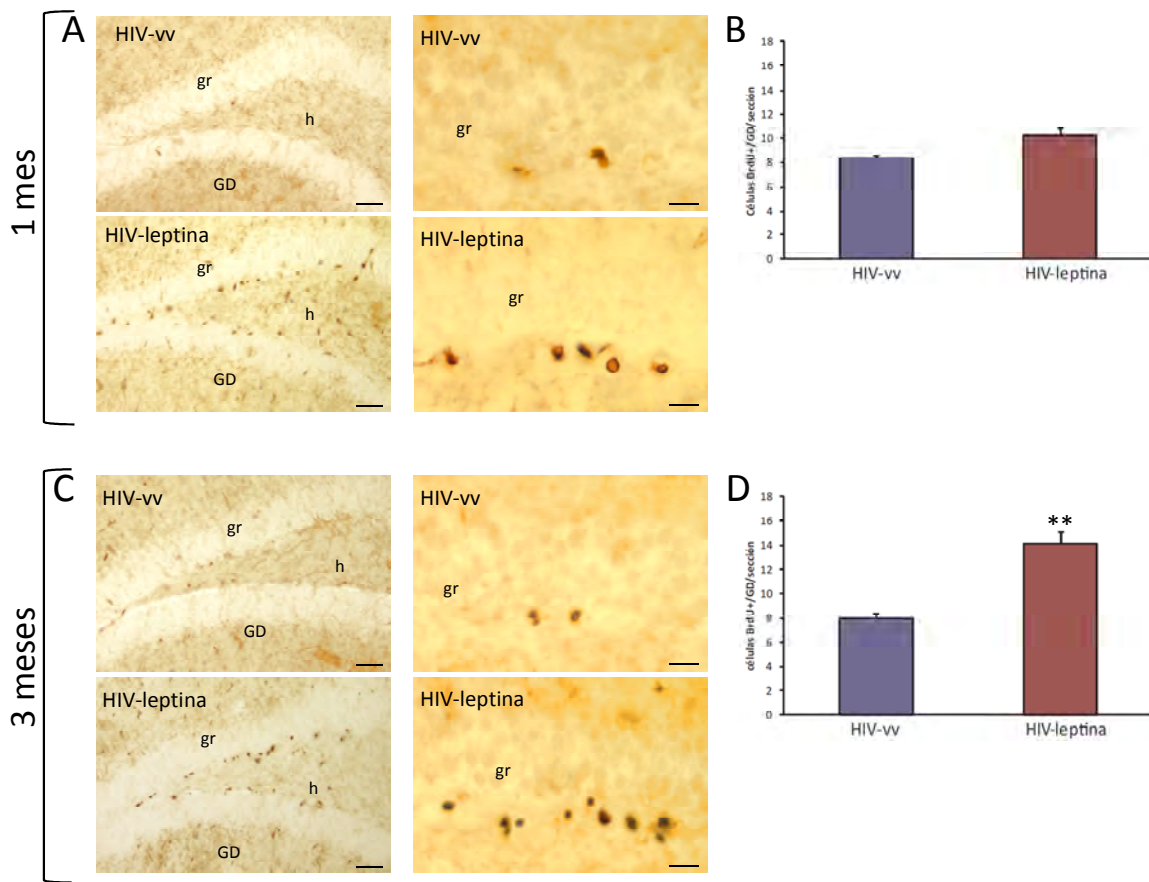


Figura 63. Efecto del HIV-leptina sobre la proliferación celular en el giro dentado de ratones APP/PS1. **A**, imágenes con diferente aumento mostrando células BrdU+ en el giro dentado de APP/PS1 tratados con HIV-vv o HIV-leptina durante 1 (**A**) o 3 (**C**) meses. **B**, histogramas que muestran el número de núcleos BrdU+ en los ratones APP/PS1 tratados con HIV-leptina o con el vector vacío (HIV-vv) tras 1 (**B**) o 3 (**D**) meses de terapia génica. Los datos están expresados como la media \pm SEM ($n = 5$). ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ (prueba T para muestras independientes) gr: capa de células granulares del giro dentado; GD: giro dentado; h: hilus del giro dentado. Barra de calibración = 20 μ m.

10.2 Estudios *in vitro*

Para evaluar si la leptina podía tener un efecto directo sobre la proliferación celular *in vitro*, neuronas primarias corticales fueron tratadas con leptina (100 nM), oligómeros de A β -42 (5 μ g/ml) y el tratamiento conjunto y 24 horas después de iniciar el tratamiento, se añadió BrdU al medio (50 μ g/ml) y las células se incubaron durante 48 horas más con el tratamiento inicial (72 horas en total) para el estudio de la proliferación a corto plazo. Por otro lado, para el estudio de la supervivencia las células que se habían generado *de novo*, el tratamiento se prolongó hasta 7 y 14 días. Cuando los tratamientos alcanzaron su fin, se llevaron a cabo diferentes ensayos de inmunocitoquímica para determinar el número de células que habían incorporado BrdU a su material genético y averiguar qué tipo celular estaba proliferando.

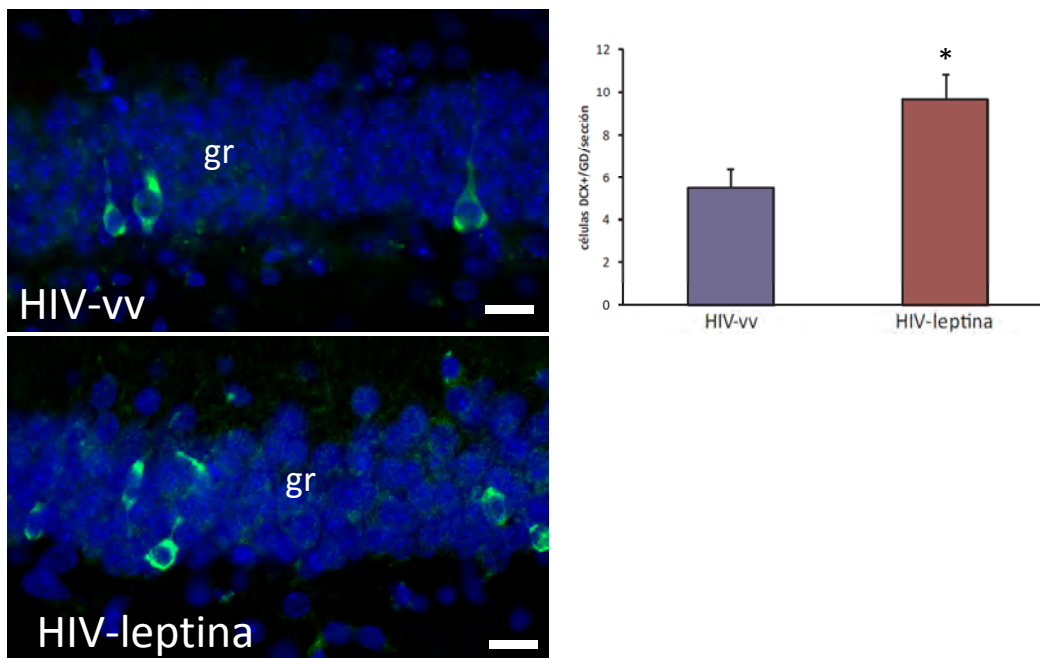


Figura 64. Efecto del HIV-leptina sobre la proliferación de progenitores neuronales en el giro dentado de ratones APP/PS1 tras 3 meses de terapia génica. **A**, las imágenes muestran el marcaje fluorescente de DCX (verde) de células de la capa granular del giro dentado de APP/PS1. Los núcleos están teñidos con DAPI (azul). **B**, el histograma muestra el número de células DCX+ en los ratones APP/PS1 tratados con HIV-vv o HIV-leptina. Los datos están expresados como la media \pm SEM (n=6-7). * $p < 0.05$ (prueba T para muestras independientes). gr: capa de células granulares del giro dentado; GD: giro dentado. Barra de calibración = 20 μ m.

Tras el tratamiento de 72 horas, se realizó un ensayo de inmunocitoquímica con un anticuerpo específico anti-BrdU (Figura 65A) y se observó un aumento significativo ($p < 0,05$), de

más de 1,5 veces ($165,4 \pm 20,1\%$ relativo al control), en el número de núcleos BrdU positivos tras la exposición a la leptina (Figura 65B). Para averiguar qué tipo de células estaban proliferando se llevó a cabo una inmunofluorescencia doble utilizando, además del anticuerpo anti-BrdU, un específico anti-DCX (Figura 66A y B). Se detectó un incremento significativo ($p < 0,05$), de 2,6 veces ($260,9 \pm 57,5\%$ relativo al control), en el número de células doblemente marcadas (BrdU-DCX+) en los pocillos que habían sido tratados con leptina (Figura 66C).

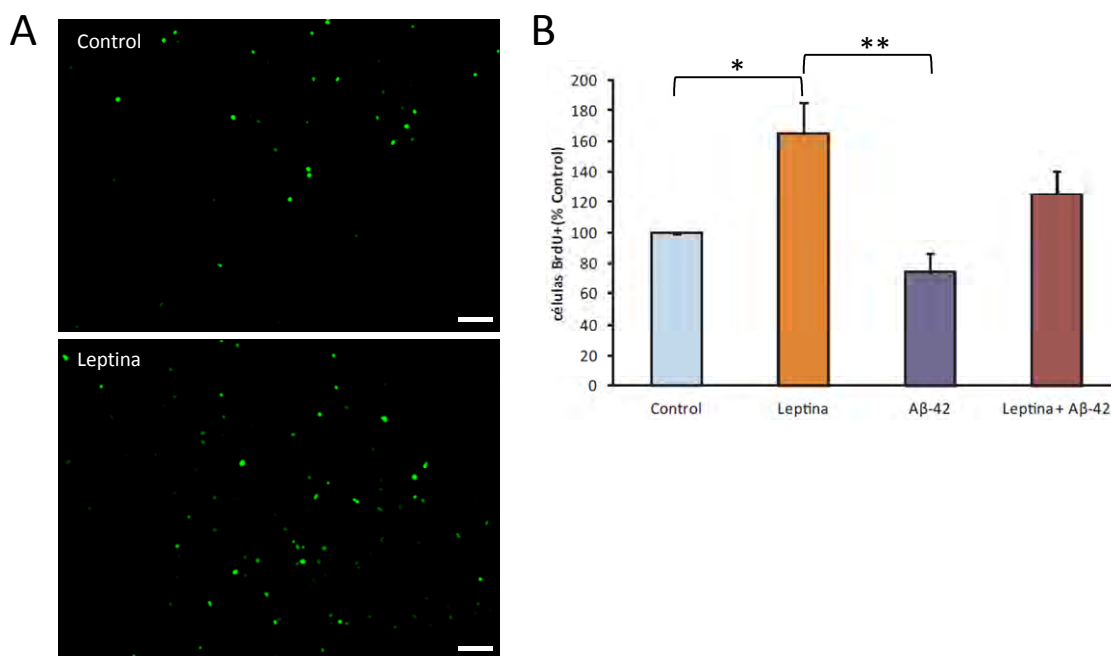


Figura 65. Efectos de la leptina, el A β -42 y el tratamiento conjunto sobre la proliferación celular en cultivos primarios de neuronas tras 72 horas de tratamiento. **A**, las imágenes muestran el marcaje fluorescente de núcleos BrdU+ (verde) en neuronas control y neuronas tratadas con leptina durante 72 horas. **B**, histograma que muestra el número de células BrdU+ en los diferentes tratamientos. Los valores están representados como la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ (ANOVA, contraste post-hoc LSD Fisher). Barra de calibración = 50 μ m.

Adicionalmente, también se realizó un ensayo de inmunofluorescencia doble utilizando los anticuerpos específicos anti-BrdU y anti-GFAP, identificándose células doblemente marcadas (BrdU-GFAP+) (Figura 67), que ponían de manifiesto la existencia de una pequeña población de astrocitos que estaba proliferando en los cultivos primarios de neuronas.

En las células que habían sido tratadas durante 7 días, no se detectaron diferencias significativas entre grupos en cuanto al número de células positivas pra BrdU (Figura 68A). Sin embargo, tras analizar el número de células DCX positivas, se detectó una reducción significativa en el número de células DCX positivas en el grupo tratado con A β -42 frente a las células tratadas con leptina ($p < 0,05$), aunque no respecto al grupo control (Figura 68B). Este efecto se revirtió totalmente tras el tratamiento conjunto ($p < 0,01$) (Figura 68B).

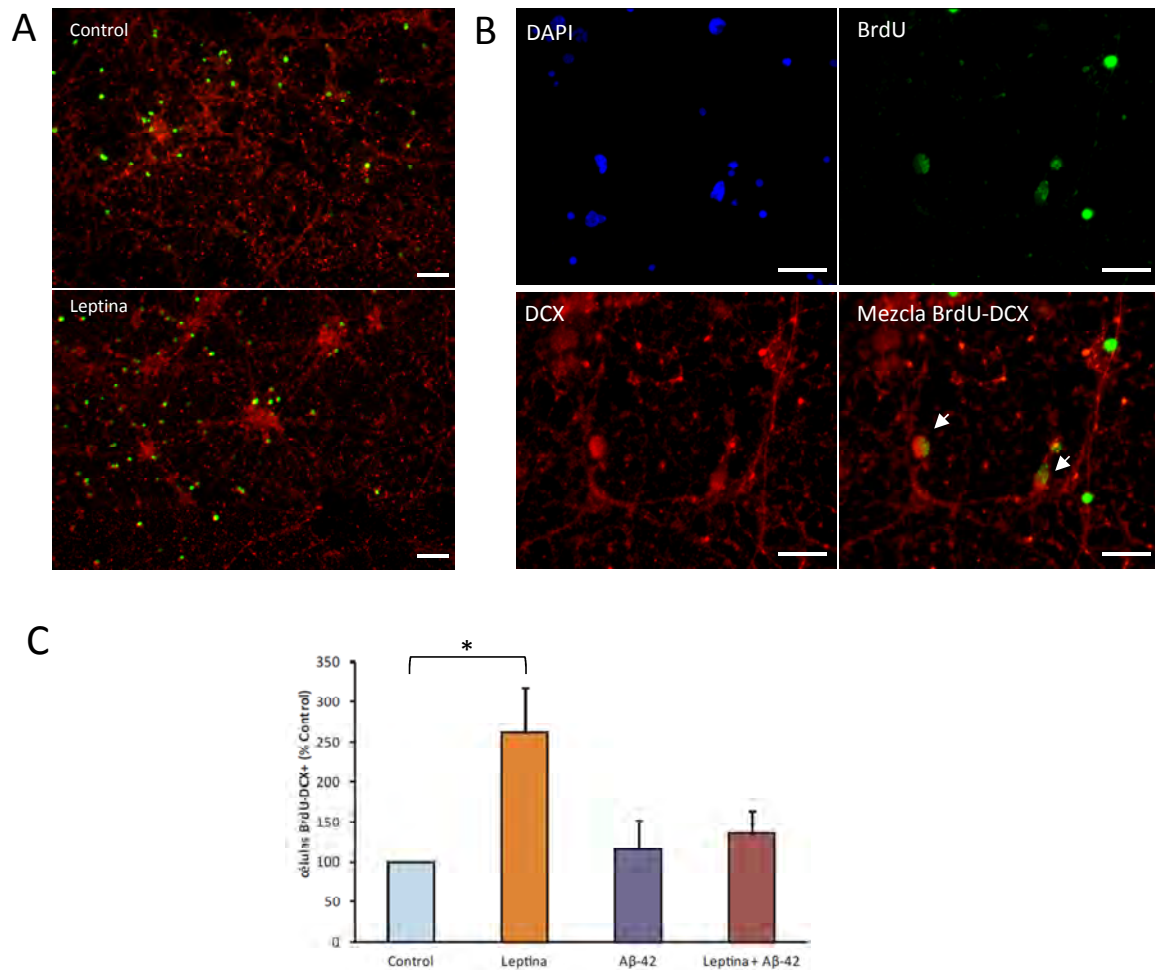


Figura 66. Efectos de la leptina, el A β -42 y el tratamiento conjunto, sobre la proliferación de progenitores neuronales en cultivo primario de neuronas tras 72 horas de tratamiento. **A**, imágenes a pequeño aumento que muestran núcleos BrdU+ (verde) y células DCX+ en neuronas control y tratadas con leptina durante 72 horas. Barra de calibración = 50 μ m. **B**, imágenes a mayor aumento que muestran el marcaje de DAPI (azul), BrdU (verde), DCX (rojo) y la mezcla de los canales rojo y verde para la identificación de células doblemente marcadas BrdU-DCX + (flechas). Barra de calibración = 20 μ m. **C**, histograma correspondiente al número de células doblemente marcadas BrdU-DCX+ en los diferentes tratamientos. Los valores están representados como la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$ (ANOVA, contraste post-hoc LSD Fisher).

RESULTADOS

En las células tratadas durante 7 días también se llevó a cabo un ensayo de inmunocitoquímica doble con los anticuerpos anti-BrdU y anti- β III-tubulina (un marcador de neuronas en estadios tempranos del desarrollo) (Figura 68C). Tras analizar el número de células doblemente marcadas con BrdU y β III-tubulina se detectaron diferencias similares a las encontradas en el caso de las neuronas marcadas con DCX, encontrando una reducción significativa ($p < 0,01$) en el número de neuronas β III-tubulina positivas tras el tratamiento con A β -42 frente a las tratadas con leptina (Figura 68D), efecto que se revirtió con el tratamiento conjunto de A β -42 y leptina ($p < 0,05$).

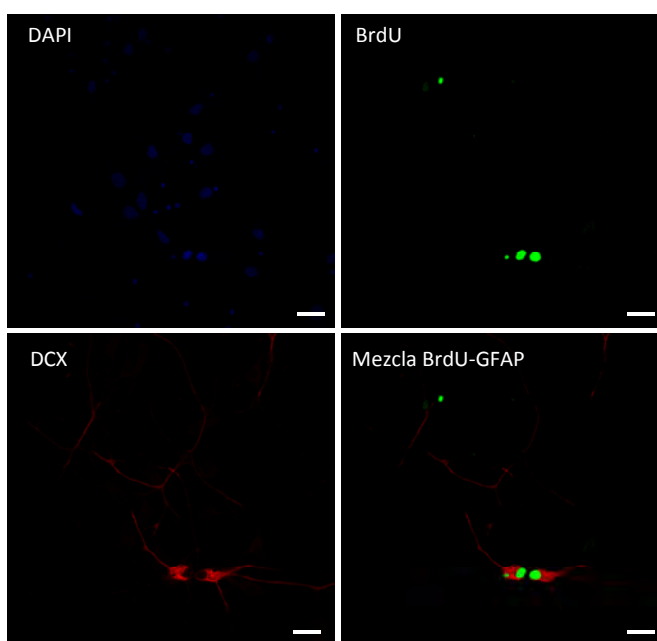


Figura 67. Identificación de células doblemente marcadas con BrdU (verde) y GFAP (rojo) en cultivos primarios de neuronas. Barra de calibración = 20 μ m.

En relación al tratamiento largo de 14 días, no se detectaron diferencias en el número de células marcadas con BrdU entre los grupos (Figura 69A). Sin embargo, tras identificar células doblemente marcadas con BrdU y DCX, se detectó una disminución significativa ($p < 0,05$) en el número de estas células en el grupo tratado con A β -42 respecto al grupo tratado con leptina (Figura 69B). En el caso de las células BrdU- β III-tubulina positivas se detectó una disminución significativa ($p < 0,05$) en el número de células tanto en grupo tratado con A β -42 como el tratado doblemente con A β -42 y leptina (Figura 69C).

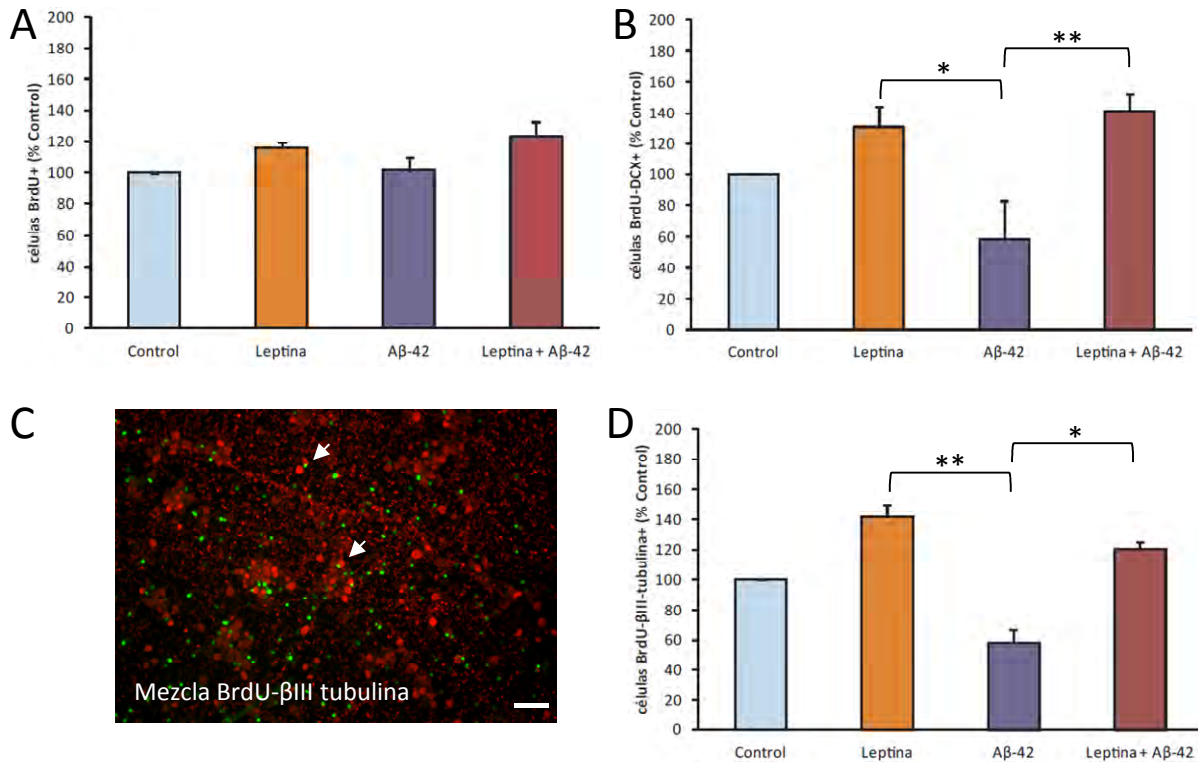


Figura 68 Efectos de la leptina, el Aβ-42 y el tratamiento combinado, sobre la proliferación celular en cultivos primarios de neuronas tras 7 días de tratamiento. Histogramas que muestran el número de células BrdU positivas (A), el número de células doblemente marcadas BrdU-DCX+ (B) o BrdU-βIII tubulina+ (C) en los diferentes tratamientos. La imagen muestra el marcaje fluorescente de BrdU (verde) y βIII tubulina (rojo) con indicación de células doblemente marcadas BrdU-βIII tubulina+ (flechas). Los valores están representados como la media ± SEM de al menos 3 experimentos independientes. ** p<0,01; * p<0,05 (ANOVA, contraste post-hoc LSD de Fisher). Barra de calibración = 50μm.

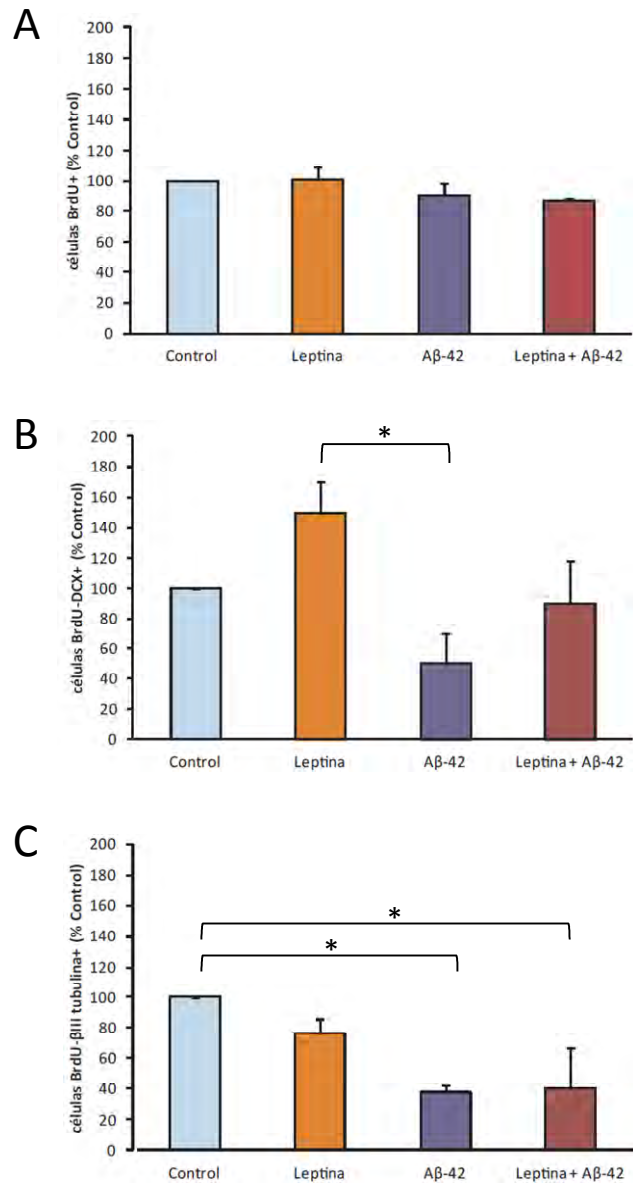


Figura 69. Efectos de la leptina, el Aβ-42 y el tratamiento combinado, sobre la proliferación celular en cultivos primarios de neuronas tras 14 días de tratamiento. Los histogramas muestran el número de células BrdU+ (A), BrdU-DCX+ (B) y BrdU-βIII tubulina+ (C) en los diferentes tratamientos. Los datos están expresados como la media ± SEM de al menos 3 experimentos independientes. * p<0,05 (ANOVA, contraste post-hoc LSD de Fisher)

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

La secuencia de eventos característica del proceso de neurodegeneración comienza con una pérdida sináptica temprana (asociada con el declive cognitivo), seguida de daño neurítico que lleva finalmente a una pérdida selectiva de neuronas (Walsh y Selkoe, 2004). En el presente trabajo se han estudiado las diferentes capacidades protectoras que potencialmente podría tener la leptina sobre estos eventos utilizando como modelo de amiloidosis el ratón doblemente transgénico APP/PS1 y la terapia génica como vía de administración de leptina a nivel central. Los resultados obtenidos indicaron que la terapia génica con leptina durante 3 meses fue capaz de reducir la acumulación cerebral de A β . Además de este efecto sobre uno de los marcadores neuropatológicos clásicos de la EA, los ratones APP/PS1 tratados con leptina mostraron una reducción significativa de los niveles de astrogliosis y neurodegeneración, asociada a una mayor plasticidad neuronal, proliferación y diferenciación celular. Como resultado, se produjo una importante atenuación en los déficits cognitivos característicos de los ratones transgénicos APP/PS1 (Figura 70).

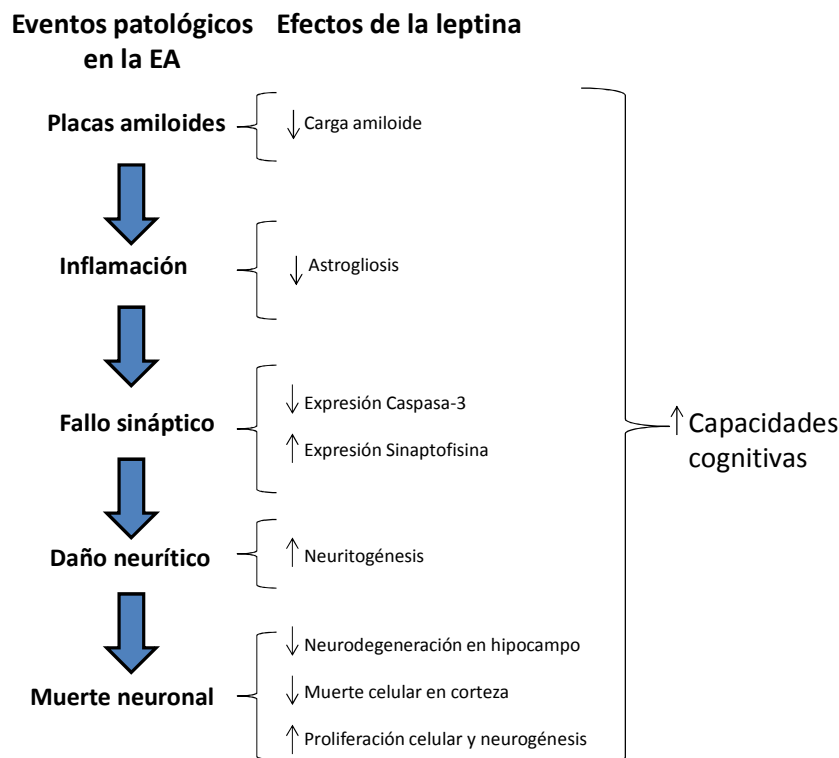


Figura 70. Efectos de la leptina sobre la cascada de eventos neuropatológicos característicos de la EA observados en el modelo murino de amiloidosis APP/PS1 y en modelos de amiloidosis experimentales *in vitro*.

1. La terapia génica como vía de administración central de leptina

El paso del tiempo ha hecho que los vectores virales utilizados en terapia génica hayan sido modificados y mejorados, al tiempo que otros nuevos tipos se han incorporado al conjunto. Una de estas incorporaciones consistió en el uso de retrovirus, que forman parte del género *Lentivirus*, entre los que se encuentra el virus del SIDA. Este cambio, que indudablemente añadía en aquel momento el riesgo de utilizar como agente curativo elementos de un virus altamente patógeno, se debió a que estos retrovirus clásicos eran capaces de infectar y transducir células en reposo, estado en el que se encuentran normalmente las células más apropiadas para una terapia génica duradera. Desde entonces, han sido muchos los esfuerzos realizados para dotar a estos vectores lentivirales de características que disminuyan su carácter patogénico sin afectar a su capacidad de infectar células diana y expresar eficientemente el gen terapéutico.

En este estudio se ha demostrado que la terapia génica lentiviral es un método eficaz para la administración de leptina a nivel del SNC en el modelo murino de amiloidosis APP/PS1. Como vector de transferencia génica se utilizó el HIV-leptina, un vector lentiviral de tercera generación, derivado del HIV-1 y creado según el modelo de empaquetado condicional descrito por Tom Dull (Dull y col., 1998). Los vectores lentivirales están considerados como valiosas herramientas en la investigación neurobiológica debido a su capacidad para infectar células que no entran normalmente en mitosis, como es el caso de las neuronas (Zhang y col., 2006) y hacerlo de una manera estable durante un periodo de tiempo de hasta 6 meses (Blomer y col., 1997). En el sistema nervioso, los lentivirus median la transfección génica en cualquier tipo de neurona, sin efectos secundarios de los vectores *per se*, y con un nivel de seguridad que permite su aplicación en ensayos clínicos en enfermedades neurodegenerativas (Tuszynski y col., 2005; Aiuti y col., 2007). La utilización del vector lentiviral HIV-leptina permitió una sobreexpresión estable y eficaz de leptina en nuestro modelo animal de amiloidosis, como se confirmó tras la identificación de la expresión de leptina recombinante en diferentes áreas del SNC después de 1 y 3 meses de la inyección icv del vector lentiviral, utilizando diferentes técnicas de detección de la etiqueta HA que lleva incorporada la leptina recombinante en su secuencia (Figura 33).

Los vectores lentivirales presentan la capacidad de migrar largas distancias y de modular eficientemente la expresión de proteínas en las células huésped cerebrales, como se ha visto en diferentes estudios (Carro y col., 2005; Carro y col., 2006b; Dietrich y col., 2008; Antequera y col., 2009). En nuestro modelo experimental también se testó la funcionalidad de la leptina recombinante al analizar su implicación en la vía JAK-STAT3 mediante la modulación de STAT3 en su forma fosforilada (Figura 36). La fosforilación de STAT3 está elevada en la corteza e hipocampo de los ratones transgénicos APP/PS1y en cerebros post mórtem de pacientes con EA (Wan y col., 2010). Este incremento de la fosforilación de STAT3 está relacionado con el incremento de la muerte neuronal inducida por A β en los ratones transgénicos APP/PS1, sugiriendo que la inhibición de la actividad de STAT3 atenuaría la apoptosis neuronal inducida por el péptido amiloide (Wan y col., 2010). En nuestro modelo experimental, la terapia con el vector HIV-leptina durante 3 meses, en lugar de producir un incremento en la fosforilación de STAT3, como cabría esperar (Bendinelli y col., 2000), produjo una disminución de los niveles de p-STAT3, posiblemente, y como explicaremos en detalle, debido a una reducción en los niveles de A β .

2. Efectos de la leptina sobre marcadores patológicos característicos del modelo APP/PS1

El objetivo terapéutico más importante en la EA es mejorar los trastornos cognitivos, los déficits clínicamente relevantes en estos pacientes. Además de amnesia, los pacientes con EA presentan síntomas neuropsiquiátricos como la apatía, a veces acompañada por depresión, disforia y aislamiento social (Cheng y Cummings, 2000). Sin embargo, también el patrón opuesto, de agitación, inquietud, desinhibición y euforia suele ser frecuente (Cheng y Cummings, 2000). En nuestro estudio, tras la valoración de la capacidad cognitiva de los roedores en el test del laberinto en T, se observó que en la alternancia espontánea los ratones transgénicos presentaban menor porcentaje de aciertos con respecto los ratones control y que la terapia con leptina moderaba estas diferencias, aunque no de una forma significativa. Sí se observaron diferencias significativas en cuanto al tiempo que los ratones tardaban en elegir la opción correcta (latencia). El grupo control fue el más rápido en elegir la opción correcta, seguido del

grupo APP/PS1 que fue administrado con HIV-leptina, siendo el grupo transgénico que recibió HIV-vv el que más tiempo tardó en tomar la decisión (Figura 37A). El deterioro en la alternancia espontánea puede interpretarse de varias maneras, incluyendo una pérdida de motivación para explorar, una pérdida del control inhibitorio o de la orientación espacial, similar a los síntomas descritos en la EA (Cheng y Cummings, 2000). También puede interpretarse como una pérdida de memoria, teniendo en cuenta que este test que se ha utilizado (el laberinto en T), valora la memoria espacial (Deacon y Rawlins, 2006; Stewart y col., 2011).

Por otro lado, utilizando la prueba de reconocimiento de objetos que depende de la actividad del hipocampo (Dewachter y col., 2002), se evaluó la memoria visual a corto plazo, que es la que se ve principalmente afectada en la EA. Los pacientes de EA normalmente presentan déficit de memoria a corto plazo antes que la pérdida de memoria a largo plazo (Germano y Kinsella, 2005). En nuestro modelo experimental, se observó que en los ratones APP/PS1, en el que ya está comprometida la cognición, el tratamiento con el lentivirus HIV-leptina durante 3 meses alivió estos déficits conductuales, demostrando la eficacia de la terapia génica (Figura 37B). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en un estudio reciente donde utilizando el modelo de amiloidosis TgCRND8 (Greco y col., 2010), los ratones transgénicos tratados con leptina mostraron recuperación de las alteraciones comportamentales tras la realización del mismo test y un test adicional, el de condicionamiento al miedo (otro test de memoria que mide la capacidad para recordar un estímulo desagradable). Estos hallazgos también estarían en sintonía con otros resultados que describieron que la inyección directa de leptina en el hipocampo mejora el procesamiento de la memoria y modula la LTP y la plasticidad sináptica (Harvey y col., 2005).

En la prueba del laberinto en cruz elevado se determinó el ratio entre el tiempo que los animales pasaban en los brazos abiertos y el tiempo total, así como el ratio entre el número de veces que entraban en los brazos abiertos y las entradas totales, como medidas de ansiedad de los animales (Tabla 13), no detectando diferencias en los niveles de ansiedad de los grupos a estudio. Estos resultados concuerdan con los encontrados en un estudio previo donde los autores señalaban que los niveles de ansiedad en la línea transgénica APP/PS1 eran similares a los de controles no transgénicos (Arendash y col., 2001). Por otro lado, se observó un menor número de entradas tanto en brazos abiertos como en cerrados en el modelo transgénico respecto al control,

así como una menor duración en los brazos abiertos (Tabla 13). La duración en los brazos abiertos se incrementó tras la terapia génica con leptina en los ratones APP/PS1, de forma que no se observaron diferencias significativas con los controles (Tabla 13). Estos datos sugieren la existencia de una actividad exploratoria comprometida en los ratones APP/PS1, relacionada con el estado hipoactivo que se ha descrito en ratones APP/PS1 de 9 meses de edad (Ferguson y col., 2013), y sugerimos que la leptina podría contribuir a la restauración de los niveles normales de actividad ya que se ha descrito su papel antidepresivo (Lu y col., 2006; Lu, 2007).

En el año 2004, el grupo de Fewlass y colaboradores (Fewlass y col., 2004) describió por primera vez la capacidad de la leptina de regular niveles del péptido A β . Más recientemente, nuevos estudios han confirmado que el tratamiento con leptina es capaz de reducir la carga amiloide en el cerebro de animales modelos de amiloidosis (Greco y col., 2010; Marwarha y col., 2010). En nuestro estudio, la administración de leptina via terapia génica de 1 mes de duración no ocasionó cambios significativos en la densidad de placas amiloides de los ratones APP/PS1 tratados con HIV-leptina frente a los que habían sido inyectados con el vector vacío (Figura 38). Este resultado fue atribuido a la moderada carga de amiloide que tienen estos animales a los 7 meses de edad (al final del tratamiento) y a la brevedad del tratamiento (1 mes). Sin embargo, tras prolongar la terapia génica hasta 3 meses, se detectó una disminución en la carga cerebral de A β y más concretamente en el número y grosor de placas tanto en corteza como en hipocampo de los APP/PS1 tratados con leptina (Figura 39). El hecho de que el tratamiento con HIV-leptina sea capaz de reducir la placa de amiloide en áreas cerebrales distales a su lugar de aplicación (ventrículos laterales) da una idea de la capacidad de difusión de la leptina recombinante.

La proteína BACE1 es una β -secretasa responsable del procesamiento de APP mediante la vía amiloidogénica para la formación del péptido A β y cuyos niveles se han visto aumentados en patologías amiloides (Vassar y col., 1999; Yan y col., 1999; Lin y col., 2000). Una menor expresión de la proteína BACE1 fue detectada en los ratones APP/PS1 tras la terapia génica con leptina de 3 meses al compararlos con los APP/PS1 que recibieron el vector vacío (Figura 40 A-D), por lo que el efecto inhibitor de la leptina sobre la acumulación cerebral de A β sería atribuible a la disminución de la expresión de esta proteína, como ocurría en estudios previos (Marwarha y col., 2010; Greco y col., 2010). Reforzando estos resultados se ha demostrado que

STAT3 es un mediador de la regulación transcripcional de BACE1 (Wen y col., 2008) y en nuestro estudio se detectó una tendencia hacia la disminución en los niveles de expresión de p-STAT3 en ratones APP/PS1 tratados con HIV-leptina (Figura 36), sugiriendo que esta disminución podía regular a la baja la expresión de BACE1.

Estos hallazgos son consistentes con los datos previos que revelan la implicación de la leptina en la modulación de la actividad de BACE1 (Fewlass y col., 2004). Sin embargo, tras analizar la actividad de BACE1 en muestras de corteza e hipocampo de nuestro grupo experimental, no se detectaron diferencias significativas entre los ratones transgénicos tratados con HIV-leptina y los que recibieron HIV-vv (Figura 40 E-F). La aproximación metodológica para la determinación de la actividad de BACE1 en nuestro trabajo pudo no ser la más adecuada ya que el ensayo se realizó a partir del lisado total celular, mientras que, en el grupo de Fewlass y colaboradores (Fewlass y col., 2004), los ensayos de actividad de BACE1 fueron realizados sobre diferentes fracciones celulares tras su separación en un gradiente de sacarosa.

En concordancia con datos previamente publicados (Ding y col., 2008), no se detectaron en nuestro estudio diferencias en la expresión de BACE1 entre los ratones no transgénicos y los APP/PS1 tratados con el vector vacío HIV-vv. Este hecho no es sorprendente ya que existe un incremento progresivo de la expresión de BACE1 dependiente de la edad. Mientras que los niveles de BACE1 están elevados en ratones APP/PS1 de 12-18 meses de edad (Dietrich y col., 2008; Torres y col., 2012), no se han detectado diferencias en ratones más jóvenes, de 6 meses de edad, al compararlos con sus controles no transgénicos (Torres y col., 2012). Adicionalmente para contrastar estos resultados, analizamos la expresión de BACE1 en muestras de corteza humana de controles y pacientes enfermos con diferentes grados de demencia. El resultado fue similar al encontrado en el modelo animal transgénico, al no detectar diferencias significativas entre los controles y pacientes en distintos estadios de la EA (Figura 41). Puede que nuestro tamaño muestral (n=6-8) no fuese lo suficientemente grande para detectar diferencias significativas, ya que en algunos estudios donde sí se ha detectado esta diferencia (Hebert y col., 2008; Santosa y col., 2011), la distribución de los datos sugería que sólo cerca de la mitad de los pacientes con EA contribuían al aumento de la media, mientras que, en la otra mitad de casos, los

niveles de expresión de BACE1 coincidían con los niveles de expresión existentes en controles sanos.

En base a la hipótesis de la cascada amiloide (Hardy y Selkoe, 2002), la existencia de placas amiloides en los ratones APP/PS1 desencadenaría una respuesta inflamatoria responsable de una activación astro y microglial. En relación a los astrocitos, se observó que la terapia génica con leptina de 3 meses atenuó la activación astrogliar en la corteza de ratones APP/PS1 respecto a los que recibieron el vector vacío HIV-vv (Figura 42A y B). No se detectaron tales diferencias en el hipocampo probablemente debido a que en los ratones transgénicos APP/PS1 la densidad astrogliar basal es similar a la existente en los controles no transgénicos (Figura 42 C-D). La inflamación y la astrogliosis están íntimamente conectadas en la EA (Herrup, 2010). De hecho, la astrogliosis está considerada como una de las manifestaciones patológicas más tempranas en la EA, con respuestas inflamatorias que juegan un papel crucial en la modulación del progreso de la enfermedad (McGeer y McGeer, 2010). La astrogliosis parece ser especialmente abundante asociada a los depósitos de A β en el parénquima cerebral (Richards y col., 2003). Sin embargo, todavía no está claro si esos astrocitos reactivos acumulados en torno a los depósitos de A β desempeñan funciones protectoras o destructoras (Wyss-Coray y Mucke, 2002). En nuestro estudio, siguiendo la misma aproximación metodológica utilizada en estudios previos (Carro y col., 2006b), se detectó una reducción considerable de la astrogliosis asociada a las placas en la corteza de los ratones APP/PS1 tratados con HIV-leptina (Figura 43). Aunque la astrogliosis es considerada como un marcador patológico asociado a las placas en la EA, algunos estudios sugieren que los astrocitos reactivos localizados alrededor de las placas pueden tener una función beneficiosa al ser capaces de captar y degradar el A β (Nagele y col., 2003; Wyss-Coray y col., 2003; Koistinaho y col., 2004). En nuestro modelo experimental, la leptina se ha manifestado como un importante regulador de la astrogliosis, ya que tanto la astrogliosis asociada a placas de A β como la total se han visto reducidas en la corteza cerebral de los ratones APP/PS1 tras el tratamiento con HIV-leptina. Ello nos hace suponer que controlar la activación de la astrogliar llevaría a una adecuada regulación del aclaramiento de A β por parte de los astrocitos, lo cual a su vez sería responsable de controlar la acumulación de A β en el cerebro.

Las células de microglía, células inmunes residentes en el cerebro, pueden ser activadas a través de la liberación de neurotransmisores, factores tróficos, citoquinas o por factores liberados desde células necróticas (Hanisch y Kettenmann, 2007). Según el tipo de estímulo, la microglía actuará siguiendo diferentes modelos, por ejemplo, eliminando células apoptóticas o proteínas anormales, o liberando citoquinas anti-inflamatorias (revisado en Lucin y Wyss-Coray, 2009). El papel de la microglía en el desarrollo y progreso de la EA ha sido muchas veces controvertido y su carácter dual o pleiotrópico ha sido estudiado en detalle (revisado en Wyss-Coray, 2006). En nuestro estudio se observó que el tratamiento con leptina en los ratones APP/PS1 ocasionaba un mayor marcaje de microglía (marcada con lectina de tomate), aunque las diferencias entre grupos no fueron estadísticamente significativas (Figura 44). La activación microglial, mediada por las citoquinas anteriormente señalada, fue confirmada mediante estudios con cultivos primarios de microglía. En estos estudios *in vitro* se observó que la leptina ejercía un papel dual, por una parte inducía la activación microglial en altas concentraciones, pero en concentraciones más bajas era capaz de bloquear el proceso inflamatorio (Figura 45). Teniendo en cuenta el papel de la microglía en la degradación fagocítica de la placa amiloidea (Paresce y col., 1996; Paresce y col., 1997; Kakimura y col., 2002; Takata y col., 2007; Takata y col., 2010), la activación microglial mediada por leptina en nuestro modelo experimental *in vivo*, podría estar directamente relacionada con el descenso en la carga de A β . Otra ventaja de nuestro modelo experimental utilizando el lentivirus HIV-leptina, sería la presencia sostenida de niveles bajos de leptina que aseguren unos niveles moderados de óxido nítrico, como hemos visto en los cultivos de microglía. No olvidemos que la microglía puede producir óxido nítrico en respuesta a estímulos como el A β (Wang y col., 2004) y su producción excesiva está íntimamente relacionada con la patogénesis de la EA (revisado en Malinski, 2007). En conclusión el tratamiento de los ratones APP/PS1 con HIV-leptina asegura unos niveles de leptina que permiten activar la microglía sin inducir neurotoxicidad.

