

# Estudi de la relació existent entre les alteracions de la barrera hematoencefàlica i la $\beta$ -amiloïdosi en el model murí de senescència accelerada i malaltia d'Alzheimer SAMP8.

Jaume del Valle i Macià

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



FACULTAT de FARMÀCIA  
DEPARTAMENT de FISIOLOGIA

**Estudi de la relació existent entre les  
alteracions de la barrera hematoencefàlica i  
la  $\beta$ -amiloidosi en el model murí de  
senescència accelerada i malaltia  
d'Alzheimer SAMP8.**

JAUME del VALLE i MACIÀ

2010





FACULTAT de FARMÀCIA  
DEPARTAMENT de FISIOLOGIA

Programa de doctorat:

**Recerca, desenvolupament i control de medicaments**

**Estudi de la relació existent entre les alteracions  
de la barrera hematoencefàlica i la  $\beta$ -amiloïdosi  
en el model murí de senescència accelerada i  
malaltia d'Alzheimer SAMP8.**

Memòria presentada per Jaume del Valle i Macià per optar al títol de doctor per la  
universitat de Barcelona

Dra. Carme Pelegrí i Gabaldà  
(directora)

Dr. Jordi Vilaplana i Hortensi  
(director)

Jaume del Valle i Macià  
(doctorand)

JAUME del VALLE i MACIÀ

2010



Yesterday is but today's memory, tomorrow is today's dream.

**Kahlil Gibran**



A la meva família i a la família política, per donar-me tant suport.

A l'Ari, perquè és el millor que m'ha passat mai.





Amb el final de la tesi es mira enrere... Perquè després de tants anys, hi ha moments i persones que es recorden amb especial emotivitat, persones amb les que s'ha dut a terme o una part o tot el camí i que han contribuït a que aquest camí (o carrera d'obstacles) hagi estat tot un plaer recórrer. Un dia vaig rebre un correu electrònic, d'aquests de fotos i frases, on hi deia que no hi ha carretera llarga sense corbes... Però també és veritat que no hi ha carretera llarga amb bona companyia.

En un article hi solen haver diversos autors que contribueixen a publicar aquell treball; en aquesta tesi hi ha moltes persones que n'han pres part i que, sens dubte, es podrien considerar també autores.

En Kasperle, per ensenyar-me que un altre món es possible.

El Dídac i la Sílvia, amb ells vaig emprendre el camí que m'acabaria portant a on sóc avui. Sense ells la carrera no hauria estat igual.

El Dr. Queralt, amb ell vaig començar en aquest món de la recerca. Encara recordo quan em va trucar per dir-me si m'interessava fer el treball pràctic. Recordo també com de fàcil resultaven les coses quan les explicava.

To Professor Galla, thank you very much for opening your lab and allowing me to stay in your group. Sabine, if I ever reproduce your cultures, you will be the first person to know! Dearest Antje, you were like a mother in Münster, I don't know if I ever will be able to thank you for all the help you gave me. Dr. Fredrick Höhn and Wolfgang Willenbrink, thank you for the help with the computers, the microscope and the bicycle! Dr. Markus Seidl and Dr. Patrick Zeni, thank you for being so fun and talkative. Patrick, Prachee, Kathrin, Sandra, Julia, Mira, Milena, Christian, Ralph, Falko, Gokulan, Lena, Isabel and Philipp... You were my family for three months; you will always be my family in Germany. Jihad, I don't know if you realize what you did for me. You were, you are and you will be much more than a friend... Viele danke!!!

El Dr. Camins i la Dra. Pallàs, pels consells, suggeriments i ajudes (moltes d'elles grans ajudes) de diversa naturalesa. Moltes gràcies per ajudar-me a arribar al final.

Els companys del departament, amb els que compartim molts dinars (quan avisen), i molt més que dinars. Amb els que em trobo a la *coffee* o al passadís i fem bromes i parlem del temps, de pastissos, de chismorreos o de... Que m'aguanten les

insolències i no m'engeguen. A la Tere, Sara, Carolina, Francisco, Raquel, Maria José, Vanesa, Montse, Malén, Mar, Sílvia, Ana, Manel, Chari, Carme i demés... Gràcies.

En Quim i la Gemma, companys del lab i companys de congressos. Que m'aguanten quan se'm gira el cap, o quan parlo de Sarrià, o dels transgènics... Gràcies per no deixar d'escoltar-me quan em queixo (o per dissimular tan bé). Dank u wel.

Els meus amics Edu, Xavi i Dume, els pelleringues, la Marina, la Roser, l'Albert i la Irene, les Núries, el David, la Jessica, la Miren i el Renato, el Miki i tots els que em falta per posar. Gràcies per preocupar-vos per com m'anava i per preguntar on era quan desapareixia del mapa, gràcies pels ànims.

La meva família, per interessar-se en tot moment pel què feia i per què ho feia, per intentar entendre el que els explicava i per confiar en mi. Per pensar que descobriria la vacuna del SIDA i del càncer (tot alhora, vinga va...). Gràcies pel suport i per donar importància a la meva feina.

La Dra. Pelegrí i el Dr. Vilaplana, el Jordi i la Nanen. Perquè sigui en l'ordre que sigui, tots dos m'han portat fins aquí. Fa 4 anys em van explicar el projecte de recerca i ja em van contagiar el seu entusiasme. Gràcies per deixar-me formar part d'aquest projecte i fer-me'l sentir també meu. Gràcies per compartir consells, per compartir la feina i molt més que la feina, per compartir i ajudar-me amb la burocràcia (eterna), pels projectes, les idees, els articles, els pòsters i gràcies, sobretot, per compartir riures (encara recordo els barrufets) i pel bon rotllo. Moltes gràcies.

L'Ari, perquè és qui més ha patit els danys col·laterals d'aquesta tesi, perquè és qui més m'ha ajudat en aquesta tesi. Si al principi deia que això és com un camí, ella m'ha ajudat a arribar al final de l'etapa sent el bastó en el que et recolzes a cada passa. Cada cop que he ensopegat ella m'ha ajudat a aixecar-me, m'ha desinfectat les ferides i m'ha curat els peus quan em feien mal de tant caminar. Perquè sense ella no hagués estat el mateix arribar fins aquí, perquè no sé si hi hagués arribat sense ella.

Ella és la coautora de molt, molt més que aquesta tesi.

Aquesta tesi ha estat subvencionada pels projectes BFU 2006-11981 del "Ministerio de Educación y Ciencia" i BFU 2009-08352 del "Ministerio de Ciencia e Innovación". Durant la seva realització, l'autor ha gaudit d'una beca de la fundació Agustí Pedro i Pons i de dues beques de col·laboració 59FQ200702003 i 59FQ201002004.



# ÍNDEX

<b>I. INTRODUCCIÓ</b>	<b>1</b>
<b>1. La malaltia d'Alzheimer</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Signes clínics i símptomes</b>	<b>4</b>
<b>1.2 Neuropatologia</b>	<b>7</b>
1.2.1 Beta	7
1.2.2 Tau	8
1.2.3 Alteracions sinàptiques	11
1.2.4 Depleció de neurotrofines i neurotransmissors	11
1.2.5 Disfunció mitocondrial	13
1.2.6 Estrès oxidatiu	14
1.2.7 Reentrada al cicle cel·lular	15
1.2.8 Neuroinflamació i gliosi	17
1.2.9 Alteracions vasculars	18
<b>1.3 Models animals</b>	<b>19</b>
1.3.1 Models de ratolins transgènics	20
1.3.1.1 Models de tau	20
1.3.1.2 Models d'A $\beta$	21
1.3.1.3 Modelant l'eix Tau – A $\beta$ – PS – ApoE	22
1.3.2 Models d'artròpodes, la mosca comuna de la fruita ( <i>Drosophila melanogaster</i> )	23
1.3.3 Models de nemàtodes, el cuc <i>Caenorhabditis elegans</i>	24
1.3.4 Models espontanis	25
<b>1.4. Etiologia i hipòtesis</b>	<b>26</b>
1.4.1 Hipòtesi de la cascada amiloïdal	26
1.4.2 Hipòtesi de Tau	28
1.4.3 Hipòtesi colinèrgica	28
1.4.4 Metabolisme del colesterol i ApoE	29
1.4.5 Hipòtesis dels dos cops	30
1.4.6 Hipòtesi neurovascular	32

<b>2. La barrera hematoencefàlica</b>	<b>34</b>
<b>2.1 Estructura i funcions de la BHE</b>	<b>36</b>
2.1.1 Barrera física, les unions estretes	36
2.1.1.1 Ocludina	38
2.1.1.2 Claudines	39
2.1.1.3 Molècules d'adhesió cel·lular	39
2.1.1.4 Proteïnes citoplasmàtiques accessòries	40
2.1.1.5 Actina	41
2.1.1.6 Unions adherents	41
2.1.2 Barrera de transport	42
2.1.2.1 GLUT1	42
2.1.2.2 MCT1	43
2.1.2.3 Transportadors d'aminoàcids	44
2.1.2.4 Vitamines	44
2.1.2.5 Ions	45
2.1.2.6 Transportadors d'efluència	45
2.1.3 Barrera metabòlica	46
2.1.4 Membrana basal	46
<b>2.2 Paper de la BHE en la MA</b>	<b>47</b>
2.2.1 Patologia microvascular	47
2.2.2 Angiogènesi aberrant	48
2.2.3 Captació d'A $\beta$ circulant	48
2.2.4 Eliminació d'A $\beta$ cerebral	49
<b>3. Els ratolins SAMP8</b>	<b>51</b>
<b>3.1 Alteracions del comportament</b>	<b>52</b>
3.1.1 Aprenentatge i memòria	52
3.1.2 Conducta d'ansietat	52
3.1.3 Ritme circadiari	53
<b>3.2 Alteracions neuropatològiques</b>	<b>53</b>
3.2.1 $\beta$ Amiloide	54
3.2.2 Tau	54
3.2.3 Degeneració esponjiforme	55
3.2.4 Proliferació astrocitària i microglial	55
3.2.5 Virus de la leucemia murina	56
3.2.6 Degeneració cerebelar	56

3.2.7 Degeneració neuronal dopaminèrgica	57
3.2.8 Degeneració oligodendrocítica	57
3.2.9 Estrés oxidatiu	58
3.2.10 Alteracions mitocondrials	59
3.2.11 Alteracions en la barrera hematoencefàlica	60
<b>II. OBJECTIUS</b>	<b>63</b>
<b>III. RESULTATS: ARTICLES</b>	<b>67</b>
Article 1	69
Article 2	81
Article 3	95
Article 4	105
Article 5	123
<b>IV. DISCUSSIÓ</b>	<b>151</b>
<b>V. CONCLUSIONS</b>	<b>171</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>175</b>





## ÍNDIX DE FIGURES

<b>Figura 1</b>	Processament de la proteïna precursora de l'amiloide.	7
<b>Figura 2</b>	Estructura i dominis de les isoformes de tau que s'expressen en el cervell humà adult.	9
<b>Figura 3</b>	Formació d'agregats de tau.	10
<b>Figura 4</b>	Dany mitocondrial i estrès oxidatiu en la MA.	14
<b>Figura 5</b>	Reentrada al cicle cel·lular de neurones diferenciades i madures en la MA.	16
<b>Figura 6</b>	Hipòtesi de la cascada amiloïdal de la MA.	27
<b>Figura 7</b>	Hipòtesi dels dos cops de la MA.	30
<b>Figura 8</b>	Hipòtesi neurovascular de la MA.	32
<b>Figura 9</b>	Esquema dels experiments de Goldman.	34
<b>Figura 10</b>	Esquema de la unitat neurovascular i les seves funcions.	36
<b>Figura 11</b>	Esquema de la posició i estructura de la unions estretes i de les unions adherents.	37
<b>Figura 12</b>	Tècnica d'anàlisi d'imatge per quantificar el diàmetre dels vasos i l'extravasació d'IgG.	71
<b>Figura 13</b>	Extravasació d'IgG i diàmetre dels vasos sanguinis de ratolins SAMP8 i SAMR1.	72
<b>Figura 14</b>	Imatges representatives de seccions cerebrals d'animals perfosos amb el mètode còctel.	84
<b>Figura 15</b>	Imatges representatives de la zona de penombra on es caracteritza la naturalesa de les cèl·lules EB <sup>+</sup> .	85
<b>Figura 16</b>	Evolució temporal de l'extravasació d'EB a les tres zones estudiades en les soques SAMP8, SAMR1 i ICR-CD1.	98
<b>Figura 17</b>	Seccions coronals de l'hipocamp on s'observa el pèptid A $\beta$ en ratolins SAMP8 de 3, 6 i 12 mesos d'edat.	107
<b>Figura 18</b>	Evolució temporal del nombre de clústers als hipocamps de les soques ICR, SAMR1 i SAMP8.	108
<b>Figura 19</b>	Evolució temporal del nombre de vasos positius amiloides als hipocamps de les soques ICR i SAMP8.	125
<b>Figura 20</b>	Imatges de seccions cerebrals d'animals SAMP8 de 12 mesos d'edat marcats amb PECAM; B40 i IgG.	126



## **ABREVIACIONS**

A $\beta$	pèptid $\beta$ -amiloide
A $\beta_{40}$	pèptid $\beta$ -amiloide de 40 aminoàcids
A $\beta_{42}$	pèptid $\beta$ -amiloide de 42 aminoàcids
aa	aminoàcid
AADC	<i>Aromatic L-amino acid decarboxylase</i> , L-aminoàcid aromàtic descarboxilasa
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ach	acetilcolina
ADL	<i>activities of daily living</i> , activitats de la vida diària
AF-6	Afadina-6
AINE	antiinflamatori no esteroïdal
ApoE	apolipoproteïna E
ApoJ	apolipoproteïna J
APP	<i>amyloid precursor protein</i> , proteïna precursora de l'amiloide
APP <sub>Ind</sub>	mutació indiana de l'APP
APP <sub>Lon</sub>	mutació londinenca de l'APP
APP <sub>Swe</sub>	mutació sueca de l'APP
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i> , factor neurotròfic derivat del cervell
BHE	barrera hematoencefàlica
BRCP	<i>breast cancer resistance protein</i> , proteïna de resistència al càncer de mama
CAA	<i>cerebral amyloid angiopathy</i> , angiopatia amiloïdal cerebral
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i> , quinasa dependent de ciclina
CDR	<i>clinical dementia rating</i> , índex de demència clínica
CEC	cèl·lules endotelials cerebrals
CNP	2', 3'-nucleòtid cíclic 3'-fosfodiesterasa
DA	dopamina
DNAmt	DNA mitocondrial
Drp1	<i>dynamitin related protein 1</i> , proteïna lligada a dinamina 1
EAAT	<i>excitatory amino acid transporters</i> , transportadors d'aminoàcids excitatoris
EB	<i>evans blue</i> , blau d'Evans
EE	extensió de l'extravasació

E.E.M.	Error estàndard de la mitjana
E-MuLVs	virus ecotròpic de la leucèmia murina
FDG	18-Flúor-Desoxi-Glucosa
FSC	flux sanguini cerebral
GSK	<i>glycogen synthase kinase</i> , glicogen sintasa quinasa
HNE	4-hidroxi-2-nonenal
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , peroxidasa de rave
IDE	<i>insulin degrading enzyme</i> , enzim degradador de la insulina
JAM	<i>junctional adhesion molecules</i> , molècules d'adhesió cel·lular
LCR	líquid cefaloraquidi
LDL	<i>low-density lipoprotein</i> , lipoproteïnes de baixa densitat
LIC	líquid intersticial del cervell
LRP	<i>low-density lipoprotein receptor-related protein</i> , receptor de la proteïna associada a la lipoproteïna de baixa densitat
LTP	<i>long-term potentiation</i> , potenciació a llarg termini
MA	malaltia d'Alzheimer
MBP	<i>myelin basic protein</i> , proteïna bàsica de la mielina
MCI	<i>mild cognitive impairment</i> , deteriorament cognitiu lleu
MCT1	<i>Monocarboxylate transporter 1</i> , transportador de monocarboxilats 1
MDA	malondialdehid
ME	matriu extracel·lular
MRP	<i>multidrug resistance-associated protein</i> , proteïnes associades de resistència múltiple
MT	microtúbul
MuLVs	virus de la leucèmia murina
NA	noradrenalina
NT	neurotrofina
NFT	<i>neurofibrillary tangles</i> , cabdells neurofibril·lars
NGF	<i>nerve growth factor</i> , factor de creixement nerviós
OCV	òrgan circumventricular
PBN	N-tert-fenil-butilnitrona
PET	<i>positron emission tomography</i> , tomografia d'emissió de positrons
P-gp	glicoproteïna-P
PFA	paraformaldehid
PHF	<i>paired helicoïdal filaments</i> , filaments helicoïdals aparellats
PKC	<i>Protein kinase C</i> , proteïna quinasa C
PS	presenilina

RAGE	<i>receptor for advanced glycation endproducts</i> , receptor per a productes finals de la glucosilació avançada
REE	<i>relative extravasation extension</i> , extensió relativa de l'extravasació
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , espècies reactives d'oxigen
SAM	<i>senescence-accelerated mice</i> , ratolins amb senescència accelerada
SAMP	<i>senescence-accelerated mice prone</i> , ratolins sensibles a la senescència accelerada
SAMR	<i>senescence-accelerated mice resistant</i> , ratolins resistents a la senescència accelerada
sLRP1	LRP1 soluble
SMA	<i>spontaneous motor activity</i> , activitat motora espontània
SNC	sistema nerviós central
SPECT	<i>single photon emission computed tomography</i> , tomografia per emissió de fotó únic
TJ	<i>tight junctions</i> , unions estretes
UA	unions adherents
VD	<i>vessel diameter</i> , diàmetre dels vasos
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> , factor de creixement de l'endoteli vascular
WT	<i>wild type</i> , fenotip típic d'una forma
ZO	<i>zonula occludens</i>



# **I. Introducció**





# **1. La malaltia d'Alzheimer**

La malaltia d'Alzheimer (MA) va ser descrita per primera vegada com un cas inusual de demència, "*Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnhinde*" (Alzheimer, 1907). Avui en dia, però, parlar d'Alzheimer és parlar de la tercera edat, ja que l'edat és el principal factor de risc de patir MA. Així, una de cada deu persones majors de 65 anys pateixen la malaltia (Smith, 1998), i a cada interval creixent de 5 anys la incidència es duplica (Katzman i Fox, 1999). De fet, l'any 2050, una de cada 85 persones patirà la MA arreu del planeta (Brookmeyer *et al.*, 2007), i si es compleixen les projeccions de població mundial de les nacions unides (United Nations, 2009), més de 107 milions de persones patiran aquesta malaltia. Així doncs, la MA s'ha convertit en un problema de salut de primer ordre (Avramopoulos, 2009).

Els dos trets histològics principals de la MA en el cervells són les plaques neurítiques i els cabdells neurofibril·lars (*neurofibrillary tangles*, NFT) (Selkoe, 1991). Les plaques neurítiques estan formades per un nucli de pèptids  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ) agregat de manera aberrant, mentre que els NFT són un agregat intraneuronal anormal format bàsicament per la proteïna tau hiperfosforilada. Aquestes lesions es troben presents al neocòrtex temporal i a les regions de l'hipocamp del cervell de pacients de MA (Taguchi *et al.*, 2005). El neocòrtex es compon de sis capes, numerades de la I a la VI, que recobreixen els lòbuls frontals i prefrontals del cervell. Entre les seves funcions hi trobem la percepció sensorial, la generació d'ordres motrius, el raonament espacial, el pensament conscient i el llenguatge. L'hipocamp es troba en l'escorça cerebral del cervell anterior i està involucrat en la formació i emmagatzematge de noves memòries (Squire, 1992) així com en la codificació espacial (O'Keefe i Nadel, 1978). Tot i que l'etiologia de la MA encara és desconeguda, i de fet hi ha nombroses hipòtesis en referència a aquest tema, les plaques neurítiques i els NFT són encara avui en dia la única eina de diagnòstic tangible i que es realitza post mortem (McKhann *et al.*, 1984; Epis *et al.*, 2010). Aquests dos fets es consideren claus en la patogènia de la MA, tot i que el mecanisme exacte pel qual aquests dos fets estan connectats i indueixen neurotoxicitat encara és objecte d'estudi i controvèrsia (Mudher i Lovestone, 2002).

## **1.1 Signes clínics i símptomes**

Podem dividir la MA en dues variants, la MA de tipus esporàdic i aparició tardana i la MA de tipus familiar i d'aparició a edats més joves. Tot i les diferències en l'edat d'aparició, les dues variants mostren característiques neurològiques i histopatològiques similars i es consideren el mateix trastorn. La MA de tipus genètic apareix abans dels 65 anys i genera aproximadament un 5% del total de casos de MA (Pimplikar, 2009); aquesta forma de MA lligat a predisposició familiar està produïda majoritàriament per mutacions als gens de la proteïna precursora de l'amiloide (amyloid precursor protein, APP) (Goate *et al.*, 1991), la presenilina (PS) 1 (Sherrington *et al.*, 1995) i la PS2 (Levy-Lahad., 1995). La MA d'aparició espontània es presenta a partir dels 65 anys i és la forma més comú de la malaltia, amb prop del 95% del total dels casos (Alzheimer's association, 2008), aquesta forma de la malaltia sembla que no està lligada a susceptibilitat familiar (Bertram i Tanzi, 2008). Cal destacar que un polimorfisme comú ( $\epsilon 4$ ) al gen que codifica l'apolipoproteïna E (ApoE) incrementa el risc de patir les dues variants de la malaltia (van Duijn *et al.*, 1994; Corder *et al.*, 1993).

En tots dos casos, la MA és un trastorn lent i progressiu, d'inici insidiós i amb un deteriorament gradual de la memòria episòdica. Els seus signes són, entre d'altres, afàsia, apràxia i agnòsia, i com a símptomes generals cognitius trobem l'alteració del judici, de la presa de decisions i de l'orientació (Blennow *et al.*, 2006).

Es considera que la neurodegeneració característica de la MA comença uns 20 o 30 anys abans de que la clínica es manifesti (Davies *et al.*, 1988). Durant aquesta fase preclínica, la càrrega cerebral de plaques neurítiques i NFT augmenta progressivament fins que s'arriba al punt en què els primers signes i símptomes surten a la superfície. Dificultats per dur a terme tasques laborals o familiars i dificultats per recordar noms i fets recents són un símptoma comú inicial. Aquesta fase prèvia on encara no s'ha diagnosticat la MA és sovint designada com deteriorament cognitiu lleu (*mild cognitive impairment*, MCI) de tipus amnèsic, i es defineix en base a informes subjectius d'episodis de pèrdua de memòria dels propis malalts i es verifica amb persones pròximes al malalt, tot junt amb tests objectius adaptats a l'edat i ajustats al nivell educatiu del pacient (Petersen, 2004; Crum *et al.*, 1993). L'MCI de tipus amnèsic és un ens etiològicament heterogeni ja que molts pacients amb MCI tenen MA prodròmica, altres poden patir diferents trastorns com ara demència vascular i també d'altres tenen una forma benigna de MCI com a part del procés normal d'envelliment

(Gauthier *et al.*, 2006). S'ha suggerit que l'MCI de tipus amnèsic constitueix en realitat una primera etapa de la MA (Markesbery *et al.*, 2006), de fet la taxa de conversió de pacients amb MCI a la malaltia d'Alzheimer amb demència clínica és de 10-15% per any (Petersen, 2004; Visser *et al.*, 2005).

Arriba un moment en que el declivi funcional s'ha desenvolupat suficient com per satisfer els criteris del "Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - Fourth Edition" (DSM-IV; American Psychiatric Association, 1994) per a la demència i el diagnòstic posterior de MA per NINCDS/ADRDA (McKhann *et al.*, 1984), apareix ja aquí un augment concomitant en l'extensió i severitat dels símptomes neuropsiquiàtrics i conductuals (Cummings *et al.*, 1987; Lyketsos *et al.*, 2002). Segons el "*clinical dementia rating*" (CDR) podem dividir el devenir clínic de la MA en tres fases: suau, moderada i severa (Hughes *et al.*, 1982).

En aquest primer estadi de MA suau de CDR 1 (Hughes *et al.*, 1982) podem veure com ja apareix depressió, ansietat i irritabilitat; estats que són acompanyats per alteracions del son, deliris i paranoies més acusades i inquietud, motora així com en alguns malalts també pot aparèixer apatia greu i aïllament social. Tot i això, la persona amb MA és capaç de mantenir un sentit i consciència pròpia al llarg d'aquesta etapa (Jicha i Carr, 2010). En aquesta etapa de la malaltia es mostra per primera vegada una disminució important en la capacitat de realitzar de manera independent les activitats de la vida diària (*activities of daily living*, ADL) més complexes (Desai *et al.*, 2004; Patterson *et al.*, 1992; Galasko *et al.*, 2006), com per exemple les dificultats en la gestió financera, que sovint precedeixen un futur desenvolupament de dificultats amb simples intercanvis monetaris (Griffith *et al.*, 2003) o la capacitat de conduir vehicles, que pot veure's alterada (Dawson *et al.*, 2009). No obstant això, la majoria de les activitats més bàsiques de la vida diària poden romandre completament intactes. Activitats tals i com anar a comprar, cuinar, netejar, així com dur a terme aficions simples poden ser preservades; de la mateixa manera la persona és encara capaç de banyar-se, vestir-se, menjar i controlar la continència urinària (Jicha i Carr, 2010).

A mesura que la malaltia afecta cada vegada més les regions cerebrals límbica i neocortical, s'arriba al CDR 2 i s'entra en un segon estat de MA moderada (Hughes *et al.*, 1982) on les alteracions psiquiàtriques, conductuals i de funcionament vistes a la primera etapa s'accentuen. Comencen a emergir al·lucinacions i cada vegada més els deliris s'integren de manera activa en la construcció de la realitat (Cummings *et al.*, 1987; Lyketsos *et al.*, 2002). La inquietud motora, sovint manifesta a través de rascar-

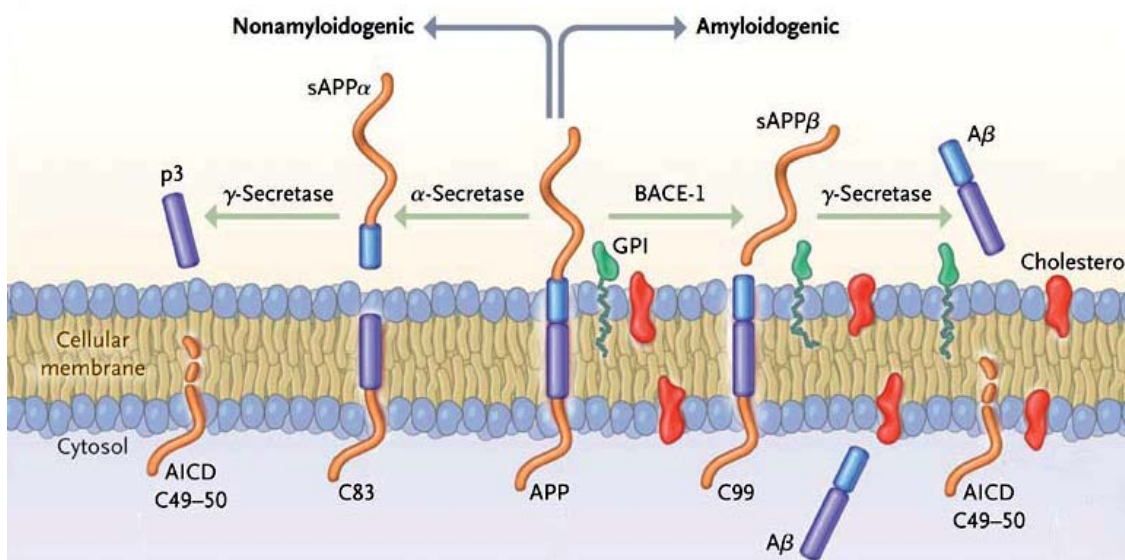
se compulsivament o fins i tot produir-se esgarrapades, pot conduir a infeccions recurrents de la pell superficial (Johansson *et al.*, 1999). A mesura que la MA segueix el seu curs, el pacient desenvolupa cada vegada més dificultats amb les ADL. En aquesta fase moderada de la MA ja li és impossible cuinar, netejar, fer funcionar aparells elèctrics complexos i dur a terme finances simples. Les habilitats per menjar solen degenerar i, en aquesta etapa, la persona malalta sovint és capaç de menjar amb un sol cobert o, en darrers estats, només amb els dits. La supervisió les 24 hores del dia és fa gairebé imprescindible, tot i que els malalts de MA encara mantinguin un cert grau d'independència en les ADL bàsiques. La inadequació social pot arribar a ser problemàtica i portar a l'aïllament social de les persones amb AD i el cercle immediat dels seus cuidadors, amics i família. Les manifestacions clíniques es fan més difícils i resistents al tractament i comencen a emergir com els principals temes de preocupació per a tots els involucrats en la cura de la persona malalta. La supervisió d'un cuidador és absolutament necessària per a que es mantingui una correcta administració de medicaments i evitar així possibles crisis de salut (Jicha i Carr, 2010).

Arribat el punt en què un malalt entra la fase severa de la MA de CDR 3 (Hughes *et al.*, 1982), la patologia subjacent pròpia de la malaltia, la coexistència d'altres trets patològics, i/o l'atròfia relacionada amb l'edat fan que el cervell estigui severament afectat en la seva pràctica totalitat. La construcció de la realitat està completament fragmentada. Els malalts amb al·lucinacions i agitació agreugen aquestes condicions per donar pas a un estat progressiu d'apatia. A l'inici d'aquesta fase algunes habilitats físiques poden estar conservades i pot aparèixer conversa de manera casual, però a mesura que avança la malaltia sobrevé una completa dependència i cessen totes les funcions amb sentit. La participació en qualsevol activitat s'atura i la persona amb MA es queda postrada al llit, convertint-se en totalment dependent d'altres que n'han de tenir cura per qualsevol activitat o fet del dia a dia. El resultat final és la mort per comorbiditat o per altres condicions mèdiques (Jicha i Carr, 2010).

## 1.2 Neuropatologia

### 1.2.1 Beta

Les plaques neurítiques formades pels pèptids A $\beta$  van ser descrites per primera vegada pel Dr. Alois Alzheimer el 1906 (Alzheimer, 1907) i són una important característica patològica de la MA. Inicialment, el pèptid A $\beta$  present a les plaques senils es pensava que era una proteïna anormal (Blennow *et al.*, 2006). Per això, va esdevenir una troballa important saber que l'A $\beta$  es produeix constitutivament durant el metabolisme cel·lular normal (Haass *et al.*, 1992). Els pèptids A $\beta$  estan formats per 36-43 aminoàcids (aa) sent el pèptid de 40 aa (A $\beta_{40}$ ) més prevalent que el de 42 aa (A $\beta_{42}$ ) el qual té més toxicitat i tendència a agregar-se (Selkoe, 2001a). La proteòlisi amiloidogènica de l'APP es produeix per l'acció enzimàtica seqüencial in situ d'una  $\beta$ -secretasa anomenada "*beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1*" (BACE-1) (Vassar, 2001), i un complex de proteïnes anomenat  $\gamma$ -secretasa, format per PS1 o bé PS2, nicastrina, APH1 i PEN2 (Haass, 2004; De Strooper, 2003). La proteòlisi amiloidogènica produeix també els fragments "amyloid intracellular domain" (AICD) i sAPP $\beta$  (Fig. 1). Per altra banda, la via no amiloidogènica de procés de l'APP genera els pèptids sAPP $\alpha$ , i el fragment C83 mitjançant l'acció de les  $\alpha$ -secretases. Posteriorment el fragment C83 és processat pel complex  $\gamma$ -secretasa per alliberar els fragments p3 i AICD (Kojro i Fahrenholz, 2005) (Fig. 1).



**Fig.1 Processament de la proteïna precursora de l'amiloide.** En la via no amiloidogènica del procés de l'APP, l' $\alpha$ -secretasa allibera el fragment sAPP $\alpha$  al líquid extracel·lular, deixant enrere el fragment C83. Aquest fragment és després tallat per la  $\gamma$ -secretasa, alliberant el pèptid p3 extracel·lular i l'AICD intracel·lular. En la via amiloidogènica, el procés s'inicia per la BACE-1, que allibera al líquid extracel·lular el fragment sAPP $\beta$  i produeix el fragment C99. Aquest C99 és també substrat de la  $\gamma$ -secretasa, que al processar-lo genera A $\beta$  i AICD. El procés de la  $\gamma$ -secretasa té lloc a l'interior de la membrana cel·lular. El fragment AICD que s'allibera al citoplasma té funcions reguladores de la transcripció; modificat de Querfurth i LaFerla, 2010.

Estudis recents han suggerit que el pèptid A $\beta$  és secretat per neurones durant l'activitat neuronal excitatòria (Cirritto *et al.*, 2005a), que inhibeix la transmissió excitadora sinàptica (Kamenetz *et al.*, 2003) i que podria tenir un important paper fisiològic millorant l'aprenentatge i la retenció de memòria (Morley *et al.*, 2010).

Un augment dels nivells de pèptids A $\beta$  degut a un increment en la seva producció i/o un dèficit en la seva eliminació afavoreixen la formació d'agregats amiloïdals. Els pèptids A $\beta$  s'agreguen entre ells de manera espontània formant oligòmers solubles. A mesura que el procés continua, els oligòmers es van fent més grans convertint-se en entitats anomenades protofibril·les i fibril·les, el procés avança i els agregats poden incorporar també altres proteïnes i material cel·lular tornant-se ja insolubles i donant lloc a les plaques neurítiques característiques de la MA (Haass i Selkoe, 2007).

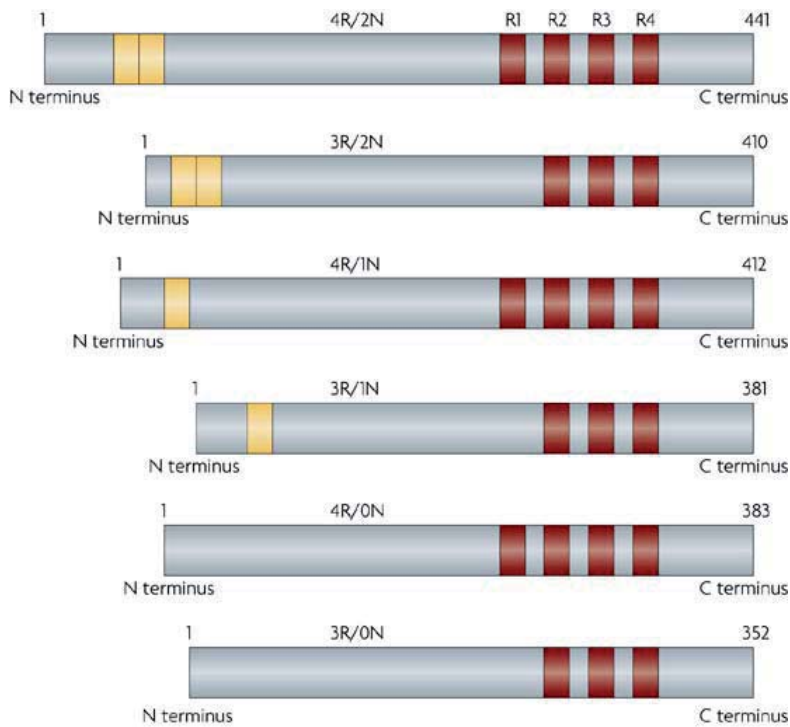
Les proteases neprilisina i l'enzim degradador de la insulina (IDE) regulen els nivells basals de l'A $\beta$ . De fet, la neprilisina, és capaç de degradar monòmers i oligòmers d'A $\beta$  (Kanemitsu *et al.*, 2003) i una reducció en l'acumulació de neprilisina causa acumulació cerebral d'A $\beta$  (Iwata *et al.*, 2001). L'IDE és un enzim que degrada petits pèptids com la insulina i també és capaç de degradar monòmers d'A $\beta$  (Qiu *et al.*, 1998). En estudis fets amb ratolins s'ha vist com la supressió de l'IDE redueix la degradació d'A $\beta$  en més del 50% (Farris *et al.*, 2003). A més, la sobreexpressió de la neprilisina o de l'IDE prevenen la formació de plaques (Leissring *et al.*, 2003).

Els oligòmers solubles així com les fibril·les són les formes amiloides més tòxiques (Walsh i Selkoe, 2007) i s'ha vist com en preparacions amb seccions de cervell dímers i trímers de pèptids A $\beta$  indueixen una pèrdua progressiva de sinapsis hipocampals electrofisiològicament actives i una pèrdua d'espines dendrítiques de les neurones piramidals de l'hipocamp (Shankar *et al.*, 2007). De fet varis estudis han mostrat com la severitat dels dèficits cognitius en malalts d'Alzheimer és proporcional als nivells d'oligòmers i no pas de la càrrega total d'A $\beta$  al cervell (Lue *et al.*, 1999, McLean *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999; Näslund *et al.*, 2000).

### **1.2.2 Tau**

La funció principal de la proteïna associada a microtúbuls tau, proteïna particularment abundant en axons de neurones, és la d'estabilització dels microtúbuls (MT) (Johnson i Hartigan, 1999). Hi ha sis isoformes principals de tau que s'expressen en cervell d'humà adult, les quals deriven d'un únic gen per talls i unions alternatives (Fig. 2).

Les sis isoformes tau difereixen entre si en el nombre de repeticions de zones d'unió a la tubulina i en la presència o absència d'un o dos inserts de 29 aminoàcids en la porció N-terminal de la proteïna, que no és necessari per la unió a MT (Binder *et al.*, 1985). Tot i que les sis isoformes semblen funcionalment similars, cada una podria tenir funcions fisiològiques distintives (Hong *et al.*, 1998).



**Fig.2 Estructura i dominis de les isoformes de tau que s'expressen en el cervell humà adult.** Les isoformes es poden diferenciar entre elles pel nombre de dominis d'unió a la tubulina (tres o quatre, en vermell). També es poden diferenciar per la presència o absència d'una o dos insercions d'aa (en groc) a la porció N-terminal; modificat de Ballatore *et al.*, 2007.

Tot i que la funció principal del domini d'unió a MT de la proteïna tau és l'estabilització pròpia dels MT, s'han dut a terme diversos estudis on s'ha vist que també es podrien unir a aquest domini altres estructures o enzims tals i com la membrana plasmàtica (Brandt *et al.*, 1995; Maas *et al.*, 2000), filaments d'actina del citoesquelet (Fulga *et al.*, 2007), tirosina quinases com ara la fyn (Lee *et al.*, 1998), RNA (Kampers *et al.*, 1999) i PS1 (Takashima *et al.*, 1998). Aquests resultats donarien suport a la idea que la tau podria donar a lloc a diverses interaccions heterogènies, particularment quan no es troba unida a MT, i que això podria afavorir el seu plegament aberrant i agregació (Kuret *et al.*, 2005).

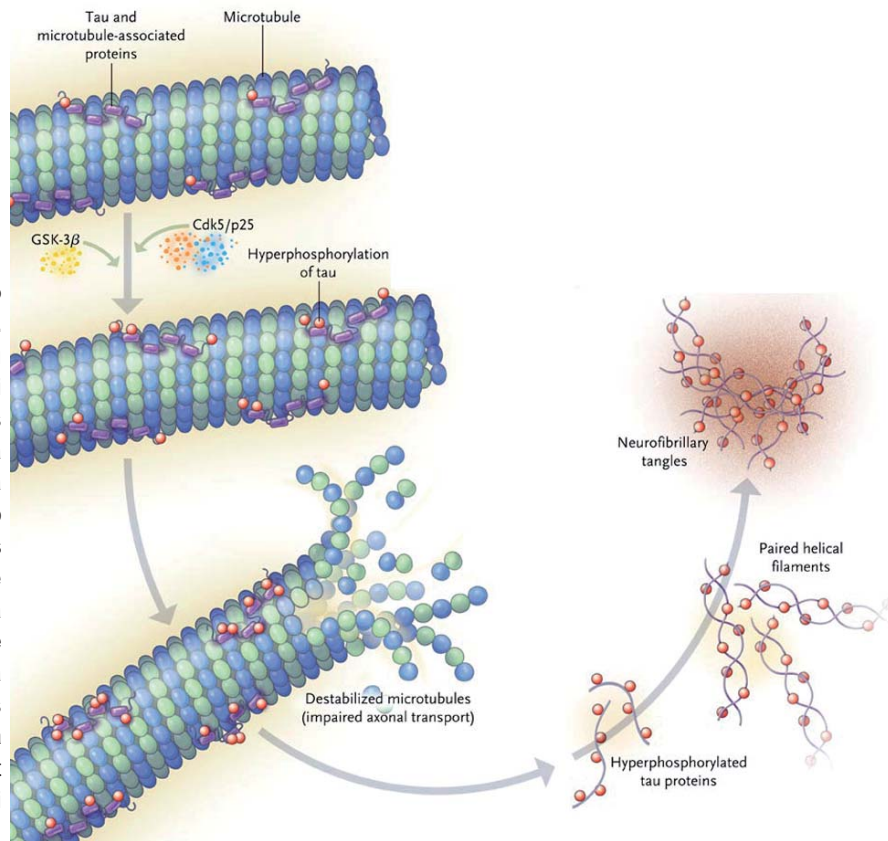
En condicions patològiques l'equilibri d'unió entre la tau i els MT es troba pertorbat. La separació anormal de la tau dels MT pot ser provocada per múltiples causes com un augment en la taxa de fosforilació i/o una disminució en la taxa de desfosforilació, generant així un increment anormal dels nivells de la fracció lliure de tau citosòlica (Ballatore *et al.*, 2007). A partir de la tau lliure es formen petits dipòsits de tau no fibril·lars (Galvan *et al.*, 2001; Maeda *et al.*, 2007) per, seguidament, generar una



forma de transició estructural anomenada filaments helicoidals aparellats (*paired helicoïdal filaments*, PHF). Finalment aquests PHF s'agreguen entre si per formar els NFT característics de la MA (Fig. 3).

**Fig.3 Formació d'agregats de tau.**

La unió de tau promou l'estabilitat i l'acoblament dels microtúbuls. Una activitat quinasa excessiva, la reducció d'activitat de les fosfatases o bé ambdues indueixen la hiperfosforilació de tau, promovent-ne la separació dels microtúbuls i la seva l'agregació; modificat de Querfurth i LaFerla, 2010.



Arribat aquest punt, la tau ja no s'uneix als MT sinó que queda segregada als NFT que, en la MA, es troben majoritàriament a les neurites distròfiques a més dels somes neuronals (Mitchell *et al.*, 2000) tot i que també es poden trobar cabdells gials als astròcits i oligodendròcits (Ballatore *et al.*, 2007). La pèrdua de la funció normal d'estabilització de MT de tau dona a lloc a una alteració patològica en les funcions normals estructurals i reguladores del citoesquelet, d'aquesta manera el transport axonal es veu compromès produint-se així disfuncions sinàptiques i neurodegeneració (Roy *et al.*, 2005; Trojanowski *et al.*, 2005). De fet, s'ha vist com molècules estabilitzadores de microtúbuls disminueixen la hiperfosforilació de tau i la mort neuronal per A $\beta$  (Michaelis *et al.*, 2004) i el paclitaxel, un fàrmac que estabilitza el complex MT-tau, disminueix la neurodegeneració en un model murí de MA (Zhang *et al.*, 2005).

Tot i que encara avui no se sap del cert el mecanisme exacte pel qual alteracions en la proteïna tau poden generar neurodegeneració, s'ha postulat que els efectes tòxics dels NFT es deguin a la gran mida d'aquests acúmuls a dins de les neurones exercint així

una alteració física directa al transport axonal. A més a més, els NFT poden contribuir a l'avanç de la neurodegeneració segregant cada vegada més tau i amplificant la pèrdua de funció d'aquesta proteïna. S'hauria de tenir en compte que els efectes tòxics de guany de funció davant dels de pèrdua de funció són difícils de diferenciar entre ells i que no són excloents l'un de l'altre. D'aquesta manera, una combinació d'aquests dos efectes podria ser la que generés la neurodegeneració (Ballatore *et al.*, 2007).

### **1.2.3 Alteracions sinàptiques**

L'edat avançada és el factor de risc més important per a patir la MA i, de fet, l'envelliment per si mateix genera pèrdua de sinapsis (Masliah *et al.*, 1993) i aquesta pèrdua afecta més sensiblement al gir dentat de l'hipocamp (Lister i Barnes, 2009). Tanmateix, els individus amb MCI tenen un 18 % menys de sinapsis hipocampals que persones sanes de la mateixa edat i la reducció de sinapsis en malalts de MA lleu arriba fins al 55%. A més, els malalts amb MA lleu mostren una disminució del volum de la capa neuronal *stratum radiatum* de l'hipocamp en comparació a malalts amb MCI i individus sans (Scheff *et al.*, 2007).

A més a més, els pacients amb MA lleu presenten una reducció del 25% de la proteïna presinàptica sinaptofisina, mentre que les altres proteïnes sinàptiques mostren nivells normals. Ja en estadis de MA moderada o greu les també proteïnes sinàptiques sinaptotagmina i proteïna associada al creixement 43 tenen nivells més baixos que en comparació a persones de CDR 0 o 0,5 (Masliah *et al.*, 2001). Diversos estudis han quantificat la pèrdua sinàptica i la pèrdua neuronal durant el transcurs de la MA i s'ha vist que la pèrdua sinàptica és molt més acusada que la pèrdua neuronal. A més a més, aquesta pèrdua sinàptica mostra una millor correlació amb les puntuacions de demència que no pas la pèrdua neuronal (Terry *et al.*, 1991). A més, la transmissió basal d'impulsos aïllats i la potenciació a llarg termini (*long-term potentiation*, LTP) es veuen afectades en ratolins amb plaques senils (Larson *et al.*, 1999) així com després d'administrar el pèptid A $\beta$  a rates Wistar sanes (Walsh *et al.*, 2002) i a cultius de llesques de cervell (Wang *et al.*, 2004).

### **1.2.4 Depleció de neurotrofines i neurotransmissors**

El treball de Rita Levi-Montalcini i Angeletti que va conduir a la caracterització del factor de creixement nerviós (*nerve growth factor*, NGF) (Levi-Montalcini i Angeletti, 1963) va establir les bases per al descobriment de que la proliferació, diferenciació i

supervivència de les neurones i cèl·lules glials es troba sota el control d'una petita família de factors de creixement, les neurotrofines. En els mamífers, es troben les diferents neurotrofines (NT) NGF, factor neurotròfic derivat del cervell (*brain-derived neurotrophic factor*, BDNF), NT-3 i NT-4/5 (Schechteron i Bothwell, 2010).

Els nivells normalment alts de receptors de NT en neurones colinèrgiques del telencèfal basal es veu molt reduït en l'última etapa de la MA. De fet, s'ha vist com en ratolins amb reducció en la mida i el nombre de neurones colinèrgiques del telencèfal basal, la injecció intracerebroventricular d'NGF reverteix aquesta reducció (Cooper *et al.*, 2001). A més, un assaig en fase 1 amb el gen d'NGF va mostrar una millora en la cognició i un increment del metabolisme de glucosa al còrtex cerebral de malalts d'Alzheimer, i hi ha més estudis planificats en aquesta direcció (Tuszynski 2007). D'altra banda, els nivells de BDNF es troben reduïts a la MA i l'MCI (Connor *et al.*, 1997) així com el seu mRNA (Holsinger *et al.*, 2000) i aquest fet es reproduïx en cultius cel·lulars després d'administrar oligòmers d'A $\beta$ <sub>42</sub> (Garzon i Fahnstock, 2007). En estudis amb ratolins *knockout* per BDNF o pel seu receptor TrkB s'ha vist com l'administració de BDNF millora l'aprenentatge i la memòria d'aquests ratolins (Murer *et al.*, 2001). De la mateixa manera, s'ha vist com el tractament amb BDNF afavoreix la supervivència neuronal, la funció sinàptica i memòria en ratolins transgènics J20, model de MA, i en rates Wistar i simis d'edat avançada (Nagahara *et al.*, 2009). Tant és així que l'administració local de BDNF i potser també el seu receptor han estat suggerits com un possible tractament per la MA (Pezet i Malcangio, 2004).

El dèficit de projeccions colinèrgiques en la MA ha estat associat amb la patologia produïda per A $\beta$  i tau. Els receptors d'acetilcolina (ach) nicotínics presinàptics  $\alpha$ -7 són essencials pels processos cognitius i els seus nivells es veuen incrementats a la MA lleu (Ikonovic *et al.*, 2009) per després veure's disminuïts en les següents etapes de la MA (Hellström-Lindahl *et al.*, 1999). A més, s'ha vist com el pèptid A $\beta$  s'uneix al receptor nicotínic  $\alpha$ -7 generant una disminució en l'alliberament d'ach i en el manteniment de l'LTP (Wang *et al.*, 2000).

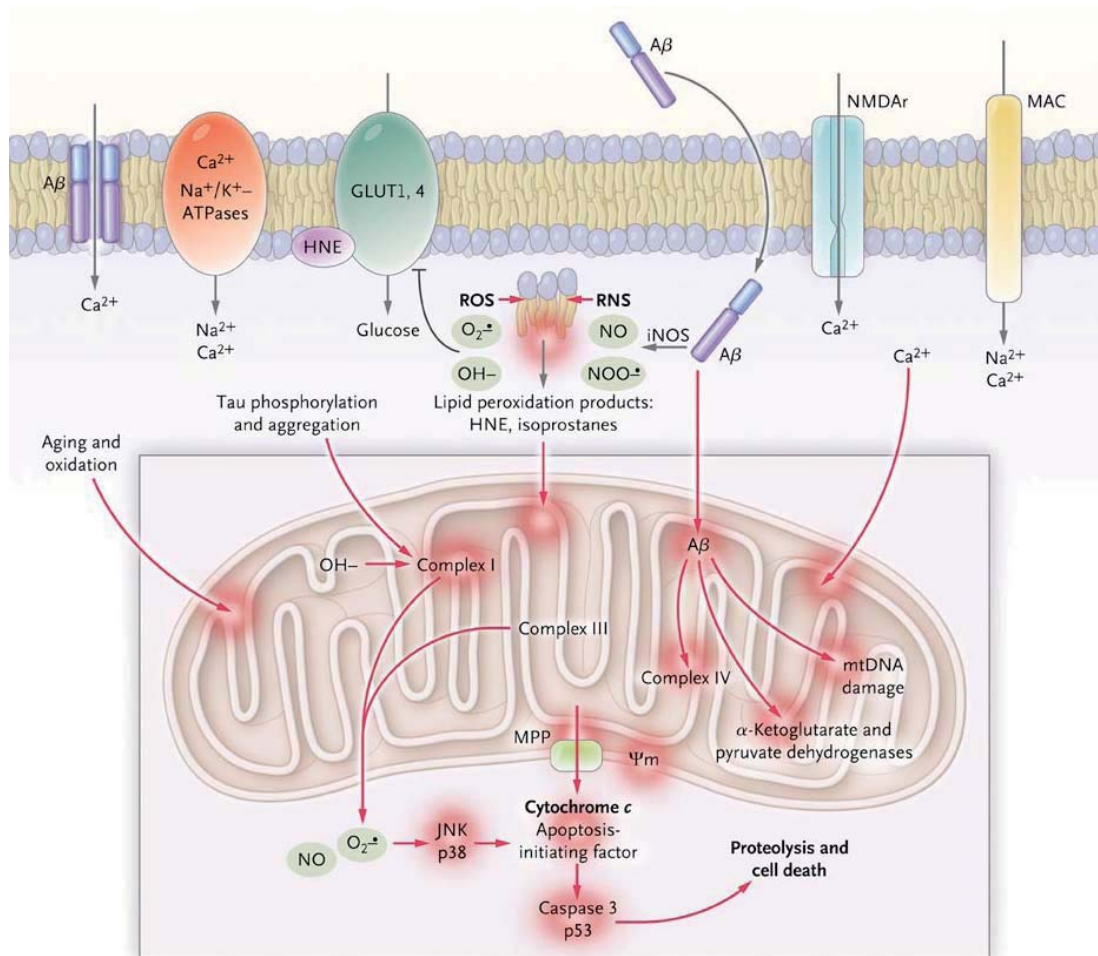
Els nivells dels receptors muscarínics d'ach es troben també disminuïts en cervell d'individus amb MA. L'estimulació farmacològica dels receptors dels receptors muscarínics postsinàptics M1 activa la proteïna C i afavoreix el processament de l'APP per la via no amiloidogènica (Nitsch, 1996). A més, l'activació dels receptors  $\alpha$ -7 i M1 limita la fosforilació de tau (Bitner *et al.*, 2009; Caccamo *et al.*, 2006). Avui en dia, els tractaments farmacològics per a la MA inclouen els inhibidors de la colinesterasa

donepezil, galantamina i rivastigmina i, en comparació amb placebo, aquests fàrmacs són capaços d'estabilitzar o alentir el declivi cognitiu, funcional, de comportament, i el canvi global en malalts de MA (Hansen *et al.*, 2008). Tanmateix, els inhibidors de la colinesterasa perden eficàcia amb el temps (Takeda *et al.*, 2006). L'ús d'agonistes i moduladors de receptors d'ach nicotínics  $\alpha$ -7 està encara sota investigació i s'han dut a terme ja assaigs clínics amb agonistes selectius M1 com la xanomelina, on s'han mostrat millores en la cognició (Bodick *et al.*, 1997) i amb cevimelina i talsaclidina on es va veure una reducció en els nivells d'A $\beta$  en el líquid cefaloraquídi (LCR) (Nitsch *et al.*, 2000; Hock *et al.*, 2003). Aquests assaigs però, s'han vist obstaculitzats pels efectes secundaris deguts a l'activació perifèrica dels receptors d'ach (Conn *et al.*, 2009).