3. Efectos de la leptina sobre la plasticidad neuronal

La pérdida de sinapsis es un evento relevante en la patogénesis de la EA. De hecho, la pérdida sináptica es el mejor marcador patológico que correlaciona con el declive cognitivo que

aparece en la EA (Coleman y Yao, 2003; Scheff y col., 2007). Es bien conocido que el hipocampo es un área del cerebro relacionada con los procesos de aprendizaje y memoria. Los receptores NMDA de la región CA1 del hipocampo están implicados en la formación de la memoria espacial (Bliss y Collingridge, 1993) y estudios recientes han mostrado la implicación de la leptina en la plasticidad sináptica hipocampal al observar alteraciones tanto en la LTP como en la LTD en ratones obesos *db/db* con receptores no funcionales de leptina (Li y col., 2002). Además, estos ratones tenían dificultades para llevar a cabo tareas relacionadas con la memoria espacial en el laberinto bajo el agua de Morris (Li y col., 2002; Gerges y col., 2003). En nuestro modelo experimental se estudió por primera vez la densidad sináptica de la región CA1 del hipocampo del modelo murino de amiloidosis APP/PS1 de 9 meses de edad. Para ello se llevaron a cabo estudios de ME y se cuantificó el número total de sinapsis en ratones control y ratones transgénicos APP/PS1, diferenciando entre sinapsis en espinas y sinapsis en troncos dendríticos. Se calculó el porcentaje de sinapsis en espinas con respecto al número de sinapsis totales (sinapsis en espinas y sinapsis en dendritas) y se observó que los ratones APP/PS1 presentaban una disminución estadísticamente significativa en este parámetro respecto a los controles (Tabla 15). Este novedoso resultado concuerda con un estudio previo donde se describe una reducción en la densidad de espinas dendríticas en la línea de ratones transgénicos Tg2576 (Adlard y col., 2011) así como en el número de sinápsis en cultivos de neuronas hipocampales de ratones APP/PS1 (Priller y col., 2009). El tratamiento con HIV-leptina por su parte era capaz de revertir parcialmente esta tendencia negativa, aunque, especialmente en nuestro grupo experimental tratado con leptina (APP/PS1 HIV-leptina), se observó una gran dispersión en los resultados se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados tras analizar los resultados con el test Kruskal-Wallis para muestras no paramétricas. Es posible que este hallazgo del número de sinapsis en espinas tenga repercusión funcional, ya que está en consonancia con otros estudios donde la leptina es capaz de modular sinápsis hipotalámicas en modelos de obesidad (Pinto y col., 2004). Aumentar el tamaño muestral en este estudio podría darnos pistas más certeras sobre el papel de la leptina en la modulación sináptica.

Los mecanismos moleculares responsables del fallo sináptico que ocurre en los pacientes con EA y en los modelos animales de amiloidosis son en su mayoría desconocidos. En el año 1998, un estudio (Mattson y col., 1998) identificó la actividad de la caspasa-3 dependiente de apoptosis

que contribuía al fallo sináptico en neuronas hipocampales cultivadas *in vitro*, pero el mecanismo molecular que relacionaba la actividad de la caspasa-3 con la pérdida sináptica era todavía desconocido. Un estudio reciente ha descrito la actividad de la caspasa-3 incrementada en las espinas dendríticas en el modelo de amiloidosis Tg2576 (D'Amelio y col., 2011) y en nuestro estudio también se ha observado un incremento de los niveles de expresión de caspasa-3 en sinaptosomas de corteza e hipocampo de ratones transgénicos APP/PS1 (Figura 48). Este incremento fue más moderado en los ratones APP/PS1 que recibieron el vector HIV-leptina, lo que sugiere que el efecto neuroprotector de la leptina frente a la pérdida sináptica se debe a la disminución de la toxicidad del A β , probablemente en términos de disminución de expresión de caspasa-3.

Dado que se ha descrito que leptina es capaz de modular las concentraciones de proteínas sinápticas (Walker y col., 2007), también se analizó la expresión de diferentes proteínas sinápticas en las preparaciones de sinaptosomas de los ratones control y transgénicos tratados con HIV-leptina o con el vector vacío. Las proteínas sinápticas son componentes esenciales para el normal mantenimiento de la función sináptica. La pérdida de inmunoreactividad de sinaptofisina en terminales presinápticos se ha correlacionado con el declive cognitivo existente en la EA (Masliah y col., 1994; Sze y col., 1997; Hsia y col., 1999). En nuestro estudio, esta pérdida de señal fue confirmada en los ratones transgénicos APP/PS1 (*Western-blot*), encontrando que la terapia génica con leptina fue capaz de revertir estos efectos sobre la expresión de la proteína sinaptofisina, de manera que se volvían a alcanzar concentraciones similares a las existentes en ratones no transgénicos (Figura 49). La sinaptofisina es la proteína más abundante de las vesículas sinápticas y se suele utilizar como marcador para cuantificar el número de sinápsis intactas (Nagahara y col., 2009; Giusti-Rodriguez y col., 2011). De ahí que este resultado refuerze el dato previo obtenido mediante microcopía electrónica relativo al posible efecto modulador de la leptina sobre la densidad sináptica.

Apoyando nuestros resultados *in vivo*, encontramos que la expresión de sinaptofisina también estaba incrementada en cultivos primarios de neuronas corticales que habían sido tratados con leptina durante 48 horas, y se observó que la incubación con leptina revertía parcialmente los efectos tóxicos del A β sobre la expresión de sinaptofisina (Figura 51), coincidiendo con estudios

previos sobre la sinaptotoxicidad inducida por el A β (Mucke y col., 2000; Abad y col., 2006). Nuestros hallazgos *in vitro* pusieron de manifiesto que, en cultivos primarios de neuronas, la leptina utiliza la vía JAK-STAT3, como vía de señalización (Figura 52) y que la inhibición de esta vía mediante el pretratamiento con Cucurbitacina I (Garza y col., 2008) bloquea los efectos de la leptina sobre la expresión de la proteína sinaptofisina (Figura 53). Este hecho sugiere que uno de los mecanismos implicados en la modulación de la sinaptofisina es la activación de STAT3 mediante su fosforilación, coincidiendo con estudios previos donde se describe una mayor expresión de sinaptofisina y STAT3 tras la administración aguda de leptina (Walker y col., 2007). Es importante tener en cuenta que en nuestro modelo experimental *in vitro* también se observó una disminución en la expresión de de sinaptofisina en neuronas control que habían sido pretratadas con Cucurbitacina I, por lo que puede que este inhibidor esté afectando de alguna manera a la expresión de sinaptofisina, ya que el mecanismo de actuación de este inhibidor natural es desconocido y existen evidencias que lo relacionan con la motilidad celular al interferir con los filamentos de actina (Knecht y col., 2010).

Se ha documentado que la transmisión sináptica excitatoria juega un importante papel en el crecimiento de las neuritas. De hecho, la formación de espinas dendríticas está estimulada por la activación sináptica de los receptores NMDA (Maletic-Savatic y col., 1999) y el glutamato modula la formación y motilidad de los filopodios dendríticos (McKinney y col., 1999; Fischer y col., 2000). Los cambios estructurales y morfológicos que ocurren durante los eventos de plasticidad sináptica pueden estar regulados por diferentes factores, como neurotrofinas o factores de crecimiento (Ethell y Pasquale, 2005). Cada vez hay más evidencias que señalan los efectos neurotróficos de la leptina tanto en el cerebro en desarrollo como en el cerebro adulto (Bouret y col., 2004; Garza y col., 2008; Guo y col., 2008). En el año 2004 se publicó uno de los primeros trabajos que ponía de relieve el papel esencial de la leptina en los circuitos neuronales hipotalámicos promoviendo el crecimiento neurítico (Bouret y col., 2004). También se ha demostrado que la leptina acelera la motilidad y densidad de los filopodios dendríticos en neuronas hipocampales, aumentado la densidad de las sinapsis y la longitud de las neuritas (O'Malley y col., 2007). En el presente trabajo, se analizó la longitud de las neuritas de neuronas, tanto de origen cortical como hipocampal, que habían sido tratadas con leptina (100 nM), A β -42 oligomerizado (5 μ g/ml) o con el tratamiento conjunto a tiempos de 18 y 36 horas. En primer

lugar se observó que tras 18 horas de tratamiento la leptina estimulaba la proyección de neuritas secundarias, probablemente debido a un aumento de la motilidad celular (O'Malley y col., 2007) tanto en neuronas corticales (Figura 54) como en hipocampales (Figura 56). El aumento de la motilidad celular es responsable de la formación de nuevas neuritas y nuevos contactos sinápticos ya que se ha correlacionado con una mayor expresión de componentes sinápticos (O'Malley y col., 2007). Estos resultados estarían en sintonía con nuestros resultados previos donde se observó una mayor expresión de sinaptofisina en neuronas primarias tras el tratamiento con leptina (Figura 51).

Tras prolongar el tratamiento hasta 36 horas se observó una disminución de la longitud de las neuritas en neuronas corticales (Figura 55) e hipocampales (Figura 57) tratadas con el péptido A β -42 oligomerizado, coincidiendo con resultados previos (Abad y col., 2006), y que la leptina era capaz de revertir estas alteraciones en el tratamiento conjunto de ambas moléculas al restablecer estos niveles hasta valores normales (Figuras 55 y 57) poniendo de manifiesto el papel neuroprotector de la leptina frente a la toxicidad ejercida por el péptido amiloide. Este resultado se correlacionaría con el de un estudio muy reciente donde los autores observaron que la leptina protegía frente a la muerte celular inducida por A β en cultivos primarios de neuronas (Doherty y col., 2013).

	18 horas de tratamiento	36 horas de tratamiento
Neuronas corticales		
Leptina (100 nM)	↑ Neuritas secundarias	=
A β -42 (5 μ g/ml)	=	↓ Neuritas totales, primarias y secundarias
Leptina + A β -42	↑ Neuritas secundarias	=
Neuronas hipocampales		
Leptina (100 nM)	↑ Neuritas secundarias	=
A β -42 (5 μ g/ml)	=	↓ Neuritas totales
Leptina + A β -42	↑ Neuritas secundarias	=

Tabla 16. Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de longitud de neuritas en cultivos primarios de neuronas. Las flechas indican una disminución (↓), un aumento (↑) de la longitud de neuritas frente a neuronas control. = no cambios significativos.

En resumen, en nuestro estudio la leptina por sí sola no tuvo efectos tróficos globales sobre el crecimiento neurítico de las neuronas, aunque tras 18 horas de tratamiento promovió la proyección de neuritas secundarias y tras el tratamiento más largo de 36 horas rescató a las células de los efectos tóxicos del A β . En la tabla 16 se esquematizan los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro* de análisis de longitud de neuritas.

4. Efectos neuroprotectores de la leptina

En este trabajo se encontró que el proceso de neurodegeneración, evaluado mediante el ensayo con Fluoro-Jade B, que tiñe exclusivamente neuronas en proceso de degeneración (Schmued y Hopkins, 2000), se reducía a nivel del giro dentado del hipocampo en los ratones APP/PS1 tratados con el HIV-leptina (Figura 58), aunque sin llegar a reducir la muerte celular, tal y como se observó tras los ensayos de detección de muerte celular (Figura 60B) y *Western-blot* de caspasa-3 (61C y D). Este hecho es especialmente importante en el contexto del proceso de neurogénesis que hemos estudiado y podría explicar el hecho de que en la EA la capacidad reparadora vía neurogénesis es limitada, como seguidamente discutiremos. Sin embargo, el tratamiento con HIV-leptina sí fue capaz de reducir la muerte celular determinada en la corteza de los ratones APP/PS1 (Figura 60A y 61A y B). El efecto neuroprotector de la leptina frente al A β -42 en un modelo *in vitro* utilizando neuronas corticales primarias y mediado por la regulación de la vía STAT3, se ha descrito muy recientemente (Doherty y col., 2013). En nuestro trabajo el efecto neuroprotector de la leptina parece estar mediado por la regulación sobre la expresión de la caspasa-3. Este resultado está en consonancia con estudios previos en modelos de Parkinson inducido por el tratamiento con 6-OHDA utilizando cultivos de neuronas dopaminérgicas, donde también se observó una reducción en la activación de la caspasa-3 tras la administración de leptina (Weng y col., 2007). Adicionalmente, también se ha descrito la capacidad neuroprotectora de la leptina mediante la disminución de la actividad de la caspasa-3 en un modelo de lesión medular (Fernandez-Martos y col., 2012).

5. Efectos neurogénicos de la leptina

En el presente estudio, se ha puesto en relieve la capacidad de la leptina para aumentar la neurogénesis tanto *in vivo*, en el modelo animal de amiloidosis APP/PS1, como *in vitro* en neuronas primarias corticales.

Aunque a una tasa no muy elevada, se ha descrito la existencia de neurogénesis en el cerebro adulto durante la senescencia (Kuhn y col., 1996). Además, el cerebro retiene la capacidad de regular la neurogenesis a través de diferentes mecanismos (Kempermann y col., 2002) y en condiciones como las que tienen lugar en la EA, la capacidad del cerebro para movilizar nuevas neuronas supone una nueva estrategia en la terapia de recambio celular. El proceso de neurogénesis en el adulto puede suponer un mecanismo natural de defensa frente a la neurodegeneración existente en la EA. Sin embargo, una neurogénesis incrementada puede no ser suficiente para compensar los cambios patológicos progresivos que ocurren en la EA (Jin y col., 2004), por lo que una estimulación de la neurogénesis podría suponer una nueva estrategia de terapia para el tratamiento de la EA.

La neurogénesis es un proceso que puede ser estimulado mediante factores fisiológicos, como es el caso de factores de crecimiento, o mediante procesos patológicos entre los que se incluye la neurodegeneración. Estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado que la leptina es capaz de estimular la neurogénesis hipocampal en términos de aumento de la proliferación celular (Garza y col., 2008). Adicionalmente, otras investigaciones han mostrado que la leptina favorece el aprendizaje espacial y la memoria (Farr y col., 2006; Oomura y col., 2006) y produce efectos similares a los antidepresivos (Lu y col., 2006; Lu, 2007).

En nuestro modelo experimental *in vivo* se observó que la administración icv del lentivirus HIV-leptina durante 1 mes incrementaba ligeramente, aunque sin alcanzar la significación estadística, la proliferación celular en el giro dentado del hipocampo (Figura 63A y B), lugar asociado con la neurogénesis e implicado en la patología de la EA. Además, tras la extensión del tratamiento de leptina hasta 3 meses se observó un incremento significativo de la proliferación celular (Figura 63C y D). Adicionalmente se demostró que esta estimulación de la proliferación

implicaba a progenitores neuronales hipocampales mediante un ensayo de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo específico anti-DCX (Figura 64). Estos hallazgos son consistentes con los resultados obtenidos en el estudio de Garza tras un tratamiento crónico de 14 días de leptina (Garza y col., 2008). En este estudio, los autores analizaron los cambios en el número total de células positivas para BrdU tras 1, 5 y 14 días de tratamiento con leptina mediante inyecciones diarias intraperitoneales de la proteína (1 mg/Kg). Ellos observaron una tendencia hacia la disminución del número de células BrdU positivas en el giro dentado de los animales control conforme se alargaba el tratamiento en el tiempo. Un resultado similar fue encontrado en el estudio de Nakagawa donde el número de células BrdU positivas en el giro dentado de animales control parecía reducirse tras un tratamiento crónico de 14 días del vehículo al compararlo con el tratamiento corto de 1 día (Nakagawa y col., 2002). Este hecho contrasta con nuestro estudio donde encontramos una tendencia al aumento de proliferación celular al prolongar el tratamiento de 1 a 3 meses (Figura 63). Debido a que está demostrado que el estrés y las hormonas relacionadas con el mismo disminuyen la proliferación celular en el giro dentado del hipocampo (Pham y col., 2003; Wong y Herbert, 2006), es posible que el procedimiento usado por el grupo de Garza, que implicaba repetidas inyecciones intraperitoneales, pueda haber sido estresante para los animales resultando en supresión o al menos reducción de la proliferación celular. Para evitar los efectos inductores de estrés sobre la neurogénesis, en nuestro estudio se utilizó un vector lentiviral como vía alternativa para la administración de leptina.

En el estudio de Garza y colaboradores (Garza y col., 2008) el efecto de la leptina sobre el proceso de neurogénesis era en términos de proliferación celular, ya que la leptina no produjo efectos significativos sobre la diferenciación celular. A diferencia de los resultados de estos estudios donde la leptina no mostró efectos significativos en la supervivencia celular, en nuestro trabajo, como mencionamos anteriormente, se observó una reducción significativa de la degeneración neuronal en el giro dentado del hipocampo (Figura 58). Este resultado es particularmente importante porque el microambiente que se desarrolla en el cerebro de pacientes con EA puede ser tóxico para las neuronas (Rapoport y col., 2002) y puede constituir un factor importante en la progresión de la pérdida neuronal que se observa con frecuencia en enfermos de EA (Hardy y Selkoe, 2002). Esta puede ser una de las razones por las cuales en la EA existe una limitación en la capacidad de reparación mediante la vía de la neurogénesis.

Recientemente se ha demostrado que una infusión crónica de leptina vía icv, protege a las neuronas hipocampales de la muerte celular (Guo y col., 2008). En nuestro modelo experimental la administración icv de HIV-leptina no produjo efectos significativos sobre la muerte celular a nivel del hipocampo, sin embargo sí fue capaz de reducir la degeneración de las celular del giro dentado (Figura 58). Nuestros resultados sugieren que la leptina tendría una importante acción dual: en primer lugar estimularía la proliferación de progenitores neuronales y en segundo lugar induciría la reducción de la degeneración celular inducida por A β , específicamente en el giro dentado del hipocampo, región principalmente implicada en los procesos de neurogénesis y memoria (Saab y col., 2009). Estos datos refuerzan el papel potencial de la leptina sobre la modulación de los procesos de la memoria.

Resumiendo, nuestros resultados *in vivo* indican que la leptina aumenta la proliferación de nuevas neuronas en el giro dentado en un modelo animal de amiloidosis, lo que podría contribuir al mantenimiento de las funciones hipocampales, incluyendo memoria, aprendizaje y regulación del estado de ánimo (Shors, 2008).

Utilizando un modelo experimental *in vitro* en cultivos de neuronas corticales tratados con A β y leptina a diferentes tiempos, hemos tratado de reproducir similares situaciones patológicas que tienen lugar *in vivo* en los ratones APP/PS1. Este tipo de modelo *in vitro* utilizando neuronas corticales de embriones de rata ha sido usado previamente para el estudio de la neurogénesis inducida por diferentes factores tróficos, como el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF: *Vascular endothelial growth factor*) (Jin y col., 2002b), el factor de crecimiento epidérmico (EGF: *Epidermal growth factor*) (Jin y col., 2002a) o la eritropoyetina (Osredkar y col., 2010). Tras realizar los diferentes ensayos de proliferación y diferenciación celular encontramos unos resultados equiparables a los obtenidos *in vivo*, que nos ayudan a comprender el desarrollo y evolución de los cambios patológicos que tiene lugar en la EA. Por una parte, y como era previsible (Garza y col., 2008), la leptina indujo un importante efecto proliferativo y diferenciador en cultivos primarios de neuronas corticales tras 72 horas de tratamiento (Figura 65 y 66), mientras que el A β *per se* no produjo ningún efecto significativo (Figura 65 y 66), siendo este hecho comparable a los resultados *in vivo* obtenidos previamente (Figura 63), donde no se observaron diferencias en la tasa de proliferación entre ratones APP/PS1 y controles no

transgénicos. Sin embargo, tras la administración conjunta de A β y leptina a los cultivos neuronales durante 7 días, lo que reproduciría el modelo de ratón APP/PS1 tratado con el lentivirus HIV-leptina, se observó un incremento en la tasa de proliferación de progenitores neuronales (identificadas como células doblemente marcadas para BrdU y DCX, BrdU-DCX+) (Figura 68B). Tras 7 días también se observó un ligero aumento de la proliferación celular (BrdU+) por parte de la leptina, aunque no llegó a ser significativo (Figura 68A). Adicionalmente, se observó que el número de células doblemente marcadas para BrdU y β III-tubulina (BrdU- β III-tubulina+) disminuía tras el tratamiento con A β , y los valores normales se restablecían tras el tratamiento conjunto con leptina (Figura 68D). La β III-tubulina es un marcador de neuronas en los primeros estadios de desarrollo (Curtis y col., 2003), pero en un estadio superior a las DCX positivas y su co-marcaje con BrdU sería un indicador de la supervivencia de las células que se habían generado *de novo* tras el estímulo de la leptina.

Es importante mencionar que en los estudios de proliferación también se identificaron células doblemente marcadas para BrdU y GFAP (Figura 67), indicando la existencia de células GFAP positivas que estaban proliferando en nuestros cultivos primarios, ya que, aunque optimizados para su enriquecimiento en neuronas, contienen una pequeña población de células positivas para GFAP, como se ha descrito previamente (Jin y col., 2002b), que corresponde a una población de células astrogliales.

En el tratamiento largo de 14 días no se observaron diferencias significativas en términos de proliferación celular (Figura 69A), sin embargo los efectos tóxicos del tratamiento prolongado con el péptido amiloide produjeron una disminución significativa del número de células doblemente marcadas para BrdU y β III-tubulina tanto en el grupo tratado sólo con A β , como el grupo tratado con A β (Figura 69B), indicando que la supervivencia de las neuronas que se habían generado *de novo* en los cultivos se estaba viendo comprometida, y la leptina no tuvo efectos sobre la supervivencia celular tras prolongar los tratamiento hasta 14 días. En estos hallazgos también tenemos que tener en cuenta el envejecimiento de las células neuronales que han permanecido en cultivo durante 3 semanas y con baja cantidad de recursos nutricionales (2% B27).

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En la tabla 17 se resumen los efectos de cada uno de los tratamientos en cada uno de los tiempos sobre la proliferación y diferenciación celular en cultivos primarios de neuronas.

	3 días	7 días	14 días
Leptina (100 nM)			
BrdU+	↑ (control)	=	=
BrdU-DCX+	↑ (control)	=	=
BrdU-βIII-tubulina+	NA	=	=
Aβ-42 (5 μg/ml)			
BrdU ⁺	=	=	=
BrdU/DCX+	=	↓ (leptina)	=
BrdU- βIII-tubulina+	NA	↓ (leptina)	=
Leptina + Aβ-42			
BrdU+	=	=	=
BrdU-DCX+	=	↑ (Aβ-42)	=
BrdU-βIII-tubulina+	NA	=	=

Tabla 17. Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de proliferación y diferenciación celular en cultivos primarios de neuronas. Las flechas indican una disminución (↓) o un aumento (↑), respecto al grupo que se indica entre paréntesis, en la proliferación o diferenciación celular. = no cambios significativos. NA: no analizado.

Por tanto, la capacidad de la leptina de estimular la proliferación de precursores neuronales, junto con su carácter neuroprotector, sería de especial importancia en enfermedades neurodegenerativas, incluida la EA, caracterizadas por alteraciones en el proceso de neurogénesis y por una importante tasa de pérdida neuronal. A pesar del cada vez más controvertido papel del Aβ en la EA, su carácter neurotóxico es incuestionable. Un ejemplo lo

encontramos en un reciente trabajo donde se describe como la inmunoterapia de A β produce una estimulación de la neurogénesis (Biscaro y col., 2009). Teniendo en cuenta la capacidad de la leptina de reducir la acumulación cerebral de A β (Figura 39), también esperaríamos un efecto positivo sobre el proceso de neurogénesis. Por lo tanto, los hallazgos obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto los diversos efectos tróficos de la leptina y su potencialidad en el tratamiento de la EA.

CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo son las siguientes:

1. La inyección icv del lentivirus que expresa leptina recombinante es una vía eficaz para la administración de leptina a nivel del SNC en el modelo transgénico murino APP/PS1. La infección resultante provocó la modulación de STAT3, una de las vías de señalización de la leptina.

2. Utilizando esta técnica de terapia génica, administrando el lentivirus HIV-leptina por vía icv a ratones APP/PS1 durante 3 meses, se revierten una serie de alteraciones patológicas características de la EA:
 - 2.1. El tratamiento crónico con leptina durante 3 meses reduce los déficits cognitivos de los ratones transgénicos APP/PS1 con respecto a los tratados con el vector vacío HIV-vv.

 - 2.2. La leptina disminuye la carga amiloide en los ratones APP/PS1 posiblemente debido a una disminución de los niveles de expresión de la enzima BACE1 tanto en corteza como en hipocampo.

 - 2.3. La leptina actúa sobre la respuesta inflamatoria modulando la actividad de la microglía en cultivos primarios de microgliales y disminuyendo la astrogliosis general y la asociada a las placas amiloides en la corteza de ratones APP/PS1.

 - 2.4. El porcentaje de sinapsis en espinas en la región CA1 del hipocampo está disminuido en los ratones APP/PS1 con respecto a los controles no transgénicos. La leptina rescata de las alteraciones sinápticas inducidas por el A β al observar una disminución de la expresión de caspasa-3, y un aumento de la proteína sináptica sinaptofisina en sinaptosomas de corteza e hipocampo de ratones APP/PS1.

 - 2.5. El efecto de la leptina sobre la expresión de sinaptofisina implica la activación de la vía de señalización STAT3.

- 2.6. La leptina bloquea el efecto tóxico del A β sobre el crecimiento neurítico en neuronas corticales e hipocampales, restaurando la longitud de las neuritas.
- 2.7. Tras 3 meses de tratamiento con HIV-leptina observamos una disminución de la degeneración celular en el hipocampo y una disminución de la muerte celular, asociada a la expresión de caspasa-3, en corteza de los ratones APP/PS1.
- 2.8. La leptina aumenta la proliferación de progenitores neurales tanto *in vivo* en ratones APP/PS1 tras 3 meses de terapia génica con HIV-leptina, como *in vitro* en cultivos primarios de neuronas tras 72 horas de tratamiento.

Y como conclusión final:

La leptina administrada via terapia génica en este estudio ha demostrado ser un potencial agente terapéutico ejerciendo diversos efectos neuroprotectores sobre los eventos patológicos característicos de la EA. La modulación de la plasticidad sináptica, asociada a los niveles cerebrales de A β , así como la implicación de la gliosis, podrían ser los efectores directos de la leptina.

BIBLIOGRAFÍA

- Abad, M.A., Enguita, M., DeGregorio-Rocasolano, N., Ferrer, I., Trullas, R. (2006). Neuronal pentraxin 1 contributes to the neuronal damage evoked by amyloid-beta and is overexpressed in dystrophic neurites in Alzheimer's brain. *J Neurosci* 26, 12735-12747.
- Acarin, L., Vela, J.M., Gonzalez, B., Castellano, B. (1994). Demonstration of poly-N-acetyl lactosamine residues in amoeboid and ramified microglial cells in rat brain by tomato lectin binding. *J Histochem Cytochem* 42, 1033-1041.
- Adlard, P.A., Bica, L., White, A.R., Nurjono, M., Filiz, G., Crouch, P.J., Donnelly, P.S., Cappai, R., Finkelstein, D.I., Bush, A.I. (2011). Metal ionophore treatment restores dendritic spine density and synaptic protein levels in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 6, e17669.
- Ahima, R.S. (2005). Central actions of adipocyte hormones. *Trends Endocrinol Metab* 16, 307-313.
- Ahima, R.S., Lazar, M.A. (2008). Adipokines and the peripheral and neural control of energy balance. *Mol Endocrinol* 22, 1023-1031.
- Aiuti, A., Bachoud-Levi, A.C., Blesch, A., Brenner, M.K., Cattaneo, F., Chiocca, E.A., Gao, G., High, K.A., Leen, A.M., Lemoine, N.R. y col., (2007). Progress and prospects: gene therapy clinical trials (part 2). *Gene Ther* 14, 1555-1563.
- Akiyama, H., Arai, T., Kondo, H., Tanno, E., Haga, C., Ikeda, K. (2000). Cell mediators of inflammation in the Alzheimer disease brain. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 14 Suppl 1, S47-53.
- Altman, J., Das, G.D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124, 319-335.
- Alvira-Botero, X., Pérez-González, R., Spuch, C., Vargas, T., Antequera, D., Garzon, M., Bermejo-Pareja, F., Carro, E. (2010). Megalin interacts with APP and the intracellular adapter protein FE65 in neurons. *Mol Cell Neurosci* 45, 306-315.
- Amaducci, L., Tesco, G. (1994). Aging as a major risk for degenerative diseases of the central nervous system. *Curr Opin Neurol* 7, 283-286.
- Anderwald, C., Muller, G., Koca, G., Furnsinn, C., Waldhausl, W., Roden, M. (2002). Short-term leptin-dependent inhibition of hepatic gluconeogenesis is mediated by insulin receptor substrate-2. *Mol Endocrinol* 16, 1612-1628.
- Anstey, K.J., von Sanden, C., Salim, A., O'Kearney, R. (2007). Smoking as a risk factor for dementia and cognitive decline: a meta-analysis of prospective studies. *Am J Epidemiol* 166, 367-378.
- Anstey, K.J., Cherbuin, N., Budge, M., Young, J. (2011). Body mass index in midlife and late-life as a risk factor for dementia: a meta-analysis of prospective studies. *Obes Rev* 12, e426-437.

- Antequera, D., Vargas, T., Ugalde, C., Spuch, C., Molina, J.A., Ferrer, I., Bermejo-Pareja, F., Carro, E. (2009). Cytoplasmic gelsolin increases mitochondrial activity and reduces Abeta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 36, 42-50.
- Arendash, G.W., King, D.L., Gordon, M.N., Morgan, D., Hatcher, J.M., Hope, C.E., Diamond, D.M. (2001). Progressive, age-related behavioral impairments in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin-1 transgenes. *Brain Res* 891, 42-53.
- Arendt, T., Zvegintseva, H.G., Leontovich, T.A. (1986). Dendritic changes in the basal nucleus of Meynert and in the diagonal band nucleus in Alzheimer's disease--a quantitative Golgi investigation. *Neuroscience* 19, 1265-1278.
- Attoub, S., Noe, V., Pirola, L., Bruyneel, E., Chastre, E., Mareel, M., Wymann, M.P., Gispach, C. (2000). Leptin promotes invasiveness of kidney and colonic epithelial cells via phosphoinositide 3-kinase-, rho-, and rac-dependent signaling pathways. *FASEB J* 14, 2329-2338.
- Bado, A., Levasseur, S., Attoub, S., Kermorgant, S., Laigneau, J.P., Bortoluzzi, M.N., Moizo, L., Lehy, T., Guerre-Millo, M., Le Marchand-Brustel, Y. *y col.*, (1998). The stomach is a source of leptin. *Nature* 394, 790-793.
- Banks, A.S., Davis, S.M., Bates, S.H., Myers, M.G., Jr. (2000). Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem* 275, 14563-14572.
- Banks, W.A., Kastin, A.J., Huang, W., Jaspan, J.B., Maness, L.M. (1996). Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 17, 305-311.
- Barrett-Connor, E., Edelstein, S.L., Corey-Bloom, J., Wiederholt, W.C. (1996). Weight loss precedes dementia in community-dwelling older adults. *J Am Geriatr Soc* 44, 1147-1152.
- Bates, S.H., Myers, M.G., Jr. (2003). The role of leptin receptor signaling in feeding and neuroendocrine function. *Trends Endocrinol Metab* 14, 447-452.
- Bates, S.H., Stearns, W.H., Dundon, T.A., Schubert, M., Tso, A.W., Wang, Y., Banks, A.S., Lavery, H.J., Haq, A.K., Maratos-Flier, E. *y col.*, (2003). STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature* 421, 856-859.
- Bell, R.D., Zlokovic, B.V. (2009). Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 118, 103-113.
- Bendinelli, P., Maroni, P., Pecori Giraldi, F., Piccoletti, R. (2000). Leptin activates Stat3, Stat1 and AP-1 in mouse adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 168, 11-20.
- Benjamin, R., Leake, A., McArthur, F.K., Ince, P.G., Candy, J.M., Edwardson, J.A., Morris, C.M., Bjertness, E. (1994). Protective effect of apoE epsilon 2 in Alzheimer's disease. *Lancet* 344, 473.

- Bertoni-Freddari, C., Fattoretti, P., Paoloni, R., Caselli, U., Galeazzi, L., Meier-Ruge, W. (1996). Synaptic structural dynamics and aging. *Gerontology* 42, 170-180.
- Bertram, L., McQueen, M.B., Mullin, K., Blacker, D., Tanzi, R.E. (2007). Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat Genet* 39, 17-23.
- Beydoun, M.A., Beydoun, H.A., Wang, Y. (2008). Obesity and central obesity as risk factors for incident dementia and its subtypes: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* 9, 204-218.
- Billingsley, M.L., Kincaid, R.L. (1997). Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration. *Biochem J* 323 (Pt 3), 577-591.
- Biscaro, B., Lindvall, O., Hock, C., Ekdahl, C.T., Nitsch, R.M. (2009). Abeta immunotherapy protects morphology and survival of adult-born neurons in doubly transgenic APP/PS1 mice. *J Neurosci* 29, 14108-14119.
- Bjorbaek, C., El-Haschimi, K., Frantz, J.D., Flier, J.S. (1999). The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *J Biol Chem* 274, 30059-30065.
- Bjorbaek, C., Elmquist, J.K., Michl, P., Ahima, R.S., van Bueren, A., McCall, A.L., Flier, J.S. (1998). Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology* 139, 3485-3491.
- Bjorbaek, C., Kahn, B.B. (2004). Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res* 59, 305-331.
- Bjorbaek, C., Uotani, S., da Silva, B., Flier, J.S. (1997). Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem* 272, 32686-32695.
- Blennow, K., de Leon, M.J., Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's disease. *Lancet* 368, 387-403.
- Bliss, T.V., Collingridge, G.L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-39.
- Block, M.L., Hong, J.S. (2005). Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol* 76, 77-98.
- Blomer, U., Naldini, L., Kafri, T., Trono, D., Verma, I.M., Gage, F.H. (1997). Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. *J Virol* 71, 6641-6649.
- Bouret, S.G., Draper, S.J., Simerly, R.B. (2004). Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* 304, 108-110.
- Bourne, J.N., Harris, K.M. (2008). Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu Rev Neurosci* 31, 47-67.

- Brennan, A.M., Mantzoros, C.S. (2006). Drug Insight: the role of leptin in human physiology and pathophysiology--emerging clinical applications. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2, 318-327.
- Bullido, M.J., Martinez-Garcia, A., Tenorio, R., Sastre, I., Munoz, D.G., Frank, A., Valdivieso, F. (2008). Double stranded RNA activated EIF2 alpha kinase (EIF2AK2; PKR) is associated with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 29, 1160-1166.
- Caille, I., Allinquant, B., Dupont, E., Bouillot, C., Langer, A., Muller, U., Prochiantz, A. (2004). Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Development* 131, 2173-2181.
- Caporaso, G.L., Takei, K., Gandy, S.E., Matteoli, M., Mundigl, O., Greengard, P., De Camilli, P. (1994). Morphologic and biochemical analysis of the intracellular trafficking of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein. *J Neurosci* 14, 3122-3138.
- Carleton, A., Petreanu, L.T., Lansford, R., Alvarez-Buylla, A., Lledo, P.M. (2003). Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci* 6, 507-518.
- Carrasquillo, M.M., Belbin, O., Hunter, T.A., Ma, L., Bisceglia, G.D., Zou, F., Crook, J.E., Pankratz, V.S., Dickson, D.W., Graff-Radford, N.R. *y col.*, (2010). Replication of CLU, CR1, and PICALM associations with alzheimer disease. *Arch Neurol* 67, 961-964.
- Carro, E., Spuch, C., Trejo, J.L., Antequera, D., Torres-Aleman, I. (2005). Choroid plexus megalin is involved in neuroprotection by serum insulin-like growth factor I. *J Neurosci* 25, 10884-10893.
- Carro, E., Trejo, J.L., Gerber, A., Loetscher, H., Torrado, J., Metzger, F., Torres-Aleman, I. (2006a). Therapeutic actions of insulin-like growth factor I on APP/PS2 mice with severe brain amyloidosis. *Neurobiol Aging* 27, 1250-1257.
- Carro, E., Trejo, J.L., Spuch, C., Bohl, D., Heard, J.M., Torres-Aleman, I. (2006b). Blockade of the insulin-like growth factor I receptor in the choroid plexus originates Alzheimer's-like neuropathology in rodents: new cues into the human disease? *Neurobiol Aging* 27, 1618-1631.
- Carro, E.M. (2009). Therapeutic approaches of leptin in Alzheimer's disease. *Recent Pat CNS Drug Discov* 4, 200-208.
- Carter, C.L., Resnick, E.M., Mallampalli, M., Kalbarczyk, A. (2012). Sex and gender differences in Alzheimer's disease: recommendations for future research. *J Womens Health (Larchmt)* 21, 1018-1023.
- Chen, H., Charlat, O., Tartaglia, L.A., Woolf, E.A., Weng, X., Ellis, S.J., Lakey, N.D., Culpepper, J., Moore, K.J., Breitbart, R.E. *y col.*, (1996). Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 84, 491-495.

- Cheng, J., Cummings, J. (2000). Neurobehavioral and neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: characteristics and treatment. *Neurol Clin* 18, 829-846.
- Chu, L.W. (2012). Alzheimer's disease: early diagnosis and treatment. *Hong Kong Med J* 18, 228-237.
- Coleman, D.L. (2010). A historical perspective on leptin. *Nat Med* 16, 1097-1099.
- Coleman, D.L., Hummel, K.P. (1973). The influence of genetic background on the expression of the obese (Ob) gene in the mouse. *Diabetologia* 9, 287-293.
- Coleman, P.D., Yao, P.J. (2003). Synaptic slaughter in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 24, 1023-1027.
- Colonnier, M., Beaulieu, C. (1985). An empirical assessment of stereological formulae applied to the counting of synaptic disks in the cerebral cortex. *J Comp Neurol* 231, 175-179.
- Colton, C.A. (2009). Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol* 4, 399-418.
- Coraci, I.S., Husemann, J., Berman, J.W., Hulette, C., Dufour, J.H., Campanella, G.K., Luster, A.D., Silverstein, S.C., El-Khoury, J.B. (2002). CD36, a class B scavenger receptor, is expressed on microglia in Alzheimer's disease brains and can mediate production of reactive oxygen species in response to beta-amyloid fibrils. *Am J Pathol* 160, 101-112.
- Corder, E.H., Woodbury, M.A., Volkman, I., Madsen, D.K., Bogdanovic, N., Winblad, B. (2000). Density profiles of Alzheimer disease regional brain pathology for the huddinge brain bank: pattern recognition emulates and expands upon Braak staging. *Exp Gerontol* 35, 851-864.
- Cota, D., Proulx, K., Smith, K.A., Kozma, S.C., Thomas, G., Woods, S.C., Seeley, R.J. (2006). Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science* 312, 927-930.
- Couce, M.E., Burguera, B., Parisi, J.E., Jensen, M.D., Lloyd, R.V. (1997). Localization of leptin receptor in the human brain. *Neuroendocrinology* 66, 145-150.
- Craft, S., Baker, L.D., Montine, T.J., Minoshima, S., Watson, G.S., Claxton, A., Arbuckle, M., Callaghan, M., Tsai, E., Plymate, S.R. *y col.*, (2012). Intranasal insulin therapy for Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment: a pilot clinical trial. *Arch Neurol* 69, 29-38.
- Curtis, M.A., Penney, E.B., Pearson, A.G., van Roon-Mom, W.M., Butterworth, N.J., Dragunow, M., Connor, B., Faull, R.L. (2003). Increased cell proliferation and neurogenesis in the adult human Huntington's disease brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 9023-9027.
- D'Amelio, M., Cavallucci, V., Middei, S., Marchetti, C., Pacioni, S., Ferri, A., Diamantini, A., De Zio, D., Carrara, P., Battistini, L. *y col.*, (2011). Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 14, 69-76.
- Deacon, R.M., Rawlins, J.N. (2006). T-maze alternation in the rodent. *Nat Protoc* 1, 7-12.

- DeFelipe, J., Marco, P., Busturia, I., Merchan-Perez, A. (1999). Estimation of the number of synapses in the cerebral cortex: methodological considerations. *Cereb Cortex* 9, 722-732.
- DeKosky, S.T., Scheff, S.W. (1990). Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol* 27, 457-464.
- Denver, R.J., Bonett, R.M., Boorse, G.C. (2011). Evolution of leptin structure and function. *Neuroendocrinology* 94, 21-38.
- Dewachter, I., Reverse, D., Caluwaerts, N., Ris, L., Kuiperi, C., Van den Haute, C., Spittaels, K., Umans, L., Serneels, L., Thiry, E. *y col.*, (2002). Neuronal deficiency of presenilin 1 inhibits amyloid plaque formation and corrects hippocampal long-term potentiation but not a cognitive defect of amyloid precursor protein [V717I] transgenic mice. *J Neurosci* 22, 3445-3453.
- Dietrich, M.O., Spuch, C., Antequera, D., Rodal, I., de Yebenes, J.G., Molina, J.A., Bermejo, F., Carro, E. (2008). Megalin mediates the transport of leptin across the blood-CSF barrier. *Neurobiol Aging* 29, 902-912.
- Dillon, C., Goda, Y. (2005). The actin cytoskeleton: integrating form and function at the synapse. *Annu Rev Neurosci* 28, 25-55.
- Ding, Y., Qiao, A., Wang, Z., Goodwin, J.S., Lee, E.S., Block, M.L., Allsbrook, M., McDonald, M.P., Fan, G.H. (2008). Retinoic acid attenuates beta-amyloid deposition and rescues memory deficits in an Alzheimer's disease transgenic mouse model. *J Neurosci* 28, 11622-11634.
- Djupesland, P.G. (2008). Intranasal insulin improves cognition and modulates beta-amyloid in early AD. *Neurology* 71, 864; author reply 864.
- Dobson, C.B., Wozniak, M.A., Itzhaki, R.F. (2003). Do infectious agents play a role in dementia? *Trends Microbiol* 11, 312-317.
- Doherty, G.H., Beccano-Kelly, D., Yan, S.D., Gunn-Moore, F.J., Harvey, J. (2013). Leptin prevents hippocampal synaptic disruption and neuronal cell death induced by amyloid beta. *Neurobiol Aging* 34, 226-237.
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R.J., Nguyen, M., Trono, D., Naldini, L. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72, 8463-8471.
- Elmqvist, J.K., Bjorbaek, C., Ahima, R.S., Flier, J.S., Saper, C.B. (1998). Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol* 395, 535-547.
- Endo, T.A., Masuhara, M., Yokouchi, M., Suzuki, R., Sakamoto, H., Mitsui, K., Matsumoto, A., Tanimura, S., Ohtsubo, M., Misawa, H. *y col.*, (1997). A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 387, 921-924.
- Ethell, I.M., Pasquale, E.B. (2005). Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling. *Prog Neurobiol* 75, 161-205.

- Farr, S.A., Banks, W.A., Morley, J.E. (2006). Effects of leptin on memory processing. *Peptides* 27, 1420-1425.
- Fei, H., Okano, H.J., Li, C., Lee, G.H., Zhao, C., Darnell, R., Friedman, J.M. (1997). Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7001-7005.
- Ferguson, S.A., Sarkar, S., Schmued, L.C. (2013). Longitudinal behavioral changes in the APP/PS1 transgenic Alzheimer's Disease model. *Behav Brain Res* 242C, 125-134.
- Fernandez-Martos, C.M., Gonzalez, P., Rodriguez, F.J. (2012). Acute leptin treatment enhances functional recovery after spinal cord injury. *PLoS One* 7, e35594.
- Fewlass, D.C., Noboa, K., Pi-Sunyer, F.X., Johnston, J.M., Yan, S.D., Tezapsidis, N. (2004). Obesity-related leptin regulates Alzheimer's Abeta. *FASEB J* 18, 1870-1878.
- Fischer, M., Kaech, S., Wagner, U., Brinkhaus, H., Matus, A. (2000). Glutamate receptors regulate actin-based plasticity in dendritic spines. *Nat Neurosci* 3, 887-894.
- Fishel, M.A., Watson, G.S., Montine, T.J., Wang, Q., Green, P.S., Kulstad, J.J., Cook, D.G., Peskind, E.R., Baker, L.D., Goldgaber, D. *et al.* (2005). Hyperinsulinemia provokes synchronous increases in central inflammation and beta-amyloid in normal adults. *Arch Neurol* 62, 1539-1544.
- Fitzpatrick, A.L., Kuller, L.H., Lopez, O.L., Diehr, P., O'Meara, E.S., Longstreth, W.T., Jr., Luchsinger, J.A. (2009). Midlife and late-life obesity and the risk of dementia: cardiovascular health study. *Arch Neurol* 66, 336-342.
- Fox, N.C., Black, R.S., Gilman, S., Rossor, M.N., Griffith, S.G., Jenkins, L., Koller, M. (2005). Effects of Abeta immunization (AN1792) on MRI measures of cerebral volume in Alzheimer disease. *Neurology* 64, 1563-1572.
- Fratiglioni, L., Ahlbom, A., Viitanen, M., Winblad, B. (1993). Risk factors for late-onset Alzheimer's disease: a population-based, case-control study. *Ann Neurol* 33, 258-266.
- Fratiglioni, L., De Ronchi, D., Aguero-Torres, H. (1999). Worldwide prevalence and incidence of dementia. *Drugs Aging* 15, 365-375.
- Friedman, J.M. (1998). Leptin, leptin receptors, and the control of body weight. *Nutr Rev* 56, s38-46; discussion s54-75.
- Fruhbeck, G. (2006). Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J* 393, 7-20.
- Furukawa, K., Sopher, B.L., Rydel, R.E., Begley, J.G., Pham, D.G., Martin, G.M., Fox, M., Mattson, M.P. (1996). Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *J Neurochem* 67, 1882-1896.

- Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., Carr, T., Clemens, J., Donaldson, T., Gillespie, F. *y col.*, (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 373, 523-527.
- Garcia-Marin, V., Garcia-Lopez, P., Freire, M. (2007). Cajal's contributions to the study of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 12, 161-174.
- Garza, J.C., Guo, M., Zhang, W., Lu, X.Y. (2008). Leptin increases adult hippocampal neurogenesis in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 283, 18238-18247.
- Gerges, N.Z., Aleisa, A.M., Alkadhi, K.A. (2003). Impaired long-term potentiation in obese zucker rats: possible involvement of presynaptic mechanism. *Neuroscience* 120, 535-539.
- Germano, C., Kinsella, G.J. (2005). Working memory and learning in early Alzheimer's disease. *Neuropsychol Rev* 15, 1-10.
- Giusti-Rodriguez, P., Gao, J., Graff, J., Rei, D., Soda, T., Tsai, L.H. (2011). Synaptic deficits are rescued in the p25/Cdk5 model of neurodegeneration by the reduction of beta-secretase (BACE1). *J Neurosci* 31, 15751-15756.
- Glennner, G.G., Wong, C.W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120, 885-890.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M.C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L. *y col.*, (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704-706.
- Gouras, G.K., Tampellini, D., Takahashi, R.H., Capetillo-Zarate, E. (2010). Intraneuronal beta-amyloid accumulation and synapse pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 119, 523-541.
- Grant, W.B. (1999). Dietary links to Alzheimer's disease: 1999 update. *J Alzheimers Dis* 1, 197-201.
- Grant, W.B. (2004). Obesity and Alzheimer disease: roles of diet and genetics. *Arch Intern Med* 164, 109-110; author reply 110.
- Greco, S.J., Bryan, K.J., Sarkar, S., Zhu, X., Smith, M.A., Ashford, J.W., Johnston, J.M., Tezapsidis, N., Casadesus, G. (2010). Leptin reduces pathology and improves memory in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 19, 1155-1167.
- Greco, S.J., Sarkar, S., Johnston, J.M., Tezapsidis, N. (2009). Leptin regulates tau phosphorylation and amyloid through AMPK in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 380, 98-104.