### 1.2.5 Disfunció mitocondrial

Diversos estudis mostren acumulació d'A $\beta$  en mitocondris danyats estructuralment en malalts de MA (Hirai *et al.*, 2001) i en cervells d'animals transgènics (Caspersen *et al.*, 2005). De fet, en la MA, l'exposició a A $\beta$  inhibeix enzims clau mitocondrials al cervell així com *in vitro* (Hauptmann *et al.*, 2006). A més, tant en la MA com en el procés normal d'envelliment, el DNA mitocondrial (DNAm) pateix uns alts nivells de dany oxidatiu (Hirai *et al.*, 2001). Aquesta inestabilitat i la incapacitat de reparació del genoma mitocondrial cerebral permet l'acumulació de mutacions al DNAm (Wallace, 1999). D'aquesta manera, el transport d'electrons, la producció d'ATP, el consum d'oxigen i el potencial de membrana mitocondrial es troben alterats. L'augment en la formació de radicals superòxids i la transformació en peròxid d'hidrogen genera estrès oxidatiu, alliberament del citocrom c i apoptosi (Fig. 4) (Querfurth i LaFerla, 2010).

L'òxid nítric produït en resposta al pèptid A $\beta$  en la MA genera fissió mitocondrial, pèrdua sinàptica i dany neuronal, ja que s'altera (mitjançant s-nitrosilació) la proteïna lligada a dinamina (Drp1) que regula la fissió mitocondrial. De fet, el complex òxid nítric-Drp1 es troba augmentat en pacients amb MA i la inhibició d'aquesta nitrosilació n'anul·la la toxicitat, fet que podria ajudar a prevenir la neurodegeneració (Cho *et al.*, 2009). A més, el dimebon, un fàrmac usat a Rússia com a antihistamínic (Bachurin *et al.*, 2001) ha estat descrit com a protector mitocondrial (Bachurin *et al.*, 2003) i s'ha comprovat que té efectes beneficiosos cognitius i comportamentals en pacients amb MA lleu a moderada (Doody *et al.*, 2008).



**Fig.4 Dany mitocondrial i estrès oxidatiu en la MA.** Des d'un punt de vista centrat en l'Aβ, aquest pèptid indueix la formació d'espècies reactives d'oxigen i el nitrogen que generen toxines mitocondrials. El dany oxidatiu a proteïnes de membrana i l'estimulació de l'entrada del Ca<sup>2+</sup> generen increments cel·lulars d'aquest ió. A més a més, l'Aβ ataca el complex IV (citocrom c) i danya el DNA mitocondrial; modificat de Querfurth i LaFerla, 2010.

### 1.2.6 Estrès oxidatiu

L'estrès oxidatiu en el cervell de malalts d'Alzheimer està molt documentat (Su *et al.*, 2008). De fet, en models experimentals s'ha vist que marcadors de dany oxidatiu precedeixen els canvis patològics de la MA (Nunomura *et al.*, 2001). A més, s'han trobat nivells alterats d'enzims antioxidants en cervell de malalts amb MA en comparació amb persones de la mateixa edat i diversos estudis han mostrat un increment dels grups carbonils com a marcadors d'estrès oxidatiu en hipocamp i còrtex parietal, estructures particularment danyades en MA, i no en cerebel, on la patologia típica de la MA és menys significativa (Hensley *et al.*, 1995).

Si ens fixem en l'estadi preclínic de la MA, l'MCI, s'ha vist com al cervell d'aquests individus hi ha uns nivells inferiors de proteïnes així com d'activitat antioxidant enzimàtica i no enzimàtica, mentre els nivells totals de proteïnes es mantenen inalterats (Guidi *et al.*, 2006; Sultana *et al.*, 2008) i aquesta disminució en l'activitat antioxidant podria conduir a un augment dels radicals lliures durant la progressió de MCI a MA lleu (Sultana i Butterfield, 2010). A més, varis estudis han mostrat com en cervell de malalts de MCI en comparació amb individus control hi ha uns nivells elevats de diversos marcadors d'estrès oxidatiu i peroxidació lipídica, com grups carbonils, 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) unit a proteïnes, HNE lliure, substàncies reactives a àcid tiobarbitúric, 3-nitrotirosina i malondialdèhid (Keller *et al.*, 2005; Butterfield *et al.*, 2006a; Butterfield *et al.*, 2006b; Williams *et al.*, 2006; Butterfield *et al.*, 2007). A més a més, també s'han trobat alts nivells dels marcadors d'estrès oxidatiu F2-isoprostans, en plasma, orina i líquid cefaloraquídi en malalts amb MCI en comparació amb individus sans de la mateixa edat (Markesbery *et al.*, 2005) i aquests malalts presenten també nivells elevats de diversos marcadors de dany oxidatiu tant en DNA nuclear com en mitocondrial (Migliore *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006).

De la mateixa manera, en malalts amb MA lleu s'ha descrit un increment de la base oxidada 8-hidroxiguanosina per després disminuir a mesura que la càrrega amiloïdal i de tau augmenten, suggerint que el dany oxidatiu a l'RNA és un dels primers esdeveniments en la progressió de la MA (Nunomura *et al.*, 2001). A més, en cervell de malalts amb MA lleu s'han vist nivells elevats d'oxidants com espècies reactives del nitrogen (Reed *et al.*, 2009a) i d'HNE unit a proteïnes (Reed *et al.*, 2009b).

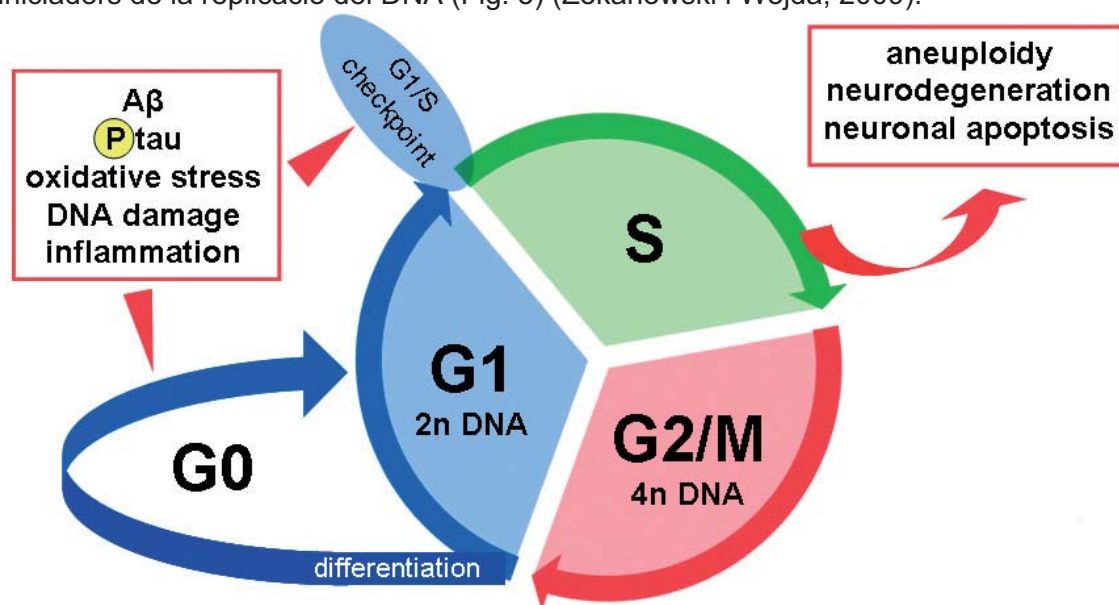
Prenent tots aquests fets en conjunt, queda clar com l'estrès oxidatiu és un dels fets neuropatològics present en les diverses fases de la MA i un estudi més exhaustiu d'aquest dany oxidatiu podria donar a lloc a desenvolupar teràpies per a aquesta malaltia (Sultana i Butterfield, 2010). Tanmateix, tot i que els estudis fets amb models animals i amb població envellida mostren certa associació entre ingesta d'antioxidants i rendiment cognitiu, els estudis clínics realitzats fins avui en dia amb antioxidants han fracassat (Praticò, 2008).

### **1.2.7 Reentrada al cicle cel·lular**

En el sistema nerviós central (SNC), el cicle cel·lular té a lloc en associació a la neurogènesi on les neurones madures es troben en estat post mitòtic, detingudes a la fase G0. De fet, aquestes neurones ja diferenciades mostren un fort bloqueig per evitar

la seva reentrada al cicle cel·lular. Se suposa que aquest bloqueig està relacionat amb la degradació de les molècules de cicle cel·lular mitjançant el complex ubiquitina proteasoma (Staropoli i Abeliovich, 2005). A més, la unió de la proteïna del retinoblastoma a factors de transcripció de la família de l'E2F és capaç de bloquejar-ne l'activitat impedit també l'activació de la maquinària de transcripció de la cèl·lula (Harbour i Dean, 2000).

La proteïna tau fosforilada (Chee *et al.*, 2005), l'estrès oxidatiu, els pèptid A $\beta$  i C99 (Klein i Ackerman, 2003) i la neuroinflamació característics de la MA poden ser iniciadors de la replicació del DNA (Fig. 5) (Zekanowski i Wojda, 2009).



**Fig. 5 Reentrada al cicle cel·lular de neurones diferenciades i madures en la MA.** Les neurones entren en l'etapa G0 i es fan resistents davant estímuls mitogènics. No obstant, estímuls repetitius i prolongats de senyals de proliferació (A $\beta$ , tau fosforilada, estrès oxidatiu, dany del DNA i inflamació) condueixen a la reentrada de les neurones al cicle cel·lular. El fracàs del punt de control G1/S permet la síntesi d'ADN però el cicle no progressa més enllà de la fase S. El resultat final és aneuploidia, neurodegeneració i mort cel·lular; prové de Zekanowski i Wojda, 2009.

Tant és així que en anàlisis post mortem de cervells de pacients amb MCI s'han trobat nivells elevats de proteïnes de cicle cel·lular (Yang *et al.*, 2003). De la mateixa manera, en hipocamp de malalts de MA s'han observat nivells elevats i localització aberrant de proteïnes de cicle cel·lular, com les ciclins D, E i B, així com les quinases dependents de ciclina (CDK) CDK1 i CDK4, l'antigen nuclear de proliferació cel·lular i inhibidors de CDK, com p21 i p105 (McPhie *et al.* 2003; Yang i Herrup, 2007). A més, també s'ha vist un augment en la replicació del DNA en hipocamp i còrtex frontal d'individus amb MA en comparació amb altres zones del cervell o amb hipocamp i còrtex frontal d'individus sans (Yang *et al.*, 2001).

D'aquesta manera, una reentrada al cicle cel·lular produïda per una fallada en el control del punt de restricció G1/S permet que se sintetitzi nou DNA encara que el cicle no progressi a través de la fase S; produint-se així aneuploidia, neurodegeneració i mort cel·lular (Fig. 5) (Zekanowski i Wojda, 2009). De manera curiosa, les estatines, fàrmacs àmpliament utilitzats en el tractament de la hipercolesterolèmia, i que s'han descrit com a molècules possiblement beneficioses en el tractament de la MA, són uns fàrmacs que bloquegen el cicle cel·lular en el punt de restricció G1/S (Sala *et al.*, 2008).

### **1.2.8 Neuroinflamació i gliosi**

Les cèl·lules de la micròglia són considerades com l'equivalent funcional dels macròfags en el SNC i són les cèl·lules principals residents del sistema immune del cervell (Lue *et al.*, 2001). Diversos estudis han documentat una major presència de la micròglia reactiva en cervell de no només pacients amb MA si no també en diversos models de ratolins transgènics (Combs, 2009). De fet, es pot trobar micròglia activada i astròcits reactius adjacents a plaques neurítiques i els marcadors bioquímics d'aquestes cèl·lules estan elevats en la MA (Wyss-Coray i Mucke, 2002). Així, la inflamació present en la MA s'ha postulat que pot ser deguda a que els dipòsits d'A $\beta$  poden activar astròcits (Cairns *et al.*, 1992) i micròglia (Tan *et al.*, 1999; Combs *et al.*, 2001).

Inicialment, la micròglia fagocita els pèptids A $\beta$ . No obstant, la micròglia activada crònicament allibera varies quimiocines (IL-8, MIP-1- $\alpha$ , MIP-1- $\beta$ , MCP-1) i citocines (interleucina-1, interleucina-6 i factor de necrosi tumoral (TNF- $\alpha$ )) (Akiyama *et al.*, 2000). A més, tal i com passa amb les cèl·lules endotelials cerebrals (CEC) vasculars, la micròglia expressa receptors per a productes finals de la glucosilació avançada (RAGE) que s'uneixen als pèptids A $\beta$ , fet que genera més citocines, glutamat i òxid nítric (Yan *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2003). A més, s'ha vist com els pèptids A $\beta_{40}$  i A $\beta_{42}$  poden estimular la secreció de quimiocines induint així quimioatracció i infiltració de monòcits de la sang al cervell afectat (Simard *et al.*, 2006). A més, tant les plaques senils com els NFT contenen productes de processament del sistema complement com C1q i C5b-9, indicant que l'opsonització i l'atac autolític estan en marxa (Akiyama *et al.*, 2000). A més, astròcits activats poden alliberar reactius de fase aguda com la proteïna C reactiva, l' $\alpha$ 1-antiquimiotripsina i l' $\alpha$ 2-macroglobulina, els quals poden ser tan beneficiosos com perjudicials en la MA (Querfurth i LaFerla, 2010).



Els diferents papers que té la micròglia en la MA, eliminant A $\beta$  i alliberant mediadors inflamatoris, compliquen el tractament (Fiala *et al.*, 2005). Tanmateix, el paper de la inflamació en la MA queda avalat per la reducció, o la tendència cap aquesta reducció, del risc de patir MA en pacients amb un ús crònic d'antiinflamatoris no esteroïdals (AINE) en comparació amb pacients amb un ús esporàdic (McGeer *et al.*, 1990). A més, aquesta reducció del risc de patir la malaltia s'ha vist també en models transgènics de MA (McGeer i McGeer, 2007). D'altra banda, tot i no negar aquest possible benefici però moguts pel fracàs mostrat en diversos assaigs clínics amb AINE en la MA, diferents autors qüestionen aquesta reducció en el risc i reclamen nous estudis amb diferents molècules (Veld *et al.*, 2001; Tuppo i Arias, 2005)

### **1.2.9 Alteracions vasculars**

Diferents estudis fets en humans usant imatges per ressonància magnètica, doppler transcranial, i tomografia per emissió de fotó únic (SPECT) en humans han demostrat que el flux sanguini cerebral (FSC) en repòs es troba significativament reduït en malalts de MA i que aquest pot ser un esdeveniment precoç en la patogènesi de la MA (Bell i Zlokovic, 2009). A més, s'ha vist que davant de tasques que impliquen l'ús de la memòria episòdica, els pacients amb MCI mostren una adaptació del FSC retardada en comparació amb individus sans, i aquesta resposta és encara més lenta en pacients de MA (Rombouts *et al.*, 2005). D'aquesta manera, es mostra com ja podem trobar reduccions del FSC a les fases preclíniques de la MA, com l'MCI, i que continuen presents durant les fases ja clíniques de la MA.

D'altra banda, estudis de tomografia d'emissió de positrons (PET) amb 18-Flúor-Desoxi-Glucosa (FDG) i amb l'objectiu d'identificar, localitzar i quantificar el consum de glucosa han mostrat que tant els individus amb MCI com els que mostren un diagnòstic de MA possible o probable pateixen una reducció en la captació cerebral de glucosa abans d'entrar en la fase clínica de MA lleu (Drzezga *et al.*, 2003; Hunt *et al.*, 2007). A més, aquesta deficiència en la captació de glucosa no és resultat de l'atròfia cerebral característica de la MA si no que podria precedir a la neurodegeneració de la MA (Samuraki *et al.*, 2007). Altres estudis han suggerit la reducció d'FDG-PET en hipocamp durant l'envelliment com a marcador predictiu del declivi cognitiu (Mosconi *et al.*, 2006).

A més, també s'han descrit canvis de microvasculatura cerebral en pacients amb MA, com augment del nombre de vasos sanguinis fragmentats junt amb una reducció de

les branques intactes, aparició de restes de vasos atrofics, reducció de la densitat microvascular, augment de la irregularitat de la superfície dels capil·lars, canvis marcats en el diàmetre dels vasos, engrossiment de la membrana basal capil·lar i acumulació de col·lagen a la membrana basal (Farkas i Luiten, 2001; Bailey *et al.*, 2004). A més a més, també s'ha demostrat un augment del col·lagen IV (Kalaria i Pax, 1995), dipòsits a la membrana basal d'heparan sulfat proteoglicans (HPSG) i laminina (Verbeek *et al.*, 1999; Berzin *et al.*, 2000), degeneració de les CEC (Kalaria i Hedera, 1995) així com edema als processos pediculars dels astròcits i un augment en el nombre de vesícules pinocítiques a les CEC (Farkas i Luiten, 2001; Bailey *et al.*, 2004).

En un estudi clínic s'ha associat l'ús d'inhibidors de l'enzim convertidor d'angiotensina en adults amb hipertensió amb reduccions en el declivi cognitiu, tot i que no es va veure una reducció en el risc de patir demència (Sink *et al.*, 2009). Tanmateix, pacients hipertensos en tractament van mostrar menys plaques senils i NFT en exàmens post mortem que individus hipertensos no tractats i no hipertensos, essent aquests dos grups no diferents en quant a plaques senils i NFT (Hoffman *et al.*, 2009).

### **1.3 Models animals**

El ratolí és la principal espècie utilitzada en la investigació de la MA, però una perspectiva addicional ha estat afegida amb l'addició d'espècies com el cuc *Caenorhabditis elegans*, la mosca de la fruita (*Drosophila melanogaster*), dos tipus de peixos, la llampresa de mar (*Petromyzon marinus*) i el peix zebra (*Danio rerio*), així com altres models d'envelliment espontani. El descobriment que, en les formes familiars de MA, els gens que codifiquen les proteïnes que es dipositen en les plaques senils i els NFT (*APP* i *MAPT*, respectivament) estan mutats, suggereix un paper causal d'aquestes proteïnes en la malaltia i va portar a la generació de diverses soques de ratolins transgènics (Götz *et al.*, 2007). Tanmateix, cal notar que també hi ha alguns models transgènics de rata disponibles (Koson *et al.*, 2008). La llista de soques és llarga i segurament incompleta, però degut a la gran varietat de soques i models de MA generades des dels anys 1990, és impossible presentar-les totes (Götz i Götz, 2009).

### 1.3.1 Models de ratolins transgènics

#### 1.3.1.1 Models de tau

Els primers models transgènics van utilitzar per primera vegada l'expressió de proteïna tau humana no modificada (*wild type*, WT) de quatre repeticions (Götz *et al.*, 1995) i de tres repeticions (Brion *et al.*, 1999). Aquests ratolins reproduïen varis aspectes de la patologia de la MA, com ara la hiperfosforilació somatodendrítica de tau. Posteriorment, es van utilitzar promotors més forts per dirigir l'expressió i obtenir fenotips més pronunciats (Ishihara *et al.*, 1999; Spittaels *et al.*, 1999; Probst *et al.*, 2000). No obstant això, malgrat una disminució de la solubilitat de tau dependent de l'edat, els ratolins no mostraven NFT a no ser que arribessin a edats molt avançades (Ishihara *et al.*, 2001).

Algunes soques representatives amb formació d'NFT són la JNPL3 (Lewis *et al.*, 2000) i pR5 (Götz *et al.*, 2001a), les quals expressen la proteïna tau mutant P301L (Götz i Götz, 2009). Els animals de la soca JNPL3 van ser els primers ratolins que portaven la proteïna tau humana P301L en mostrar NFT (Lewis *et al.*, 2000). Aquesta soca de ratolins desenvolupa alteracions motores als 10 mesos d'edat més pronunciades que les observades en animals amb tau humana WT (Ishihara *et al.*, 1999; Spittaels *et al.*, 1999; Probst *et al.*, 2000) i mostra NFT al cervell i medul·la espinal, a més de presentar una reducció neuronal a la medul·la espinal del 50% (Lewis *et al.*, 2000). D'altra banda, la soca de ratolins pR5 reproduïx la neuropatologia d'NFT de la MA (Götz *et al.*, 2001b) i mostren un deteriorament del comportament relatiu al hipocamp i l'amígdala semblant al de la MA (Götz i Ittner, 2008).

Un altre aspecte a tenir en compte és el recent concepte de transmissió i propagació de tau (Götz i Götz, 2009). Mitjançant mètodes d'estereotàxia (Clavaguera *et al.*, 2009), es genera un extracte de cervell de ratolins amb tau P301S, els quals formen NFT als 6 mesos d'edat (Allen *et al.*, 2002), i s'injecta en cervells de ratolins de 3 mesos d'edat ALZ17 (Probst *et al.*, 2000; Götz i Nitsch, 2001c), una soca d'animals amb tau humana WT i que no forma NFT tot i mostrar-ne la patologia associada (Clavaguera *et al.*, 2009). L'estudi dut a terme per Clavaguera i cols (2009) va veure com l'extracte generava NFT als ratolins que prèviament no en generaven, un fet que van anomenar "transmissió". En segon lloc, es va veure com la inducció d'NFT no es quedava localitzada a la zona d'injecció, si no que difonia progressivament a regions cerebrals veïnes, una característica que van anomenar "propagació". Finalment, els

investigadors van concloure que els efectes es devien a la fracció de proteïna tau insoluble i no pas a la fracció soluble (Clavaguera *et al.*, 2009).

#### 1.3.1.2 Models d'A $\beta$

Els ratolins que expressen la proteïna APP mutant i que reproduïxen la formació de plaques d'A $\beta$  així com la pèrdua de memòria típiques de la MA són l'eina més utilitzada per estudiar els mecanismes patològics relacionats amb la MA *in vivo* (Götz i Ittner, 2008). Dels molts ratolins mutants APP que han estat generats, les soques PDAPP (Games *et al.*, 1995), J20 (Mucke *et al.*, 2000), APP23 (Sturchler-Pierrat *et al.*, 1997) o Tg2576 (Hsiao *et al.*, 1996) són de les més utilitzades degut a la seva correlació entre la patologia i l'expressió d'APP i A $\beta$ .

Els ratolins transgènics PDAPP expressen nivells elevats de la proteïna mutant humana APP, on una fenilalanina substitueix a una valina al residu 717, mutació coneguda com a Indiana (APP<sub>Ind</sub>) pel lloc on es va descriure per primera vegada (Murrell *et al.*, 1991). Aquests animals desenvolupen diversos trets patològics comuns a la MA, com plaques senils, pèrdua sinàptica i gliosi (Games *et al.*, 1995). A més, aquests ratolins també desenvolupen dèficits en el reconeixement d'objectes similars als vistos en malalts de MA en paral·lel a la càrrega amiloïdal cerebral (Dodart *et al.*, 2000).

Els animals de la soca J20 expressen la proteïna APP amb dues mutacions, APP<sub>Ind</sub> i la Sueca (APP<sub>Swe</sub>) on els aminoàcids lisina i metionina de les posicions 670 i 671 es substitueixen per asparagina i leucina respectivament (Mullan *et al.*, 1992). Aquests animals mostren dipòsits d'A $\beta$  i plaques senils als 11 mesos (Mucke *et al.*, 2000) tot i que no presenten NFT o pèrdua neuronal (Hsia *et al.*, 1999; Arancio *et al.*, 2004).

Els animals APP23 són ratolins que expressen l'APP<sub>Swe</sub> i mostren un increment de fins a 7 vegades en la producció d'APP humana (Szot *et al.*, 2009). Les primeres plaques senils apareixen al còrtex frontal i al subicle de l'hipocamp al sis mesos i a mesura que l'animal envellaix les plaques creixen en grandària per passar a ocupar també el tàlem i l'amígdala als 12 mesos, i diferents àrees de l'hipocamp i el neocòrtex als 24 mesos (Sturchler-Pierrat *et al.*, 1997). A més, diversos estudis descriuen diverses alteracions cognitives i del comportament dels ratolins APP23 (Szot *et al.*, 2009) així com alteracions en el sistema de transmissió colinèrgica (Van Dam *et al.*, 2005).

Els ratolins de la soca Tg2576 presenten també l'APP<sub>Swe</sub> (Hsiao *et al.*, 1996). Aquests animals són un dels models de MA més estudiats i desenvolupen patologia amiloide així com alteracions dependents de l'edat en la memòria espacial, l'aprenentatge i l'LTP (Chapman *et al.*, 1999; Kawarabayashi *et al.*, 2001). Recentment, una espècie dodecamèrica soluble de l'A $\beta$  anomenada A $\beta$ \*56 ha estat descoberta en ratolins Tg2576 i s'ha vist com els dèficits de memòria i aprenentatge apareixien alhora que els nivells d'A $\beta$ \*56 augmentaven i, a més, la infusió d'un extracte d'A $\beta$ \*56 altera la memòria a rates joves (Lesné *et al.*, 2006).

S'han desenvolupat també models de ratolins intervenint genèticament en l'activitat de les secretases  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ . Per exemple, la introducció de la mutació M146L a la PS1 en ratolins amb mutacions a l'APP van incrementar la formació d'A $\beta$ <sub>42</sub> i els seus dipòsits així com també va aparèixer pèrdua neuronal i alteracions del comportament (Holcomb *et al.*, 1998; Schmitz *et al.*, 2004). D'altra banda, el ratolí APP(SL)PS1K1 és un animal amb les mutacions M233T/L235P a la PS1 que, a més, sobreexpressa la forma humana d'A $\beta$ <sub>42</sub>. Aquest animal presenta uns nivells elevats d'A $\beta$ <sub>42</sub> així com formes d'A $\beta$ <sub>42</sub> truncades a la part N-terminal de manera semblant a la MA. Als sis mesos es pot observar pèrdua neuronal i una forta gliosi, i als deu mesos d'edat la pèrdua neuronal a les zones CA1 i CA2 de l'hipocamp arriba al 50% i apareixen agregats d'A $\beta$ <sub>42</sub> intraneuronals tot i que no n'apareixen d'extracel·lulars (Casas *et al.*, 2004)

A més, també s'ha observat una disminució en la formació d'A $\beta$  i els seus dipòsits reduint l'activitat  $\beta$ -secretasa BACE-1, mitjançant el creuament de ratolins BACE<sup>-/-</sup> amb ratolins Tg2576 (Ohno *et al.*, 2004) i PDAPP (McConlogue *et al.*, 2007) i, de manera anàloga, una sobreexpressió de BACE en ratolins amb la mutació V717I a l'APP (APP<sub>Lon</sub>) (Moechars *et al.*, 1999) va incrementar la formació de plaques senils (Willem *et al.*, 2004). D'altra banda, una sobreexpressió de l' $\alpha$ -secretasa ADAM10 en ratolins amb l'APP<sub>Lon</sub> va mostrar una reducció en els nivells d'A $\beta$ , va reduir els dèficits en el comportament i va disminuir també les alteracions en l'LTP (Postina *et al.*, 2004).

#### 1.3.1.3 Modelant l'eix Tau – A $\beta$ – PS - ApoE

No només s'han creat línies de ratolins amb patologia únicament per la proteïna tau o l'A $\beta$ , si no que també hi ha ratolins transgènics per les dues o més proteïnes que intenten apropar-se als trets patològics característics de la MA.

El creuament dels animals Tg2576 amb la soca JNPL3 així com la injecció de la forma A $\beta$ <sub>42</sub> a ratolins pR5 va generar animals amb patologia per NFT i va incrementar els nivells de tau fosforilada (Lewis *et al.*, 2001; Götz *et al.*, 2001b). De la mateixa manera, la formació d'NFT es va agreujar amb la infusió d'extractes cerebrals de ratolins APP23 a ratolins JNPL3 o bé també amb el creuament d'aquestes dues soques (Bolmont *et al.*, 2007). D'altra banda, els ratolins 3xTg-AD són animals triple transgènics ja que porten la mutació de la PS1 M146V, l'APP<sub>Swe</sub> i la tau P301L. Aquesta soca de ratolins desenvolupa dipòsits d'A $\beta$  que s'inicien al còrtex i apareixen al hipocamp amb l'envelliment, mentre que la patologia de tau apareix per primera vegada al hipocamp i després progressa cap al còrtex (Oddo *et al.*, 2003a). A més, també presenten alteracions sinàptiques i en l'LTP dependents de l'edat (Oddo *et al.*, 2003b). Un tret a tenir en compte és l'al·lel ApoE  $\epsilon$ 4, que és l'únic factor de risc genètic per patir la MA d'aparició tardana, tot i que la presència d'aquest al·lel no sigui ni necessària ni determinant per a patir la malaltia (Saunders *et al.*, 1993). El creuament de ratolins PDAPP amb ratolins ApoE<sup>-/-</sup> va mostrar uns nivells menors d'A $\beta$  i els seus dipòsits en cervell (Bales *et al.*, 1997) mentre que l'administració d'un lentivirus amb ApoE en va augmentar els nivells (Dodart *et al.*, 2005).

### **1.3.2 Models d'artròpodes, la mosca comuna de la fruita (*Drosophila melanogaster*)**

Diversos models d'invertebrats i, en particular la mosca, s'han convertit en una poderosa eina per a estudiar la neurodegeneració (Driscoll i Gerstbrein, 2003); de fet, una dotzena de diferents línies transgèniques poden ser generades de forma simultània (Götz i Ittner, 2008).

L'expressió de la proteïna tau humana WT o bé la mutada a R406W en *Drosophila melanogaster* genera una expressió i acumulació incrementada d'aquesta proteïna a les neurones i provoca neurodegeneració progressiva i mort prematura tot i que, tal i com passa en diversos models murins, no es produeixen NFT (Dias-Santagata *et al.*, 2007). Tanmateix, quan l'homòleg Shaggy de la Glicogen sintasa quinasa 3 (GSK-3) (Welsh *et al.*, 1996) és induït en mosques amb tau humana sí que apareixen NFT, veient així com un increment en la fosforilació afavoreix la formació de filaments de tau (Jackson *et al.*, 2002).

Prenent avantatge que l'estrès oxidatiu juga un paper important en la MA, es va fer un estudi on es van disminuir genèticament els mecanismes de defensa antioxidant en mosques mutants R406W. Els resultats van mostrar que es va incrementar la toxicitat de tau i va augmentar l'activació de la via apoptòtica per quinases JNK, la reentrada neuronal al cicle cel·lular i la mort neuronal, així mateix l'administració de l'antioxidant  $\alpha$ -tocoferol (Vitamina E) va anul·lar aquesta toxicitat produïda per tau (Dias-Santagata *et al.*, 2007).

Els components proteics del complex  $\gamma$ -secretasa estan molt conservats en *Drosophila melanogaster* (Takasugi *et al.*, 2003). D'altra banda, l'activitat  $\beta$ -secretasa és molt baixa o fins i tot absent (Fossgreen *et al.*, 1998), i l'APP, tal i com passa en ratolins, no conserva el mateix domini A $\beta$  que en humans (Götz i Ittner, 2008). L'expressió de l'APP humana WT o bé APP humana mutada van generar mort neuronal al cervell de larves de *Drosophila melanogaster* (Fossgreen *et al.*, 1998). En un altre estudi es va veure com els cervells de mosques amb A $\beta_{42}$  humana van mostrar una presència abundant de dipòsits amiloides i tant el nombre i la grandària d'aquests dipòsits es van incrementar amb l'envelliment. Per contra, no es van observar dipòsits en mosques amb A $\beta_{40}$  humana o en cervells control. A més l'expressió d'A $\beta_{42}$  humana va generar neurodegeneració, alteracions motores dependents de l'edat i una reducció en l'esperança de vida. Tanmateix, van aparèixer també dèficits d'aprenentatge en les mosques amb expressió humana d'A $\beta_{42}$  i d'A $\beta_{40}$  (Iijima *et al.*, 2004).

### **1.3.3 Models de nemàtodes, el cuc *Caenorhabditis elegans***

La majoria de gens i rutes metabòliques relacionats amb diverses malalties humanes estan presents al cuc *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) i tot i que varis estudis fets amb aquests cucs han proporcionat una gran informació sobre els mecanismes de diverses malalties humanes, encara avui l'ús d'aquest model es qüestiona com a model animal i quina rellevància pot arribar a tenir (Kaletta i Hengartner, 2006).

Tot i que *C. elegans* no té sistema vascular, sí té un sistema nerviós accessible i ben caracteritzat i compta amb diversos gens homòlegs als gens humans implicats en la MA com l'homòleg de l'APP *APL-1*, una mutació del qual resulta en la mortalitat de les larves (Hornsten *et al.*, 2007), dos homòlegs de les PS anomenats *SEL-12* (Levitan i Greenwald, 1995) i *HOP-1* (Li i Greenwald, 1997) així com una única proteïna similar a tau anomenada *PTL-1* (McDermott *et al.*, 1996). L'expressió tant de tau humana WT com mutada a *C. elegans* produeix neurodegeneració (Miyasaka *et al.*, 2005) així com

alteracions presinàptiques i del comportament, essent l'expressió de tau mutada la que genera més severitat en els efectes així com un avançament de l'aparició (Kraemer *et al.*, 2003). D'altra banda, els cucs *C. Elegans* no expressen A $\beta$  endògena per si sols (Götz i Götz, 2009) i el primer estudi on es va generar un model transgènic que expressés aquesta proteïna va observar com es formaven dipòsits d'A $\beta$  als músculs de *C. elegans* (Link, 1995) així com també es va veure un increment en l'estrès oxidatiu sense formació d'acúmul d'A $\beta$  en *C. elegans* transgènics que sobreexpressaven A $\beta_{42}$  (Drake *et al.*, 2003).

Un altre aspecte a tenir en compte és que la diabetis mellitus, amb les seves complicacions, i la MA comparteixen moltes similituds. Totes dues estan relacionades amb l'edat i s'associen amb la formació de productes finals de la glucosilació avançada (*advanced glycation end products*, AGE) i l'estrès oxidatiu, factors que també poden ser observats durant el procés normal d'envelliment en persones humanes. En la diabetis es poden observar dipòsits d'AGE a les zones de les lesions arterioscleròtiques així com en la MA que es poden observar en les plaques senils i els NFT. En *C. elegans* es pot observar com els AGE s'acumulen i un increment en la formació d'AGE i modificació mitocondrial d'aquests són responsables d'augmentar l'estrès oxidatiu i reduir l'esperança de vida d'aquests cucs (Morcos i Hutter, 2009). Tots aquests fets donen suport a l'ús potencial de *C. elegans* com a model d'estudi de la MA (Kaletta i Hengartner, 2006).

#### **1.3.4 Models espontanis**

Tot i que els ratolins, junt amb altres organismes, modificats genèticament són els models animals més utilitzats en la investigació de la MA, altres animals envellits han estat utilitzats en aquest camp (Dhenain, 2001).

Els primats amb edat avançada han estat àmpliament estudiats abans del desenvolupament dels ratolins transgènics (Dhenain, 2008). Alguns d'ells desenvolupen alteracions com ara dipòsits cerebrals d'A $\beta$  (Bons *et al.*, 1991; Gearing *et al.*, 1994) taupaties (Gilissen *et al.*, 1999; Schultz *et al.*, 2000), alteracions cognitives i del comportament (Bartus i Dean, 1985; Picq, 2007) i atrofia cerebral edat-dependent (Andersen *et al.*, 1999; Dhenain *et al.*, 2003).

Els gossos envellits mostren certes característiques que els converteixen també en un model d'estudi de la MA (Cummings *et al.*, 1996a). Presenten alteracions cognitives,



de l'aprenentatge i de memòria (Ruehl *et al.*, 1994), dipòsits d'A $\beta$  cerebrals (Von braunmuhl, 1956) i vasculars (Shimada *et al.*, 1992) així com pèrdua neuronal (Shimada *et al.*, 1991). Tanmateix, sembla que hi ha un clar acord en què el cervell caní d'edat avançada no conté NFT (Cummings *et al.*, 1996a).

En estudis fets amb gats, s'ha vist com animals vells, i no joves, presenten plaques d'A $\beta$ <sub>42</sub> i no d'A $\beta$ <sub>40</sub> així com dipòsits vasculars dels dos pèptids (Cummings *et al.*, 1996b), a més, s'han observat nivells elevats de tau hiperfosforilada i dipòsits intraneuronals de tau (Head *et al.*, 2005).

Els ratolins d'edat avançada poden ajudar a discernir la frontera entre l'envelliment normal i el patològic (Van Dam i De Deyn, 2006). En aquest context prenen especial rellevància els ratolins amb senescència accelerada (SAM) i, en concret, els ratolins SAMP8. Aquesta soca ja ha estat descrita com a model de MA (Morley, 2002; Morley *et al.*, 2004) i presenta varies característiques de la MA com dèficits en l'aprenentatge i la memòria, alteracions emocionals, nivells elevats d'APP i A $\beta$ , patologia neuronal associada a tau, alteracions en el sistema colinèrgic, neurodegeneració i estrès oxidatiu entre d'altres (Takeda, 2009).

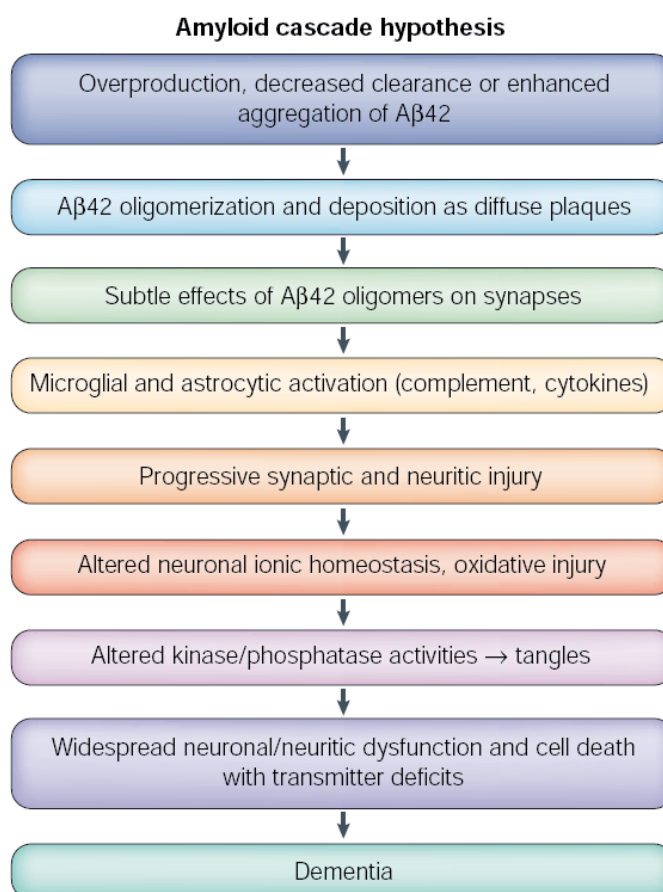
## **1.4. Etiologia i hipòtesis**

Degut a que la MA és un trastorn genèticament heterogeni, es classifica com familiar i esporàdic. La forma familiar es deu a mutacions en els gens que codifiquen les PS i l'APP que condueixen a formes de MA d'inici precoç abans dels 65 en les famílies aïllades que les pateixen (Williamson *et al.*, 2009). La causa de la forma esporàdica de la malaltia és encara avui desconeguda i diverses hipòtesis han estat formulades per tal d'intentar resoldre aquest problema.

### **1.4.1 Hipòtesi de la cascada amiloïdal**

La clonació del gen que codifica l'APP i la seva localització en el cromosoma 21, juntament amb el coneixement previ que la trisomia del cromosoma 21 (síndrome de Down) condueix invariablement a la neuropatologia de la MA, van establir les bases per a la proposta de la hipòtesi amiloïdal, la qual postula que una acumulació d'A $\beta$  i el seu posterior dipòsit en plaques senils és l'esdeveniment principal en la patogènesi de la MA (Hardy i Selkoe, 2002).

La hipòtesis amiloide va ser formulada el 1992 i proposa que els dipòsits d'A $\beta$  són l'agent causant de la MA i que els NFT, la pèrdua cel·lular, el dany vascular i la demència són tots resultats directes d'aquests dipòsits (Hardy i Higgins, 1992). La demostració que mutacions en les PS també incrementen els nivells d'A $\beta$  a través del procés per la via amiloidogènica de l'APP (Scheuner *et al.*, 1996) van donar suport a aquesta hipòtesi. Avui en dia, però, la idea més acceptada per la comunitat científica és que són els oligòmers solubles d'A $\beta$  i no les formes insolubles o les plaques senils els agents causals de la MA (Fig.6) (Haass i Selkoe, 2007).



**Fig.6 Hipòtesi de la cascada amiloïdal de la MA.** La cascada s'inicia amb la generació d'A $\beta$ <sub>42</sub>. Els oligòmers d'A $\beta$  poden afectar directament a les sinapsis i els axons neuronals. A més a més, els oligòmers poden també activar la microglia i els astròcits. La patologia produïda per tau, que contribueix substancialment al procés de la malaltia, és desencadenada per A $\beta$ <sub>42</sub>; prové de Citron, 2004.

No obstant, la hipòtesi de la cascada amiloïdal és encara avui un motiu de controvèrsia. La presència de plaques senils en individus normals, la naturalesa incerta de les espècies patògenes d'A $\beta$ , i el fracàs continu dels estudis clínics centrats en l'A $\beta$  fan que diversos autors qüestionen aquesta hipòtesi. Tot i això, l'estat actual del coneixement no pot provar ni refutar la hipòtesi amiloide, sinó que més aviat s'apunta a la necessitat de la seva reavaluació. La visió que l'A $\beta$  és un dels diversos

factors en comptes de l'únic factor causant de la MA és més consistent amb els coneixements actuals (Pimplikar, 2009).

#### **1.4.2 Hipòtesi de Tau**

El fet que els NFT es donen a nivell neuronal, ocupen pràcticament la neurona sencera i, presumptament, en generen la mort; així com es poden trobar nombrosos NFT extracel·lulars amb forma de neurona en les últimes fases de la malaltia van portar a pensar que els NFT de la proteïna tau són el factor central de la MA (Mudher i Lovestone, 2002). La hipòtesi dels cabdells de tau sosté que en la MA, la funció normal de la proteïna tau d'estabilització dels MT es veu afectada i, de fet, en neurones afectades, els MT són substituïts progressivament per NFT (Verdile *et al.*, 2004). Alguns autors argumenten que la fosforilació de tau és essencial en aquest procés ja que en els agregats de tau aquesta proteïna es troba altament fosforilada així com la fosforilació de tau redueix la unió a MT (Gray *et al.*, 1987). Altres estudis, però, argumenten que la fosforilació de tau es produeix després de l'agregació i que els canvis estructurals de tau estan associats a l'agregació (Mena *et al.*, 1996). D'aquesta manera la pèrdua de la funció normal de tau d'estabilitzar els MT provocaria alteracions al citoesquelet, fet que comportaria a una alteració patològica en les funcions normals estructurals i reguladores del citoesquelet, posant en perill el transport axonal i per tant contribuir a la disfunció sinàptica i la neurodegeneració (Ballatore *et al.*, 2007).

#### **1.4.3 Hipòtesi colinèrgica**

La hipòtesi colinèrgica de la MA postulava originalment una relació entre algunes de les alteracions cognitives d'aquest trastorn, sobretot de memòria, i una alteració en la neurotransmissió colinèrgica cerebral (Bartus *et al.*, 1982). Des de la seva publicació, la coherència conceptual i el potencial terapèutic de la hipòtesi colinèrgica han continuat essent intensament investigats durant els últims anys i tot i que aquest esforç no sembla capaç de proporcionar avui en dia enfocaments innovadors terapèutics, ha estat de gran valor en l'expansió del coneixement de diversos aspectes patològics i moleculars de la demència i la MA (Contestabile, 2010). Avui en dia, està acceptat que la disfunció colinèrgica no pot causar deteriorament cognitiu directament, sinó que més aviat podria tenir un paper indirecte interferint en el procés d'atenció. Un mèrit a tenir en compte d'aquesta hipòtesi però, ha estat la predicció que els fàrmacs colinomimètics millorarien la funció cognitiva (Francis *et al.*, 1999) i, de fet, dels quatre

únics fàrmacs aprovats a Europa per la millora simptomàtica de la MA, tres són inhibidors de l'acetilcolinesterasa (donepezil, galantamina i rivastigmina).

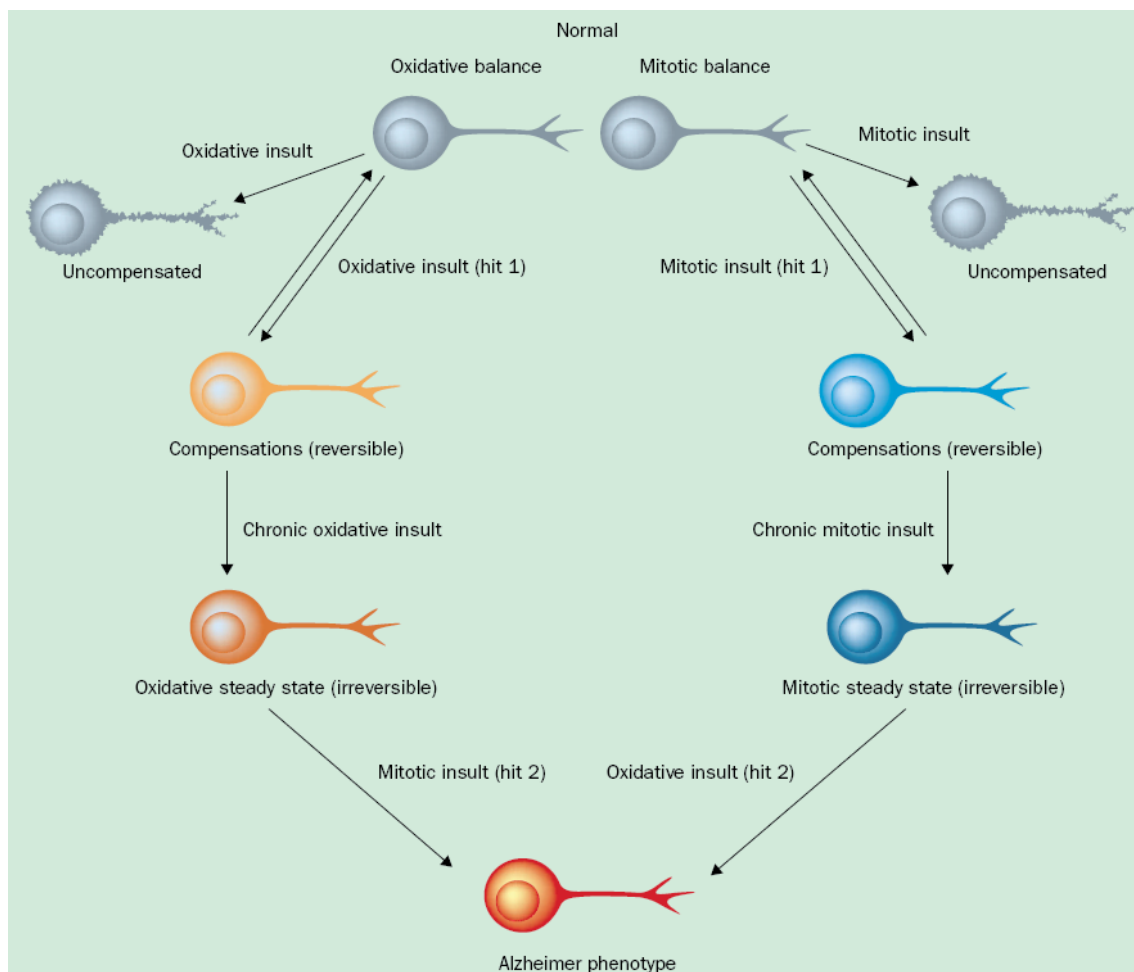
#### **1.4.4 Metabolisme del colesterol i ApoE**

Un defecte en el metabolisme del colesterol és una hipòtesi atractiva, ja que uneix el risc genètic per ApoE (Strittmatter i Roses, 1995), la producció i l'agregació d'A $\beta$  i la vasculopatia de la MA. No obstant això, no hi ha evidències que provin aquesta hipòtesis (Querfurth i LaFerla, 2010). El colesterol és un component essencial de les membranes neuronals i es concentra en illes d'esfingolípids denominades "basses lipídiques". Aquestes basses són plataformes ordenades per a l'assemblatge de les  $\beta$  i  $\gamma$ -secretases i el processament de l'APP en A $\beta$  (Ehehalt *et al.*, 2003). La generació i agregació d'A $\beta$  s'incrementa i la seva depuració cerebral es redueix quan un excés de colesterol esterificat disminueix l'intercanvi lipídic. L'ApoE és una de les apolipoproteïnes més abundants del plasma i el principal transportador de colesterol al cervell. Varis estudis han confirmat que l'al·lel ApoE  $\epsilon$ 4 és el factor de risc més important per patir la MA. Aquest risc incrementa de manera dosidependent ja que els individus homozigots  $\epsilon$ 4 tenen vuit vegades més probabilitats de patir la MA que els homozigots  $\epsilon$ 3. Tanmateix, l'al·lel  $\epsilon$ 4 no és ni necessari ni suficient per patir la malaltia (Tanzi i Bertram, 2001).

Nivells elevats de colesterol en edat adulta són un factor de risc de patir la MA (Kivipelto *et al.*, 2001). Els inhibidors de l'HMG-CoA reductasa, també coneguts com a estatines, disminueixen els nivells de colesterol i estan essent estudiats com a teràpia potencial per la MA, de fet, s'ha vist com la simvastatina redueix de manera acusada els nivells dels pèptids A $\beta$ <sub>42</sub> i A $\beta$ <sub>40</sub> tant *in vitro* com *in vivo* (Fassbender *et al.*, 2001) i en humans que prenen estatines s'ha vist com els nivells d'A $\beta$  en plasma i líquid cefaloraquidi són un 40% més baixos (Friedhoff *et al.*, 2001). Un assaig prospectiu amb estatines va mostrar millores cognitives en pacients amb MA lleu (Sparks *et al.*, 2005) tot i que en un recent estudi multicèntric no es van observar aquestes millores (Jones *et al.*, 2008). D'aquesta manera, el benefici terapèutic de les estatines i la seva relació amb la MA segueix sent controvertit i matèria d'estudi encara avui en dia.

### 1.4.5 Hipòtesis dels dos cops

La hipòtesi dels dos cops (Zhu *et al.*, 2004) uneix la hipòtesi de l'estrès oxidatiu (Markesbery, 1997) i la hipòtesi de reentrada del cicle cel·lular (Nagy *et al.*, 1998). Diverses línies d'evidència mostren que tant l'estrès oxidatiu com canvis aberrants mitogènics tenen un paper important en la patogènesi de la MA. En base a aquests dos fets, la hipòtesi dels dos cops proposa que tot i que l'estrès oxidatiu o les alteracions en la senyalització mitòtica poden servir independentment com a iniciadors, tots dos processos són necessaris per propagar la patogènesi de la malaltia (Fig.7) (Zhu *et al.*, 2004).



**Fig.7 Hipòtesi dels dos cops de la MA.** Una agressió inicial, oxidativa o mitòtica, crònica i per sobre dels límits tolerables condueix a un nou estat d'equilibri (ja sigui en estat d'equilibri oxidatiu o mitòtic estat estacionari). És en aquest nou estat estacionari on les neurones són vulnerables al segon cop posterior, que condueix a la patologia de la MA; prové de Zhu *et al.*, 2004.

Els senyals mitòtics poden ser desencadenats per l'estrès oxidatiu. El cicle cel·lular és un procés altament regulat amb una gran quantitat de punts de control i equilibri per garantir la correcta proliferació cel·lular en presència de senyals ambientals adequades (Zhu *et al.*, 2000). Les cèl·lules diferenciades, com ara les neurones, poden sortir del cicle cel·lular i romandre en repòs en la fase G0. De fet, el SNC madur

s'ha descrit que presenta les neurones en un estat de diferenciació terminal, el que significa que són incapaces d'avançar i completar el cicle cel·lular amb èxit. No obstant això, s'ha observat com en la MA moltes neurones en estat degeneratiu mostren canvis fenotípics característics de cèl·lules mitòtiques suggerint que, tot i que les neurones no són necessàriament capaces de completar el cicle cel·lular, sí que són capaces de tornar a entrar-hi. Per exemple, diversos trets característics de la MA com la fosforilació de tau, així com l'expressió, la fosforilació, i el metabolisme de l'APP són també característiques comuns de les cèl·lules normals en estat de divisió (Zhu *et al.*, 1999; Raina *et al.*, 2000). Tanmateix, malgrat les neurones semblen tornar a entrar en el cicle cel·lular, no s'han observat les característiques estructures mitòtiques en la MA, fent especular sobre una "catàstrofe mitòtica" (Bowser i Smith, 2002; Ogawa *et al.*, 2003) i apuntant a un control insuficient o inadequat del cicle cel·lular (Bowen *et al.*, 2002).

Tot i que la reentrada aberrant de les neurones al cicle cel·lular pot contribuir a la seva eventual mort en la MA, les proteïnes mitòtiques no es troben associades exclusivament a la neuropatologia de les etapes terminals, sinó més aviat als canvis neuronals més primerencs que es produeixen en la malaltia (Zhu *et al.*, 2004). De fet els marcadors del cicle cel·lular apareixen abans que els grans canvis histopatològics (Vincent *et al.*, 1998) i varis esdeveniments mitòtics han estat demostrats en pacients amb MCI (Yang *et al.*, 2003).

D'altra banda, l'estrès oxidatiu és un fet característic de totes les etapes de la MA. Un fet sorprenent és que poques neurones (menys d'una de cada 10.000 en un moment donat) mostrin signes d'apoptosi (Perry *et al.*, 1998; 2001) com seria d'esperar en condicions d'estrès oxidatiu agut i elevat. No obstant això, baixes concentracions d'oxidants, com el peròxid d'hidrogen, podrien induir una resposta adaptativa en lloc de la mort cel·lular (Davies *et al.*, 1995; Wiese *et al.*, 1995) i, per tant, una tolerable i crònica exposició neuronal a l'estrès oxidatiu podria explicar el per què de la baixa quantitat d'apoptosi neuronal en la MA (Zhu *et al.*, 2004).

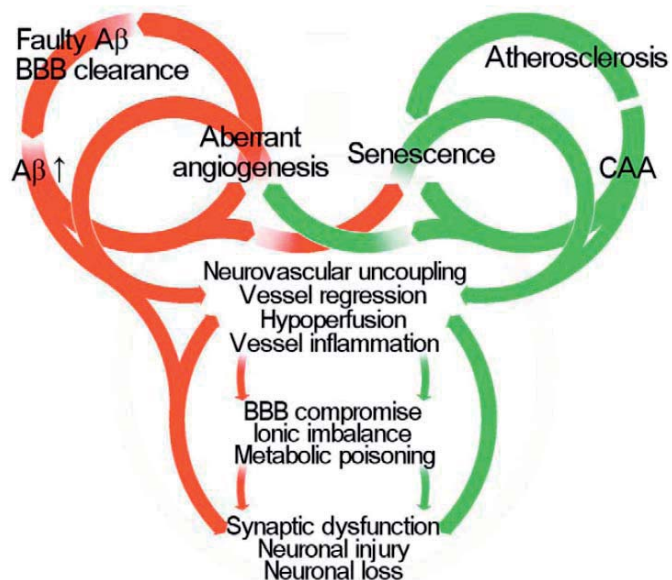
D'aquesta manera, quantitats tolerables d'estrès oxidatiu provocarien canvis compensatoris que conduirien a un canvi en la homeòstasi neuronal que seria reversible si l'estrès oxidatiu és agut. En canvi, si l'estrès oxidatiu és persistent, com succeeix en l'MCI i la MA a partir d'un cert llindar de cronicitat i severitat d'estrès oxidatiu, les neurones fan canvis adaptatius permanents. En aquest nou estat d'equilibri, les neurones segueixen funcionant en un ambient pro-oxidant amb

normalitat o fins i tot d'una manera lleugerament compromesa (Zhu *et al.*, 2004) i en aquest estat anomenat "estat d'equilibri oxidatiu" les neurones podrien funcionar eficientment durant dècades (LeBel i Bondy, 1992). De fet, degut a que l'estrès oxidatiu és molt més gran en l'MCI i la MA que en l'envelliment normal, és probable que les neurones en estat d'equilibri oxidatiu dediquin gran part del seu potencial compensatori a prevenir aquest estrès oxidatiu, d'aquesta manera es tornarien particularment vulnerables a insults secundaris que requereixen més canvis compensatoris en altres vies, com ara les vies que regulen la mida i el creixement cel·lular (Zhu *et al.*, 2004).

Normalment, els factors neurotròfics com l'NGF i el BDNF promouen la supervivència, el creixement i la sinaptogènesi neuronal (Mattson *et al.*, 2002). No obstant això, l'expressió ectòpica d'una sensibilitat augmentada als factors neurotròfics en resposta a l'estrès cel·lular de neurones en estat d'equilibri oxidatiu pot servir com a segon cop i, inesperadament, desencadenar una sèrie de canvis catastròfics d'aquestes neurones que condueixen a les alteracions característiques descrites en la MA (Allen *et al.*, 1991; Crutcher *et al.*, 1993; Connor *et al.*, 1996).

#### 1.4.6 Hipòtesi neurovascular

D'acord amb el neurocèntric punt de vista tradicional de la MA, les neurones són els principals elements afectats en aquesta malaltia, mentre que la patologia vascular es desenvolupa de manera secundària a la lesió neuronal. No obstant això, diversos estudis indiquen que la disfunció neurovascular contribueix al deteriorament cognitiu i a la neurodegeneració en la MA. D'aquesta manera, la disfunció de la unitat neurovascular



**Fig.8 Hipòtesi neurovascular de la MA.** Múltiples cascades patològiques amb origen en artèries cerebrals alterades (verd) o alteració de capil·lars cerebrals (verd) poden iniciar l'alteració de la unitat neurovascular. S'acaba produint alteració de la BHE i l'homeòstasi cerebral. Fet que conclou en les alteracions i la mort neuronal descrites en la MA; prové de Zlokovic, 2005.

suggereix múltiples cascades patogèniques per a la MA (Fig. 8) (Zlokovic, 2005).

Tal i com proposa Zlokovic (2005), la hipòtesi neurovascular de la MA planteja que una eliminació defectuosa de l'A $\beta$  a través de la barrera hematoencefàlica (BHE), ja sigui per la senescència de les CEC (Minamino *et al.*, 2004) o per una angiogènesi aberrant (Carmeliet i Jain, 2000), associat amb nivells baixos de receptors d'aclariment d'A $\beta$  com el receptor de la proteïna associada a la lipoproteïna de baixa densitat (*low-density lipoprotein receptor-related protein*, LRP) 1 (Shibata *et al.*, 2000; Deane *et al.*, 2004) i amb un augment dels nivells dels receptors d'influx d'A $\beta$  RAGE (Deane *et al.*, 2003) podria augmentar la concentració d'A $\beta$  soluble en el líquid intersticial del cervell (LIC) i generar lesions amiloides vasculars i nivells elevats d'A $\beta$  fibril·lar (Davis *et al.*, 2004; Deane *et al.*, 2004).

Una proteòlisi insuficient d'A $\beta$  (Selkoe, 2001b) amplificaria l'efecte d'una insuficient eliminació d'A $\beta$  a través de la BHE mentre que ja s'ha observat que l'acumulació vascular d'A $\beta$  estimula la degradació del receptor LRP1 (Deane *et al.*, 2004) i té efectes antiangiogènics (Paris *et al.*, 2004). La senescència prematura cerebrovascular (Kalaria i Hedera, 1995; Minamino *et al.*, 2004) produïda ja sigui per aterosclerosi (Roher *et al.*, 2004), per angiopatia amiloïdal cerebral (CAA) (Greenberg *et al.*, 2004) o bé per nivells elevats d'A $\beta$  soluble (Iadecola *et al.*, 1999) pot generar alteracions en el control del flux sanguini regulat per les CEC, hipoperfusió cerebral (de la Torre, 2004) i desacoblament neurovascular (Iadecola, 2004). A més, agregats de capil·lars atròfics o en degeneració conseqüents a una angiogènesi aberrant (Bailey *et al.*, 2004; Paris *et al.*, 2004) podrien actuar com a suport físic per a les plaques senils activant la resposta neuroinflamatòria.

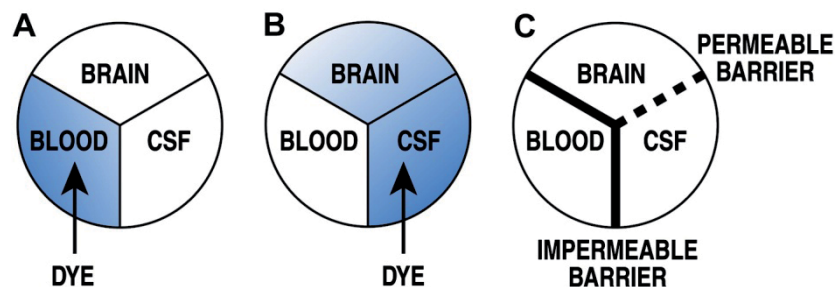
En última instància, això portaria a una BHE compromesa, generant així un desequilibri químic en l'entorn neuronal i generant en darrer terme disfunció sinàptica i neuronal així com lesions i mort neuronal (Zlokovic, 2005).



## 2. La barrera hematoencefàlica

La idea d'una BHE va sorgir d'experiments realitzats a finals del segle XIX i principis del XX a Alemanya. Paul Ehrlich va demostrar la manca de permeabilitat dels vasos intracerebrals als colorants units a l'albumina, suggerint la presència d'una barrera per a les proteïnes al cervell (Ehrlich, 1885). L'observació de que certs compostos perdien la seva activitat farmacològica quan s'injectaven intravenosament a animals d'experimentació, encara que podien produir símptomes dràstics quan eren injectats directament a diferents zones del LCR van suggerir la presència d'una barrera entre la sang i el cervell (Biedl i Kraus, 1898; Lewandowsky, 1900). Aquesta hipòtesi va guanyar importància amb els experiments de Goldman (1909, 1913) qui va demostrar que el colorant blau tripà injectat al torrent sanguini tenia tots els teixits excepte el cervell i la medulla espinal, que quedaven blancs i el LCR incolor (Fig. 9A), i quan aquest colorant era injectat directament al LCR, les zones adjacents del teixit nerviós es

tenien ràpidament de color blau (Fig. 9B). Es va concloure així que hi havia una barrera a nivell dels vasos sanguinis cerebrals i que aquesta barrera no existia entre el LCR i el cervell (Fig. 9C).



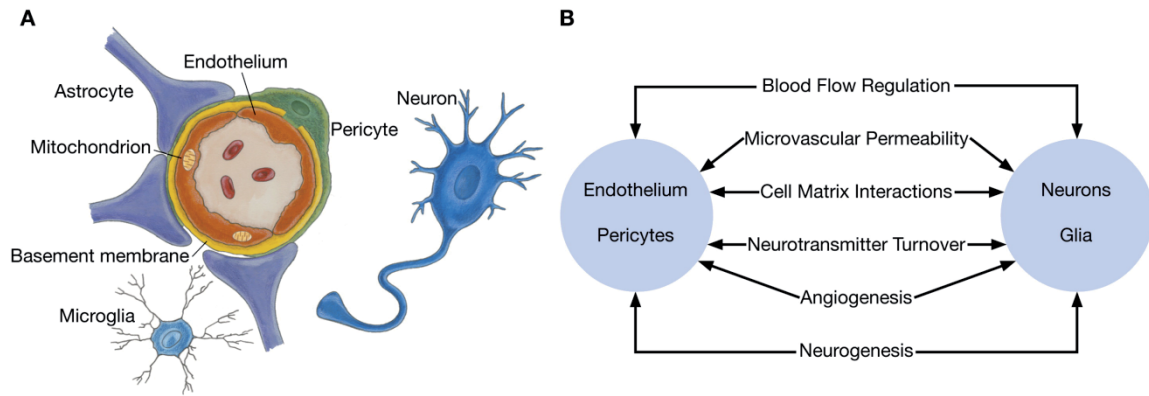
**Fig.9 Esquema dels experiments de Goldman.** La BHE i la difusió del blau tripà des del líquid cefaloraquídic (*cerebrospinal fluid*, CSF a la imatge) al cervell. (A) En el primer experiment de Goldman el blau tripà va ser injectat a la sang i es van analitzar el cervell i el LCR. (B) En el segon experiment de Goldman el colorant va ser injectat al LCR i es van analitzar el cervell i la sang. (C) Conclusions dels dos experiments; prové de Zlokovic, 2008.

Gràcies als avenços de la microscòpia electrònica va ser possible correlacionar la localització ultraestructural de la BHE amb les CEC (Reese i Karnovsky, 1967). Es va injectar peroxidasa de rave (*horseradish peroxidase*, HRP) per via intravenosa o intracerebral, i aquesta proteïna de 40 kDa es va trobar que difonia per les esquerdes intercel·lulars de les CEC fins a les unions estretes (*tight junctions*, TJ) situades entre les cèl·lules. Així, en vertebrats, les TJ interendotelials van ser reconegudes com l'estructura bàsica morfològica de la BHE.

No obstant, hi ha estructures dins del cervell que no tenen una BHE a nivell endotelial i que reben el nom d'òrgans circumventriculars (OCV). Els OCV compleixen funcions neurosecretores i, per tant, les seves neurones controlen estímuls hormonals i d'altres substàncies del torrent sanguini i també secreten substàncies neuroendocrines a la sang (Leonhardt, 1980). Els capil·lars de dins els OCV són fenestrats i permeten la difusió lliure de les proteïnes i soluts entre la sang i els OCV. De la mateixa manera, les cèl·lules endotelials del plexe coroide no formen una barrera i són també fenestrades, com les dels OCV (Engelhardt *et al.*, 2001), de fet el plexe coroide és considerat també a vegades un OCV. El plexe coroide és una estructura vellosa que s'estén des de la superfície ventricular de la llum dels ventricles i la seva principal funció és la secreció de l'LCR. Es compon d'una àmplia xarxa de capil·lars tancats dins d'una sola capa d'epiteli cúbic el qual conté TJ apicals i forma una barrera sang-LCR. De manera anàloga, una complexa xarxa de TJ connectades a cèl·lules ependimàries especialitzades segellen el SNC dels OCV (Leonhardt, 1980; Bouchaud i Bosler, 1986).

Les CEC i les TJ, el lloc anatòmic de la BHE conjuntament amb els pericits, els astròcits, la micròglia i les neurones formen una unitat funcional, sovint anomenada com a "unitat neurovascular" (Fig. 10A) (Zlokovic, 2005), i es considera com la unitat bàsica i funcional de la BHE (Abbott *et al.*, 2006). La proximitat dels diferents tipus de cèl·lules gials entre sí i amb les neurones permet una regulació paracrina eficaç que és crítica per al bon funcionament del SNC (Zlokovic, 2008). Una alteració d'aquesta coordinació pot ser clau en diverses malalties (Abbott *et al.*, 2006). La membrana basal separa les CEC dels pericits, els quals poden embolcallar la major part de la part externa de la membrana basal. A més, els pericits i les CEC poden comunicar-se directament en punts de contacte. Els astròcits emeten processos pediculars i es troben a la superfície exterior dels capil·lars.

Gràcies a la regulació coordinada de les cèl·lules vasculars (endoteli i pericits), les neurones i els astròcits, la unitat neurovascular pot controlar l'acoblament hemodinàmic neurovascular, la permeabilitat microvascular, les interaccions amb la matriu extracel·lular, la inactivació de neurotransmissors, els acoblaments neurotròfics, i la coordinació àngio i neurogènica (Zlokovic, 2008) (Fig. 10B).



**Fig.10 Esquema de la unitat neurovascular i les seves funcions.** Unitat neurovascular i la seva regulació. (A) Les cèl·lules endotelials i els pericits estan separats per la membrana basal. Els pericits embeinen la major part de la part externa de la membrana basal. En els punts de contacte, els pericits es comuniquen directament amb les cèl·lules endotelials. Els processos pediculars dels astròcits desembeinen la paret microvasos, que està formada per cèl·lules endotelials i els pericits. La micròglia en repòs es troba ramificada. (B) La regulació coordinada de les funcions de la unitat neurovascular depèn de les cèl·lules vasculars (endoteli i pericits), neurones i astròcits; modificat de Zlokovic, 2008.

## 2.1 Estructura i funcions de la BHE

La funció de barrera resulta d'una combinació de barrera física, formada bàsicament per les TJ intercel·lulars que redueixen el flux de l'esclatxa intercel·lular, junt amb una funció de barrera de transport (mecanismes de transport específics de solut) i de barrera metabòlica (enzims que poden metabolitzar molècules en trànsit). La funció de barrera no és fixa, però pot ser modulada i regulada tant en la fisiologia com en la patologia (Abbott *et al.*, 2006).

### 2.1.1 Barrera física, les unions estretes

Els factors bàsics de la impermeabilitat de la BHE són les unions complexes entre les CEC. Les TJ es troben entre cèl·lules i les encerclen com un cinturó continu (Bernacki *et al.*, 2008). Moltes de les característiques de les TJ i de les seves propietats especials es coneixen gràcies a estudis fets amb cèl·lules epitelials en cultiu (Sandoval i Witt, 2008). El nombre de punts de fusió entre les TJ pot variar segons la regió cerebral, fet que genera un nivell de hermeticitat no homogeni en les diferents zones del cervell; d'aquesta manera, a mesura que els capil·lars es transformen en vènules postcapil·lars s'observa un segellat menor (Simionescu *et al.*, 1976).

Funcionalment, les TJ constitueixen una frontera que limita la lliure difusió de les proteïnes i lípids de membrana, conferint així polaritat a les CEC, d'aquesta manera es limita la presència d'uns o altres transportadors entre les membranes luminal i abluminal. Degut a la unió total, la via paracel·lular queda totalment segellada i les substàncies de pes molecular major de 180 Da es veuen obligades a creuar la membrana i el citosol de les CEC (Grieb *et al.*, 1985; Mitic i Anderson, 1998). Les TJ es caracteritzen per una alta resistència elèctrica (1500-2000  $\Omega\text{cm}^2$ ), i la seva integritat depèn d'una adequada concentració extracel·lular d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Una caiguda de la resistència provoca desestabilització de les TJ. D'altra banda, un augment de la concentració d'ATPc intracel·lular genera punts de fusió que enforteixen les TJ (Bernacki *et al.*, 2008).

Diverses proteïnes de la membrana plasmàtica han estat identificades com a constituents de les TJ (Fig. 11), entre aquestes es poden trobar la claudina, l'occludina i molècules de les unions adherents. A més, les proteïnes *zonula occludens* (ZO) 1, 2 i 3 junt amb la cingulina han estat identificades com a proteïnes citoplasmàtiques que uneixen les proteïnes de la membrana amb l'actina, la proteïna del citoesquelet principal responsable de la integritat estructural i funcional de l'endoteli (Ballabh *et al.*, 2004).

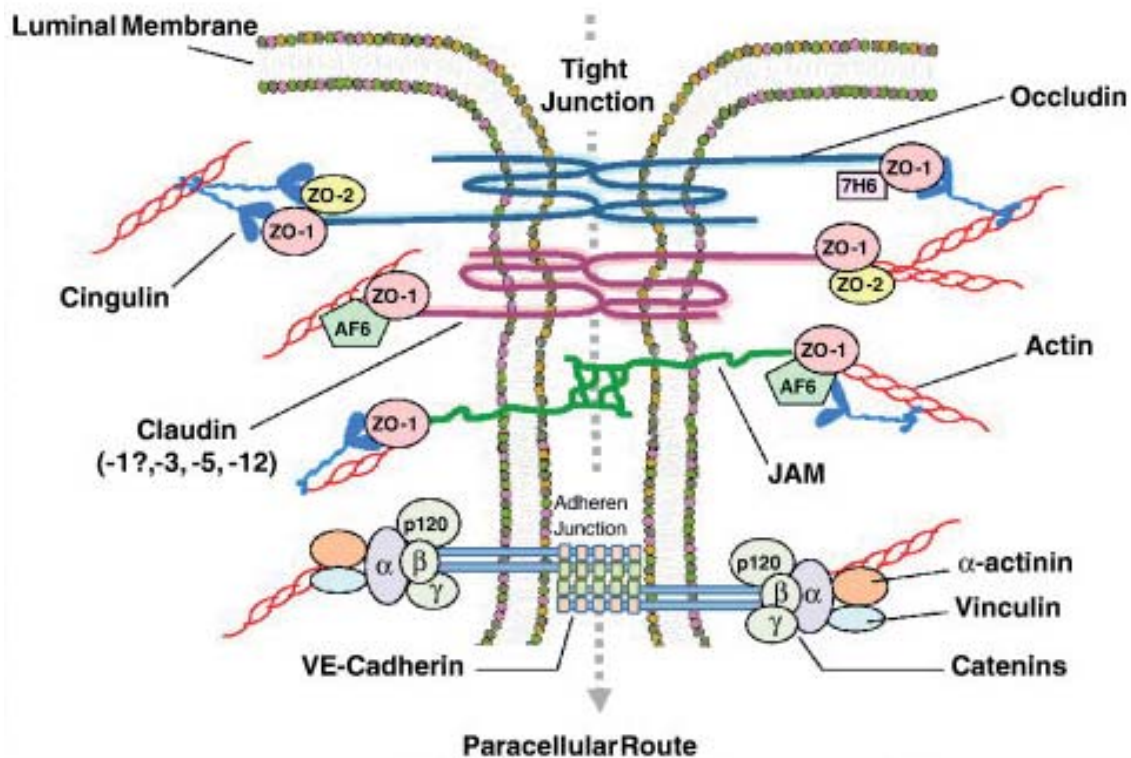


Fig.11 Esquema de la posició i estructura de la unions estretes i de les unions adherents. Modificat de Sandoval i Witt, 2008.

### 2.1.1.1 Ocludina

L'occludina és una fosfoproteïna de 60-65 kDa amb 4 dominis transmembrana que es troba a concentracions altes a les TJ (Fig. 12) i la seva expressió s'ha identificat en una ampla varietat de cèl·lules i teixits normals i anormals. En particular, l'expressió d'occludina sembla mantenir correlació amb propietats de barrera en diferents teixits. L'occludina forma dímers que interactuen homofilicament amb dues nanses extracel·lulars separades per un petit bucle citosòlic i amb els dos dominis amino- i carboxiterminal situats al citosol (Feldman *et al.*, 2005). Tot i que alguns estudis han demostrat que l'occludina no és imprescindible per a la formació de TJ (Saitou *et al.*, 1998), sí que la situen almenys com a una proteïna reguladora crítica i la seva absència genera alteracions cerebrals, retard en el creixement i una funció de barrera alterada (Saitou *et al.*, 2000); a més, la seva presència es correlaciona amb una major resistència elèctrica a través de la membrana i una disminució de la permeabilitat intestinal (Balda *et al.*, 1996). La regió carboxiterminal, que codifica per un domini putatiu en espiral-espiral, es pot enllaçar amb diverses proteïnes que influeixen en les seves accions reguladores com per exemple la proteïna quinasa C (PKC), c-Yes, connexina-26 i p85 (Nusrat *et al.*, 2000). Aquest extrem carboxiterminal és el que s'uneix a les proteïnes ZO-1 (Fanning *et al.*, 1998), ZO-2 (Furuse *et al.*, 1994) i ZO-3 (Haskins *et al.*, 1998), que al seu torn s'uneixen al citoesquelet d'actina (Sandoval i Witt, 2008).

L'estat de fosforilació de l'occludina ha estat proposat com a element regulador de la seva associació dins de la membrana cel·lular en la TJ (Feldman *et al.*, 2005). S'ha demostrat que quan l'occludina es troba altament fosforilada es concentra a la membrana cel·lular i la TJ s'identifica com a intacta, mentre que la forma menys fosforilada de l'occludina s'ha identificat amb la fracció citoplasmàtica i podria servir com a reservori (Sakakibara *et al.*, 1997; Wong, 1997). La fosforilació de serines i treonines de l'occludina es correlaciona amb la localització a la membrana (Andreeva *et al.*, 2001), mentre que la fosforilació de la tirosina s'ha identificat amb la seva desvinculació de les proteïnes intracel·lulars (ZO-1, ZO-2 i ZO-3) i augment de la permeabilitat de les TJ (Kago *et al.*, 2006; Kale *et al.*, 2003; Rao *et al.*, 2002). No obstant això, existeix certa discrepància en els papers que pot tenir la fosforilació de l'occludina en els diferents tipus de cèl·lules i quins poden ser els seus estímuls (Sandoval i Witt, 2008).

### 2.1.1.2 Claudines

Avui en dia, almenys 24 membres de la família de les claudines han estat identificats en mamífers (Lal-Nag i Morin, 2009). En comparació amb l'occludina, les claudines són més petites (20-24 kDa) i no presenten homologia en la seva seqüència amb l'occludina (Sandoval i Witt, 2008). Tenen quatre dominis transmembrana i dos bucles extracel·lulars que s'uneixen homotípicament amb claudines adjacents de les CEC, formant així la junta principal de les TJ (Piontek *et al.*, 2008). Els dos bucles carboxiterminals interns s'uneixen a proteïnes citoplasmàtiques com les ZO-1, ZO-2 i ZO-3 (Furuse *et al.*, 1999). De la família de les claudines, la 3, la 5 i la 12 han estat identificades en les CEC de la BHE (Hawkins i Davis, 2005); a més, la claudina 1 també ha estat localitzada en CEC però hi ha certa polèmica sobre el seu paper en les TJ ja que sembla existir variabilitat entre models *in vitro* i espècies avaluades *in vivo* (Witt *et al.*, 2003; Wolburg *et al.*, 2003). Diversos estudis indiquen que la claudina-5 està especialment implicada en la regulació activa de la permeabilitat de la BHE a molècules petites (Sandoval i Witt, 2008). Els fàrmacs que augmenten l'expressió de claudina 5 han demostrat augmentar la resistència i disminuir la permeabilitat transendotelial de la BHE (Honda *et al.*, 2006). A més, els ratolins que no tenen el gen de la claudina 5 mostren una pèrdua de la integritat de la BHE donat que hi ha una major retenció cerebral de molècules de menys de 800 Da (Nitta *et al.*, 2003). La fosforilació de la claudina 5 pot modular el seu paper a les TJ ja que la fosforilació del residu Thr207, a través de la proteïna quinasa A (PKA) (Soma *et al.*, 2004), així com a través de l'activació de Rho-quinasa (Yamamoto *et al.*, 2008), s'han identificat amb un augment de la permeabilitat de les TJ.

### 2.1.1.3 Molècules d'adhesió cel·lular

Les molècules d'adhesió cel·lular (*Junctional adhesion molecules*, JAM) són una família de proteïnes de 40 kDa dins de la superfamília de les immunoglobulines que es localitzen dins de l'esclatxa intercel·lular de les TJ, però que també s'expressen en leucòcits i plaquetes (Bernacki *et al.*, 2008). Les JAM participen en l'assemblatge i el manteniment de les TJ, la senyalització de proteïnes associades al citoesquelet i la diapedesi de leucòcits (Weber *et al.*, 2007). S'han identificat varies JAM: JAM-A (també coneguda com JAM, JAM-1, F11R), JAM-B (també coneguda com JAM-2, JAM-2 humana, JAM-3 de ratolí, VE-JAM), JAM-C (també coneguda com JAM-3, JAM-3 humana, JAM-2 de ratolí), i més recentment JAM-4 i JAML (JAM-like o AMICA1) (Sandoval i Witt, 2008). Les JAM tenen un únic domini transmembrana i el seu segment extracel·lular té dos bucles de tipus immunoglobulina formats per enllaços

disulfur i formen unions homo- i heterofíliques (Weber *et al.*, 2007). Al citoplasma, les JAM s'uneixen principalment a les proteïnes intracel·lulars ZO-1, afadina (AF-6), la proteïna de partició defectuosa-3 (PAR-3) i la multiproteïna-PDZ-1 (MUPP-1) (Ebnet *et al.*, 2003). L'expressió de JAM-A, -B, i -C ha estat demostrada en les CEC, essent la JAM-A la més altament expressada en la vasculatura cerebral. A més, s'ha demostrat que les interaccions homofíliques de JAM-A estabilitzen les unions cel·lulars i disminueixen la permeabilitat intestinal (Liu *et al.*, 2000; Mandell *et al.*, 2004). Una pèrdua de la integritat de la BHE mitjançant una alteració de les TJ es correlaciona amb una disminució en l'expressió de JAM-A (Yeung *et al.*, 2008).

#### 2.1.1.4 Proteïnes citoplasmàtiques accessòries

Diverses proteïnes citoplasmàtiques participen en la formació i regulació de les TJ. Aquestes són la ZO-1, la ZO-2, la cingulina, la 7H6, i l'AF-6 (Hawkins i Davis, 2005), encara que probablement n'hi pugui haver d'altres. La ZO-1 (220 kDa) i la ZO-2 (160 kDa) són fosfoproteïnes membres de la família de proteïnes guanilat quinasa-*like* associades a membrana i capaces de formar complexos heterodimèrics l'una amb l'altra. Les ZO contenen tres dominis PDZ (PDZ1, PDZ2 i PDZ3), un domini SH3 i un domini guanilil-quinasa-*like*. Aquests dominis actuen com regions d'unió a molècules facilitant així l'organització de les proteïnes a la membrana plasmàtica (Sandoval i Witt, 2008); a més, la ZO-1 interacciona amb ZO-2 i ZO-3, a través dels dominis PDZ (Wittchen *et al.*, 1999), tot i que la ZO-3 no ha estat encara verificada en l'endoteli de la BHE. S'ha descrit que la ZO-2 podria tenir una funció redundant a la ZO-1, substituint-la i contribuint a la formació de TJ més competents i estables (Umeda *et al.*, 2004). El fragment carboxiterminal ric en prolina de les ZO es troba unit a l'actina en cultius *in vitro* i es creu que serveix d'enllaç amb el citoesquelet d'actina (Fanning *et al.*, 1998; Lischper *et al.*, 2010). D'aquesta manera, les proteïnes ZO funcionen com a proteïnes de reconeixement per la ubicació de les TJ i per connectar i ancorar les proteïnes transmembrana al citoesquelet d'actina (Sandoval i Witt, 2008). A més a més, s'ha hipotetitzat que les ZO són les encarregades de captar i conduir les proteïnes transmembrana de les TJ al seu destí final dins de la porció apical de la membrana cel·lular (Bazzoni i Dejana, 2004; Tsukita *et al.*, 2001).

S'han identificat altres proteïnes accessòries de les TJ tot i que encara queden per aclarir alguns aspectes de les seves funcions estructurals i reguladores en les CEC (Sandoval i Witt, 2008). La cingulina és una fosfoproteïna de 140-160 kDa localitzada a la superfície citoplasmàtica de les TJ, i diversos estudis han demostrat que s'uneix a

les proteïnes ZO, miosina, JAM-A, i AF6 (Cordenonsi *et al.*, 1999; Bazzoni *et al.*, 2000), dotant a la cingulina d'un important paper com a proteïna d'ancoratge. També ha estat suggerit que la cingulina transmet la força mecànica generada per la contracció d'actina-miosina del citoesquelet, regulant així la permeabilitat de les TJ (Cordenonsi *et al.*, 1999). La fosfoproteïna 7H6 (155 kDa) es dissocia de forma reversible de les TJ en condicions de nivells baixos d'ATP associats amb un augment de la permeabilitat paracel·lular (Zhong *et al.*, 1994; Satoh *et al.*, 1996) i l'AF-6, de 180 kDa, s'ha vist que interacciona amb la ZO-1 en les TJ (Yamamoto *et al.*, 1999).

#### 2.1.1.5 Actina

Tot i que l'actina (42 kDa) no ha estat tradicionalment definida com a proteïna de les TJ, aquesta proteïna té un paper actiu en la seva regulació i estabilització (Lai *et al.*, 2005), i com a tal és una part integral del complex de les TJ. Els filaments d'actina del citoesquelet proporcionen la infraestructura necessària per al manteniment de la morfologia i la funció cel·lular i, a més a més, en la porció apical de la cèl·lula modulen la orientació espacial de la cèl·lula i funcionen com a ancoratge de les TJ. La importància del citoesquelet en l'establiment i el manteniment de la BHE es va fer evident a partir d'estudis en ratolins MDX, els quals no expressen la proteïna distrofina, que s'uneix a l'actina. Degut a una desorganització del citoesquelet d' $\alpha$ -actina dels astròcits i de les CEC, aquests ratolins mostren un augment de la permeabilitat vascular del cervell i una reducció en els nivells de ZO-1. A més, la localització subcel·lular de les proteïnes d'unió de l'endoteli i el canal d'aigua aquaporina-4 dels processos pediculars dels astròcits es veu alterada (Nico *et al.*, 2003).

#### 2.1.1.6 Unions adherents

Les unions adherents (UA) no formen part de manera estricta de les TJ. Les TJ s'identifiquen com la barrera paracel·lular primària mentre que les UA semblen jugar un paper clau en la localització i l'estabilització de les TJ (Dejana *et al.*, 2008). Les UA tenen una localització més basal que les TJ i formen un segon ajust d'unió entre les CEC (Fig. 11). Les UA s'uneixen entre sí mitjançant interaccions homofíliques entre unes proteïnes transmembrana anomenades cadherines (Takeichi, 1995); tanmateix, encara avui es creu que el domini d'unió extracel·lular de les cadherines és insuficient per ell mateix per formar les unions. El domini citoplasmàtic de les cadherines s'uneix a les  $\beta$ -,  $\gamma$ - i p120-catenines, les quals s'uneixen a l' $\alpha$ -catenina que, al seu torn, s'uneix



amb el citoesquelet d'actina, de manera anàloga a com ho fan les ZO en les TJ (Nieset *et al.*, 1997).

Tot i que el paper de les UA en la permeabilitat paracel·lular de la BHE en diferents esdeveniments patològics està encara per dilucidar, s'ha demostrat que les UA interactuen amb el receptor del factor de creixement de l'endoteli vascular 2 (Lampugnani *et al.*, 2006), implicant la seva importància durant processos angiogènics. Altres estudis han demostrat que l'increment d'expressió de la claudina 5 pot necessitar de la participació de la cadherina de l'endoteli vascular, mostrant que les UA tenen una relació directa amb la integritat de la BHE (Taddei *et al.*, 2008).

### **2.1.2 Barrera de transport**

La BHE mostra una permeabilitat passiva baixa a molts nutrients hidrosolubles essencials per al SNC, és per això que hi ha diversos sistemes específics de transport a la BHE que en garanteixen un subministrament adequat (Abbott *et al.*, 2010). La presència de sistemes de transport específics en les membranes luminal i abluminal de les CEC regula el trànsit transcel·lular de petites molècules hidrofíliques proporcionant així una barrera de transport selectiu. D'aquesta manera, es pot permetre o facilitar l'entrada dels nutrients requerits, i excloure o efluir compostos que siguin potencialment nocius per al SNC (Abbott *et al.*, 2006). Els sistemes específics de transport mediat faciliten el transport de nutrients, com diferents hexoses (glucosa, galactosa), diversos aa, àcids monocarboxílics (lactat, piruvat, cossos cetònics), nucleòsids (adenosina, guanosina, uridina), purines (adenina, guanina), amines (colina) i vitamines (Hawkins *et al.*, 2006; Simpson *et al.*, 2007; Ohtsuki i Terasaki, 2007; Deeken i Löscher, 2007; Spector i Johanson, 2007). En general, les concentracions de nutrients són més altes a la sang que al cervell i les diferents concentracions de cada nutrient estan regulades per les necessitats metabòliques del cervell a cada moment, i per les concentracions de substrats en plasma (Zlokovic, 2008).

#### **2.1.2.1 GLUT1**

El transportador de glucosa GLUT1 és d'especial importància ja que la glucosa és la font principal d'energia cerebral (Siesjö, 1978). El GLUT1 (55 kDa) forma part de la família de gens dels transportadors de glucosa independents de sodi, d'expressió exclusiva a la BHE i s'encarrega de transportar glucosa així com altres hexoses a

través de la BHE (Zlokovic, 2008). La densitat dels transportadors GLUT1 a la membrana abluminal és més gran que a la luminal. Aquesta distribució asimètrica proporciona a la BHE un control homeostàtic dels nivells de glucosa cerebrals i permet evitar una acumulació de glucosa que sobrepassi els nivells plasmàtics (Simpson *et al.*, 2007). L'expressió de GLUT1 és controlada pel factor induïble per hipòxia-1 (HIF-1). Després d'una isquèmia global transitòria, s'ha vist com l'HIF-1 $\alpha$  s'acumula a l'escorça cerebral, generant increments en el gen GLUT1 (Chávez i Lamanna, 2002). A més, s'ha vist com en condicions prolongades d'hipòxia moderada, el cervell adult s'adapta augmentant la vascularització i incrementant la densitat de GLUT1 a la BHE (Harik *et al.*, 1996).

Les mutacions espontànies al gen GLUT1 causen haploinsuficiència del transportador d'hexoses i provoquen la síndrome de GLUT1 en humans. Aquesta síndrome es caracteritza per epilèpsia infantil que, en general, no respon a anticonvulsions, retard del creixement, microcefàlia, espasticitat, hipotonia i alteracions motores; a més, aquests símptomes poden ser variables i agreujar-se en dejú (Klepper, 2010). De la mateixa manera, els ratolins GLUT1<sup>+/-</sup> mostren descàrregues epiléptiformes a l'electroencefalograma, deteriorament de l'activitat motora, manca de coordinació, microcefàlia, disminució de la captació de glucosa al cervell i una forta disminució de l'expressió de GLUT1 als capil·lars cerebrals (Wang *et al.*, 2006). Tant la forma humana com el model de ratolí són bons exemples de trastorns cerebrals provocats per alteracions dels transportadors específics de la BHE.

#### 2.1.2.2 MCT1

El transportador de monocarboxilats 1 (MCT1) s'expressa en ambdues membranes de les CEC de la BHE i s'encarrega de transportar lactat i altres monocarboxilats dins i fora del cervell. Els cossos cetònics són una font d'energia per al cervell i, de la mateixa manera que amb el metabolisme de la glucosa, la captació per part del cervell de cossos cetònics depèn de la funció i regulació de transportadors propis, com l'MCT1 (Simpson *et al.*, 2007). En un estudi recent en rates amb cetosi induïda per la dieta es va veure com els nivells d'MCT1 i GLUT1 van augmentar a la BHE, i també es va observar com van incrementar els nivells de cossos cetònics cerebrals sense aparèixer canvis en el FSC (Puchowicz *et al.*, 2007), suggerint que un increment de transportadors a la BHE (com per exemple, MCT1 i GLUT1), però no un augment del FSC, és essencial per a que el metabolisme cerebral s'adapti als nivells de metabòlits disponibles en plasma (Zlokovic, 2008).

### 2.1.2.3 Transportadors d'aminoàcids

L'existència de dos mecanismes de transport facilitat per aa anomenats L1 i y<sup>+</sup> en les membranes luminal i abluminal garanteix l'accés de tots el aa essencials al cervell. El transportador L1 independent de sodi s'encarrega de transportar grans aa neutres, com per exemple la leucina, la isoleucina, la valina, el triptòfan, la tirosina, la fenilalanina, la treonina i la metionina. El sistema y<sup>+</sup> transporta aa catiònics, com la lisina, l'arginina i l'ornitina (Hawkins *et al.*, 2006). A més, existeixen cinc transportadors d'aa dependents de sodi a la membrana abluminal. Aquests sistemes tenen la capacitat de transferir activament a les CEC, i des d'allà a la circulació sanguínia, tots els aa que es produeixen de manera natural al LIC. D'aquesta manera, es genera un mecanisme pel qual les concentracions d'aa al LIC es mantenen aproximadament un 10% de les concentracions plasmàtiques.

Els transportadors d'aa excitatoris dependents de sodi (*Excitatory Amino Acid Transporters*, EAAT) EAAT1, EAAT2 i EAAT3 ofereixen un mecanisme per a l'eliminació d'aa potencialment neurotòxics del cervell, com el glutamat i l'aspartat. Aquests transportadors poden determinar els nivells de glutamat extracel·lular i són essencials per prevenir l'excitotoxicitat (Lipton, 2005). De fet, s'ha suggerit que l'excitotoxicitat podria tenir un paper clau en la relació de la BHE amb diverses malalties neurodegeneratives, i s'està estudiant actualment el paper terapèutic dels EAAT per reduir els nivells de glutamat en malalties neurodegeneratives agudes i cròniques (Zlokovic, 2008). En aquesta línia s'ha demostrat que en rates on es disminuïen els nivells de glutamat en sang, s'incrementava l'efluència de glutamat del cervell. D'aquesta manera, el tractament a rates amb agents segrestadors o quelants de glutamat just abans o després d'una lesió cerebral té efectes neuroprotectors (Zlotnik *et al.*, 2007).

### 2.1.2.4 Vitamines

Les vitamines com, per exemple, la B1, B3, B5, o E són transportades en la majoria dels casos per transportadors específics individuals a través de la BHE o el plexe coroide. L'excepció és el transportador de multivitamines dependent de sodi que és capaç de transportar la biotina, l'àcid pantotènic i l'àcid lipoic (Spector i Johanson, 2007).

#### 2.1.2.5 Ions

La BHE té una gran densitat de mitocondris, que reflecteix les altes demandes d'energia pels transportadors dependents d'ATP, com la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , que es troba a la cara abluminal de la BHE (Vorbrodt, 1988). D'altra banda, el cotransportador de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  i  $2 \text{Cl}^-$  es localitza bàsicament a la membrana luminal de la BHE (O'Donnell *et al.*, 2006) i s'encarrega de cotransportar aquest ions des de la sang a l'endoteli cerebral. A més, també trobem l'intercanviador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  a la membrana luminal i l'intercanviador de  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  a les dues membranes, mostrant ambdós transportadors un paper clau en la regulació del pH intracel·lular a l'endoteli (Taylor *et al.*, 2006). D'altra banda, l'intercanviador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  també és present a la BHE i s'encarrega del flux de sortida de  $\text{Ca}^{2+}$  de l'endoteli (Zlokovic, 2008).

#### 2.1.2.6 Transportadors d'efluència

Si es compara la diferent penetració de certes substàncies liposolubles, es pot veure que una gran quantitat de molècules tenen una taxa d'entrada molt més baixa al SNC de la que es podria esperar de la seva lipofília (Abbott *et al.*, 2010). Aquestes substàncies, i molts dels seus metabòlits, són activament eliminats per transportadors ABC (*ATP-binding cassette*) des del cervell i l'endoteli capil·lar (Begley, 2004). En humans, els transportadors ABC són una superfamília de proteïnes que conté 48 membres, els quals s'agrupen en 7 subfamílies segons homologia estructural (Dean *et al.*, 2001). El transportador P-gp (glicoproteïna-P) és una bomba dependent d'ATP que pot eliminar ràpidament diversos metabòlits lipofílics tòxics, així com diversos medicaments amfipàtics catiónics (Löscher i Potschka, 2005; Hermann i Bassetti, 2007). Estudis recents d'immunocitoquímica en rata i teixit cerebral humà han revelat que la P-gp s'expressa tant a la membrana luminal com l'abluminal, així com als pericits i als astròcits (Bendayan *et al.*, 2006). A l'interior de les cèl·lules, la P-gp es distribueix al llarg de l'embolcall nuclear, en vesícules citoplasmàtiques, al complex de Golgi i al reticle endoplasmàtic rugós (Abbott *et al.*, 2010).

A més de la P-gp, també cal tenir en compte altres transportadors com les proteïnes associades de resistència múltiple (*multidrug resistance-associated protein*, MRP) ABCC1, 2, 4, 5 i, possiblement, 3 i 6, i la proteïna de resistència al càncer de mama (*breast cancer resistance protein*, BRCP) ABCG2 (Begley, 2004; Dauchy *et al.*, 2008; Kamiie *et al.*, 2008). Tots aquests transportadors tenen la possibilitat de treballar en consonància per reduir la penetració de diversos fàrmacs al cervell així com per augmentar la seva efluència. El possible paper dels transportadors ABC en la

patogènesi i tractament de diferents trastorns cerebrals diferents és cada vegada més reconegut i suscita un creixent interès (Zlokovic, 2008).

### **2.1.3 Barrera metabòlica**

Les CEC, junt amb els astròcits i els pericits de la BHE proporcionen una barrera metabòlica expressant una sèrie d'enzims que modifiquen molècules endògenes i exògenes, que d'altra manera podrien creuar la barrera física i afectar negativament la funció neuronal (Pardridge, 2005). D'aquesta manera, l'expressió intra- i extracel·lular de diversos ectoenzims com aminopeptidases, endopeptidases i colinesterases entre d'altres, poden dotar a la BHE d'una "barrera metabòlica". Així, ectoenzims com les peptidases i nucleotidases són capaços de metabolitzar respectivament diferents pèptids i ATP, mentre que enzims intracel·lulars com la monoamino-oxidasa i el citocrom P450 poden desactivar diversos compostos neuroactius tòxics (el-Bacha i Minn, 1999).

### **2.1.4 Membrana basal**

Tot i no formar part de manera explícita de la BHE funcionant com a barrera física, de transport o metabòlica, la membrana basal dóna suport a la vasculatura cerebral i separa les cèl·lules endotelials de les cèl·lules veïnes, és a dir, pericits i astròcits. La membrana basal es compon de diferents proteïnes estructurals de matriu extracel·lular (ME) com ara el col·lagen, la fibronectina, l'heparan-sulfat, la laminina i diversos proteoglicans i proteoglicans condroitina-sulfat. Les CEC, els pericits i els astròcits cooperen per generar i mantenir la membrana basal i les propietats de la BHE. Les cèl·lules vasculars, junt amb les neurones i les cèl·lules glials de suport (micròglia, oligodendròglia i astròcits) expressen receptors d'adhesió de matriu (del Zoppo *et al.*, 2006).

Les cèl·lules de la microvasculatura cerebral expressen les famílies de receptors d'adhesió de matriu d'integrina i de distroglicans, i tot i que diverses funcions d'aquests receptors encara s'estan estudiant, s'ha vist com les integrines tenen un paper clau en la senyalització endotelial, la migració cel·lular i la formació dels tubs de capil·lars durant l'angiogènesi (Zlokovic, 2008).

Els factors de creixement, com ara el factor de creixement de l'endoteli vascular (vascular endothelial growth factor, VEGF), estan units a les proteïnes de la ME i poden ser activats in situ per les metaloproteïnases (Zlokovic, 2006). Al seu torn, això pot regular diferents respostes de reparació angio- i neurogènica postisquèmiques (Zhao *et al.*, 2006). A més, s'ha vist que es produeixen alteracions en els receptors d'adhesió, dels seus lligands i de la mateixa ME durant la isquèmia cerebral focal, l'esclerosi múltiple, l'esclerosi lateral amiotròfica i certs tumors del SNC, així com durant malformacions arteriovenoses (Rascher *et al.*, 2002; Jian Liu i Rosenberg, 2005).

## **2.2 Paper de la BHE en la MA**

En nombroses patologies del cervell així com en altres malalties vasculars, inflamatòries i infeccioses, la funció de la BHE es troba sovint compromesa (Abbott *et al.*, 2006). En trastorns neuronals que tenen un origen vascular primari, les neurotoxines que es troben en la circulació sanguínia poden creuar la BHE i danyar a les neurones; a més, senyals proinflamatoris de les cèl·lules vasculars o una reducció del flux sanguini als capil·lars pot alterar la transmissió sinàptica normal i provocar així una lesió neuronal. Les cèl·lules de la micròglia reclutades de la sang o del cervell i de la paret vascular poden detectar senyals de les neurones; d'aquesta manera, l'activació de l'endoteli de la micròglia i dels astròcits pot conduir a l'alliberació de diferents mediadors cel·lulars que en la majoria dels casos agreugen la lesió neuronal. En el cas d'un trastorn neuronal primari, els senyals de les neurones s'envien a les cèl·lules vasculars i la micròglia, que activen la unitat neurovascular i contribueixen a la progressió del trastorn (Zlokovic, 2008).

### **2.2.1 Patologia microvascular**

Un elevat nombre de factors de risc per a la MA i la demència vascular es superposen, com edat avançada, aterosclerosi, accidents cerebrovasculars i accidents isquèmics transitoris, hipertensió, hiperlipidèmia, traumatismes cranials, viscositat sèrica elevada, factors trombogènics, trastorns cardíacs, ApoE4 i diabetis (Iadecola, 2004; Zlokovic, 2005; de la Torre, 2006; Luchsinger *et al.*, 2007). A més, els cervells dels pacients amb MA solen patir hipoperfusió i hipòxia. Com ja s'ha indicat a la introducció sobre la MA (apartat 2.9), s'ha observat que en l'esmentada malaltia hi ha una reducció de la densitat microvascular, un augment del nombre de vasos atròfics i fragmentats, un

augment de la irregularitat de la superfície dels capil·lars, una major dispersió en el diàmetre dels vasos, i un engruiximent de la membrana basal amb acumulació de col·lagen (Farkas i Luiten, 2001; Bailey *et al.*, 2004). Durant la MA, l'acumulació d'A $\beta$  al cervell i als vasos resulta en el desenvolupament de la CAA (Greenberg *et al.*, 2004). D'altra banda, hi ha una reducció en l'expressió de GLUT1 als capil·lars cerebrals, tot i que no apareixen canvis en l'estructura de l'mRNA GLUT1 (Mooradian *et al.*, 1997), ni alteracions en els seus nivells (Wu *et al.*, 2005). A més, la superfície disponible per al transport de glucosa disminueix significativament (Bailey *et al.*, 2004), suggerint que degut a alteracions en la BHE, en la MA el cervell experimenta una reducció de l'aportació energètica.