- Greco, S.J., Sarkar, S., Johnston, J.M., Zhu, X., Su, B., Casadesus, G., Ashford, J.W., Smith, M.A., Tezapsidis, N. (2008). Leptin reduces Alzheimer's disease-related tau phosphorylation in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 376, 536-541.
- Greenfield, J.P., Tsai, J., Gouras, G.K., Hai, B., Thinakaran, G., Checler, F., Sisodia, S.S., Greengard, P., Xu, H. (1999). Endoplasmic reticulum and trans-Golgi network generate distinct populations of Alzheimer beta-amyloid peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 742-747.
- Guo, Z., Jiang, H., Xu, X., Duan, W., Mattson, M.P. (2008). Leptin-mediated cell survival signaling in hippocampal neurons mediated by JAK STAT3 and mitochondrial stabilization. *J Biol Chem* 283, 1754-1763.
- Haass, C., Hung, A.Y., Schlossmacher, M.G., Teplow, D.B., Selkoe, D.J. (1993). beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J Biol Chem* 268, 3021-3024.
- Haass, C., Selkoe, D.J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 101-112.
- Hanisch, U.K., Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10, 1387-1394.
- Hardy, J., Selkoe, D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353-356.
- Hardy, J.A., Higgins, G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184-185.
- Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Gerrish, A., Hamshere, M.L., Pahwa, J.S., Moskva, V., Dowzell, K., Williams, A. *et al.*, (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 41, 1088-1093.
- Hartmann, T., Bieger, S.C., Bruhl, B., Tienari, P.J., Ida, N., Allsop, D., Roberts, G.W., Masters, C.L., Dotti, C.G., Unsicker, K. *et al.*, (1997). Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides. *Nat Med* 3, 1016-1020.
- Harvey, J., McKay, N.G., Walker, K.S., Van der Kaay, J., Downes, C.P., Ashford, M.L. (2000). Essential role of phosphoinositide 3-kinase in leptin-induced K(ATP) channel activation in the rat CRI-G1 insulinoma cell line. *J Biol Chem* 275, 4660-4669.
- Harvey, J., Shanley, L.J., O'Malley, D., Irving, A.J. (2005). Leptin: a potential cognitive enhancer? *Biochem Soc Trans* 33, 1029-1032.
- Hay, N., Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 18, 1926-1945.
- Hebert, S.S., Horre, K., Nicolai, L., Papadopoulou, A.S., Mandemakers, W., Silahtaroglu, A.N., Kauppinen, S., Delacourte, A., De Strooper, B. (2008). Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1

in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 6415-6420.

Hegyí, K., Fulop, K., Kovacs, K., Toth, S., Falus, A. (2004). Leptin-induced signal transduction pathways. *Cell Biol Int* 28, 159-169.

Hendriks, L., van Duijn, C.M., Cras, P., Cruts, M., Van Hul, W., van Harskamp, F., Warren, A., McInnis, M.G., Antonarakis, S.E., Martin, J.J. *y col.*, (1992). Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nat Genet* 1, 218-221.

Herrup, K. (2010). Reimagining Alzheimer's disease--an age-based hypothesis. *J Neurosci* 30, 16755-16762.

Ho, A.J., Raji, C.A., Becker, J.T., Lopez, O.L., Kuller, L.H., Hua, X., Lee, S., Hibar, D., Dinov, I.D., Stein, J.L. *y col.*, (2010). Obesity is linked with lower brain volume in 700 AD and MCI patients. *Neurobiol Aging* 31, 1326-1339.

Hoenicke, J. (2006). [Genes in Alzheimer's disease]. *Rev Neurol* 42, 302-305.

Hollingworth, P., Harold, D., Sims, R., Gerrish, A., Lambert, J.C., Carrasquillo, M.M., Abraham, R., Hamshere, M.L., Pahwa, J.S., Moskvina, V. *y col.*, (2011). Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 43, 429-435.

Hooper, C., Killick, R., Lovestone, S. (2008). The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 104, 1433-1439.

Hsia, A.Y., Masliah, E., McConlogue, L., Yu, G.Q., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Malenka, R.C., Nicoll, R.A., Mucke, L. (1999). Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3228-3233.

Ihle, J.N. (1995). Cytokine receptor signalling. *Nature* 377, 591-594.

Irvine, K., Laws, K.R., Gale, T.M., Kondel, T.K. (2012). Greater cognitive deterioration in women than men with Alzheimer's disease: A meta analysis. *J Clin Exp Neuropsychol*.

Itzhaki, R. (2004). Herpes simplex virus type 1, apolipoprotein E and Alzheimer' disease. *Herpes* 11 Suppl 2, 77A-82A.

Jacobsen, J.S., Wu, C.C., Redwine, J.M., Comery, T.A., Arias, R., Bowlby, M., Martone, R., Morrison, J.H., Pangalos, M.N., Reinhart, P.H. *y col.*, (2006). Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5161-5166.

Jin, K., Mao, X.O., Sun, Y., Xie, L., Jin, L., Nishi, E., Klagsbrun, M., Greenberg, D.A. (2002a). Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor: hypoxia-inducible expression in vitro and stimulation of neurogenesis in vitro and in vivo. *J Neurosci* 22, 5365-5373.

- Jin, K., Peel, A.L., Mao, X.O., Xie, L., Cottrell, B.A., Henshall, D.C., Greenberg, D.A. (2004). Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 343-347.
- Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X.O., Xie, L., Greenberg, D.A. (2002b). Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 11946-11950.
- Jin, M., Shepardson, N., Yang, T., Chen, G., Walsh, D., Selkoe, D.J. (2011). Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 5819-5824.
- Jonsson, T., Atwal, J.K., Steinberg, S., Snaedal, J., Jonsson, P.V., Bjornsson, S., Stefansson, H., Sulem, P., Gudbjartsson, D., Maloney, J. *y col.*, (2012). A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* *488*, 96-99.
- Kakimura, J., Kitamura, Y., Takata, K., Umeki, M., Suzuki, S., Shibagaki, K., Taniguchi, T., Nomura, Y., Gebicke-Haerter, P.J., Smith, M.A. *y col.*, (2002). Microglial activation and amyloid-beta clearance induced by exogenous heat-shock proteins. *FASEB J* *16*, 601-603.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H. (1982). Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. *Science* *218*, 433-443.
- Kaneda, Y., Morishita, R. (1999). [Gene therapy of cardiovascular disorders]. *Hum Cell* *12*, 109-114.
- Katzman, R. (1986). Alzheimer's disease. *N Engl J Med* *314*, 964-973.
- Kempermann, G., Gast, D., Gage, F.H. (2002). Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann Neurol* *52*, 135-143.
- Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B., Kronenberg, G. (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* *27*, 447-452.
- Kloek, C., Haq, A.K., Dunn, S.L., Lavery, H.J., Banks, A.S., Myers, M.G., Jr. (2002). Regulation of Jak kinases by intracellular leptin receptor sequences. *J Biol Chem* *277*, 41547-41555.
- Knecht, D.A., LaFleur, R.A., Kahsai, A.W., Argueta, C.E., Beshir, A.B., Fenteany, G. (2010). Cucurbitacin I inhibits cell motility by indirectly interfering with actin dynamics. *PLoS One* *5*, e14039.
- Koistinaho, M., Lin, S., Wu, X., Esterman, M., Koger, D., Hanson, J., Higgs, R., Liu, F., Malkani, S., Bales, K.R. *y col.*, (2004). Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-beta peptides. *Nat Med* *10*, 719-726.

- Konner, A.C., Klockener, T., Bruning, J.C. (2009). Control of energy homeostasis by insulin and leptin: targeting the arcuate nucleus and beyond. *Physiol Behav* 97, 632-638.
- Koob, A.O., Borgens, R.B. (2006). Polyethylene glycol treatment after traumatic brain injury reduces beta-amyloid precursor protein accumulation in degenerating axons. *J Neurosci Res* 83, 1558-1563.
- Kou, J., Kim, H.D., Jin, J., Cao, D., Li, L., Lalonde, R., Fukuchi, K. (2010). Simvastatin enhances immune responses to A β vaccination and attenuates vaccination-induced behavioral alterations. *Brain Res* 1356, 102-111.
- Kuhn, H.G., Dickinson-Anson, H., Gage, F.H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16, 2027-2033.
- Lambert, J.C., Heath, S., Even, G., Campion, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., Combarros, O., Zelenika, D., Bullido, M.J., Tavernier, B. *y col.*, (2009). Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *CR1* associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 41, 1094-1099.
- Lautenschlager, N.T., Cupples, L.A., Rao, V.S., Auerbach, S.A., Becker, R., Burke, J., Chui, H., Duara, R., Foley, E.J., Glatt, S.L. *y col.*, (1996). Risk of dementia among relatives of Alzheimer's disease patients in the MIRAGE study: What is in store for the oldest old? *Neurology* 46, 641-650.
- Lee, G.H., Proenca, R., Montez, J.M., Carroll, K.M., Darvishzadeh, J.G., Lee, J.I., Friedman, J.M. (1996). Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379, 632-635.
- Lee, J.H., Chan, J.L., Sourlas, E., Raptopoulos, V., Mantzoros, C.S. (2006). Recombinant methionyl human leptin therapy in replacement doses improves insulin resistance and metabolic profile in patients with lipotrophy and metabolic syndrome induced by the highly active antiretroviral therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 2605-2611.
- Lee, E.B. (2011). Obesity, leptin, and Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1243, 15-29.
- Li, C., Friedman, J.M. (1999). Leptin receptor activation of SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase 2 modulates Ob receptor signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9677-9682.
- Li, S., Huang, L. (2000). Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gene Ther* 7, 31-34.
- Li, X.L., Aou, S., Oomura, Y., Hori, N., Fukunaga, K., Hori, T. (2002). Impairment of long-term potentiation and spatial memory in leptin receptor-deficient rodents. *Neuroscience* 113, 607-615.
- Licinio, J., Caglayan, S., Ozata, M., Yildiz, B.O., de Miranda, P.B., O'Kirwan, F., Whitby, R., Liang, L., Cohen, P., Bhasin, S. *y col.*, (2004). Phenotypic effects of leptin replacement on morbid obesity, diabetes mellitus, hypogonadism, and behavior in leptin-deficient adults. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4531-4536.

- Lieb, W., Beiser, A.S., Vasan, R.S., Tan, Z.S., Au, R., Harris, T.B., Roubenoff, R., Auerbach, S., DeCarli, C., Wolf, P.A. y col., (2009). Association of plasma leptin levels with incident Alzheimer disease and MRI measures of brain aging. *JAMA* 302, 2565-2572.
- Lin, X., Koelsch, G., Wu, S., Downs, D., Dashti, A., Tang, J. (2000). Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1456-1460.
- Lovestone, S., Hartley, C.L., Pearce, J., Anderton, B.H. (1996). Phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase-3 beta in intact mammalian cells: the effects on the organization and stability of microtubules. *Neuroscience* 73, 1145-1157.
- Lu, X.Y. (2007). The leptin hypothesis of depression: a potential link between mood disorders and obesity? *Curr Opin Pharmacol* 7, 648-652.
- Lu, X.Y., Kim, C.S., Frazer, A., Zhang, W. (2006). Leptin: a potential novel antidepressant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1593-1598.
- Luber-Narod, J., Rogers, J. (1988). Immune system associated antigens expressed by cells of the human central nervous system. *Neurosci Lett* 94, 17-22.
- Lucin, K.M., Wyss-Coray, T. (2009). Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little? *Neuron* 64, 110-122.
- Lue, L.F., Rydel, R., Brigham, E.F., Yang, L.B., Hampel, H., Murphy, G.M., Jr., Brachova, L., Yan, S.D., Walker, D.G., Shen, Y. y col., (2001). Inflammatory repertoire of Alzheimer's disease and nondemented elderly microglia in vitro. *Glia* 35, 72-79.
- Ma, Q.L., Yang, F., Rosario, E.R., Ubeda, O.J., Beech, W., Gant, D.J., Chen, P.P., Hudspeth, B., Chen, C., Zhao, Y. y col., (2009). Beta-amyloid oligomers induce phosphorylation of tau and inactivation of insulin receptor substrate via c-Jun N-terminal kinase signaling: suppression by omega-3 fatty acids and curcumin. *J Neurosci* 29, 9078-9089.
- Mahley, R.W., Nathan, B.P., Pitas, R.E. (1996). Apolipoprotein E. Structure, function, and possible roles in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 777, 139-145.
- Maletic-Savatic, M., Malinow, R., Svoboda, K. (1999). Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science* 283, 1923-1927.
- Malinski, T. (2007). Nitric oxide and nitroxidative stress in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 11, 207-218.
- Man, H.Y., Lin, J.W., Ju, W.H., Ahmadian, G., Liu, L., Becker, L.E., Sheng, M., Wang, Y.T. (2000). Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization. *Neuron* 25, 649-662.
- Mandrekar-Colucci, S., Landreth, G.E. (2010). Microglia and inflammation in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 9, 156-167.

- Mangialasche, F., Solomon, A., Winblad, B., Mecocci, P., Kivipelto, M. (2010). Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet Neurol* 9, 702-716.
- Martin-Moreno, A.M., Reigada, D., Ramirez, B.G., Mechoulam, R., Innamorato, N., Cuadrado, A., de Ceballos, M.L. (2011). Cannabidiol and other cannabinoids reduce microglial activation in vitro and in vivo: relevance to Alzheimer's disease. *Mol Pharmacol* 79, 964-973.
- Martins, I.J., Hone, E., Foster, J.K., Sunram-Lea, S.I., Gnjec, A., Fuller, S.J., Nolan, D., Gandy, S.E., Martins, R.N. (2006). Apolipoprotein E, cholesterol metabolism, diabetes, and the convergence of risk factors for Alzheimer's disease and cardiovascular disease. *Mol Psychiatry* 11, 721-736.
- Marwarha, G., Dasari, B., Prasanthi, J.R., Schommer, J., Ghribi, O. (2010). Leptin reduces the accumulation of Abeta and phosphorylated tau induced by 27-hydroxycholesterol in rabbit organotypic slices. *J Alzheimers Dis* 19, 1007-1019.
- Masliah, E., Crews, L., Hansen, L. (2006). Synaptic remodeling during aging and in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 9, 91-99.
- Masliah, E., Mallory, M., Hansen, L., DeTeresa, R., Alford, M., Terry, R. (1994). Synaptic and neuritic alterations during the progression of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 174, 67-72.
- Matsuoka, Y., Picciano, M., Malester, B., LaFrancois, J., Zehr, C., Daeschner, J.M., Olschowka, J.A., Fonseca, M.I., O'Banion, M.K., Tenner, A.J. *et al.*, (2001). Inflammatory responses to amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 158, 1345-1354.
- Mattson, M.P. (1997). Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev* 77, 1081-1132.
- Mattson, M.P., Keller, J.N., Begley, J.G. (1998). Evidence for synaptic apoptosis. *Exp Neurol* 153, 35-48.
- Mayeux, R., Sano, M., Chen, J., Tatemichi, T., Stern, Y. (1991). Risk of dementia in first-degree relatives of patients with Alzheimer's disease and related disorders. *Arch Neurol* 48, 269-273.
- Mazzali, G., Bissoli, L., Gambina, S., Residori, L., Pagliari, P., Guariento, S., Sun, M., Broggio, E., Bosello, O., Zamboni, M. (2002). Energy balance in Alzheimer's disease. *J Nutr Health Aging* 6, 247-253.
- McGeer, E.G., McGeer, P.L. (2010). Neuroinflammation in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a field in its infancy. *J Alzheimers Dis* 19, 355-361.
- McKinney, R.A., Luthi, A., Bandtlow, C.E., Gahwiler, B.H., Thompson, S.M. (1999). Selective glutamate receptor antagonists can induce or prevent axonal sprouting in rat hippocampal slice cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11631-11636.
- Middleton, L.E., Yaffe, K. (2009). Promising strategies for the prevention of dementia. *Arch Neurol* 66, 1210-1215.

- Minkeviciene, R., Ihalainen, J., Malm, T., Matilainen, O., Keksa-Goldsteine, V., Goldsteins, G., Iivonen, H., Leguit, N., Glennon, J., Koistinaho, J. *y col.*, (2008). Age-related decrease in stimulated glutamate release and vesicular glutamate transporters in APP/PS1 transgenic and wild-type mice. *J Neurochem* *105*, 584-594.
- Morishima-Kawashima, M., Ihara, Y. (2002). Alzheimer's disease: beta-Amyloid protein and tau. *J Neurosci Res* *70*, 392-401.
- Moult, P.R., Milojkovic, B., Harvey, J. (2009). Leptin reverses long-term potentiation at hippocampal CA1 synapses. *J Neurochem* *108*, 685-696.
- Mucke, L., Masliah, E., Yu, G.Q., Mallory, M., Rockenstein, E.M., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Johnson-Wood, K., McConlogue, L. (2000). High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci* *20*, 4050-4058.
- Mullan, M., Crawford, F., Axelman, K., Houlden, H., Lilius, L., Winblad, B., Lannfelt, L. (1992). A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet* *1*, 345-347.
- Munzberg, H., Bjornholm, M., Bates, S.H., Myers, M.G., Jr. (2005). Leptin receptor action and mechanisms of leptin resistance. *Cell Mol Life Sci* *62*, 642-652.
- Myers, M.G., Cowley, M.A., Munzberg, H. (2008). Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu Rev Physiol* *70*, 537-556.
- Nagahara, A.H., Merrill, D.A., Coppola, G., Tsukada, S., Schroeder, B.E., Shaked, G.M., Wang, L., Blesch, A., Kim, A., Conner, J.M. *y col.*, (2009). Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nat Med* *15*, 331-337.
- Nagele, R.G., D'Andrea, M.R., Lee, H., Venkataraman, V., Wang, H.Y. (2003). Astrocytes accumulate A beta 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains. *Brain Res* *971*, 197-209.
- Naj, A.C., Jun, G., Beecham, G.W., Wang, L.S., Vardarajan, B.N., Buross, J., Gallins, P.J., Buxbaum, J.D., Jarvik, G.P., Crane, P.K. *y col.*, (2011). Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet* *43*, 436-441.
- Nakagawa, S., Kim, J.E., Lee, R., Malberg, J.E., Chen, J., Steffen, C., Zhang, Y.J., Nestler, E.J., Duman, R.S. (2002). Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein. *J Neurosci* *22*, 3673-3682.
- Naldini, L., Blomer, U., Gally, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M., Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* *272*, 263-267.

- Nestor, P.J., Scheltens, P., Hodges, J.R. (2004). Advances in the early detection of Alzheimer's disease. *Nat Med* 10 *Suppl*, S34-41.
- Nguyen, K.V., Gendrault, J.L., Wolff, C.M. (2002). Poly-L-lysine dissolves fibrillar aggregation of the Alzheimer beta-amyloid peptide in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 291, 764-768.
- Niswender, K.D., Baskin, D.G., Schwartz, M.W. (2004). Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 15, 362-369.
- Nordstedt, C., Caporaso, G.L., Thyberg, J., Gandy, S.E., Greengard, P. (1993). Identification of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein in clathrin-coated vesicles purified from PC12 cells. *J Biol Chem* 268, 608-612.
- O'Malley, D., MacDonald, N., Mizielinska, S., Connolly, C.N., Irving, A.J., Harvey, J. (2007). Leptin promotes rapid dynamic changes in hippocampal dendritic morphology. *Mol Cell Neurosci* 35, 559-572.
- Ohsawa, I., Takamura, C., Morimoto, T., Ishiguro, M., Kohsaka, S. (1999). Amino-terminal region of secreted form of amyloid precursor protein stimulates proliferation of neural stem cells. *Eur J Neurosci* 11, 1907-1913.
- Oomura, Y., Hori, N., Shiraishi, T., Fukunaga, K., Takeda, H., Tsuji, M., Matsumiya, T., Ishibashi, M., Aou, S., Li, X.L. *et al.*, (2006). Leptin facilitates learning and memory performance and enhances hippocampal CA1 long-term potentiation and CaMK II phosphorylation in rats. *Peptides* 27, 2738-2749.
- Osredkar, D., Sall, J.W., Bickler, P.E., Ferriero, D.M. (2010). Erythropoietin promotes hippocampal neurogenesis in in vitro models of neonatal stroke. *Neurobiol Dis* 38, 259-265.
- Panza, F., Frisardi, V., Solfrizzi, V., Imbimbo, B.P., Logroscino, G., Santamato, A., Greco, A., Seripa, D., Pilotto, A. (2012). Immunotherapy for Alzheimer's disease: from anti-beta-amyloid to tau-based immunization strategies. *Immunotherapy* 4, 213-238.
- Paresce, D.M., Chung, H., Maxfield, F.R. (1997). Slow degradation of aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein by microglial cells. *J Biol Chem* 272, 29390-29397.
- Paresce, D.M., Ghosh, R.N., Maxfield, F.R. (1996). Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor. *Neuron* 17, 553-565.
- Paxinos, G., Franklin, K. (2001). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. ACADEMIC PRESS.
- Peltier, J., O'Neill, A., Schaffer, D.V. (2007). PI3K/Akt and CREB regulate adult neural hippocampal progenitor proliferation and differentiation. *Dev Neurobiol* 67, 1348-1361.

- Pendlebury, S.T., Rothwell, P.M. (2009). Prevalence, incidence, and factors associated with pre-stroke and post-stroke dementia: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* 8, 1006-1018.
- Pérez-González, R., Gauthier, S.A., Kumar, A., Levy, E. (2012). The exosome-secretory pathway transports amyloid precursor protein carboxyl terminal fragments from the cell into the brain extracellular space. *J Biol Chem*.
- Peters, A., Palay, S.L., de Webster, H. (1991). The fine structure of the nervous system. New York: Oxford University Press *Neurons and their supporting cells*.
- Peters, A., Sethares, C., Luebke, J.I. (2008). Synapses are lost during aging in the primate prefrontal cortex. *Neuroscience* 152, 970-981.
- Pham, K., Nacher, J., Hof, P.R., McEwen, B.S. (2003). Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 17, 879-886.
- Pinto, S., Roseberry, A.G., Liu, H., Diano, S., Shanabrough, M., Cai, X., Friedman, J.M., Horvath, T.L. (2004). Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science* 304, 110-115.
- Pithadia, A.S., Lim, M.H. (2012). Metal-associated amyloid-beta species in Alzheimer's disease. *Curr Opin Chem Biol* 16, 67-73.
- Plassman, B.L., Havlik, R.J., Steffens, D.C., Helms, M.J., Newman, T.N., Drosdick, D., Phillips, C., Gau, B.A., Welsh-Bohmer, K.A., Burke, J.R. *y col.*, (2000). Documented head injury in early adulthood and risk of Alzheimer's disease and other dementias. *Neurology* 55, 1158-1166.
- Polidori, M.C., Pratico, D., Mangialasche, F., Mariani, E., Aust, O., Anlasik, T., Mang, N., Pientka, L., Stahl, W., Sies, H. *y col.*, (2009). High fruit and vegetable intake is positively correlated with antioxidant status and cognitive performance in healthy subjects. *J Alzheimers Dis* 17, 921-927.
- Power, D.A., Noel, J., Collins, R., O'Neill, D. (2001). Circulating leptin levels and weight loss in Alzheimer's disease patients. *Dement Geriatr Cogn Disord* 12, 167-170.
- Priller, C., Mitteregger, G., Paluch, S., Vassallo, N., Staufenbiel, M., Kretschmar, H.A., Jucker, M., Herms, J. (2009). Excitatory synaptic transmission is depressed in cultured hippocampal neurons of APP/PS1 mice. *Neurobiol Aging* 30, 1227-1237.
- Profenno, L.A., Porsteinsson, A.P., Faraone, S.V. (2010). Meta-analysis of Alzheimer's disease risk with obesity, diabetes, and related disorders. *Biol Psychiatry* 67, 505-512.
- Puglielli, L., Tanzi, R.E., Kovacs, D.M. (2003). Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nat Neurosci* 6, 345-351.

- Rajendran, L., Honsho, M., Zahn, T.R., Keller, P., Geiger, K.D., Verkade, P., Simons, K. (2006). Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11172-11177.
- Raji, C.A., Lopez, O.L., Kuller, L.H., Carmichael, O.T., Becker, J.T. (2009). Age, Alzheimer disease, and brain structure. *Neurology* 73, 1899-1905.
- Ramirez, B.G., Blazquez, C., Gomez del Pulgar, T., Guzman, M., de Ceballos, M.L. (2005). Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *J Neurosci* 25, 1904-1913.
- Rapoport, M., Dawson, H.N., Binder, L.I., Vitek, M.P., Ferreira, A. (2002). Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6364-6369.
- Reger, M.A., Watson, G.S., Frey, W.H., 2nd, Baker, L.D., Cholerton, B., Keeling, M.L., Belongia, D.A., Fishel, M.A., Plymate, S.R., Schellenberg, G.D. *y col.*, (2006). Effects of intranasal insulin on cognition in memory-impaired older adults: modulation by APOE genotype. *Neurobiol Aging* 27, 451-458.
- Reger, M.A., Watson, G.S., Green, P.S., Baker, L.D., Cholerton, B., Fishel, M.A., Plymate, S.R., Cherrier, M.M., Schellenberg, G.D., Frey, W.H., 2nd *y col.*, (2008a). Intranasal insulin administration dose-dependently modulates verbal memory and plasma amyloid-beta in memory-impaired older adults. *J Alzheimers Dis* 13, 323-331.
- Reger, M.A., Watson, G.S., Green, P.S., Wilkinson, C.W., Baker, L.D., Cholerton, B., Fishel, M.A., Plymate, S.R., Breitner, J.C., DeGroot, W. *y col.*, (2008b). Intranasal insulin improves cognition and modulates beta-amyloid in early AD. *Neurology* 70, 440-448.
- Reiman, E.M., Caselli, R.J. (1999). Alzheimer's disease. *Maturitas* 31, 185-200.
- Richards, J.G., Higgins, G.A., Ouagazzal, A.M., Ozmen, L., Kew, J.N., Bohrmann, B., Malherbe, P., Brockhaus, M., Loetscher, H., Czech, C. *y col.*, (2003). PS2APP transgenic mice, coexpressing hPS2mut and hAPPswe, show age-related cognitive deficits associated with discrete brain amyloid deposition and inflammation. *J Neurosci* 23, 8989-9003.
- Ring, S., Weyer, S.W., Kilian, S.B., Waldron, E., Pietrzik, C.U., Filippov, M.A., Herms, J., Buchholz, C., Eckman, C.B., Korte, M. *y col.*, (2007). The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J Neurosci* 27, 7817-7826.
- Risner, M.E., Saunders, A.M., Altman, J.F., Ormandy, G.C., Craft, S., Foley, I.M., Zvartau-Hind, M.E., Hosford, D.A., Roses, A.D. (2006). Efficacy of rosiglitazone in a genetically defined population with mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Pharmacogenomics J* 6, 246-254.
- Roberson, E.D., Scarce-Levie, K., Palop, J.J., Yan, F., Cheng, I.H., Wu, T., Gerstein, H., Yu, G.Q., Mucke, L. (2007). Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* 316, 750-754.

- Rodgers, R.J., Dalvi, A. (1997). Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev* 21, 801-810.
- Rodriguez, J.J., Olabarria, M., Chvatal, A., Verkhratsky, A. (2009). Astroglia in dementia and Alzheimer's disease. *Cell Death Differ* 16, 378-385.
- Rodriguez, J.J., Witton, J., Olabarria, M., Noristani, H.N., Verkhratsky, A. (2010). Increase in the density of resting microglia precedes neuritic plaque formation and microglial activation in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Cell Death Dis* 1, e1.
- Rogers, J., Lubner-Narod, J., Styren, S.D., Civin, W.H. (1988). Expression of immune system-associated antigens by cells of the human central nervous system: relationship to the pathology of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 9, 339-349.
- Rohan de Silva, H.A., Jen, A., Wickenden, C., Jen, L.S., Wilkinson, S.L., Patel, A.J. (1997). Cell-specific expression of beta-amyloid precursor protein isoform mRNAs and proteins in neurons and astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* 47, 147-156.
- Rosenberg, R.N. (2000). The molecular and genetic basis of AD: the end of the beginning: the 2000 Wartenberg lecture. *Neurology* 54, 2045-2054.
- Rusanen, M., Kivipelto, M., Quesenberry, C.P., Jr., Zhou, J., Whitmer, R.A. (2011). Heavy smoking in midlife and long-term risk of Alzheimer disease and vascular dementia. *Arch Intern Med* 171, 333-339.
- Rzepecki, P., Nagel-Steger, L., Feuerstein, S., Linne, U., Molt, O., Zadnarc, R., Aschermann, K., Wehner, M., Schrader, T., Riesner, D. (2004). Prevention of Alzheimer's disease-associated A β aggregation by rationally designed nonpeptidic beta-sheet ligands. *J Biol Chem* 279, 47497-47505.
- Saab, B.J., Georgiou, J., Nath, A., Lee, F.J., Wang, M., Michalon, A., Liu, F., Mansuy, I.M., Roder, J.C. (2009). NCS-1 in the dentate gyrus promotes exploration, synaptic plasticity, and rapid acquisition of spatial memory. *Neuron* 63, 643-656.
- Santosa, C., Rasche, S., Barakat, A., Bellingham, S.A., Ho, M., Tan, J., Hill, A.F., Masters, C.L., McLean, C., Evin, G. (2011). Decreased expression of GGA3 protein in Alzheimer's disease frontal cortex and increased co-distribution of BACE with the amyloid precursor protein. *Neurobiol Dis* 43, 176-183.
- Saunders, A.M. (2001). Gene identification in Alzheimer's disease. *Pharmacogenomics* 2, 239-249.
- Saunders, A.M., Trowers, M.K., Shimkets, R.A., Blakemore, S., Crowther, D.J., Mansfield, T.A., Wallace, D.M., Strittmatter, W.J., Roses, A.D. (2000). The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease: pharmacogenomic target selection. *Biochim Biophys Acta* 1502, 85-94.
- Scheff, S.W., Price, D.A. (2003). Synaptic pathology in Alzheimer's disease: a review of ultrastructural studies. *Neurobiol Aging* 24, 1029-1046.

- Scheff, S.W., Price, D.A., Schmitt, F.A., DeKosky, S.T., Mufson, E.J. (2007). Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology* 68, 1501-1508.
- Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T.D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W. *et al.*, (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 2, 864-870.
- Schmued, L.C., Hopkins, K.J. (2000). Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res* 874, 123-130.
- Schwartz, M.W., Peskind, E., Raskind, M., Boyko, E.J., Porte, D., Jr. (1996). Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat Med* 2, 589-593.
- Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Jr., Seeley, R.J., Baskin, D.G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* 404, 661-671.
- Selkoe, D.J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81, 741-766.
- Selkoe, D.J. (2008). Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav Brain Res* 192, 106-113.
- Señaris, R., Garcia-Caballero, T., Casabiell, X., Gallego, R., Castro, R., Considine, R.V., Dieguez, C., Casanueva, F.F. (1997). Synthesis of leptin in human placenta. *Endocrinology* 138, 4501-4504.
- Serrano-Pozo, A., Mielke, M.L., Muzitansky, A., Gomez-Isla, T., Growdon, J.H., Bacskai, B.J., Betensky, R.A., Frosch, M.P., Hyman, B.T. (2012). Stable size distribution of amyloid plaques over the course of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 71, 694-701.
- Shanley, L.J., Irving, A.J., Harvey, J. (2001). Leptin enhances NMDA receptor function and modulates hippocampal synaptic plasticity. *J Neurosci* 21, RC186.
- Shimomura, I., Hammer, R.E., Ikemoto, S., Brown, M.S., Goldstein, J.L. (1999). Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature* 401, 73-76.
- Shioda, S., Funahashi, H., Nakajo, S., Yada, T., Maruta, O., Nakai, Y. (1998). Immunohistochemical localization of leptin receptor in the rat brain. *Neurosci Lett* 243, 41-44.
- Shors, T.J. (2008). From stem cells to grandmother cells: how neurogenesis relates to learning and memory. *Cell Stem Cell* 3, 253-258.
- Shors, T.J., Miesegaes, G., Beylin, A., Zhao, M., Rydel, T., Gould, E. (2001). Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410, 372-376.

- Shors, T.J., Townsend, D.A., Zhao, M., Kozorovitskiy, Y., Gould, E. (2002). Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus* 12, 578-584.
- Sinha, S., Anderson, J.P., Barbour, R., Basi, G.S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H.F., Frigon, N., Hong, J. *et al.*, (1999). Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 402, 537-540.
- Sisodia, S.S. (1992). Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6075-6079.
- Sivanandam, T.M., Thakur, M.K. (2012). Traumatic brain injury: a risk factor for Alzheimer's disease. *Neurosci Biobehav Rev* 36, 1376-1381.
- Snyder, E.M., Philpot, B.D., Huber, K.M., Dong, X., Fallon, J.R., Bear, M.F. (2001). Internalization of ionotropic glutamate receptors in response to mGluR activation. *Nat Neurosci* 4, 1079-1085.
- Sofroniew, M.V., Vinters, H.V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119, 7-35.
- Solomon, A., Kivipelto, M., Wolozin, B., Zhou, J., Whitmer, R.A. (2009). Midlife serum cholesterol and increased risk of Alzheimer's and vascular dementia three decades later. *Dement Geriatr Cogn Disord* 28, 75-80.
- Sparks, D.L., Sabbagh, M., Connor, D., Soares, H., Lopez, J., Stankovic, G., Johnson-Traver, S., Ziolkowski, C., Browne, P. (2006). Statin therapy in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand Suppl* 185, 78-86.
- Squitti, R. (2012). Metals in Alzheimer's disease: a systemic perspective. *Front Biosci* 17, 451-472.
- Stein, M.S., Scherer, S.C., Ladd, K.S., Harrison, L.C. (2011). A randomized controlled trial of high-dose vitamin D2 followed by intranasal insulin in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 26, 477-484.
- Stewart, S., Cacucci, F., Lever, C. (2011). Which memory task for my mouse? A systematic review of spatial memory performance in the Tg2576 Alzheimer's mouse model. *J Alzheimers Dis* 26, 105-126.
- Streit, W.J., Xue, Q.S. (2009). Life and death of microglia. *J Neuroimmune Pharmacol* 4, 371-379.
- Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S., Roses, A.D. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1977-1981.

- Sze, C.I., Troncoso, J.C., Kawas, C., Mouton, P., Price, D.L., Martin, L.J. (1997). Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 56, 933-944.
- Takata, K., Kitamura, Y., Saeki, M., Terada, M., Kagitani, S., Kitamura, R., Fujikawa, Y., Maelicke, A., Tomimoto, H., Taniguchi, T. *y col.*, (2010). Galantamine-induced amyloid- β clearance mediated via stimulation of microglial nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* 285, 40180-40191.
- Takata, K., Kitamura, Y., Yanagisawa, D., Morikawa, S., Morita, M., Inubushi, T., Tsuchiya, D., Chishiro, S., Saeki, M., Taniguchi, T. *y col.*, (2007). Microglial transplantation increases amyloid-beta clearance in Alzheimer model rats. *FEBS Lett* 581, 475-478.
- Taniguchi, T. (1995). Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science* 268, 251-255.
- Tartaglia, L.A. (1997). The leptin receptor. *J Biol Chem* 272, 6093-6096.
- Tartaglia, L.A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G.J., Campfield, L.A., Clark, F.T., Deeds, J. *y col.*, (1995). Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83, 1263-1271.
- Tokutake, T., Kasuga, K., Yajima, R., Sekine, Y., Tezuka, T., Nishizawa, M., Ikeuchi, T. (2012). Hyperphosphorylation of Tau induced by naturally secreted amyloid-beta at nanomolar concentrations is modulated by insulin-dependent Akt-GSK3beta signaling pathway. *J Biol Chem* 287, 35222-35233.
- Torres, M., Jimenez, S., Sanchez-Varo, R., Navarro, V., Trujillo-Estrada, L., Sanchez-Mejias, E., Carmona, I., Davila, J.C., Vizueté, M., Gutierrez, A. *y col.*, (2012). Defective lysosomal proteolysis and axonal transport are early pathogenic events that worsen with age leading to increased APP metabolism and synaptic Abeta in transgenic APP/PS1 hippocampus. *Mol Neurodegener* 7, 59.
- Trejo, J.L., Carro, E., Torres-Aleman, I. (2001). Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci* 21, 1628-1634.
- Tuszynski, M.H., Thal, L., Pay, M., Salmon, D.P., U, H.S., Bakay, R., Patel, P., Blesch, A., Vahlsing, H.L., Ho, G. *y col.*, (2005). A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Nat Med* 11, 551-555.
- Unger, R.H., Zhou, Y.T., Orci, L. (1999). Regulation of fatty acid homeostasis in cells: novel role of leptin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2327-2332.
- Vassallo, N., Scerri, C. (2012). Mediterranean Diet and Dementia of the Alzheimer Type. *Curr Aging Sci*.

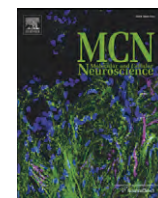
- Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R. *y col.*, (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735-741.
- Walker, C.D., Long, H., Williams, S., Richard, D. (2007). Long-lasting effects of elevated neonatal leptin on rat hippocampal function, synaptic proteins and NMDA receptor subunits. *J Neurosci Res* 85, 816-828.
- Walsh, D.M., Selkoe, D.J. (2004). Oligomers on the brain: the emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration. *Protein Pept Lett* 11, 213-228.
- Wan, J., Fu, A.K., Ip, F.C., Ng, H.K., Hugon, J., Page, G., Wang, J.H., Lai, K.O., Wu, Z., Ip, N.Y. (2010). Tyk2/STAT3 signaling mediates beta-amyloid-induced neuronal cell death: implications in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 30, 6873-6881.
- Wang, L., Zhang, Z.G., Zhang, R.L., Jiao, Z.X., Wang, Y., Pourabdollah-Nejad, D.S., LeTourneau, Y., Gregg, S.R., Chopp, M. (2006). Neurogenin 1 mediates erythropoietin enhanced differentiation of adult neural progenitor cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 26, 556-564.
- Wang, Q., Rowan, M.J., Anwyl, R. (2004). Beta-amyloid-mediated inhibition of NMDA receptor-dependent long-term potentiation induction involves activation of microglia and stimulation of inducible nitric oxide synthase and superoxide. *J Neurosci* 24, 6049-6056.
- Wasco, W., Bupp, K., Magendantz, M., Gusella, J.F., Tanzi, R.E., Solomon, F. (1992). Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10758-10762.
- Wasco, W., Gurubhagavatula, S., Paradis, M.D., Romano, D.M., Sisodia, S.S., Hyman, B.T., Neve, R.L., Tanzi, R.E. (1993). Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor. *Nat Genet* 5, 95-100.
- Wen, Y., Yu, W.H., Maloney, B., Bailey, J., Ma, J., Marie, I., Maurin, T., Wang, L., Figueroa, H., Herman, M. *y col.*, (2008). Transcriptional regulation of beta-secretase by p25/cdk5 leads to enhanced amyloidogenic processing. *Neuron* 57, 680-690.
- Weng, Z., Signore, A.P., Gao, Y., Wang, S., Zhang, F., Hastings, T., Yin, X.M., Chen, J. (2007). Leptin protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic cell death via mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* 282, 34479-34491.
- Wenk, G.L., Parsons, C.G., Danysz, W. (2006). Potential role of N-methyl-D-aspartate receptors as executors of neurodegeneration resulting from diverse insults: focus on memantine. *Behav Pharmacol* 17, 411-424.
- White, D.W., Wang, D.W., Chua, S.C., Jr., Morgenstern, J.P., Leibel, R.L., Baumann, H., Tartaglia, L.A. (1997). Constitutive and impaired signaling of leptin receptors containing the Gln --> Pro extracellular domain fatty mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10657-10662.

- Whitmer, R.A., Gustafson, D.R., Barrett-Connor, E., Haan, M.N., Gunderson, E.P., Yaffe, K. (2008). Central obesity and increased risk of dementia more than three decades later. *Neurology* 71, 1057-1064.
- Wiesner, G., Vaz, M., Collier, G., Seals, D., Kaye, D., Jennings, G., Lambert, G., Wilkinson, D., Esler, M. (1999). Leptin is released from the human brain: influence of adiposity and gender. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 2270-2274.
- Wimo, A., Winblad, B., Aguero-Torres, H., von Strauss, E. (2003). The magnitude of dementia occurrence in the world. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 17, 63-67.
- Wimo, A., Winblad, B., Jonsson, L. (2010). The worldwide societal costs of dementia: Estimates for 2009. *Alzheimers Dement* 6, 98-103.
- Wischik, C.M., Novak, M., Edwards, P.C., Klug, A., Tichelaar, W., Crowther, R.A. (1988). Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 4884-4888.
- Witt, A., Macdonald, N., Kirkpatrick, P. (2004). Memantine hydrochloride. *Nat Rev Drug Discov* 3, 109-110.
- Wong, E.Y., Herbert, J. (2006). Raised circulating corticosterone inhibits neuronal differentiation of progenitor cells in the adult hippocampus. *Neuroscience* 137, 83-92.
- Wood, W.G., Schroeder, F., Igbavboa, U., Avdulov, N.A., Chochina, S.V. (2002). Brain membrane cholesterol domains, aging and amyloid beta-peptides. *Neurobiol Aging* 23, 685-694.
- Wyss-Coray, T. (2006). Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat Med* 12, 1005-1015.
- Wyss-Coray, T., Loike, J.D., Brionne, T.C., Lu, E., Anankov, R., Yan, F., Silverstein, S.C., Husemann, J. (2003). Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med* 9, 453-457.
- Wyss-Coray, T., Mucke, L. (2002). Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron* 35, 419-432.
- Xu, H., Sweeney, D., Wang, R., Thinakaran, G., Lo, A.C., Sisodia, S.S., Greengard, P., Gandy, S. (1997). Generation of Alzheimer beta-amyloid protein in the trans-Golgi network in the apparent absence of vesicle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3748-3752.
- Xu, W.L., Atti, A.R., Gatz, M., Pedersen, N.L., Johansson, B., Fratiglioni, L. (2011). Midlife overweight and obesity increase late-life dementia risk: a population-based twin study. *Neurology* 76, 1568-1574.
- Yaffe, K., Lindquist, K., Schwartz, A.V., Vitartas, C., Vittinghoff, E., Satterfield, S., Simonsick, E.M., Launer, L., Rosano, C., Cauley, J.A. *et al.*, (2011). Advanced glycation end product level, diabetes, and accelerated cognitive aging. *Neurology* 77, 1351-1356.

- Yamaguchi, H., Yamazaki, T., Kawarabayashi, T., Sun, X., Sakai, Y., Hirai, S. (1994). Localization of Alzheimer amyloid beta protein precursor and its relation to senile plaque amyloid. *Gerontology* 40 *Suppl* 2, 65-70.
- Yan, R., Bienkowski, M.J., Shuck, M.E., Miao, H., Tory, M.C., Pauley, A.M., Brashier, J.R., Stratman, N.C., Mathews, W.R., Buhl, A.E. *y col.*, (1999). Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 402, 533-537.
- Yang, F., Ueda, K., Chen, P., Ashe, K.H., Cole, G.M. (2000). Plaque-associated alpha-synuclein (NACP) pathology in aged transgenic mice expressing amyloid precursor protein. *Brain Res* 853, 381-383.
- Yuste, R., Bonhoeffer, T. (2001). Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 24, 1071-1089.
- Zempel, H., Thies, E., Mandelkow, E., Mandelkow, E.M. (2010). Aβ oligomers cause localized Ca²⁺ elevation, missorting of endogenous Tau into dendrites, Tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines. *J Neurosci* 30, 11938-11950.
- Zhang, F., Basinski, M.B., Beals, J.M., Briggs, S.L., Churgay, L.M., Clawson, D.K., DiMarchi, R.D., Furman, T.C., Hale, J.E., Hsiung, H.M. *y col.*, (1997). Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature* 387, 206-209.
- Zhang, F., Wang, S., Signore, A.P., Chen, J. (2007). Neuroprotective effects of leptin against ischemic injury induced by oxygen-glucose deprivation and transient cerebral ischemia. *Stroke* 38, 2329-2336.
- Zhang, W., Li, C., Yang, S., Xu, C., Wang, W., Nyengaard, J.R., Tang, Y. (2008). A stereological method for estimating the total length and size of myelinated fibers in rat cerebral cortex. *J Neurosci Methods* 172, 21-26.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.
- Zhang, Y., Wang, H., Pan, H., Bao, X., Li, M., Jin, J., Wu, X. (2006). Gene delivery into primary cerebral cortical neurons by lentiviral vector. *Cell Biol Int* 30, 777-783.
- Zhou, Q., Homma, K.J., Poo, M.M. (2004). Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron* 44, 749-757.
- Zufferey, R., Donello, J.E., Trono, D., Hope, T.J. (1999). Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* 73, 2886-2892.

ARTÍCULOS

A continuación se adjuntan dos artículos originales publicados como consecuencia de parte de los resultados de este trabajo, así como un manuscrito que se encuentra en revisión para su publicación.



Megalin interacts with APP and the intracellular adapter protein FE65 in neurons

Ximena Alvira-Botero^{a,b}, Rocío Pérez-Gonzalez^{a,c,1}, Carlos Spuch^{a,c,1}, Teo Vargas^{a,c}, Desiree Antequera^{a,c}, Miguel Garzón^b, Felix Bermejo-Pareja^{c,d}, Eva Carro^{a,c,*}

^a Laboratory of Neuroscience, Research Center, Hospital 12 de Octubre, Avenida de Córdoba s/n. 28041, Madrid, Spain

^b Department of Anatomy, Histology and Neuroscience, Universidad Autónoma de Madrid, C/Arzobispo Morcillo 4. 28029, Madrid, Spain

^c Center for Biomedical Research in Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Avenida de Córdoba s/n. 28041, Madrid, Spain

^d Neurology Department, Hospital 12 de Octubre, Avenida de Córdoba s/n. 28041, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 March 2010

Revised 19 June 2010

Accepted 7 July 2010

Available online 14 July 2010

Keywords:

Megalin

LRP2

Neurons

APP

FE65

Alzheimer's disease

Central nervous system

ABSTRACT

Increasing evidence has implicated megalin, a low-density lipoprotein receptor-related protein, in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). In the brain, megalin is expressed in brain capillaries, ependymal cells and choroid plexus, where it participates in the clearance of brain amyloid β -peptide ($A\beta$) complex. Recently, megalin has also been detected in oligodendrocytes and astrocytes. In this study we demonstrate that megalin is widely distributed in neurons throughout the brain. Additionally, given that FE65 mediates the interaction between the low density lipoprotein receptor-related protein-1 and the amyloid precursor protein (APP) to modulate the rate of APP internalization from the cell surface, we hypothesize that megalin could also interact with APP in neurons. Our results confirm that megalin interacts with APP and FE65, suggesting that these three proteins form a tripartite complex. Moreover, our findings imply that megalin may participate in neurite branching. Taken together, these results indicate that megalin has an important role in $A\beta$ -mediated neurotoxicity, and therefore may be involved in the neurodegenerative processes that occur in AD.

© 2010 Published by Elsevier Inc.

Introduction

Megalin, also known as low density lipoprotein-related protein-2 (LRP2) and glycoprotein 330, is the largest member of the low-density lipoprotein receptor (LDLR) family. Megalin expression was first detected in various absorptive epithelial cells throughout the body, such as the kidney and the intestinal brush border. In the central nervous system, megalin was initially described in brain capillaries, ependymal lining of the ventricular walls and choroid plexus (Chun et al., 1999; Kounnas et al., 1994; Zheng et al., 1994), and later in neural progenitors in embryonic mouse spinal cord (Wicher et al., 2005), and postnatal mouse spinal cord oligodendrocytes (Wicher et al., 2006). More recently, megalin has been described in cultured astrocytes (Bento-Abreu et al., 2008) and neurons (Ambjørn et al., 2008; Chung et al., 2008; Fleming et al., 2009).

Megalin binds and internalizes a number of ligands that represent a wide variety of molecules, including lipoproteins, hormones, vitamin-binding proteins, drugs, and immunorelated proteins (Hjälml et al., 1996; Moestrup and Verroust, 2001). Since many are involved in neuroprotection, they are considered potential new

targets in AD research (Birn, 2006; Carro et al., 2005; Christensen and Birn, 2002; Dietrich et al., 2008; Moestrup and Verroust, 2001).

In the brain, megalin participates in endocytosis and transport of amyloid β -peptide ($A\beta$) complex across the blood–cerebrospinal fluid barrier at the choroid plexus (Carro et al., 2005; Zlokovic et al., 1996), and the blood–brain barrier (Deane et al., 2004; Hammad et al., 1997; Zlokovic et al., 1996). This process involves the interaction of megalin's cytoplasmic tail domain with several adaptor and scaffold proteins (Biemesderfer, 2006; May et al., 2003), including Dab2, MAGI-I, GIPC, ANKRA, MegBP, and ARH (Bonifacino and Traub, 2003; Jaeger and Pietrzik, 2008). The adaptor protein FE65 has been shown to mediate the interaction between another member of the LDLR superfamily, the LRP1, and the amyloid precursor protein (APP) (Cam and Bu, 2006; Pietrzik et al., 2004; Yoon et al., 2005).

Due to the growing evidence that megalin expression in the central nervous system is not restricted to tight-junction epithelia, but is also expressed in neurons, the objective of our study was to assess the expression of megalin in different subpopulations of neurons, explore the interaction between megalin, APP and FE65, and discuss its possible functional role in the central nervous system.

Results

Megalin expression in neurons

WB of neuronal cells and choroid plexus proteins showed a megalin signal consistent with its reported size in primary

* Corresponding author. Laboratory of Neuroscience, Research Center, Hospital 12 de Octubre, Avenida de Córdoba s/n. 28041, Madrid, Spain. Fax: +34 91 390 8544.

E-mail address: carroeva@yahoo.es (E. Carro).

¹ These authors have contributed equally to this work.

hippocampal and cortical neuronal cell cultures (Fig. 1a). Single immunofluorescence using three different megalin antisera showed that in cultured neurons, megalin immunoreactivity appears as a

punctate labeling throughout the neuronal cytoplasm, but mainly within cell bodies and proximal neurites (Fig. 1b). Double immunofluorescence experiments confirmed megalin expression in primary

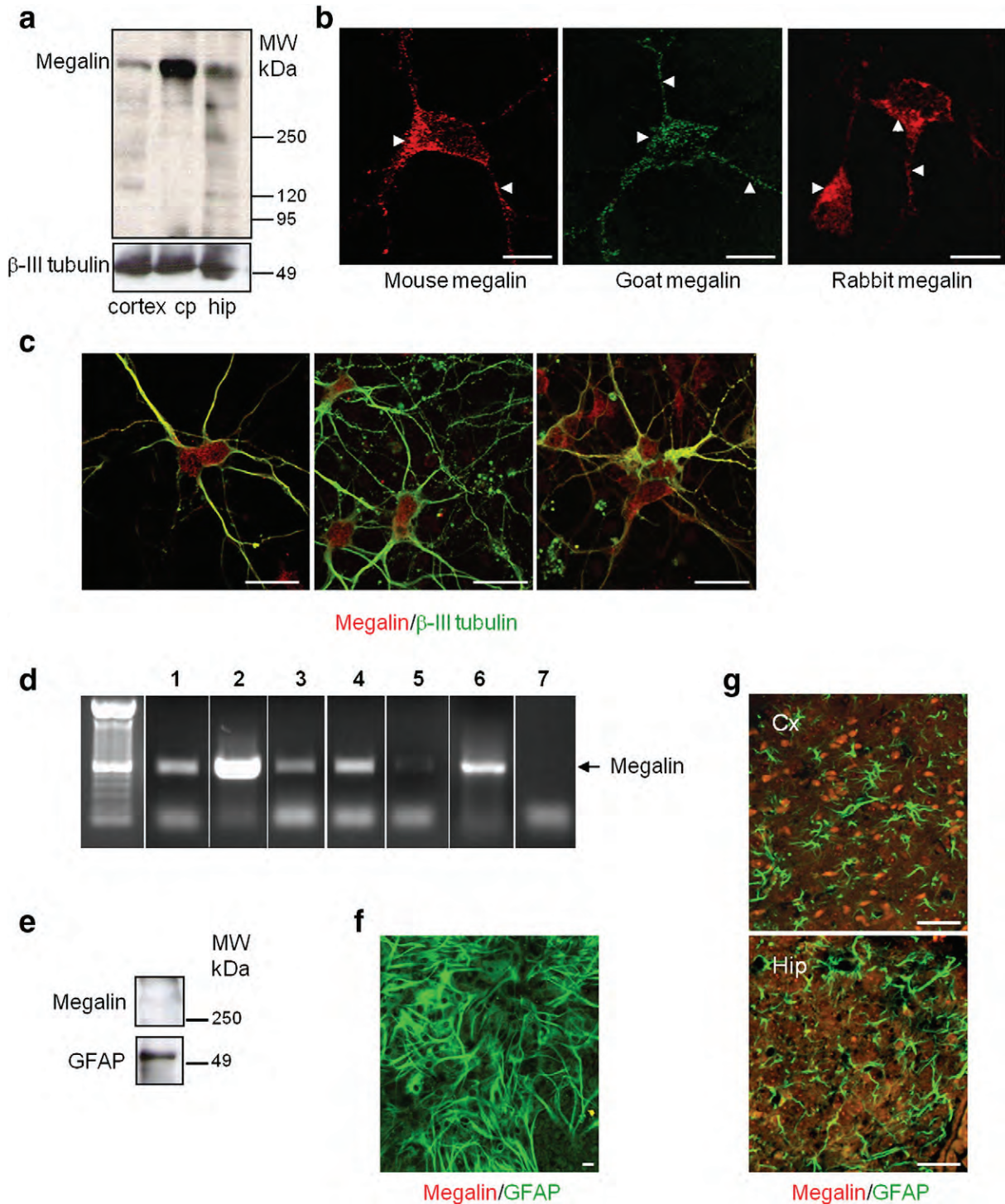


Fig. 1. Megalin expression in mouse brain. (a) Representative western blots showing megalin levels in choroid plexus (cp), cerebral cortex, and hippocampus (hip) lysates. Observe how β -III tubulin levels remained unchanged. (b) Microphotograph of primary hippocampal neuronal cell cultures showing an intense megalin immunostaining of the soma and neurites using mouse (left image), goat (middle image), and rabbit (right image) anti-megalin antisera. Scale bars = 10 μ m. (c) Merged confocal images showing that megalin (in red) and β -III tubulin (in green) colocalize abundantly in primary hippocampal (left image), cortical (middle image), and olfactory bulb (right image) neuronal cell cultures. Scale bars = 20 μ m. (d) Gel image of a competitive RT-PCR for megalin. Lanes: (1) olfactory bulb, (2) kidney, (3) hippocampus, (4) frontal cortex, (5) astrocytes, (6) choroid plexus, and (7) negative control. (e) Representative immunoblots showing no expression of megalin in primary cortical astrocyte cultures while GFAP levels remained unchanged. (f) Double-immunofluorescence for megalin (in red) and GFAP (in green) in primary cultured cortical astrocytes. Megalin labeling was completely absent, as shown by the lack of red immunofluorescence in the image. Scale bars = 20 μ m. (g) Confocal images showing megalin (in red) and GFAP (in green) in the cerebral cortex (Cx), and hippocampus (Hip). Scale bars = 20 μ m. MW: molecular weight.

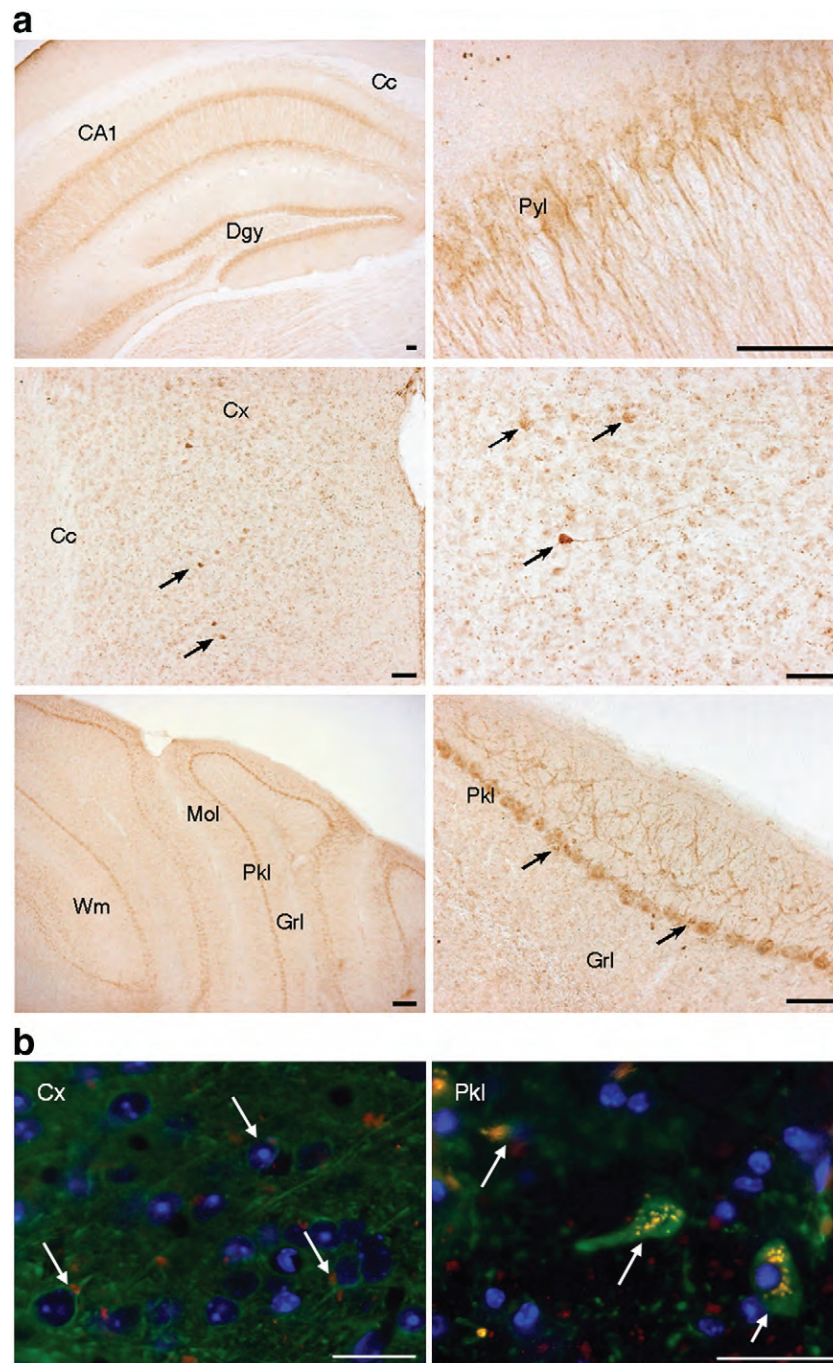


Fig. 2. Megalin immunoreactivity in mouse brain detected using light and fluorescence microscopy. (a) Microphotographs of peroxidase-stained brain sections showing megalin immunoreactivity in the hippocampus (upper panel), cerebral cortex (middle panel) and cerebellum (lower panel). Intensely megalin-labeled neuronal cell bodies can be seen in the CA1 layer and dentate gyrus (Dgy) of the hippocampus, and also scattered throughout several layers of the cerebral cortex (Cx, black arrows) and in the Purkinje cell layer (Pkl) of the cerebellum (black arrows). At higher magnifications (images on the right) megalin immunoreactivity is typically seen as a dark brown punctate aggregate distributed mainly within the soma, surrounding the nucleus, such as in the cerebral cortex (Cx; middle panel, right image). On some regions, such as the pyramidal layer (Pyl) neurons of the hippocampus (upper panel; right image) megalin immunoreactivity can be seen filling the proximal neurites. Scale bars = 50 μ m. (b) Confocal images showing colocalization of megalin (red) and β -III tubulin (green) in cerebral cortex (Cx; left image), and cerebellar Purkinje layer (Pkl; right image) neurons (white arrows, DAPI-stained nuclei). Megalin immunoreactivity is seen as a dark orange precipitate within the soma, near the nucleus. Scale bars = 20 μ m. Cc: corpus callosum; Grl: granular layer; Mol: molecular layer; Wm: white matter.

olfactory bulb (left image), cortical (middle image) and hippocampal (right image) cultured neurons (Fig. 1c). Pre-adsorption of megalin antiserum with the cognate peptide abolished megalin staining (Supplementary Fig. 1a and b).

RT-PCR carried out in primary olfactory bulb, cortical and hippocampal neuronal cell cultures, and in choroid plexus epithelial cell cultures confirmed these findings (Fig. 1d). Kidney tissue was

used as a positive control. No amplicons were obtained from negative control reactions lacking the cDNA template (Fig. 1d). Murine glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH), a constitutively expressed gene, which was amplified simultaneously, was used as internal control (Supplementary Fig. 1d). WB assays ruled out megalin expression in astrocytes, since megalin was barely detectable in these cells (Fig. 1e). Moreover, no colocalization was observed

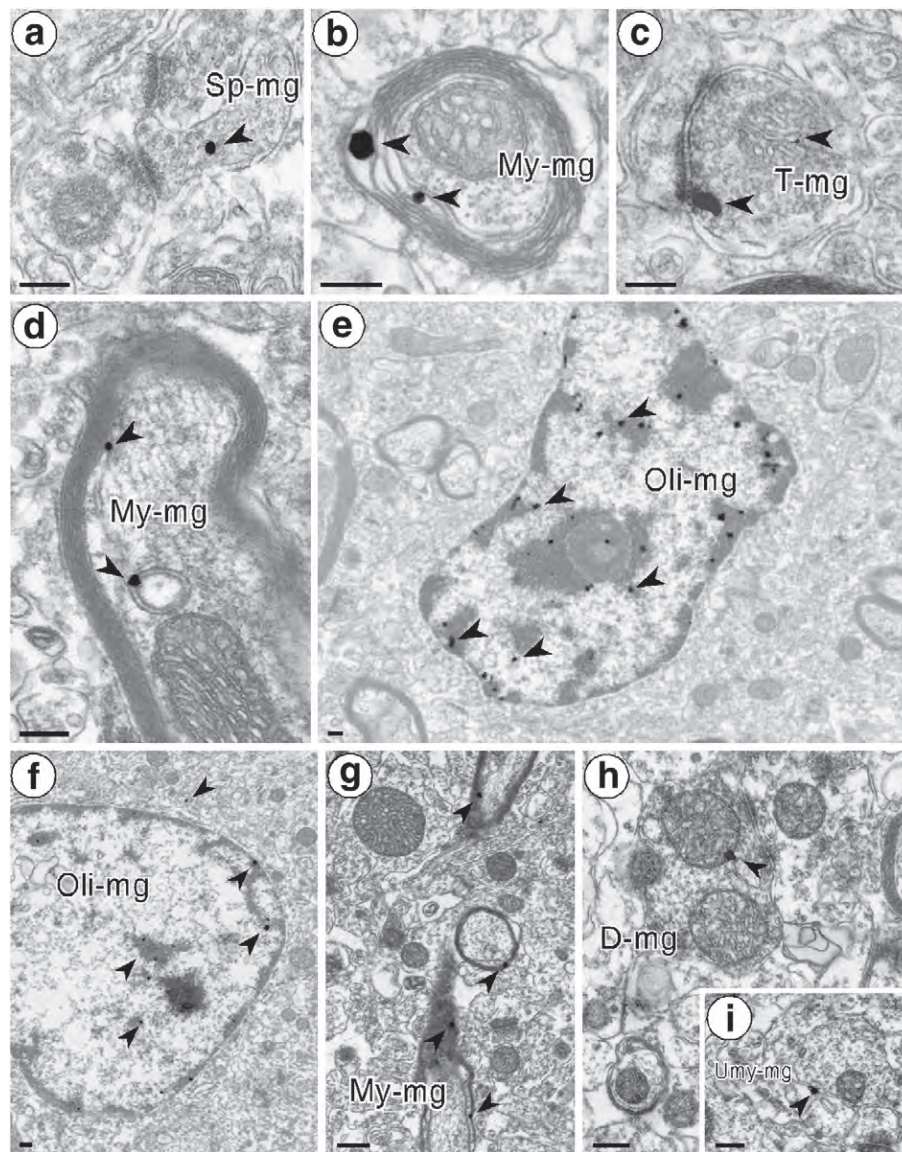


Fig. 3. Electron micrographs showing megalin immunoreactivity in the fronto-parietal cortex (a–e) and hippocampus (f–i) of the mouse, detected using colloidal gold. Gold particles (black arrow-heads) corresponding to megalin immunoreactivity were observed in numerous elements of the neuropil, including dendritic spines (a), lamellae of a myelinated axons (b, d, g), axon terminals (c), transport vesicles (d), medium-size dendrites (h) and small unmyelinated axons (i). Megalin immunoreactivity seemed especially abundant in oligodendrocytes of both the cortex (e) and hippocampus (f). Scale bars = 0.2 μm . Abbreviations for megalin-immunoreactive profiles: D-mg: dendrite; Sp-mg: dendritic spine; My-mg: myelinated axon; Oli-mg: oligodendrocyte; T-mg: axon terminal; Umy-mg: unmyelinated axon.

between GFAP and megalin in double immunofluorescence experiments in primary cultured cortical astrocyte (Fig. 1f) or fixed brain tissue (Fig. 1g).

In fixed mouse brain tissue sections processed for light microscopy, megalin was observed in neurons of many structures throughout the rostro-caudal axis of the brain. Areas showing an intense neuronal megalin labeling included the hippocampus (Fig. 2a, upper panel), limbic cortices (middle panel), and cerebellum (bottom panel). In these structures, megalin immunoreactivity was seen as a finely and homogeneously dispersed punctate precipitate contained within the soma or dispersed throughout the neuropil (black arrows, middle and bottom panels).

Double immunofluorescence experiments showed that megalin and β -III tubulin colocalized in several structures, including the cerebral cortex and cerebellum, in agreement with the light microscopy results (Fig. 2b). Corresponding negative controls were prepared by substitution of the primary antibody with 10% normal goat serum in PBS (Supplementary Fig. 1c).

Electron microscopy was used to confirm and describe the subcellular localization of megalin within different cell types in the cerebral cortex and hippocampus using colloidal gold (Fig. 3) and immunoperoxidase (Fig. 4). Megalin immunoreactivity was detected in many cellular and subcellular elements of the fronto-parietal cortex (Figs. 3a–e, and 4) and hippocampus (Fig. 3f–i), including dendrites, axon terminals, and myelinated and unmyelinated axons. As expected, based on results from previous studies (Wicher et al., 2005), megalin immunoreactivity was abundant in oligodendrocytes (Fig. 3e, f). Within profiles, immunogold particles were seen near the plasma membrane or distributed throughout the cytoplasm, in many cases bound to intracellular organelles such as endocytic vesicles and pre-synaptic density (Fig. 3c, d). Immunoperoxidase experiments confirmed megalin immunoreactivity in several cellular and subcellular profiles. Megalin labeling was seen as an electron dense precipitate either dispersed throughout the cytoplasm (Fig. 4a, b, d), aggregated within tubulovesicular organelles (Fig. 4c) or surrounding endocytic and synaptic vesicles (Fig. 4d, e).

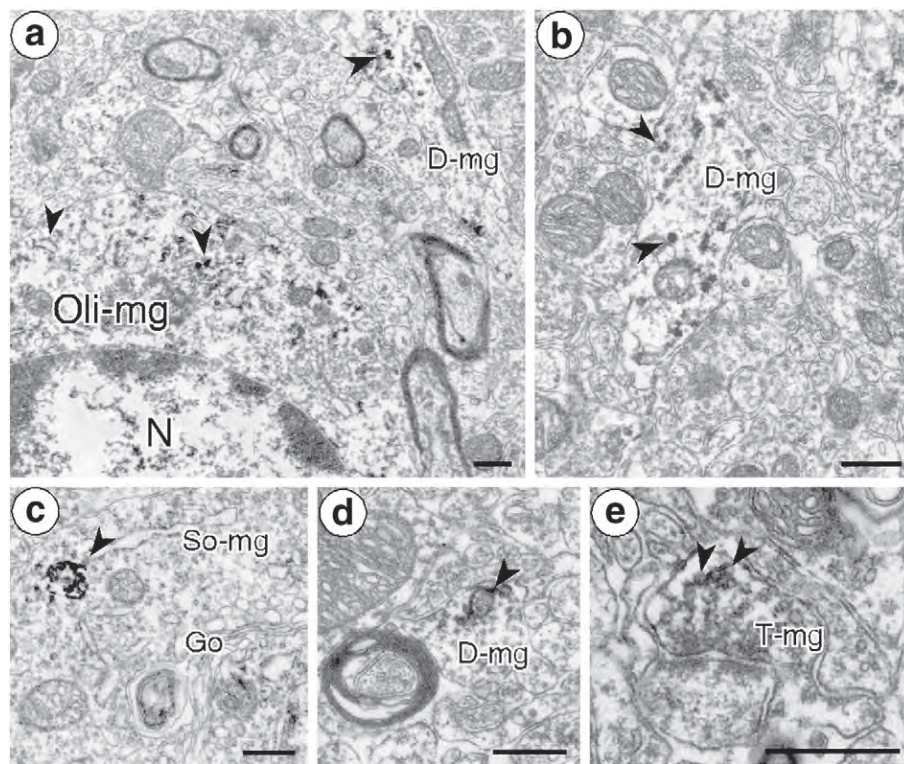


Fig. 4. Electron micrographs showing megalin immunoreactivity in the fronto-parietal cortex of the mouse, with the ABC method. Megalin immunoreactivity was observed in several elements of the neuropil, such as oligodendrocytes (a), dendrites (a, b, d), neuronal somata (c), and axon terminals (e). Immunoperoxidase-labeled megalin is seen as an electrondense precipitate that tends to cluster around tubular-vesicular organelles and synaptic vesicles (a, d, e; black arrow heads) or within secretory vesicles, such as in neuronal somata (c; black arrow head). Megalin may also be seen dispersed through the cytoplasm, as in the dendrite in b. Scale bars = 0.5 μm . Go: Golgi apparatus; N: nucleus. Abbreviations megalin-immunoreactive profiles: D-mg: dendrite; Oli-mg: oligodendrocyte; So-mg: somata; T-mg: axon terminal.

Megalin complexes with APP and FE65

One of our study hypothesis is that megalin interacts with APP mediated by FE65, resulting in the formation of a trimeric complex. To test this hypothesis we first studied the presence of megalin-APP and megalin-FE65 complexes. As expected, on the basis of published reports, megalin-FE65 and megalin-APP complexes were immunoprecipitated from primary hippocampal neuronal cells (Fig. 5a). Reciprocally, APP co-immunoprecipitated with FE65 as well as with megalin (Fig. 5b). Finally, FE65-megalin and FE65-APP complexes were also detected in these cells (Fig. 5c), thereby confirming our working hypothesis. Confocal microscopy showed colocalization of megalin with APP (Fig. 5d, left image) and FE65 (Fig. 5d, middle image), and of APP with FE65 (Fig. 5d, right image).

To further confirm these interactions we performed FRET experiments. Fig. 6 shows representative sets of spectrally unmixed images (APP, FE65, and megalin) taken from primary hippocampal neuronal cell cultures before and after photobleaching of the acceptor. Images of FE65 (Fig. 6a and b) and megalin (Fig. 6c) show an increase in donor emission after photobleaching that only occurred in the cell region exposed to the photobleach (see also the pseudo-colored intensity images). Fig. 6 also provides the averaged relative FRET efficiency value for coexpression of APP, FE65, and megalin in the bleached area of the cells, and their respective controls (average relative FRET efficiency in non-photobleached areas).

Given that our results indicate that megalin binds to APP and FE65, we propose that this trimeric complex also regulates neurite branching in a fashion similar to that described by Ikin et al (2007) for the APP/FE65/Mena complex. Hippocampal neurons were transfected with HIV-siMegalin, and control cells were transfected with an empty vector. In vitro interference of neuronal megalin decreased the neuronal content of megalin (Fig. 7a), and led to a

significant increase in neurite branching ($69.74 \pm 3.29 \mu\text{m}$ to $182.57 \pm 4.91 \mu\text{m}$; $p < 0.05$) (Fig. 7b).

Discussion

Three major observations can be drawn from our study: (1) that megalin is expressed in adult neurons, (2) that megalin interacts with FE65 and APP, suggesting the formation of a tripartite complex, and that (3) megalin may be involved in neurite branching.

Megalin is a LDLR involved in endocytosis and transport of A β complex across the blood barrier at the choroid plexus (Carro et al., 2005; Zlokovic et al., 1996) and brain endothelial cells (Deane et al., 2004; Hammad et al., 1997; Zlokovic et al., 1996). However, megalin expression is not restricted to the blood-brain barrier, but is also expressed in retinal ganglion cells (Fitzgerald et al., 2007), cultured astrocytes (Bento-Abreu et al., 2008), dorsal root ganglia neurons (Fleming et al., 2009), cultured cerebellar granule neurons (Ambjørn et al., 2008), and cultured cortical neurons (Chung et al., 2008). In agreement with most of these findings, our results confirm megalin expression in cultured and adult neurons. However, unlike Bento-Abreu's (Bento-Abreu et al., 2008) study, our results do not support the finding that megalin is expressed in astrocytes. Possible explanations for this difference include that (1) cultures were obtained from different brain areas; while Bento-Abreu's group used forebrain astrocytes, we used cerebral cortex astrocytes; (2) the tissue we used was obtained from 'older' newborns than those used by Bento-Abreu's group (3 to 5-day newborns compared with 1-day newborns), and as some studies have demonstrated there is a progressive decrease in megalin expression towards the end of the gestational period (Assémat et al., 2005) and during postnatal brain maturation, gradually decreasing from day 4 until the end of the first postnatal week (Bento-Abreu et al., 2008); and (3) the antiserum used to label megalin was different; we used a

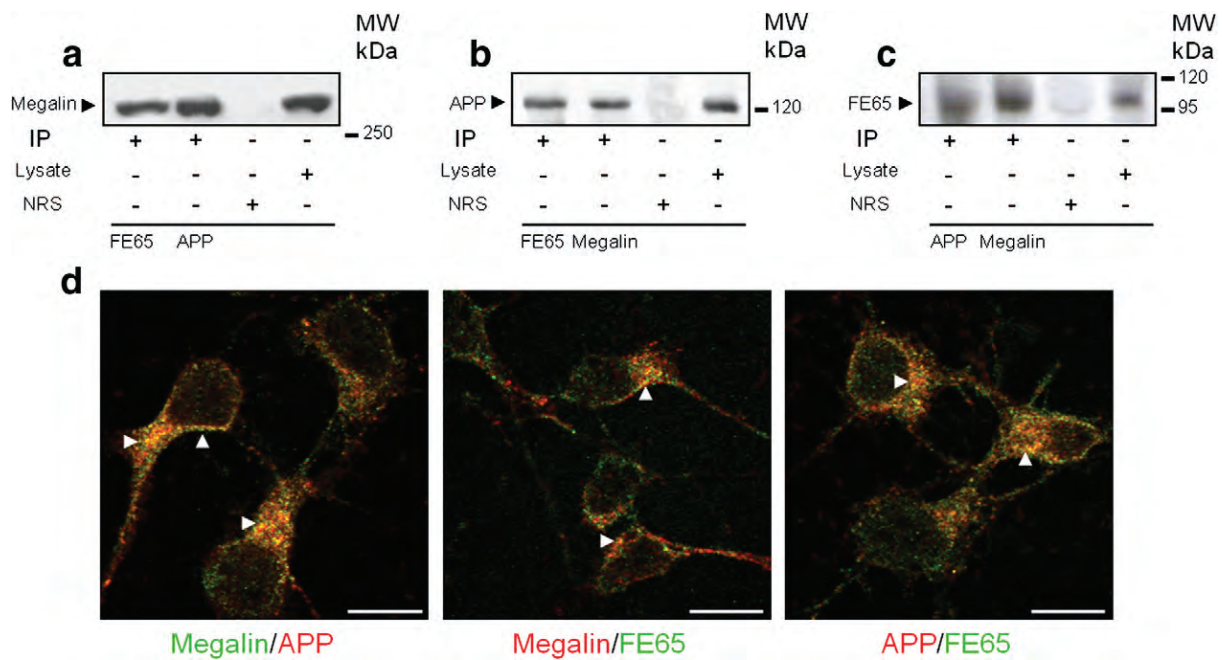


Fig. 5. APP, FE65 and megalin interaction in primary hippocampal neuronal cell cultures. Immunoblots showing that, in these cells, megalin co-immunoprecipitates with FE65 and APP (a), that APP co-immunoprecipitates with FE65 and megalin (b), and that FE65 co-immunoprecipitates with APP and megalin (c). Note the absence of immunoprecipitation when primary antibodies were omitted (NRS, normal rabbit serum). Neuronal cell lysates were run as a positive control for APP, megalin or FE65. IP: immunoprecipitation. MW: molecular weight. (d) Confocal images showing colocalization of megalin with APP (left image) and FE65 (middle image), and of APP with FE65, as indicated by the orange-yellow color observed in all images (white arrowheads). Scale bars = 10 μ m.

commercially available polyclonal goat-antibody from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) directed against an antigenic peptide of approximately 20 amino acids mapping within the region of 4550–4600 amino acids of the rat's megalin protein. This same antibody has been used successfully by our group in previous studies (Carro et al., 2005).

As to megalin expression in neurons, Ambjørn et al. (2008) have hypothesized that megalin expression in granular cerebellar neurons is triggered by the stress induced during culturing. As far as we know, megalin has not yet been detected in neurons of healthy, postnatal brain. Our findings demonstrate that both megalin mRNA and protein are expressed in adult brain neurons.

In the brain, megalin was first described in the choroid plexus and blood vessels where, together with LRP1, it participates in A β clearance (Carro et al., 2005; Deane et al., 2004; Tanzi and Bertram, 2005; Zlokovic et al., 1996). In addition, several other functions have been attributed to megalin in the central nervous system. In the adult rodent brain megalin is involved in insulin-like growth factor-I-mediated neuroprotection (Carro et al., 2005). Megalin-deficient mice show profound neuro-developmental alterations (Spoelgen et al., 2005; Willnow et al., 1996), and mutations in the megalin gene are associated with neurodegenerative disorders such as the Donnai-Barrow syndrome (Kantarci et al., 2007), and probably AD (Vargas et al., 2010). These data suggest that impairment in megalin function or expression could be contributing to the pathogenesis of neurological disorders. Thus, our results confirming megalin expression in adult brain neurons indicate that this protein might play a key role in central nervous system physiology.

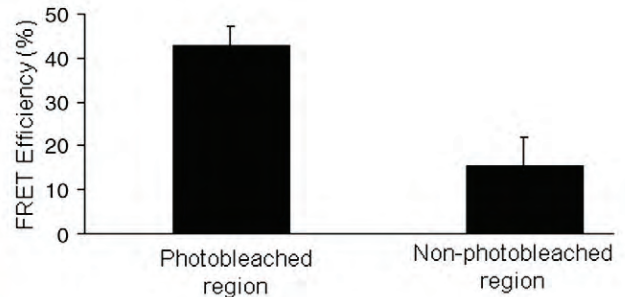
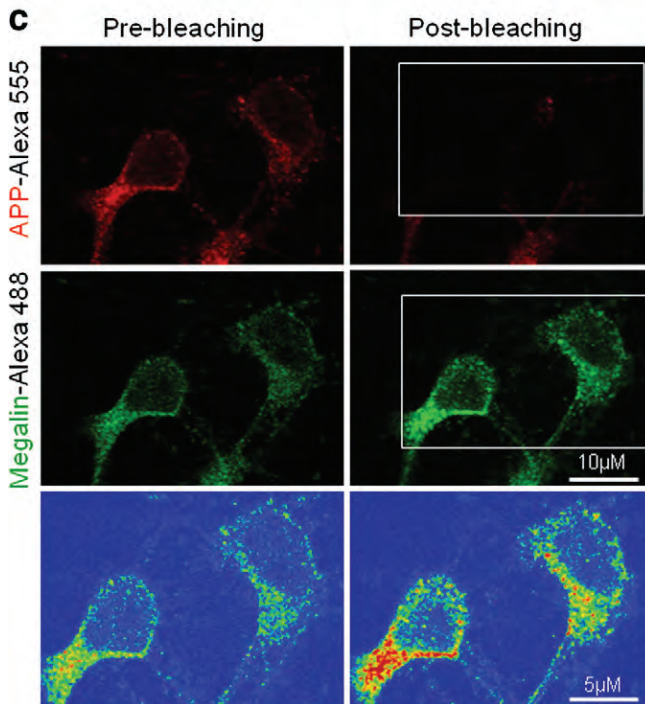
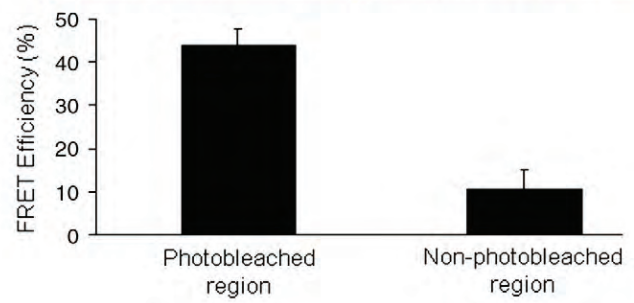
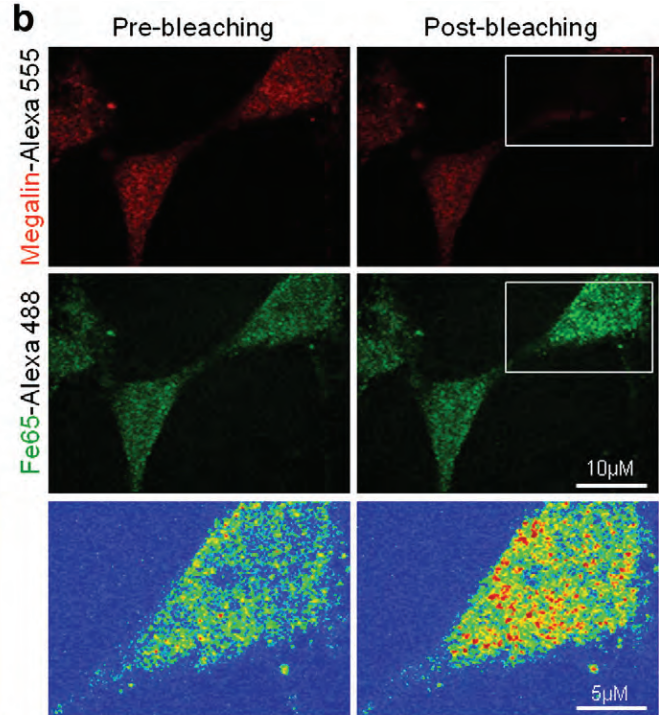
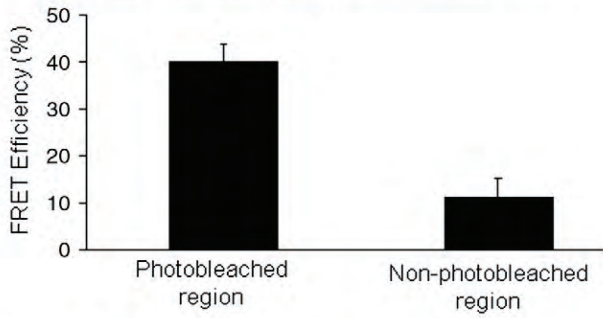
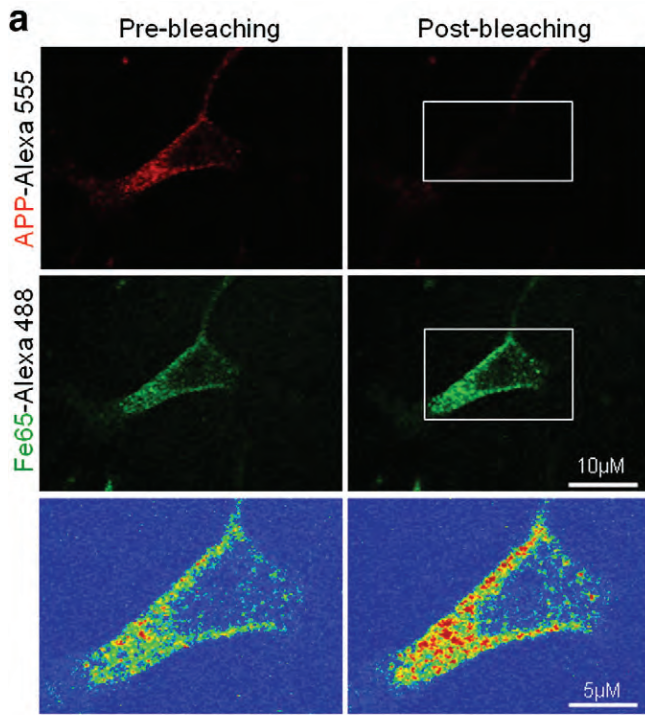
Another member of the LDLR family, LRP1, binds APP to the neuronal plasma membrane, where it is transported from early secretory compartments to the cell surface and is then internalized into endosomal/lysosomal compartments (Cam et al., 2004; Liu et al., 2007; Waldron et al., 2008). LRP1 may contribute to APP trafficking and metabolism through its ability to increase the rate of APP internalization from the cell surface, an effect that is mediated by an indirect interaction between APP and LRP1 in association with FE65 (Kinoshita et al., 2001; Pietrzik et al., 2004). FE65 binds to the cytoplasmic domain of APP, where it modulates its processing and

trafficking (Cao and Südhof, 2001; Sabo et al., 2003; Sabo et al., 1999). Several groups have demonstrated that these three elements – the receptor (LRP1), the ligand (APP) and the adaptor protein (FE65) – form a trimeric complex (Ikin et al., 2007; Jaeger and Pietrzik, 2008; Pietrzik et al., 2004).

Megalin, like other members of the LDLR family, is expressed in clathrin-coated pits that continually internalize ligands through receptor-mediated endocytosis (Nagai et al., 2003). The selective endocytic uptake of ligands is regulated by binding signals in the cytoplasmic tails of receptors to adaptor proteins. The number of signals and adaptor proteins that function along the endocytic pathway, as well as the identification of novel interactions, is an ever-expanding field of study (Bonifacino and Traub, 2003; Jaeger and Pietrzik, 2008). Our study was designed to test the hypothesis that megalin interacts with APP in neurons, using FE65 as an adaptor or scaffold protein. Using confocal microscopy-based FRET techniques we confirmed that APP and FE65 colocalized in neurons. Subsequently, using the same approach we demonstrated that megalin and FE65, as well as megalin and APP, were in close proximity to each other. These results support the hypothesis that FE65 links APP and megalin forming a tripartite protein complex similar to that described for LRP1 (Pietrzik et al., 2004). We hypothesize that APP endocytosis involves megalin binding to APP, and in this way modulates A β synthesis.

Previous studies have shown that a macromolecular complex involving APP and FE65 acts as a negative regulator of neurite branching (Ikin et al., 2007). In addition, axonal loss, synaptic disconnection and aberrant neuritic sprouting correlate with dementia in AD (Grutzendler et al., 2007). In vitro, cellular effects of A β administration include cell death, disruption of synaptic transmission, and stimulation of neurite branching (Walsh et al., 2002). The decrease in neuronal expression of FE65 disrupts the formation of the APP/FE65 complex, and exacerbates neurite sprouting (Ikin et al., 2007). However, other authors argue that LRP is the limiting factor in APP/FE65/LRP complex formation (Pietrzik et al., 2004).

Based on our findings, we propose that the defective neuronal sprouting which characterizes AD (Teter and Ashford, 2002) could



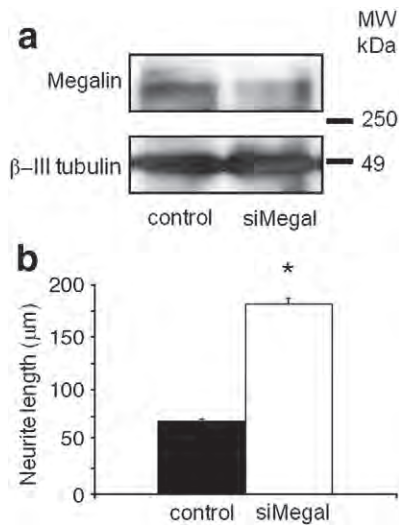


Fig. 7. (a) Representative immunoblots showing decreased megalin levels in primary hippocampal neuronal cell cultures after viral infection with HIV-siMegal (siMegal). In contrast, levels of the unrelated protein β -III tubulin remain undisturbed. MW: molecular weight. (b) Bar graph showing how the average neurite length increased significantly in siMegal-treated neurons compared with controls ($*p < 0.05$).

be partly and/or indirectly be mediated by megalin. A reduced expression of megalin, which has been observed in patients with AD (Dietrich et al., 2008), would be producing a decrease in APP internalization and thereby an increase in A β secretion into the extracellular space (Zhang and Xu, 2007), and neurite abnormalities have been shown to be directly related to A β deposition (Lombardo et al., 2003).

Conclusions

In conclusion, the results described herein demonstrate that megalin is expressed in adult neurons, that it interacts with APP and FE65, and that neurite branching may be associated with a reduced expression of megalin. Our data argue in favor of an important role of neuronal megalin in A β -mediated neurotoxicity. We propose that one of the mechanisms that participate in the neurodegenerative processes observed in AD involves a dysfunction in neuronal megalin.

Experimental methods

Antisera

Primary antibodies

Mouse monoclonal anti- β -III tubulin (1:1000; Millipore); mouse monoclonal anti-Glial fibrillary acidic protein (GFAP; 1:1000; Sigma-Aldrich); goat polyclonal anti-megalin (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Inc.); rabbit polyclonal anti-megalin (1:500; kind gift from Dr. Michele Marino, Department of Endocrinology, University of Pisa, Italy); mouse polyclonal anti-megalin (1:500; Abcam); rabbit polyclonal anti-APP (1:1000; Sigma-Aldrich); goat polyclonal anti-FE65 (1:250; Santa Cruz Biotechnology, Inc.); mouse monoclonal anti-tau Ab-2 (Clone TAU-5; 1:500;) (Thermo Fisher Scientific).

Secondary antibodies

Donkey anti-mouse IgG 488 (FluoProbes, Interchim), goat anti-rabbit IgG 642 (FluoProbes, Interchim), and donkey anti-rabbit IgG

555 (1:1000; FluoProbes, Interchim); Texas Red goat anti-rabbit (1:1000; Jackson Immunoresearch); chicken anti-goat IgG-Alexa 647 (Molecular Probes, Invitrogen); donkey anti-goat IgG-Alexa 488 (1:1000; Molecular Probes, Invitrogen); HRP-conjugated: goat anti-mouse HRP-conjugated (Bio-Rad Laboratories); goat anti-rabbit HRP-conjugated (1:10,000; Bio-Rad Laboratories); biotinylated donkey anti-goat (1:400; Jackson Immunoresearch); colloidal gold-conjugated rabbit anti-goat 1 nm (1:50; Ted Pella).

Cell cultures

We carried out primary olfactory bulb, hippocampal and cortical neuronal cell cultures, primary cortical astrocyte cultures, and primary choroid plexus cell cultures as described previously (Carro et al., 2002; Gonzalez de la Vega et al., 2001; Pons and Torres-Aleman, 2000).

Protein analysis

Western blots (WB) and immunoprecipitations were performed as described by Carro et al. (2002). WB membranes were re-blotted with the same antibody used for immunoprecipitation or with unrelated proteins (β -III tubulin, GFAP) as internal standards, and to normalize for protein load. Densitometric analysis was performed using ImageJ software (NIH Image).