### **2.2.2 Angiogènesi aberrant**

Diversos estudis suggereixen que en la MA, la degeneració de les CEC pot reflectir una angiogènesi aberrant (Zlokovic, 2008). En la MA, les CEC expressen nivells extremadament baixos del gen *MEOX-2*, un factor de transcripció que en el cervell adult es limita al sistema vascular, on regula la diferenciació cel·lular i el remodelat vascular. Nivells baixos de *MEOX-2* produeixen respostes aberrants de les CEC al VEGF i altres factors angiogènics, produint una regressió prematura dels vasos, reducció del FSC i una formació alterada de la BHE (Wu *et al.*, 2005). A més, nivells baixos de *MEOX-2* promouen la degradació per part del proteasoma d'LRP1, disminuint la capacitat d'eliminació d'A $\beta$  per la BHE i afavorint-ne l'acumulació als vasos de la BHE (Zlokovic, 2008). A més, s'ha observat que l'acumulació d'A $\beta$  a la membrana externa dels vasos sanguinis té efectes antiangiogènics i aquest fet podria contribuir a la reducció de la densitat capil·lar observada en la MA (Paris *et al.*, 2004).

### **2.2.3 Captació d'A $\beta$ circulant**

El transportador RAGE capta A $\beta$  circulant i la internalitza al cervell a través de la BHE (Deane *et al.*, 2003). En condicions fisiològiques, el RAGE s'expressa en nivells relativament baixos en la BHE, excepte en l'endoteli dels capil·lars més grans. Tanmateix, en la MA i en models animals de MA l'expressió de RAGE es troba augmentada als vasos cerebrals (Deane *et al.*, 2003), i també a micròglia i a neurones (Yan *et al.*, 1996). El RAGE es pot unir a diferents formes del pèptid A $\beta$  i produir diferents respostes fisiopatològiques cel·lulars, i l'acumulació dels seus lligands com les proteïnes AGE i el mateix pèptid A $\beta$  augmenta l'expressió cerebrovascular de RAGE (Zlokovic, 2008). D'aquesta manera, una sobreexpressió del RAGE condueix a

una acumulació d'A $\beta$  vascular i cerebral que pot generar alteracions a la unitat neurovascular i, en conseqüència, en l'homeòstasi cerebral.

La interacció del RAGE amb l'A $\beta$  pot contribuir de manera directa a la mort neuronal per la producció de dany oxidatiu a les neurones que expressen RAGE, i de manera indirecta mitjançant l'activació de la micròglia (Yan *et al.*, 1996). A més, la inhibició de la interacció A $\beta$ /RAGE en vasos afectats inhibeix la producció de citocines, així com disminueix l'estrès oxidatiu i el transport d'A $\beta$  a través de la BHE (Deane *et al.*, 2003). A més a més, s'ha vist com els inhibidors de la interacció d'A $\beta$  amb RAGE estableixen les funcions de la BHE, redueixen la neuroinflamació i milloren el FSC. De fet, alguns d'aquests inhibidors estan sent provats avui en dia en pacients amb MA (Zlokovic, 2008).

D'altra banda, l'apolipoproteïna J (ApoJ), també coneguda com a clusterina, pot facilitar el transport d'A $\beta$  plasmàtic a través de la BHE (Nuutinen *et al.*, 2009) tot i que no és la principal proteïna de transport d'A $\beta$  (Sagare *et al.*, 2007). El transport del complex A $\beta$ -ApoJ a través de la BHE està mediat per la gp330/megalina o per l'LRP2 (Zlokovic *et al.*, 1996). El paper de l'LRP2 en el transport d'A $\beta$  encara no es coneix completament ja que a concentracions fisiològiques, l'LRP2 està saturat per ApoJ (Shayo *et al.*, 1997). El paper en la progressió de la patologia de la MA del transport mediat ApoJ/LRP2 d'A $\beta$  a través de la BHE encara està per explorar.

#### **2.2.4 Eliminació d'A $\beta$ cerebral**

L'LRP1 és un important transportador d'eliminació d'A $\beta$  a través de la BHE (Shibata *et al.*, 2000) membre de la família de receptors de les lipoproteïnes de baixa densitat (Low-density lipoprotein, LDL) i actua com a receptor de senyalització i com a quelant multifuncional. La unió d'A $\beta$  a LRP1 a la cara abluminal de les CEC n'inicia la seva eliminació mitjançant transcitosi (Shibata *et al.*, 2000; Deane *et al.*, 2004) i ja a nivell hepàtic, l'LRP1 s'encarrega de l'eliminació sistèmica del pèptid (Tamaki *et al.*, 2006).

L'enzim  $\beta$ -secretasa pot tallar l'LRP1 pel domini N-terminal extracel·lular alliberant així LRP1 soluble (sLRP1) al plasma (von Arnim *et al.*, 2005). En humans, entre un 70% - 90% d'A $\beta$  plasmàtic es troba unit a sLRP1 en condicions normals i s'ha vist que a la MA l'sLRP1 es troba oxidat i la unió amb A $\beta$  no és prou efectiva, incrementant així els nivells cerebrals d'aquest pèptid (Sagare *et al.*, 2007). S'ha constatat una expressió reduïda de LRP1 durant l'envelliment en rosegadors, en primats no humans i en



malalts de MA, associada a un increment dels vasos que presenten marcatge positiu per a  $A\beta_{40}$  i  $A\beta_{42}$  (Shibata *et al.*, 2000; Deane *et al.*, 2004; Donahue *et al.*, 2006). A més, els ratolins amb deficiència funcional severa de LRP1 a la BHE desenvolupen acumulacions d' $A\beta$  quan es creuen amb ratolins APP<sub>Swe</sub> (Van Uden *et al.*, 2002).

D'altra banda, s'ha vist com ratolins que no expressen la P-gp a la BHE (*knockouts* dels gens *mdr1a* i *mdr1b*) presenten una menor eliminació d' $A\beta$  cerebral, així com nivells reduïts d'LRP1 a les CEC. A més, s'ha vist com en ratolins Tg2576 l'acumulació i els dipòsits d' $A\beta$  s'acceleren i intensifiquen quan s'administra un inhibidor de la P-gp, i el creuament dels ratolins *knockouts* de P-gp amb els Tg2576 produeix el mateix efecte (Cirritto *et al.*, 2005b).

L'ApoE és una apolipoproteïna que té com a funció bàsica el transport de lípids i colesterol, i que presenta tres isoformes (ApoE2, ApoE3 i ApoE4) en éssers humans. Pel que fa a l'eliminació vascular, s'ha demostrat que l'ApoE té una funció de xaperona per a l' $A\beta$  (Wisniewski i Frangione, 1992). Els individus homozigots ApoE4 presenten un risc augmentat de patir la MA mentre que el homozigots ApoE2 presenten una reducció d'aquest risc (Tanzi i Bertram, 2001). A més, l'ApoE està associada amb un transport alterat d' $A\beta$  a través de la BHE (Bell *et al.*, 2007). En particular, els complexos ApoE2- $A\beta$  i els ApoE3- $A\beta$  s'eliminen per la BHE a un ritme considerablement més ràpid que els complexos ApoE4- $A\beta$  (Deane *et al.*, 2008). D'altra banda, s'ha observat com pericits amb un genotip ApoE2 o ApoE3 són més resistents als efectes tòxics de l' $A\beta_{40}$  en comparació amb pericits amb un genotip ApoE4 (Verbeek *et al.*, 2000). A més, un increment en la dosi de l'al·lel *ApoE4* s'ha associat amb un augment de CAA (Alonzo *et al.*, 1998).

A més del transport mediat per receptor, l'eliminació d' $A\beta$  del SNC també es pot produir per difusió lliure a través del flux del LIC cap al líquid cefaloraquídi (Silverberg *et al.*, 2003), i tot i que la proporció exacta d'aquesta via en relació a l'eliminació total d' $A\beta$  no es coneix amb exactitud, s'ha estimat que podria arribar a ser un 10 o un 15 % del total (Shibata *et al.*, 2000).

### **3. Els ratolins SAMP8**

El primer article descrivint el model SAM (*senescence-accelerated mice*) va ser publicat a *Mechanisms of Ageing and Development* l'any 1981 (Takeda *et al.*, 1981). La soca de ratolins SAM deriva originàriament dels ratolins AKR/J. L'any 1968 vàries parelles de ratolins AKR/J van ser donades al departament de patologia del Institut de recerca de malalties toràciques (CDRI) de la universitat de Kyoto, Japó on la soca va ser mantinguda de manera estàndard mitjançant creuaments entre germans. Als anys 1972-1973, va aparèixer descendència amb signes de pèrdua d'activitat, pèrdua de pèl i la seva lluentor, lesions perioftàlmiques, lordocifosi i mort prematura, sense existir evidència de retard en el creixement, malformacions, paràlisi de les extremitats o altres signes neurològics tals com tremolors o convulsions. Degut a que aquests fenotips eren heretats per les següents generacions, l'any 1975 es van seleccionar cinc membres amb les citades característiques com a progenitors de les sèries P, propenses a la senescència. De la mateixa manera, es van seleccionar tres animals que presentessin signes normals d'envelliment com a progenitors de les sèries R, resistents a la senescència (Takeda, 2009).

Amb el transcurs dels anys, algunes soques van esdevenir inviàbles i van aparèixer-ne també de noves que complien els criteris de consanguinitat per soques. L'any 1991, d'acord amb les normes internacionals de nomenclatura de soques de ratolins consanguinis, es van establir els termes SAMP (*senescence-accelerated mice prone*) i SAMR (*senescence-accelerated mice resistant*) per a les soques sensibles i resistents a l'envelliment accelerat respectivament, quedant establertes diferents colònies de ratolins SAMP i SAMR. L'esperança de vida mitjana dels animals SAMP era de 9,7 mesos, un 40% més curta que la dels animals SAMR, de 16,3 (Takeda *et al.*, 1991, 1994).

L'any 1986, l'equip del Dr. Miyamoto va descriure dèficits en aprenentatge i memòria de la soca d'animals SAMP8, una de les proclius a la senescència accelerada (Miyamoto *et al.*, 1986). Des d'aleshores els ratolins SAMP8 han estat usats en nombrosos estudis on s'han descrit nombroses característiques comportamentals, neuropatològiques, neuroquímiques i neurofarmacològiques que han convertit aquesta soca en un excel·lent model de senescència així com per estudiar els mecanismes del declivi cognitiu amb l'edat (Tomobe i Nomura, 2009). En diversos estudis que s'han dut

a terme per caracteritzar aquesta soca d'animals (Pallàs *et al.*, 2008), s'han usat animals SAMR1 com animals control ja que són resistents a la senescència accelerada i estan genèticament emparentats amb els SAMP8.

### **3.1 Alteracions del comportament**

#### **3.1.1 Aprenentatge i memòria**

Els ratolins SAMP8 mostren de manera espontània dèficits d'aprenentatge i memòria en edats joves i aquests dèficits empitjoren amb l'envelliment (Tomobe i Nomura, 2009). Mitjançant tasques especialment dissenyades per a detectar alteracions de memòria espacial, lligada a l'hipocamp, com el laberint aquàtic de Morris i el laberint de braços radials, els ratolins SAMP8 van mostrar dèficits en aquest tipus de memòria a partir dels 4 mesos d'edat (Flood *et al.*, 1998; Ikegami *et al.*, 1992; Cheng *et al.*, 2008). A més a més, estudis duts a terme amb tests més sensibles com el laberint aquàtic de braços radials suggereixen que els dèficits en l'aprenentatge espacial poden ser detectats en ratolins SAMP8 a partir dels 3 mesos, i que les alteracions en la memòria espacial no apareixen fins als 5 mesos d'edat (Chen *et al.*, 2004).

Altres tests d'aprenentatge són els d'evitació passiva i evitació activa. En el test d'evitació passiva, l'animal ha d'aprendre a evitar estímuls adversos romanent en ambients sense estímulo negatiu però no agradables (llum), en comptes d'entrar en ambients agradables (fosc) però amb estímulo negatiu. El test d'evitació activa consisteix en avaluar si l'animal és capaç d'aprendre a escapar d'un ambient on prèviament ha rebut un estímulo advers (Archer, 1975). En ambdós tests els animals SAMP8 van presentar alteracions significatives a partir dels dos mesos d'edat (Miyamoto, 1992; 1997).

#### **3.1.2 Conducta d'ansietat**

Els ratolins SAMP8 mostren un comportament reduït d'ansietat, expressat per una disminució del temps de latència per començar a rosegat un nou menjar després d'una deprivació de menjar de 24 hores, en contrast amb altres soques de ratolins que mostren neofòbia a nous menjars. En el laberint de creu elevat, els ratolins SAMP8 entren més vegades i estan més temps en els braços oberts que els animals SAMR1 (Miyamoto *et al.*, 1992). En un altre estudi on es donaven xocs elèctrics davant d'intents de beguda després de deprivació d'aigua, els animals SAMP8 van presentar

resultats més baixos d'ansietat davant d'animals SAMR1 i, de manera interessant, animals SAMR1 d'edat avançada també van presentar índexs més baixos d'ansietat enfront animals SAMR1 joves (Miyamoto *et al.*, 1992).

### **3.1.3 Ritme circadiari**

Alguns autors han mesurat l'activitat motora espontània (*spontaneous motor activity*, SMA) per a avaluar l'estat del ritme circadiari d'animals SAMP8 i també SAMR1. Als 4 mesos d'edat, els ratolins SAMP8 van mostrar un augment significatiu en els recomptes de SMA diürns, especialment durant les primeres 3-4 hores del període de llum. Aquest augment de l'SMA diürna també es va observar als 8 mesos d'edat. Per contra, els ratolins SAMR1 van mostrar ritmes circadiaris de SMA i d'hàbit de beguda típics; és a dir, notables augments en el període de foscor en contrast amb la disminució en el període de llum i es va reduir l'amplitud dels ritmes amb l'edat. Als 12 mesos d'edat, no hi va haver diferències aparents entre les dues soques a causa d'una reducció en l'amplitud del ritme de la soca SAMR1 (Miyamoto, 1994; 1997). Pel que fa a la conducta de beguda, es va fer evident que el recompte vegades que els ratolins SAMP8 bevien a la nit va tendir a disminuir als 2 mesos d'edat. Dels 4 als 12 mesos d'edat, però, els ratolins SAMP8 van mostrar increments significatius en els recomptes de beguda diürns en comparació amb els ratolins de control SAMR1 (Nishiyama *et al.*, 1994; Miyamoto, 1997). Per tant, aquests resultats van revelar que els ratolins SAMP8 mostren un trastorn definit en el ritme circadiari en relació amb l'SMA i la conducta de beguda. Tal i com discuteix Miyamoto (1997), però, altres factors fisiològics i neuroquímics com el deteriorament en el sistema de neurotransmissors de l'hipotàlem i el nucli supraquiasmàtic s'haurien de considerar també per entendre millor els ritmes circadiaris alterats en els animals SAMP8.

## **3.2 Alteracions neuropatològiques**

La soca d'animals SAMP8 mostra certes alteracions neurològiques també observades en humans d'edat avançada i que es consideren més com canvis fisiològics inherents al procés d'envelliment que no pas canvis patològics. Entre varies alteracions descrites, trobem inclusions neuronals talàmiques (Akiguchi *et al.*, 1988), reducció en la densitat d'espines dendrítiques en diferents àrees hipocampals (Sugiyama *et al.*, 1987), distròfia axonal en els nuclis de la columna dorsal (Kawamata *et al.*, 1994), astrogliosis i lipopigmentosis (Akiguchi *et al.*, 1988)

### 3.2.1 $\beta$ -Amiloide

La proteïna  $\beta$ -amiloide prové del processament de la proteïna APP per part dels enzims  $\beta$ - i  $\gamma$ -secretasa. Els dipòsits d'aquesta proteïna formen les plaques senils, una de les lesions més característiques de la MA i imprescindible encara avui dia per a un diagnòstic post mortem de la malaltia (McKhann *et al.*, 1984; Epis *et al.*, 2010). En animals SAMP8, es va detectar un augment de l'mRNA de l'APP tant a l'escorça cerebral com a l'hipocamp a partir dels 6 mesos d'edat (Tha *et al.*, 2000). A més a més, s'ha descrit un increment de la càrrega d'APP en animals SAMP8 (Morley *et al.*, 2000) així com en la càrrega de  $\beta$ -amiloide (Takemura *et al.*, 1993). Aquestes premisses van conduir a que alguns autors consideressin la soca d'animals SAMP8 com a model de la MA (Morley *et al.*, 2004), tot i que encara mancava una clara confirmació de si tenien o no plaques senils.

Els primers estudis en parlar d'acumulacions de la proteïna  $\beta$ -amiloide en ratolins SAMP8 van descriure unes estructures granulars immunoreactives de tipus proteic  $\beta/A4$  (Takemura *et al.*, 1993). Tot i això, pocs articles han continuat parlant d'aquest tipus de dipòsits (Fukunari *et al.*, 1994; Kato *et al.*, 1997; Morley *et al.*, 2000) i han estat caracteritzats amb una gran variabilitat, descrivint la seva aparició ja als dos mesos d'edat (Takemura *et al.*, 1993) o rarament i no abans dels 16 mesos (Morley *et al.*, 2000) o 18 mesos d'edat (Pallàs *et al.*, 2008). Degut a la controvèrsia creada sobre la presència o no d'agregats amiloides que formessin estructures similars a les plaques senils en aquests ratolins, alguns autors van posar de manifest la necessitat d'una clarificació sobre aquest assumpte (Takeda, 2009).

### 3.2.2 Tau

La família de proteïnes tau es constitueix per 6 isoformes involucrades en la polimerització de la tubulina, l'estabilitat dels microtúbuls, el transport axonal així com la senyalització del citoesquelet (Pallàs *et al.*, 2008). En diverses malalties neurodegeneratives, podem trobar com la proteïna tau s'hiperfosforila mitjançant diversos enzims com GSK3 $\beta$ , CDK-5, PKC i SAPK (Avila, 2004; Ferrer *et al.*, 2005; Iqbal *et al.*, 2005). Aquesta hiperfosforilació genera inestabilitat als microtúbuls ja que inhibeix el seu acoblament i provoca, en darrer terme, degeneració de les neurones afectades (Brion, 2006; Cash *et al.*, 2003). De fet, en la MA on hi ha degeneració neuronal es troben lesions neurofibril·lars produïdes per cúmuls de tau hiperfosforilada en cabdells neuronals, extensions neurítiques, neurites distròfiques i als voltants de plaques senils. Es poden detectar increments en la fosforilació de Tau a partir dels 5

mesos d'edat en ratolins SAMP8 (Alvarez-García *et al.*, 2006), aquests animals mostren varies formes de tau hiperfosforilada en comparació als ratolins SAMR1 (Caballero *et al.*, 2008; Canudas *et al.*, 2005) i, a més a més, aquest increment en la fosforilació de tau és degut a mecanismes equivalents als de la MA, com un increment en l'expressió de CDK5 i un increment de l'activitat del complex CDK5/p25 (Canudas *et al.*, 2005).

### **3.2.3 Degeneració espongiforme**

La degeneració espongiforme dels ratolins SAMP8 va ser descrita l'any 1989 i és la primera alteració descrita en aquesta soca (Yagi *et al.*, 1989). Durant el desenvolupament, es poden observar vacúols de diferent grandària en el neuropil de la formació reticular del tronc de l'encèfal en cervells de ratolins SAMP8, mentre que aquestes les mateixes alteracions no s'aprecien en els animals SAMR1. La degeneració espongiforme es pot trobar entre l'hipotàlem i la medul·la espinal, especialment en la formació reticular magnocel·lular, el nucli reticular pontí i el nucli reticular gigantocel·lular. Els vacúols comencen a aparèixer al mes d'edat i assoleixen el seu màxim en nombre i grandària als 4-8 mesos d'edat. Ultraestructuralment, els vacúols es classifiquen en dos tipus morfològics. El primer tipus es refereix als que es troben entre els components postsinàptics. Aquests apareixen a partir d'una lleu inflamació dendrítica al primer mes d'edat, i a continuació hi ha inflamació postsinàptica i un augment de les estructures membranoses de les dendrites als 2 mesos. Als 5 mesos d'edat, ja es poden observar làmines membranoses de tipus mielínic envoltant els grans vacúols. El segon tipus de vacúol és causat per la separació de les beines de mielina en la línia densa major de l'oligodendròglia.

### **3.2.4 Proliferació astrocitària i microglial**

En cervells humans d'edat avançada es pot observar proliferació glial (Goss *et al.*, 1991; Kohama *et al.*, 1995; David *et al.*, 1997; Amenta *et al.*, 1998). L'activació astrocitària i el reclutament de la micròglia generen una resposta inflamatòria que es troba sobretot accentuada en cervells de persones amb MA, essent els astròcits i la micròglia cèl·lules capaces de secretar un gran nombre de citocines i productes neurotòxics; produint d'aquesta manera processos de neurodegeneració i mort neuronal (Sastre *et al.*, 2006). S'ha demostrat que els cervells de malalts d'Alzheimer mostren un increment en els marcadors de gliosi GFAP i S100 $\beta$  en hipocamp i escorça cerebral (Sheng *et al.*, 1994). De manera similar, els ratolins SAMP8 presenten un

increment dels marcadors de proliferació glial GFAP i PK-11195 (Nomura *et al.*, 1996). En un altre estudi realitzat per Sureda i col. es mostra una marcada astrogliosi i microgliosi en animals SAMP8 de 5 mesos en comparació amb ratolins SAMR1 de la mateixa edat (Sureda *et al.*, 2006). Així mateix, s'ha descrit una marcada acumulació de cèl·lules microgials reactives associada amb un increment d'expressió de catepsines E i D en cervells de ratolins SAMP8 (Amano *et al.*, 1995).

### **3.2.5 Virus de la leucèmia murina**

En un estudi virològic i morfològic realitzat recentment (Jeong *et al.*, 2002), es va analitzar l'expressió dels virus ecotròpic (E-MuLVs), xenotròpic, i politròpic de la leucèmia murina (MuLVs) al cervell de ratolins SAMP8 i SAMR1. No es va trobar mRNA ecotròpic en SAMR1 i només va ser detectat mRNA ecotròpic de tipus Akv en ratolins SAMP8. Els nivells d'mRNA corresponents a politròpic i xenotròpic MuLV van ser equivalents per SAMP8 i SAMR1 i, a més, no es va detectar cap indicatiu de cap altre virus patològic.

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

### **3.2.6 Degeneració cerebelar**

En el cerebel de ratolins SAMP8 s'han descrit diferències regionals relacionades amb l'edat en la reducció del gruix de l'escorça: essent l'arquicerebel el que va mostrar una major disminució del gruix, seguit pel neocerebel i el paleocerebel. Així mateix, la taxa de disminució en l'espessor de la capa molecular va ser més gran que el de la capa granular (Nagasaki *et al.*, 1995).

En un article publicat recentment es posa de manifest com, mitjançant els mètodes de TUNEL i tinció histològica de plata, algunes cèl·lules de Purkinje en el cerebel medial i la vermis semblen desaparèixer durant l'envelliment en ratolins SAMP8 (Zhu *et al.*,

2007), d'acord amb el que passa als cervells de persones amb MA (Fukutani *et al.*, 1996; Sjobeck i Englund, 2001).

### **3.2.7 Degeneració neuronal dopaminèrgica**

En un estudi realitzat per Karasawa *et al.* (1997) es va veure com la immunoreactivitat de neurones catecolaminèrgiques a la DOPA descarboxilasa (*aromatic L-amino acid decarboxylase*, AADC), la dopamina (DA) o la noradrenalina (NA), era més feble en ratolins SAMP8 que en ratolins SAMR1 en totes les regions cerebrals.

Per microscòpia immunoelectrònica es va detectar una degeneració progressiva de les neurones dopaminèrgiques i les seves fibres terminals en la substància nigra de ratolins SAMP8, així com de les neurones noradrenèrgiques i les seves dendrites proximals del *locus coeruleus*. En canvi, no es van observar diferències en el nombre de neurones únicament AADC positives (neurones D) entre les soques SAMP8 i SAMR1. Aquests resultats van indicar que les neurones dopaminèrgiques en la substància nigra i les neurones noradrenèrgiques en el *locus coeruleus* degeneren més ràpidament durant l'envelliment en els ratolins SAMP8 que en els ratolins SAMR1 i que les neurones D poden funcionar com a part d'un sistema compensatori a la disminució de neurones catecolaminèrgiques durant l'envelliment.

### **3.2.8 Degeneració oligodendrocítica**

Per valorar les possibles alteracions en els oligodendròcits, un estudi va dur a terme tècniques immunohistoquímiques per detectar la proteïna bàsica de la mielina (*myelin basic protein*, MBP) i l'enzim 2', 3'-nucleòtid cíclic 3'-fosfodiesterasa (CNP) com a marcadors d'oligodendròcits (Tanaka *et al.*, 2005). A la subzona de l'hipocamp CA1 als 10 mesos d'edat, els animals SAMP8 van presentar una disminució en la immunoreactivitat de la MBP i el CNP en comparació a animals SAMR1 de la mateixa edat. Ara bé, no es van poder apreciar diferències per a aquests marcadors oligodendrocítics en escorça cerebral o tracte òptic. A més, es va mesurar l'àrea d'immunoreactivitat per MBP a la subzona CA1 de les dues soques i es va veure com aquesta disminueix progressivament amb l'edat en SAMP8 en comparació amb animals SAMR1. D'aquesta manera es va demostrar una degeneració d'oligodendròcits a l'hipocamp en ratolins de la soca SAMP8.



### 3.2.9 Estrès oxidatiu

S'ha dut a terme una gran quantitat d'estudis que indiquen un major estatus oxidatiu en diversos teixits, incloent el cervell, de ratolins SAMP8 en comparació a d'altres soques.

En un primer estudi utilitzant ratolins d'11 i 12 mesos d'edat SAMP8 i SAMR1, es va poder observar una quantitat significativament més alta de malondialdehid (MDA) i d'activitat monoamino oxidasa B en cervell i fetge de ratolins SAMP8 en comparació als ratolins SAMR1. A més, el contingut de lipofuscina (producte de la peroxidació lipídica) va augmentar al fetge, però no al cervell, dels ratolins SAMP8 d'11-12 mesos. A més a més, la superòxid dismutasa (SOD) mitocondrial de les cèl·lules hepàtiques va mostrar ser menys activa en ratolins SAMP8 (Nomura *et al.*, 1989). Tanmateix, en un altre estudi es va descriure un augment edat-dependent en l'activitat de la SOD al fetge així com en la reactivitat de l'àcid tiobarbitúric (equivalent al contingut d'MDA) tant en fetge com en cervell de ratolins SAMP8, i una disminució relacionada amb l'edat en els nivells de glutatió en cervell i fetge als 3 i 11 mesos d'edat (Liu i Mori, 1993).

D'altra banda, amb l'objectiu de prevenir els danys oxidatius a diversos òrgans, un estudi va administrar de manera crònica a animals SAMP8 a partir dels tres mesos d'edat N-tert-fenil-butilnitrona (PBN), un depurador de radicals lliures. Els animals tractats van veure incrementada la seva esperança de vida en un 33% (56 setmanes en el grup tractat amb PBN enfront de 42 setmanes dels animals administrats amb vehicle), suggerint un paper protagonista dels radicals lliures en el procés d'envelliment dels animals SAMP8 (Edamatsu *et al.*, 1995).

Sato *et al.* (1996a, b) van estudiar els canvis en l'estrès oxidatiu relacionats amb l'edat en cervells de ratolins SAMP8 i SAMR1 a les 2, 4-8, 20-28 i 40-56 setmanes d'edat. Van mostrar com els nivells de peròxids lipídics, de grups carbonil i d'espècies reactives de l'oxigen (*reactive oxygen species*, ROS) augmentaven amb l'edat en animals SAMP8. Tanmateix, els nivells de l'enzim glutamina sintetasa, enzim sensible a les ROS, disminuïa progressivament amb l'edat. A més a més, els nivells de peròxids lipídics i de grups carbonil proteics es van incrementar transitòriament en ratolins SAMP8 de 4-8 setmanes d'edat en comparació a animals SAMR1, tot i que l'augment dels peròxids lipídics només es va observar en l'escorça cerebral i no en altres regions cerebrals. Es va observar també com, en comparació a animals SAMR1, en aquesta franja d'edat s'incrementava la generació neta d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en cèl·lules cerebrals

dissociades. A més a més, l'activitat de la glutamina sintetasa va disminuir en l'escorça cerebral de ratolins SAMP8 a 4-8 setmanes d'edat. D'aquesta manera, es mostra com els ratolins SAMP8 de 4 a 8 setmanes d'edat mostren un major estatus oxidatiu, que precedeix a la manifestació de dèficits en l'aprenentatge i la memòria (Sato *et al.*, 1996a). En un estudi posterior es va suggerir que els canvis en l'activitat de catalasa i oxidasa acil-CoA podrien ser una de les causes de l'augment precoç d'estrès oxidatiu en l'escorça de ratolins SAMP8 de 4 a 8 setmanes d'edat (Sato *et al.*, 1996b).

En un altre estudi es va determinar la concentració de peròxids lipídics en cervell, cor, fetge, pulmons i ronyons de ratolins SAMP8 i SAMR1 als 3, 6 i 9 mesos d'edat. Els nivells de peròxids lipídics en els teixits estudiats excepte el cervell van mostrar un augment amb l'edat en ambdues soques, i els nivells en SAMP8 van ser significativament més grans que en SAMR1 als 3 i 6 mesos d'edat, excepte als 3 mesos en ronyó. D'altra banda, no van aparèixer canvis progressius amb l'edat en cervell en cap de les dues soques, tot i que els nivells van ser sempre més alts en ratolins SAMP8 (Matsugo *et al.*, 2000). Després d'aquest treball, es va determinar amb més precisió l'edat en què els peròxids lipídics augmentaven en cervell i fetge de SAMP8. Els resultats van mostrar que els nivells ja van ser significativament majors als 2 mesos en comparació a 1 més d'edat i en SAMR1, però aquests canvis no es van observar ni en cervell ni en fetge. D'aquesta manera es mostra com la soca d'animals SAMP8 ja està exposada a nivells elevats d'estrès oxidatiu des d'una edat primerenca (Yasui *et al.*, 2003).

A més de les qüestions de gènere, els diferents mètodes, diferents condicions de cria d'animals i així successivament podria ser factors causants de les discrepàncies de dades.

### **3.2.10 Alteracions mitocondrials**

L'estat de les mitocòndries dels animals SAMP8 es va estudiar mitjançant la fosforilació oxidativa d'aquests orgànuls en fetge de ratolins de 6, 12 i 18 mesos d'edat. La ràtio de control respiratori va disminuir progressivament amb l'edat, i el seu valor a 18 mesos es va considerar insuficient per proporcionar la síntesi d'ATP necessària per a un metabolisme cel·lular normal (Nakahara *et al.*, 1998). Per caracteritzar la disfunció mitocondrial a edats inicials es va investigar l'estat redox i la fosforilació oxidativa d'aquests orgànuls al cervell de ratolins SAMP8 i SAMR1 de 2 mesos d'edat. Els mitocondris cerebrals de SAMP8 van mostrar un major estat redox i

una major activitat de la respiració mitocondrial amb una ràtio menor de control respiratori que els mitocondris de ratolins SAMR1. D'aquesta manera, es va suggerir que abans de desenvolupar una disfunció mitocondrial relacionada amb l'edat, podria existir un estat hiperactiu ineficient en el sistema de transport electrònic mitocondrial (Nishikawa *et al.*, 1998).

A més a més, l'ADN mitocondrial en cervell de SAMP8 mostra múltiples delecions. Les supressions apareixen ja a les 4-8 setmanes d'edat i en major nombre en comparació a soques control com SAMR1 o ddY. A més, apareix també una disminució de l'activitat enzimàtica dels complexos I i III. Els autors van considerar així que una alteració del transport d'electrons en els mitocondris del cervell de ratolins SAMP8 pot induir una major producció de radicals lliures i així un estat d'estrès oxidatiu crònic, generant en últim terme neurodegeneració (Fujibayashi *et al.*, 1998).

### **3.2.11 Alteracions en la barrera hematoencefàlica**

Hi ha certa controvèrsia sobre l'estat de la BHE en aquests animals, ja que alguns estudis han descrit alteracions de la BHE amb la subseqüent extravasació de traçadors i d'altres estudis no han detectat canvis en la permeabilitat de la BHE degut a una retenció nul·la de traçadors en el parènquima cerebral.

Estudis preliminars van detectar que la taxa de transferència cerebral d'albumina sèrica administrada prèviament és més gran en ratolins SAMP8 que en animals SAMR1 de la mateixa edat. Així mateix, aquesta taxa de transferència és més gran a mesura que els animals SAMP8 envelleixen (Ueno *et al.*, 1993; Hosokawa i Ueno 1999). A més a més, en hipocamp d'animals SAMP8, s'ha observat mitjançant marcatges immunohistoquímics un increment en l'extravasació d'albumina sèrica endògena (Hosokawa i Ueno, 1999) i d'HRP prèviament administrada així com un increment de cèl·lules endotelials tenyides per HRP (Ueno *et al.*, 2001a). Així mateix, s'ha descrit que en animals SAMP8 vells les cèl·lules endotelials de les àrees adjacents a les zones periventriculars mostren un citoplasma irregularment gruixut i dens així com inclusions de la membrana a la làmina basal (Ueno *et al.*, 2001b) indicant que tant els pericits com les cèl·lules endotelials d'aquestes zones tenen una estructura amb la BHE danyada.

D'altra banda, l'equip de Banks *et al.* (2000) van realitzar diversos estudis per tractar de caracteritzar l'estat de la BHE dels animals SAMP8. En un primer estudi es va

administrar per via intravenosa albúmina i també insulina marcades radioactivament i es va mesurar la relació cervell/sèrum de l'albúmina i la taxa de transport de la insulina. No es van observar canvis en la relació cervell/sèrum d'albúmina, ni en animals SAMP8 joves ni en els vells, mostrant que no hi ha retenció cerebral d'aquesta proteïna. A més a més, no van aparèixer canvis ni en el transport ni en la unió de insulina al cervell, suggerint que la BHE no estava alterada. En un altre estudi es va mesurar la capacitat de transport cerebral per a IL-1 en cervells d'animals SAMP8 joves i vells i es va comparar amb la capacitat dels animals ICR; a més a més, es va determinar la retenció de sucrosa i albúmina radioactives. Es va veure que els animals SAMP8 exhibien un transport deficient d'IL-1 degut a que eren capaços d'incorporar IL-1 al parènquima cerebral en menys àrees del cervell que en comparació als animals ICR. Aquest fet, però, no era degut a alteracions en la BHE si no a una influència genètica en la capacitat de transport d'aquesta citocina. A més a més, no es van trobar diferències en la quantitat de sucrosa ni d'albúmina cerebrals en animals SAMP8 vells (Moinuddin *et al.*, 2000).

En un darrer estudi es va mesurar la transferència TNF $\alpha$  de la sang a 10 regions cerebrals en animals SAMP8 de 17 mesos i en ICR i SAMP8 de 2 mesos d'edat. En animals joves, no van aparèixer diferències ni en les diferents regions cerebrals estudiades ni tampoc en la taxa total de transferència entre les dues soques. Sí que van aparèixer diferències però en animals SAMP8 vells, que van presentar un índex més alt de transport de TNF $\alpha$  a còrtex occipital, mesencèfal i cos estriat en comparació als ratolins joves de la mateixa soca (Banks *et al.*, 2001).

S'ha de tenir en compte però que els estudis que s'han dut a terme per tal de descriure possibles alteracions en la BHE d'animals SAMP8 s'han fet amb diferents molècules, marcadors i tècniques, i que això pot ser un factor determinant en la variabilitat dels resultats trobats en la literatura fins avui en dia.



## **II. Objectius**



Els ratolins SAMP8 constitueixen un model ideal per a l'estudi dels processos fisiològics i fisiopatològics que tenen lloc durant la senescència i, a més, aquesta soca ha estat usada com a model de la MA. Segons la hipòtesis neurovascular de la MA, la falta d'eliminació d'A $\beta$  a través de la BHE pot incrementar els nivells dels pèptids tòxics A $\beta$  i produir lesions vasculars i dipòsits amiloides. Aquesta falta d'eliminació estaria produïda per una angiogènesi aberrant o per la senescència de les CEC, ambdues associades a una disminució dels receptors d'eliminació i/o un augment dels receptors de captació d'A $\beta$ . L'acumulació de pèptids tòxics, al seu temps, produeix alteracions en la BHE generant alteracions iòniques i moleculars en el parènquima cerebral que acabarien donant a lloc o amplificant les disfuncions sinàptiques i les lesions i mort neuronals observades en la MA.

L'objectiu global d'aquest treball és caracteritzar l'evolució temporal de les alteracions de la BHE i estudiar la presència d'amiloïdosi en els ratolins SAMP8, així com determinar la relació entre aquestes dues variables.

En concret s'han formulat els següents objectius:

1. Determinar la presència i la progressió temporal de les possibles modificacions en la permeabilitat de la BHE en l'hipocamp i l'escorça dels ratolins SAMP8.
  - 1.1. Establir mètodes per a la determinació de la permeabilitat de la BHE a substàncies plasmàtiques endògenes i/o traçadors exògens.
  - 1.2. Aplicar els mètodes establerts a l'objectiu anterior a animals SAMP8 de diferents edats i comparar els resultats amb animals control.
2. Caracteritzar la presència i la progressió temporal d'A $\beta$  en l'hipocamp i l'escorça de ratolins SAMP8.
  - 2.1. Caracteritzar el marcatge tipus A $\beta$  i la seva proteïna precursora APP mitjançant immunolocalització i anàlisi microscòpic.
  - 2.2. Quantificar els diferents tipus de marcatge A $\beta$  caracteritzats a l'objectiu anterior a ratolins SAMP8 de diferents edats i comparar els resultats amb animals de soques control.
  - 2.3. Caracteritzar l'evolució temporal del nombre de vasos amb amiloïdosi en SAMP8 i soques control.



3. Estudiar la possible la relació espacial i temporal entre l'augment d'A $\beta$  i les alteracions de permeabilitat de la BHE en ratolins SAMP8.
  - 3.1. Analitzar si la localització dels agregats amiloides manté relació amb la localització dels capil·lars cerebrals.
  - 3.2. Determinar si els agregats amiloides es troben en àrees cerebrals on la BHE està alterada.
  - 3.3. Establir la possible relació entre els agregats amiloides i els vasos amb amiloïdosi
  - 3.4. Establir la relació entre els vasos amb amiloïdosi i els vasos amb la BHE alterada.

### **III. Resultats: articles**



## Article 1

### INCREASED PERMEABILITY OF BLOOD-BRAIN BARRIER ON THE HIPPOCAMPUS OF A MURINE MODEL OF SENESCENCE

**Authors:** Carme Pelegrí, Anna Maria Canudas, Jaume del Valle, Gemma Casadesus, Mark A. Smith, Antoni Camins, Mercè Pallàs i Jordi Vilaplana

Mechanisms of Ageing and Development 2007; 128: 522-528.



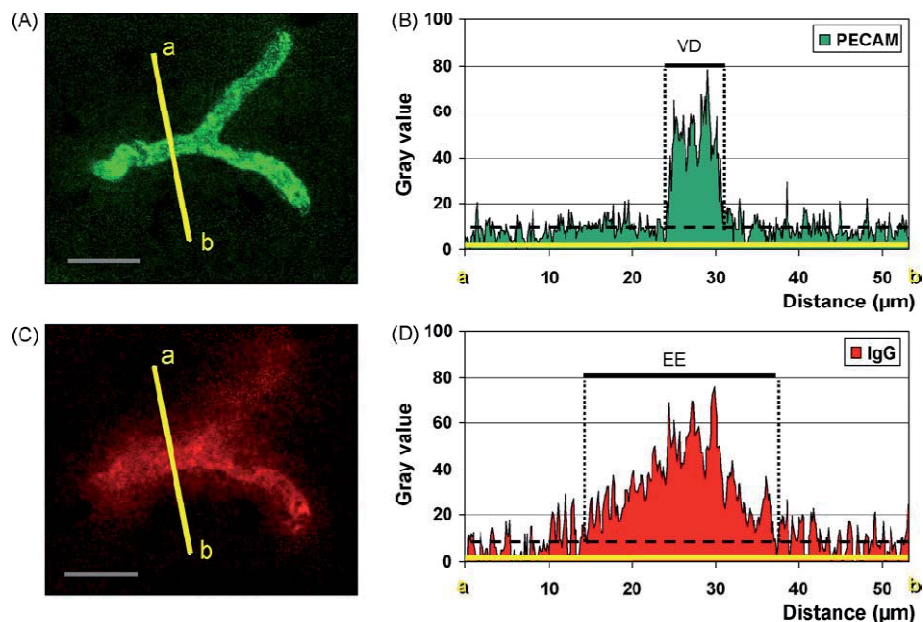
## RESUM

### Objectiu

Determinar la integritat de la BHE mitjançant l'estudi d'extravasació d'una proteïna endògena a l'hipocamp dels ratolins amb senescència accelerada SAMP8 a diferents edats.

### Material i mètodes

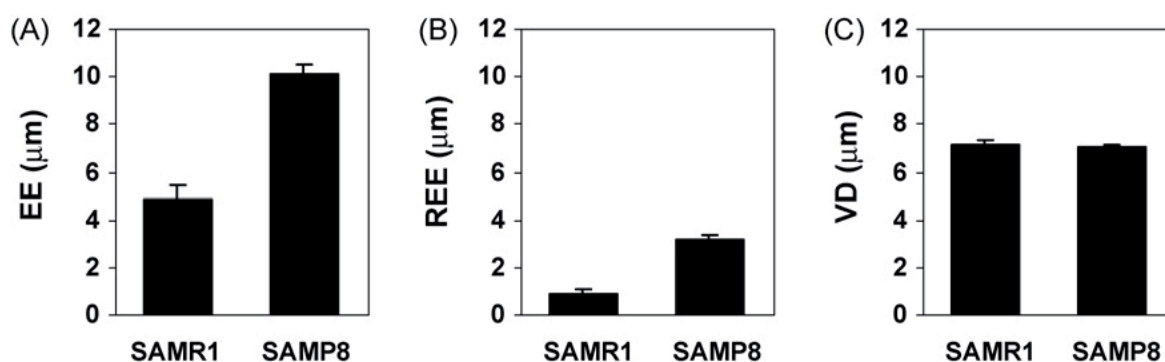
Es van utilitzar animals SAMP8 i SAMR1 de 3, 7 i 12 mesos d'edat. Després d'anestesiari i perfondre els animals amb sèrum fisiològic, es va procedir a l'extracció del seu cervell. Es van realitzar seccions criostàtiques d'aquest teixit i es van aplicar tècniques de immunohistoquímica per localitzar els vasos sanguinis de l'hipocamp i detectar l'extravasació d'IgG en aquests vasos. Es van obtenir imatges dels vasos i de la IgG en aquests mitjançant microscòpia de fluorescència. Posteriorment, es va dissenyar una tècnica d'anàlisi d'imatges per a la quantificació de la fluorescència btinguda (Fig. 12) i obtenir així tres variables: diàmetre dels vasos (*vessel diameter*, VD), extensió de l'extravasació de l'IgG (EE) i extensió relativa de l'extravasació de l'IgG (*relative extension of IgG extravasation*, REE) com a diferència de VD i EE.



**Fig. 12** Tècnica d'anàlisi d'imatge per quantificar el diàmetre dels vasos i l'extravasació d'IgG. (A) Vas cerebral amb línia arbitrària. (B) Perfil d'intensitat de marcatge a través de la línia, una línia discontinua marca la fluorescència basal, s'aprecia el VD. (C) La mateixa regió amb la mateixa línia traçada però amb tinció per IgG. (D) Perfil d'intensitat de marcatge a través de la línia. S'obté l'extensió de l'extravasació. Barra d'escala: 20 µm.

## Resultats

Tant el plexe coroide, on no hi ha una BHE funcional i s'usa com a control positiu d'extravasació, com la fissura hipocampal van mostrar marcatge positiu per IgG en totes les edats i soques estudiades. No es va observar positivat d'IgG en els vasos de l'hipocamp de les soques SAMP8 ni SAMR1 als 3 i 7 mesos d'edat. En canvi, sí que l'EE va ser significativament superior en els vasos de l'hipocamp d'animals SAMP8 de 12 mesos d'edat, en comparació amb la soca control SAMR1 (Fig. 13A). Quan es va restar l'EE del VD per obtenir l'REE i així saber la quantitat relativa d'IgG present al parènquima cerebral, es va observar que els ratolins SAMP8 mostraven també valors significativament més alts d'extravasació d'IgG que els ratolins SAMR1 (Fig. 13B). Tanmateix, no van aparèixer diferències significatives en el VD a 12 mesos d'edat (Fig. 13C).



**Fig. 13 Extravasació d'IgG i diàmetre dels vasos sanguinis de ratolins SAMP8 i SAMR1.** (A) Extensió de l'extravasació de l'IgG (EE) i (B) Extensió relativa de l'extravasació de l'IgG (*relative extension of IgG extravasation*, REE) al voltant dels capil·lars de l'hipocamp dels ratolins SAMR1 i SAMP8 de 12 mesos d'edat. (C) Diàmetre dels vasos (*vessel diameter*, VD) de l'hipocamp dels ratolins SAMR1 i SAMP8. Els valors mostren mitjanes  $\pm$  E.E.M. En (A) i (B), les diferències entre grups són significatives ( $p < 0.05$ ).

## Conclusions

La permeabilitat de la barrera hematoencefàlica per a la IgG està incrementada en els animals SAMP8 de 12 mesos d'edat, en comparació a les altres edats més joves estudiades i a la soca control SAMR1.

## Increased permeability of blood–brain barrier on the hippocampus of a murine model of senescence

Carme Pelegrí<sup>a</sup>, Anna Maria Canudas<sup>b</sup>, Jaume del Valle<sup>a</sup>, Gemma Casadesus<sup>c</sup>,  
Mark A. Smith<sup>d</sup>, Antoni Camins<sup>b</sup>, Mercè Pallàs<sup>b</sup>, Jordi Vilaplana<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain*

<sup>b</sup> *Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain*

<sup>c</sup> *Department of Neuroscience, Case Western Reserve University, Cleveland, OH, USA*

<sup>d</sup> *Department of Pathology, Case Western Reserve University, Cleveland, OH, USA*

Received 31 March 2007; received in revised form 22 June 2007; accepted 1 July 2007

Available online 10 July 2007

### Abstract

SAMP8 mice show several indicative characteristics of accelerated aging and have been used to study the physiological and physiopathological processes that take place during senescence. There is some controversy about the presence of a functional blood–brain barrier (BBB) disturbance on these animals, which could be related to the oxidative stress or the amyloidosis present in their brain. In order to elucidate BBB status in the hippocampus of SAMP8 mice, in this study we have determined the extravasation from brain microvessels of endogenous IgG in SAMP8 mice aged 3, 7 and 12 months and in age-matched control SAMR1 mice. Immunohistochemistry, confocal microscopy and an imaging methodology specially designed to quantify IgG extravasation have been used. The choroid plexus was analyzed as a control for positive extravasation in SAMP8 and SAMR1 mice and, as expected, in all studied ages high IgG immunoreactivity was observed in both strains. We have found significantly higher levels of IgG extravasation in the hippocampus of 12-month-old SAMP8 mice compared to SAMR1 mice, indicating an increased permeability of BBB in aged senescence-accelerated mice.

© 2007 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** SAMP8; Senescence; Mouse; Blood–brain barrier; Hippocampus; Immunohistochemistry; Confocal microscopy; IgG quantification

### 1. Introduction

The blood–brain barrier (BBB) is a complex structure essential to maintain central nervous system (CNS) homeostasis. The BBB protects the brain from toxic substances and it simultaneously allows access to essential nutrients and chemical signals. An increase in BBB permeability has been described in a number of CNS pathologies (Al-Kassab et al., 1981; Mihaly and Bozoky, 1984; Tanno et al., 1992; De Vries et al., 1997). This increase could be related to an oxidative stress-mediated disruption of BBB, as it has been shown in experimental models in vivo (Parathath et al., 2006) and in vitro (Blasig et al., 2002).

Oxidative stress is a hallmark of neurodegenerative disorders as Alzheimer's or Parkinson's disease (Moosmann and Behl, 2002), HIV-1 encephalitis (Boven et al., 1999), multiple sclerosis (van Horssen et al., 2006) and severe hypertension (Poulet et al., 2006).

To study the relationship between oxidative stress and the BBB, several animal models can be used. Among them are senescence-accelerated mouse (SAM) strains, which were developed as a model of accelerated senescence (Takeda et al., 1991). They include nine strains of accelerated-prone short-lived mice (SAMP) and three strains of accelerated senescence-resistant long-lived mice (SAMR) (Takeda et al., 1981, 1991). SAMP8 is characterized by an early onset of deficits in learning and memory for aversive and appetitive training (Miyamoto et al., 1986; Flood and Morley, 1992, 1993). Additionally, pharmacological studies have found that SAMP8 mice have a cholinergic deficit in the hippocampus (Flood et al., 1996). Moreover, these mice overproduce amyloid precursor protein (APP) (Morley et al., 2000) and immunocytochemical studies

\* Corresponding author. Tel.: +34 93 4024505; fax: +34 93 4035901.

E-mail addresses: [carmepelegri@ub.edu](mailto:carmepelegri@ub.edu) (C. Pelegrí), [canudas@ub.edu](mailto:canudas@ub.edu) (A.M. Canudas), [jdelvama7@far.ub.edu](mailto:jdelvama7@far.ub.edu) (J. del Valle), [gxc40@case.edu](mailto:gxc40@case.edu) (G. Casadesus), [mark.smith@case.edu](mailto:mark.smith@case.edu) (M.A. Smith), [camins@ub.edu](mailto:camins@ub.edu) (A. Camins), [pallas@ub.edu](mailto:pallas@ub.edu) (M. Pallàs), [vilaplana@ub.edu](mailto:vilaplana@ub.edu) (J. Vilaplana).



have shown an age-related increase in A $\beta$ -like deposits in the hippocampus (Takemura et al., 1993; Fukunari et al., 1994). Finally, it has been observed that the accelerated ageing of SAMP8 animals is connected to a decreased efficiency of the systems utilizing reactive oxygen species in tissues (Boldyrev et al., 2001; Sureda et al., 2006).

In these mice, some changes in BBB permeability have also been reported. An age-dependent increase in serum albumin cerebral transference has been observed and this increase is higher than that observed in SAMR1 mice (Ueno et al., 1993). In addition, an age-dependent increase in peroxidase extravasation in the hippocampus has also been detected and this increase has not been observed in SAMR1 mice (Ueno et al., 2001). Nevertheless, Banks et al. (2000) have not found albumin permeability disturbances in the BBB of SAMP8 mice and have questioned if BBB is disrupted in this animal model. Therefore, in order to shed some more light onto BBB alterations in SAMP8 mice and to clarify these contradictory reports, we have studied BBB permeability by analyzing endogenous IgG extravasation in the hippocampus. In healthy animals, plasmatic IgG cannot cross BBB so there is almost no presence of IgG in the cerebral parenchima. IgG is only found in some structures of the encephalus, like circumventricular organs or choroid plexus, which have fenestrated capillaries that allow the exchange of plasmatic hydrophilic substances of high molecular weight. On the other hand, if there are important disturbances of BBB, IgG extravasation occurs also in other areas of the encephalus.

In this regard, in the present study we have determined IgG extravasation in 3, 7 and 12-month-old SAMP8 mice and we have compared it to that of SAMR1 mice, which are genetically related but resistant to accelerated senescence. The study is focused on the hippocampus of SAMP8, where some reports indicate the presence of BBB disturbances, and in choroid plexus, where extravasation of IgG is expected to occur in both mouse strains SAMP8 and SAMR1.

## 2. Methods

### 2.1. Animals and tissue harvesting

Male SAMP8 and SAMR1 mice, 3, 7 and 12-month-old were used. They were anaesthetized with 65 mg/kg of sodium pentobarbital. Intra-cardiac perfusion was performed by injecting 50 mL of physiological saline into the left ventricle and making an incision on the right auricle to drain all incoming venous blood. Brains were removed, snap frozen by immersion in isopentane chilled in dry ice and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further use. Thereafter, frozen brains were embedded in OCT cryostat-embedding compound (Tissue-Tek, Torrance, CA) and cut into 20  $\mu\text{m}$ -thick sections on a cryostat (Leyca Microsystems, Germany) at  $-22^{\circ}\text{C}$ . Slides containing brain sections were fixed with acetone for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$ , allowed to dry at room temperature and then frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until staining. The hippocampus was located with the help of a mouse brain atlas between bregma  $-1.06$  and  $-4.04$  (Paxinos and Franklin, 2001), and sections of bregma  $-2.30$  approximately were selected. Choroid plexus was also present on these sections.

### 2.2. Antibodies and nuclear staining reagents

Rat monoclonal anti-mouse PECAM-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) was used to localize blood vessels. PECAM-1 is uniformly localized

on the luminal membrane of all vascular endothelial cells (Scholz and Schaper, 1997). AlexaFluor 488 donkey anti-rat IgG (Invitrogen Molecular Probes, Carlsbad, CA) was used as the secondary antibody to detect anti-PECAM-1 staining. AlexaFluor 546 goat anti-mouse IgG (Invitrogen Molecular Probes, Carlsbad, CA) was used to stain endogenous IgG and to measure IgG extravasation from brain blood microvessels. Nuclear stain Hoechst (H-33258, Fluka, Madrid, Spain) was used to facilitate the localization of the different brain regions on the confocal microscope.

### 2.3. Immunofluorescent staining

For immunofluorescence, fixed slides were allowed to defreeze at room temperature and then rehydrated with phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) for 5 min. Sections were then blocked and permeabilized with PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma–Aldrich, Madrid, Spain) and 0.1% Triton-X-100 (Sigma–Aldrich) for 20 min. After two washes in PBS of 5 min each, brain sections were incubated with rat monoclonal anti-mouse PECAM-1 diluted 1:50 in PBS containing 1% BSA (PBS-BSA) for 90 min at room temperature. Slides were washed again and then incubated for 1 h at room temperature in the dark with the secondary antibody AlexaFluor 488 donkey anti-rat IgG and AlexaFluor 546 goat anti-mouse IgG, diluted respectively 1:500 and 1:250 in PBS-BSA. After washing again, nuclear staining was performed by incubating slides in Hoechst reagent at 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in PBS for 10 min at room temperature in the dark. Finally, slides were washed, mounted using Mowiol (Calbiochem, Germany) and stored at  $4^{\circ}\text{C}$  in the dark. Staining controls were performed by incubating with the secondary antibody anti-rat IgG, the anti-mouse IgG antibody and also with both anti-rat and anti-mouse IgG antibodies.

### 2.4. Confocal microscopy

Slides were examined under a laser confocal microscope (TCS/SP2, Leica Microsystems, Germany). Hippocampus and choroid plexus were localized by observing nuclear distribution stained by Hoechst. For each brain section and selected area, different images were digitized with different laser filters for further analyses. Staining for PECAM-1 + AlexaFluor 488 was excited with a laser of 488 nm (blue zone) and visualized as green fluorescence. AlexaFluor 546 anti-mouse IgG was excited at 543 nm (green zone) and visualized as red fluorescence. Finally, nuclear staining (Hoechst) was excited at 351 and 364 nm (ultraviolet) and was visualized as blue fluorescence.

### 2.5. Fluorescence analyses

All sections were analyzed in a blinded manner by two observers. After these observations, which reported some extravasation in the hippocampus of 12-month-old animals but not in any of the other studied ages (see results), an image analysis methodology was designed to objectively determine the magnitude of the extravasation on the hippocampus of 12-month-old SAMP8 and SAMR1 animals. This method is based on determining the limits of the brain microvessels and the diffusion limits of the IgG extravasated around the vessel. As more permeability on the BBB (more extravasation) generates a higher gradient of IgG on the neuropil, and diffusion depends on the gradient, high levels of IgG will extend longer on neuropil from the vessel. Image treatment and fluorescence analyses of the images corresponding to the hippocampus have been performed by means of the Image J program (National Institutes of Health, USA). In order to determine the limits of the brain microvessels the strategy consisted on the following steps: First, on the image showing PECAM-1 immunostaining, arbitrary lines were traced transversally crossing each blood vessel (Fig. 1A). Second, the profile of the staining along each line was plotted (Fig. 1B). Third, a horizontal background-line was drawn over each profile on the background level in order to define the limits of stain positiveness. Fourth, the diameter of each vessel (VD) was determined converting pixels of the positively stained region to  $\mu\text{m}$ . In order to determine the limits of IgG extravasation, the last three steps were applied on the equivalent images corresponding to IgG staining, using the same lines transversally crossing each blood vessel (Fig. 1C and D). The extension of the extravasation (EE) was obtained by converting pixels of the positively stained IgG region to  $\mu\text{m}$ .

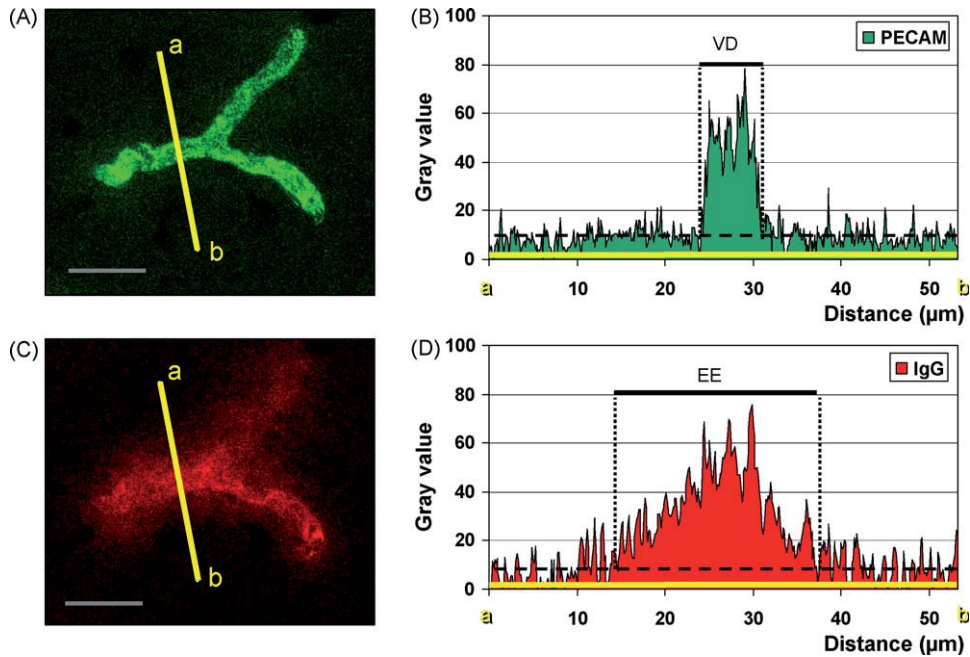


Fig. 1. Image analysis strategy designed to quantify the diameter of brain microvessels and the extension of IgG extravasation. (A) Brain microvessel stained with an anti-PECAM-1 antibody and with an arbitrary line traced. (B) Profile of the PECAM-1 staining along the arbitrary line. A horizontal background-line (to mark positiveness) is traced, and the vessel diameter (VD) is obtained. (C) The same region stained with anti-IgG antibody and with the same arbitrary line traced. (D) Profile of the IgG staining along the arbitrary line. The extension of IgG extravasation (EE) has been determined after drawing the background horizontal line. Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ .

### 2.6. Statistical analyses

Statistical analyses have been performed by means of the ANOVA using STATISTICA for Windows (StatSoft Inc.). Three dependent variables were obtained after the fluorescence analyses: diameter of the vessel (VD), extension of IgG extravasation (EE) and relative extension of IgG extravasation (REE). VD and EE were directly obtained as indicated in the fluorescence analyses section, and REE was calculated as  $EE - VD$  (i.e. the extension of IgG extravasation minus the diameter of the vessel) to discard possible significant differences on EE due to differences on VD. For each dependent variable, an ANOVA by the fixed factor strain (i.e. SAMP8 or SAMR1) was performed. As 12 brain vessels were analyzed for each of the eight animals, a random factor animal (one code for each animal) was also included on each ANOVA to consider the presence of replica. Significant differences between groups were accepted when  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Confocal microscopic observation of choroid plexus

Choroid plexus was easily localized by using Hoechst staining. When the same regions were visualized for PECAM-1, high density green staining appeared in the choroid plexus for both mouse strains studied because the plexus is a highly vascularized zone. As it was expected due to the presence of fenestrated capillaries in the choroid plexus, microscopic inspection of the sections for mouse IgG confirmed the extravasation of IgG in this zone independent of age and strain analyzed. As IgG does not cross the epithelial tissue of the plexus, it does not appear in the surrounding ventricular space. In Fig. 2 it can be observed the Hoechst, PECAM-1 and IgG staining on choroid plexus in a representative section from 12-month-old SAMP8 and SAMR1 mice.

### 3.2. Confocal microscopic observation of hippocampus

The Hippocampus was localized by the nuclear distribution pattern showed by Hoechst staining (Fig. 3A, D, G and H). The PECAM-1 staining shows hippocampal vessels in all animals (Fig. 3B, E, H and K). When looking for IgG staining around the hippocampal vessels on SAMP8 animals, neither 3 nor 7-month-old mice showed positive staining while clear IgG staining can be detected around vessels of 12-month-old animals (Fig. 3C, F and I). In SAMR1 animals, IgG staining was not observed around vessels of hippocampus of 3 and 7-month-old mice and a weak staining can be observed in some 12-month-old animals (Fig. 3L). In all analyzed sections from mice aged 12 months, IgG staining is present in the vessels of the hippocampal fissure.

### 3.3. Quantitative analysis of IgG extravasation

Quantification and statistical analysis has been performed on sections from animals of 12 months of age, in which some degree of extravasation has been observed. Quantification and statistical analysis (ANOVA) of the EE revealed significant differences on this variable due both to the fixed factor strain and to the random factor animal (respectively,  $F_{1,6} = 9.83$ ,  $F_{6,88} = 8.74$ ;  $p < 0.05$  in both cases). The mean values (and standard errors) from SAMP8 and SAMR1 animals are 10.14  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0.35$ ) and 4.89  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0.60$ ), respectively (Fig. 4A). Thus, we can conclude that EE, or extension of extravasation, is higher in SAMP8 than in SAMR1 animals.

The analysis of REE variable yielded similar results to those obtained for analyzing EE. REE was significantly influenced by

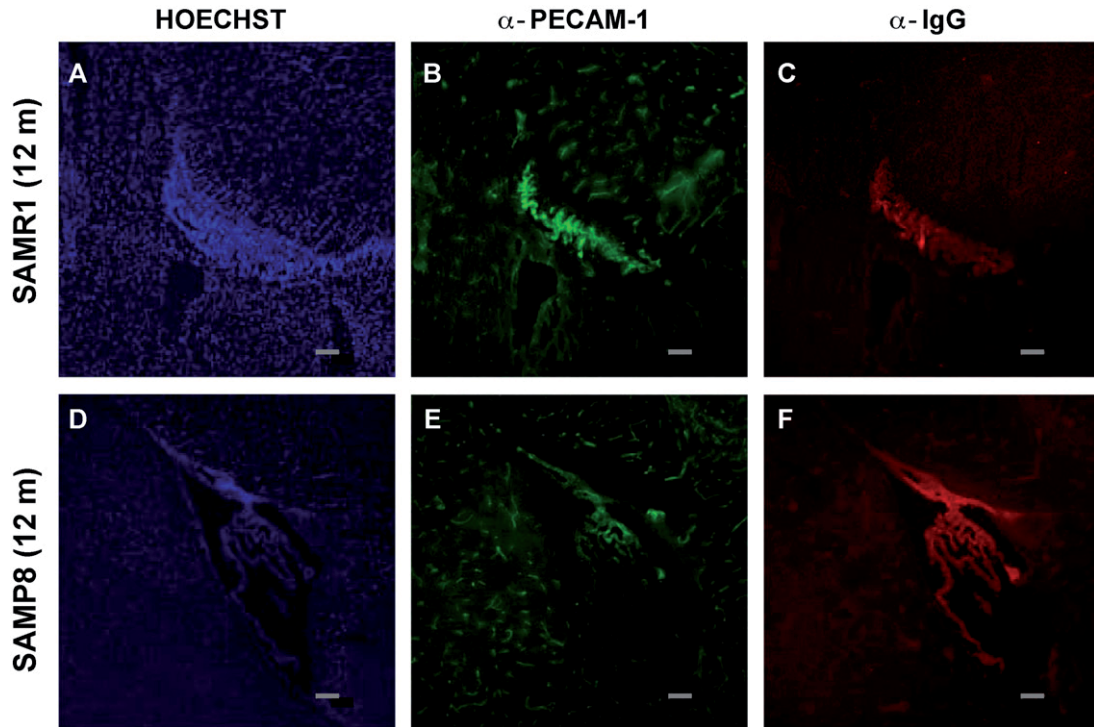


Fig. 2. Choroid plexus from SAMR1 (A–C) and SAMP8 (D–F) 12-month-old mice stained with Hoechst (A, D), anti-PECAM-1 (B, E) and anti-IgG (C, F) antibodies. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ .

both the strain factor and the animal factor (respectively,  $F_{1,6} = 21.08$ ,  $F_{6,88} = 2.51$ ;  $p < 0.05$  in both cases). REE in SAMP8 animals was  $3.13 \mu\text{m}$  ( $\pm 0.28$ ), while in SAMR1 was  $0.91 \mu\text{m}$  ( $\pm 0.16$ ) (Fig. 4B). This indicates that relative extension of the IgG immunoreactivity around the blood vessels was higher in SAMP8 than in SAMR1 mice. It is worth mentioning that the mean diameter (and S.E.M.) of the analyzed vessels from the SAMP8 animals was  $7.01 \mu\text{m}$  ( $\pm 0.18$ ) and for SAMR1 animals was  $7.16 \mu\text{m}$  ( $\pm 0.22$ ) (Fig. 3C). The ANOVA with dependent variable diameter of the vessel (VD) indicate no statistical differences on this variable due to the factors strain or animal (respectively,  $F_{1,6} = 0.23$ ,  $F_{6,88} = 1.34$ ;  $p > 0.05$  in both cases).

#### 4. Discussion

Endogenous IgG extravasation has been analyzed here in order to evaluate BBB integrity in the hippocampus of SAMP8 and SAMR1 mice. Neither SAMP8 nor SAMR1 mice aged 3 and 7 months showed positive staining for IgG. On the other hand, a clear IgG positive staining was observed on the hippocampus of 12-month-old SAMP8 mice, while only a weak extravasation appeared in age-matched SAMR1 animals. Furthermore, the vessels in the hippocampal fissure exhibited positive staining to IgG in both 12-month-old SAMP8 and SAMR1 mice but not in 3- or 7-month-old groups. When IgG extravasation was quantified by an image analysis strategy, 12-month-old SAMP8 mice showed significantly higher levels of IgG extravasation in the hippocampus than SAMR1 animals.

Ueno et al. (2006) reported positive HRP staining around hippocampal vessels in 24-month-old HIF-1 $\alpha$  deficient mice,

although they did not find such positive staining in 10-week-old mutant mice or 10-week and 24-month old control mice. However, there would be some differences between our control strain SAMR1 and the nestin-Cre:Hif-1 $\alpha^{\text{lox/+}}$  mice used as control mice for Ueno et al. In any case, in our study, a high density IgG staining occurred in both studied strains at the choroid plexus, as expected due to the fenestrated capillaries characteristic of this zone.

Several studies have used the visualization of IgG extravasation as a variable to identify BBB disturbances in murine models of a variety of diseases (Fullerton et al., 2001; Natah et al., 2005; Sugimura et al., 2005; Tomás-Camardiel et al., 2005). Moreover, in the present study, an imaging methodology was specially designed to quantify IgG extravasation. This novel strategy allows for the quantification of extravasation extension to objectively analyze the existence of significant differences between both mice strains.

The presence of IgG in the parenchyma of the hippocampus from SAMP8 mice can be explained by three different mechanisms: (1) disturbances in the intercellular junctions of the vascular endothelium that constitute the BBB, which would allow the paracellular flux of IgG, (2) disturbances on transcellular flux across the endothelial cells due to modifications on parajunctional passage or to disturbances on the IgG carriers situated on the plasmatic membranes, and (3) local synthesis of IgG in the brain tissue, which would involve some kind of immune or autoimmune response. To this end, the third explanation seems to be the least plausible because IgG in the hippocampus of SAMP8 mice appears as an aureole around the blood vessel and it loses intensity when the distance from the blood vessel increases. The aureole around the vessels can

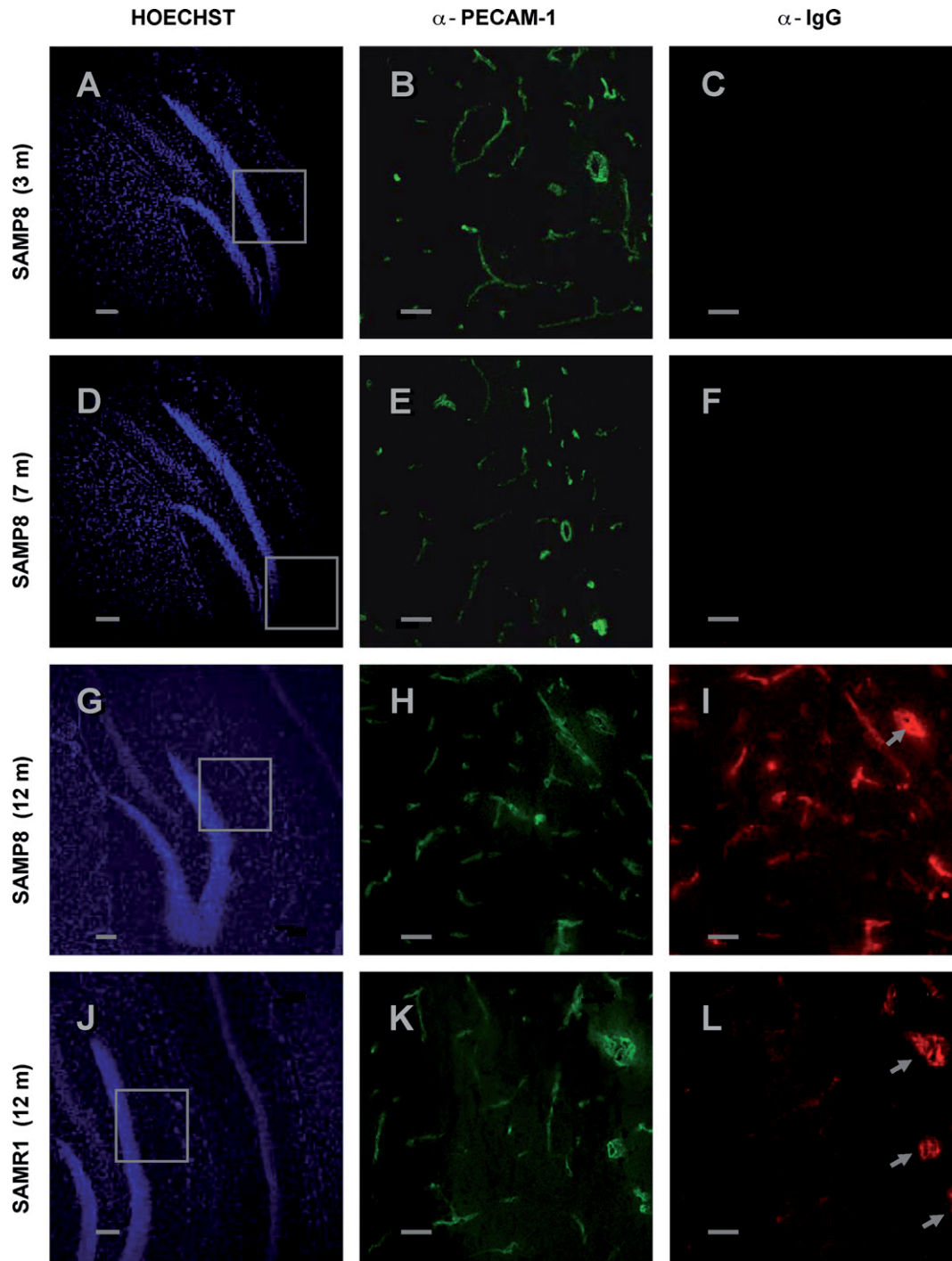


Fig. 3. Hippocampus from 3-month- (A–C), 7-month- (D–F) and 12-month-old (G–I) SAMP8 mice and 12-month-old SAMR1 mice (J–L) stained with Hoechst (A, D, G, J), anti-PECAM-1 (B, E, H, K) and anti-IgG (C, F, I, L) antibodies. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$  (A, D, G and J); 30  $\mu\text{m}$  (B, C, E, F, H, I, K and L). Images B and C belong to the region squared on A (and the same for each animal). Arrows on I and L indicate the vessels on the hippocampal fissure.

be easily explained by an extravasation of IgG and its slow expansion towards the cerebral parenchyma. On the other hand, the simultaneous observation of IgG, endothelial cells stained by PECAM-1 and cellular nuclei stained by Hoechst, do not allow for the observation of the presence of cellular aggregates or non-endothelial extravascular cells responsible of the generation of this IgG. For all these reasons, in this animal model, the presence of IgG around the blood vessels in the hippocampus is related to its extravasation from functionally altered BBB.

In another BBB permeability study in SAMP8 mice, Ueno et al. (1993) reported that the transference of radioactive serum albumin in the hippocampus of 13-month-old SAMP8 mice is increased in relation to that of 3-month-old SAMP8 and 13-month-old SAMR1 mice. However, other studies performed by administering radioactive albumin intravenously and measuring the radioactive albumin in cerebrospinal fluid/serum ratio (Banks et al., 2000), reported no disturbances of BBB permeability.

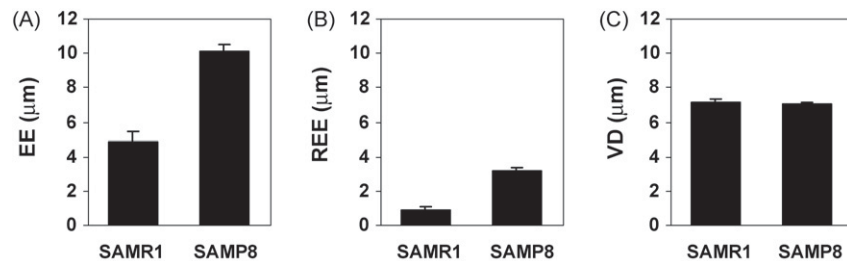


Fig. 4. (A) Extension of IgG extravasation (EE) and (B) relative extension of IgG extravasation (REE) around hippocampus microvessels of SAMR1 and SAMP8 mice. (C) Diameter of the vessels (VD) on the hippocampus of SAMR1 and SAMP8 mice. Values are means  $\pm$  S.E.M. In (A) and (B), differences between groups are significant ( $p < 0.05$ ).

An age-dependent increase of peroxidase extravasation described for SAMP8 but not SAMR1 mice could be explained by the uncontrolled passage of HRP through the parajunctional cytoplasm of the endothelial cells, which could also contribute to the accumulation of serum albumin in SAMP8 brains (Ueno et al., 2001). IgG extravasation described in our study could also be caused by this uncontrolled passage.

Our results support those obtained by Ueno et al. (1993) since SAMP8 mice, as they age, would present increasing permeability not only for albumin and HRP, but also for IgG. As permeability increases are observed for albumin, HRP and IgG extravasation, we suggest that these changes might be explained by paracellular permeability disturbances or by changes in the vacuolar system that generates the parajunctional passage. Although the functionality of the endothelial cells carriers for IgG in the BBB of SAMP8 mice is not known, modifications just on the carriers activity would not explain changes in albumin and HRP permeability; while changes in paracellular or parajunctional flux can explain changes in permeability for serum albumin, HRP and IgG.

The fact that BBB is disrupted in the hippocampus of 12-month-old SAMP8 mice suggest that these changes may underline the deficits in learning and memory seen in aged SAMP8 animals. Nevertheless, it is possible that both are a consequence of a common etiopathogenic factor, for example, an increase in oxidative stress described in these animals (Boldyrev et al., 2001; Sureda et al., 2006) or a possible increase of their  $\beta$ -amyloid burden, derived from APP over expression observed in SAMP8 animals (Takemura et al., 1993). In this regard, the increase of  $\beta$ -amyloid burden can generate BBB disturbances while, at the same time, these disturbances can produce the increase of  $\beta$ -amyloid. When BBB disturbances from SAMP8 animals are identified and characterized in detail, we will be able to study if they are related with the presence of an elevated  $\beta$ -amyloid burden in the brain of this mouse strain. Whilst, we demonstrate the alterations in BBB in this strain and describe a novel, reproducible and reliable method to quantify BBB disruption.

### Acknowledgments

This work was supported by grants SAF2005-01604, BFU/2006-11981 and SAF-2006-13092 from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain); PI041300 and Centros de

Investigación Biomédica en Red (CIBER) from the Instituto de Salud Carlos III; and 2005/SGR00893 from the Generalitat de Catalunya. Authors are grateful to Dr. C. Auladell, F. Junyent and J. Utrera for their valuable assessment and to A. Folch for revising the English language.

### References

- Al-Kassab, S., Olsen, T.S., Skriver, E.B., 1981. Blood–brain barrier integrity in patients with cerebral infarction investigated by computed tomography and serum-CSF-albumin. *Acta Neurol. Scand.* 64, 438–445.
- Banks, W.A., Farr, S.A., Morley, J.E., 2000. Permeability of the blood–brain barrier to albumin and insulin in the young and aged SAMP8 mouse. *J. Gerontol.* 55A, B601–B606.
- Blasig, I.E., Mertsch, K., Haseloff, R.F., 2002. Nitronyl nitroxides, a novel group of protective agents against oxidative stress in endothelial cells forming the blood–brain barrier. *Neuropharmacology* 43, 1006–1014.
- Boldyrev, A.A., Yuneva, M.O., Sorokina, E.V., Kramarenko, G.G., Fedorova, T.N., Kononova, G.G., Lanzin, V.Z., 2001. Antioxidant systems in tissues of senescence accelerated mice. *Biochemistry (Moscow)* 66, 1157–1163.
- Boven, L.A., Gomes, L., Hery, C., Gray, F., Verhoef, J., Portegies, P., Tardieu, M., Nottet, H.S., 1999. Increased peroxynitrite activity in AIDS dementia complex: implications for the neuropathogenesis of HIV-1 infection. *J. Immunol.* 162, 4319–4327.
- De Vries, H.E., Kuiper, J., De Boer, A.G., Van Berkel, T.J.C., Breimer, D.D., 1997. The blood–brain barrier in neuroinflammatory diseases. *Pharmacol. Rev.* 49, 143–155.
- Flood, J.F., Morley, J.E., 1992. Early onset of age-related impairment of aversive and appetite learning in the SAM-P/8 mouse. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 47, B52–B59.
- Flood, J.F., Morley, J.E., 1993. Age-related changes in footshock avoidance acquisition and retention in senescence accelerated mouse (SAM). *Neurobiol. Aging* 14, 153–157.
- Flood, J.F., Harris, F.J., Morley, J.E., 1996. Age-related changes in hippocampal drug facilitation of memory processing in SAMP8 mice. *Neurobiol. Aging* 17, 15–24.
- Fukunari, A., Kato, A., Sakai, Y., Yoshimoti, T., Ishiura, S., Suzuki, K., Nakajima, T., 1994. Colocalization of prolyl endopeptidase and amyloid  $\beta$ -peptide in brains of senescence-accelerated mouse. *Neurosci. Lett.* 176, 201–204.
- Fullerton, S.M., Shirman, G.A., Strittmatter, W.J., Matthew, W.D., 2001. Impairment of the blood–nerve and blood–brain barriers in apolipoprotein E knockout mice. *Exp. Neurol.* 169, 13–22.
- Mihaly, A., Bozoky, B., 1984. Immunohistochemical localization of extravasated serum albumin in the hippocampus of human subjects with partial and generalized epilepsies and epileptiform convulsions. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 65, 25–34.
- Miyamoto, M., Kiyota, Y., Yamazaki, N., Nagaoka, A., Matsuo, T., Nagawa, Y., Takeda, T., 1986. Age-related changes in learning and memory in the senescence-accelerated mouse (SAM). *Physiol. Behav.* 38, 399–406.

- Moosmann, B., Behl, C., 2002. Antioxidants as treatment for neurodegenerative disorders. *Expert Opin. Invest. Drugs* 11, 1407–1435.
- Morley, J.E., Kumar, V.B., Bernardo, A.E., Farr, S.A., Uezu, K., Tumosa, N., Flood, J.F., 2000.  $\beta$ -Amyloid precursor polypeptide in SAMP8 mice affects learning and memory. *Peptides* 21, 1761–1767.
- Natah, S.S., Mouihate, A., Pittman, Q.J., Sharkey, K.A., 2005. Disruption of the blood–brain barrier during TNBS colitis. *Neurogastroenterol. Motil.* 17, 433–446.
- Parathath, S.R., Parathath, S., Tsirka, S.E., 2006. Nitric oxide mediates neurodegeneration and breakdown of the blood–brain barrier in tPA-dependent excitotoxic injury in mice. *J. Cell. Sci.* 119, 339–349.
- Paxinos, G., Franklin, K.B.J., 2001. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd ed. Academic Press, London.
- Poulet, R., Gentile, M.T., Vecchione, C., Distaso, M., Aretini, A., Fratta, L., Russo, G., Echart, C., Maffei, A., De Simoni, M.G., Lembo, G., 2006. Acute hypertension induces oxidative stress in brain tissues. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 26, 253–262.
- Scholz, D., Schaper, J., 1997. Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) is localized over the entire plasma membrane of endothelial cells. *Cell Tissue Res.* 290, 623–631.
- Sugimura, Y., Murase, T., Takefuji, S., Hayasaka, S., Takagishi, Y., Oiso, Y., Murata, Y., 2005. Protective effect of dexamethasone on osmotic-induced demyelination in rats. *Exp. Neurol.* 192, 178–183.
- Sureda, F.X., Gutierrez-Cuesta, J., Romeo, M., Mulero, M., Canudas, A.M., Camins, A., Mallol, J., Pallas, M., 2006. Changes in oxidative stress parameters and neurodegeneration markers in the brain of the senescence-accelerated mice SAMP-8. *Exp. Gerontol.* 41, 360–367.
- Takeda, T., Hosokawa, M., Takeshita, S., Irino, M., Higuchi, K., Matsushita, T., Tomita, Y., Yasuhira, K., Hamamoto, H., Shimizu, K., Ishii, M., Yamamuro, T., 1981. A new murine model of accelerated senescence. *Mech. Ageing Dev.* 17, 183–194.
- Takeda, T., Hosokawa, M., Higuchi, K., 1991. Senescence-accelerated mouse (SAM): a novel murine model of accelerated senescence. *J. Am. Geriatr. Soc.* 39, 911–919.
- Takemura, M., Nakamura, S., Akiguchi, I., Ueno, M., Oka, N., Ishikawa, S., Shimiada, A., Kimura, J., Takeda, T., 1993. Beta/A4 proteinlike immunoreactive granular structures in the brain of senescence-accelerated mouse. *Am. J. Pathol.* 142, 1887–1897.
- Tanno, H., Nockels, R.P., Pitts, L.H., Noble, L.G., 1992. Breakdown of the blood–brain barrier after fluid percussive brain injury in the rat: Part 1. Distribution and time course of protein extravasation. *J. Neurotrauma* 9, 21–32.
- Tomás-Camardiel, M., Venero, J.L., Herrera, A.J., De Pablos, R.M., Pintor-Toro, J.A., Machado, A., Cano, J., 2005. Blood–brain barrier disruption highly induces aquaporin-4 mRNA and protein in perivascular and parenchymal astrocytes: protective effect by estradiol treatment in ovariectomized animals. *J. Neurosci. Res.* 80, 235–246.
- Ueno, M., Akiguchi, I., Yagi, H., Naiki, H., Fujibayashi, Y., Kimura, J., Takeda, T., 1993. Age-related changes in barrier function in mouse brain I. Accelerated age-related increase of brain transfer of serum albumin in accelerated senescence prone SAM-P/8 mice with deficits in learning and memory. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 16, 233–248.
- Ueno, M., Sakamoto, H., Kanenishi, K., Onodera, M., Akiguchi, I., Hosokawa, M., 2001. Ultrastructural and permeability features of microvessels in the hippocampus, cerebellum and pons of senescence-accelerated mice (SAM). *Neurobiol. Aging* 22, 469–478.
- Ueno, M., Tomita, S., Nakagawa, T., Ueki, M., Iwanaga, Y., Ono, J.I., Onodera, M., Huang, C.L., Kanenishi, K., Shimada, A., Maekawa, N., Sakamoto, H., 2006. Effects of aging and HIF-1 $\alpha$  deficiency on permeability of hippocampal vessels. *Microsc. Res. Tech.* 69, 29–35.
- van Horssen, J., Schreibelt, G., Bo, L., Montagne, L., Drukarch, B., van Muiswinkel, F.L., de Vries, H.E., 2006. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 expression in multiple sclerosis lesions. *Free Radic. Biol. Med.* 41, 311–317.



## Article 2

**A NEW METHOD FOR DETERMINING BLOOD–BRAIN BARRIER INTEGRITY  
BASED ON INTRACARDIAC PERFUSION OF AN EVANS BLUE–HOECHST  
COCKTAIL**

**Authors:** Jaume del Valle, Antoni Camins, Mercè Pallàs, Jordi Vilaplana, Carme Pelegrí.

Journal of Neuroscience Methods 2008; 174: 42–49.





## **RESUM**

### **Objectiu**

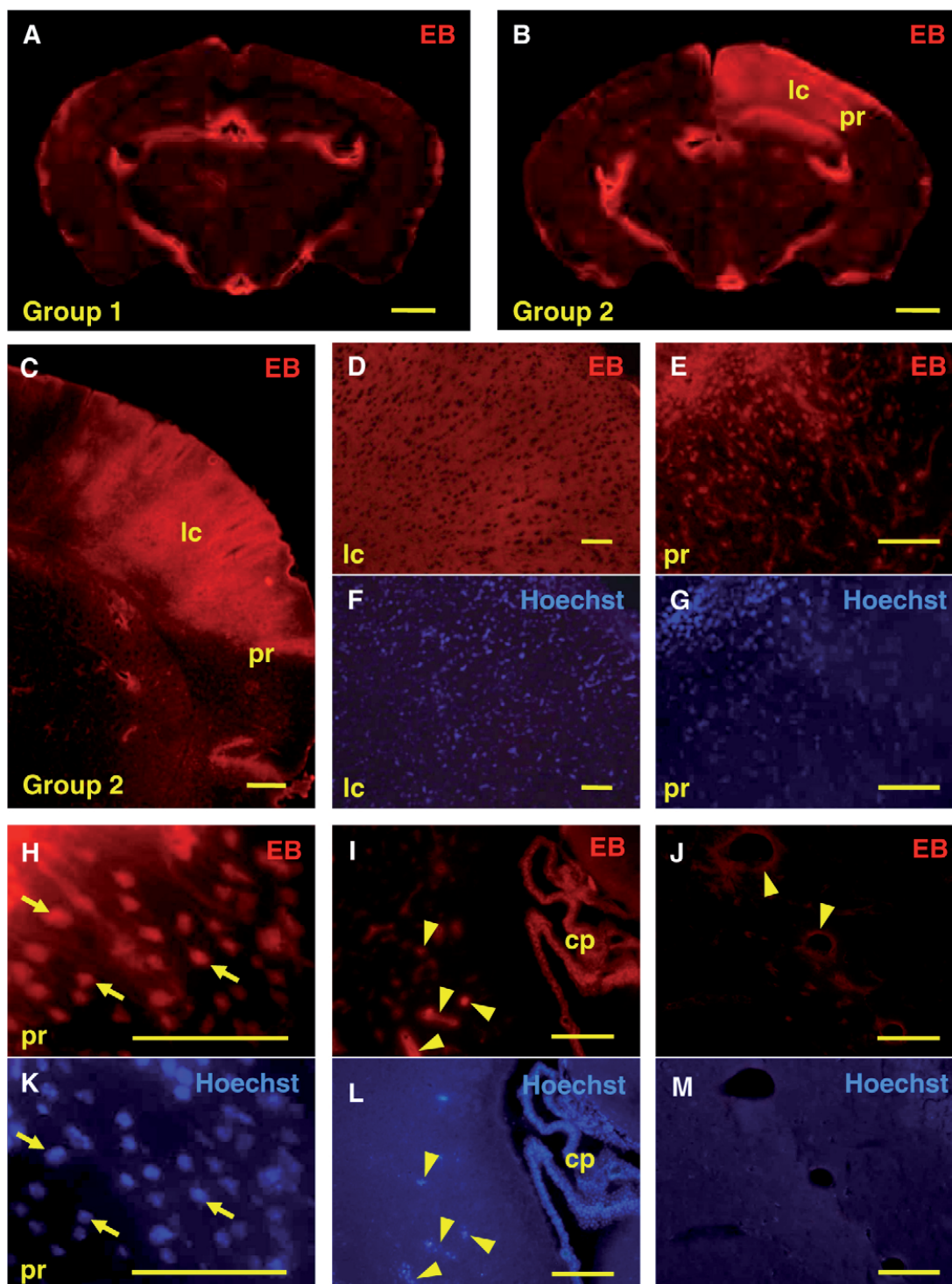
Descriure un nou mètode per a determinar la integritat de la barrera hematoencefàlica que permeti localitzar les estructures cerebrals afectades i que permeti alhora aplicar tècniques immunohistoquímiques.

### **Material i mètodes**

Es va induir una criolesió localitzada al cervell de ratolins ICR-CD1, utilitzant un cilindre de neu carbònica amb una punta de 5 mm de diàmetre. Després de perfondre els animals amb PBS per netejar els vasos de, es va aplicar el mètode còctel, que consistia en perfondre els animals amb una solució estàndard de paraformaldehid, però amb blau d'Evans (*Evans blue*, EB) i Hoechst com a traçadors. També es va disposar de grups d'animals no criolesionats i perfosos amb la mateixa solució de cocktail, o afegint albúmina sèrica bovina al cocktail. A d'altres grups se'ls va administrar EB per via intravenosa o intraperitoneal abans de realitzar la perfusió amb PBS primer i una solució convencional de paraformaldehid després.

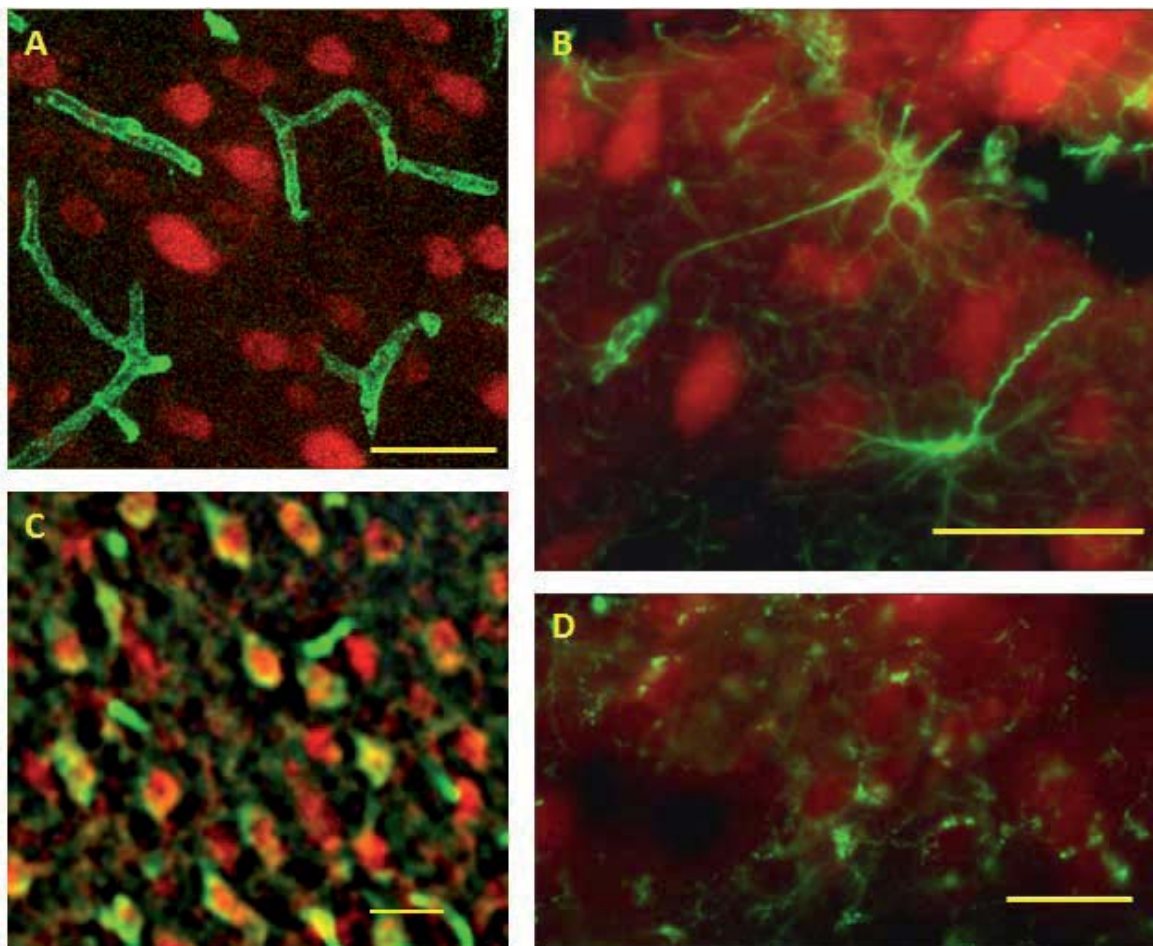
### **Resultats**

En comparació a animals sense alteració de la BHE, el mètode còctel permet la localització de la regió lesionada, tant per la fluorescència de l'EB com pels nuclis tenyits amb Hoechst a la mateixa regió (Fig. 14 A, B i F). Els dos traçadors també permeten localitzar el plexe coroide i els òrgans circumventriculars, on no hi ha una BHE funcional i els capil·lars són fenestrats, a més de la fisura de l'hipocamp (Fig. 14 I, J, L i M). El marcatge amb EB mostra un nucli de la lesió on tot el parènquima cerebral mostra fluorescència vermella (Fig. 14 C i D) i una zona de penombra on només apareixen algunes cèl·lules marcades amb EB (Fig. 14 C, E i H), en les zones de penombra el hoechst tenyeix tots els nuclis cel·lulars (Fig. 14 G i K). La tinció d'EB obtinguda amb el cocktail a les zones amb extravasació és més intensa a l'obtinguda amb aquest traçador pels mètodes convencionals. A més a més, la tinció amb Hoechst només és vàlida per determinar la integritat de la barrera hematoencefàlica amb el mètode cocktail, donat que quan aquest traçador s'administra per via intravenosa tenyeix tots els nuclis de l'encèfal.



**Fig. 14** Imatges representatives de seccions cerebrals d'animals perfosos amb el mètode còctel. Es poden apreciar imatges representatives de seccions cerebrals d'animals amb operació testimoni i amb lesió. Mentre els animals no lesionats mostren fluorescència per EB només a les zones dels OCV (A), els animals lesionats mostren la zona de la lesió tenyida per EB (B). Al nucli de la lesió (*lesion core*, lc) l'EB tenyeix tot el parènquima amb fluorescència vermella (B-D) i el hoechst tenyeix el nucli de totes les cèl·lules (F). A l'anell de penombra (*perilesional rim*, pr) la fluorescència de l'EB disminueix progressivament (E) i apareixen algunes cèl·lules EB<sup>+</sup> (fletxes en H). En aquesta zona, el hoechst tenyeix totes les cèl·lules (G, fletxes a K). A les zones més distants, l'EB i el hoechst poden ser observats al plexe coroid (choroid plexus, cp) i en alguns vasos sanguinis (puntes de fletxa a I, L). En altres regions, incloent l'hipocamp contralateral, l'EB tenyeix alguns vasos (puntes de fletxa a J) però no hi ha fluorescència al voltant dels vasos ni al parènquima (J). El hoechst no tenyeix ningun nucli en aquesta zona on la BHE està intacta (M). Escales: 1000µm (A-B), 750 µm (C), 150µm (D-M).

D'altra banda, és possible aplicar tècniques de marcatge immunohistoquímic sobre les mateixes seccions tenyides amb el cocktail. Gràcies a les tècniques d'immunohistoquímica, es pot apreciar com les cèl·lules EB<sup>+</sup> són exclusivament neurones (Fig. 15).



**Fig. 15** Imatges representatives de la zona de penombra on es caracteritza la naturalesa de les cèl·lules EB<sup>+</sup>. Es poden observar diferents imatges on s'han dut a terme marcatges immunohistoquímics amb PECAM pels vasos (A), GFAP pels astròcits (B), NeuN per les neurones (C) i CD11b per la microglia (D), en les 4 imatges es poden veure cèl·lules EB<sup>+</sup>. A la figura C es pot apreciar colocalització de neurones

## Conclusions

El mètode cocktail permet determinar la integritat de la barrera hematoencefàlica amb dos traçadors i aplicar al mateix temps tècniques d'immunohistoquímica que permetin localitzar estructures i comparar les poblacions cel·lulars presents en zones amb barrera hematoencefàlica alterada o intacta.





## A new method for determining blood–brain barrier integrity based on intracardiac perfusion of an Evans Blue–Hoechst cocktail

Jaume del Valle<sup>a,c</sup>, Antoni Camins<sup>b,c</sup>, Mercè Pallàs<sup>b,c</sup>, Jordi Vilaplana<sup>a,c,1</sup>, Carme Pelegrí<sup>a,c,\*,1</sup>

<sup>a</sup> *Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n., 08028 Barcelona, Spain*

<sup>b</sup> *Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n., 08028 Barcelona, Spain*

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

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 January 2008

Received in revised form 25 June 2008

Accepted 25 June 2008

#### Keywords:

Blood–brain barrier

Cryo-injury

Tracers

Evans Blue

Hoechst

Fluorescence

Immunohistochemistry

### ABSTRACT

A new method for determining brain regions with blood–brain barrier (BBB) alterations is described. In this method, mice were perfused intracardially with Evans Blue (EB) and Hoechst tracers added in a standard formaldehyde fixative solution. This cocktail method was tested after a localized cryolesion induced in the brain had produced an edematous brain region with disrupted BBB in the animals. The results were then compared with the intravenous and intraperitoneal administration of the tracers prior to intracardiac perfusion. When using the cocktail method, red EB fluorescence locates the cryoinjured brain region while the Hoechst tracer stains the nuclei in that same region. EB and Hoechst fluorescence can also be observed in the choroid plexus and circumventricular organs, where there is no functional BBB. The cocktail gives more intense EB staining in zones of disrupted BBB than that given by traditional methods which use this tracer. The Hoechst tracer is also more useful when administered in the cocktail, since when administrated intravenously it stains all the brain nuclei. The cocktail method permits the immunostaining of brain sections, enabling researchers to characterize and analyze structural and cellular changes in regions where BBB disturbances are present. Thus, immunohistochemistry has been used here to determine the nature of intense EB fluorescent cells that appear in the perilesional rim, which were identified here as neuronal cells.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Impairment of the blood–brain barrier (BBB) has been widely reported in many neurological diseases (Hawkins and Davis, 2005), and various techniques have been used experimentally to assess BBB status, including the administration of tracers that can only cross the BBB when it is disrupted (Zhang et al., 1999; Keller et al., 2002). Tracers are usually administered intravenously or intraperitoneally and, after allowing enough time for circulation, the brain parenchyma is examined by optical densitometry, optical microscopy or fluorescence microscopy. Densitometry provides accurate quantification but fails to locate BBB disruption accurately or to identify the structures affected. Thus, major regional disturbances cannot be distinguished from only slight but extensive alterations. Moreover, unless these alterations are significant, physiological extravasation within the circumventricular organs (CVO) may mask that of a disrupted BBB. Alternatively, optical microscopy has been used to study BBB integrity when administer-

ing horseradish peroxidase (HRP), Evans Blue (EB) or trypan blue tracers. Although these methods give satisfactory results, difficulties arise when double labeling is attempted. Furthermore, these methods require *in vivo* treatments of the animals prior to sacrifice (Reynolds and Morton, 1998).

Here we describe a new method for determining BBB integrity in which mice were perfused intracardially with EB and Hoechst (H-33258) tracers added in a standard formaldehyde fixative solution. This cocktail method is both rapid and reliable, and it does not require previous *in vivo* handling of the animal which could alter the results, i.e., there is no need to wait for the recirculation of tracers and so any potential physiological disturbances of the BBB attributable to the methodology are avoided. Moreover, EB-protein and Hoechst-DNA complexes are fluorescent, emitting at characteristic wavelengths, and this method allows subsequent immunofluorescence staining at other wavelengths, enabling structural and cellular changes in regions where BBB disturbances are present to be characterized and analyzed. In short, this method is of great use in studying the processes involved in BBB disruption and can be employed in a wide variety of BBB-disruption models including medial cerebral artery occlusion (Zea Longa et al., 1989) and hypertonic infusion (Rapoport, 2000).

\* Corresponding author. Tel.: +34 93 4024505; fax: +34 93 4035901.

E-mail address: [carmepelegri@ub.edu](mailto:carmepelegri@ub.edu) (C. Pelegrí).

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

EB and Hoechst tracers were chosen here as they have different diffusion coefficients and hydrophilic properties, they stain different structures and they permit visualization of different features. When used together as a cocktail, the EB tracer fluoresces in all areas of extravasation as well as in some neuron cell bodies situated around the extravasation zone. The Hoechst dye, when administered intravenously, stains the nuclei of the whole brain, but when administered as proposed, only the nuclei of the brain cells located in the zones of extravasation fluoresce.

In testing the efficiency of a new method for analyzing BBB integrity it is useful to have access to different BBB states in different regions of the same brain. Here, a cryolesion was used to produce a cortical brain region with pathological alterations of the BBB and the choroid plexus was also used as a region of positive physiological extravasation. In addition, EB and Hoechst tracers were administered intravenously to some mice, while EB was administered intraperitoneally to others. These are the methods previously reported in the literature and this allows to compare our results with those obtained using these more conventional techniques.

**2. Material and methods**

**2.1. Animals**

Six- to eight-week-old female ICR (CD-1) mice (25–30 g body weight) were purchased from Harlan Interfauna Iberica SA (Barcelona, Spain). They were housed under standard conditions of temperature (22 ± 2 °C) and 12:12 h light/dark cycles (300 lx/0 lx). Up to the day of the experiment they were given food and water *ad libitum*, and allowed a minimum of 10 days adaptation following arrival. Studies were performed in accordance with the institutional guidelines for the care and use of laboratory animals established by the Ethical Committee for Animal Experimentation at the University of Barcelona.

**2.2. Experiment design, induction of cryoinjury and administration of tracers**

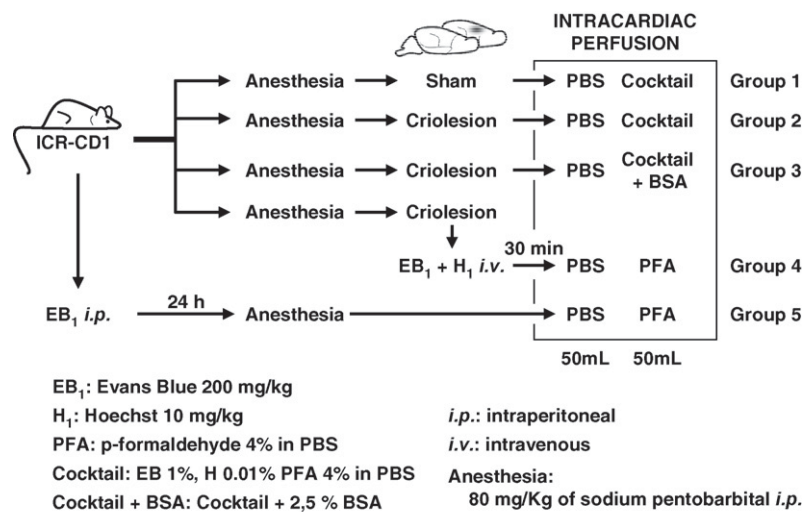
The mice were divided into five groups of six animals each. The procedures applied to each group are summarized in Fig. 1.