Immunocytochemistry

Cells were fixed for 30 min in cold 2% paraformaldehyde, washed three times in phosphate buffer (PB) 0.1 M containing 0.5% Triton X-100, blocked in PB containing 0.5% bovine serum albumin (BSA) for 1 h at room temperature, and incubated with primary antibodies overnight at 4 °C. All primary antibodies were diluted in PB 0.1 M containing 0.5% BSA and 0.5% Triton X-100. Images were captured using a laser scanning microscope (LSM 510; Carl Zeiss, Inc.). The specificity of the staining was tested by omitting primary antibodies.

Confocal microscopy and in vitro FRET analysis

Fluorescence resonance energy transfer (FRET) measurements were carried out in primary hippocampal neuronal cell cultures to investigate the proximity between megalin, FE65, and APP at a nanometer scale. FRET was evaluated using the acceptor photobleaching method using a confocal laser scanning microscope (LSM 510; Carl Zeiss, Inc.) equipped with a Plan-Neofluar 100x/1.3 oil objective. A 488 nm laser was used to excite the donor Alexa 488 at moderate laser power, and emissions were detected using a 505–550 nm bandpass emission filter. Acceptor Alexa 555 was excited at 561 nm at moderate laser power, and emission was detected using a 570 nm long-pass filter. For the acceptor photobleaching method, the donor signal in defined regions of interest (ROI) were bleached with a 561 nm light at 100% power for 50 iterations to ensure >80% bleaching efficiency. The intensity in each ROI at 488 nm excitation before and after the bleach was measured. Similar calculations were made in non-photobleached cells in the same culture. As negative control, intensity was measured in cells incubated only with Alexa 488 and bleached. As an additional negative control FRET efficiency was evaluated between megalin and tau Ab-2 (Clone TAU-5), since they are molecules that do not bind to each other (data not shown). The intensity of at least 25 cells from at least three different experiments for each protein pair was measured. FRET analysis was based on all pixels in the selected ROI. FRET efficiency was calculated from the summary of the fluorescence intensities from individual pixels by normalizing the difference of the donor post-

Fig. 6. FRET assay in primary hippocampal neuronal cell cultures. Sets of unmixed APP and FE65 (a), megalin and FE65 (b), and APP and megalin (c) FRET signals taken before photobleaching (images at the right of the panels) and after acceptor photobleaching (images at the left of the panels) of cultured neurons. The photobleached region is indicated by a white rectangle. Scale bars = 10 μ m. Pseudocolored intensity images at the bottom of each panel (in blue) show the photobleached regions taken before and after bleaching. Scale bars = 5 μ m. Bar graphs show the averaged FRET efficiency (%).

and pre-bleach intensity by the post-bleach intensity according FRET all algorithms implemented in the custom-developed FRETcalc plugin.

Immunohistochemistry

Immunofluorescence

Adult male C57 mice obtained from our inbred colony were used. Animals were handled and cared for in accordance with the EU directive 86/609/EEC. Immunofluorescence assays were carried out as described previously by Carro et al. (2000). Fixed brains were cut with cryostat at 50 μ m and collected in PB 0.1 M at room temperature. One series of sections was used for double-labeling experiments using DAPI nuclear staining (Sigma-Aldrich) and cell phenotype markers. Images were captured using a laser scanning microscope (LSM 510; Carl Zeiss, Inc.).

Light and electron immunohistochemistry

Megalín immunoreactivity was assessed in 50–60 μ m-thick coronal tissue sections obtained from C57 mice. All animals were handled and cared for in accordance with the EU directive 86/609/EEC. Slices containing the fronto-parietal cortex and hippocampus were processed for single-labeling immunohistochemistry using the avidin–biotin–complex (ABC) method (for light and electron microscopy) and the colloidal gold method (for electron microscopy), as previously described by Garzón and Pickel (2002). For electron microscopy, osmicated, resin-embedded cortical and hippocampal tissue sections were ultrathin-cut before examination according to standard procedures (Leranth and Pickel, 1989). Uranyl and lead-counterstained ultrathin sections were analyzed under a Jeol JEM 1010 electron microscope at 80 kV coupled to a digital camera (GATAN BioScan Gatan Inc.). Light microscope images were taken with a DXM1200 Nikon digital camera using AnalySIS®3.1 (Soft Imaging System). See Appendix for the detailed protocol.

Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was isolated and purified from neuronal cells obtained from the olfactory bulb, hippocampus and frontal cerebral cortex, astrocytes, choroid plexus cell cultures, and frozen kidney tissue as positive control, using Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. cDNA was prepared from 1 μ g of total RNA by Superscript II reverse transcriptase (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions, and then amplified by 40 cycles of PCR (95 °C for 30 seconds, 55 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min) using pairs of mouse megalín mRNA-specific primers: 5'-CCTTGCCAAACCCTCTGAAAAT-3', and 5'-CACAAGTTTTCGGTGTCTTTA-3'. PCR products were run on 1.5–2.5 % agarose gels containing ethidium bromide and visualized under a UV illuminator. Amplification of mouse megalín cDNA expected fragments was confirmed by sequencing using an automated sequencer (Applied Biosystems).

Lentiviral construction

Lentiviral vectors using a four-plasmid transfection system were produced as described previously (Carro et al., 2005). To block megalín expression, a small interfering megalín RNA (siRNA) was ligated into the HIV-1 transfer vector between the XhoI/SalI sites as described previously (Carro et al., 2005). An empty vector (without insert) was used as negative control.

Neurite branching assessment

Fresh Dulbecco's modified Eagle's medium containing vector particles (1 μ g/ml of siMegalín plus empty vector) and 8 μ L of polybrene (Sigma-Aldrich) were added to the cultures and replaced after 24 h (Carro et al., 2005). Cells were incubated for an additional

24 h, fixed with 2% paraformaldehyde, and labeled with an anti- β -III tubulin antibody. Images were obtained using a Zeiss LSM 510 Meta scanning laser confocal microscope (Leica Microsystems), and neurite branching was assessed as described by Ikin et al. (2007). All clearly identifiable neurites were measured using ImageJ software (NIH Image). At least 100 neurons were examined per group.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Student's *t* test. Data are presented as means \pm SEM.

Disclosure statement

There are no actual or potential conflicts of interest with other people or organizations.

Funding was provided by grants from 'Fondo de Investigación Sanitaria (FIS)' (CP04/00179, PI060155), 'Fundación Investigación Médica Mutua Madrileña' (2006.125), 'CIBERNED', and 'Ministerio de Educación y Ciencia' (BFU2006-07430/BFI).

Acknowledgments

This work was supported by grants from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) (CP04/00179, PI060155), Fundación Investigación Médica Mutua Madrileña (2006.125; 2008.93), CIBERNED, and Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2006-07430/BFI). We thank Begoña Santiago for her expert help in FRET measurements. We also thank Dr. Carlos Avendaño for his helpful suggestions and Ms. Marta Callejo Móstoles for her valuable help.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.mcn.2010.07.005.

References

- Ambjørn, M., Asmussen, J.W., Lindstam, M., Gotfryd, K., Jacobsen, C., Kiselyov, V.V., Moestrup, S.K., Penkowa, M., Bock, E., Berezin, V., 2008. Metallothionein and a peptide modeled after metallothionein, EmtinB, induce neuronal differentiation and survival through binding to receptors of the low-density lipoprotein receptor family. *J. Neurochem.* 104, 21–37.
- Assémat, E., Châtelet, F., Chandellier, J., Commo, F., Cases, O., Verroust, P., Kozyraki, R., 2005. Overlapping expression patterns of the multiligand endocytic receptors cubilin and megalín in the CNS, sensory organs and developing epithelia of the rodent embryo. *Gene Expr. Patterns* 6, 69–78.
- Bento-Abreu, A., Velasco, A., Polo-Hernandez, E., Perez-Reyes, P.L., Taberner, A., Medina, J.M., 2008. Megalín is a receptor for albumin in astrocytes and is required for the synthesis of the neurotrophic factor oleic acid. *J. Neurochem.* 106, 1149–1159.
- Biemesderfer, D., 2006. Regulated intramembrane proteolysis of megalín: linking urinary protein and gene regulation in proximal tubule? *Kidney Int.* 69, 1717–1721.
- Birn, H., 2006. The kidney in vitamin B12 and folate homeostasis: characterization of receptors for tubular uptake of vitamins and carrier proteins. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 291, F22–36.
- Bonifacino, J.S., Traub, L.M., 2003. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 395–447.
- Cam, J.A., Bu, G., 2006. Modulation of beta-amyloid precursor protein trafficking and processing by the low density lipoprotein receptor family. *Mol. Neurodegener.* 1, 8.
- Cam, J.A., Zerbini, C.V., Knisely, J.M., Hecimovic, S., Li, Y., Bu, G., 2004. The low density lipoprotein receptor-related protein 1B retains beta-amyloid precursor protein at the cell surface and reduces amyloid-beta peptide production. *J. Biol. Chem.* 279, 29639–29646.
- Cao, X., Südhof, T.C., 2001. A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293, 115–120.
- Carro, E., Nunez, A., Busiguina, S., Torres-Aleman, I., 2000. Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *J. Neurosci.* 20, 2926–2933.
- Carro, E., Trejo, J.L., Gomez-Isla, T., LeRoith, D., Torres-Aleman, I., 2002. Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. *Nat. Med.* 8, 1390–1397.
- Carro, E., Spuch, C., Trejo, J.L., Antequera, D., Torres-Aleman, I., 2005. Choroid plexus megalín is involved in neuroprotection by serum insulin-like growth factor I. *J. Neurosci.* 25, 10884–10893.

- Christensen, E.I., Birn, H., 2002. Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 256–266.
- Chun, J.T., Wang, L., Pasinetti, G.M., Finch, C.E., Zlokovic, B.V., 1999. Glycoprotein 330/megalin (LRP-2) has low prevalence as mRNA and protein in brain microvessels and choroid plexus. *Exp. Neurol.* 157, 194–201.
- Chung, R.S., Penkowa, M., Dittmann, J., King, C.E., Bartlett, C., Asmussen, J.W., Hidalgo, J., Carrasco, J., Leung, Y.K., Walker, A.K., Fung, S.J., Dunlop, S.A., Fitzgerald, M., Beazley, L.D., Chuah, M.I., Vickers, J.C., West, A.K., 2008. Redefining the role of metallothionein within the injured brain: extracellular metallothioneins play an important role in the astrocyte-neuron response to injury. *J. Biol. Chem.* 283, 15349–15358.
- Deane, R., Wu, Z., Sagare, A., Davis, J., Du Yan, S., Hamm, K., Xu, F., Parisi, M., LaRue, B., Hu, H.W., Spijkers, P., Guo, H., Song, X., Lenting, P.J., Van Nostrand, W.E., Zlokovic, B.V., 2004. LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms. *Neuron* 43, 333–344.
- Dietrich, M.O., Spuch, C., Antequera, D., Rodal, I., de Yébenes, J.G., Molina, J.A., Bermejo, F., Carro, E., 2008. Megalin mediates the transport of leptin across the blood-CSF barrier. *Neurobiol. Aging* 29, 902–912.
- Fitzgerald, M., Nairn, P., Bartlett, C.A., Chung, R.S., West, A.K., Beazley, L.D., 2007. Metallothionein-IIA promotes neurite growth via the megalin receptor. *Exp. Brain Res.* 183, 171–180.
- Fleming, C.E., Mar, F.M., Franquinho, F., Saraiva, M.J., Sousa, M.M., 2009. Transthyretin internalization by sensory neurons is megalin mediated and necessary for its neurotogenic activity. *J. Neurosci.* 29, 3220–3232.
- Garzón, M., Pickel, V.M., 2002. Ultrastructural localization of enkephalin and mu-opioid receptors in the rat ventral tegmental area. *Neuroscience* 114, 461–474.
- Gonzalez de la Vega, A., Buño, W., Pons, S., García-Calderat, M.S., García-Galloway, E., Torres-Aleman, I., 2001. Insulin-like growth factor I potentiates kainate receptors through a phosphatidylinositol 3-kinase dependent pathway. *NeuroReport* 12, 1293–1296.
- Gruzendler, J., Helmin, K., Tsai, J., Gan, W.B., 2007. Various dendritic abnormalities are associated with fibrillar amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Ann. NY Acad. Sci.* 1097, 30–39.
- Hammad, S.M., Ranganathan, S., Loukinova, E., Twal, W.O., Argraves, W.S., 1997. Interaction of apolipoprotein J-amyloid beta-peptide complex with low density lipoprotein receptor-related protein-2/megalin. A mechanism to prevent pathological accumulation of amyloid beta-peptide. *J. Biol. Chem.* 272, 18644–18649.
- Hjälml, G., Murray, E., Crumley, G., Harazim, W., Lundgren, S., Onyango, I., Ek, B., Larsson, M., Juhlin, C., Hellman, P., Davis, H., Akerström, G., Rask, L., Morse, B., 1996. Cloning and sequencing of human gp330, a Ca(2+)-binding receptor with potential intracellular signaling properties. *Eur. J. Biochem.* 239, 132–137.
- Ikin, A.F., Sabo, S.L., Lanier, L.M., Buxbaum, J.D., 2007. A macromolecular complex involving the amyloid precursor protein (APP) and the cytosolic adapter FE65 is a negative regulator of axon branching. *Mol. Cell. Neurosci.* 35, 57–63.
- Jaeger, S., Pietrzik, C.U., 2008. Functional role of lipoprotein receptors in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 5, 15–25.
- Kantarci, S., Al-Gazali, L., Hill, R.S., Donnai, D., Black, G.C., Bieth, E., Chassaing, N., Lacombe, D., Devriendt, K., Teebi, A., Loscertales, M., Robson, C., Liu, T., MacLaughlin, D.T., Noonan, K.M., Russell, M.K., Walsh, C.A., Donahoe, P.K., Pober, B.R., 2007. Mutations in LRP2, which encodes the multiligand receptor megalin, cause Donnai-Barrow and facio-oculo-acoustico-renal syndromes. *Nat. Genet.* 39, 957–959.
- Kinoshita, A., Whelan, C.M., Smith, C.J., Mikhailenko, I., Rebeck, G.W., Strickland, D.K., Hyman, B.T., 2001. Demonstration by fluorescence resonance energy transfer of two sites of interaction between the low-density lipoprotein receptor-related protein and the amyloid precursor protein: role of the intracellular adapter protein Fe65. *J. Neurosci.* 21, 8354–8361.
- Kounnas, M.Z., Haudenschild, C.C., Strickland, D.K., Argraves, W.S., 1994. Immunological localization of glycoprotein 330, low density lipoprotein receptor related protein and 39 kDa receptor associated protein in embryonic mouse tissues. *In Vivo* 8, 343–351.
- Leranth, C., Pickel, V.M., 1989. Electron microscopic pre-embedding double immunostaining methods. In: Heimer, L., Zaborsky, L. (Eds.), *Neuroanatomical tract-tracing methods. II. Recent progress.* Plenum, New York, pp. 129–172.
- Liu, Q., Zerbinatti, C.V., Zhang, J., Hoe, H.S., Wang, B., Cole, S.L., Herz, J., Muglia, L., Bu, G., 2007. Amyloid precursor protein regulates brain apolipoprotein E and cholesterol metabolism through lipoprotein receptor LRP1. *Neuron* 56, 66–78.
- Lombardo, J.A., Stern, E.A., McLellan, M.E., Kajdasz, S.T., Hickey, G.A., Bacskai, B.J., Hyman, B.T., 2003. Amyloid-beta antibody treatment leads to rapid normalization of plaque-induced neuritic alterations. *J. Neurosci.* 23, 10879–10883.
- May, P., Bock, H.H., Herz, J., 2003. Integration of endocytosis and signal transduction by lipoprotein receptors. *Sci. STKE* PE12.
- Moestrup, S.K., Verroust, P.J., 2001. Megalin- and cubilin-mediated endocytosis of protein-bound vitamins, lipids, and hormones in polarized epithelia. *Annu. Rev. Nutr.* 21, 407–428.
- Nagai, M., Meerloo, T., Takeda, T., Farquhar, M.G., 2003. The adaptor protein ARH escorts megalin to and through endosomes. *Mol. Biol. Cell* 14, 4984–4996.
- Pietrzik, C.U., Yoon, I.-S., Jaeger, S., Busse, T., Weggen, S., Koo, E.H., 2004. FE65 Constitutes the Functional Link between the Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein and the Amyloid Precursor Protein. *J. Neurosci.* 24, 4259–4265.
- Pons, S., Torres-Aleman, I., 2000. Insulin-like growth factor-I stimulates dephosphorylation of ikappa B through the serine phosphatase calcineurin (protein phosphatase 2B). *J. Biol. Chem.* 275, 38620–38625.
- Sabo, S.L., Lanier, L.M., Ikin, A.F., Khorkova, O., Sahasrabudhe, S., Greengard, P., Buxbaum, J.D., 1999. Regulation of beta-amyloid secretion by FE65, an amyloid protein precursor-binding protein. *J. Biol. Chem.* 274, 7952–7957.
- Sabo, S.L., Ikin, A.F., Buxbaum, J.D., Greengard, P., 2003. The amyloid precursor protein and its regulatory protein, FE65, in growth cones and synapses in vitro and in vivo. *J. Neurosci.* 23, 5407–5415.
- Spoelgen, R., Hammes, A., Anzenberger, U., Zechner, D., Andersen, O.M., Jerchow, B., Willnow, T.E., 2005. LRP2/megalin is required for patterning of the ventral telencephalon. *Development* 132, 405–414.
- Tanzi, R.E., Bertram, L., 2005. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* 120, 545–555.
- Teter, B., Ashford, J.W., 2002. Neuroplasticity in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* 70, 402–437.
- Vargas, T., Bullido, M.J., Martínez-García, A., Antequera, D., Clarimon, J., Rosich-Estrago, M., Martín-Quero, A., Mateo, I., Rodríguez-Rodríguez, E., Vilella-Cuadrada, E., Frank, A., Leo, A., Molina-Porcel, L., Blesa, R., Combarros, O., Gomez-Isla, T., Bermejo-Pareja, F., Valdivieso, F., Carro, E., 2010. A megalin polymorphism associated with promoter activity and Alzheimer's disease risk. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 805405.
- Waldron, E., Heilig, C., Schweitzer, A., Nadella, N., Jaeger, S., Martin, A.M., Weggen, S., Brix, K., Pietrzik, C.U., 2008. LRP1 modulates APP trafficking along early compartments of the secretory pathway. *Neurobiol. Dis.* 31, 188–197.
- Walsh, D.T., Monteiro, R.M., Bresciani, L.G., Jen, A.Y., Leclercq, P.D., Saunders, D., EL-A, A.N., Gbadamoshi, L., Gentleman, S.M., Jen, L.S., 2002. Amyloid-beta peptide is toxic to neurons in vivo via indirect mechanisms. *Neurobiol. Dis.* 10, 20–27.
- Wicher, G., Larsson, M., Rask, L., Aldskogius, H., 2005. Low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP)-2/megalin is transiently expressed in a subpopulation of neural progenitors in the embryonic mouse spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 492, 123–131.
- Wicher, G., Larsson, M., Svenningsen, A.F., Gyllencreutz, E., Rask, L., Aldskogius, H., 2006. Low density lipoprotein receptor-related protein-2/megalin is expressed in oligodendrocytes in the mouse spinal cord white matter. *J. Neurosci. Res.* 83, 864–873.
- Willnow, T.E., Hilpert, J., Armstrong, S.A., Rohlmann, A., Hammer, R.E., Burns, D.K., Herz, J., 1996. Defective forebrain development in mice lacking gp330/megalin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93, 8460–8464.
- Yoon, I.S., Pietrzik, C.U., Kang, D.E., Koo, E.H., 2005. Sequences from the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) cytoplasmic domain enhance amyloid beta protein production via the beta-secretase pathway without altering amyloid precursor protein/LRP nuclear signaling. *J. Biol. Chem.* 280, 20140–20147.
- Zhang, Y.W., Xu, H., 2007. Molecular and cellular mechanisms for Alzheimer's disease: understanding APP metabolism. *Curr. Mol. Med.* 7, 687–696.
- Zheng, G., Bachinsky, D.R., Stamenkovic, I., Strickland, D.K., Brown, D., Andres, G., McCluskey, R.T., 1994. Organ distribution in rats of two members of the low-density lipoprotein receptor gene family, gp330 and LRP/alpha 2MR, and the receptor-associated protein (RAP). *J. Histochem. Cytochem.* 42, 531–542.
- Zlokovic, B.V., Martel, C.L., Matsubara, E., McComb, J.G., Zheng, G., McCluskey, R.T., Frangione, B., Ghiso, J., 1996. Glycoprotein 330/megalin: probable role in receptor-mediated transport of apolipoprotein J alone and in a complex with Alzheimer disease amyloid beta at the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93, 4229–4234.

Research Report

Leptin Induces Proliferation of Neuronal Progenitors and Neuroprotection in a Mouse Model of Alzheimer's Disease

Rocío Pérez-González^{a,b}, Desiree Antequera^{a,b}, Teo Vargas^{a,b}, Carlos Spuch^{a,b}, Marta Bolós^{a,b} and Eva Carro^{a,b,*}

^aNeuroscience Group, Research Institute Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

^bCenter for Biomedical Research in Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Madrid, Spain

Accepted 18 January 2011

Abstract. Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease associated with senile amyloid- β (A β) plaques, neuronal death, and cognitive decline. Neurogenesis in the adult hippocampus, which is notably affected by progressive neurodegeneration and A β pathology, is implicated in learning and memory regulation. Human postmortem brains of AD patients and A β PP/PS1 double transgenic mice show increased neurodegeneration. Leptin, an adipose-derived hormone, promotes neurogenesis in the adult hippocampus, but the way in which this process occurs in the AD brain is still unknown. Thus, we sought to determine if leptin stimulated the proliferation of neuronal precursors in A β PP/PS1 mice. We estimated the number proliferating hippocampal cells after intracerebroventricular administration of a lentiviral vector encoding leptin. After 3 months of treatment with leptin we observed an increase in the number of BrdU-positive cells in the subgranular zone of the dentate gyrus, as shown by morphometric analysis. This increase resulted mainly from an increased proliferation of neuronal precursors. Additionally, leptin led to an attenuation of A β -induced neurodegeneration, as revealed by Fluoro-Jade staining. Our results suggest that in A β PP/PS1 mice, leptin exerts changes resembling acute neurotrophic and neuroprotective effects. These effects could serve as the basis for the design of future treatment strategies in AD.

Keywords: Alzheimer's disease, amyloid- β , lentivirus, leptin, neurodegeneration, neurons

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD), a common cause of dementia [1], is a progressive neurodegenerative disease associated with dysfunction and eventual death of neurons. A pathologic hallmark of AD is the formation of senile plaques, of which amyloid- β (A β) is the major component [2]. Increased A β levels or plaques in the brain may be the primary influence leading to neuronal degeneration in patients with AD [1].

The hippocampus is a unique structure regarding neurogenesis, as it continues to produce new neurons throughout life [3]. In fact, the dentate gyrus of the hippocampus is one of the main brain regions where adult neurogenesis persists throughout life. Thus, one potential approach in the treatment of AD could involve the use of endogenous neuronal precursors to replace lost or damaged neurons, based on the ability of several brain areas, including the dentate gyrus to generate new neurons in the adult brain [4, 5].

Animal models have been useful in identifying and characterizing injury-induced neurogenesis associated with epilepsy [6], ischemic stroke [7, 8], and Parkinson's disease [9]. Functional neurons are also

*Correspondence to: Eva Carro, PhD, Neuroscience Group, Research Institute Hospital 12 de Octubre, Av. de Córdoba s/n, 28041-Madrid, Spain. Tel.: +34 91 390 8765; Fax: +34 91 390 8544; E-mail: carroeva@h12o.es.

generated in the adult human brain [10], and altered neurogenesis has been reported in patients with Huntington's disease [11], and AD [12].

Adult neurogenesis is regulated by physiological and pathological events. In addition, pharmacological interventions at any of the three main stages of neurogenesis (cell proliferation, differentiation, and survival) by using neurotrophins, growth factors, or cytokines, have demonstrated to modulate adult neurogenesis [13–16]. Leptin is an adipocyte-derived cytokine that has been shown to increase the production of new neurons in the adult dentate gyrus [17]. A recent literature review of leptin's many actions suggest that this pluripotent peptide holds promise as a novel therapeutic tool for the treatment of AD [18]. Leptin receptors are widely distributed in brain areas related to emotional responses, such as the hippocampus [19, 20]. Many studies have provided further evidence of leptin's neuroprotective properties related to leptin-mediated survival signaling in different types of neurons [21–25].

Based on these findings, we examined the therapeutic effects of leptin in adult amyloid- β protein precursor/presenilin-1 (A β PP/PS1) mice, a transgenic mouse model of AD, focusing on its ability to stimulate cell proliferation and neuroprotection in the hippocampus, and the possible differential response depend on the area studied. Bigenic A β PP/PS1 transgenic mice display both AD-like A β neuropathology and cognitive deficits, with a markedly accelerated amyloid deposition [26]. In order to achieve a stable expression of leptin we used lentiviral vectors, which have proven to be an excellent approach to modulate protein expression [27–30].

MATERIAL AND METHODS

Lentiviral vectors

Lentiviral vectors were produced using a four-plasmid transfection system, as described previously [27]. A cDNA coding for mouse leptin was subcloned in the *XbaI-BamHI* site of the pRRLsin18.PPT.CMV.eGFP.Wpre transfer vector, with a small segment of the viral hemagglutinin coat protein as an epitope tag (HA). Packaging, purification and titer determination of the lentivirus were performed as described previously [27]. In all experiments, controls were infected with an empty human immunodeficiency virus (HIV) vector.

Cell cultures

Primary neuronal cultures from the cerebral cortex were obtained from Wistar rat embryos (E17) as previously described [20]. Cultures were kept at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ for 7 days prior to experimentation. Fresh Neurobasal™ media (Invitrogen, Life Technologies) containing vector particles (1 μ g/mL) and 8 μ g/mL polybrene (Sigma) were added to the cultures and replaced after 24 h, as previously described [27].

Animals

Six-month-old male double transgenic A β PP/PS1 mice, a cross between Tg2576 (overexpressing human A β PP695) and mutant PS1 (M146L) mice were used. Vector suspensions (2 μ L per mouse) were stereotactically injected in each lateral ventricle (brain coordinates are expressed as mm from bregma: 0.6 posterior, 1.1 lateral, 2 ventral) with a 10 μ L syringe at a rate of 1 μ L/min. Empty vector-treated and leptin-treated animals were assigned to two groups, and were treated for 1 (5 A β PP/PS1 mice treated with HIV-Leptin and 5 A β PP/PS1 mice treated with empty vector), and 3 months (8 A β PP/PS1 mice treated with HIV-Leptin and 8 A β PP/PS1 mice treated with empty vector). Subsequently, animals received daily intraperitoneal injections of BrdU (Sigma, St Louis, MO) dissolved in 0.9% NaCl at dose of 50 mg/kg for 7 days. After either 1 or 3 months of treatment, animals were deeply anesthetized and sacrificed 24 h after the last injection of BrdU. By immunohistochemical examination, newly formed cells that survived up to 7 days were considered BrdU-positive (BrdU⁺). Animals were perfused transcardially either with saline buffer for biochemical analysis, or 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4 for immunohistochemical analysis. All animals were handled and cared for according to the Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986.

Protein analysis

Western-blot (WB) assays were performed as described previously [31]. Primary antibodies used were: mouse monoclonal anti-HA (1 : 1000, Sigma), and mouse monoclonal anti- β III tubulin (1 : 10000, Millipore). The secondary antibody was a goat anti-mouse IgG, HRP-conjugated (1 : 10000, Bio-Rad Laboratories).

Immunohistochemistry

Fixed brains were cut on a vibratome (Leica Microsystems) at 50 μm , and tissue sections were collected in cold PB 0.1 M, and incubated overnight with primary antibodies at 4°C. All primary antibodies were diluted in PB 0.1 M containing 0.5% bovine serum albumin and 0.5% Triton X-100. Sections were blocked by incubating for 15 min in a solution containing 10% methanol and 3% hydrogen peroxide. For BrdU immunohistochemistry, DNA was denatured by incubating tissue sections for 30 min in 2 N HCl at room temperature.

To detect A β deposits, brain sections from A β PP/PS1 mice were pre-incubated with 88% formic acid and immunostained as previously described [31]. Primary antibodies used were: mouse monoclonal anti-HA (1 : 500, Sigma), mouse monoclonal anti-BrdU (1 : 20000, DS Hybridoma Bank), goat polyclonal doublecortin (DCX; 1 : 250, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), and rabbit polyclonal anti-A β (1 : 500, Millipore). Secondary antibodies used were: donkey anti-mouse IgG 488 (1 : 1000, FluoProbes[®], Interchim), donkey anti-goat IgG 488 (1 : 1000, FluoProbes[®], Interchim), and Texas Red goat anti-rabbit IgG antibody (1 : 1000, Jackson Immunoresearch, West Grove). Images were captured using a Zeiss LSM 510 Meta scanning laser confocal microscope (Carl Zeiss Microimaging, GmbH). For stereological estimation of BrdU⁺ cells, all sections were processed for single BrdU immunohistochemistry using the avidin-biotin complex method (VECTASTAIN Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA). The reaction was visualized using 3,3'-diaminobenzidine (Vector Laboratories) as the chromogen.

Morphometrical analyses were performed as previously described [32]. The number of BrdU⁺ neurons within the hippocampus was counted using light microscopy (Zeiss microscope; Carl Zeiss Microimaging, GmbH) at a magnification of 40X. Based on a modified stereological method [33], BrdU⁺ were counted in one of every six sections from rostral (2 mm from bregma) to caudal (-4.3 mm from bregma). In addition, one series of sections was used for double-labeling experiments using DAPI nuclear staining (Sigma), and DCX (Santa Cruz Biotechnology) as a marker of neuronal progenitor cells [12, 32, 34]. The same areas and number of sections were studied in all animals and experimental groups. The specificity of the staining was tested by omitting primary antibodies from the incubation solution.

Fluoro-Jade B labeling

Fluoro-Jade B (Histochem, Jefferson, AR) staining was carried out as described by Schmued and Hopkins [35]. Briefly, paraformaldehyde-fixed brain sections were mounted on 1.5% gelatin-coated slides, air-dried overnight at room temperature and then for 30 min at 40°C before staining. Sections were immersed for 5 min in a solution containing 1% sodium hydroxide in 80% alcohol, then for 2 min in 70% ethanol, and finally for 1 min in distilled water. Sections were then oxidized by immersion for 10 min in 0.06% KMnO₄, under moderate shaking. After several rinses in distilled water, sections were incubated for 30 min in 0.004% Fluoro-Jade-B dye in 0.1% acetic acid, rinsed thoroughly in distilled water, and placed into a heater set to 40°C until the tissue was completely dry. Finally, they were cleared in xylene and coverslipped using D.P.X. mounting medium (Sigma).

One series of sections was used for double-labeling experiments using rabbit anti-A β and Fluoro-Jade B, using the same method as described above, except that sections were oxidized in 0.06% KMnO₄ solution for 5 min instead of 10 min to avoid altering A β labeling. Fluoro-Jade B has been shown to stain degenerated, but not healthy, neurons [35, 36].

Morphometrical analysis, using ImageJ software (NIH Image), was done as described [33], and results expressed as number of Fluoro-Jade B-positive cells and plaques, and as brain area % covered with Fluoro-Jade B labeling.

Statistical analysis

Results are expressed as means \pm standard error of the mean (SEM). Student's *t* test was used for comparisons between groups. All calculations were made using SPSS v15.0 software. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Leptin delivery to A β PP/PS1 mice using a lentiviral vector

As mentioned in the Methods section, we constructed a lentiviral (HIV) vector coding for leptin (HIV-Leptin). The transfection efficiency was tested in primary neuronal cultures of the cerebral cortex by WB detection with an anti-tag antibody against HA (Fig. 1A). Immunoreactivity against HA was

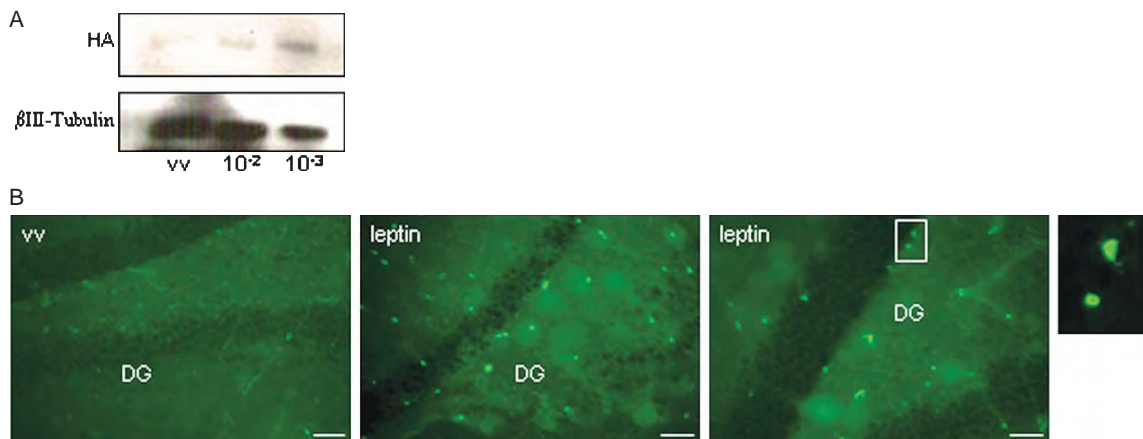


Fig. 1. *In vitro* and *in vivo* transfection efficiency of HIV-Leptin. A) Western blots show overexpression of leptin in lysates from primary neuronal cultures transfected with HIV-Leptin at a dilution of 10^{-2} and 10^{-3} . Lentiviral efficiency was detected using an antibody directed against HA. Note that levels of the unrelated protein β -III tubulin remained undisturbed after lentiviral transfection. Representative blots are shown. B) Detection of HA (in green) after intracerebroventricular injection of HIV-Leptin in A β PP/PS1 mice at 1 and 3 months. Note the absence of HA-staining in empty vector-treated A β PP/PS1 mice. DG: Dentate gyrus; vv: Void vector. Scale bars = 20 μ m.

used to determine the efficiency of HIV-Leptin in A β PP/PS1 mice 1 and 3 months after intracerebroventricular (i.c.v.) injection of vector suspensions. We observed HA-positive (HA⁺) cells in hippocampus of A β PP/PS1 mice 1 month after administration HIV-Leptin (Fig. 1B, middle image), and they were still detected 3 months after the injection (Fig. 1B, right image).

Leptin increases proliferation of neuronal progenitors in the hippocampus of A β PP/PS1 mice

Most BrdU⁺ nuclei were found in the inner part of the granule cell layer in the dentate gyrus of the hippocampus. Stereological counting of BrdU⁺ cells showed that HIV-Leptin treatment for 1 month induced an increased tendency in cell proliferation, but this is not a significant difference (Fig. 2A, B). However, in the dentate gyrus of A β PP/PS1 mice treated with HIV-Leptin for 3 months, the number of BrdU⁺ nuclei was significantly increased (more than 1.5 fold) compared to the empty vector-treated A β PP/PS1 mice ($p < 0.01$) (Fig. 2C, D).

Since we found no significant differences between animal groups after 1 month of treatment with HIV-Leptin, we decided to perform the next set of experiments only in the group of A β PP/PS1 mice treated for 3 months. Cell proliferation in the dentate gyrus of HIV-Leptin-treated A β PP/PS1 mice was assessed using DCX labeling. Representative photomicrographs of DCX staining are shown in Fig. 3A.

The number of DCX-positive (DCX⁺) cells in the dentate gyrus was significantly higher in A β PP/PS1 mice treated with HIV-Leptin than in A β PP/PS1 mice treated with the empty vector ($p < 0.05$) (Fig. 3B).

Leptin reduces neurodegeneration in A β PP/PS1 mice

We observed that Fluoro-Jade B labeling in the dentate gyrus of A β PP/PS1 mice decreased significantly after treatment with HIV-Leptin injections, as compared with A β PP/PS1 mice treated with the empty vector ($p < 0.05$) (Fig. 4A, B). In contrast, these significant differences in Fluoro-Jade B labeling were not observed in the CA1 region of the hippocampus. Using double immunofluorescence, we observed that Fluoro-Jade B labeling consistently colocalized with labeling for A β plaques in the hippocampus of A β PP/PS1 mice (Fig. 4C). Consequently, we assessed whether leptin treatment was able to reduce the number of A β plaques in A β PP/PS1 mice. We observed that, compared with A β PP/PS1 mice treated with the empty vector, both the number and size of A β plaques were significantly decreased in the hippocampus ($p < 0.05$), of A β PP/PS1 mice treated with HIV-Leptin (Figs. 4D, E).

DISCUSSION

Here, we have shown that i.c.v. gene delivery of leptin in A β PP/PS1 mice increases proliferation of

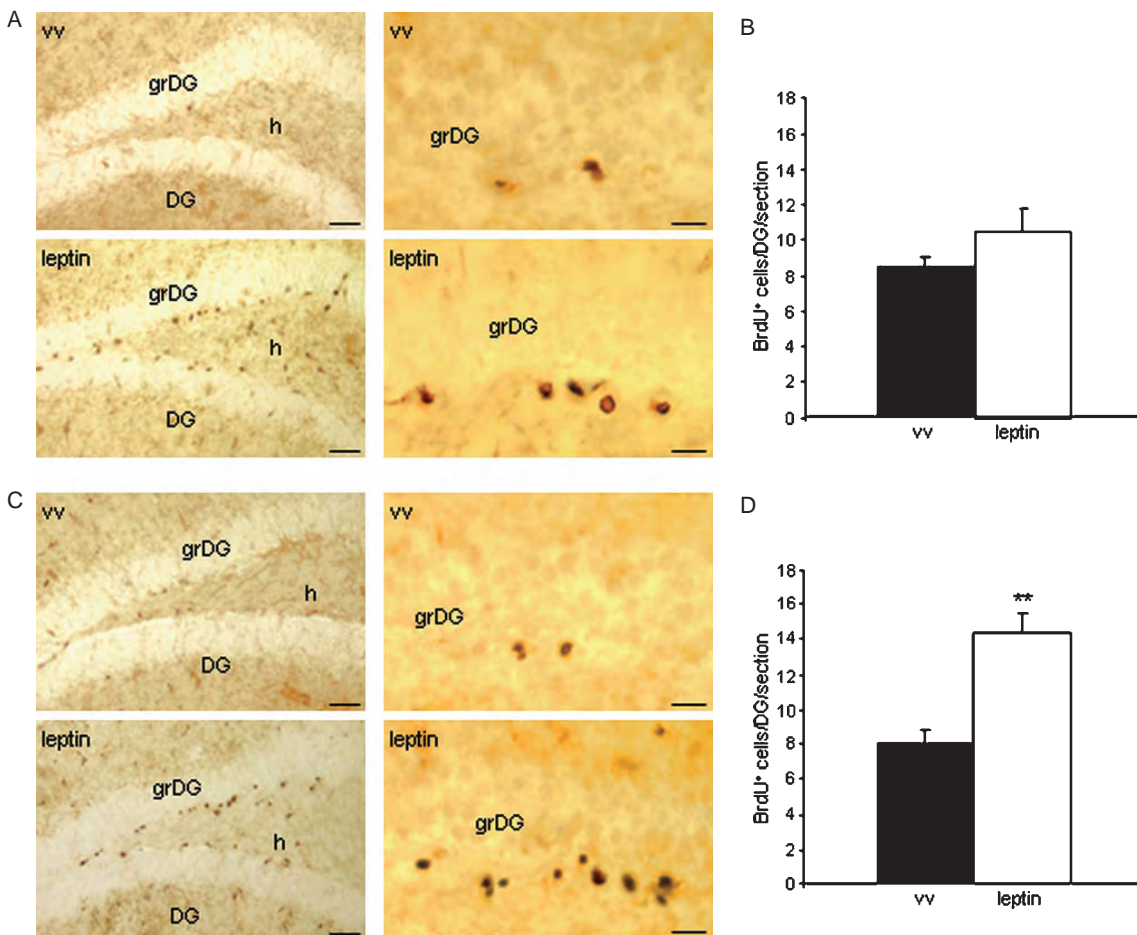


Fig. 2. Effect of HIV-Leptin on cell proliferation in the dentate gyrus of A β PP/PS1 mice. Photomicrographs, with different magnification, show BrdU-stained nuclei in the dentate gyrus of HIV-Leptin-treated and empty (void) vector-treated A β PP/PS1 mice 1 (A) and 3 (C) months after injection. Note that the number of BrdU-positive nuclei is notably higher after HIV-Leptin injection at any time point. Scale bars = 20 μ m. Histograms show the number of BrdU-positive nuclei in HIV-Leptin treated A β PP/PS1 mice compared with empty (void) vector-treated mice after 1 (B) and 3 (D) months of treatment. Data are expressed as mean \pm SEM. **Statistically significant ($p < 0.01$). grDG: Granular layer of the dentate gyrus; vv: Void vector; DG: Dentate gyrus; h: Hilus.

hippocampal neuronal progenitors and reduces neurodegeneration, thereby suggesting by this mechanism dead or damaged neurons could be replaced. Lentiviral vectors are valuable tools for neurobiology research because of their ability to transduce nondividing cells, such as neurons [37]. This *in vivo* gene delivery approach ensured a stable and effective overexpression of leptin in a mouse model of amyloidosis, providing a more physiologic leptin delivery than is possible with direct infusion. As gene delivery vehicles, lentiviral vectors exhibit an inherent nontoxic capacity to migrate long-distances, and a remarkable ability to modulate host brain cells [27–30].

Prior studies have shown that neurogenesis occurs in the adult mammalian brain, although at a reduced rate with advancing age [38]. Nevertheless, the aged brain retains the capacity to up-regulate neurogenesis through different mechanisms [39]. In conditions like AD, which occurs at an increasing frequency with advancing age, the ability of the aged brain to mobilize new neurons opens new avenues for cell-replacement therapy. Neurogenesis may be a natural defense strategy against neurodegeneration in AD. However, an increase in neurogenesis may not be enough to compensate for the progressive pathological changes that occur in this disease [12]. Therefore, upregulation of

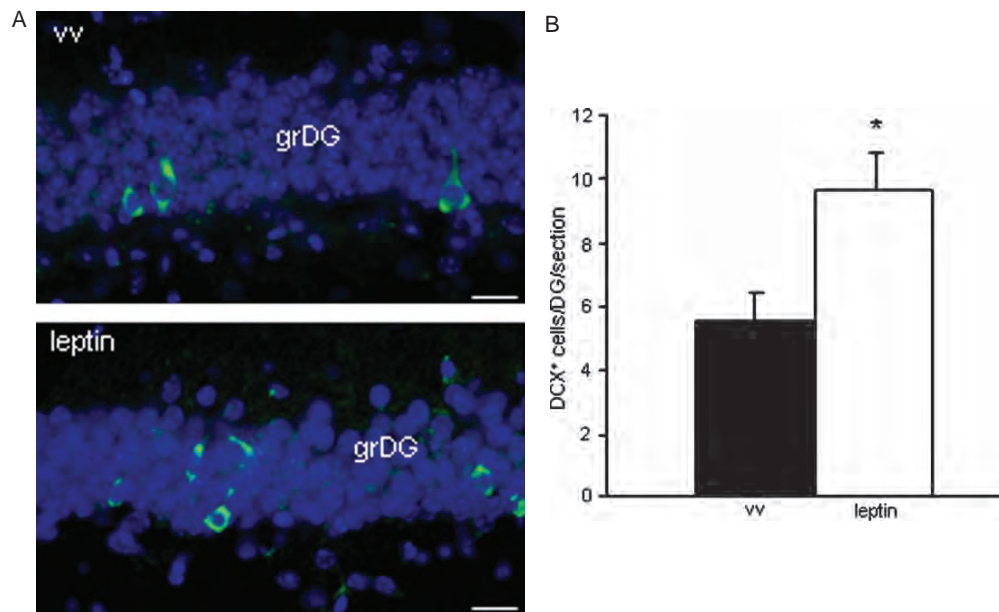


Fig. 3. Effect of HIV-Leptin on the proliferation of neuronal progenitors in the dentate gyrus of A β PP/PS1 mice. A) Photomicrographs show fluorescent DCX staining of neurons in the granule cell layer of the dentate gyrus in HIV-Leptin-treated and empty vector-treated A β PP/PS1 mice after 3 months of treatment. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bars = 20 μ m. B) The histogram shows the number of DCX⁺ cells in HIV-Leptin treated A β PP/PS1 mice compared with empty (void) vector-treated mice. Notice that the number of DCX-positive cells in the dentate gyrus is significantly increased after 3 months of HIV-Leptin treatment. Data are expressed as mean \pm SEM. *Statistically significant ($p < 0.05$). grDG: Granular layer of the dentate gyrus; vv: Void vector.

neurogenesis may be a potential future therapeutic strategy for the treatment of AD.

Neurogenesis is a process that can be stimulated by physiological factors, such as growth factors and environmental enrichment, and by pathological processes, including neurodegeneration. *In vitro* and *in vivo* studies have shown that leptin stimulates hippocampal neurogenesis by increasing cell proliferation [17]. Many peripheral effects of leptin have been described, including angiogenesis [40], and neuroprotection [22, 23]. More recent findings have shown that leptin facilitates spatial learning and memory [41, 42], and produces antidepressant-like effects [43, 44]. In turn, adult neurogenesis has been proposed to mediate hippocampal-dependent learning and therapeutic actions of antidepressants [45, 46].

Therefore, our data are consistent with the findings of Garza et al. using a 14-day chronic treatment with leptin in adult mice [17]. Interestingly, in their study, Garza et al. observed a tendency towards a decrease in the number of BrdU⁺ cells in the dentate gyrus in control animals. A similar finding was also shown in the study by Nakagawa et al. [47], in which the number of BrdU⁺ cells in the dentate gyrus in control animals

appeared to be reduced after chronic (14 days) vehicle injection in comparison with acute (1 day) injection. It is possible that the procedure used by the investigators that involved repeated intraperitoneal injections, may have been stressful to the animals, resulting in suppression, or at least reduction, in cell proliferation. In support of this assumption, stress hormones and stress have been demonstrated to decrease cell proliferation in the dentate gyrus [48, 49]. To avoid these stress-induced effects on neurogenesis, we decided to use a lentivirus-based vector, which is capable of infecting brain cells, including adult neurons, by injecting a highly concentrated viral vector stock into the brain, via lateral ventricles [30]. The lentivirus vector system has been shown to efficiently and stably infect quiescent cells within the primary injection site, and is associated with a stable transgene expression for a period of over six months [50].

Our results also showed an increased expression of the neuronal marker DCX in the hippocampus of A β PP/PS1 mice. With the use of immunohistochemistry, DCX was shown to localize in hippocampal sites associated with neurogenesis, and involved in the pathogenesis of AD. Our findings are consistent with

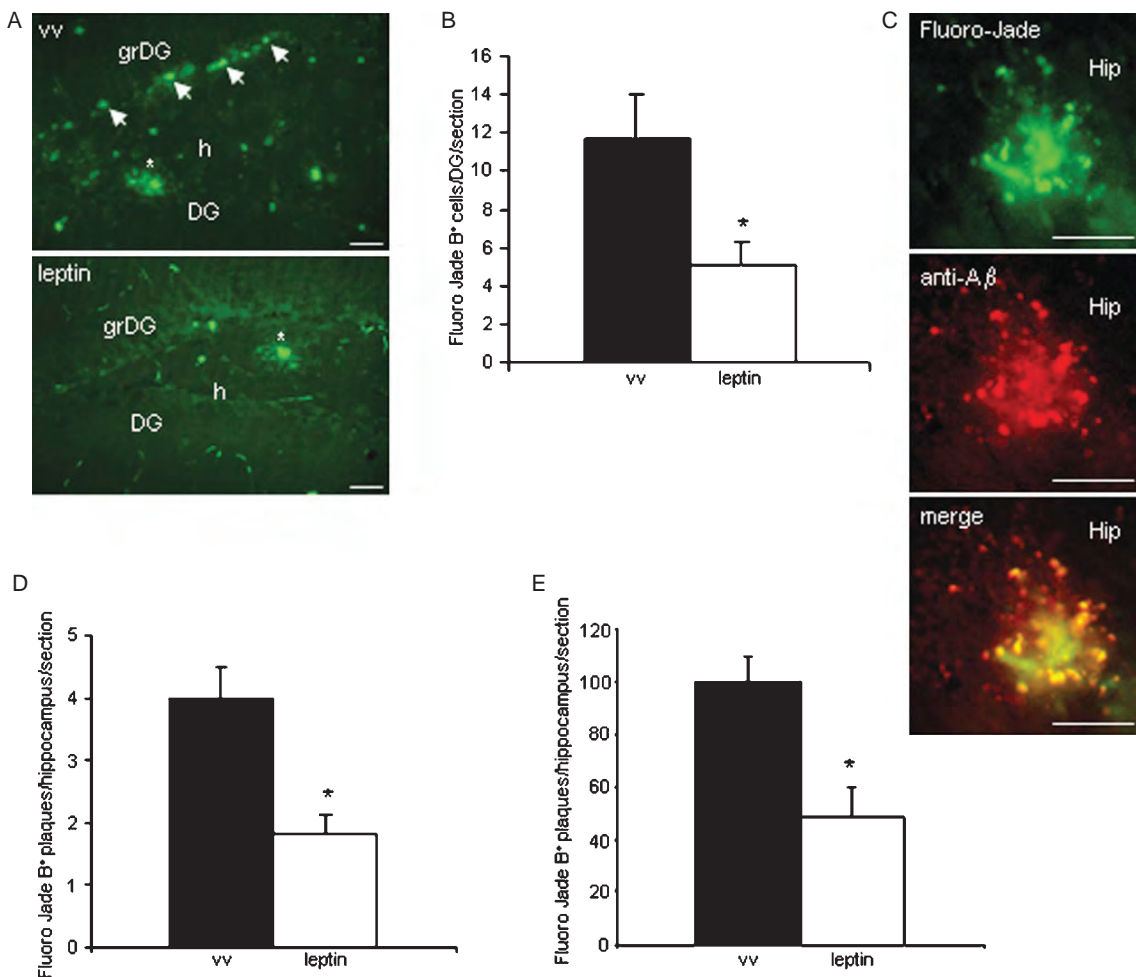


Fig. 4. Effect of HIV-Leptin on Fluoro-Jade B staining in the brain of A β PP/PS1 mice. A) Photomicrographs show fluorescent Fluoro-Jade B staining in the dentate gyrus of A β PP/PS1 mice, mainly in empty (void) vector-treated A β PP/PS1 mice. Notice how Fluoro-Jade B not only stains neurodegenerative cells (arrows), but also amyloid plaques (asterisks), which show an intense green immunofluorescent core. B) The histogram shows the number of Fluoro-Jade B-positive cells in HIV-Leptin treated A β PP/PS1 mice compared with empty (void) vector-treated mice. Stereological analysis revealed a significant reduction in the number of neurodegenerative cells in the dentate gyrus after 3 months of leptin treatment. C) Double immunofluorescence assays showed colocalization of Fluoro-Jade B (in green) and A β (in red) in amyloid plaques in the hippocampus of A β PP/PS1 mice. Histograms show the number (D) and size (in %) (E) of Fluoro-Jade B-positive plaques in the hippocampus of HIV-Leptin-treated and empty (void) vector-treated mice. Notice how both the number and size are reduced in HIV-Leptin-treated A β PP/PS1 mice compared with empty (void) vector-treated A β PP/PS1 mice. Data are expressed as mean \pm SEM. *Statistically significant ($p < 0.05$). grDG: Granular layer of the dentate gyrus; h: Hilus; Hip: Hippocampus; vv: Void vector. Scale bars = 20 μ m.

the results by Garza et al. [17] that demonstrate leptin-stimulated neurogenesis in adult mice. This effect on neurogenesis mainly resulted from an increase in cell proliferation, as leptin did not produce a significant effect on cell differentiation.

In contrast with findings from other studies, in which leptin did not show significant effects on cell survival [17], we observed that leptin significantly reduced neuronal degeneration. This result is particularly important

because the microenvironment of the AD brain may be toxic to new neurons [51], and may constitute an important factor in the progression of the neuronal loss, typically observed in patients with AD [1]. This may be one of the reasons why in AD there is a limited repair capacity via neurogenesis. Recently, it has been reported that chronic i.c.v. infusion of leptin protects hippocampal neurons from cell death induced by neuronal insults [25]. Our results suggest that leptin

has an important dual action: first, it has a stimulatory effect on neuronal progenitor proliferation, and secondly, it induces a reduction on A β -induced neurodegeneration, specifically in the dentate gyrus, the hippocampal region mainly involved in neurogenesis and memory [52]. These data reinforce the potential role of leptin on memory modulation.

The results of our study could have important consequences in the hippocampus, as this brain region is extensively affected in AD, and because memory function, which is greatly impaired in AD, may largely depend on hippocampal neurogenesis [45]. Furthermore, experimental and population studies have shown that decreased leptin levels are associated with cognitive impairment [29, 53].

In summary, our results indicate that leptin increases proliferation of new neurons in the dentate gyrus, and reduces A β -induced neuronal degeneration in a mouse model of amyloidosis. Moreover, our data support a novel role of leptin in the process of neurogenesis in AD, providing new insights into the mechanisms of neurogenic turnover. These findings suggest that leptin could contribute to AD-induced compensatory neurogenesis, and could represent an interesting target for the treatment of AD.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from *Fondo de Investigación Sanitaria* (FIS) (PI060155), *Fundación Investigación Médica Mutua Madrileña* (2006.125, 2008.93), and *CIBERNED*. We thank Ximena Alvira-Botero, MD, PhD, for the careful revision of this manuscript.

Authors' disclosures available online (<http://www.jalz.com/disclosures/view.php?id=740>).

REFERENCES

- [1] Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**, 353-356.
- [2] Selkoe DJ (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. *Ann N Y Acad Sci* **924**, 17-25.
- [3] Verret L, Jankowsky JL, Xu GM, Borchelt DR, Rampon C (2007) Alzheimer's-type amyloidosis in transgenic mice impairs survival of newborn neurons derived from adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* **27**, 6771-6780.
- [4] Gage FH, Kempermann G, Palmer TD, Peterson DA, Ray J (1998) Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. *J Neurobiol* **36**, 249-266.
- [5] Cameron HA, McKay RD (1999) Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat Neurosci* **2**, 894-897.
- [6] Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH (1997) Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* **17**, 3727-3738.
- [7] Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Bateur S, Simon RP, Greenberg DA (2001) Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4710-4715.
- [8] Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T, Nakafuku M (2002) Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* **110**, 429-441.
- [9] Fallon J, Reid S, Kinyamu R, Opole I, Opole R, Baratta J, Korc M, Endo TL, Duong A, Nguyen G, Karkehabadi M, Twardzik D, Patel S, Loughlin S (2000) *In vivo* induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14686-14691.
- [10] Roy NS, Wang S, Jiang L, Kang J, Benraiss A, Harrison-Restelli C, Fraser RA, Couldwell WT, Kawaguchi A, Okano H, Nedergaard M, Goldman SA (2000) *In vitro* neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. *Nat Med* **6**, 271-277.
- [11] Curtis MA, Penney EB, Pearson AG, van Roon-Mom WM, Butterworth NJ, Dragunow M, Connor B, Faull RL (2003) Increased cell proliferation and neurogenesis in the adult human Huntington's disease brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9023-9027.
- [12] Jin K, Peel A, Mao XO, Xie L, Cottrell B, Greenberg DA (2004) Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 343-347.
- [13] Lu B, Chow A (1999) Neurotrophins and hippocampal synaptic transmission and plasticity. *J Neurosci Res* **58**, 76-87.
- [14] Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T, Weiss S (2001) Erythropoietin regulates the *in vitro* and *in vivo* production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci* **21**, 9733-9743.
- [15] Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA (2002) Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11946-11950.
- [16] Ransome MI, Turnley AM (2007) Systemically delivered erythropoietin transiently enhances adult hippocampal neurogenesis. *J Neurochem* **102**, 1953-1965.
- [17] Garza JC, Guo M, Zhang W, Lu XY (2008) Leptin increases adult hippocampal neurogenesis *in vivo* and *in vitro*. *J Biol Chem* **283**, 18238-18247.
- [18] Carro EM (2009) Therapeutic approaches of leptin in Alzheimer's disease. *Recent Pat CNS Drug Discov* **4**, 200-208.
- [19] Friedman JM, Halaas JL (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* **395**, 763-770.
- [20] Alvira-Botero X, Pérez-González R, Spuch C, Vargas T, Antequera D, Garzón M, Bermejo-Pareja F, Carro E (2010) Megalin interacts with APP and the intracellular adapter protein FE65 in neurons. *Mol Cell Neurosci* **45**, 306-315.
- [21] Russo VC, Metaxas S, Kobayashi K, Harris M, Werther GA (2004) Antiapoptotic effects of leptin in human neuroblastoma cells. *Endocrinology* **145**, 4103-4112.
- [22] Zhang F, Wang S, Signore AP, Chen J (2007) Neuroprotective effects of leptin against ischemic injury induced by oxygen-

- glucose deprivation and transient cerebral ischemia. *Stroke* **38**, 2329-2336.
- [23] Weng Z, Signore AP, Gao Y, Wang S, Zhang F, Hastings T, Yin XM, Chen J (2007) Leptin protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic cell death via mitogen-activated protein kinase signalling. *J Biol Chem* **282**, 34479-34491.
- [24] Signore AP, Zhang F, Weng Z, Gao Y, Chen J (2008) Leptin neuroprotection in the CNS: mechanisms and therapeutic potentials. *J Neurochem* **106**, 1977-1990.
- [25] Guo Z, Jiang H, Xu X, Duan W, Mattson MP (2008) Leptin-mediated cell survival signaling in hippocampal neurons mediated by JAK STAT3 and mitochondrial stabilization. *J Biol Chem* **283**, 1754-1763.
- [26] Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, Yu X, Benkovic S, Jantzen P, Wright K, Saad I, Mueller R, Morgan D, Sanders S, Zehr C, O'Campo K, Hardy J, Prada CM, Eckman C, Younkin S, Hsiao K, Duff K (1998) Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med* **4**, 97-100.
- [27] Carro E, Spuch C, Trejo JL, Antequera D, Torres-Aleman I (2005) Choroid plexus megalin is involved in neuroprotection by serum insulin-like growth factor I. *J Neurosci* **25**, 10884-10893.
- [28] Carro E, Trejo JL, Spuch C, Bohl D, Heard JM, Torres-Aleman I (2006) Blockade of the insulin-like growth factor I receptor in the choroid plexus originates Alzheimer's-like neuropathology in rodents: new cues into the human disease? *Neurobiol Aging* **27**, 1618-1631.
- [29] Dietrich MO, Spuch C, Antequera D, Rodal I, de Yébenes JG, Molina JA, Bermejo F, Carro E (2008) Megalin mediates the transport of leptin across the blood-CSF barrier. *Neurobiol Aging* **29**, 902-912.
- [30] Antequera D, Vargas T, Ugalde C, Spuch C, Molina JA, Ferrer I, Bermejo-Pareja F, Carro E (2009) Cytoplasmic gelsolin increases mitochondrial activity and reduces Abeta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* **36**, 42-50.
- [31] Carro E, Trejo JL, Gomez-Isla T, LeRoith D, Torres-Aleman I (2002) Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. *Nat Med* **8**, 1390-1397.
- [32] Yu Y, He J, Zhang Y, Luo H, Zhu S, Yang Y, Zhao T, Wu J, Huang Y, Kong J, Tan Q, Li XM (2009) Increased hippocampal neurogenesis in the progressive stage of Alzheimer's disease phenotype in an APP/PS1 double transgenic mouse model. *Hippocampus* **19**, 1247-1253.
- [33] Trejo JL, Carro E, Torres-Aleman I (2001) Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci* **21**, 1628-1634.
- [34] Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH (2003) Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development* **130**, 391-399.
- [35] Schmued LC, Hopkins KJ (2000) Fluoro-Jade: novel fluorochromes for detecting toxicant-induced neuronal degeneration. *Toxicol Pathol* **28**, 91-99.
- [36] Damjanac M, Rioux Bilan A, Barrier L, Pontcharraud R, Anne C, Hugon J, Page G (2007) Fluoro-Jade B staining as useful tool to identify activated microglia and astrocytes in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *Brain Res* **128**, 40-49.
- [37] Zhang Y, Wang H, Pan H, Bao X, Li M, Jin J, Wu X (2006) Gene delivery into primary cerebral cortical neurons by lentiviral vector. *Cell Biol Int* **30**, 777-783.
- [38] Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* **16**, 2027-2033.
- [39] Kempermann G, Gast D, Gage FH (2002) Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann Neurol* **52**, 135-143.
- [40] Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Polverini PJ, Flores-Riveros JR (1998) Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* **281**, 1683-1686.
- [41] Oomura Y, Hori N, Shiraiishi T, Fukunaga K, Takeda H, Tsuji M, Matsumiya T, Ishibashi M, Aou S, Li XL, Kohno D, Uramura K, Sougawa H, Yada T, Wayner MJ, Sasaki K (2006) Leptin facilitates learning and memory performance and enhances hippocampal CA1 long-term potentiation and CaMK II phosphorylation in rats. *Peptides* **27**, 2738-2749.
- [42] Farr SA, Banks WA, Morley JE (2006) Effects of leptin on memory processing. *Peptides* **27**, 1420-1425.
- [43] Lu XY, Kim CS, Frazer A, Zhang W (2006) Leptin: a potential novel antidepressant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1593-1598.
- [44] Lu XY (2007) The leptin hypothesis of depression: a potential link between mood disorders and obesity? *Curr Opin Pharmacol* **7**, 648-652.
- [45] Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E (2001) Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* **410**, 372-376.
- [46] Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* **301**, 805-809.
- [47] Nakagawa S, Kim JE, Lee R, Malberg JE, Chen J, Steffen C, Zhang YJ, Nestler EJ, Duman RS (2002) Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein. *J Neurosci* **22**, 3673-3682.
- [48] Pham K, Nacher J, Hof PR, McEwen BS (2003) Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci* **17**, 879-886.
- [49] Wong EY, Herbert J (2006) Raised circulating corticosterone inhibits neuronal differentiation of progenitor cells in the adult hippocampus. *Neuroscience* **137**, 83-92.
- [50] Blömer U, Naldini L, Kafri T, Trono D, Verma IM, Gage FH (1997) Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. *J Virol* **71**, 6641-6649.
- [51] Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, Vittek MP, Ferreira A (2002) Tau is essential to beta-amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6364-6369.
- [52] Saab BJ, Georgiou J, Nath A, Lee FJ, Wang M, Michalon A, Liu F, Mansuy IM, Roder JC (2009) NCS-1 in the dentate gyrus promotes exploration, synaptic plasticity, and rapid acquisition of spatial memory. *Neuron* **63**, 643-656.
- [53] Holden KF, Lindquist K, Tylavsky FA, Rosano C, Harris TB, Yaffe K for the Health ABC study (2009) Serum leptin level and cognition in the elderly: findings from the Health ABC Study. *Neurobiol Aging* **30**, 1483-1489.

Leptin attenuates neuronal damages evoked by amyloid- β and rescues memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease

Rocío Pérez-González^{1,2}, María Ximena Alvira-Botero³, Omar Robayo³, Desiree Antequera^{1,2}, Miguel Garzón³, Ana María Martín-Moreno^{2,4,5}, Begoña Brera^{2,4}, María L. de Ceballos^{2,4}, Eva Carro^{1,2}

¹*Neuroscience Group, Instituto de Investigacion Hospital 12 de Octubre (i+12), Madrid, Spain*

²*Center for Networker Biomedical Research on Neurodegenerative Diseases (CIBERNED)*

³*Department of Anatomy, Histology and Neuroscience, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain*

⁴*Neurodegeneration Group, Cajal Institute-CSIC*

⁵*Present address: MD Anderson Cancer Center, Arturo Soria 270, 28033 Madrid, Spain*

Corresponding author:

Dr. Eva Carro
Neuroscience Group, Instituto de Investigacion Hospital 12 de Octubre (i+12),
Av. de Córdoba s/n. 28041. Madrid. Spain
Phone:+34 91 390 8765
Fax:+34 91 390 8544
E-mail: carroeva@h12o.es

ABSTRACT

Leptin has been recently implicated in neuroprotection in Alzheimer's disease (AD). There is growing evidence that leptin is able to ameliorate AD-like pathologies, including reduction in brain amyloid- β ($A\beta$) burden. Because $A\beta$ accumulation is thought to play a crucial role in the progressive loss of synapses, we decided to investigate the ability of leptin to restore neurite damage and neuronal death, which have shown to be one of the best pathological correlates of the cognitive decline in AD. In the present study we examined amyloid burden, behavioural deficits, and synaptic dysfunction in 6-month-old male APP/PS1 mice using a previously described gene therapy approach. In order to achieve a stable expression of leptin, we used a lentiviral vector (HIV-leptin). Three months after intracerebroventricular (icv) administration of HIV-leptin, we found an important reduction in brain $A\beta$ accumulation accompanied by a significant decrease in the β -site APP-cleaving enzyme 1 (BACE1) expression, and modulated glial activation. By electron microscopy, we found that APP/PS1 mice exhibited deficits in synaptic density compared with littermate controls, and were partially rescued by HIV-leptin treatment. This alteration correlated with an enhancement of caspase-3 expression and a reduction in synaptophysin expression in synaptosome preparations. Notably, HIV-leptin therapy reverted these dysfunctions. Leptin also modulated neurite outgrowth in primary neuronal cultures, and rescued them from $A\beta_{42}$ -induced toxicity, suggesting that leptin may affect multiple aspects of synaptic status. These biochemical changes were correlated with behavioural improvements. All these findings support the potential for leptin as a therapeutic tool for the treatment of AD.

Keywords: leptin, Alzheimer's disease, synapsis, neurite length, cognitive impairment, transgenic mice.

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is the most a common form of dementia in the elderly [36]. Pathologic hallmarks of AD are senile plaques, of which β -amyloid peptide ($A\beta$) is a major component, intracellular neurofibrillary tangles containing hyperphosphorylated tau, synapse dysfunction, progressive memory loss, and eventual death of brain neurons [66]. Neuronal degeneration usually involves concomitant changes in other cells, such as inflammatory responses of astrocytes and microglial cells. Reactive gliosis is another hallmark of plaque-associated pathology in AD [9,14,50], which is a characteristic component of an inflammatory process that usually surrounds injury sites in the brain [51]. Activated astrocytes become hypertrophic, exhibit increased production of glial fibrillary acidic protein (GFAP), and form glial scars, which hinder axonal regeneration [7]. In the case of microglia, their normal physiological functions are not as well understood but research in recent years has helped to consolidate the view of microglia as the first line of defense in acute "emergency" situations, such as neurodegenerative diseases.

Leptin, an adipocyte-derived hormone, exhibits a large range of central and peripheral actions. Recently, the versatile actions of leptin have been revised [15]. Leptin receptors have been identified in neurons in many brain regions, including the hippocampus [28,2], providing evidences of leptin's neuroprotective properties on proliferation and survival signaling [87]. Recent studies have demonstrated the potential beneficial effects of leptin in several transgenic animal AD models, namely modulation of the amount of $A\beta$, and reduction tau phosphorylation [49,27,32].

For decades, $A\beta$ plaques were thought to cause dementia in AD patients by physically interrupting normal neural connectivity and function. However, the lack of correlation between $A\beta$ plaque load and the degree of cognitive impairment in AD patients [80,17], and the fact that $A\beta$ plaques occupy a negligible fraction (less than 5%) of the neuropil in cognitively impaired transgenic mice cerebral cortex [41], raised the possibility that fibrillar $A\beta$ in plaques does not contribute significantly to dementia in AD patients. In addition, impaired behavior, memory and synaptic plasticity occurs in leptin-insensitive in rodents [69,46], and these effects are reversed by the administration of leptin [6,47,26]. Importantly, clinical evidences have shown alterations in the circulating levels of leptin in AD, where patients with this disorder have lower than normal levels [21,61]. In the present study, we have used APP/PS1 mice displaying AD-like alterations [52,82,90] to investigate whether the cognitive and neuropathological

disturbances associated with amyloidosis could be reversed by chronic treatment with leptin. In order to achieve a stable expression of leptin we used a lentiviral vector, which has proven to be an excellent approach to modulate protein expression [58]. Leptin treatment was administered to 6-month-old APP/PS1 mice, which characteristically show a high A β load in hippocampal and cortical subareas, thereby allowing the evaluation of the potential reduction on A β plaque accumulation. After 3 months of treatment, leptin effectively reduced A β accumulation, and astroglial activation. Remarkably, leptin treatment alleviated synapse loss, neurodegeneration and cell death, and rescued the spatial memory deficits.

MATERIAL AND METHODS

Lentiviral vectors

Lentiviral vectors were produced using a four-plasmid transfection system, as described previously [58]. Briefly, a cDNA coding for mouse leptin was subcloned in the *XbaI-BamHI* site of the pRRLsin18.PPT.CMV.eGFP.Wpre transfer vector, with a small segment of the viral hemagglutinin coat protein as an epitope tag (HA). Packaging, purification and titer determination of the lentivirus were performed as described previously [12]. Empty vector (no insert) was used as a control (void vector, HIV-vv) in all experiments.

Animals

We used the double-transgenic APP/PS1 mice, B6.Cg-Tg (APP^{Swe}, PSEN1^{dE9})/J mouse line (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA: stock no. 005864), which expresses human APP (Swedish mutation) and presenilin 1 with a deletion in exon 9 (APP/PS1). A total of 20 six month old double transgenic APP/PS1 male, and 8 age-matched non-transgenic male littermates were used as controls. Vector suspensions (2 μ l per mouse) were stereotaxically injected in each lateral ventricle (brain coordinates are expressed as mm from bregma: 0.6 posterior, 1.1 lateral, 2 ventral) with a 10 μ l syringe at a rate of 1 μ l/min. After 3 months of treatment, animals were deeply anesthetized and transcardially perfused either with saline for biochemical analysis, or 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4 for immunohistochemical analysis. All animals were handled and cared for according to the Council Directive 2010/63/UE of 22 September 2010.

Behavioral testing

After adaptation to human handling, behavioral tests were conducted in APP/PS1 and non-transgenic mice over 11-day period, as previously described [76]. On each study day, spontaneous alternation, tested with a T-maze, a behavioral test of spatial memory [19], was the first parameter evaluated, followed by the object recognition test (days 10 and 11), a test of non-spatial visual recognition memory [20]. In the T-maze, the number of alternations and errors (entries to previously visited arms), and the time to complete each session (latency) were recorded. In the object recognition test, the recognition index, was defined as the ratio of the time spent exploring the novel object over the time spent exploring both objects in percentage, and was used to measure nonspatial memory.

Primary cell cultures

Primary neuronal cultures from the cerebral cortex and hippocampus were performed as previously described [2]. Briefly, primary cortical and hippocampal neurons were obtained from Wistar rat embryos on prenatal day 17 (E17). Cultures were kept at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ for 7 days prior to experimentation. Then, cultures were incubated in fresh medium with or without 100 nM leptin, alone or in combination with 5 µg/ml oligomeric Aβ₁₋₄₂, and STAT3 inhibitor cucurbitacin I (10 nM). Aβ₁₋₄₂ was previously dissolved in acetic acid 0.1 M, and then was dissolved in sterile distilled water as reported previously [21]. Cucurbitacin I was dissolved in DMSO as described previously [30].

Primary mixed glial cultures were prepared from neonatal rat cortex as described previously [62]. In brief, mechanically dissociated cortices were seeded onto 75-cm² flasks in Dulbecco's modified Eagle's medium, supplemented with 10% fetal calf serum, and 40 µg/ml gentamicin. Cells were cultured in a humidified atmosphere of 5% CO₂/95% air at 37°C, and the medium was changed the day after seeding and once every week afterward. When confluence was reached, cells loosely attached were collected after shaking the flasks (250 rpm for 3-4 h at 37°C) and they were seeded on poly-L-lysine-coated 96-well plates in medium with 0.1% FCS, and treated with or without 0.25-10 µg/µl leptin, alone or in combination with lipopolisacaride (LPS, 300 ng/ml).

Determination of neurite outgrowth

Cortical and hippocampal neuronal cultures were seeded at 5×10^4 cells/cm² on poly (lysine)-coated 24-well plates. 18 and 36 h after treatments were added (100 nM leptin, and 5 µg/ml oligomeric Aβ₁₋₄₂), cells were fixed with 2% paraformaldehyde, and labeled with an anti-calbindin antibody. Images were obtained using a Zeiss LSM 510 Meta scanning laser confocal microscope with a 40X objective, converted to 8 bit grayscale images for analysis (Fig. S1). The term “neurite” refers to any projection from the cell body of a neuron, which can either be an axon or a dendrite. Processes with lengths equivalent to one or more diameters of a cell body were counted as neurites. Morphometric analysis was performed with ImageJ 1.43u software (National Institute of Health, USA) with the NeuronJ plugging. Morphological analysis of neurite length were performed as described previously [2] based on a method adapted from a study by Arendt et al. [5]. A centrifugal ordering system was used to establish branch or neurite order in a neuron (Fig. S1), and branch order was taken into consideration when calculating total neurite length, as well as the

length of neurite of each order. The average neurite length was calculated and subsequently analyzed using ANOVA. At least 30 neurons were examined for each group.

Immunohistochemistry

Fixed brains were cut on a vibratome (Leica Microsystems) at 50 μ m, tissue sections were collected in cold PB 0.1 M, and incubated overnight with primary antibodies at 4°C. To detect A β deposits, brain sections from APP/PS1 mice were pre-incubated with 88% formic acid and immunostained as previously described [13]. The following primary antibodies were used: mouse anti-HA (1:500, Sigma), mouse anti-A β (1:500, MBL, Nagoya, Japan), rabbit anti-A β (1:500, Millipore) and mouse anti-GFAP (1:500, Sigma). And the secondary antibodies were: biotinylated anti-mouse IgG (1: 400, Vector Laboratories), donkey anti-mouse IgG 488 (1:1000, FluoProbes®, Interchim) and Texas Red goat anti-rabbit IgG antibody (1:1000, Jackson Immunoresearch, West Grove). Images were captured using a Zeiss LSM 510 Meta scanning laser confocal microscope (Carl Zeiss Microimaging, GmbH). A β ⁺ area was analyzed stereologically as described previously [13] and plaque burden was expressed as percentage of brain area stained with A β . Pictures were taken using light microscopy (Zeiss microscope; Carl Zeiss Microimaging, GmbH) at a magnification of 10X. Three or four areas were sampled within each section and semiquantitative analysis of labeled signal was performed using NIH Image J software. Amyloid deposits in parenchyma were also evaluated using Thioflavin S (ThS) staining.

To measure gliosis associated with the A β plaques, double fluorescence immunohistochemistry was conducted with anti-GFAP and anti-A β antibodies, as described previously [14]. All pictures were taken using a Zeiss LSM 510 Meta scanning laser confocal microscope with a 40X objective. Selected GFAP⁺ and A β ⁺ areas were analyzed with NIH Image J software to obtain the area of positive surfaces. Data are presented as the ratio of GFAP⁺ area to A β ⁺ area. Both measured areas had to be inside the reference space. In turn, the reference space was a virtual circle centered in the midpoint of the plaque. The virtual circle radius was twice the radius of the amyloid plaque as determined in its sharp focus. This procedure assured that (1) the measured fluorescence is truly associated to plaques and is proportional to the size of each plaque; and that (2) whatever the size of each plaque, the data represent the gliosis per plaque area unit, so the data were not depending on the relative plaque sizes, as plaques vary widely in size while reactive astrocytes appear similar.

Synaptosome preparation

Hippocampal tissue was homogenized in homogenization buffer containing 320 mM sucrose, 4 mM HEPES (pH 7.4), 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, and protease inhibitor cocktail (Roche) in a glass Dounce tissue grinder, as previously described [18]. The homogenate was centrifuged at 1000g for 10 min and the resulting supernatant was centrifuged at 12000g for 15 min. The pellet was resuspended in homogenization buffer and centrifuged at 13000g for 15 min to obtain the final pellet containing the synaptosome-enriched fraction.

Biochemical measurements

Western blot (WB) was performed as described previously [13]. For WB analysis, samples were homogenized in lysis buffer and then 2% SDS-containing buffers, electrophoresed and blotted. Antibodies used included: mouse anti-HA (1:250, Sigma), mouse anti-megalin (1:500, Abcam), mouse anti-Ob-R (1:150, Santa Cruz), rabbit anti-BACE1 (1:1000, Sigma), rabbit anti-p-STAT3 (1:2000, Cell Signaling), rabbit anti-caspase-3 (1:1000, Cell signaling), mouse anti-Snap-25 (1:1000, Abcam), rabbit anti-PSD95 (1:1000, Abcam), mouse anti-synaptophysin (1:1000, Millipore), and rabbit anti-synapsin I (1:5000, Sigma).

Levels of human endogenous A β ₄₀ and A β ₄₂ in cerebral cortex and hippocampus fractions from APP/PS1 mice were determined with human specific ELISA kits (Biosource), according to the manufacturer's instructions. The final A β ₄₀ and A β ₄₂ values were determined following normalization to total protein levels.

MTT assay (Roche) was used to determine the effects of LPS and leptin on microglial cultures. Briefly, cells were grown on 96-well plates and at the end of the culture period 10 μ l of MTT were added to the 100 μ l culture volume in each well and the plates were incubated for 4 hours at 37°C, 5% CO₂. Thereafter, the culture medium was removed and 100 μ l of the solubilization buffer were added. The plates were incubated overnight and absorbance was measured at 550-600 nm in a microplate reader.

Nitrite oxide (NO) production was assessed by the colorimetric Griess reaction (Sigma-Aldrich), which detects nitrite (NO₂⁻), a stable reaction product of NO and molecular oxygen, in cell cultures supernatants. Briefly, eighty microliters of each sample was incubated with 80 μ l of Griess reagent for 15 min and absorbance was measured at 540 nm in a microplate reader.

For cell death quantification, DNA fragmentation in cerebral cortex and hippocampus of APP/PS1 mice undergoing apoptosis was detected using a Cell Death Detection ELISA^{PLUS} kit (Roche Diagnostics), according to the manufacturer's protocol.

Electron microscopy

Mice were intracardially perfused with saline solution followed by 2% paraformaldehyde and 3.8% acrolein in 0.1 M PB, pH 7.4. The brains were removed and post-fixed overnight in 2% PFA in 0.1 M PB. Coronal 500 μm thick sections containing the hippocampus were cut on a Series 3000 vibratome (Technical Products International, St. Louis, MO). With the help of a magnifying glass, 1.0-1.5 mm^3 trapezoid shaped blocks of tissue of the hippocampal CA1 area were cut with a scalpel, for a total of three blocks of tissue per mouse. The 36 tissue blocks were placed in individual, coded and blind to condition glass vials, post-fixed in 1% osmium tetroxide in 0.1 M PB for 2 h, dehydrated in a series of cold graded ethanols and propylene oxide, incubated for 24 h in a 1:1 mixture of propylene oxide and epoxy resin (Embed 812; Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA) and then in 100% epoxy resin for 12-15 h. Each block was then transferred to flat-ended embedding capsules containing epoxy resin. The position of each one of the three tissue blocks belonging to each mouse was adjusted using a wooden stick in order to ensure that each had a different orientation relative to the other. The tissue was polymerized at 60°C for at least 48 h, after which blocks were trimmed, ultrathin-sectioned on an ultramicrotome and collected on 400 mesh copper grids and analyzed under a Jeol JEM 1010 electron microscope at 80 kV coupled to a digital camera (GATAN BioScan Gatan Inc.).

Thirty micrographs at 25K magnification were taken of each of the 36 copper grids in a diagonal fashion by rows from corner to corner of the mesh. To select the micrographs that were going to be analyzed we conducted a random sampling, blind as to condition, in which one out of every three micrographs from every grid was selected. The total number of synapses, the profiles where these synapses occurred (dendritic shafts or spines), and the relationship between the number of shaft synapses and spine synapses were counted using ImageJ software, version 1.46 using an unbiased counting frame area 20 μm^2 . The classification of cellular elements was based on the descriptions made by Peters et al. [59]. Asymmetric synapses were identified by the presence of thick postsynaptic densities, while symmetric synapses were identified by the presence of thin pre- and postsynaptic specializations. In addition, synapses were classified as shaft synapses, i.e. those occurring on the surface of a dendrite, or spine synapses, i.e.

those occurring at the bulbous end of a relatively short ($<2 \mu\text{m}$) protrusion separated from the dendrite by a neck or narrower region.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). A Student *t*-test was used when comparing two groups, and a two-way ANOVA followed by post-hoc test was used for multiple comparisons. Non-parametric tests were used when variances were not homogeneous. All calculations were made using SPSS v15.0 software. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Signaling pathway after HIV-Leptin administration

To obtain a gene delivery approach, we generated lentiviral vectors able to efficiently transfect most cell types. We inserted the cDNA of leptin into a lentiviral vector driven by the cytomegalovirus promoter. We previously reported that the resulting vector was able to transfect primary neuronal cells in culture, and produced high levels of leptin expression [58]. Next, we investigated *in vivo* transfection, and found that icv injection of the HIV-leptin vector into the brain lateral ventricles (icv) resulted in sustained HA expression in the choroid plexus epithelium of lateral ventricles (Fig. S2a) but also in nearby areas, including hippocampus and cerebral cortex, where HA-leptin immunoreactivity is particularly abundant and localized to the cerebral blood vessels (Fig. S2b). To verify the entry of leptin (delivery from HIV-leptin vector) into neurons, we performed double immunohistochemistry using an antibody against calbindin, a neuronal marker, in combination with the HA antibody. We found that calbindin-positive cells located in the cerebral cortex were also labeled with anti-HA antibody (Fig. S2c).

Then, we determined whether brain leptin signaling was modulated following HIV-leptin vector administration. Leptin activates multiple signaling pathways, and notably the signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3), in neurons that express the leptin receptor [53]. Furthermore, for these experiments, we assessed STAT3 phosphorylation in cerebral cortex and hippocampus. We found that tyrosine phosphorylation of STAT3 was elevated in the cerebral cortex and hippocampus of APP/PS1 transgenic mice (Fig. S2d,e). These findings confirmed those reported in a recent study [85]. When we tested the APP/PS1 mice who had received an HIV-leptin icv injection 3 months before, we observed a tendency to reduce STAT3 phosphorylation (Fig. S2d,e).

Although retroviral vectors have been routinely utilized, particularly by our group [58,4,21,12,14], we decided to confirm that lentiviral administration did not generate any non-specific dysfunction in neurons. We compared the expression of synaptic protein in intact (sham) APP/PS1 mice with that of HIV-vv-treated APP/PS1 mice. No differences were observed regarding the expression of synaptophysin and synapsin I in the cerebral cortex (Fig. S3a) or hippocampus (Fig. S3b) of APP/PS1 mice.

Leptin rescues behavioral deficits

We determined whether HIV-leptin-treated APP/PS1 mice showed behavioral and cognitive recovery. Working memory was evaluated by measuring the rate of spontaneous alternations in T-maze. This particular model of spatial memory was selected based upon its sensitivity of detection of cognitive deficit in AD mouse models [77,19]. APP/PS1 mice showed a moderate deficit in this behavioral task, the baseline rate of spontaneous alternations being: $73.7 \pm 4.9\%$ in non-transgenic mice, versus $59.3 \pm 5.3\%$ in APP/PS1 mice, ($p = 0.068$; Student's *t*-test). HIV-leptin treatment had only a partial effect on the performance of APP/PS1 mice; the alternation rate following chronic treatment was $66.3 \pm 5.1\%$. However, in APP/PS1 mice the latency to perform the correct choice was significantly increased compared with non-transgenic mice, whereas this time was reduced after HIV-leptin treatment ($p < 0.05$; Fig. 1a).

Short-term memory was evaluated using a paradigm of non-spatial visual recognition memory, subjecting the animals to a "novel object" recognition task, as previously described [76]. Retention in male APP/PS1 transgenic mice was significantly impaired relative to non-transgenic mice, whereas in HIV-leptin-treated APP/PS1 mice the impaired cognition was completely restored ($p < 0.05$; Fig. 1b). This result is similar to that of a recent study using different mouse model of AD, the TgCRND8 transgenic mice, and a different treatment consisting of a continuous delivery of leptin using a subcutaneous pump for 8 weeks [32].

Leptin reduces A β plaque accumulation

Leptin has been shown to reduce brain A β levels in 6-month-old CRND8 transgenic mice following 8 weeks of treatment [32]. We demonstrated that A β staining in the brain parenchyma of 6-month-old APP/PS1 mice was significantly reduced after 3 months of treatment with HIV-leptin (Fig. 2a). Stereological analysis of amyloid immunostaining in APP/PS1 mice treated with leptin showed a 34% decrease in the cerebral cortex, and a 22% decrease in the hippocampus (Fig. 2b) compared with empty vector-treated APP/PS1 mice. We also used thioflavin-S staining to detect amyloid deposits, and we also confirmed a reduction in amyloid deposits after HIV-leptin treatment (Fig. 2c).

To obtain a direct quantitative measurement of the A β levels after HIV-leptin treatment, we performed an ELISA analysis of human A β_{40} and A β_{42} . The study revealed that APP/PS1 mice treated with HIV-leptin for 3 months had a

significant decrease in human A β ₄₂ levels in the cerebral cortical and hippocampal regions (Table 1). Human A β ₄₀ levels showed a tendency towards reduction without significant differences (Table 1).

We then investigated whether HIV-leptin treatment altered the processing of brain APP into A β peptides. The amyloidogenic route was evaluated by testing the expression and the enzymatic activities of BACE1. Therefore, we proceeded to measure BACE1 expression in the cortical and hippocampal samples, using WB assay. HIV-leptin treated mice had reduced expression of BACE1 in the cortical (Fig. 2d) and hippocampal (Fig. 2e) samples, with similar levels, or even lower, than those observed in non-transgenic mice.

Leptin modulates glial activation

In the brains of patients with AD and transgenic AD mouse models, infiltration of activated astrocytes is seen in the area of A β plaques [14,50]. Activated astrocytes were visualized using brain sections immunostained with a GFAP antibody, an astrocyte marker, demonstrating a marked increase of reactive astrocytes in the brain of empty vector-treated APP/PS1 mice. We observed that astroglial GFAP intensity in the cerebral cortex was significantly reduced in HIV-leptin-treated APP/PS1 mice (Fig. 3a). These results were confirmed by stereological analysis of GFAP immunoreactivity in cortical brain areas (Fig. 3b). In the hippocampus, GFAP expression was neither significantly different from the APP/PS1 control mice nor from the non-transgenic mice (data not shown). The activated astrocytes were also visualized via confocal microscopy using brain section coimmunostained with GFAP antibody. We found that the amount of reactive astroglia associated with A β plaques appeared significantly reduced in APP/PS1 after HIV-leptin treatment (Fig. 3c,d) versus empty vector-treated APP/PS1 mice.

In vivo HIV-leptin tends to activate microglial cells as judged by the increased area showing tomato lectin positive cells in both cerebral cortex and hippocampus from APP/PS1 mice (Fig. S4a,b). This microglial activation could be directly related to the decrease in the load of A β , given the role of the microglia in the degradation of amyloid plaque. Indeed, one proposed mechanism of A β clearance is microglial A β phagocytosis [78,39,79,24,71]. We tested the involvement of leptin in the regulation of activated microglia in an *in vitro* model. Leptin is a pleiotropic hormone whose anti-inflammatory actions are controversial. We have studied its effects in microglia cultures subjected to endotoxin LPS challenge. Leptin increased mitochondrial respiration (MTT assay) of microglial cells in a dose-dependent manner in the range of 1.25-10 μ g/ml (Fig. S4c), and enhanced the production of nitrites in the

culture medium (Fig. S4d). Interestingly lower leptin concentrations (0.25-1 $\mu\text{g/ml}$), which did not affected the generation of nitrites nor microglial respiration, effectively counteracted LPS-induced nitrite generation (Fig. S4e). In summary leptin alone induces microglial activation at high concentrations, but at lower concentrations blocks the inflammatory challenge.

Leptin modulates synaptic deficits

Because leptin has been proposed to induce synaptic plasticity [56,60,68], and in order to assess whether early cognitive decline in APP/PS1 mice and restoration after HIV-leptin treatment was associated with synaptic alterations, we measured synapse density in CA1 pyramidal neurons of the dorsal hippocampus in nontransgenic and APP/PS1 mice treated with HIV-vv or with HIV-leptin. The area studied in each of the 12 animals was $8820 \mu\text{m}^2$, and the total area analyzed in each experimental group was $35280 \mu\text{m}^2$. Overall, there was a predominance of asymmetric synapses in the three experimental groups (average percentage of asymmetric synapses in (1) non-transgenic mice: $97.67\% \pm 0.73\%$; (2) APP/PS1-HIV-vv: $97.48\% \pm 1.16\%$; (3) APP/PS1-HIV-leptin: $98.78\% \pm 1.10\%$). Therefore, we did not discriminate between synapse type (symmetrical or asymmetrical) in the estimation of the number of synapses per unit area. Also, we observed that most of the synaptic contacts occurred between axon terminals and dendritic spines, and less among axon terminals and dendritic shafts. A gross analysis of the ultrastructure showed that, compared with APP/PS1 mice, non-transgenic controls had an abundant number of synapses between axon terminals and dendritic spines. In addition, the morphology of the subcellular elements was well conserved in control animals, as expected, whereas the overall organization of the subcellular elements was somewhat less conserved in APP/PS1 mice. The most prominent characteristics being the presence of excessively dilated and vacuolated dendrites, a decreased number of synaptic profiles, enlarged mitochondria, distended and irregular extracellular spaces, and a less compact and structured aspect of the tissue (Fig. 4, upper and middle panels). Finally, the ultrastructural morphology of HIV-leptin-treated APP/PS1 mice seemed to fluctuate between control and APP/PS1 mice. Extracellular spaces seem less distended and subcellular profiles appear more compact and less vacuolated. In addition, the number of synaptic profiles also seems to be greater compared with APP/PS1 mice (Fig. 4, lower panel).

Given the absence of data about synaptic density in APP/PS1 transgenic mice, we first decided to compare the synaptic density between transgenic and non-transgenic mice. Analysis of the synaptic profiles showed a statistically significant reduction in the percentage of synapses in dendritic spines compared with the total percentage of synapses in APP/PS1 mice ($p < 0.05$) (Table 2). Then, we investigated whether 3 months of gene therapy with leptin could alter this observation. A non-significant tendency towards an improvement in the number of synapses in dendritic spines compared with the total number of synapses was observed in HIV-leptin-treated APP/PS1 mice versus empty vector-treated controls (83.94 ± 1.30 in HIV-vv APP/PS1 mice, versus 86.38 ± 1.61 in HIV-leptin APP/PS1 mice) ($p = 0.077$; Kruskal-Wallis test).

Synapse loss was associated with A β -induced caspase activation and neurotoxicity in synaptosomes [34]. Additionally, a recent study has demonstrated that caspase-3 activity is increased in Tg2576 hippocampal synapses, and correlates with spine degeneration and deficit in hippocampal-dependent memory [18]. Thus, we examined caspase-3 expression in cortical and hippocampal synaptosome preparations from non-transgenic and APP/PS1 mice with and without leptin treatment. We observed a marked increase in procaspase-3 expression in synaptosomes prepared from cerebral cortex ($p < 0.01$), being reduced after HIV-leptin treatment ($p < 0.05$; Fig. 5a,b). In these samples, the expression of active forms of caspase-3 (17 and 19 kDa) was undetectable by WB (Fig. 5a). In the hippocampal synaptosome samples, the enhancement in procaspase-3 expression was not statistically significant ($p = 0.069$) in APP/PS1 mice (Fig. 5c,d). However active forms of caspase-3 were markedly increased in these transgenic mice, showing a tendency towards reduction after HIV-leptin treatment (Fig. 5c,e).

These findings were also associated with an increased expression of procaspase-3 in the lysates from cerebral cortex of APP/PS1 mice, whereas these effects were reverted after HIV-leptin treatment ($p < 0.05$; Fig. 5e,g). In the hippocampus, no significant differences were observed between experimental groups (data not shown). Notably, we found that procaspase-3 was more abundant in the synaptosomal fraction when compared with the total tissue homogenate. These findings suggest that caspase-3 is preferentially localized and selectively activated in the synaptic compartment, reinforcing the role of caspase-3 in synaptic dysfunction in AD [18]. In view of all these findings, we measured whether leptin was able to modulate A β -induced cell death. Using the Cell Death Detection ELISA^{PLUS} kit, we found an increased tendency on cell death in the cerebral cortex from APP/PS1 mice ($p = 0.06$; Fig. 5h), and this effect was fully reverted after HIV-leptin treatment ($p < 0.05$; Fig. 5h).