In group 1 (sham-operated group), the animals were anesthetized (80 mg/kg of sodium pentobarbital intraperitoneally) and the skin of the skull was dissected, although no brain cryoinjury was induced. After 30 s, the thoracic cavity was opened and a polished 21-gauge needle connected to the gravity-dependent perfusion system was inserted through the left ventricle into the ascending aorta. Then, an incision was made in the right auricle to drain incoming venous blood and the perfusion solution was allowed to enter into the left ventricle. Bottles of the perfusion system were placed 90 cm above the animal (mean flux rate = 7 mL/min). The perfusion was performed with 50 mL of phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) followed by 50 mL of the cocktail. The cocktail was prepared as follows: EB 1% (Sigma–Aldrich, Madrid, Spain), Hoechst 0.01% (H-33258, Fluka, Madrid, Spain) and p-formaldehyde 4% (PFA; Scharlau, Barcelona, Spain) in PBS. Thus, each mouse received both 500 mg of EB as well as 5 mg of Hoechst during the perfusion. Brains were then dissected, post-fixed in 4% PFA in PBS for 4 h and cryoprotected by immersion in PBS with 30% sucrose for 24 h. Afterwards, brains were frozen by immersion in isopentane chilled in dry ice and stored at –80 °C until further use.

In groups 2–4, the mice were anesthetized with 80 mg/kg of sodium pentobarbital intraperitoneally and, after exposing the skull over the right frontoparietal cortex, BBB disruption was induced using the method described by Penkowa and Moos (1995). Thus, a cone-shaped pellet of dry ice with a 5-mm diameter tip was placed in direct contact with the exposed skull and kept in place for 30 s. The resulting lesion on the brain was localized in the right frontoparietal cortex and surrounding tissue structures. Cryoinjury was performed in order to generate a brain region with positive extravasation of the tracer.

In group 2, immediately after the cryoinjury had been induced, the thoracic cavity was opened and an intracardiac perfusion was performed with 50 mL of phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) followed by 50 mL of the cocktail. Brains were then dissected, post-fixed and treated in the same way as those in group 1.

Group 3 was treated in exactly the same way as group 2, except bovine serum albumin (BSA, Sigma–Aldrich) at 2.5% was added to the cocktail. As EB fluoresces only after binding to a protein, especially albumin, it is common to add albumin to the EB solution. Group 3 animals were used to test whether it was necessary to add BSA to the cocktail. Brains were then treated in the same way as those in group 1.



**Fig. 1.** Experimental design. Details of the procedures followed for each group included in the study.

In group 4, a bolus of 5  $\mu$ L/g body weight of a solution of 0.4% EB and 0.02% Hoechst in PBS was intravenously administered in the tail vein after the cryolesion had been induced. The resulting dose was 200 mg/kg of EB and 10 mg/kg of Hoechst. Thus, each mouse received 5–6 mg of EB and 0.25–0.30 mg of Hoechst (depending on body weight). The dyes were allowed to circulate for 30 min. The animals were then perfused with 50 mL of PBS followed by 50 mL of 4% PFA in PBS. Brains were treated in the same way as those in group 1.

In group 5, the animals were administered an intraperitoneal dose of EB at 200 mg/kg without previous anesthesia (a bolus of 5  $\mu$ L/g body weight of a solution of 0.4% EB in PBS). Each mouse received 5–6 mg of EB (depending on body weight). The dye was allowed to circulate for 24 h and animals were given food and water *ad libitum* throughout this period. Afterwards, the mice were anesthetized (80 mg/kg of sodium pentobarbital intraperitoneally) and perfused with 50 mL of PBS followed by 50 mL of 4% PFA in PBS. Brains were then dissected, post-fixed and cryoprotected adopting the same procedure as with the organs in group 1.

### 2.3. Brain processing

Frozen brains were embedded in OCT cryostat-embedding compound (Tissue-Tek, Torrance, CA), cut into 20- $\mu$ m thick sections on a cryostat (Leica Microsystems, Germany) at  $-22^{\circ}\text{C}$ , and mounted on Superfrost<sup>+</sup> slides (Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany). The slides were subsequently frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  awaiting immunohistochemical testing. Some slides containing brain sections were directly visualized using a confocal microscope, whereas others were visualized after having first been coverslipped with Entellan (Merck, Darmstadt, Germany) or with Prolong Gold antifade reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA).

### 2.4. Immunohistochemistry

A standard immunohistochemistry protocol was followed to analyze brain sections from the animals perfused with the cocktail (groups 1–3). Thus, fixed slides were allowed to thaw at room temperature before being rehydrated with PBS for 5 min. Sections were then blocked and permeabilized with PBS containing 1% BSA and 0.1% Triton X-100 (Sigma–Aldrich) for 20 min. After two 5-min washes in PBS, brain sections were incubated with the primary antibody (see below) for 90 min at room temperature. Slides were washed again and then incubated for 1 h at room temperature in the dark with the secondary antibody (see below). Finally, slides were washed, mounted with Entellan and stored at  $4^{\circ}\text{C}$  in the dark. Staining controls were performed by incubating with PBS instead of the primary antibody or both antibodies.

Rat monoclonal anti-mouse PECAM-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), diluted 1:50 in PBS containing 1% BSA (PBS–BSA) was used as the primary antibody to localize blood vessels. PECAM-1 is uniformly localized on the luminal membrane of all vascular endothelial cells (Scholz and Schaper, 1997). AlexaFluor 488 donkey anti-rat IgG (Invitrogen, dilution 1:500 in PBS–BSA) was used as the secondary antibody to detect anti-PECAM-1 staining. In order to visualize neurons, mouse monoclonal anti-NeuN (Millipore, Molsheim, France; dilution 1:500 in PBS–BSA) was used. AlexaFluor 488 donkey anti-mouse IgG (Invitrogen; dilution 1:250 in PBS–BSA) was used as the secondary antibody to detect anti-NeuN staining. Astrocytes were visualized with polyclonal rabbit anti-GFAP (DakoCytomation, Glostrup, Denmark; dilution 1:50 in PBS–BSA) and AlexaFluor 488 donkey anti-rabbit IgG (Invitrogen; dilution 1:250 in PBS–BSA) was used to detect the anti-GFAP stain-

ing. Finally, to detect microglia, rat anti-mouse CD11b monoclonal antibody (Millipore; dilution 1:50 in PBS–BSA) was used. AlexaFluor 488 donkey anti-rat IgG (Invitrogen; 1:250 in PBS–BSA) was used as the secondary antibody to detect anti-CD11b staining.

### 2.5. Confocal microscopy

Slides were examined under a confocal laser microscope (TCS/SP2, Leica Microsystems, Germany). For each brain section and each selected area, different images were digitized with different laser filters for further analysis. EB staining was visualized by excitation with 543-nm laser beams (green zone) and visualized as red fluorescence. Nuclear staining (Hoechst) was excited with 351- and 364-nm laser beams (ultraviolet) and was visualized as blue fluorescence. Finally, staining for PECAM-1, NeuN, GFAP and CD11b+AlexaFluor 488 was excited with a 488-nm laser beam (blue zone) and visualized as green fluorescence.

## 3. Results

### 3.1. The cocktail method allows EB and Hoechst extravasation in the edematous brain region to be visualized

The observation by confocal microscopy of EB fluorescence in brains from group 1 (sham-operated) and group 2 animals (cryoinjured cocktail group) mounted with Entellan allows cryoinjured and non-cryoinjured brains to be compared (Fig. 2A and B). Fig. 2B shows the location of the cryoinjured region. In all group 2 animals, the lesion affected the right parietal cortex and its surrounding tissue structures (Fig. 2B and C). In the lesion's core, EB stained all the parenchyma bright red (Fig. 2D). In the perilesional rim, the EB fluorescence diminished as the distance from the core increased. Moreover, in this region, some cells with intense EB fluorescence, which will be referred to EB<sup>+</sup> cells, did appear (Fig. 2E and H). In the most distant areas of the brain, where there was no injury, EB fluorescence in the parenchyma could only be observed in the choroid plexus (Fig. 2I), where there is no functional BBB. In other areas, EB could only be seen filling some blood vessels and there was no fluorescence around the vessels and the parenchyma, indicating a functional BBB (Fig. 2J).

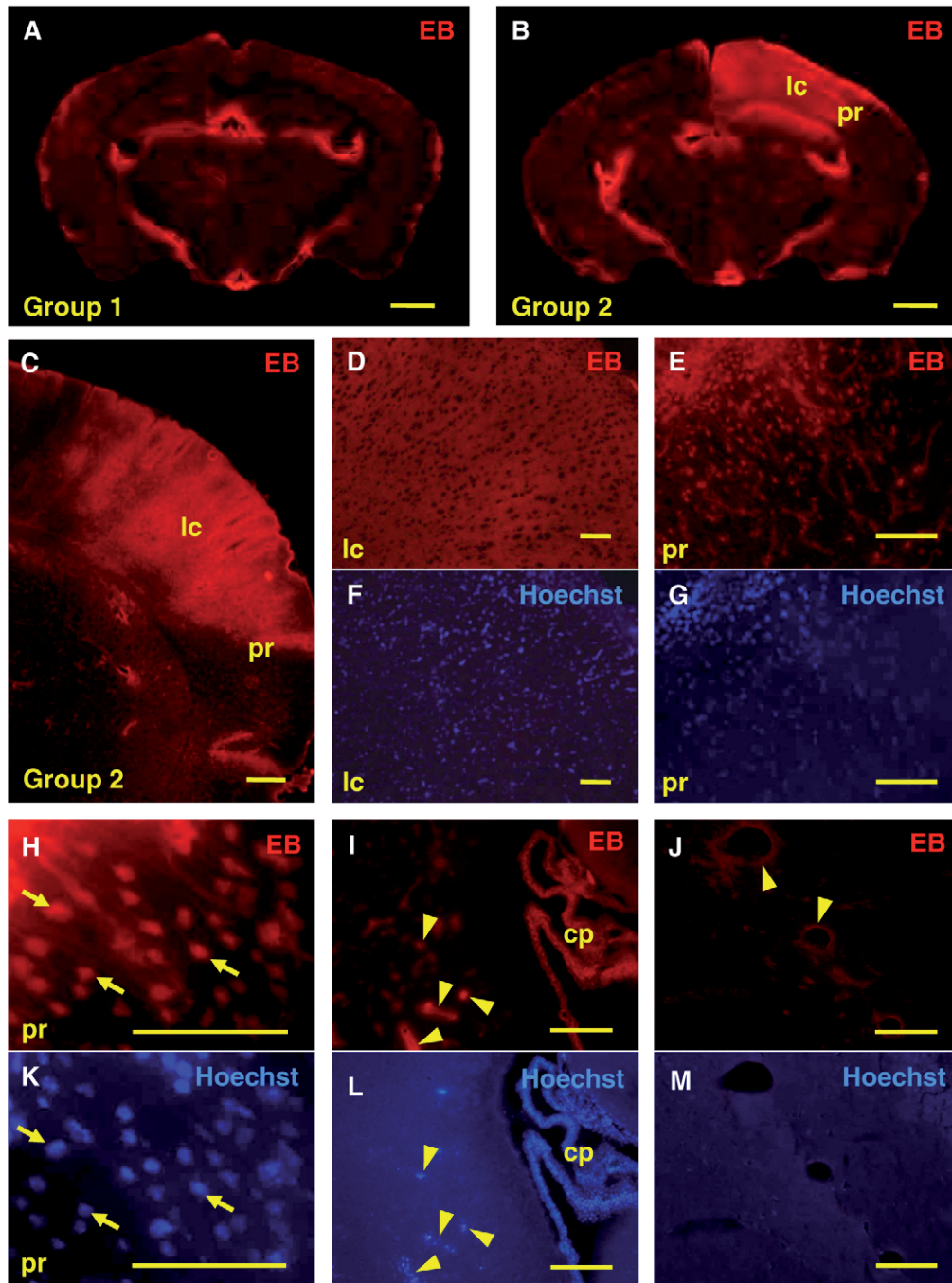
In the case of Hoechst, blue fluorescence was observed in the nuclei of cells located in the same zones as those which EB fluorescence was observed: in the lesion's core (Fig. 2F), in the EB<sup>+</sup> cells of the perilesional rim (Fig. 2G and K), and also in the cells of the choroid plexus (Fig. 2L). However, in the perilesional rim, Hoechst fluorescence was observed not only in the EB<sup>+</sup> cells, but also in some other cells, indicating that not all the cells of the region acquired EB fluorescence (Fig. 2G and K). On regions where BBB is not impaired, Hoechst can only be seen staining the nuclei of some blood vessels (Fig. 2L).

### 3.2. Mounting media can affect further visualization of EB and Hoechst

If the slides were not mounted, i.e., if they were observed directly without any mounting media, no differences were observed at lower magnification compared with slides mounted with Entellan, as can be seen in a representative choroid plexus of group 2 visualized for EB staining (Fig. 3A and B).

By contrast, when mounted with Prolong Gold, some differences did occur. EB, as well perhaps as the proteins to which it is bound gradually spreads through, and even outside, the tissue



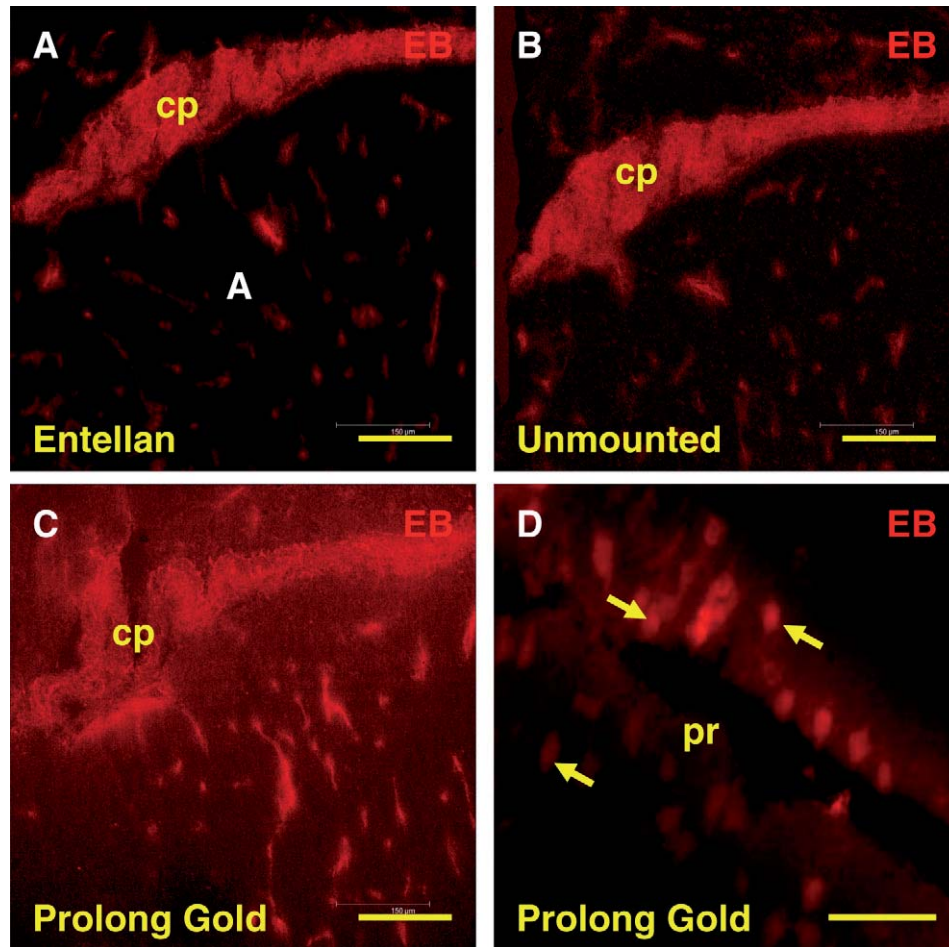


**Fig. 2.** Representative images from brain sections of group 1 (sham-operated) and group 2 (cryoinjured) mounted with Entellan and visualized for EB (red) or Hoechst (blue) fluorescence. While sham-operated animals only show extravasation in the periventricular areas (A), the cryoinjured region appears completely stained in the brains of group 2 animals (B). In the lesion's core (lc), EB stains all the parenchyma with a bright red fluorescence (B, C and D) and Hoechst stains all the nuclei of the cells (F). In the perilesional rim (pr), the EB fluorescence diminished as the distance from the core increased (E) and some EB<sup>+</sup> cells start to appear (arrows in H). In this zone, Hoechst stains the nuclei of all cells (G, arrows in K). In the most distant areas of the brain, EB and Hoechst fluorescence can be observed in the choroid plexus (cp) (I and L) and in some blood vessels (arrowheads in I, L). In other regions, including the contralateral hippocampus, EB stains blood vessels (arrowheads in J) but there is no fluorescence around the vessels and the parenchyma (J). Hoechst does not stain any nuclei in this zone of intact BBB (M). Scale bars: 1000  $\mu\text{m}$  (A and B), 750  $\mu\text{m}$  (C), and 150  $\mu\text{m}$  (D–M). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

(Fig. 3C). This is probably due to the hydrophilic properties of this mounting medium. Although Prolong Gold gives a dispersed red EB fluorescence, some EB<sup>+</sup> cells could still be located in the perilesional rim (Fig. 3D). Hoechst dye visualized with Prolong Gold followed the same pattern as that observed with Entellan, but the brain nuclei were more sharply defined (data not shown).

### 3.3. The cocktail does not require BSA to visualize EB extravasation

A comparison of the EB fluorescence of the brains mounted with Entellan from group 2 (cocktail) with those from group 3 (cocktail + BSA) revealed no differences. Brains from group 2 and group 3 showed a similar intensity of EB staining in the zones



**Fig. 3.** Comparison of the effects of different mounting media on EB visualization. Representative images of the choroid plexus (cp) from the brains of group 2 animals (cocktail method) mounted with Entellan (A), unmounted (B) or mounted with Prolong Gold (C). With this last medium, EB gradually spreads through the tissue and gives a disperse red fluorescence. Nevertheless, some EB<sup>+</sup> cells can still be localized in the perilesional rim (pr) (arrows in D). Scale bars: 150  $\mu\text{m}$  (A–C) and 75  $\mu\text{m}$  (D).

of extravasation, as observed in the cryoinjured region and the choroid plexus (Fig. 4).

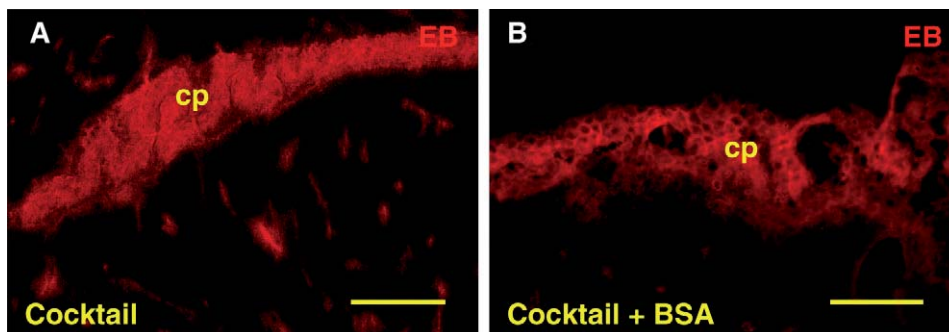
#### 3.4. The cocktail method versus intravenous EB and Hoechst administration or intraperitoneal EB administration

Fig. 5 shows images of the cryoinjured region, the choroid plexus and the hippocampus of group 2 (cocktail) and group 4 (intravenous EB + Hoechst) animals. When analyzing the EB fluorescence in brains from group 4 animals, we observed fluorescence in the

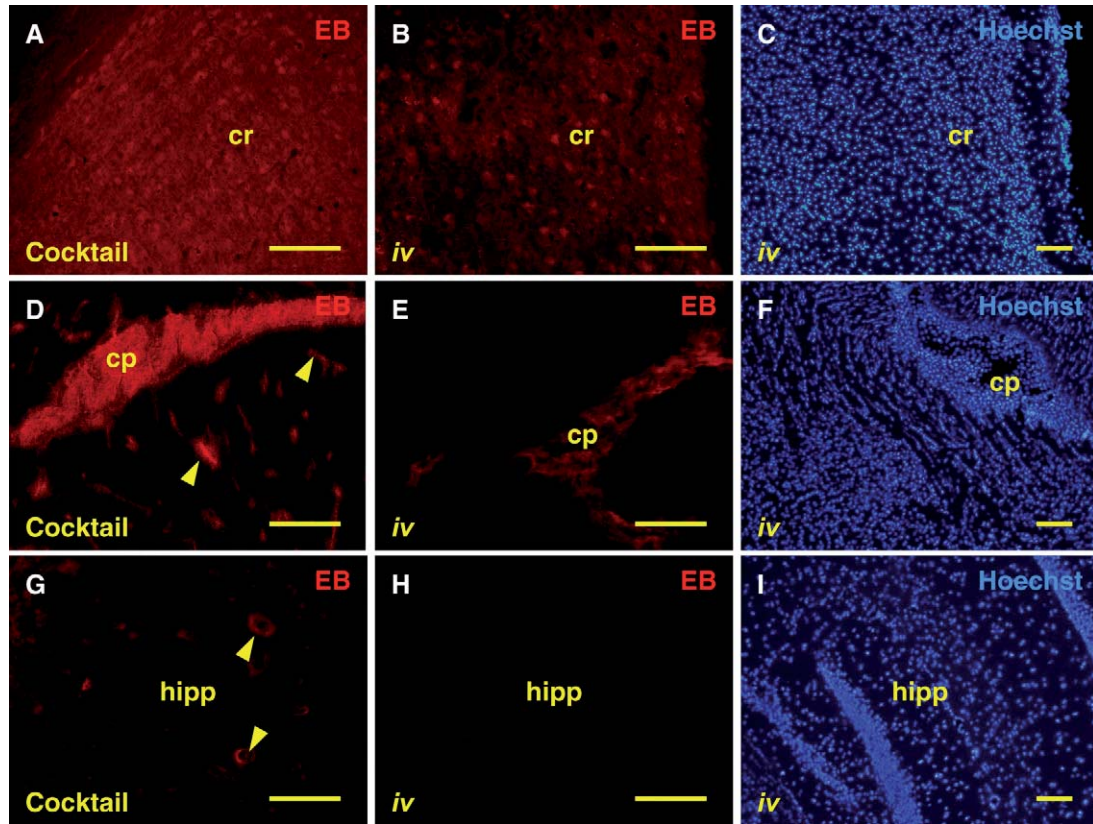
edematous region corresponding to the lesion (Fig. 5B) and the choroid plexus (Fig. 5E). However, the intensity of EB fluorescence in group 4 was clearly not as great as that observed in group 2 (Fig. 5A and B, D and E).

In group 4, vessels in those regions with a functional BBB, such as the hippocampus, could not be seen, while they were visualized in group 2 (Fig. 5G and H).

When Hoechst is intravenously administered (group 4), the tracer labels all the nuclei in all regions of the brain and not only in the zones where the BBB is disrupted. Fig. 5C, F and I show,



**Fig. 4.** Effect of adding BSA to cocktail. Representative images of the choroid plexus from group 2 (cocktail, A) and group 3 animals (cocktail + BSA, B). The groups show a similar intensity of EB staining. Scale bars: 150  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 5.** Comparison of the results obtained using the cocktail method with those from intravenous (*i.v.*) administration of EB and Hoechst. Representative images from the cryoinjured region (*cr*) (A, B and C), the choroid plexus (*cp*) (D, E and F) and the contralateral hippocampus (*hipp*) (G, H and I) of group 2 (cocktail; A, D and G) and group 4 animals (intravenous EB + Hoechst; B, C, E, F, H, and I). Intravenously administered EB stains the edematous region corresponding to the lesion (B) and the choroid plexus (E), but the fluorescence is clearly not as intense as that observed in group 2 (A and D). Regions of intact BBB are not stained by intravenous EB (H) whereas vessels can be observed when using the cocktail method (arrowheads in G). Intravenously administered Hoechst labels all the nuclei in all regions of the brain, not just those where the BBB is disrupted (C, F and I). Scale bars: 150  $\mu\text{m}$ .

respectively, the cryoinjured lesion, the choroid plexus and the hippocampus of a brain from a group 4 animal visualized with Hoechst staining.

In group 5, animals administered intraperitoneally with EB, the regions which showed EB fluorescence were the same as those for group 4 animals. However, in this case the intensity of EB fluorescence was even lower (data not shown).

### 3.5. Immunohistochemistry can be performed on brain sections obtained using the cocktail method

The immunohistochemical assessment using anti-PECAM-1 conducted on brain sections from group 2 clearly showed the blood vessels of these tissues (Fig. 6A). The immunostaining process did not affect the extravasation zones substantially, as observed by both Hoechst and EB fluorescence. Thus, the same slide showed the blood vessels located in the regions where the BBB had been disrupted as well as those located in zones where the BBB remained intact.

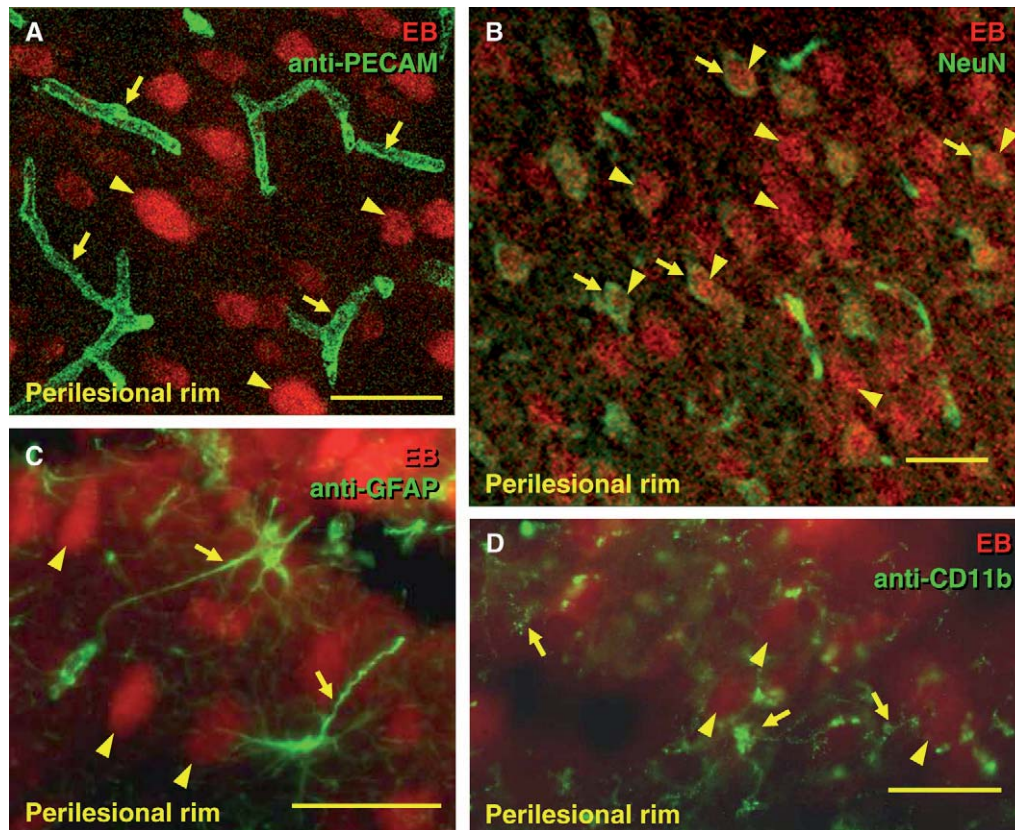
Immunostaining with anti-NeuN, anti-GFAP and anti-CD11b antibodies performed on brain slides from group 2 presented the characteristic pattern of staining described elsewhere for brain regions not affected by a lesion. Moreover, in the perilesional rim, we observed a clear co-localization of EB<sup>+</sup> cells and NeuN staining (Fig. 6B), while EB<sup>+</sup> cells were not stained with anti-GFAP (Fig. 6C) or with anti-CD11b (Fig. 6D). Thus, cells fluorescing with EB in the perilesional rim were exclusively neurons.

## 4. Discussion

This study presents a new method for determining and locating BBB alterations. This cocktail method involving the intracardiac perfusion of EB and Hoechst tracers in a saline solution with PFA can be used in several animal models of neurological diseases. Here, a localized cryoinjury was induced in mice to produce intact and disrupted BBB in the same brain.

Traditionally, EB and other tracers, such as trypan blue or HRP, have been administered intravenously or intraperitoneally (Broman, 1944; Dobbing, 1961; Broman et al., 1966; Reese and Karnovsky, 1967) to study BBB status. However, these methods require *in vivo* treatment of the animals which can affect the results. Moreover, as some tracers can be retained by lipid deposits, which may be modified in some pathological states, tracer extravasation quantification might be biased, especially when tracers are intraperitoneally administered. The addition of the tracers within the fixative solution administered by the intracardiac perfusion avoids having to wait for the recirculation of tracers and minimizes the variability caused by the method itself.

Some authors claim that responses of the BBB to pathological insults might be heterogeneous, varying along different segments of the brain vasculature and among different brain regions (Nitsch and Klatzo, 1983; Ge et al., 2005). Such claims support the methods that use brain sections to study BBB, such as ours, in contrast with those that process the tissue by mechanical disaggregation. Additionally, microscopic examination of perfused



**Fig. 6.** Immunohistochemistry in brain sections from mice treated with the cocktail method. Representative images from the perilesional rim of brains from group 2 stained with anti-PECAM-1 (A), anti-NeuN (B), anti-GFAP (C) and anti-CD11b (D) antibodies. EB fluorescence and EB<sup>+</sup> cells are visualized (arrowheads in A–D). The anti-PECAM-1 antibody clearly shows the blood vessels of these tissues (arrows in A). Immunostaining with anti-NeuN stains neurons (arrows in B) and allows EB<sup>+</sup> cells (arrowheads) in the perilesional rim to be identified as this cell type. Anti-GFAP and anti-CD11b antibodies stain astrocytes (arrows in C) and microglia (arrows in D), respectively, and do not co-localize with EB<sup>+</sup> cells in the perilesional rim. Scale bars: 50  $\mu$ m.

brain tissue may enable visualization of discrete alterations in permeability.

The two tracers used in the present study provide different staining and permeability characteristics. EB becomes fluorescent when linked to proteins (Olsson, 1966). In our case, EB fluoresces in the regions with altered BBB when it extravasates and binds to the previously extravasated albumin. In the case of Hoechst, the tracer fluoresces when it is linked to DNA and its diffusion produces staining of all the brain nuclei if given sufficient time to recirculate, as occurs when the dose is administered intravenously. When the cocktail method is adopted, the tracer only stains the nuclei of those zones in which the BBB is impaired and paracellular extravasation is possible. Thus, these two tracers are useful in determining BBB permeability and provide satisfactory results in the brains of cryoinjured mice. Both tracers stain the lesion and the surrounding areas, although in this latter zone, Hoechst stains all the nuclei while EB only stains some of the cells. It is conceivable that Hoechst stains all the nuclei in the periphery of the cryolesion because of its greater capacity to diffuse from the injured area. The EB staining of the EB<sup>+</sup> cells in the perilesional rim is probably due to the presence of neurons whose damaged axons or axon collaterals cross through or terminate in the lesion and take up plasma proteins almost immediately after the lesion (Loberg and Torvik, 1991).

As expected, in the brains of sham-operated animals and in the non-cryoinjured zones of operated animals, EB and Hoechst fluorescence appear in the choroid plexus and CVO, where there is no functional BBB. In the other parts, EB and Hoechst only appear associated with some blood vessels. The fluorescence observed on the vessels of intact BBB regions is probably due to the presence of

albumin or other proteins retained by the basal membrane of the vessels or due to the presence of other endothelial membrane proteins. Staining of this kind is also useful as it allows blood vessels to be located throughout the brain by red fluorescence, even after immunostaining.

As both the EB-protein and the Hoechst-DNA complexes are fluorescent, it is possible to perform immunohistochemistry on brain sections treated with the cocktail so as to analyze the structural and cellular characteristics of the zones in which the BBB is disrupted and to compare them with intact regions.

As two tracers with different solubility properties were used, two mounting media were analyzed in this study, in addition to simple observation without mounting medium. Good results were obtained without mounting media, as both EB and Hoechst fluorescences could be easily visualized. However, this is only partially useful because obtaining images of a higher magnification and of a better quality and resolution requires the use of immersion oil.

When mounting with Prolong Gold, a medium similar to Mowiol, Hoechst staining provides adequate visualization, but EB tends to spread through, and even outside the tissue. In fact, several authors have used Mowiol as a mounting medium to visualize EB fluorescence (Crépin et al., 2007), but in our sections, it does not give precise well-localized staining. Indeed the time allowed to elapse between mounting and microscoping observation should be kept to a minimum, as staining spreads with time. By contrast, when mounting slides with Entellan, which contains xylene and has lipophilic properties, EB does not spread and all labeled structures can be visualized perfectly.

In the present study, EB was administered to different groups of mice with or without BSA, to test the need to include the protein in the cocktail. When observed alone under a fluorescence microscope EB does not fluoresce, but when bound to a protein, most commonly albumin, it emits a bright red fluorescence (Olsson, 1966). In fact, EB has been used as a tracer of serum albumin after intravenous administration (Wolman et al., 1981). These observations have led some researchers to administer the tracer pre-bound to albumin in order to visualize EB-albumin fluorescence (Hawkins and Egleton, 2006), although here we have shown that EB administered in the cocktail without BSA stains the injured zone and some cells in the periphery of the lesion. A brain with disrupted BBB will present leakage of certain proteins, and the accumulation of serum proteins has been demonstrated in injured brain cells (Murakami et al., 1998). Therefore, the EB in the cocktail is able to bind to the leaked proteins in some cells and in the injured cerebral parenchyma, so that administering albumin to visualize EB fluorescence is not necessary. Moreover, albumin can generate oncotic pressure, and inadequate osmotic pressure can produce shrinking or swelling of the endothelial cells that constitutes the barrier, thus altering the BBB status. If we wish to administer albumin with the tracer, the appropriate albumin concentration must first be determined to minimize any possible effects on the BBB status. The albumin concentration used with group 3 animals enabled us to identify as positive the same brain regions as those identified in group 2 animals. Thus, even though the concentration tested can be optimal, we considered that the inclusion of albumin with the tracer is not necessary. In any case, if the albumin-EB complex is capable of crossing the BBB, then the unbounded EB will also cross the barrier and bind to the albumin that has leaked from the animal. Moreover, if the BBB does not present any leakage of proteins, albumin-EB complexes would be unable to cross the barrier, and while EB might be able to do so, it could not bind to any protein.

Contrary to expectations, EB was found to signal blood vessels even in the case of a functional BBB. This might be due to the presence of some proteins retained in the basal membrane.

Moreover, as EB-protein and Hoechst-DNA complexes fluoresce at different emission wavelengths, this method allows subsequent immunofluorescence staining to be performed, thereby enabling us to characterize and analyze structural and cellular changes in regions where BBB disturbances are present. Thus, the cocktail method described here is particularly useful for studying the processes involved in BBB disruption and can be applied in a wide variety of BBB-disruption models including medial cerebral artery occlusion (Zea Longa et al., 1989) and the hypertonic infusion (Rapoport, 2000). In this study, immunostaining with anti-NeuN, anti-GFAP and anti-CD11b antibodies enabled us to identify the EB<sup>+</sup> cells that appeared in the perilesional rim as neurons.

Our data indicate that using standard intracardiac perfusion techniques with a cocktail solution of EB and Hoechst tracers provides a rapid and reliable marker of BBB permeability. The cocktail stained regions without BBB (choroid plexus and CVO) and those zones where the BBB was impaired (cryoinjured in this study). Moreover, this method is compatible with subsequent immuno-

histological staining, which allows structures and cell populations to be compared in zones with intact or disrupted BBB.

## Acknowledgements

This study was supported by grants BFU2006-11981, SAF2005-01604 and SAF2006-13092 from the *Ministerio de Educación y Ciencia* (Spain); P1041300 and *Centros de Investigación Biomédica en Red* (CIBER) from the *Instituto de Salud Carlos III*; 2005/SGR00893 from the *Generalitat de Catalunya*. J. del Valle is sponsored by a 2007 grant from *Fundació Universitària Agustí Pedro i Pons*. The authors are grateful to A. Folch for revising this English text.

## References

- Broman T. Supravital analysis of disorders in the cerebral vascular permeability in man. *Acta Med Scand* 1944;118:79–83.
- Broman T, Branemark PI, Johansson B, Steinwall O. Intravital and postmortem studies on air embolism damage of the blood-brain barrier tested with trypan blue. *Acta Neurol Scand* 1966;42:146–52.
- Crépin A, Bidaux G, Vanden-Abeele F, Dewailly E, Goffin V, Prevarskaya N, et al. Pro-lactin stimulates prostate cell proliferation by increasing endoplasmic reticulum content due to SERCA 2b over-expression. *Biochem J* 2007;401:49–55.
- Dobbing J. The blood-brain barrier. *Physiol Rev* 1961;41:135–89.
- Ge S, Song L, Patcher JS. Where is the blood-brain barrier . . . really? *J Neurosci Res* 2005;79:421–7.
- Hawkins B, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* 2005;57:173–85.
- Hawkins BT, Egleton RD. Fluorescence imaging of blood-brain barrier disruption. *J Neurosci Methods* 2006;151:262–7.
- Keller E, Ishihara H, Nadler A, Niederer P, Seifert B, Yonekawa Y, et al. Evaluation of brain toxicity following near infrared light exposure after indocyanine green dye injection. *J Neurosci Methods* 2002;117:23–31.
- Loberg EM, Torvik A. Uptake of plasma proteins into damaged neurons. An experimental study on cryogenic lesions in rats. *Acta Neuropathol* 1991;81:479–85.
- Murakami K, Kawase M, Kondo T, Chan PH. Cellular accumulation of extravasated serum protein and DNA fragmentation following vasogenic edema. *J Neurotrauma* 1998;15:825–35.
- Nitsch C, Klatzo I. Regional patterns of blood-brain barrier breakdown during epileptiform seizures induced by various convulsive agents. *J Neurol Sci* 1983;59:305–22.
- Olsson Y. Studies on vascular permeability in peripheral nerves. I. Distribution of circulating fluorescent serum albumin in normal, crushed and sectioned rat sciatic nerve. *Acta Neuropathol* 1966;7:1–15.
- Penkowa M, Moos T. Disruption of the blood-brain interface in neonatal rat neocortex induces a transient expression of metallothionein in reactive astrocytes. *Glia* 1995;13:217–27.
- Rapoport SI. Osmotic opening of the blood-brain barrier: principles, mechanism, and therapeutic applications. *Cell Mol Neurobiol* 2000;20:217–30.
- Reese TS, Karnovsky MJ. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 1967;34:207–17.
- Reynolds DS, Morton AJ. Changes in blood-brain barrier permeability following neurotoxic lesions of rat brain can be visualised with trypan blue. *J Neurosci Methods* 1998;79:115–21.
- Scholz D, Schaper J. Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) is localized over the entire plasma membrane of endothelial cells. *Cell Tissue Res* 1997;290:623–31.
- Wolman M, Chui E, Wilmes F, Nishimoto K, Fujiwara K, et al. Evaluation of the dye-protein tracers in pathophysiology of the blood-brain barrier. *Acta Neuropathol* 1981;54:55–61.
- Zea Longa EL, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989;20:84–91.
- Zhang ZG, Chopp M, Goussev A, Lu D, Morris D, Tsang W, et al. Cerebral microvascular obstruction by fibrin is associated with upregulation of PAI-1 acutely after onset of focal embolic ischemia in rats. *J Neurosci* 1999;19:10898–907.

## Article 3

### **TIME-COURSE OF BLOOD–BRAIN BARRIER DISRUPTION IN SENESCENCE-ACCELERATED MOUSE PRONE 8 (SAMP8) MICE**

**Authors:** Jaume del Valle, Joaquim Duran-Vilaregut, Gemma Manich, Antoni Camins, Mercè Pallàs, Jordi Vilaplana, Carme Pelegrí

International Journal of Developmental Neuroscience 2009; 27: 47–52.



## **RESUM**

### **Objectiu**

Estudiar la integritat de la barrera hematoencefàlica de ratolins SAMP8 a diferents edats mitjançant el mètode cocktail. Comparar els resultats amb ratolins de les soques SAMR1 i ICR-CD1.

### **Material i mètodes**

Es van utilitzar ratolins SAMP8 de 3, 6, 9, 12 i 15 mesos d'edat. Els ratolins es van perfondre amb el mètode còctel, que conté EB, Hoechst i paraformaldehid en solució tamponada de fosfats. Es van obtenir els encèfals i es van realitzar seccions criostàtiques. Es van observar les seccions per microscòpia confocal i es van analitzar tres zones: l'escorça, l'hipocamp i la fissura hipocampal. Es van utilitzar ratolins SAMR1 (emparentats genèticament amb els SAMP8 però resistent a la senescència accelerada) i ICR-CD1 com a controls sans i no emparentats genèticament amb les altres dues soques. Es va quantificar la intensitat de fluorescència en les zones estudiades com a mesura del traçador extravasat.

### **Resultats**

Els marcatges en les zones de trencament de BHE no van ser tan dràstics com als observats en altres models de trencament de BHE com la criolesió. Tant a la subzona CA1 de l'hipocamp, com a la fissura hipocampal i al còrtex adjacent, la permeabilitat de la barrera hematoencefàlica per l'EB dels ratolins control ICR es manté estable al llarg de les diferents edats estudiades. D'altra banda, els ratolins SAMP8 i els SAMR1 mostren un augment progressiu de permeabilitat dels 6 als 15 mesos d'edat en les tres regions estudiades. Durant aquest període, l'extravasació d'EB observada a l'escorça i a la regió CA1 de l'hipocamp dels ratolins SAMP8 fou superior que la dels animals SAMR1. Degut a problemes metodològics, als 3 mesos d'edat, van aparèixer valors més elevats d'extravasació a totes les soques estudiades. Tanmateix, els anàlisis estadístics es van dur a terme amb i sense el grup d'edat de 3 mesos i les diferències estadístiques es van mantenir, indicant la robustesa de l'anàlisi. A partir dels 9 mesos d'edat, tant els ratolins SAMP8 com els ratolins SAMR1 van mostrar una extravasació significativament superior que la soca ICR, a la regió CA1 i a la fissura (Fig. 16).



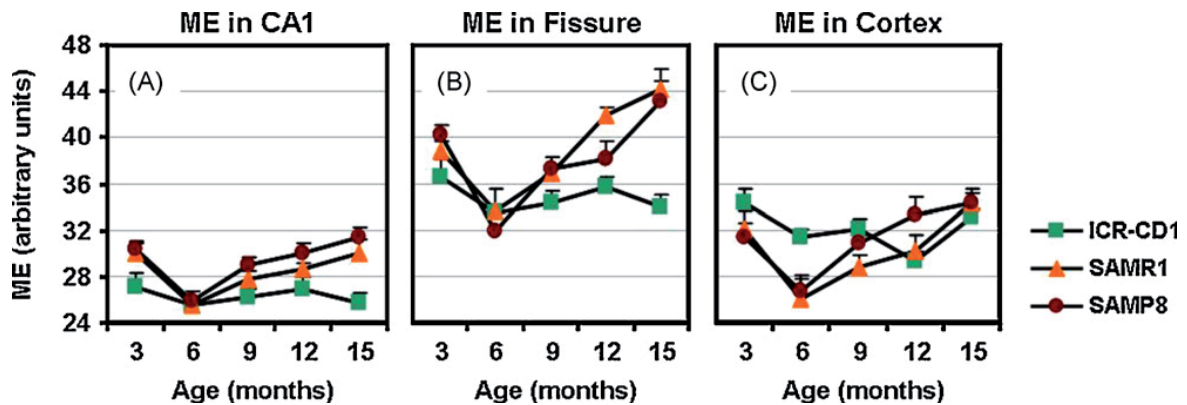


Fig. 16 Evolució temporal de l'extravasació d'EB a les tres zones estudiades en les soques SAMP8, SAMR1 i ICR-CD1. Evolució temporal de la mitjana de l'extravasació (ME) a les tres zones estudiades: Subzona CA1 de l'hipocamp (A), fissura hipocampal (B) i còrtex adjacent (C). Els valors mostren les mitjanes  $\pm$  E.E.M.

## Conclusions

En els ratolins SAMP8, la permeabilitat de la barrera hematoencefàlica a marcadors exògens es veu afectada amb l'envelliment, ja que augmenta de manera dependent de l'edat. Els ratolins SAMR1 també mostren alteracions progressives amb l'edat de la BHE a substàncies petites com l'EB.



## Time-course of blood–brain barrier disruption in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice

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

<sup>a</sup> Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n., 08028 Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n., 08028 Barcelona, Spain

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

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 1 September 2008

Received in revised form 29 September 2008

Accepted 8 October 2008

#### Keywords:

Blood–brain barrier

SAMP8

SAMR1

Alzheimer's disease

Evans blue

### ABSTRACT

Senescence of the cerebrovascular system and an abnormal function of the blood–brain barrier have been related with Alzheimer's disease. We studied here the time-course of blood–brain barrier disruption in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice, which is a murine model of senescence and is also considered a model of Alzheimer's disease. We used a previously described method that allows evaluating blood–brain barrier integrity by observing Evans blue extravasation from brain blood vessels. Three brain regions (cortex, hippocampus and hippocampal fissure) of SAMP8 brains were analyzed at 3, 6, 9, 12 and 15 months of age. Moreover, genetically related senescence-accelerated mouse resistant 1 (SAMR1) and ICR-CD1 mice were studied. Results indicate that Evans blue permeability in SAMP8 and SAMR1 increases from 6 to 15 months in the three studied regions. At 15 months of age, SAMP8 and SAMR1 mice showed higher Evans blue extravasation in CA1 and Fissure than ICR-CD1 mice. Further studies are required to understand the senescence process in SAMR1 mice, as blood–brain barrier alterations in old age have unexpectedly been observed. On the other hand, as blood–brain barrier permeability in SAMP8 mice increases with age, blood–brain barrier alterations may contribute to the cerebral pathology observed in this strain.

© 2008 ISDN. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice are studied as a model of the neuropathological processes that occur during senescence. They show several indicative characteristics of accelerated ageing, such as reduced lifespan, lordosis, loss of hair and reduced physical activity (Hamamoto et al., 1984; Takeda et al., 1994). Furthermore, aged SAMP8 mice show impairments in learning tasks, altered emotions, abnormality of the circadian rhythm (Miyamoto, 1997) and many alterations similar to those of aged humans, for example, spongy degeneration (Yagi et al., 1989),

neuronal cell loss (Kawamata et al., 1997), and gliosis (Nomura and Okuma, 1999).

Senescence-accelerated mouse resistant 1 (SAMR1) mice share similar background with SAMP8 as they both come from the same AKR/J progenitors (Takeda et al., 1981). As SAMR1 are genetically related to SAMP8 mice but resistant to accelerated senescence, they have been used as controls for SAMP8 mice by many authors (Pelegrí et al., 2007; Tajés et al., 2008; Ueno et al., 2001). However, they show some alterations such as a marked loss of photoreceptor cells and ganglion cells late in life (Shoji et al., 1998), age-related hearing impairment (Takeda et al., 1997), nonthymic lymphoma, histiocytic sarcoma and ovarian cysts (Takeda, 1999). Furthermore, most of the “age-dependent” geriatric disorders, like osteoporosis, degenerative joint disease, cataract and hyperinflation of lungs, are included in all SAM strains (Takeda et al., 1997).

The SAMP8 strain has been proposed as a model of Alzheimer's disease (AD) (Morley et al., 2004). This was based on reports of brain overproduction of amyloid precursor protein (APP) and  $\beta$ -amyloid (Morley et al., 2000; Takemura et al., 1993); an increase in cerebral cortical and hippocampal APP mRNA expression in SAMP8 at 6 months (Tha et al., 2000); defects of brain microvessels (Ueno et al., 2001); dysfunction of the cholinergic system (Onozuka et al., 2002);

\* Corresponding author at: Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n., 08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 4024505; fax: +34 93 4035901.

E-mail address: [vilaplana@ub.edu](mailto:vilaplana@ub.edu) (J. Vilaplana).

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

Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; APP, amyloid precursor protein; BBB, blood–brain barrier; EB, Evans blue; HRP, horseradish peroxidase; ME, mean extravasation; PBS, phosphate buffered saline; PFA, *p*-formaldehyde; ROI, region of interest; SAMP8, senescence-accelerated mouse prone 8; SAMR1, senescence-accelerated mouse resistant 1.

and other neurotransmitter changes (Flood et al., 1998; Kondziella et al., 2002; Nomura et al., 1997), leading to deficits in learning and memory (Nomura and Okuma, 1999; Spangler et al., 2002).

Several hypotheses attempt to explain the pathophysiology of AD. The neurovascular hypothesis holds that faulty clearance of amyloid  $\beta$  peptide across the blood–brain barrier (BBB), aberrant angiogenesis and senescence of the cerebrovascular system could initiate neurovascular uncoupling, vessel regression, brain hypoperfusion and neurovascular inflammation (Zlokovic, 2005). In addition, it has been reported that a BBB breakdown could initiate and/or contribute to a “vicious circle” of the disease process, resulting in progressive synaptic and neuronal dysfunction and loss in disorders such as AD (Zlokovic, 2008).

There is some controversy about the BBB integrity of SAMP8 mice. On the one hand, the increase in serum albumin cerebral transference has been reported to be higher than that observed for SAMR1 mice (Ueno et al., 1993). In addition, the levels of IgG in the hippocampus of 12-month-old SAMP8 mice are higher than those of SAMR1 mice (Pelegri et al., 2007). On the other hand, there is no age-dependent increase in horseradish peroxidase (HRP) extravasation in the perivascular areas of the hippocampus of SAMP8 or SAMR1 mice. However, there is some positive staining for HRP in the cytoplasm of endothelial cells only in aged SAMP8 mice (Ueno et al., 2001). Finally, Banks et al. (2000) found no increase in the permeability of the BBB to albumin in young or aged SAMP8 mice, which questioned BBB disruption in this animal model. It should be borne in mind that these studies used different dyes, substances and techniques to assess BBB integrity, which may explain the differences in the results obtained.

In the present study, the BBB integrity of SAMP8 mice aged 3, 6, 9, 12 and 15 months was analyzed and compared with that of age-matched SAMR1 and ICR-CD1 mice, the last one as control strain. Due to the fact that some disturbances in AD have been located in both the hippocampus and the cerebral cortex, we studied BBB permeability changes in the CA1 hippocampus region, the hippocampal fissure and the parietal cortex of brain slides, by a quantitative strategy designed here and based on a recently published method in which Evans blue (EB) and Hoechst are added to a standard fixative solution as tracers (del Valle et al., 2008).

## 2. Experimental procedures

### 2.1. Animals

Three, 6, 9, 12 and 15 month-old male SAMP8, SAMR1 and ICR-CD1 mice were studied. Six animals of each age and strand were used. They were kept in standard conditions of temperature ( $22 \pm 2$  °C) and 12:12-h light-dark cycles (300 lux/3 lux). Until the day of the experiment they had access to food and water *ad libitum*. Studies were performed in accordance with the institutional guidelines for the care and use of laboratory animals established by the Ethical Committee for Animal Experimentation at the University of Barcelona. A viral serology including norovirus was performed every two months and reported no contamination.