To provide additional evidence of the synaptic molecular modifications occurring in synaptosomes, we quantified the levels of four pre- and post-synaptic markers in these synaptosome preparations: SNAP-25, synaptophysin, and synapsin I, as pre-synaptic proteins, and PSD-95, as post-synaptic protein. Whereas synapsin I, SNAP-25 and PSD-95 expression did not reveal any significant differences between APP/PS1 mice when compared with non-transgenic mice, levels of synaptophysin were significantly reduced in synaptosome fractions prepared from cerebral cortex (Fig. 6a,b), and hippocampus of APP/PS1 mice (Fig. 6c,d). HIV-leptin treatment in APP/PS1 mice was able to increase these levels of synaptophysin in synaptosomal preparations from both brain areas (Fig. 6b,d). To determine whether leptin affects synaptophysin expression in neuronal cell cultures, cortical neurons were grown with the different treatments included in the media. Leptin treatment for 48 h produced a marked increase on synaptophysin expression, whereas $A\beta_{42}$ tended to reduce this effect (Fig. 6e,f). When both molecules were added to the media, leptin was able to block the negative effects induced by $A\beta_{42}$ on synaptophysin expression (Fig. 6e,f). These *in vitro* findings are consistent with the results from *in vivo* studies showing the effects of leptin on protein expression in synaptosomes of APP/PS1 mice, and support the direct involvement of $A\beta_{42}$ in the process.

Leptin activates intracellular signaling pathways

Leptin has been demonstrated to activate multiple signal transduction pathways requiring phosphorylation, including STAT3 [53]. Thus, phosphorylation of STAT3 was evaluated by WB following leptin and $A\beta_{42}$ treatments. Leptin treatment elevated the level of phosphorylated STAT3 in cultured neuronal cells, and this phosphorylation was maintained for 48 h ($p < 0.05$; Fig. 7a,b), coinciding with the increase on synaptophysin expression, as shown in Figure 6e,f. However, in presence of $A\beta_{42}$, phosphorylated STAT3 was not significantly altered after leptin treatment (Fig. 7a,b). This last result is consistent with the results from *in vivo* studies showing no effects of leptin on STAT3 phosphorylation in the cerebral cortex and hippocampus of APP/PS1 mice (Fig. S2d,e).

To further determine whether activation of STAT3 signaling pathway mediated the action of leptin on synaptic protein expression, neuronal cell cultures were exposed to different concentrations of the potent STAT3 inhibitor cucurbitacin I. Treatment of cultured cortical neurons with cucurbitacin I diminished the expression of phosphorylated STAT3 at all doses (Fig. 7c). Pretreatment with cucurbitacin I significantly reduced not only the

leptin-induced activation of STAT3 but also synaptophysin expression when compared with the leptin-treated group (Fig. 7d,e).

Leptin modulates neurite length in neuronal cultures

Previous studies have shown neurite degeneration caused by A β in culture neurons as one of the initial events in the process of neuronal death [38], which ultimately leads to reduced neurite length [1]. Since leptin rapidly enhances the motility and density of dendritic filopodia, neurite length, and subsequently increases the density of hippocampal synapses [56], we investigated the role of leptin in neurite degeneration evoked by A β in cortical and hippocampal neuronal cell cultures. Thus, we studied the effect of both stimuli, leptin and A β_{42} , on neurite length through immunocytochemistry of calbindin-labeled cells, which allows to visualize mature neurons and the different types of neurites (Fig. S1). Treatment of cortical neuronal cell cultures with both stimuli for 18 h produced modest changes. Only leptin induced an increase in the length of secondary neurites, whereas A β_{42} did not produce significant alterations (Fig. 8a,b). After 18 h, results obtained from hippocampal neurons were similar (Fig. 9a,b). However, when neurite length was assessed 36 h after treatment addition, we observed that A β_{42} had produced a marked reduction (43%) in the total length of neurites from cortical neurons (control: $140.1 \pm 30 \mu\text{m}$; A β_{42} : $80.9 \pm 2.1 \mu\text{m}$). In addition, the reduction in neurite length induced by A β_{42} was completely antagonized by the administration of leptin (Fig. 8c,d). These alterations were mainly caused by changes in primary and secondary neurites. We also investigated the response of hippocampal neurons to A β_{42} , and found that the effects were less marked (Fig. 9c,d). However, treatment of neuronal cell cultures with A β_{42} also reduced (23.6%) the total length of neurites from hippocampal neurons (control: $199.2 \pm 12.3 \mu\text{m}$; A β_{42} : $152.2 \pm 2.2 \mu\text{m}$) (Fig. 9c,d). In summary, A β_{42} had a detrimental impact on both cortical and hippocampal neurons in culture reflected by a reduction in neurite length. This effect was prevented by leptin treatment.

DISCUSSION

Loss of connectivity, caused by neuronal death, and synapses is thought to underlie cognitive decline in neurodegenerative conditions, and particularly in AD [16]. There is a growing consensus that A β , the main component of senile plaques, is toxic to synapses [67,37,73]. In both AD patients and animal models of the disease, synapse loss is greatest near senile plaques, indicating a link between amyloid pathology and synaptotoxicity. Indeed, senile plaques are associated with a local loss of dendritic spine [74-75,83]. Although leptin has been suggested as a potential therapeutic approach to prevent or decrease A β -associated neurodegeneration [32], the mechanisms and signaling pathways of leptin in AD pathology have not been clarified yet. Based on these studies, we postulated that leptin-induced regulation of A β levels would lead to synaptic improvement. Although recent evidence indicates that leptin reduces brain amyloid burden [32], and that A β oligomers detected within plaques induce synapses [42], and memory loss in the Tg2576 mouse model [44-45], there is no confirmation of the relationship between leptin, and synaptic and memory dysfunction. Our current study uses a new approach to examine this issue based on gene therapy as a viable approach to brain delivery of leptin using a lentiviral vector [58]. Lentiviral vectors are valuable tools for neurobiology research because of their ability to transduce nondividing cells, such as neurons [91]. This *in vivo* technique ensured a stable and effective overexpression of leptin, providing a more physiologic leptin delivery than is possible with direct infusion.

Our findings indicated that gene therapy with leptin for 3 months reduced accumulation of A β deposits in APP/PS1 double-transgenic mice. HIV-leptin treatment in APP/PS1 mice showed to modulate activation of glial cells, improve synaptic status in the cerebral cortex and hippocampus, and recover spatial learning and memory, when compared with APP/PS1 mice treated with HIV-vv. The finding that leptin's effects were observed distal to the injection site (lateral ventricles) may be explained by the diffusion of leptin through the parenchyma, because expression of leptin and its downstream activator proteins were detected in these brain areas. As gene delivery vehicles, lentiviral vectors exhibit an inherent nontoxic capacity to migrate long-distances, and a remarkable ability to modulate host brain cells [21,12,14,4,58]. These results demonstrate the utility of locally elevating the expression of leptin as a potential therapeutic approach for AD.

The inhibitory effect of leptin on A β accumulation is likely attributable to its inhibition of β -amyloid precursor protein (APP) processing through the amyloidogenic pathway, modulating BACE expression, a major β -secretase involved in APP processing. In agreement with published data [22], we found a modest difference in BACE expression in APP/PS1 mice compared with non-transgenic mice. This result is not surprising, as there is a progressive age-dependent BACE expression that could be affecting the mechanism of APP processing. Whereas BACE1 levels were increased in 12-18-month-old APP/PS1 mice [81,21], no differences were observed in 6-month-old APP/PS1 mice compared with non-transgenic mice [81]. However, after 3 months of treatment with HIV-leptin, we found that BACE expression was reduced in APP/PS1 mice compared with control transgenic mice.

Astrogliosis seems to be especially abundant associated with A β plaques in the brain parenchyma [63]. Given the central role of A β in the activation of astrocytes and microglia in AD [50,64], the significant decrease in astrogliosis seen in HIV-leptin-treated APP/PS1 mice could be attributed to leptin-induced reduction of A β levels. However, it is still not clear whether the reactive astrocytes that accumulate around the A β deposits play a protective or destructive role [89]. One mechanism of reducing brain A β deposits is the degradation of A β by astroglia and microglia phagocytosis [79,78,29,88,43,39,71,24]. Interestingly, leptin treatment tended to increase the area occupied by lectin-labeled microglia, probably contributing to the removal or sequestration of the pathogenic trigger [3]. Our in vitro studies showed a concentration-dependent ability of leptin to activate microglia, in agreement with other cytokines and growth factors [35], and to modulate NO secretion. In the early stages, activated microglia releases toxic molecules, such as NO and pro-inflammatory cytokines, which may induce neurodegeneration. At the same time, these cells migrate to affected brain areas and phagocytose dead neurons and A β deposits, contributing to neuroprotection. The resulting outcome of the inflammatory process would be the combination of both effects [48]. In view of our findings, we hypothesized that HIV-leptin treatment provides local delivery of low leptin concentrations that allow a controlled and non-toxic microglial activation, which could be contributing to A β degradation.

The characteristic sequence of events associated with A β -induced neurodegeneration starts with the early loss of synaptic contacts, followed by neurite damage, neuronal degeneration, and, finally, neuronal death [84,40]. We found that synapse density was significantly decreased in the CA1 layer of the hippocampus in APP/PS1 mice, and HIV-leptin treatment partially attenuated this impairment. In support of these results, the APP/PS1 transgenic mouse

model showed a significant decrease in synaptophysin in synaptosomes compared with wild-type mice. Our experiments confirmed that A β neurotoxicity is involved in this synaptophysin down-regulation, as previously reported [1], and a reversal of this decrease was observed in the HIV-leptin-treated APP/PS1 mice. Moreover, leptin inhibits A β -driven reduction of synaptophysin via STAT3-dependent mechanism. As very recently reported, leptin also prevents the detrimental effects of A β on hippocampal long-term potentiation (LTP) via STAT3 [23]. We speculate that the neuroprotective effect of leptin against synapse loss is due to a decrease in the toxicity of A β accumulation, probably by decreasing caspase-3 expression, whose up-regulation in hippocampal CA1 dendritic spines led to a reduction in spine density [18]. Finally, there is a evidence indicating that astrocytes regulate the formation, maturation, and maintenance of synapses [34,72], thus leptin-induced down-regulation of astrocytes could be involved in the recovery of synaptic structures as well. Furthermore, inhibition of astrocytic activity results in enhanced neuronal leptin uptake and signaling [57]. In the brain of APP/PS1 mice, a discrete neuronal loss is associated with A β plaques [11]. Consistent with these findings, we observed a slight increase in cell death in our model of transgenic mice, but a significant decrease in HIV-leptin-treated APP/PS1 mice. The neuroprotective effect of leptin seen in APP/PS1 mice is in line with previous reports showing protection against A β -induced injury of primary cortical neuronal cultures triggering the STAT3-mediated signaling pathway [23,85,33].

Normal cognitive function largely depends on the proper connection between neurons. Structural changes are also thought to underlie activity-dependent synaptic plasticity, and are associated with cognitive impairment. Whereas treatment with A β reduces neurite outgrowth [1], leptin promotes neurite outgrowth in hypothalamic [10] and hippocampal neurons [56]. Recent studies have implicated a number of neurotrophins and growth factors in dendritic remodeling, which may in turn underlie their ability to modulate synaptic plasticity [25]. For instance, insulin-like growth factor-1 (IGF-1), which signals via similar signaling pathways to leptin, promotes dendritic morphogenesis in cortical neurons [55]. As in our present study, the effects of IGF-I on dendritic morphology occur on a similar time scale than those of leptin. Indeed, remodeling of cortical dendrites is evident after 24–36 h exposure to IGF-1 [55]. Therefore, we hypothesized that leptin might induce changes in neurite morphology, thereby contributing to the changes in hippocampal synaptic efficacy in AD. The finding that leptin completely antagonized the reduction in neurite length evoked by A β confirms our hypothesis.

The described effects on cognition, and synapse formation demonstrate the neuroprotective effects of growth factors in mouse models of AD. In one study, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) injected icv led to an enhancement in hippocampal synaptic density [8], while gene delivery of BDNF in rodents and primates showed to improve cognition and synaptic signaling [54]. It has been reported that direct administration of leptin into the hippocampal dentate gyrus enhances the level of LTP evoked in this brain region in rats [86]. Also, it has been demonstrated that leptin administration into the CA1 region of the hippocampus improves memory processing in mice performing T-maze foot-shock avoidance and step-down passive avoidance tests [26]. On the other hand, cognitive deficits are thought to be associated with leptin-insensitivity in rodents [46], and are also prevalent in humans with obesity-related diseases, such as type II diabetes [31]. Since the decrease in the number of synapses is less marked in leptin-treated APP/PS1 mice compared to APP/PS1, it seems that leptin could be protecting from synapse loss, or inducing synaptogenesis, thereby preventing cognitive impairment. The beneficial effect of leptin on cognitive improvement in APP/PS1 mice is likely attributable to its combined effects on the levels of toxic A β peptides, synaptic dysfunction, and neurodegeneration. However, we cannot exclude the possibility that leptin improves memory through a mechanism other than the decrease of A β accumulation, because adult neurogenesis has been proposed to mediate hippocampal-dependent learning and the therapeutic actions of antidepressants [65,70], and we have recently reported that leptin stimulates proliferation of newly formed hippocampal neurons in APP/PS1 mice [58].

In conclusion, our experimental approach using a lentiviral viral vector allows the diffusion of the therapeutic factor, leptin, in the brain of a mouse model of AD. Our study demonstrates that leptin not only can ameliorate brain A β accumulation, but also synaptic, cognitive, behavioral, and A β -induced neuronal network dysfunctions. Our findings indicate that targeting the aberrant network activity with leptin or related drugs might be of therapeutic benefit in the prevention or treatment of AD.

Acknowledgements

This work was supported by grants from *Instituto de Salud Carlos III* (PI06/0155, FIS2009/01636), *Fundación Investigación Médica Mutua Madrileña* (2008/93, 2010/0004), and *CIBERNED*.

Table 1. Amyloid levels in APP/Ps1 mice.

	Aβ₄₀ (% HIV-vv)	Aβ₄₂ (% HIV-vv)
Cerebral cortex	42.6 \pm 13.8	26.5 \pm 10.9*
Hippocampus	47.34 \pm 20.89	41.21 \pm 15.19*

Data are expressed as mean \pm S.E.M. (* p<0.05, ** p<0.01 versus HIV-vv mice).

Table 2. Number of synaptic profiles in spines and shafts in APP/PS1 mice compared with control mice.

	Control	APP/PS1
Total of synapses / μm^3	1.52 \pm 0.12	1.23 \pm 0.13
Spine synapses / μm^3	1.34 \pm 0.12	1.04 \pm 0.12
Shaft synapses / μm^3	0.17 \pm 0.01	0.20 \pm 0.02
% Spine synapses	88.40 \pm 0.66	83.94 \pm 1.30*

Data are expressed as mean \pm S.E.M. (* p<0.05, Mann Whitney U test).

Figure legends

Fig. 1 HIV-leptin treatment of APP/PS1 mice results in attenuation of spatial memory deterioration. a

Increased latencies in the spontaneous alternation of APP/PS1 mice in the T-maze were partially normalized after HIV-leptin treatment (3 months). **b** In the novel-object recognition task, recognition memory was expressed as exploratory preference in the retention test. The recognition index, representing exploratory preference, was reduced in APP/PS1 mice compared with non-transgenic mice (control), and recovered after HIV-leptin administration. Data are expressed as mean \pm SEM, * $p < 0.05$, $n = 8$ for non-transgenic control group, $n = 8$ for APP/PS1 control group, $n = 12$ for HIV-leptin -treated APP/PS1 mice. vv, void vector.

Fig. 2 HIV-leptin APP/PS1 mice exhibit reduced levels of A β deposits compared with HIV-vv APP/PS1 mice.

a Representative images of amyloid staining in cerebral cortex (upper panels), and hippocampus (bottom panel) in APP/PS1 mice treated with HIV-vv (vv) or HIV-leptin (leptin). Scale bar = 20 μ m. **b** Cerebral cortex and hippocampus A β burden is decreased in HIV-leptin -treated APP/PS1 mice. Brain A β burden represents the percentage area covered by A β immunoreactivity. **c** Representative staining of amyloid deposits (Thioflavin-S staining) showing less number of aggregates in the brain of APP/PS1 mice after HIV-leptin treatment. Scale bar = 20 μ m. **d,e** BACE1 expression is reduced in **d**) cerebral cortical and **e**) hippocampal lysates of HIV-leptin-treated APP/PS1 mice. β -actin was used as control for protein loading. Representative western blots and densitometry histograms are shown. Data are expressed as mean \pm SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $n = 8$ for non-transgenic control group, $n = 8$ for APP/PS1 control group, $n = 8$ for HIV-leptin -treated APP/PS1 mice. c, control; vv, void vector; Lep, leptin vector; Cx, cerebral cortex; Hip, hippocampus.

Fig. 3 HIV-leptin treatment results in a decrease in astrocytic reactivity in the brain of APP/PS1 mice. a

GFAP immunohistochemistry in the cerebral cortex of wild-type mice and APP/PS1 mice treated with HIV-vv and HIV-leptin. Scale bar = 20 μ m. **b** Stereological quantification of GFAP immunostaining in the cerebral cortex of the 3 experimental groups is shown. **c** Double staining of GFAP and A β plaques showed less activated astrocytes surrounding the A β plaques in the cerebral cortex of HIV-leptin-treated APP/PS1 mice than that of the HIV-vv-treated APP/PS1 mice. **d** Quantification of reactive astroglia associated with A β plaques. Data are expressed as

mean \pm SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $n = 5$ for non-transgenic control group, $n = 5$ for APP/PS1 control group, $n = 6$ for HIV-leptin-treated APP/PS1 mice. vv, void vector; Cx, cerebral cortex.

Fig. 4 HIV-leptin treatment prevents loss of synapses in the CA1 layer of hippocampus of APP/PS1 mice.

Representative photomicrographs by electron microscopy from non-transgenic mice (upper panel), HIV-vv-treated APP/PS1 mice (middle panel) and HIV-leptin-treated APP/PS1 mice (bottom panel). **a** A dendritic shaft (D) make asymmetric synapses (red arrows) with different axonic terminals (T) and, occasionally, symmetric synapses (yellow arrows). **b** Longitudinally and transversally-cut dendritic shafts (D) and asymmetric synaptic contacts (red arrows) between dendritic spines (SP) and axonic terminals (T). **c** A dendrite makes different synaptic contacts (red arrows). **d** The curved red arrow indicates how a dendritic spine develops from a dendritic shaft. **e** Asymmetric synaptic contacts between spines (SP) and terminals (T). Note different dendritic shafts, one of them is longitudinally cut where a dendritic spine forms (dashed line). **f** Asymmetric synapse between a longitudinally-cut dendrite (D) and a terminal (T). Additionally, a spine synapse (SP). Scale bar = 0.5 μm ., $n = 4$ per group.

Fig. 5 HIV-leptin treatment prevents caspase 3 activation in synaptosome preparations from APP/PS1 mice. a

Representative western blot showing the expression of procaspase-3 in cortical synaptosome preparations. Note that cleaved caspase-3 was undetectable. β -actin was used as control for protein loading. **b** Densitometric quantification of changes in procaspase-3 expression. **c** In hippocampal synaptosomes, whereas the expression of procaspase-3 was not significantly modified, cleaved caspase-3 was increased in APP/PS1 mice compared with wild-type mice, and was reduced after HIV-leptin treatment. β -actin was used as control for protein loading. **d,e** Densitometric quantification of changes in **d**) procaspase-3 expression, and **f**) cleaved caspase-3 levels in hippocampal synaptosome preparations. **e** Representative western blot and **g**) densitometric quantification of procaspase-3 expression in lysates from cerebral cortex of wild-type and APP/PS1 mice. β -actin was used as control for protein loading. **h** Cell death is reduced in the cerebral cortex of HIV-leptin-treated APP/PS1 mice. Data are expressed as mean \pm SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, # $p = 0.06$, $n = 8$ for non-transgenic control group, $n = 8$ for APP/PS1 control group, $n = 12$ for HIV-leptin-treated APP/PS1 mice. c, control; vv, void vector; Lep, leptin vector.

Fig. 6 HIV-leptin treatment prevents loss of synaptophysin in synaptosome preparations from APP/PS1 mice.

a,c Representative western blots of PSD-95, synapsin I, synaptophysin, and SNAP-25 in **a**) cortical, and **c**)

hippocampal synaptosome preparations from wild-type and APP/PS1 mice treated with HIV-vv or HIV-leptin. β -actin was used as control for protein loading. **b,d** Quantitative analysis of synaptic proteins in **b**) cortical, and **d**) hippocampal synaptosome preparations. $n = 8$ for non-transgenic control group, $n = 8$ for APP/PS1 control group, $n = 12$ for HIV-leptin-treated APP/PS1 mice. c, control; vv, void vector; Lep, leptin vector. **e** Representative western blot showing an increase in synaptophysin protein levels in neuron cultures with or without exposure to $A\beta_{42}$. Proteins were extracted 48 h after treatments. β -actin was used as control for protein loading. **f** Quantitative analysis of the effects of leptin and $A\beta_{42}$ on synaptophysin levels. Data are expressed as mean \pm SEM, $*p < 0.05$, $n = 3$ independent experiments. LP, leptin.

Fig. 7 Effects of inhibition of STAT3 on leptin-induced synaptophysin modulation. **a** Representative western blot showing phosphorylated STAT3 and synaptophysin in cultured cortical neurons stimulated with leptin or $A\beta_{42}$. **b** Densitometric quantification of phospho-STAT3. **c**, Representative western blot showing that pretreatment with various concentrations of cucurbitacin I (0.1-10 nM) blocked phosphorylation of STAT3. **d,e**, Representative **d**) western blots, and **e**) densitometric analysis revealing that cucurbitacin I-induced blockage of phospho-STAT3 attenuated the leptin-induced increase in synaptophysin expression. Data are expressed as mean \pm SEM, $*p < 0.05$, $n = 3$ independent experiments. LP, leptin.

Fig. 8 Leptin prevents the reduction in neurite length evoked by $A\beta$ in cortical neuronal cultures. **a,b** Representative immunofluorescence images of calbindin neurons **a**) 18 h, and **b**) 36 h after leptin or $A\beta_{42}$ treatments. **c,d** Total neurite length, and neurite length of each order (primary, secondary and \geq tertiary neurites) were estimated in photomicrographs of calbindin neurons **c**) 18 h, and **d**) 36 h after treatments, and using a stereological procedure. Data are expressed as mean \pm SEM, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $n = 3$ independent experiments.

Fig. 9 Leptin prevents the reduction in neurite length evoked by $A\beta$ in hippocampal neuronal cultures. **a,b** Representative immunofluorescence images of calbindin neurons **a**) 18 h, and **b**) 36 h after leptin or $A\beta_{42}$ treatments. **c,d** Total neurite length, and neurite length of each order (primary, secondary and \geq tertiary neurites) were estimated in photomicrographs of calbindin neurons **c**) 18 h, and **d**) 36 h after treatments, and using a stereological procedure. Data are expressed as mean \pm SEM, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $n = 3$ independent experiments.

Suppl. Figure legends

Fig S1 Morphological analysis of neurite outgrowth. The images shown represent the method used to number the neurite order, as described in detail in Materials and Methods. **a** The image taken from a calbindin-positive neuron **b**) was converted to grey scale **c**) and the tracings were made for primary (red), secondary (blue), tertiary (yellow) and quaternary (pink) neurites.

Fig. S2 Expression and signaling of leptin delivery by HIV-leptin in the brain of APP/PS1 mice. **a** Detection of HA (in green) in the choroid plexus after icv injection of HIV-leptin in APP/PS1 mice at 3 months. **b** Detection of HA (in green) in the cerebral cortex after icv injection of HIV-leptin in APP/PS1 mice at 3 months. Note the absence of HA-staining in empty vector-treated APP/PS1 mice. **c** Double immunofluorescence of calbindin (red) and HA (green) in cells located in cerebral cortex of HIV-leptin-treated APP/PS1 mice. Note the high magnification view of a calbindin-positive cell expressing HA. **d,e** Representative western blots and densitometric quantification showing phosphorylated STAT3 in **d**) cerebral cortex, and **e**) hippocampus of wild-type and APP/PS1 mice treated with HIV-vv or HIV-leptin. Data are expressed as mean \pm SEM, * $p < 0.05$, $n = 12$ for APP/PS1 control group, $n = 12$ for HIV-leptin -treated APP/PS1 mice. vv, void vector.

Fig. S3 Expression of synaptic proteins in untreated and HIV-vv treated APP/PS1 mice. **a,b** Representative Western blot of synapsin I and synaptophysin in **a**) cortical, and **b**) hippocampal lysates of untreated (sham) and HIV-vv treated APP/PS1 mice. Densitometric quantification of synapsin I and synaptophysin protein levels revealed no changes between groups. Data are expressed as mean \pm SEM, $n = 4$ mice per group. vv, void vector.

Fig. S4 Leptin modulates *in vivo* and *in vitro* microglial activity. **a** Representative immunostaining of lectin-labeled microglia in cerebral cortex (upper panels), and hippocampus (bottom panel) of APP/PS1 mice treated with HIV-vv or HIV-leptin. **b** Quantification of microglia volume in cerebral cortex, and hippocampus. **c**) LPS, and leptin increase mitochondrial activity in microglial cell culture in a concentration-dependent manner (2.5-10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). **d**) LPS, and leptin increase nitrite generation in microglial cell culture in a concentration-dependent manner (5-10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). **e**) Leptin decreased LPS-induced nitrite generation in microglial cell cultures. Data are expressed as mean \pm SEM, $n = 8$ for APP/PS1 control group, $n = 8$ for HIV-leptin -treated APP/PS1 mice. LP, leptin; LPS,

lipopolysaccharide; NO, nitric oxid; MTT, (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). *p < 0.05 vs control; **p < 0.01 vs control; *** p < 0.001 vs control ; ## p < 0.01 vs LPS.

REFERENCES

1. Abad MA, Enguita M, DeGregorio-Rocasolano N, Ferrer I, Trullas R (2006) Neuronal pentraxin 1 contributes to the neuronal damage evoked by amyloid-beta and is overexpressed in dystrophic neurites in Alzheimer's brain. *J Neurosci* 26 (49):12735-12747. doi:26/49/12735 [pii] 10.1523/JNEUROSCI.0575-06.2006
2. Alvira-Botero X, Perez-Gonzalez R, Spuch C, Vargas T, Antequera D, Garzon M, Bermejo-Pareja F, Carro E (2010) Megalin interacts with APP and the intracellular adapter protein FE65 in neurons. *Mol Cell Neurosci* 45 (3):306-315. doi:S1044-7431(10)00169-7 [pii] 10.1016/j.mcn.2010.07.005
3. Andersen JK (2004) Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* 10 Suppl:S18-25. doi:10.1038/nrn1434 nrn1434 [pii]
4. Antequera D, Vargas T, Ugalde C, Spuch C, Molina JA, Ferrer I, Bermejo-Pareja F, Carro E (2009) Cytoplasmic gelsolin increases mitochondrial activity and reduces Abeta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 36 (1):42-50. doi:S0969-9961(09)00162-4 [pii] 10.1016/j.nbd.2009.06.018
5. Arendt T, Zvegintseva HG, Leontovich TA (1986) Dendritic changes in the basal nucleus of Meynert and in the diagonal band nucleus in Alzheimer's disease--a quantitative Golgi investigation. *Neuroscience* 19 (4):1265-1278
6. Asakawa A, Inui A, Inui T, Katsuura G, Fujino MA, Kasuga M (2003) Leptin treatment ameliorates anxiety in ob/ob obese mice. *J Diabetes Complications* 17 (2):105-107. doi:S105687270200185X [pii]
7. Block ML, Hong JS (2005) Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol* 76 (2):77-98. doi:S0301-0082(05)00067-5 [pii] 10.1016/j.pneurobio.2005.06.004
8. Blurton-Jones M, Kitazawa M, Martinez-Coria H, Castello NA, Muller FJ, Loring JF, Yamasaki TR, Poon WW, Green KN, LaFerla FM (2009) Neural stem cells improve cognition via BDNF in a transgenic model of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (32):13594-13599. doi:0901402106 [pii] 10.1073/pnas.0901402106
9. Bornemann KD, Wiederhold KH, Pauli C, Ermini F, Stalder M, Schnell L, Sommer B, Jucker M, Staufenbiel M (2001) Abeta-induced inflammatory processes in microglia cells of APP23 transgenic mice. *Am J Pathol* 158 (1):63-73. doi:S0002-9440(10)63945-4 [pii]
10. Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB (2004) Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* 304 (5667):108-110
11. Calhoun ME, Wiederhold KH, Abramowski D, Phinney AL, Probst A, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Sommer B, Jucker M (1998) Neuron loss in APP transgenic mice. *Nature* 395 (6704):755-756. doi:10.1038/27351
12. Carro E, Spuch C, Trejo JL, Antequera D, Torres-Aleman I (2005) Choroid plexus megalin is involved in neuroprotection by serum insulin-like growth factor I. *J Neurosci* 25 (47):10884-10893. doi:25/47/10884 [pii] 10.1523/JNEUROSCI.2909-05.2005
13. Carro E, Trejo JL, Gomez-Isla T, LeRoith D, Torres-Aleman I (2002) Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. *Nat Med* 8 (12):1390-1397. doi:10.1038/nm793 nm793 [pii]

14. Carro E, Trejo JL, Spuch C, Bohl D, Heard JM, Torres-Aleman I (2006) Blockade of the insulin-like growth factor I receptor in the choroid plexus originates Alzheimer's-like neuropathology in rodents: new cues into the human disease? *Neurobiol Aging* 27 (11):1618-1631. doi:S0197-4580(05)00309-X [pii]
10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.039
15. Carro EM (2009) Therapeutic approaches of leptin in Alzheimer's disease. *Recent Pat CNS Drug Discov* 4 (3):200-208. doi:RPCN-ABS-01 [pii]
16. Coleman PD, Yao PJ (2003) Synaptic slaughter in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 24 (8):1023-1027. doi:S0197458003002021 [pii]
17. Crews L, Masliah E (2010) Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 19 (R1):R12-20. doi:ddq160 [pii]
10.1093/hmg/ddq160
18. D'Amelio M, Cavallucci V, Middei S, Marchetti C, Pacioni S, Ferri A, Diamantini A, De Zio D, Carrara P, Battistini L, Moreno S, Bacci A, Ammassari-Teule M, Marie H, Cecconi F (2011) Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 14 (1):69-76. doi:nn.2709 [pii]
10.1038/nn.2709
19. Deacon RM, Rawlins JN (2006) T-maze alternation in the rodent. *Nat Protoc* 1 (1):7-12. doi:nprot.2006.2 [pii]
10.1038/nprot.2006.2
20. Dewachter I, Reverse D, Caluwaerts N, Ris L, Kuiperi C, Van den Haute C, Spittaels K, Umans L, Serneels L, Thiry E, Moechars D, Mercken M, Godaux E, Van Leuven F (2002) Neuronal deficiency of presenilin 1 inhibits amyloid plaque formation and corrects hippocampal long-term potentiation but not a cognitive defect of amyloid precursor protein [V717I] transgenic mice. *J Neurosci* 22 (9):3445-3453. doi:20026290
22/9/3445 [pii]
21. Dietrich MO, Spuch C, Antequera D, Rodal I, de Yébenes JG, Molina JA, Bermejo F, Carro E (2008) Megalin mediates the transport of leptin across the blood-CSF barrier. *Neurobiol Aging* 29 (6):902-912
22. Ding Y, Qiao A, Wang Z, Goodwin JS, Lee ES, Block ML, Allsbrook M, McDonald MP, Fan GH (2008) Retinoic acid attenuates beta-amyloid deposition and rescues memory deficits in an Alzheimer's disease transgenic mouse model. *J Neurosci* 28 (45):11622-11634. doi:28/45/11622 [pii]
10.1523/JNEUROSCI.3153-08.2008
23. Doherty GH, Beccano-Kelly D, Yan SD, Gunn-Moore FJ, Harvey J (2013) Leptin prevents hippocampal synaptic disruption and neuronal cell death induced by amyloid beta. *Neurobiol Aging* 34 (1):226-237. doi:S0197-4580(12)00425-3 [pii]
10.1016/j.neurobiolaging.2012.08.003
24. El Khoury J, Toft M, Hickman SE, Means TK, Terada K, Geula C, Luster AD (2007) Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nat Med* 13 (4):432-438. doi:nm1555 [pii]
10.1038/nm1555
25. Ethell IM, Pasquale EB (2005) Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling. *Prog Neurobiol* 75 (3):161-205. doi:S0301-0082(05)00014-6 [pii]
10.1016/j.pneurobio.2005.02.003
26. Farr SA, Banks WA, Morley JE (2006) Effects of leptin on memory processing. *Peptides* 27 (6):1420-1425
27. Fewlass DC, Noboa K, Pi-Sunyer FX, Johnston JM, Yan SD, Tezapsidis N (2004) Obesity-related leptin regulates Alzheimer's A β . *FASEB J* 18 (15):1870-1878. doi:18/15/1870 [pii]

10.1096/fj.04-2572com

28. Friedman JM (1998) Leptin, leptin receptors, and the control of body weight. *Nutr Rev* 56 (2 Pt 2):s38-46; discussion s54-75
29. Fuhrmann M, Bittner T, Jung CK, Burgold S, Page RM, Mitteregger G, Haass C, LaFerla FM, Kretzschmar H, Herms J (2010) Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 13 (4):411-413. doi:nn.2511 [pii]
10.1038/nn.2511
30. Garza JC, Guo M, Zhang W, Lu XY (2008) Leptin increases adult hippocampal neurogenesis in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 283 (26):18238-18247
31. Gispen WH, Biessels GJ (2000) Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci* 23 (11):542-549. doi:S0166-2236(00)01656-8 [pii]
32. Greco SJ, Bryan KJ, Sarkar S, Zhu X, Smith MA, Ashford JW, Johnston JM, Tezapsidis N, Casadesus G (2010) Leptin reduces pathology and improves memory in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 19 (4):1155-1167. doi:075885178N117810 [pii]
10.3233/JAD-2010-1308
33. Guo Z, Jiang H, Xu X, Duan W, Mattson MP (2008) Leptin-mediated cell survival signaling in hippocampal neurons mediated by JAK STAT3 and mitochondrial stabilization. *J Biol Chem* 283 (3):1754-1763. doi:M703753200 [pii]
10.1074/jbc.M703753200
34. Gyls KH, Fein JA, Yang F, Wiley DJ, Miller CA, Cole GM (2004) Synaptic changes in Alzheimer's disease: increased amyloid-beta and gliosis in surviving terminals is accompanied by decreased PSD-95 fluorescence. *Am J Pathol* 165 (5):1809-1817. doi:S0002-9440(10)63436-0 [pii]
35. Hanisch UK, Kettenmann H (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10 (11):1387-1394. doi:nn1997 [pii]
10.1038/nn1997
36. Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297 (5580):353-356. doi:10.1126/science.1072994
297/5580/353 [pii]
37. Hsieh H, Boehm J, Sato C, Iwatsubo T, Tomita T, Sisodia S, Malinow R (2006) AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron* 52 (5):831-843. doi:S0896-6273(06)00872-5 [pii]
10.1016/j.neuron.2006.10.035
38. Ivins KJ, Bui ET, Cotman CW (1998) Beta-amyloid induces local neurite degeneration in cultured hippocampal neurons: evidence for neuritic apoptosis. *Neurobiol Dis* 5 (5):365-378. doi:S0969-9961(98)90228-5 [pii]
10.1006/nbdi.1998.0228
39. Kakimura J, Kitamura Y, Takata K, Umeki M, Suzuki S, Shibagaki K, Taniguchi T, Nomura Y, Gebicke-Haerter PJ, Smith MA, Perry G, Shimohama S (2002) Microglial activation and amyloid-beta clearance induced by exogenous heat-shock proteins. *FASEB J* 16 (6):601-603
40. Klein WL (2002) Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem Int* 41 (5):345-352. doi:S0197018602000505 [pii]
41. Knafo S, Alonso-Nanclares L, Gonzalez-Soriano J, Merino-Serrais P, Fernaud-Espinosa I, Ferrer I, DeFelipe J (2009) Widespread changes in dendritic spines in a model of Alzheimer's disease. *Cereb Cortex* 19 (3):586-592. doi:bhn111 [pii]
10.1093/cercor/bhn111
42. Koffie RM, Meyer-Luehmann M, Hashimoto T, Adams KW, Mielke ML, Garcia-Alloza M, Micheva KD, Smith SJ, Kim ML, Lee VM, Hyman BT, Spires-Jones TL (2009) Oligomeric amyloid beta associates

- with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (10):4012-4017. doi:0811698106 [pii]
10.1073/pnas.0811698106
43. Koistinaho M, Lin S, Wu X, Esterman M, Koger D, Hanson J, Higgs R, Liu F, Malkani S, Bales KR, Paul SM (2004) Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-beta peptides. *Nat Med* 10 (7):719-726. doi:10.1038/nm1058
nm1058 [pii]
44. Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH (2006) A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440 (7082):352-357. doi:nature04533 [pii]
10.1038/nature04533
45. Lesne S, Kotilinek L, Ashe KH (2008) Plaque-bearing mice with reduced levels of oligomeric amyloid-beta assemblies have intact memory function. *Neuroscience* 151 (3):745-749. doi:S0306-4522(07)01353-X [pii]
10.1016/j.neuroscience.2007.10.054
46. Li XL, Aou S, Oomura Y, Hori N, Fukunaga K, Hori T (2002) Impairment of long-term potentiation and spatial memory in leptin receptor-deficient rodents. *Neuroscience* 113 (3):607-615
47. Lu XY, Kim CS, Frazer A, Zhang W (2006) Leptin: a potential novel antidepressant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (5):1593-1598
48. Martin-Moreno AM, Reigada D, Ramirez BG, Mechoulam R, Innamorato N, Cuadrado A, de Ceballos ML (2011) Cannabidiol and other cannabinoids reduce microglial activation in vitro and in vivo: relevance to Alzheimer's disease. *Mol Pharmacol* 79 (6):964-973. doi:mol.111.071290 [pii]
10.1124/mol.111.071290
49. Marwarha G, Dasari B, Prasanthi JR, Schommer J, Ghribi O (2010) Leptin reduces the accumulation of Abeta and phosphorylated tau induced by 27-hydroxycholesterol in rabbit organotypic slices. *J Alzheimers Dis* 19 (3):1007-1019. doi:L3TP53132069X527 [pii]
10.3233/JAD-2010-1298
50. Matsuoka Y, Picciano M, Malester B, LaFrancois J, Zehr C, Daeschner JM, Olschowka JA, Fonseca MI, O'Banion MK, Tenner AJ, Lemere CA, Duff K (2001) Inflammatory responses to amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 158 (4):1345-1354. doi:S0002-9440(10)64085-0 [pii]
10.1016/S0002-9440(10)64085-0
51. McGeer EG, McGeer PL (1999) Brain inflammation in Alzheimer disease and the therapeutic implications. *Curr Pharm Des* 5 (10):821-836
52. Moolman DL, Vitolo OV, Vonsattel JP, Shelanski ML (2004) Dendrite and dendritic spine alterations in Alzheimer models. *J Neurocytol* 33 (3):377-387. doi:5384741 [pii]
10.1023/B:NEUR.0000044197.83514.64
53. Myers MG, Cowley MA, Munzberg H (2008) Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu Rev Physiol* 70:537-556. doi:10.1146/annurev.physiol.70.113006.100707
54. Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, Tsukada S, Schroeder BE, Shaked GM, Wang L, Blesch A, Kim A, Conner JM, Rockenstein E, Chao MV, Koo EH, Geschwind D, Masliah E, Chiba AA, Tuszynski MH (2009) Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nat Med* 15 (3):331-337. doi:nm.1912 [pii]
10.1038/nm.1912
55. Niblock MM, Brunso-Bechtold JK, Riddle DR (2000) Insulin-like growth factor I stimulates dendritic growth in primary somatosensory cortex. *J Neurosci* 20 (11):4165-4176. doi:20/11/4165 [pii]
56. O'Malley D, MacDonald N, Mizielinska S, Connolly CN, Irving AJ, Harvey J (2007) Leptin promotes rapid dynamic changes in hippocampal dendritic morphology. *Mol Cell Neurosci* 35 (4):559-572

57. Pan W, Hsueh H, Xu C, Wu X, Bouret SG, Kastin AJ (2011) Astrocytes modulate distribution and neuronal signaling of leptin in the hypothalamus of obese A^{vy} mice. *J Mol Neurosci* 43 (3):478-484. doi:10.1007/s12031-010-9470-6
58. Perez-Gonzalez R, Antequera D, Vargas T, Spuch C, Bolos M, Carro E (2011) Leptin induces proliferation of neuronal progenitors and neuroprotection in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 24 Suppl 2:17-25. doi:V314T66513431260 [pii]
10.3233/JAD-2011-102070
59. Peters A, Palay SL, de Webster H (1991) The fine structure of the nervous system. New York: Oxford University Press Neurons and their supporting cells.
60. Pinto S, Roseberry AG, Liu H, Diano S, Shanabrough M, Cai X, Friedman JM, Horvath TL (2004) Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science* 304 (5667):110-115
61. Power DA, Noel J, Collins R, O'Neill D (2001) Circulating leptin levels and weight loss in Alzheimer's disease patients. *Dement Geriatr Cogn Disord* 12 (2):167-170. doi:51252 [pii]
51252
62. Ramirez BG, Blazquez C, Gomez del Pulgar T, Guzman M, de Ceballos ML (2005) Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *J Neurosci* 25 (8):1904-1913. doi:25/8/1904 [pii]
10.1523/JNEUROSCI.4540-04.2005
63. Richards JG, Higgins GA, Ouagazzal AM, Ozmen L, Kew JN, Bohrmann B, Malherbe P, Brockhaus M, Loetscher H, Czech C, Huber G, Bluethmann H, Jacobsen H, Kemp JA (2003) PS2APP transgenic mice, coexpressing hPS2mut and hAPPswe, show age-related cognitive deficits associated with discrete brain amyloid deposition and inflammation. *J Neurosci* 23 (26):8989-9003. doi:23/26/8989 [pii]
64. Rozemuller AJ, van Gool WA, Eikelenboom P (2005) The neuroinflammatory response in plaques and amyloid angiopathy in Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4 (3):223-233
65. Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301 (5634):805-809. doi:10.1126/science.1083328
301/5634/805 [pii]
66. Selkoe DJ (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81 (2):741-766
67. Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ (2008) Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 14 (8):837-842. doi:nm1782 [pii]
10.1038/nm1782
68. Shanley LJ, Irving AJ, Harvey J (2001) Leptin enhances NMDA receptor function and modulates hippocampal synaptic plasticity. *J Neurosci* 21 (24):RC186
69. Sharma AN, Elased KM, Garrett TL, Lucot JB (2010) Neurobehavioral deficits in db/db diabetic mice. *Physiol Behav* 101 (3):381-388. doi:S0031-9384(10)00257-X [pii]
10.1016/j.physbeh.2010.07.002
70. Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E (2001) Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410 (6826):372-376
71. Simard AR, Soulet D, Gowing G, Julien JP, Rivest S (2006) Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron* 49 (4):489-502. doi:S0896-6273(06)00075-4 [pii]
10.1016/j.neuron.2006.01.022

72. Slezak M, Pfrieger FW (2003) New roles for astrocytes: regulation of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci* 26 (10):531-535. doi:S0166-2236(03)00258-3 [pii]
10.1016/j.tins.2003.08.005
73. Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, Nairn AC, Salter MW, Lombroso PJ, Gouras GK, Greengard P (2005) Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci* 8 (8):1051-1058. doi:nn1503 [pii]
10.1038/nn1503
74. Spires-Jones TL, Meyer-Luehmann M, Osetek JD, Jones PB, Stern EA, Bacskai BJ, Hyman BT (2007) Impaired spine stability underlies plaque-related spine loss in an Alzheimer's disease mouse model. *Am J Pathol* 171 (4):1304-1311. doi:S0002-9440(10)62393-0 [pii]
10.2353/ajpath.2007.070055
75. Spires TL, Meyer-Luehmann M, Stern EA, McLean PJ, Skoch J, Nguyen PT, Bacskai BJ, Hyman BT (2005) Dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy. *J Neurosci* 25 (31):7278-7287. doi:25/31/7278 [pii]
10.1523/JNEUROSCI.1879-05.2005
76. Spuch C, Antequera D, Portero A, Orive G, Hernandez RM, Molina JA, Bermejo-Pareja F, Pedraz JL, Carro E (2010) The effect of encapsulated VEGF-secreting cells on brain amyloid load and behavioral impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Biomaterials* 31 (21):5608-5618. doi:S0142-9612(10)00413-8 [pii]
10.1016/j.biomaterials.2010.03.042
77. Stewart S, Cacucci F, Lever C (2011) Which memory task for my mouse? A systematic review of spatial memory performance in the Tg2576 Alzheimer's mouse model. *J Alzheimers Dis* 26 (1):105-126. doi:L86652J57223H660 [pii]
10.3233/JAD-2011-101827
78. Takata K, Kitamura Y, Saeki M, Terada M, Kagitani S, Kitamura R, Fujikawa Y, Maelicke A, Tomimoto H, Taniguchi T, Shimohama S (2010) Galantamine-induced amyloid- β clearance mediated via stimulation of microglial nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* 285 (51):40180-40191. doi:M110.142356 [pii]
10.1074/jbc.M110.142356
79. Takata K, Kitamura Y, Yanagisawa D, Morikawa S, Morita M, Inubushi T, Tsuchiya D, Chishiro S, Saeki M, Taniguchi T, Shimohama S, Tooyama I (2007) Microglial transplantation increases amyloid-beta clearance in Alzheimer model rats. *FEBS Lett* 581 (3):475-478. doi:S0014-5793(07)00030-0 [pii]
10.1016/j.febslet.2007.01.009
80. Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R (1991) Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 30 (4):572-580. doi:10.1002/ana.410300410
81. Torres M, Jimenez S, Sanchez-Varo R, Navarro V, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Carmona I, Davila JC, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J (2012) Defective lysosomal proteolysis and axonal transport are early pathogenic events that worsen with age leading to increased APP metabolism and synaptic Abeta in transgenic APP/PS1 hippocampus. *Mol Neurodegener* 7 (1):59. doi:1750-1326-7-59 [pii]
10.1186/1750-1326-7-59
82. Trinchese F, Liu S, Battaglia F, Walter S, Mathews PM, Arancio O (2004) Progressive age-related development of Alzheimer-like pathology in APP/PS1 mice. *Ann Neurol* 55 (6):801-814. doi:10.1002/ana.20101