### 2.2. Administration of tracers and brain processing

The strategy used to determine BBB permeability was based on the cocktail method (del Valle et al., 2008). The animals were anaesthetized with 80 mg/kg of sodium pentobarbital by an intraperitoneal injection. The thoracic cavity was opened and the animals received an intracardiac gravity-dependent perfusion of 50 mL of phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) followed by 50 mL of the cocktail solution prepared with EB 1% (Sigma–Aldrich, Madrid, Spain), Hoechst 0,01% (H-33258, Fluka, Madrid, Spain) and

*p*-formaldehyde 4% (PFA; Scharlau, Barcelona, Spain) in PBS. Once the perfusion had finished, brains were dissected, post-fixed in 4% PFA in PBS for 4 h and cryoprotected by immersion in PBS with 30% sucrose for 24 h. Afterwards, brains were frozen by immersion in isopentane chilled in dry ice and stored at  $-80$  °C until sectioning.

Frozen brains were embedded in OCT cryostat-embedding compound (Tissue-Tek, Torrance, CA), cut into 20- $\mu$ m-thick sections on a cryostat (Leyca Microsystems, Germany) at  $-22$  °C, and picked up on Superfrost<sup>+</sup> slides (Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany). The hippocampus was located with the help of a mouse brain atlas between bregma  $-1.06$  and  $-4.04$  (Paxinos and Franklin, 2001), and sections of the central zone of the hippocampus (at about bregma  $-2.30$ ) were selected. The slides were subsequently stored at  $-20$  °C.

### 2.3. Image acquisition

Slides were examined on a confocal laser microscope (TCS/SP2, Leica Microsystems, Germany) after being coverslipped with Entellan medium (Merck, Darmstadt, Germany). EB staining was visualized by excitation with 543-nm laser beams (green zone) and visualized as red fluorescence. For each brain section, two images, one per hemisphere, were obtained with the 4 $\times$  objective at 1024 pixels  $\times$  1024 pixels with eight bits of grey resolution (i.e.,  $2^8 = 256$  grey values), and stored in jpeg format. All the images, from right or left hemisphere, contained hippocampus and cortex. All images were acquired with the same set up of microscope, laser and software adjustments.

### 2.4. Quantification of extravasation

Image treatment and analysis were performed by means of the Image J program (National Institutes of Health, USA). In each image from each animal, three different regions of interest (ROI) were defined, corresponding to the CA1 hippocampus region, the hippocampal fissure and the parietal cortex (Fig. 1). The ROI for CA1 was set from the oriens layer of hippocampus as the upper limit to the lacunosum molecular layer, and covering about 2/3 of the CA1 from lateral to medial direction. The ROI for the hippocampal fissure was obtained from the lower limit of CA1's ROI to the lower limit of hippocampal's fissure vessels. Finally, the ROI for cortex was obtained on the corresponding dorsal cortex from corpus callosum to the molecular layer I. Following the method described by Vilaplana and Lavalie (1999), the mean grey value has been determined in each ROI. This mean grey value is equivalent to the mean value of fluorescence of the studied region and has been interpreted as the mean extravasation (ME) in arbitrary units.

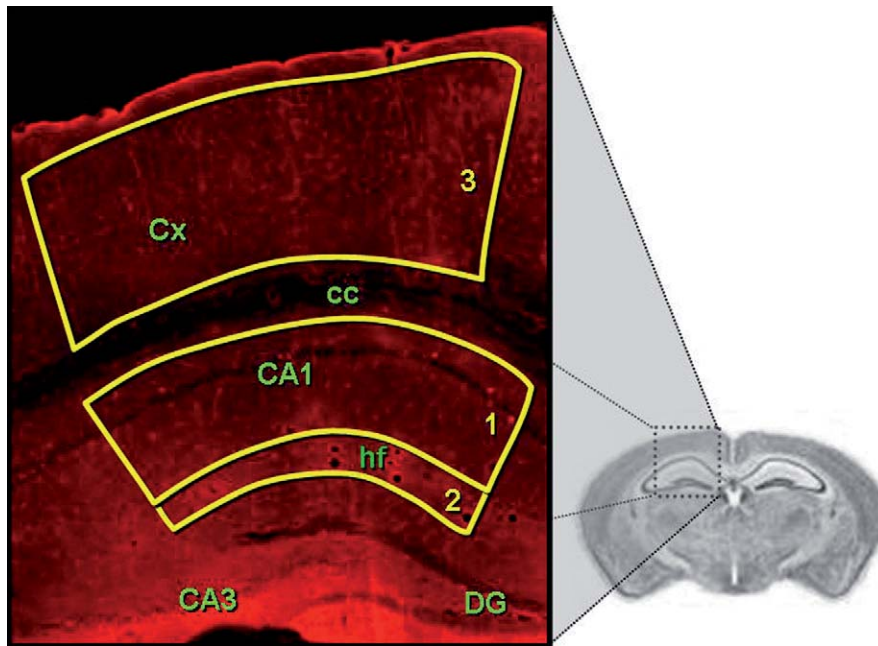
### 2.5. Statistical analyses

Statistical analyses were performed by means of the ANOVA, using STATISTICA for Windows (StatSoft Inc.). Differences were considered significant when  $p < 0.05$ . *Post hoc* comparisons were performed by LSD test (planned comparisons).

## 3. Results

### 3.1. Microscopic observation of EB extravasation in brain sections

Microscopic visual inspection of brain sections was performed before proceeding with the image acquisition and the quantification of EB extravasation. Brains sections that were not well picked up on the slides were replaced and sections were discarded if artificial splits due to the surgical manipulations were observed.



**Fig. 1.** Regions of interest (ROI), corresponding to CA1 hippocampal region (1), hippocampal fissure (2) and cortex (3). CA1: CA1 hippocampal region, CA3: CA3 hippocampal region, cc: corpus callosum, Cx: cortex, DG: dentate gyrus of the hippocampus, hf: hippocampal fissure. The brain image corresponds to a SAMP8 animal aged 9 months.

An image of a representative brain section from each strain and age can be seen in Fig. 2. From 3 to 15 months old, fluorescence seemed to increase especially in hippocampus and cortex of SAMP8 and SAMR1 animals, although 6-month-old animals seemed to have weaker staining than 3-month-old mice. From 9 months onwards, the EB extravasation on brain sections from SAMP8 and SAMR1 mice was stronger than in those from ICR-CD1 mice. High EB extravasation was also seen around some ventricular areas, in which the presence of circumventricular organs without BBB is well known.

### 3.2. Time-course of EB extravasation

After the acquisition of the images and the quantification of EB extravasation, the time-course of ME for the three strains studied was obtained separately for each ROI or zone analyzed (Fig. 3).

In the CA1 region (Fig. 3A), the ME from SAMP8 and SAMR1 mice followed a parallel evolution throughout the time-points studied. In both strains, although the ME values obtained at 3 months were higher than those obtained at 6 months, from 6 to 15 months, the values showed a progressive increase. In this region, the ME of the control strain (ICR-CD1) remained similar throughout the studied period and resembled the values obtained for the other strains at 6 months of age.

In the Fissure region (Fig. 3B), the ME levels showed the same pattern as that obtained for the CA1 region. Although ME values for SAMP8 and SAMR1 mice were higher at 3 than at 6 months of age, from 6 months on there was a progressive increase in ME, with the highest values recorded at 15 months. As occurred in CA1 region, ME levels for ICR-CD1 mice remained similar throughout the study. It is remarkable that the ME levels in the Fissure were higher than those observed in the CA1 region, although they both followed a similar pattern for each strain and age. The differences between CA1 and Fissure were significant according to ANOVA (see below).

In regard to the Cortex region, the ME levels were again higher at 3 months of age in SAMP8 and SAMR1 mice than at 6 months; and from 6 months to 15, the ME levels increased progressively. The ME levels in ICR-CD1 mice did not show a clear tendency throughout the period studied.

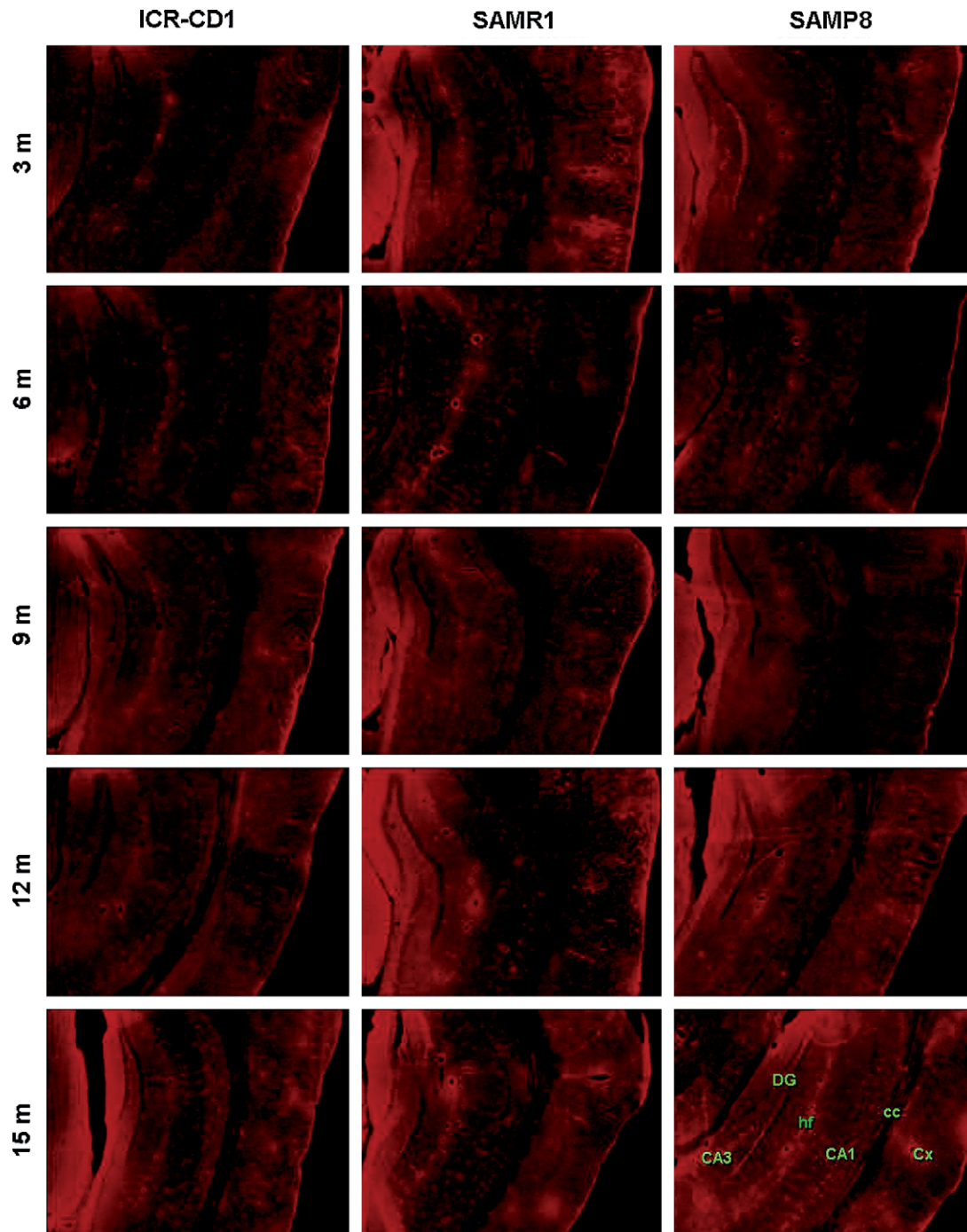
An ANOVA was performed in order to determine which variables had statistically significant effects on ME. The ME was defined as the dependent variable and the factors Region (CA1, Fissure and Cortex), Strain (SAMP8, SAMR1 and ICR-CD1) and Age (3, 6, 9, 12 and 15) as the independent variables. Interactions between factors were included.

Significant differences in ME were attributable to the factor Strain ( $F_{2,715} = 9.397$ ,  $p < 0.01$ ), Age ( $F_{4,715} = 20.048$ ,  $p < 0.01$ ) and Region ( $F_{2,715} = 222.028$ ,  $p < 0.01$ ). The interaction between Strain and Age was found significant ( $F_{8,715} = 4.065$ ,  $p < 0.01$ ), indicating that the effect of age is different in each of the three strains studied. The interaction between Strain and Region was also significant ( $F_{4,715} = 7.210$ ,  $p < 0.01$ ), indicating that the effect of Strain on ME is different in each region. Finally, the “Age-Region” interaction was not significant ( $F_{8,715} = 1.321$ ,  $p > 0.05$ ) nor was the triple interaction “Strain-Age-Region” ( $F_{16,715} = 1.193$ ,  $p > 0.05$ ).

The finding that SAMP8 and SAMR1 mice showed higher ME levels at 3 months of age than at 6 in all regions was not consistent with the observed tendency to increase with age. Thus, in order to clarify whether 3 months’ differences could modify the conclusions obtained with the ANOVA analysis, we repeated it without the data for 3 months. In this case, although  $F$  and  $p$  were slightly modified (data not shown) significant variables and interactions were maintained and the results outlined above remained valid.

The *post hoc* comparisons were carried out based on the significant differences obtained in the ANOVA test.

In regard to the factor Strain, the *post hoc* comparisons showed that ME levels from ICR-CD1 mice were significantly lower than those from SAMP8 and SAMR1 strains and, although the ME levels from SAMR1 were lower than those from SAMP8, the differences were not significant. For the factor Region, the Fissure values were significantly higher than those obtained in the Cortex, and the Cortex values were significantly higher than those for CA1. *Post hoc* comparisons of the factor Age showed that ME was lower at 6 months of age than at 9, lower at 9 than at 12, and lower at 12 than at 15. Finally, the ME levels at 3 months of age were significantly higher than those at 6 or 9, but not significantly different from those at 12 or 15 months.



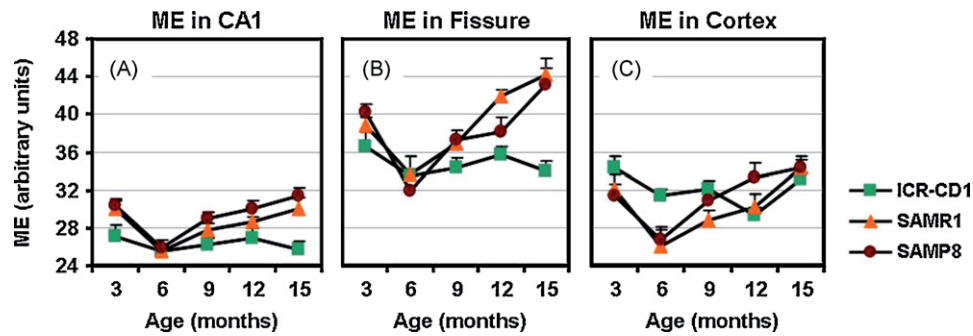
**Fig. 2.** Representative brain sections from each strain and age visualized for EB fluorescence. Brain regions are indicated in the last image. CA1: CA1 hippocampal region, CA3: CA3 hippocampal region, cc: corpus callosum, Cx: cortex, DG: dentate gyrus of the hippocampus, hf: hippocampal fissure.

Due to the significance of the interactions found between the factors Region and Strain, the presence of statistical differences in the ME levels between the three strains and between the different ages was ascertained in each ROI.

In the CA1 region, the *post hoc* comparisons showed no ME differences in ICR-CD1 mice between 3, 6, 9, 12 and 15 months of age. In contrast, SAMP8 mice showed lower ME values at 6 months than at 9, 12 or 15 months. However, although the ME values increased progressively from 9 to 15 months, the differences were not significant. In SAMR1 strain, the ME values at 15 months of age were significantly higher than those at 6 months. When

comparing the ME of the different strains in each age studied, no differences appeared between strains at 6 months of age. Actually, differences were significant at 12 months of age, when SAMP8 mice showed higher ME values than ICR-CD1 mice. At 15 months of age, both SAMP8 and SAMR1 animals showed higher ME values than ICR-CD1 mice. In regard to 3 months of age, the ME values from SAMP8 and SAMR1 strains were higher than those for ICR-CD1 animals.

The *post hoc* comparisons applied to the Fissure zone revealed no significant differences for ME values of ICR-CD1 mice at any age. SAMP8 mice showed lower ME values at 6 months than at 9, 12 or 15



**Fig. 3.** Time-course of mean extravasation (ME) in each ROI. (A) CA1 hippocampal region, (B) hippocampal fissure and (C) cortex. Values are means  $\pm$  S.E.M. Statistical differences due to the factors ROI, strain and age are detailed in Section 3.

months, and values at 12 months were lower than those at 15 months. In SAMR1 animals, the levels of ME recorded at 6 and 9 months were significantly lower than those obtained at 12 or 15 months of age. When comparing the ME of the different strains in each age studied for the Fissure region, no differences were found at 6 months between strains, as happened in the CA1 region. At 9 months, SAMP8 mice already showed higher ME values than ICR-CD1 animals, at 12 months the ME of SAMR1 was higher than that observed in ICR-CD1 mice, and at 15 months of age both SAMP8 and SAMR1 animals showed higher ME values than those of ICR-CD1 mice.

In the Cortex, the *post hoc* comparisons revealed significant differences between the ME levels from ICR-CD1 mice aged 3 and 12 months, but not between any other age. In SAMP8 animals, the ME was significantly lower at 6 months than at 9, 12 or 15 months; moreover, the ME at 9 months was lower than at 15 months. SAMR1 mice had lower ME values at 6 or 9 months of age than at 15 months. The comparison of ME levels in the cortex between strains gave higher values at 6 months for ICR-CD1 mice than for the other two strains; and finally, as a result of the ME increase observed in the cortex of SAMP8 mice, the ME values at 12 months of age were significantly higher in SAMP8 than in ICR-CD1 mice.

#### 4. Discussion

In this study we examined the BBB integrity during the aging process in three different strains of mice, SAMP8, SAMR1 and ICR-CD1. Three different cerebral regions, the hippocampus, the hippocampal fissure and the cerebral cortex, were analyzed quantitatively for BBB permeability after perfusing the mice with the EB tracer added in a standard fixative *p*-formaldehyde solution. We found that while BBB integrity remained stable throughout the lifespan of ICR-CD1 mice, SAMP8 and SAMR1 showed a progressive increase of EB fluorescence from 6 to 15 months of age in all studied regions.

Results obtained at 3 months of age are unexpected, as all strains showed higher EB extravasation values than those obtained at 6 months of age. Although we cannot reach an explanation for this fact, we performed the statistical analysis with or without including 3-months data and we obtained similar statistical results, indicating the robustness of the analysis and corroborating the increase of EB extravasation with age in SAMP8 and SAMR1 animals. Moreover, although the values obtained in the cortex of the ICR-CD1 strain are higher than expected, the extravasation in this region does not show a clear tendency with age.

The method used here to study the BBB is based on the recent published cocktail method (del Valle et al., 2008). In that study, it was unclear whether the absence of EB fluorescence outside an intact BBB was because EB had not crossed the barrier or because

there were no extravasated proteins to bind to. It is well known that EB only fluoresces when it binds to some proteins. Unpublished observations from previous experiments on healthy mice with intact BBB showed that adding an EB solution to a previously fixed brain section provides fluorescence throughout the brain tissue. This indicates the presence of some proteins in brain parenchyma to which EB can bind, and so, fluoresce. We thus conclude that when administered with the cocktail method, EB does not fluoresce outside vessels provided with an intact BBB. Accordingly, differences in EB fluorescence observed in the present study can be attributed to differences in EB extravasation across the BBB, indicating differences in BBB permeability in the different strains and ages.

HRP has also been used by many authors as a tracer to evaluate BBB permeability. Ueno et al. (1997) administered HRP to young and aged SAMP8 and SAMR1 mice (3 and 13 months old). They reported a high HRP staining that spread diffusely in the hippocampus in old SAMP8 mice, but they observed no staining in young SAMP8 animals, nor in aged or young SAMR1 animals. Although we found that EB permeability increased in aged SAMP8 and SAMR1 mice, it should be taken into account that EB tracer molecule (mol. wt. 961 D) is much smaller than HRP (mol. wt. 40 kD). Thus, these results are not in contradiction with ours, as we detected permeability of the BBB to smaller molecules than those used by Ueno et al. (1997). It has also been reported that the passage of HRP in 13-month-old SAMP8 mice occurred throughout the parajunctional regions of endothelial cells (Ueno et al., 2001). Although Ueno et al. found no tracer extravasation through the paracellular pathway, they described positive staining for HRP in endothelial cells only in aged SAMP8, which they interpreted as the evidence of injury or alterations to the endothelial cells. If a smaller tracer had been used, parajunctional alterations might also have been observed in animals below the age of 13 months.

Pelegrí et al. (2007) studied the BBB permeability to IgG in SAMP8 and SAMR1 mice at different ages (3, 7 and 12 months old). In healthy animals there is almost no presence of IgG in the cerebral parenchyma and IgG is only found in some brain structures, like circumventricular organs or choroid plexus, which have fenestrated capillaries that allow the exchange of plasmatic hydrophilic substances of high molecular weight. Only when the BBB is disrupted, IgG extravasation also occurs in other brain areas. The study reported no IgG extravasation in SAMP8 or SAMR1 mice aged 3 or 7 months. Furthermore, they found higher IgG extravasation in SAMP8 than in SAMR1 animals aged 12 months. Although we now describe a similar BBB disruption for both SAMR1 and SAMP8 mice, it is worth mentioning that IgG (mol. wt. 170 kD) has a higher molecular weight than EB (mol. wt. 0.96 kD) and would thus only enter the brain parenchyma if the disruption to the BBB was more drastic. Moreover, Pelegrí et al. (2007) stained

the IgG that had been previously extravasated to the parenchyma before animal sacrifice, while in the present study we measured the EB that extravasated during the cocktail perfusion. All these facts should be taken into account when comparing the results obtained in these studies.

On the other hand, not all the studies about BBB function in old SAMP8 mice have found BBB disturbances. Banks et al. (2000) performed a study in which radioactive albumin and radioactive insulin were administered intravenously and they found no differences between young and aged SAMP8 mice. Moreover, another study described an intact BBB in aged SAMP8 mice, reporting no increase in spaces of previously administered radioactively labeled sucrose or albumin (Moinuddin et al., 2000). However, in the same study they administered radioactively labeled IL-1 in order to determine whether all regions of the brain could transport IL-1 and whether transport differed between young (2 months old) ICR-CD1 mice and young and aged (17 months old) SAMP8 mice. They found that, in young ICR-CD1 mice, IL-1 was transported in 8 of the 10 brain regions studied. However, in both young and aged SAMP8 animals IL-1 was transported in only four regions, indicating a decreased transport capacity in comparison with young ICR-CD1 animals (Moinuddin et al., 2000).

The various studies that have questioned the BBB status in SAMP8 mice used different techniques to assess its function. The results reported in the present study indicate that the cocktail method is sensitive enough to examine the processes involved in BBB disruptions from initial stages. It allows us to evaluate, locate and quantify the alterations that occur in the BBB of SAMP8, SAMR1 and ICR-CD1 mice, and track the time-course of these alterations. We conclude that the BBB of SAMP8 and SAMR1 mice deteriorate with age, while that of ICR-CD1 remains stable.

Zlokovic (2008) discussed how BBB alterations could contribute to the onset of AD. He suggested that disruption of the BBB may precede, accelerate, or contribute to chronic disease processes in neurodegenerative disorders of the adult and aging nervous system such as AD. Here, we report a BBB disruption in SAMP8 mice, considered by some authors as a model of AD. How these permeability alterations and their modulation contribute to a better understanding of the disease requires further investigation.

## Acknowledgments

This work was supported by grants BFU/2006-11981, SAF/2005-01604, and SAF/2006-13092 from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain); P1041300 and Centros de Investigación Biomédica en Red (CIBER) from the Instituto de Salud Carlos III; and 2005/SGR00893 from the Generalitat de Catalunya. J. del Valle is sponsored by a 2007 grant from Fundació Universitària Agustí Pedro i Pons.

## References

- Banks, W.A., Farr, S.A., Morley, J.E., 2000. Permeability of the blood–brain barrier to albumin and insulin in the young and aged SAMP8 mouse. *J. Gerontol.* 55A, B601–B606.
- del Valle, J., Camins, A., Pallàs, M., Vilaplana, J., Pelegrí, C., 2008. A new method for determining blood–brain barrier integrity based on intracardiac perfusion of an Evans blue – Hoechst cocktail. *J. Neurosci. Methods* 174, 42–49.
- Flood, J.F., Farr, S.A., Uezu, K., Morley, J.E., 1998. Age-related changes in septal serotonergic GABAergic and glutamatergic facilitation of retention in SAMP8 mice. *Mech. Ageing Dev.* 105, 173–188.
- Hamamoto, H., Honma, A., Irino, M., Matsushita, T., Toda, K., Matsumura, M., Takeda, T., 1984. Grading score system: a method for evaluation of the degree of senescence in senescence accelerated mouse (SAM). *Mech. Ageing Dev.* 26, 91–102.
- Kawamata, T., Akiguchi, I., Yagi, H., Irino, M., Sugiyama, H., Akiyama, H., Shimada, A., Takemura, M., Ueno, M., Kitabayashi, T., Ohnishi, K., Seriu, N., Higuchi, K., Hosokawa, M., Takeda, T., 1997. Neuropathological studies on strains of senescence-accelerated mice (SAM) with age-related deficits in learning and memory. *Exp. Gerontol.* 32, 161–170.

- Kondziella, D., Bidar, A., Urfjell, B., Sletvold, O., Sonnewald, U., 2002. The pentylene-tetrazole-kindling model of epilepsy in SAMP8 mice: behavior and metabolism. *Neurochem. Int.* 40, 413–418.
- Miyamoto, M., 1997. Characteristics of age-related behavioral changes in senescence-accelerated mouse SAMP8 and SAMP10. *Exp. Gerontol.* 32, 139–148.
- Moinuddin, A., Morley, J.E., Banks, W.A., 2000. Regional variations in the transport of interleukin-1alpha across the blood–brain barrier in ICR-CD1 and aging SAMP8 mice. *Neuroimmunomodulation* 8, 165–170.
- Morley, J.E., Kumar, V.B., Bernardo, A.E., Farr, S.A., Uezu, K., Tumosa, N., Flood, J.F., 2000.  $\beta$ -Amyloid precursor polypeptide in SAMP8 mice affects learning and memory. *Peptides* 21, 1761–1767.
- Morley, J.E., Banks, W.A., Kumar, V.B., Farr, S.A., 2004. The SAMP8 mouse as a model for Alzheimer disease: studies from Saint Louis University. *Int. Congr. Ser.* 1260, 23–28.
- Nomura, Y., Kitamura, Y., Ohnuki, T., Arima, Y., Yamanaka, Y., Sasaki, K., Oonuma, Y., 1997. Alterations in acetylcholine, NMDA, benzodiazepine receptors and protein kinase C in the brain of the senescence-accelerated mouse: an animal model useful for studies on cognitive enhancers. *Behav. Brain Res.* 83, 51–55.
- Nomura, Y., Okuma, Y., 1999. Age-related defects in lifespan and learning ability in SAMP8 mice. *Neurobiol. Aging* 20, 111–115.
- Onozuka, M., Watanabe, K., Fujita, M., Tomida, M., Ozono, S., 2002. Changes in the septohippocampal cholinergic system following removal of molar teeth in the aged SAMP8 mouse. *Behav. Brain Res.* 133, 197–204.
- Paxinos, G., Franklin, K.B.J., 2001. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd ed. Academic Press, London.
- Pelegrí, C., Canudas, A.M., del Valle, J., Casadesús, G., Smith, M.A., Camins, A., Pallàs, M., Vilaplana, J., 2007. Increased permeability of blood–brain barrier on the hippocampus of a murine model of senescence. *Mech. Ageing Dev.* 128, 522–528.
- Shoji, M., Okada, M., Ohta, A., Higuchi, K., Hosokawa, M., Honda, Y., 1998. A morphological and morphometrical study of the retina in aging SAM mice. *Ophthalmol. Res.* 30, 172–179.
- Spangler, E.L., Patel, N., Speer, D., Hyman, M., Hengemihle, J., Markowska, A., Ingram, D.K., 2002. Passive avoidance and complex maze learning in the senescence accelerated mouse (SAM): age and strain comparisons of SAM P8 and R1. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 57, B61–B68.
- Tajes, M., Gutierrez-Cuesta, J., Folch, J., Ferrer, I., Caballero, B., Smith, M.A., Casadesús, G., Camins, A., Pallàs, M., 2008. Lithium treatment decreases activities of tau kinases in a murine model of senescence. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67, 612–623.
- Takeda, T., Hosokawa, M., Takeshita, S., Irino, M., Higuchi, K., Matsushita, T., Tomita, Y., Yasuhira, K., Hamamoto, H., Shimizu, K., Ishii, M., Yamamoto, T., 1981. A new murine model of accelerated senescence. *Mech. Ageing Dev.* 17, 183–194.
- Takeda, T., Hosokawa, M., Higuchi, K., 1994. Senescence-accelerated mouse (SAM). A novel murine model of aging. In: Takeda, T. (Ed.), *The SAM Model of Senescence*. Elsevier, Amsterdam, 15–22.
- Takeda, T., Matsushita, T., Kurozumi, M., Takemura, K., Higuchi, K., Hosokawa, M., 1997. Pathobiology of the senescence-accelerated mouse (SAM). *Exp. Gerontol.* 32, 117–127.
- Takeda, T., 1999. Senescence-accelerated mouse (SAM): a biogerontological resource in aging research. *Neurobiol. Aging* 20, 105–110.
- Takemura, M., Nakamura, S., Akiguchi, I., Ueno, M., Oka, N., Ishikawa, S., Shimada, A., Kimura, J., Takeda, T., 1993. Beta/A4 protein like immunoreactive granular structures in the brain of senescence-accelerated mouse. *Am. J. Pathol.* 142, 1887–1897.
- Tha, K.K., Okuma, Y., Miyazaki, H., Murayama, T., Uehara, T., Hatakeyama, R., Hayashi, Y., Nomura, Y., 2000. Changes in expressions of proinflammatory cytokines IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 in the brain of senescence accelerated mouse. *Brain Res.* 885, 25–31.
- Ueno, M., Akiguchi, I., Yagi, H., Naiki, H., Fujibayashi, Y., Kimura, J., Takeda, T., 1993. Age-related changes in barrier function in mouse brain. I. Accelerated age-related increase of brain transfer of serum albumin in accelerated senescence prone SAM-P/8 mice with deficits in learning and memory. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 16, 233–248.
- Ueno, M., Akiguchi, I., Hosokawa, M., Shinnou, M., Sakamoto, H., Takemura, M., Higuchi, K., 1997. Age-related changes in the brain transfer of blood-borne horseradish peroxidase in the hippocampus of senescence-accelerated mouse. *Acta Neuropathol.* 93, 233–240.
- Ueno, M., Sakamoto, H., Kanenishi, K., Onodera, M., Akiguchi, I., Hosokawa, M., 2001. Ultrastructural and permeability features of microvessels in the hippocampus, cerebellum and pons of senescence-accelerated mice (SAM). *Neurobiol. Aging* 22, 469–478.
- Vilaplana, J., Lavielle, M., 1999. A method to quantify glial fibrillary acidic protein immunoreactivity on the suprachiasmatic nucleus. *J. Neurosci. Methods* 88, 181–187.
- Yagi, H., Irino, M., Matsushita, T., Katoh, S., Umezawa, M., Tsuboyama, T., Hosokawa, M., Akiguchi, I., Tokunaga, R., Takeda, T., 1989. Spontaneous spongy degeneration of the brain stem in SAM-P/8 mice, a newly developed memory-deficient strain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 48, 577–590.
- Zlokovic, B.V., 2005. Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 28, 202–208.
- Zlokovic, B.V., 2008. The blood–brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57, 178–201.

## Article 4

### EARLY AMYLOID ACCUMULATION IN THE HIPPOCAMPUS OF SAMP8 MICE

**Authors:** Jaume del Valle, Joaquim Duran-Vilaregut, Gemma Manich, Gemma Casadesús, Mark A. Smith, Antoni Camins, Mercè Pallàs, Carme Pelegrí, Jordi Vilaplana

Journal of Alzheimer's Disease 2010; 19: 1303–1315.





## RESUM

### Objectiu

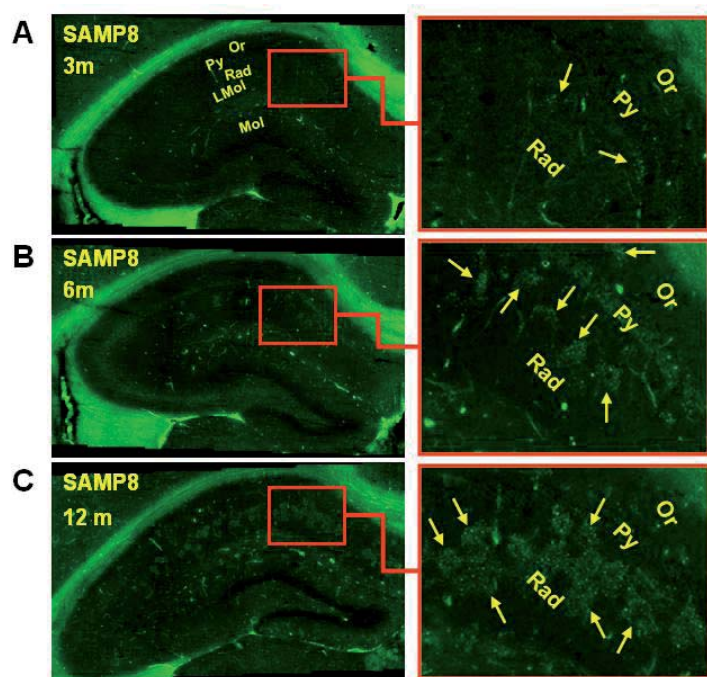
Estudiar la presència, la composició i l'evolució de dipòsits amiloides a l'hipocamp de ratolins SAMP8.

### Material i mètodes

Es van utilitzar ratolins SAMP8 de 3, 6, 9, 12 i 15 mesos d'edat. Es van perfondre els animals amb solució salina, es van obtenir els encèfals i es van congelar. Posteriorment es van obtenir seccions criostàtiques de 20µm de gruix. A continuació, es van aplicar tècniques d'immunohistoquímica utilitzant un ampli panell d'anticossos dirigits contra els pèptids amiloides Aβ<sub>40</sub>, Aβ<sub>42</sub>, i contra l'APP. Les seccions es van observar per microscòpia de fluorescència i confocal i es van quantificar a cada hipocamp els clústers amiloides positius per a cada anticòs. Els mateixos procediments es van aplicar a animals SAMR1 i ICR de les mateixes edats.

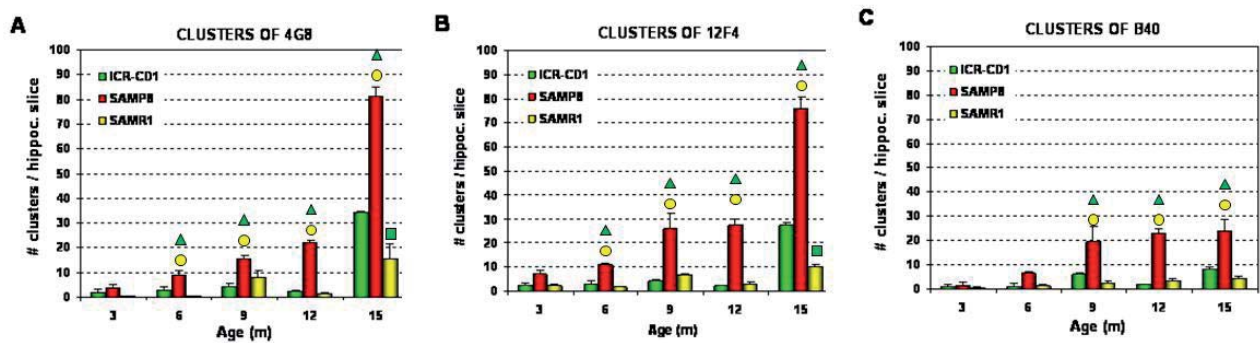
### Resultats

En ratolins SAMP8, apareixen a l'hipocamp alguns grànuls amiloides agrupats en forma de clústers a partir dels 3 mesos d'edat (Fig. 17A), a partir dels 6 mesos d'edat la mida i la quantitat d'aquests clústers augmenta i s'expandeix per la capa de l'*stratum radiatum* de la subzona CA1 de l'hipocamp (Fig. 17B), als 12 mesos d'edat els clústers ocupen ja pràcticament tot l'hipocamp (Fig 17C).



**Fig. 17** Seccions coronals de l'hipocamp on s'observa el pèptid Aβ en ratolins SAMP8 de 3, 6 i 12 mesos d'edat. En les imatges es pot observar el pèptid Aβ de 3 ratolins representatius de 3, 6 i 12 mesos d'edat (A, B i C respectivament). Les fletxes marquen alguns clústers amiloides. Or: capa oriens, Py: capa piramidal, Rad: *stratum radiatum*, LMol: capa *lacunosum moleculare*, Mol: capa molecular

La quantificació del nombre de clústers amiloides mostra com a partir dels 6 mesos d'edat els ratolins SAMP8 mostren un increment progressiu amb l'edat de clústers de grànuls amiloides i els ratolins SAMR1 i ICR mantenen nivells basals d'agregats amiloides fins als 15 mesos d'edat on ja si que mostren un augment (Fig. 18A), els clústers d'A $\beta_{42}$  mostren un perfil molt similar al dels clústers d'A $\beta$  (Fig. 18B), en canvi, els clústers d'A $\beta_{40}$  no augmenten en SAMP8 fins als 9 mesos d'edat i no arriben a mostrar un increment significatiu en les soques SAMR1 ni ICR (Fig. 18C). Els grànuls amiloides estan constituïts majoritàriament pel pèptid A $\beta_{42}$ , però també contenen pèptid A $\beta_{40}$  i diferents fragments d'APP.



**Fig. 18 Evolució temporal del nombre de clústers als hipocamps de les soques ICR, SAMR1 i SAMP8.** ICR (verd), SAMR1 (groc) i SAMP8 (vermell). Es quantifiquen els clústers d'A $\beta$  amb 4G8 (A), els clústers d'A $\beta_{42}$  amb 12F4 i (B) els clústers d'A $\beta_{40}$  amb B40 (C). Els valors mostren mitjanes  $\pm$  E.E.M.  $\Delta$  Diferències significatives entre SAMP8 i ICR-CD1.  $\circ$  Diferències significatives entre SAMP8 i SAMR1.  $\Delta$  Diferències significatives entre SAMR1 i ICR-CD1 ( $p < 0.05$ ).

## Conclusions

Existeixen dipòsits amiloides a l'hipocamp dels ratolins SAMP8, que augmenten en nombre i grandària amb l'edat. Aquest fet recolza la utilització d'aquesta soca de ratolins com a model de malaltia d'Alzheimer.

# Early Amyloid Accumulation in the Hippocampus of SAMP8 Mice

Jaume del Valle<sup>a,b</sup>, Joaquim Duran-Vilaregut<sup>a,b</sup>, Gemma Manich<sup>a</sup>, Gemma Casadesús<sup>c</sup>, Mark A. Smith<sup>d</sup>, Antoni Camins<sup>b,e</sup>, Mercè Pallàs<sup>b,e</sup>, Carme Pelegrí<sup>a,b,1</sup>, Jordi Vilaplana<sup>a,b,\*,1</sup>

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

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

<sup>c</sup>Department of Neuroscience, Case Western Reserve University, Cleveland, OH, USA

<sup>d</sup>Department of Pathology, Case Western Reserve University, Cleveland, OH, USA

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

Handling Editor: Jesus Avila

Accepted 2 November 2009

**Abstract.** Late-onset Alzheimer's disease (AD) is the most common form of AD appearing after 65 years of age. To date, however, there are no non-genetically manipulated rodent models that develop a similar sporadic onset of AD with age-related amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) deposition. Although the senescence accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice have been proposed as a model of AD, the presence of A $\beta$  deposits remains controversial. In this study, we describe the time course of A $\beta$  deposition in SAMP8 mice as well as in control SAMR1 and ICR-CD1 strains of mice. From as early as 6 months onward, SAMP8 mice show A $\beta$  deposition in the hippocampus that increase in number and extent with age. These deposits are comprised of clustered granules that contain A $\beta_{42}$ , A $\beta_{40}$ , and other A $\beta$  protein precursor fragments. By marked contrast, control mice show only low numbers of A $\beta$  clusters that do not develop until 15 months of age. The demonstration that SAMP8 mice present with amyloid deposits in their hippocampus makes this animal model a useful tool to understand the mechanisms involved in A $\beta$  deposition in AD.

**Keywords:** A $\beta_{40}$ , A $\beta_{42}$ , A $\beta$ PP, aging, Alzheimer's disease, amyloid- $\beta$ , hippocampus, SAMP8, SAMR1, senescence

Supplementary video: <http://www.j-alz.com/issues/19/vol19-4.html>

## INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) was first described as a rare case of dementia [1], however, AD is now associated with the elderly since it is the most common form of dementia in the aged population, affecting one in ten people over 65 years of age [2]. Moreover, the number

of people with the disease doubles for every 5-year intervals beyond age 65 [3], making AD an increasingly critical healthcare challenge for the 21st century [4].

Late-onset AD is the most common form of AD (nearly 90%), appearing after 65 years of age [5], and susceptibility to late-onset AD shows no apparent familial aggregation [6]. Early-onset AD, on the other hand, is the rarest form of the disease with approximately half of the cases being due to familial Alzheimer's disease (FAD), where mutations in the genes encoding amyloid- $\beta$  protein precursor (A $\beta$ PP) [7], presenilin 1 (PSEN1) [8], and presenilin 2 (PSEN2) [9] result in a genetic predisposition to the condition.

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

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

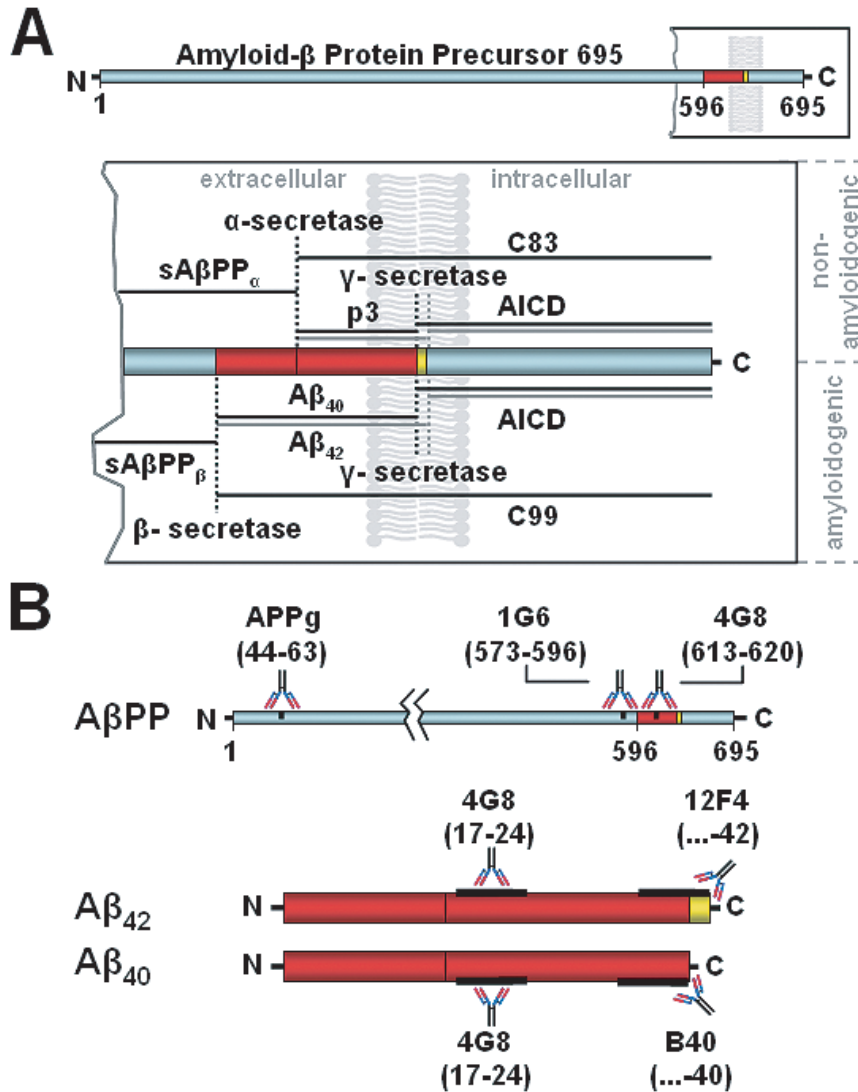


Fig. 1. A) Representation of A $\beta$ PP isoform 695 and their cleavage sites for  $\alpha$ -  $\beta$ - and  $\gamma$ - secretases. Resulting peptides are indicated. See text for details. B) Antibodies used to characterize amyloid deposition. Localization of the epitopes on both A $\beta$ PP and amyloid peptides are indicated. See text for details.

AD forms of AD are typically characterized by the presence of neurofibrillary tangles composed of hyperphosphorylated tau protein as well as aggregates of amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) peptides derived from A $\beta$ PP processing in the brain. In FAD forms, alterations in A $\beta$  generation, due to abnormal A $\beta$ PP processing, can be observed. A $\beta$ PP is a transmembrane protein expressed in the adult brain where plays a major role in the nervous system and is involved in synaptogenesis and synaptic plasticity [10]. The most common A $\beta$ PP isoform in neurons is A $\beta$ PP<sub>695</sub> [11], which can be cleaved by the enzymes  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases. In the amyloido-

genic pathway,  $\beta$ -secretase cleavage of the A $\beta$ PP<sub>695</sub> isoform between amino acids 596 and 597 releases the N-terminal fragment sA $\beta$ PP <sub>$\beta$</sub>  into the extracellular space and leaves the C99 C-terminal fragment within the membrane [12]. Consecutive cleavage of this fragment at residues 40 or 42 by  $\gamma$ -secretase releases an amyloid intracellular domain fragment (AICD) and an A $\beta$ <sub>40</sub> or A $\beta$ <sub>42</sub> peptide (Fig. 1A), with A $\beta$ <sub>42</sub> being the form most prone to toxicity and extracellular aggregation [13]. In the non-amyloidogenic pathway, A $\beta$ PP is first cleaved by the  $\alpha$ -secretase between amino acids 16 and 17 of the A $\beta$  region [14,15], producing the secret-

ed amino terminal ectodomain sA $\beta$ PP $\alpha$  and the C83 fragment. Subsequent cleavage of C83 by  $\gamma$ -secretase releases the p3 and AICD peptides (Fig. 1A) [16].

Currently, most of the animal-based models used to study AD carry one or more mutations in the proteins that play a major role in the processing of A $\beta$ PP or tau [17,18]. A $\beta$ PP and presenilin mutations, which are fully penetrant and therefore guarantee the onset of the disease, can replicate the pathophysiology of early-onset AD. However, they account for less than 5% of all AD cases [19]. To date, there are no non-genetically manipulated rodent models which develop a similar sporadic onset of AD with a demonstrated age-related A $\beta$  deposition, as it happens in humans.

The senescence accelerated mouse prone 8 (SAMP8) is a non-genetically modified strain of mice with a characteristic accelerated aging process. Senescent SAMP8 mice share similar characteristics with aged humans such as a reduced lifespan, lordosis, hair loss, and reduced physical activity [20,21]. In addition, SAMP8 has recently been proposed as a model of neurodegeneration [22] with impairments in learning tasks, as well as altered emotions and abnormality of the circadian rhythm [23], spongy degeneration [24], neuronal cell loss [25], and gliosis [26] in the brain. Notably, SAMP8 also show other characteristics seen in AD patients, such as learning and memory deficits [26,27], brain microvessels defects [28], blood-brain barrier dysfunction [29,30], alteration of the cholinergic system [31], and other neurotransmitter changes [32–34]. Given such changes, it is perhaps not surprising that SAMP8 have also been proposed as an animal model of AD [35, 36].

Changes in A $\beta$ , the canonical lesion of AD, however are controversial. For example, some investigators find an increased level of amyloid burden in the brain parenchyma, based on reports of brain overproduction of A $\beta$ PP and A $\beta$  [37,38] and an increase in cerebral cortical and hippocampal A $\beta$ PP mRNA expression in SAMP8 at 6 months [39]. On the other hand, very few reports, however, describe any kind of amyloid deposition in SAMP8 mice [38,40], and data regarding A $\beta$  deposition remains inconclusive as indicated in recent reports [22].

Since A $\beta$  accumulation is viewed as essential for the validation of an accurate AD model, in this study we performed several immunohistochemistry studies using different antibodies to ascertain the presence of amyloid deposits in the brain of SAMP8 animals. We determined the time course of A $\beta$  deposits and characterized their composition, particularly the presence of both A $\beta$ <sub>40</sub> and A $\beta$ <sub>42</sub> peptides and also other A $\beta$ PP fragments.

## MATERIAL AND METHODS

### Animals

Male SAMP8 were compared to senescence accelerated mouse resistant 1 (SAMR1) mice, which are genetically related to SAMP8 but resistant to accelerated senescence [41], and to ICR-CD1 mice, a healthy and clean strain commonly used as control mice. Four animals aged 3, 6, 9, 12, and 15 months from each strain were used. They were kept in standard conditions of temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and 12:12-h light-dark cycles (300 lux/0 lux). Throughout the study, they had access to food and water *ad libitum*. Studies were performed in accordance with the institutional guidelines for the care and use of laboratory animals established by the Ethical Committee for Animal Experimentation at the University of Barcelona.

### Brain processing

Animals were anaesthetized with 80 mg/Kg of sodium pentobarbital by an intraperitoneal injection. The thoracic cavity was opened and the animals received an intracardiac gravity-dependent perfusion of 50 mL of phosphate buffered saline (PBS, pH = 7.2). After the perfusion, brains were dissected, frozen by immersion in isopentane chilled in dry ice and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until sectioning. Thereafter, frozen brains were embedded in OCT cryostat-embedding compound (Tissue-Tek, Torrance, CA), cut into 20- $\mu\text{m}$ -thick sections on a cryostat (Leyca Microsystems, Germany) at  $-22^\circ\text{C}$ , and placed on slides. Sections of the central zone of the hippocampus (at about bregma  $-2.30$ ) were selected according to a mouse brain atlas [42]. Slides containing brain sections were fixed with acetone for 10 min at  $4^\circ\text{C}$ , allowed to dry at room temperature and then frozen at  $-20^\circ\text{C}$  until staining.

### Immunohistochemistry

Slides were brought to room temperature before being rehydrated with PBS for 5 min. Sections were then blocked and permeabilized with PBS containing 1% BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and 0.1% Triton-X-100 (Sigma-Aldrich) for 20 min. After two 5-min washes in PBS, brain sections were incubated with the primary antibody (see below) overnight in the dark at room temperature. Slides were washed again and then incubated for 1 h at room temperature in the dark with the secondary antibody (see

below). After washing again, nuclear staining was performed by incubating slides in Hoechst (H-33258, Fluka, Madrid, Spain) at 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS for 10 min at room temperature in the dark. Finally, slides were washed and coverslipped with Prolong Gold antifade reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). Staining controls were performed by incubating with PBS instead of the primary antibody or both primary and secondary antibodies.