83. Tsai J, Grutzendler J, Duff K, Gan WB (2004) Fibrillar amyloid deposition leads to local synaptic abnormalities and breakage of neuronal branches. *Nat Neurosci* 7 (11):1181-1183. doi:nn1335 [pii]
10.1038/nn1335
84. Walsh DM, Selkoe DJ (2004) Oligomers on the brain: the emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration. *Protein Pept Lett* 11 (3):213-228
85. Wan J, Fu AK, Ip FC, Ng HK, Hugon J, Page G, Wang JH, Lai KO, Wu Z, Ip NY (2010) Tyk2/STAT3 signaling mediates beta-amyloid-induced neuronal cell death: implications in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 30 (20):6873-6881. doi:30/20/6873 [pii]
10.1523/JNEUROSCI.0519-10.2010
86. Wayner MJ, Armstrong DL, Phelix CF, Oomura Y (2004) Orexin-A (Hypocretin-1) and leptin enhance LTP in the dentate gyrus of rats in vivo. *Peptides* 25 (6):991-996.
doi:10.1016/j.peptides.2004.03.018
S0196978104001524 [pii]
87. Weng Z, Signore AP, Gao Y, Wang S, Zhang F, Hastings T, Yin XM, Chen J (2007) Leptin protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic cell death via mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* 282 (47):34479-34491
88. Wyss-Coray T, Loike JD, Brionne TC, Lu E, Anankov R, Yan F, Silverstein SC, Husemann J (2003) Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med* 9 (4):453-457.
doi:10.1038/nm838
nm838 [pii]
89. Wyss-Coray T, Mucke L (2002) Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron* 35 (3):419-432. doi:S0896627302007948 [pii]
90. Zhang H, Gong B, Liu S, Fa M, Ninan I, Staniszewski A, Arancio O (2005) Synaptic fatigue is more pronounced in the APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2 (2):137-140
91. Zhang Y, Wang H, Pan H, Bao X, Li M, Jin J, Wu X (2006) Gene delivery into primary cerebral cortical neurons by lentiviral vector. *Cell Biol Int* 30 (10):777-783. doi:S1065-6995(06)00130-2 [pii]
10.1016/j.cellbi.2006.05.010

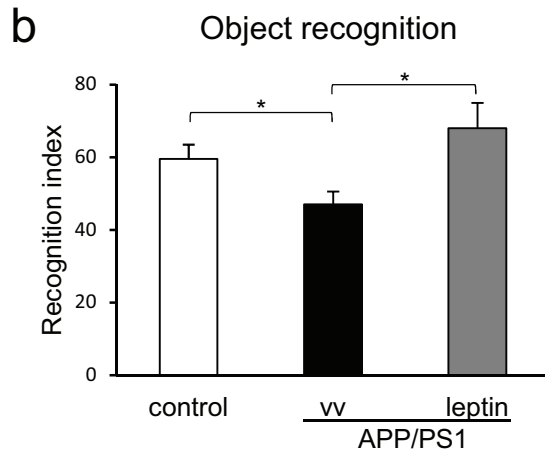
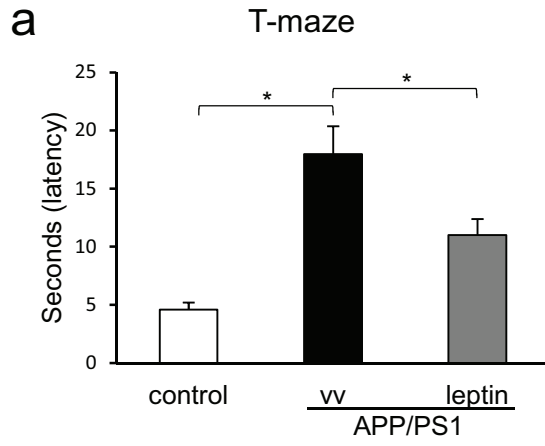


Fig. 1

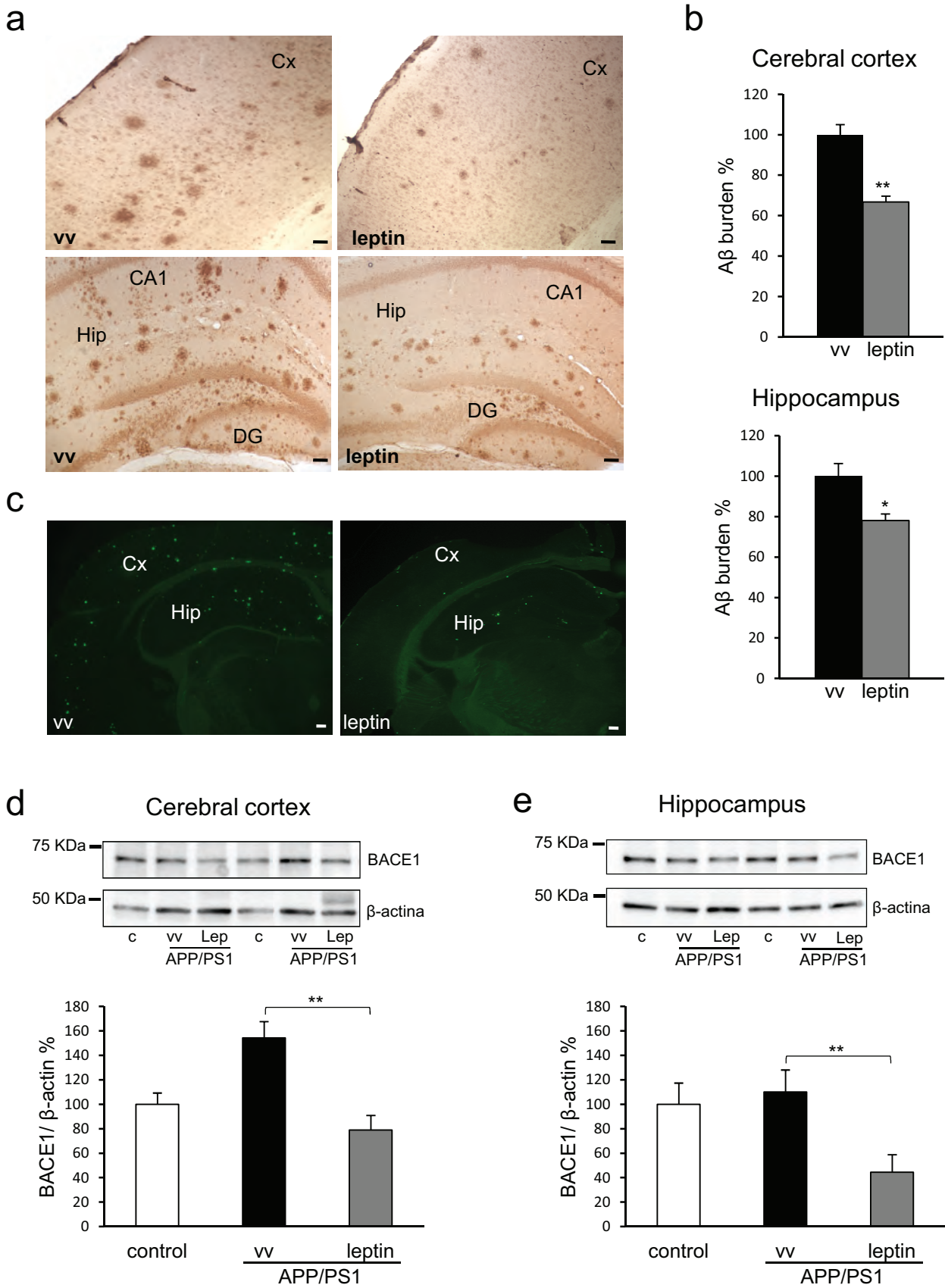


Fig. 2

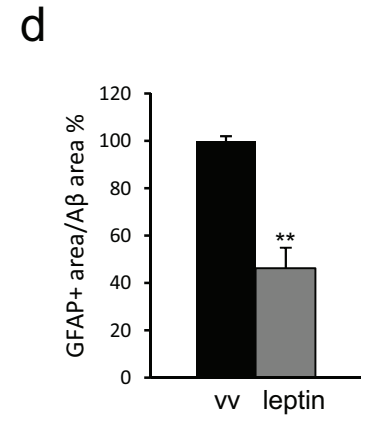
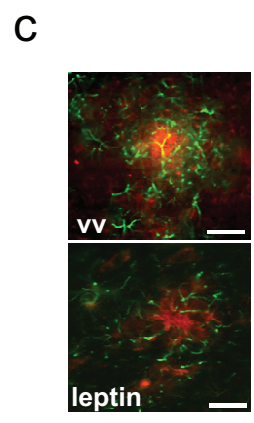
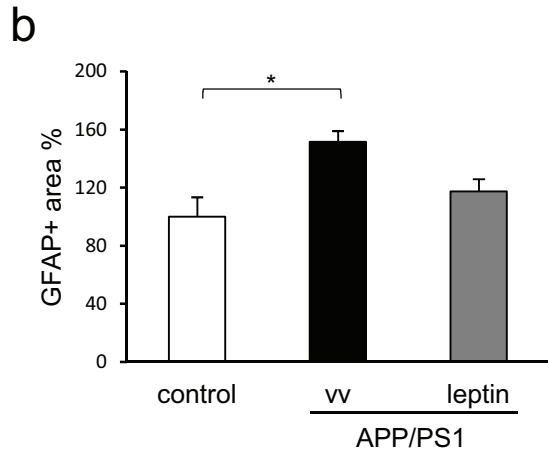
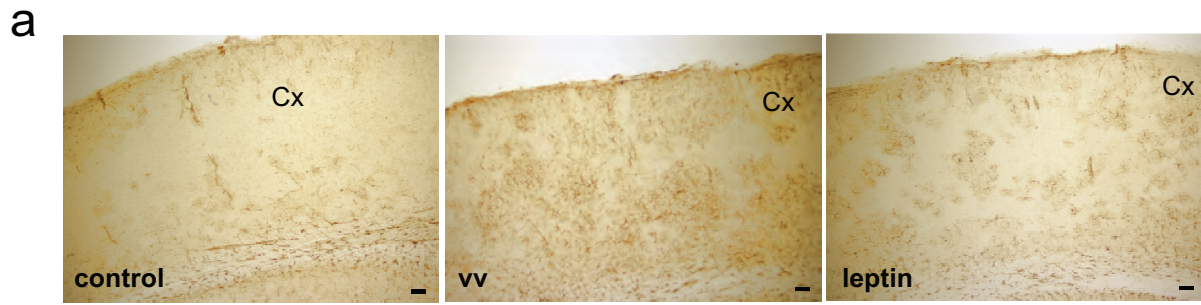


Fig. 3

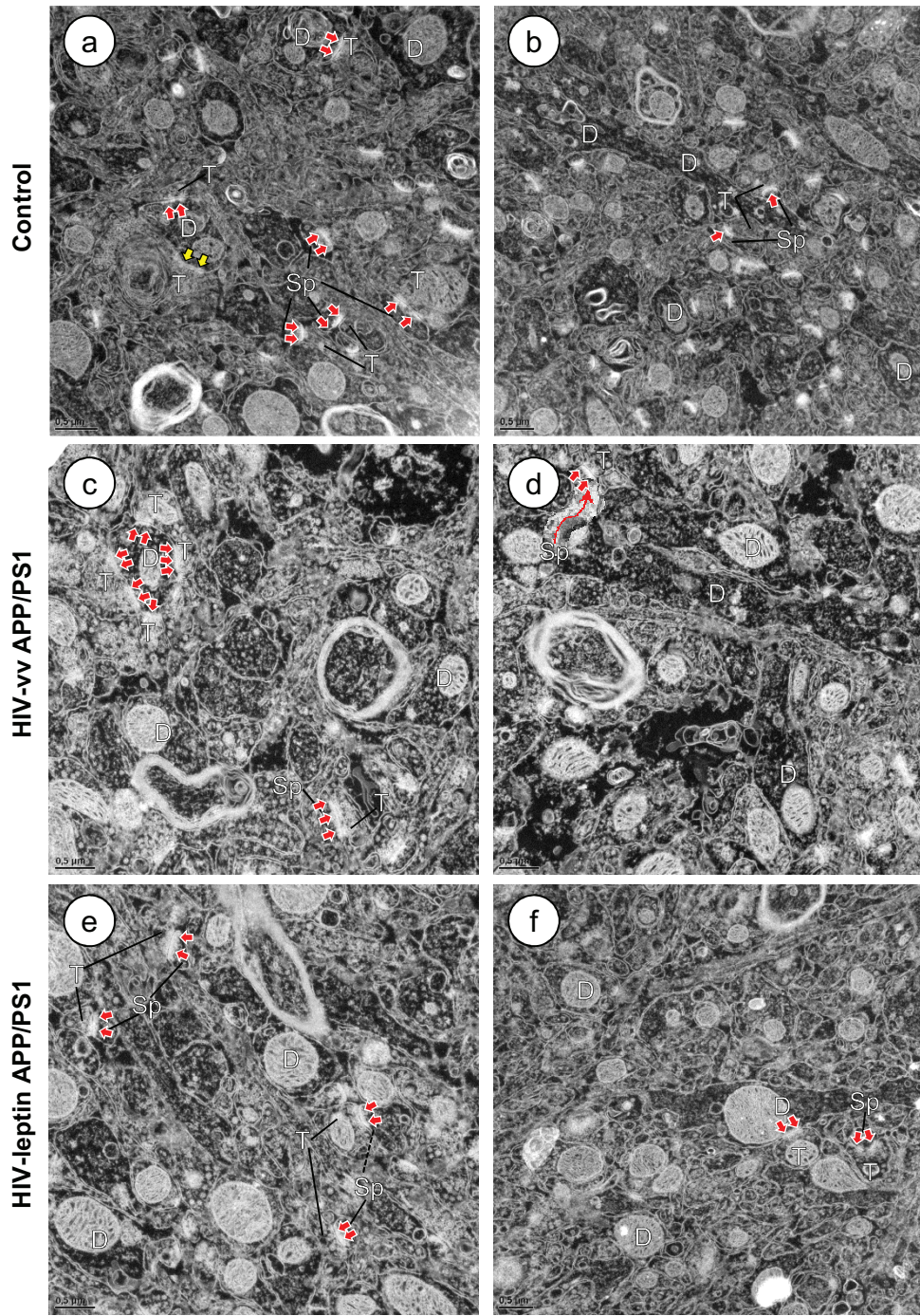


Fig. 4

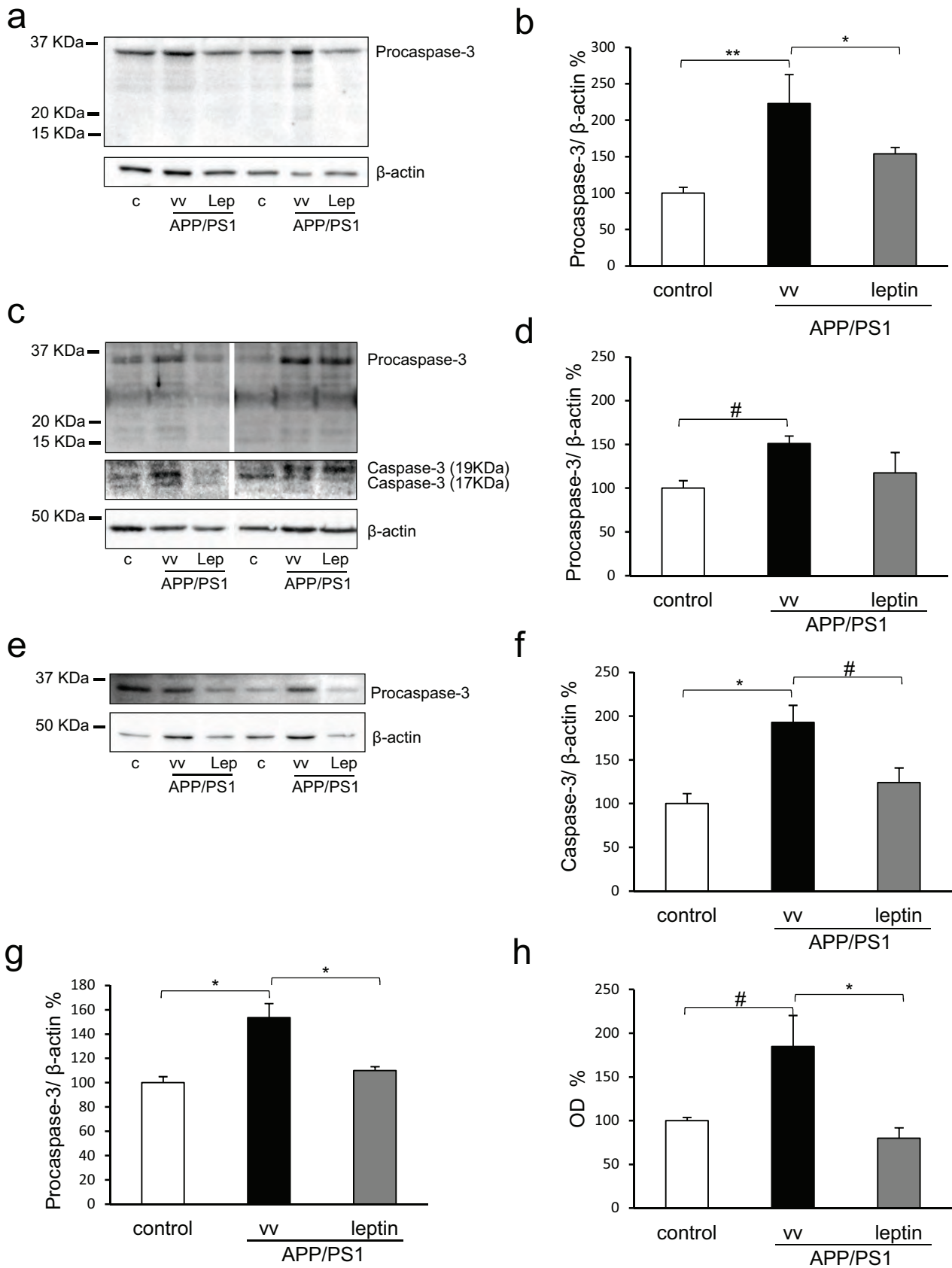


Fig. 5

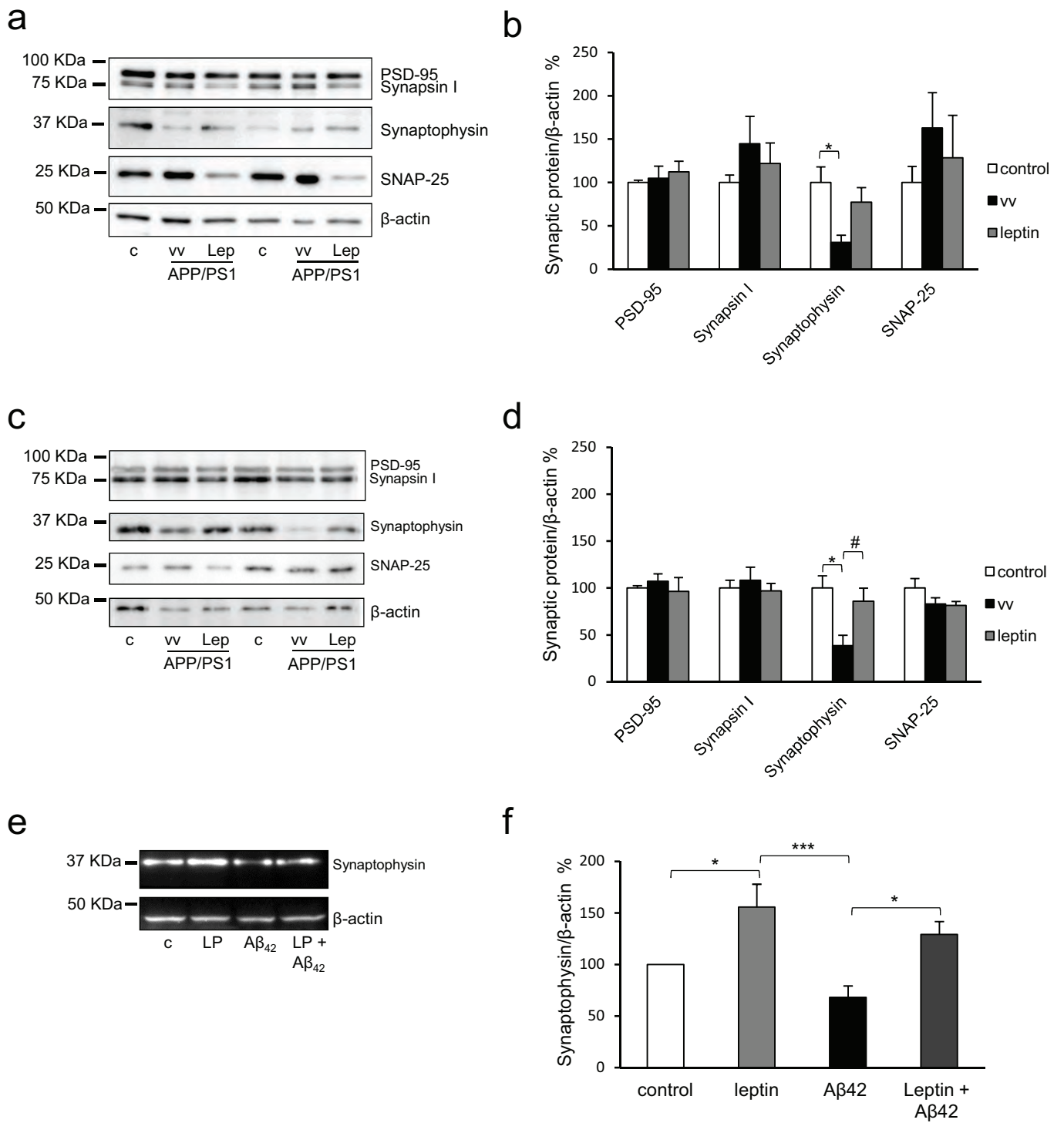


Fig. 6

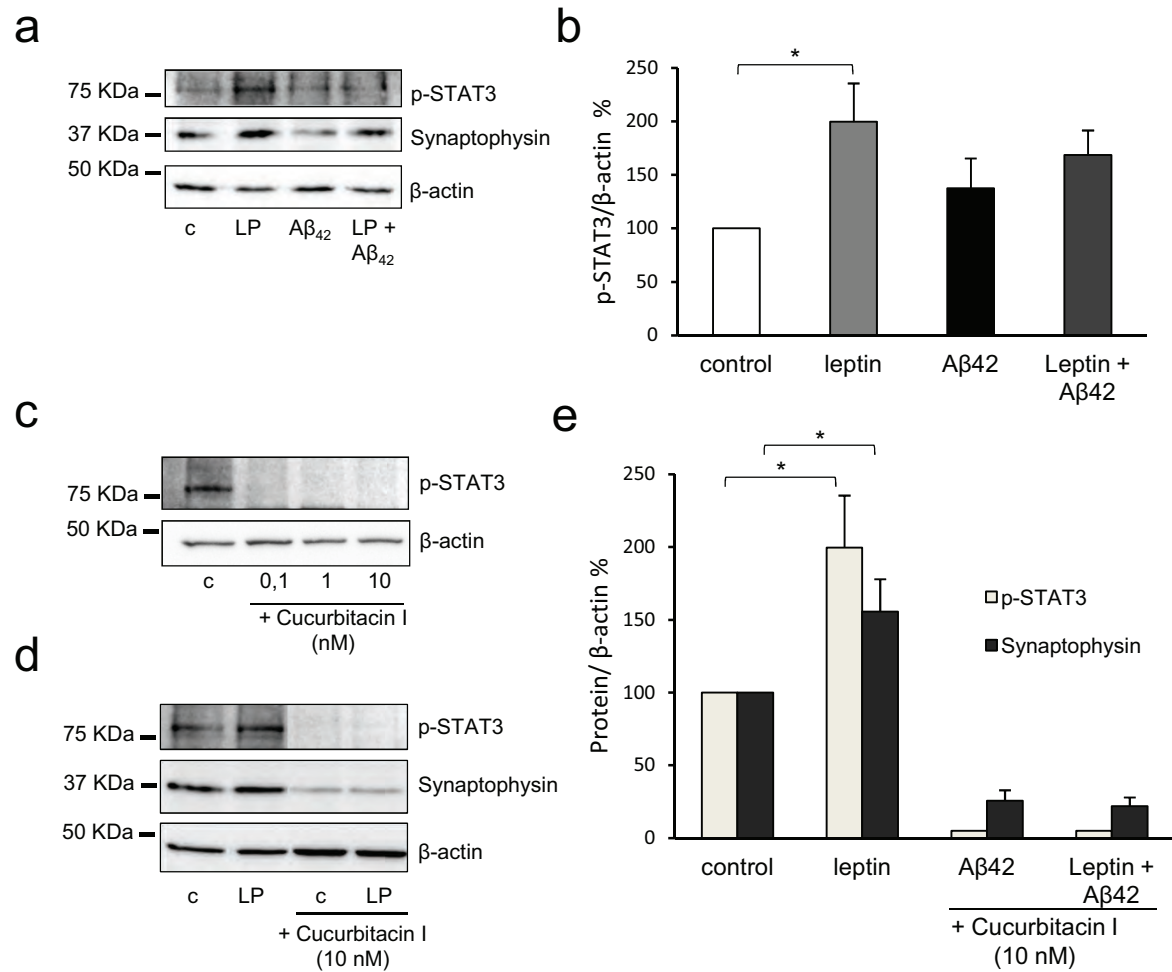


Fig. 7

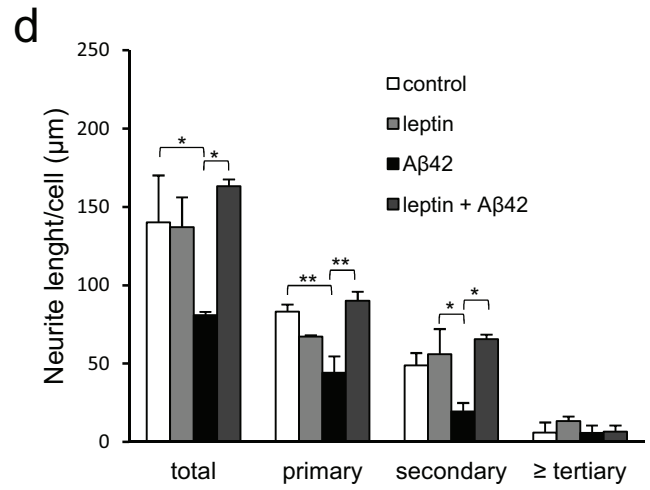
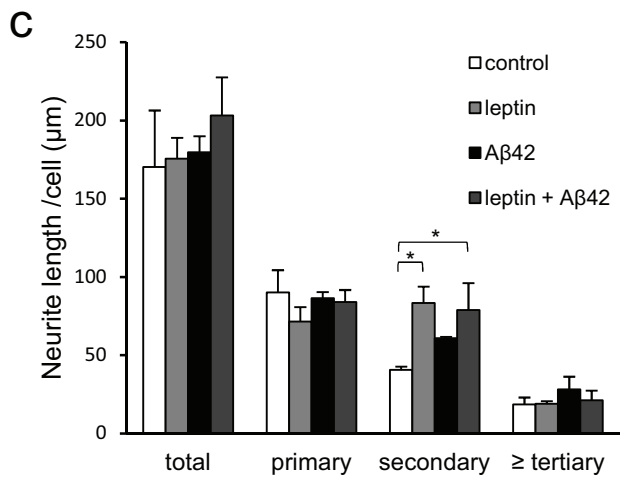
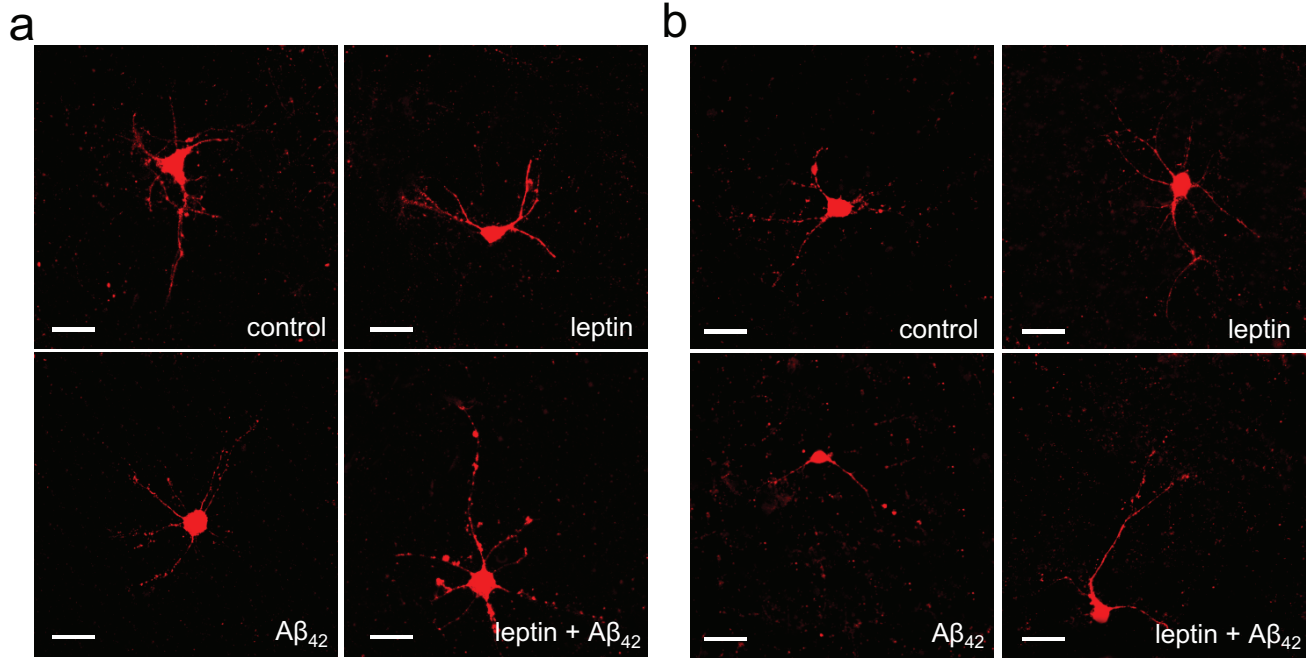


Fig. 8

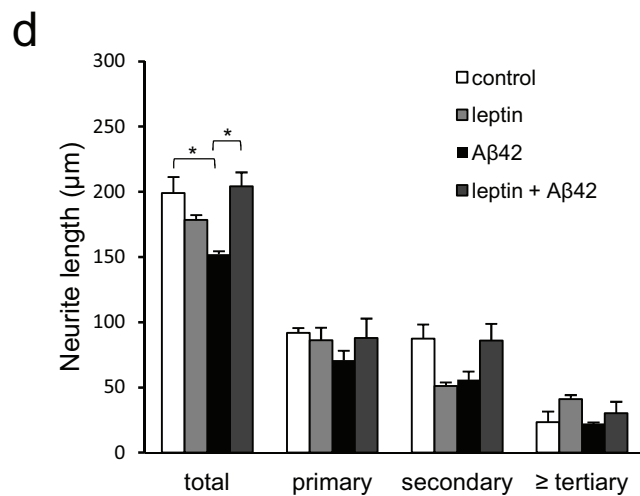
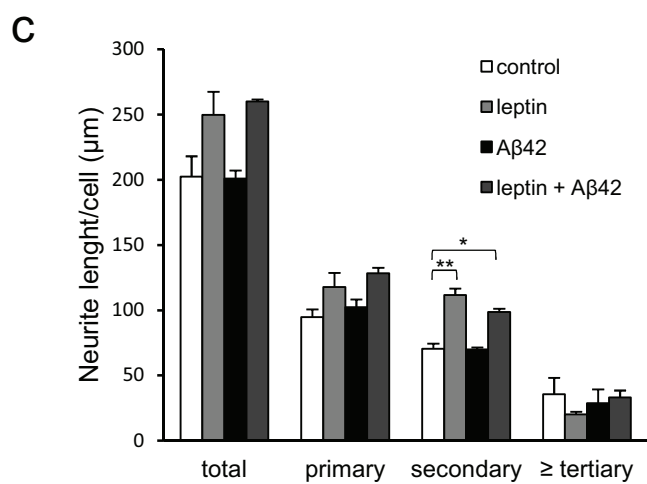
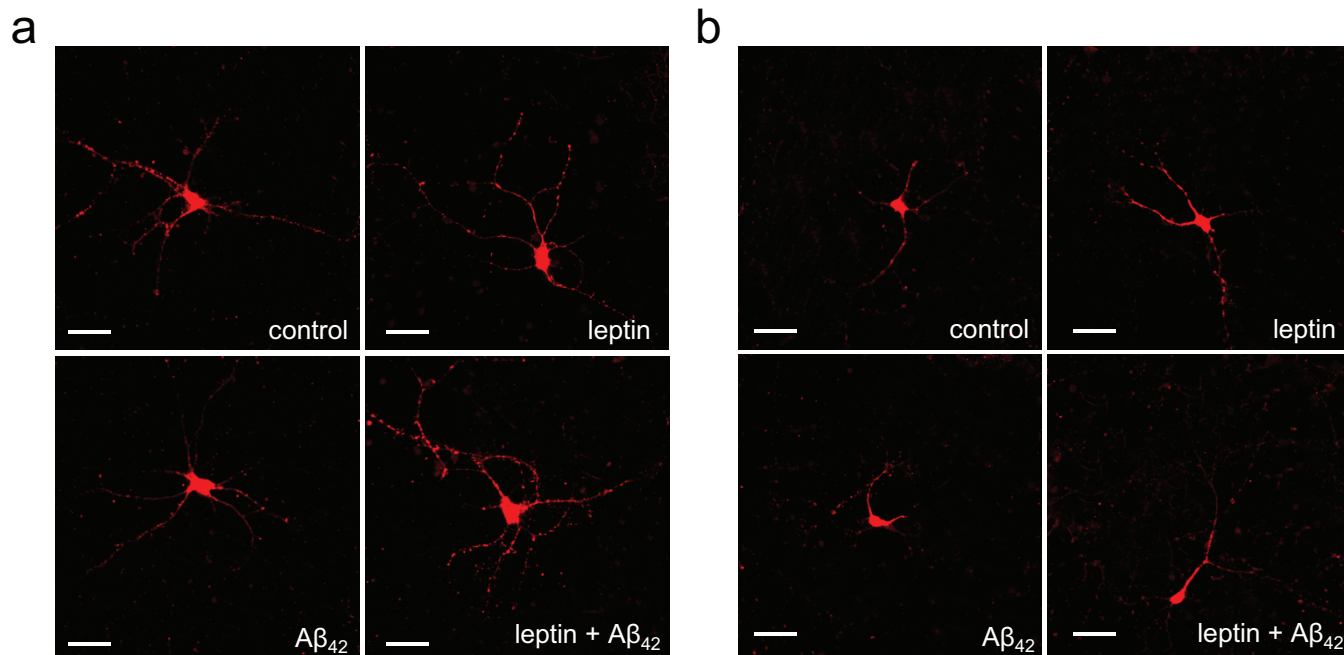


Fig. 9

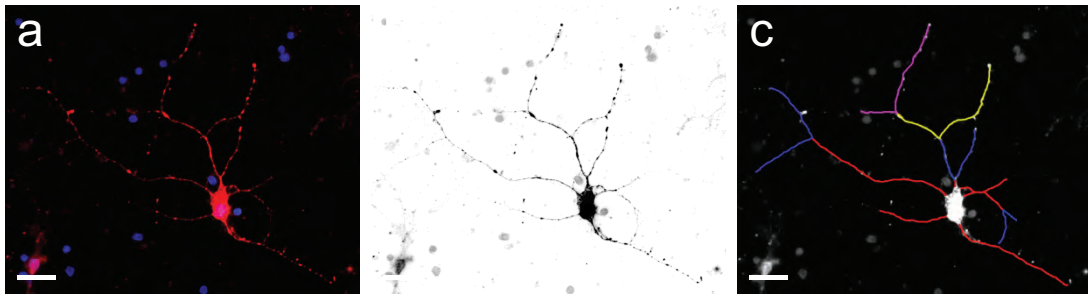


Fig. S1

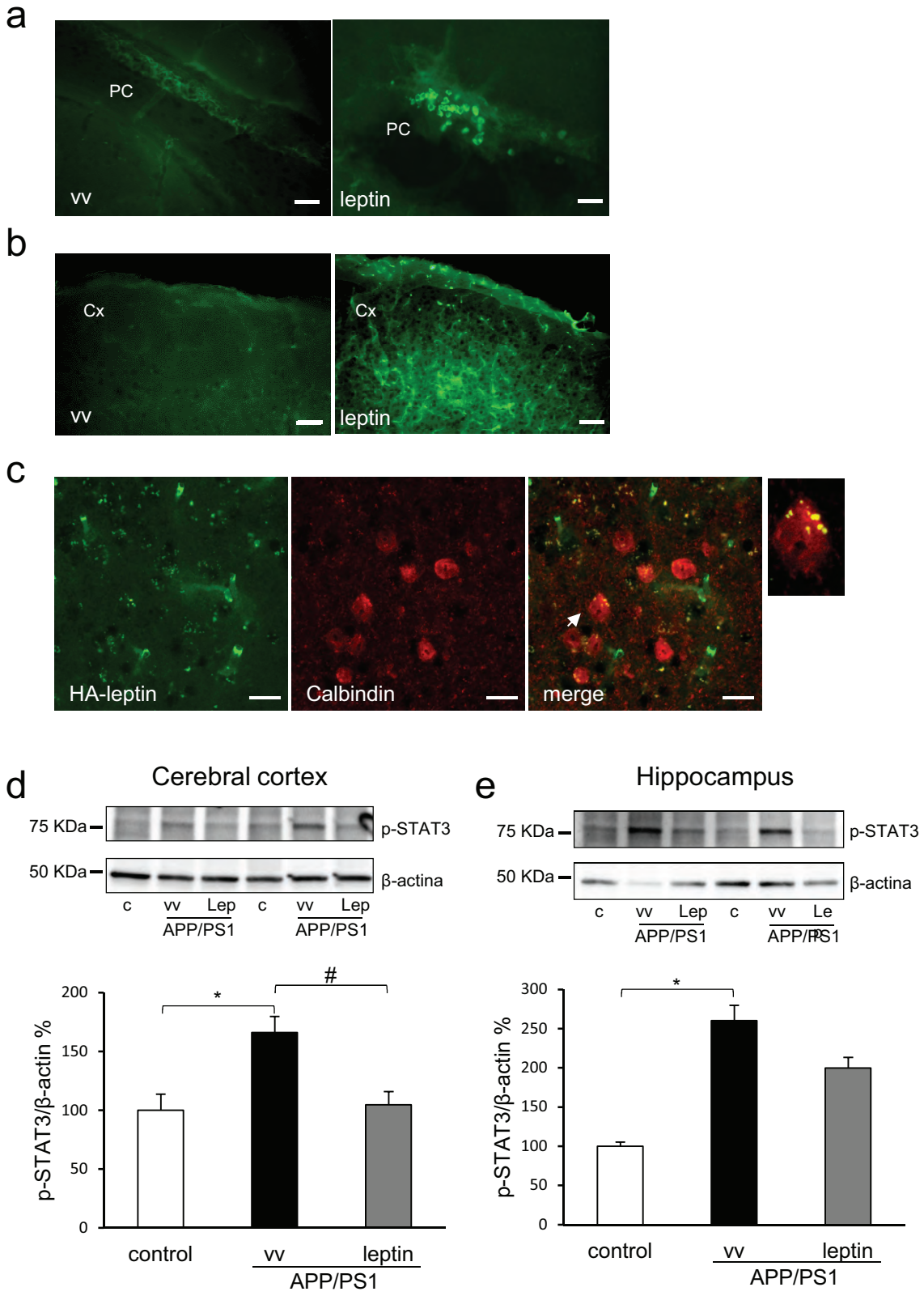


Fig. S2

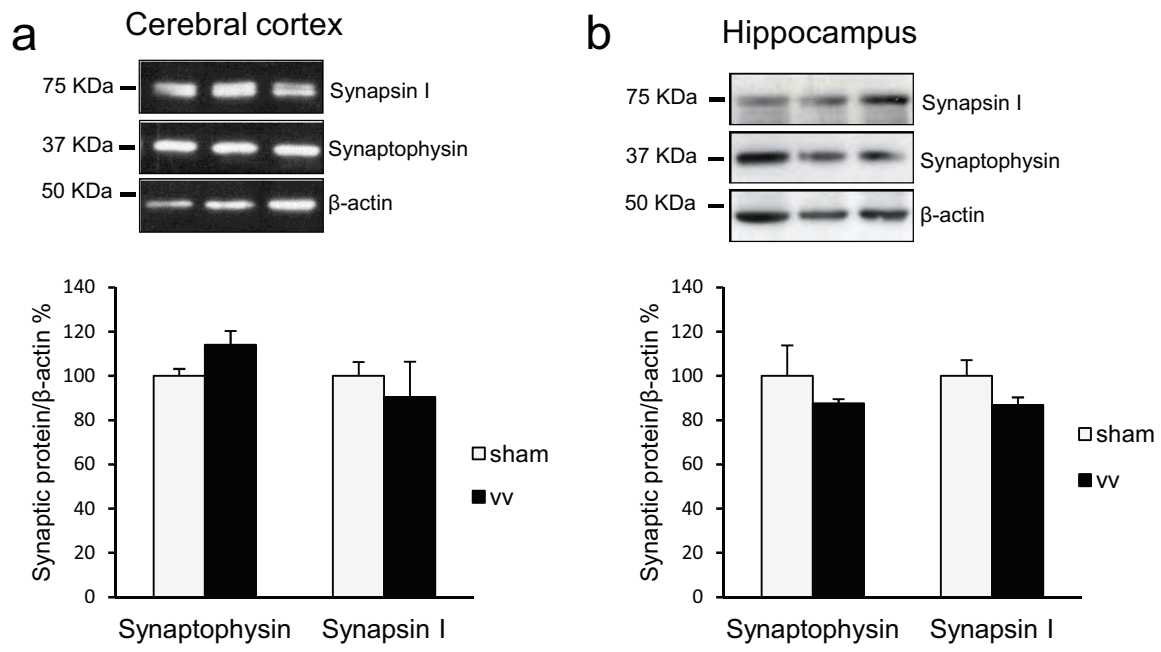


Fig. S3

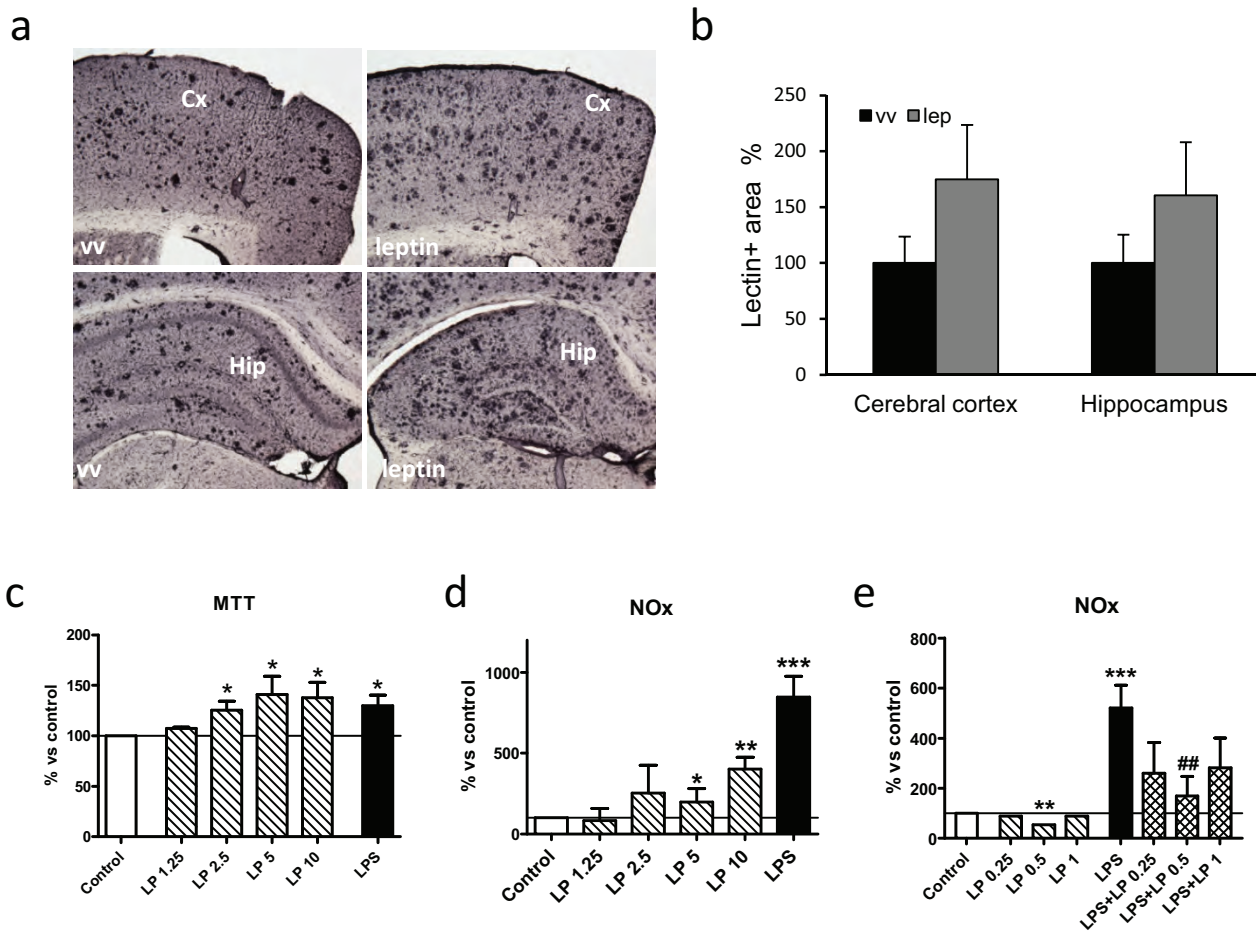


Fig. S4