To characterize A $\beta$ PP and amyloid deposits, several primary antibodies were used (Fig. 1B). The mouse monoclonal antibody 4G8 (Sigma-Aldrich), directed against human A $\beta$ , was used to localize amyloid depositions; this antibody recognizes amino acid residues 17–24 of the A $\beta$  peptides. The mouse monoclonal antibody against A $\beta_{42}$  clone 12F4 (Covance, CA) was used to localize A $\beta_{42}$  deposition; this antibody is reactive to the C-terminus of A $\beta$  and is specific for the cleaved 42 isoform. The rabbit polyclonal antibody to A $\beta_{40}$  (ab10147, Abcam, Cambridge, UK), henceforth referred to as B40, was used to detect the peptide A $\beta_{40}$ ; this antibody reacts only with the cleaved A $\beta_{40}$  isoform and has no crossreactivity with A $\beta_{42}$  nor with A $\beta$ PP. The 1G6 monoclonal antibody against A $\beta$ PP (Covance) was used to localize A $\beta$ PP or some A $\beta$ PP fragments resulting from A $\beta$ PP processing; the epitope of this antibody lies within amino acids 573–596 of A $\beta$ PP<sub>695</sub>. Finally, the goat polyclonal antibody to A $\beta$ PP (ab2084, Abcam), henceforth referred to as APPg, was also used to detect A $\beta$ PP or A $\beta$ PP fragments. This antibody recognizes the amino acid sequence of A $\beta$ PP<sub>695</sub> corresponding to amino acids 44–63. AlexaFluor 488 donkey anti-mouse IgG, AlexaFluor 555 donkey anti-goat IgG and AlexaFluor 555 donkey anti-rabbit IgG (Invitrogen) were used as secondary antibodies.

#### Image acquisition

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

#### Quantification of amyloid deposition

To quantify amyloid burden, three blinded observers analyzed a 4G8 stained brain section of each animal using a laser microscope (BX41, Olympus, Germany). As positive granules observed in the hippocampus were clustered (see results section), each observer quantified the number of clusters in each hippocampal region of the brain section. The mean number obtained by the three observers was used for statistical analysis. Identical analyses were performed with both 12F4 and B40 antibodies in adjacent sections.

#### Statistical analyses

Statistical analyses were performed by means of the ANOVA, using STATISTICA for Windows (StatSoft Inc.). Differences were considered significant when  $p < 0.05$ . *Post hoc* comparisons were performed using the LSD test (planned comparisons). In order to restrict false significant differences in *Post hoc* comparisons, the Bonferroni correction was applied and significant differences were considered when  $p < 0.001$ .

## RESULTS

#### Presence of clustered amyloid granules in the hippocampus of SAMP8 mice

The amyloid staining obtained with the 4G8 antibody was examined in brains from SAMP8, SAMR1 and ICR-CD1 mice sacrificed at the different ages studied (3, 6, 9, 12, and 15 months). In Fig. 2, representative images of the CA1 zone stained with 4G8 are presented. 4G8 staining showed highly reactive amyloid granular structures up to 3  $\mu\text{m}$  in size in the hippocampus of some animals. These granular structures appeared sometimes isolated but they were more frequently clustered, each cluster formed by approximately 40–50 granules. These clusters were not found outside the hippocampus. In the hippocampus of all the analyzed SAMP8 mice aged 3 months, some clusters could be seen. As the animals' age increased, so did the number of clusters. At 15 months, the number and size of the clusters had increased to such an extent that they covered a considerable area of the hippocampus. In SAMR1 and ICR-CD1 animals of 3, 6, 9, and 12 months clusters were rarely seen, although they were common at 15 months.

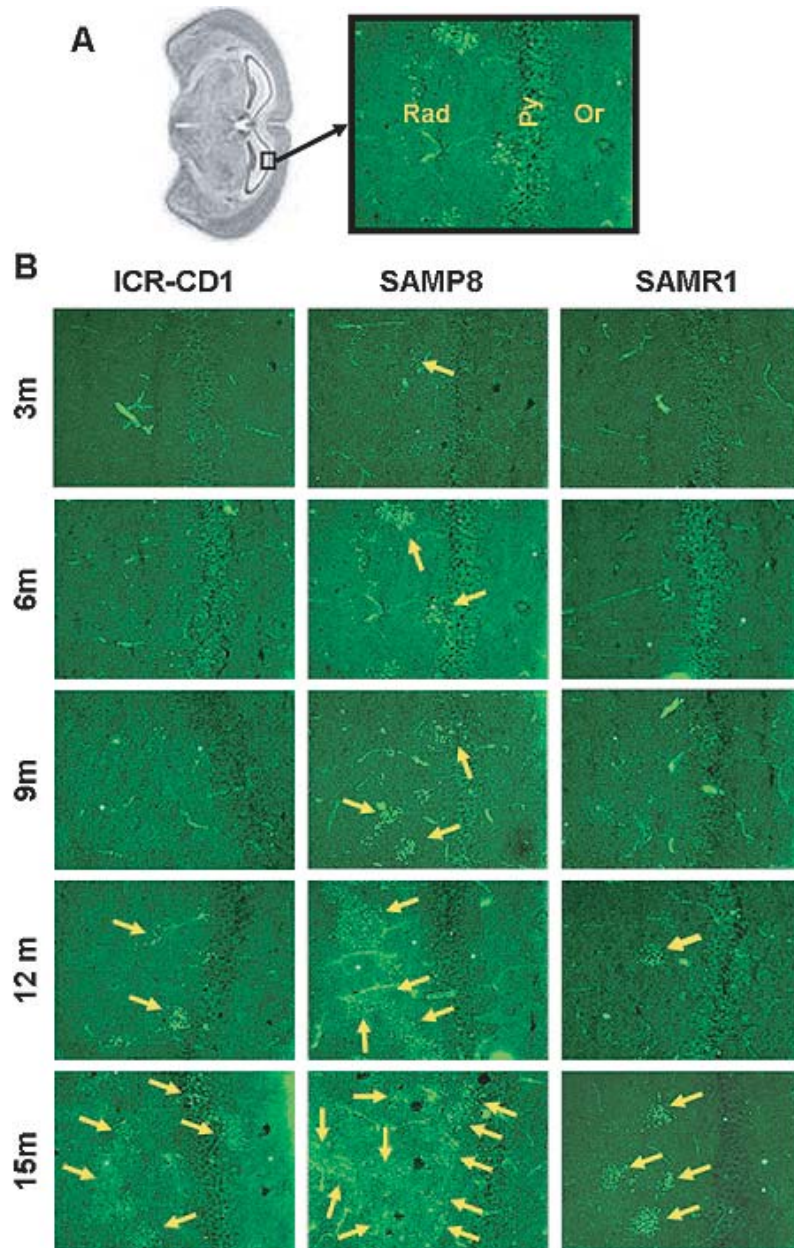


Fig. 2. A) Localization of the CA1 hippocampal regions shown in B. B) Representative images of CA1 hippocampal regions stained with the 4G8 antibody from brains of the different ages and strains. Arrows indicate some clusters of amyloid granules stained with 4G8. Rad: *stratum radiatum*, Py: *pyramidal layer*, Or: *oriens layer*.

It can also be observed in Fig. 2 that blood vessels were stained, probably due to the cross reactivity of 4G8 with  $A\beta$ PP present in the endothelial cells. Control staining with only the secondary antibody mainly stained the IgG in the circumventricular organs and choroid plexus, in which extravasated IgG is present due to the absence of blood-brain barrier (data not

shown).

*Distribution of amyloid clusters in the hippocampus of SAMP8 mice*

Figure 3 shows a coronal hippocampal section of three representative SAMP8 animals aged 3, 6, and 12



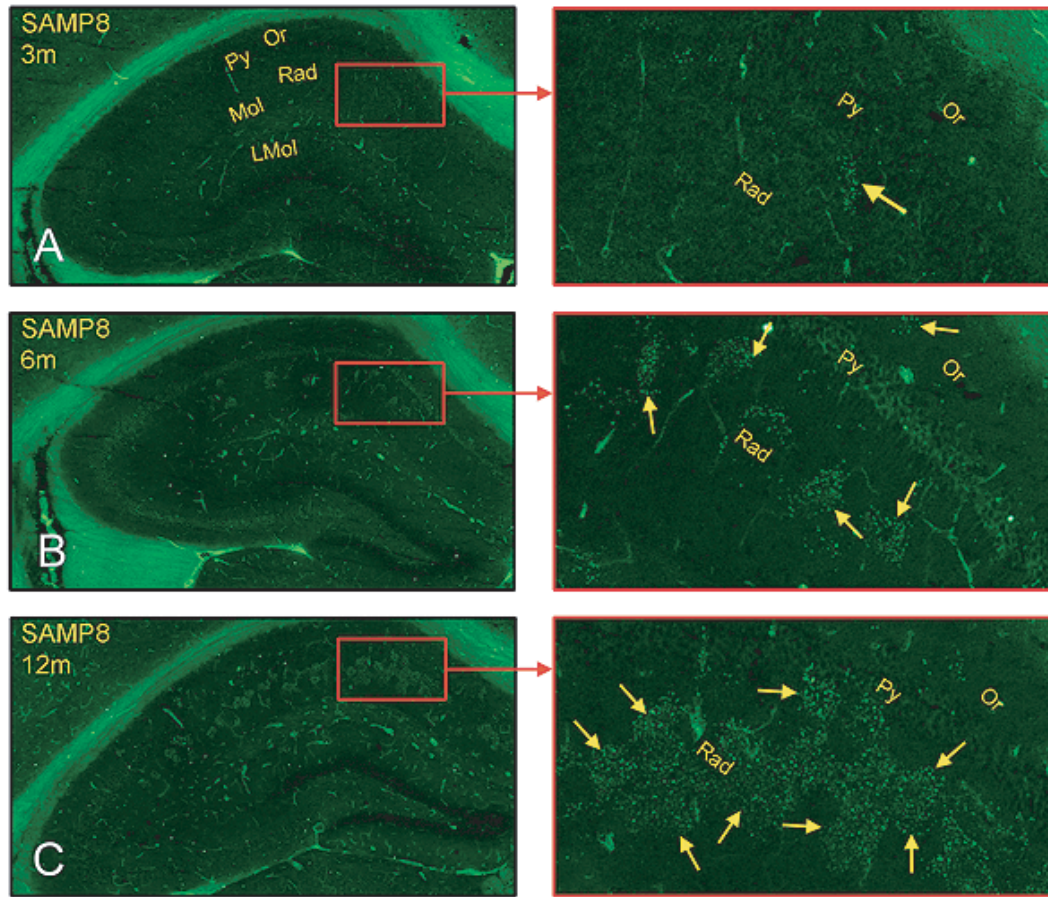


Fig. 3. Coronal hippocampal section stained with the 4G8 antibody of three representative SAMP8 animals aged 3, 6, and 12 months (A, B and C, respectively). Arrows indicate some clusters of amyloid granules stained with 4G8. Or: *oriens* layer, Py: *pyramidal* layer, Rad: *stratum radiatum*, LMol: *lacunosum moleculare* layer, Mol: *molecular* layer of the *dentate gyrus*.

months stained with 4G8. At 3 months of age (Fig. 3A), clusters in the hippocampus of SAMP8 animals were mainly located in the *stratum radiatum* of the CA1 region, with only a few appearing in the *lacunosum moleculare* and *oriens* layers of the same region. At more advanced ages (Fig. 3B-C), the number of clusters increased in those areas and cluster distribution extended to the CA2 and CA3 regions and could also be observed in the molecular layer of the *dentate gyrus*. It was unusual to find amyloid granules in the pyramidal cell layer of CA1, CA2, and CA3, or in the granular layer of the *dentate gyrus*, although some clusters partially occupied these areas in SAMP8 animals of 15 months of age.

#### *Time course of amyloid clusters in the different strains*

The time course of 4G8 stained clusters in the hippocampus of the different studied strains through the

different ages is represented in Fig. 4A. In SAMP8 animals, a progressive increase in the number of clusters in the hippocampus from 3 months onwards was observed. In the other two strains, the number of clusters appeared to be low and stable up to 15 months of age, when numbers increased although they did not reach the levels shown by SAMP8 mice.

Statistical analysis performed by ANOVA indicates that the factors "Strain" and "Age" are significantly correlated to the number of 4G8 clusters in the hippocampus ( $F_{2,45} = 178,12$ ;  $p < 0.01$  and  $F_{4,45} = 121,6$ ;  $p < 0.01$  respectively) and also that the Strain-Age interaction is significant ( $F_{8,45} = 49,08$ ;  $p < 0.01$ ). These results indicate that there are differences in the number of clusters due to both strain and age, but that aging affects the different strains in different ways. Post-hoc comparisons indicate that the SAMP8 strain showed significant increases every 3 months, with the exception of the comparison between 9 and 12 months

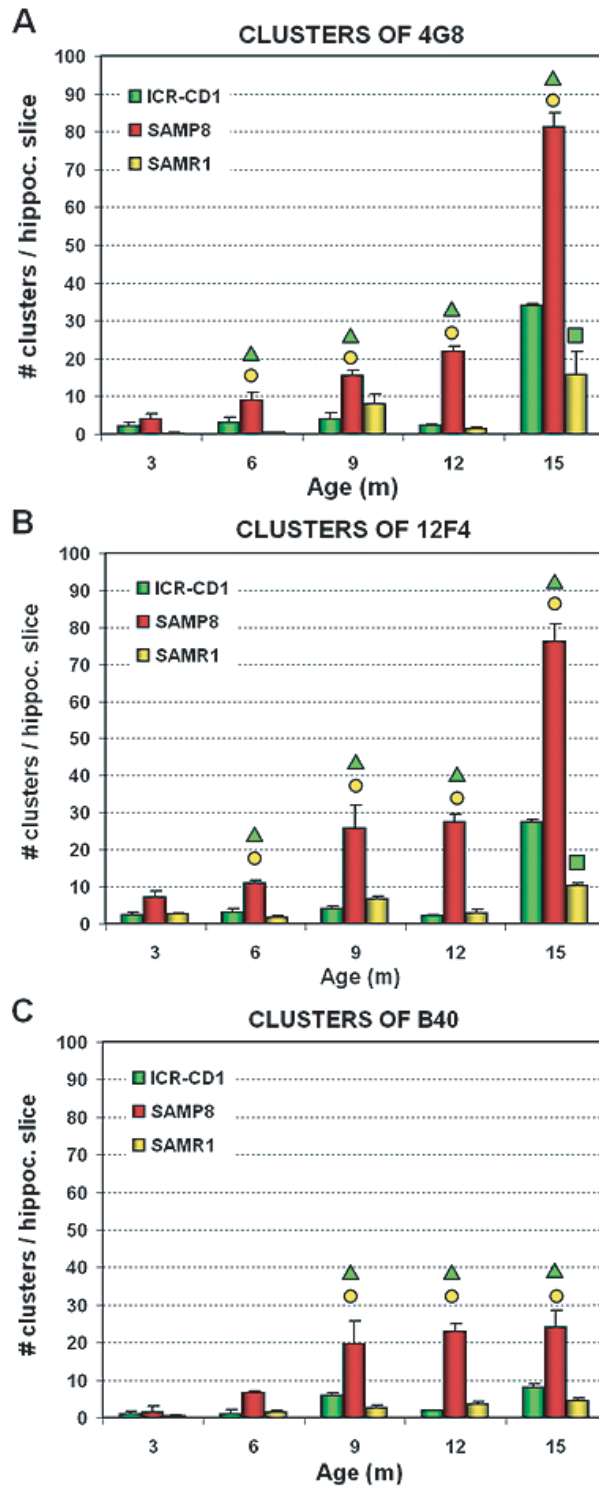


Fig. 4. Time-course of the amount of clusters in the hippocampal coronal sections of the different strains through the different ages stained with 4G8 (A), 12F4 (B), and B40 (C). Values are means  $\pm$  S.E.M.  $\Delta$  Significant differences between SAMP8 and ICR-CD1.  $\circ$  Significant differences between SAMP8 and SAMR1.  $\square$  Significant differences between SAMR1 and ICR-CD1. Statistical differences for factor age are detailed in the results section.

where although an increase in the amount of clusters did occur, this was not statistically significant. Within the SAMR1 and ICR-CD1 strains, only the 15 months groups showed a significantly higher number of clusters than the other age groups. Post-hoc comparisons between strains indicate that 6, 9, 12, and 15 months-old SAMP8 animals present significantly more amyloid clusters in their hippocampus than the other strains at the respective ages. No significant differences were found between SAMR1 and ICR-CD1 mice, except at 15 months, when ICR-CD1 presented significantly higher values than SAMR1.

To expand upon these analyses the 12F4 antibody, a specific antibody against  $A\beta_{42}$ , was used to carry out an immunohistochemical staining of the sections adjacent to those previously stained with 4G8. The results obtained from these stainings, which are summarized in Fig. 4B, corroborated previous findings for 4G8. Analyzing the data with the ANOVA, the Strain and Age factors had significant effects on the number of  $A\beta_{42}$  clusters in the hippocampus ( $F_{2,53} = 226,3$ ;  $p < 0.01$  and  $F_{4,53} = 101,52$ ;  $p < 0.01$  respectively) and the Strain-Age interaction was also significant ( $F_{8,53} = 34,91$ ;  $p < 0.01$ ). Post-hoc comparisons indicated that a progressive increase occurred in the number of  $A\beta_{42}$  clusters in SAMP8 mice from 6 months onwards. On the other hand, it was only at 15 months that ICR-CD1 and SAMR1 mice exhibited higher amyloid staining than younger animals of the same strain. In addition, the values at 15 months for ICR-CD1 mice were higher than those for SAMR1. Moreover, when comparing the number of clusters between strains at each age, the SAMP8 strain had more  $A\beta$  clusters than the other two strains, with the exception of the 3-month-old groups.

The analysis was also repeated on adjacent sections using the B40 specific antibody against  $A\beta_{40}$ . The results obtained from these stainings, which are summarized in Fig. 4C, indicate that the Strain and Age factors have significant effects on the number of  $A\beta_{40}$  clusters in the hippocampus ( $F_{2,52} = 33,47$ ;  $p < 0.01$  and  $F_{4,52} = 10,18$ ;  $p < 0,01$  respectively) and that the Strain-Age interaction was also significant ( $F_{8,52} = 3,97$ ;  $p < 0.01$ ). Post-hoc comparisons indicate that the number of  $A\beta_{40}$  clusters in SAMP8 mice were higher at 9, 12, and 15 months than at 3 or 6 months ( $p < 0.001$  in all cases), while no significant differences were found in ICR-CD1 or SAMR1 strains due to the Age factor. Moreover, comparison between strains of the number of clusters at each age showed that at 9, 12, and 15 months the SAMP8 strain have more amyloid clusters than the other two strains. No differences were found when comparing ICR-CD1 and SAMR1 at each age.

#### *Characterization of clustered amyloid granules in the hippocampus*

$A\beta$  deposition was characterized in SAMP8 animals. Brain sections were immunostained with specific antibodies, using different combinations of primary antibodies directed against different epitopes of  $A\beta$ PP or amyloid peptides (see methods section). Thereafter the sections were analyzed on confocal microscopy to determine the localization and colocalization of fluorescence.

Simultaneous staining of 4G8 and B40 antibodies, the latter being reactive only to the free C-terminal extreme of  $A\beta_{40}$ , was performed. It was observed that some granules stained with 4G8 were not stained with B40, whilst almost all the granules stained with B40 were also marked with 4G8 (Fig. 5A). This fact indicates that the granules may contain  $A\beta_{40}$  but there might be some other  $A\beta$  fragments forming these granules.

Double staining with antibodies 12F4 and B40, the former being reactive only to the free C-terminal extreme of  $A\beta_{42}$ , showed some granules stained by both antibodies. A representative image of a cluster stained with both B40 and 12F4 is shown in Fig. 5B. It could also be seen that there were 12F4 positive granules which were not stained with B40, whilst there were small granules reactive to B40 that were not reactive to 12F4. These results indicate a greater prevalence of  $A\beta_{42}$  in the granules than  $A\beta_{40}$ . Moreover, the data obtained from the confocal microscope were used to generate a three-dimensional reconstruction and to generate a movie presented as supplementary data where the higher prevalence of  $A\beta_{42}$  in the granules than  $A\beta_{40}$  can be observed.

We also used APPg to test the possibility of finding  $A\beta$ PP or  $A\beta$ PP fragments in the amyloid granules. APPg stains the  $A\beta$ PP protein but not amyloid peptides. The presence of some granules positive to 12F4 and APPg antibodies (Fig. 5C) indicated that some granules contained both  $A\beta_{42}$  and  $A\beta$ PP or  $A\beta$ PP fragments. However, the majority of granules were not APPg positive, indicating that the prevailing peptide in granules was  $A\beta_{42}$ . In addition, some granules were stained with APPg only, showing no reactivity to 12F4, indicating the presence of some  $A\beta_{42}$  free granules.

Finally, some sections were stained with APPg and 1G6 antibodies, the latter recognizing one epitope located outside but near the amyloid region of  $A\beta$ PP. Colocalization of both antibodies was observed in almost all reactive granules. However, some of them

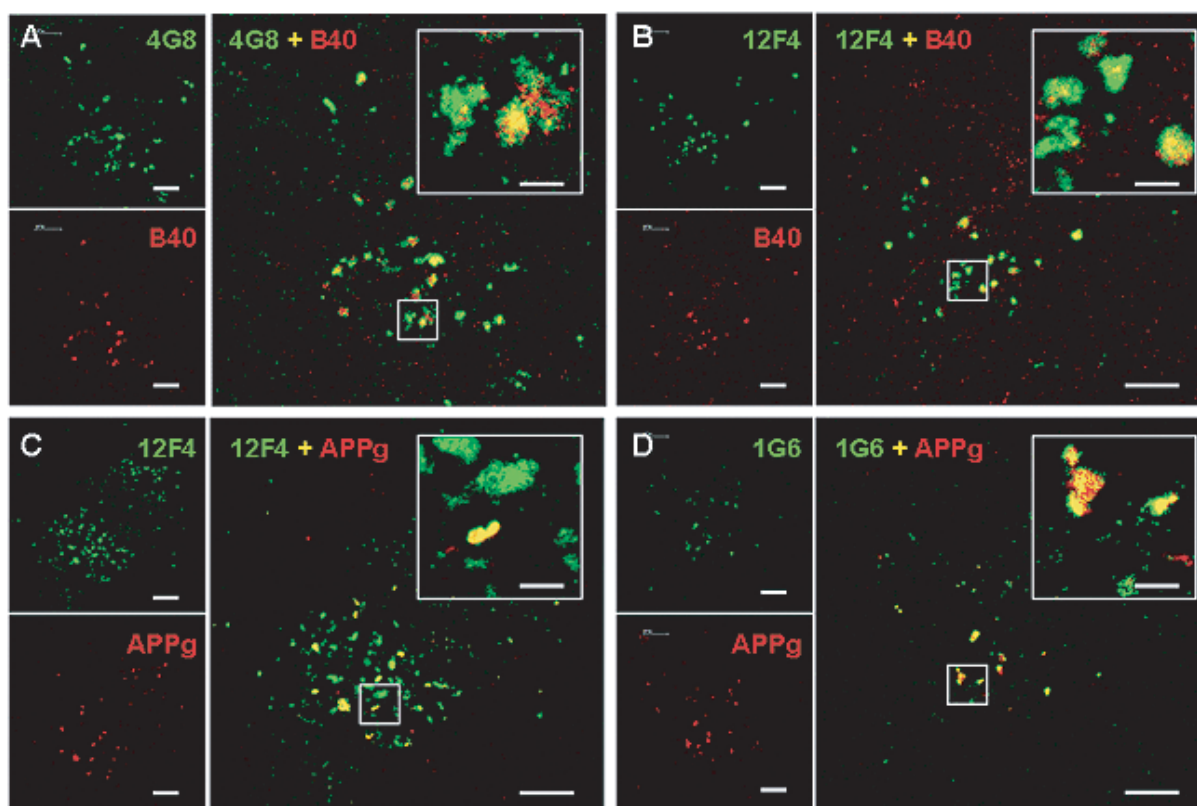


Fig. 5. Characterization of amyloid granules in the hippocampus. Representative images correspond to 6-month-old SAMP8 mice. A) Staining with 4G8 (green) and B40 (red). B) Staining with 12F4 (green) and B40 (red). C) Staining with 12F4 (green) and APPg (red). D) Staining with 1G6 (green) and APPg (red). Yellow color corresponds to the colocalization of green and red. Scale bar on insets: 2  $\mu\text{m}$ ; other scale bars: 10  $\mu\text{m}$ .

were reactive to only one or the other antibody, indicating the presence of a cleavage point in the center part of the sA $\beta$ PP $\beta$  and the presence in some granules of only one of the resulting fragments.

## DISCUSSION

Small amyloid deposits or oligomeric pre-amyloid aggregates are believed to be important in the pathogenesis of several common neurodegenerative disorders such as AD, due to their toxic effects on cells [43]. Several studies looking at A $\beta$  accumulation have been conducted in mice to gain a better understanding of AD, however, in most cases, these studies have used transgenic mice, which mimic early-onset AD [44]. Therefore, the need still exists for a reliable model of age-related AD, which constitutes nearly 90% of AD cases [45]. We describe here the time course of A $\beta$  accumulation in SAMP8 mice, a non-transgenic strain with accelerated senescence which is suitable as a model for

late-onset AD. To the best of our knowledge, this study is the first one to characterize the time course of A $\beta$  deposition in SAMP8 mice as well as in SAMR1 and ICR-CD1 animals, these latter being used as control strains with a normal aging process.

Our findings clearly show the presence of an age-dependent amyloid deposition in the hippocampus of SAMP8 mice. Staining with the anti-amyloid antibody 4G8 permitted observation of clustered amyloid granules, which were mainly located in the *stratum radiatum* of the hippocampus. In the course of aging, they extended to other hippocampal regions and their number increased. Moreover, the staining of brain slices with the specific A $\beta_{42}$  antibody 12F4 showed the same pattern as that obtained with 4G8. Therefore, these results have enabled us to conclude that the clustered amyloid granules seen in SAMP8 are essentially formed by A $\beta_{42}$ . In addition, our results also indicated some A $\beta_{40}$  deposition in the granules, which is in agreement with previous studies which reported that A $\beta$  plaques begin as diffuse plaques consisting mainly

of A $\beta$ <sub>42</sub> peptide and thereafter incorporate A $\beta$ <sub>40</sub> [46]. Of note, similar granules have been reported in A $\beta$ PP transgenic mice [47].

Early studies described A $\beta$ -protein-like immunoreactive granular structures which increased in number in the brains of SAMP8 mice as the mice aged [38]. However, there have been very few articles describing such A $\beta$  deposition in SAMP8 from 1993 onwards [37,40,48]. Surprisingly, the A $\beta$  deposition has been reported to appear at 2 months [38], but also at no earlier than 16 months [37]. Due to the variations in data reported up to now, in a recent review of the SAMP strain some authors claimed to have confirmed the presence of A $\beta$  deposition, and particularly of senile plaque-like structures, in SAMP8 mice [22].

Several other molecules are associated with A $\beta$  deposits, such as other amyloid fragments [49], ubiquitin and  $\alpha$ -synuclein [50], extracellular matrix proteins [51], and  $\alpha$ 1-antichymotrypsin [52]. Moreover, A $\beta$ PP has also been found either forming deposits in axonal [53] and neuronal damage [54] or associated with A $\beta$  assemblies [55]. In our study, we found some A $\beta$ PP presence in A $\beta$ <sub>42</sub> granules and also some different A $\beta$ PP fragments forming A $\beta$ <sub>42</sub>-free granules, although some previous studies performed in SAMP8 mice reported the absence of A $\beta$ PP [48]. Taken together, these results indicate a complex and variable organization of granular structures, with the predominance of A $\beta$ <sub>42</sub> peptide.

SAMP8 mice do indeed present hippocampal amyloid deposits which increase from 3 months of age to 15 months. Such distinguished amyloid deposition reveal the SAMP8 strain to be a very useful and accessible tool for researchers, enabling them to gain a better understanding of the relationship between amyloid accumulation and the different phenomena that occur within late-onset AD. SAMP8 mice have been used in several behavioral, neuropathological, and neurochemical studies as a model of AD and neurodegeneration [22,36]. The SAMP8 strain develops hippocampal cognitive deficits, learning, memory and emotional alterations, neurodegeneration, DNA damage, and oxidative stress. Other pathophysiological and neurochemical changes have been previously reported [56].

Amyloid  $\beta$  deposits in SAMP8 animals mainly appear in the *stratum radiatum* of the CA1 hippocampal region, where pyramidal CA1 neurons receive inputs principally from CA3 via Schaffer collaterals. Interestingly, CA1 neuron number has been found to relate to the severity of dementia [57,58] and to the Braak stage of the disease [59]. Moreover, a significant linear cor-

relation between CA1 neuron number and hippocampal volume has been found, indicating that hippocampal atrophy in AD occurs as a result of neuron loss [60]. It has been suggested that CA1 suffers a loss of functional synaptic contacts from the Schaffer collaterals rather than a loss of incoming Schaffer collaterals or a weakening of synapses [61]. The presence of amyloid granules observed in *stratum radiatum* of the CA1 in SAMP8 animals can be related to a neuronal dysfunction in this region, although this relationship needs to be studied further.

The present research also found some basal levels of amyloid accumulation from 3 to 12 months of age in the two control strains, with increased values at 15 months of age. This is consistent with the described deposition of fibrillar material in the brains of control mice, which occurred only occasionally in aged individuals [62]. However, despite the strong relationship found between AD and A $\beta$  accumulation, it has been reported that a significant number of individuals with no clinical diagnosis of AD have amyloid deposition at their death [63], and it is believed that approximately half of all people over 65 years old have some amyloid deposition in their brains, with half of these being asymptomatic [64]. Therefore, the levels of amyloid accumulation described here are not inconsistent with previously reported data, as SAMR1 and ICR-CD1 mice could be either healthy or diseased subjects within the ages studied.

Ultimately, we conclude that SAMP8 mice show a marked amyloid deposition from 6 months onwards compared with SAMR1 and ICR-CD1 control strains. The deposits are constituted by clustered granules essentially containing A $\beta$ <sub>42</sub> peptide but also A $\beta$ <sub>40</sub> and A $\beta$ PP fragments. The demonstration that SAMP8 mice present amyloid deposits in their hippocampus makes this animal model a useful tool to study neurodegeneration and to understand the mechanisms involved in the formation of A $\beta$  deposition in AD.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants BFU/2006-11981 and SAF/2006-13092 from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain); PI080400 and Centros de Investigación Biomédica en Red (CIBER) from the Instituto de Salud Carlos III; and 2005/SGR00893 from the Generalitat de Catalunya.

Authors' disclosures available online (<http://www.jalz.com/disclosures/view.php?id=196>).

## SUPPLEMENTARY VIDEO

Animation showing the three-dimensional reconstruction of an amyloid cluster. Original images were obtained by confocal microscopy from hippocampus of a 6-month old SAMP8 mouse animal. Green: staining with 12F4. Red: staining with B40. Colocalization can be observed in yellow. This video is available online at <http://www.j-alz.com/issues/19/vol19-4.html#supplementaryvideo>.

## REFERENCES

- [1] Alzheimer A (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine. Z Psychiatrie Psychisch-Gerichtliche Med* **64**, 146-148.
- [2] Smith MA (1998) Alzheimer disease. *Int Rev Neurobiol* **42**, 1-54.
- [3] Katzman R, Fox P (1999) The worldwide impact of dementia. Projections of prevalence and costs. In *Epidemiology of Alzheimer's disease: from gene to prevention*. Mayeux R, Christen Y, eds. Springer-Verlag, New York, pp. 1-17.
- [4] Avramopoulos D (2009) Genetics of Alzheimer's disease: recent advances. *Genome Med* **1**, 34.
- [5] Newman M, Musgrave FI, Lardelli M (2007) Alzheimer disease: amyloidogenesis, the presenilins and animal models. *Biochim Biophys Acta* **1772**, 285-297.
- [6] Bertram L, Tanzi RE (2008) Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. *Nat Rev Neurosci* **9**, 768-778.
- [7] Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, Mant R, Newton P, Rooke K, Roques P, Talbot C, Pericak-Vance M, Roses AD, Williamson R, Rossor M, Owen MJ, Hardy J (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* **349**, 704-706.
- [8] Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HAR, Haines JL, Pericak-Vance M, Tanzi R, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* **375**, 754-760.
- [9] Levy-Lahad E, Wijsman EM, Nemens E, Anderson L, Goddard KA, Weber JL, Bird TD, Schellenberg GD (1995) A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science* **269**, 970-973.
- [10] Gralle M, Ferreira ST (2007) Structure and functions of the human amyloid precursor protein: the whole is more than the sum of its parts. *Prog Neurobiol* **82**, 11-32.
- [11] Kang J, Muller-Hill B (1990) Differential splicing of Alzheimer's disease amyloid A4 precursor RNA in rat tissues: PreA4695 mRNA is predominantly produced in rat and human brain. *Biochem Biophys Res Commun* **166**, 1192-1200.
- [12] LaFerla FM, Green KN, Oddo S (2007) Intracellular amyloid- $\beta$  in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* **8**, 499-509.
- [13] Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT (1993) The carboxy terminus of the  $\beta$  amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* **32**, 4693-4697.
- [14] Haass C, Selkoe DJ (1993) Cellular processing of  $\beta$ -amyloid precursor protein and the genesis of amyloid  $\beta$ -peptide. *Cell* **75**, 1039-1042.
- [15] Selkoe DJ (1996) Cell biology of the  $\beta$ -amyloid precursor protein and the genetics of Alzheimer's disease. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **61**, 587-596.
- [16] Kojro E, Fahrenholz F (2005) The non-amyloidogenic pathway: structure and function of alpha-secretases. *Subcell Biochem* **38**, 105-127.
- [17] Götz J, Ittner LM (2008) Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurosci* **9**, 532-544.
- [18] Bryan KJ, Lee HG, Perry G, Smith MA, Casadesus G (2009) Transgenic mouse models of Alzheimer's disease: behavioral testing and considerations. In *Methods of Behavioral Analysis in Neuroscience*, Buccafusco JJ, ed. Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 1-18.
- [19] Tanzi RE, Bertram L (2005) Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* **120**, 545-555.
- [20] Hamamoto H, Honma A, Irino M, Matsushita T, Toda K, Matsumura M, Takeda T (1984) Grading score system: A method for evaluation of the degree of senescence in senescence accelerated mouse (SAM). *Mech Ageing Dev* **26**, 91-102.
- [21] Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K (1994) Senescence-accelerated mouse (SAM), a novel murine model of aging. In *The SAM model of senescence*, Takeda T, ed. Elsevier, Amsterdam, pp. 15-22.
- [22] Takeda T (2009) Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice. *Neurochem Res* **34**, 639-659.
- [23] Miyamoto M (1997) Characteristics of age-related behavioural changes in senescence-accelerated mouse SAMP8 and SAMP10. *Exp Gerontol* **32**, 139-148.
- [24] Yagi H, Irino M, Matsushita T, Katoh S, Umezawa M, Tsuboyama T, Hosokawa M, Akiguchi I, Tokunaga R, Takeda T (1989) Spontaneous spongy degeneration of the brain stem in SAM-P/8 mice, a newly developed memory-deficient strain. *J Neuropathol Exp Neurol* **48**, 577-590.
- [25] Kawamata T, Akiguchi I, Yagi H, Irino M, Sugiyama H, Akiyama H, Shimada A, Takemura M, Ueno M, Kitabayashi T, Ohnishi K, Seriu N, Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T (1997) Neuropathological studies on strains of senescence-accelerated mice (SAM) with age-related deficits in learning and memory. *Exp Gerontol* **32**, 161-170.
- [26] Nomura Y, Okuma Y (1999) Age-related defects in lifespan and learning ability in SAMP8 mice. *Neurobiol Aging* **20**, 111-115.
- [27] Spangler EL, Patel N, Speer D, Hyman M, Hengemihle J, Markowska A, Ingram DK (2002) Passive avoidance and complex maze learning in the senescence accelerated mouse (SAM): age and strain comparisons of SAM P8 and R1. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **57**, B61-B68.
- [28] Ueno M, Sakamoto H, Kanenishi K, Onodera M, Akiguchi I, Hosokawa M (2001) Ultrastructural and permeability features of microvessels in the hippocampus, cerebellum and pons of senescence-accelerated mice (SAM). *Neurobiol Aging* **22**, 469-478.
- [29] Pelegrí C, Canudas AM, del Valle J, Casadesús G, Smith MA, Camins A, Pallàs M, Vilaplana J (2007) Increased permeability

- of blood-brain barrier on the hippocampus of a murine model of senescence. *Mech Ageing Dev* **128**, 522-528.
- [30] Del Valle J, Duran-Vilaregut J, Manich G, Camins A, Pallàs M, Vilaplana J, Pelegrí C (2009) Time-course of blood-brain barrier disruption in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice. *Int J Dev Neurosci* **27**, 47-52.
- [31] Onozuka M, Watanabe K, Fujita M, Tomida M, Ozono S (2002) Changes in the septohippocampal cholinergic system following removal of molar teeth in the aged SAMP8 mouse. *Behav Brain Res* **133**, 197-204.
- [32] Flood JF, Farr SA, Uezu K, Morley JE (1998) Age-related changes in septal serotonergic, GABAergic and glutamatergic facilitation of retention in SAMP8 mice. *Mech Ageing Dev* **105**, 173-188.
- [33] Kondziella D, Bidar A, Urfjell B, Sletvold O, Sonnewald U (2002) The pentylentetrazole-kindling model of epilepsy in SAMP8 mice: behavior and metabolism. *Neurochem Int* **40**, 413-418.
- [34] Nomura Y, Kitamura Y, Ohnuki T, Arima Y, Yamanaka Y, Sasaki K, Oonuma Y (1997) Alterations in acetylcholine, NMDA, benzodiazepine receptors and protein kinase C in the brain of the senescence-accelerated mouse: an animal model useful for studies on cognitive enhances. *Behav Brain Res* **83**, 51-55.
- [35] Morley JE, Banks WA, Kumar VB, Farr SA (2004) The SAMP8 mouse as a model for Alzheimer disease: studies from Saint Louis University. *Int Congr Ser* **1260**, 23-28.
- [36] Pallàs M, Camins A, Smith MA, Perry G, Lee H, Casadesus G (2008) From aging to Alzheimer's disease: Unveiling "the switch" with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8). *J Alzheimers Dis* **15**, 615-624.
- [37] Morley JE, Kumar VB, Bernardo AE, Farr SA, Uezu K, Tumosa N, Flood JF (2000)  $\beta$ -Amyloid precursor polypeptide in SAMP8 mice affects learning and memory. *Peptides* **21**, 1761-1767.
- [38] Takemura M, Nakamura S, Akiguchi I, Ueno M, Oka N, Ishikawa S, Shimada A, Kimura J, Takeda T (1993)  $\beta$ /A4 proteinlike immunoreactive granular structures in the brain of senescence-accelerated mouse. *Am J Pathol* **142**, 1887-1897.
- [39] Tha KK, Okuma Y, Miyazaki H, Murayama T, Uehara T, Hatakeyama R, Hayashi Y, Nomura Y (2000) Changes in expressions of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 in the brain of senescence accelerated mouse. *Brain Res* **885**, 25-31.
- [40] Fukunari A, Kato A, Sakai Y, Yoshimoto T, Ishiura S, Suzuki K, Nakajima T (1994) Colocalization of prolyl endopeptidase and amyloid P-peptide in brains of senescence-accelerated mouse. *Neurosci Lett* **176**, 201-204.
- [41] Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S, Irino M, Higuchi K, Matsushita T, Tomita Y, Yasuhira K, Hamamoto H, Shimizu K, Ishii M, Yamamuro T (1981) A new murine model of accelerated senescence. *Mech Ageing Dev* **17**, 183-194.
- [42] Paxinos G, Franklin KBJ (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, London.
- [43] Westermarck P (2005) Aspects on human amyloid forms and their fibril polypeptides. *FEBS J* **272**, 5942-5949.
- [44] Codita A, Winblad B, Mohammed AH (2006) Of mice and men: more neurobiology in dementia. *Curr Opin Psychiatr* **19**, 555-563.
- [45] Morrisette D, Parachikova A, Green K, LaFerla F (2009) Relevance of transgenic mouse models to human Alzheimer disease. *J Biol Chem* **284**, 6033-6037.
- [46] Tahara K, Kim H, Jin J, Maxwell JA, Li L, Fukuchi K (2006) Role of toll-like receptor signaling in A $\beta$  uptake and clearance. *Brain* **129**, 3006-3019.
- [47] Siedlak SL, Casadesus G, Webber KM, Pappolla MA, Atwood CS, Smith MA, Perry G (2009) Chronic antioxidant therapy reduces oxidative stress in a mouse model of Alzheimer's disease. *Free Radic Res* **43**, 156-164.
- [48] Kato A, Fukunari A, Sakai Y, Nakajima T (1997) Prevention of amyloid-like deposition by a selective prolyl endopeptidase inhibitor, Y-29794, in senescence-accelerated mouse. *J Pharmacol Exp Ther* **283**, 328-335.
- [49] Güntert A, Döbeli H, Bohrmann B (2006) High sensitivity analysis of amyloid-beta peptide composition in amyloid deposits from human and PS2APP mouse brain. *Neuroscience* **143**, 461-475.
- [50] Yang F, Ueda K, Chen P, Ashe KH, Cole GM (2000) Plaque-associated a-synuclein (NACP) pathology in aged transgenic mice expressing amyloid precursor protein. *Brain Res* **853**, 381-383.
- [51] Van Duinen SG, Maat-Schieman MLC, Bruijn JA, Haan J, Roos RAC (1995) Cortical tissue of patients with hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (dutch) contains various extracellular matrix deposits. *Lab Invest* **73**, 183-189.
- [52] Abraham CR, Selkoe DJ, Potter H (1988) Immunohistochemical identification of the serine protease inhibitor  $\alpha$ 1-antichymotrypsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Cell* **52**, 487-501.
- [53] Bramlett HM, Kraydieh S, Green EJ, Dietrich WD (1997) Temporal and regional patterns of axonal damage following traumatic brain injury: A beta-amyloid precursor protein immunocytochemical study in rats. *J Neuropathol Exp Neurol* **56**, 1132-1141.
- [54] Justicia C, Ramos-Cabrer P, Hoehn M (2008) MRI detection of secondary damage after stroke: Chronic iron accumulation in the thalamus of the rat brain. *Stroke* **39**, 1541-1547.
- [55] Arai H, Lee V, Otvos Jr L, Greenberg B, Lowery D, Sharma SK, Schmidt ML, Trojanowski JQ (1990) Defined neurofilament, tau, and beta-amyloid precursor protein epitopes distinguish Alzheimer from non-Alzheimer senile plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 2249-2253.
- [56] Mattson MP (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* **430**, 631-639.
- [57] Bobinski M, Wegiel J, Wisniewski HM, Tarnawski M, Reusberg B, Mlodzik B, de Leon MJ, Miller DC (1995) Atrophy of hippocampal formation subdivisions correlates with stage and duration of Alzheimer disease. *Dementia* **6**, 205-210.
- [58] Bobinski M, Wegiel J, Tarnawski M, Bobinski M, Reusberg B, De Leon MJ, Miller DC, Wisniewski HM (1997) Relationships between regional neuronal loss and neurofibrillary changes in the hippocampal formation and duration and severity of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **56**, 414-420.
- [59] Rossler M, Zarski R, Bohl J, Ohm TG (2002) Stage-dependent and sector specific neuronal loss in hippocampus during Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **103**, 363-369.
- [60] Kril JJ, Hodges J, Halliday G (2004) Relationship between hippocampal volume and CA1 neuron loss in brains of humans with and without Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **361**, 9-12.
- [61] Rosenzweig ES, Barnes CA (2003) Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog Neurobiol* **69**, 143-179.
- [62] Jucker M, Ingram DK (1994) Age-related fibrillar material in mouse brain: Assessing its potential as a biomarker of aging and as a model of human neurodegenerative disease. *Ann N Y Acad Sci* **719**, 238-247.
- [63] Dickson DW, Crystal HA, Mattiace LA, Masur DM, Blau AD, Davies P, Yen S, Aronson S (1992) Identification of normal

- and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. *Neurobiol Aging* **13**, 179-189.
- [64] Aizenstein HJ, Nebes RD, Saxton JA, Price JC, Mathis CA, Tsopelas ND, Ziolkowski SK, James JA, Snitz BE, Houck PR, Bi W, Cohen AD, Lopresti BJ, DeKosky ST, Halligan EM, Klunk WE (2008) Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly. *Arch Neurol* **65**, 1509-1517.





## Article 5

### CEREBRAL AMYLOID ANGIOPATHY, BLOOD-BRAIN BARRIER DISRUPTION AND AMYLOID ACCUMULATION IN SAMP8 MICE

**Authors:** Jaume del Valle, Joaquim Duran-Vilaregut, Gemma Manich, Mercè Pallàs, Antoni Camins, Jordi Vilaplana, Carme Pelegrí

Pendent d'enviar



## RESUM

### Objectiu

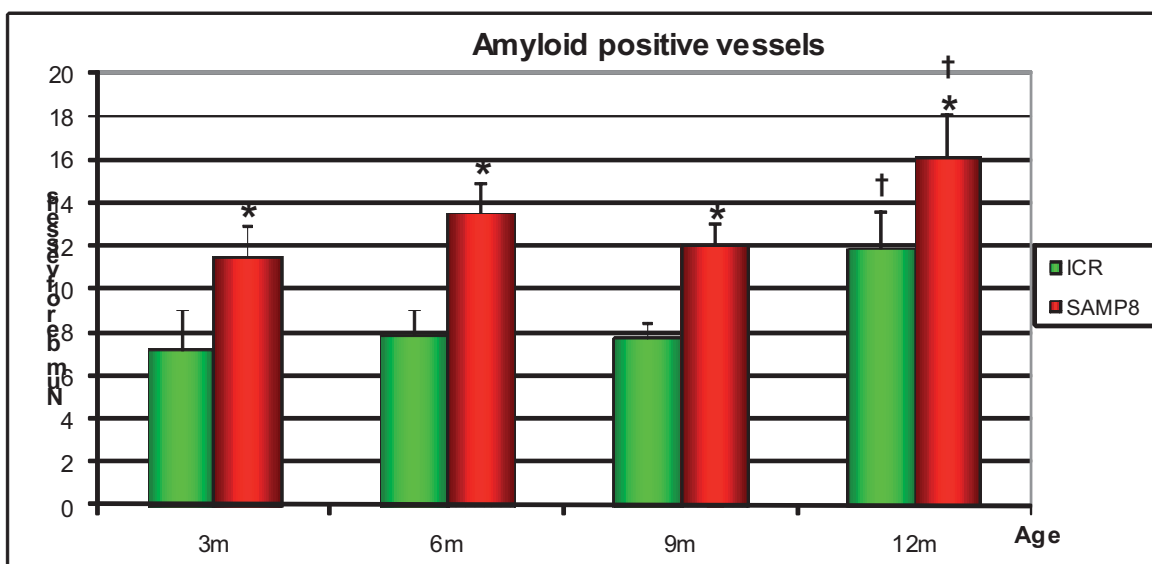
Caracteritzar l'evolució temporal de l'acumulació d'A $\beta$  a les parets dels vasos sanguinis i estudiar la relació espacial entre la disrupció de la BHE i l'augment d'A $\beta$  tant a vasos com en forma de clústers al parènquima en ratolins SAMP8.

### Material i mètodes

Es van utilitzar ratolins mascles SAMP8 i ICR-CD1 de 3, 6, 9 i 12 mesos d'edat. Els animals van ser perfosos intracardiàcament, es van extreure els cervells i es van obtenir seccions criostàtiques de 20 $\mu$ m de gruix. Es van dur a terme marcatges immunohistoquímics per caracteritzar a l'hipocamp els vasos sanguinis, els clústers d'A $\beta_{40}$  i l'acumulació d'IgG i d'A $\beta_{40}$  a les parets dels vasos sanguinis. Es van observar els marcatges al microscopi de fluorescència i es van quantificar els clústers d'A $\beta_{40}$ , el nombre de vasos positius per A $\beta_{40}$  com a mesura de CAA i els vasos IgG positius a la subzona CA1 de cada hipocamp.

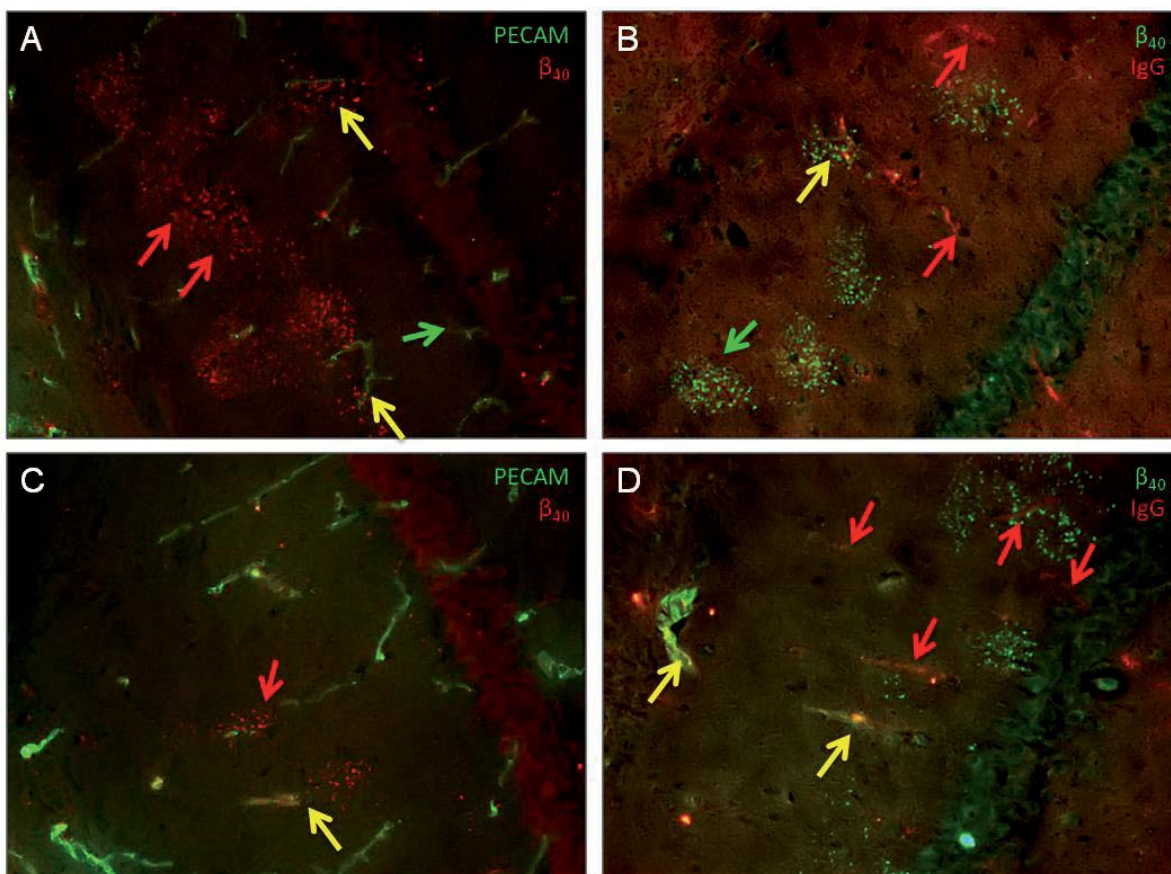
### Resultats

Els ratolins SAMP8 presenten més vasos amb marcatge amiloide que els ratolins ICR de la mateixa edat a la zona CA1 de l'hipocamp. A edats avançades, el nombre de vasos positius amiloides augmenta en ambdues soques (Fig. 19).



**Fig. 19 Evolució temporal del nombre de vasos positius amiloides als hipocamps de les soques ICR i SAMP8.** ICR (verd) i SAMP8 (vermell). Els valors mostren mitjanes  $\pm$  E.E.M. \* Diferències significatives entre SAMP8 i ICR-CD1. † Diferències significatives entre 12m i 3, 6 i 9m ( $p < 0.05$ ).

Tal i com ja havia estat descrit, els clústers d'A $\beta_{40}$  augmenten amb l'envelliment en ratolins SAMP8 però no en ratolins ICR-CD1. A més a més, i de manera similar al treball publicat al primer article, també s'observa un augment en el nombre de vasos IgG positius només als 12 mesos d'edat en ambdues soques. A més, els ratolins SAMP8 exhibeixen una tendència més alta a mostrar un nombre superior de vasos IgG positius ( $p=0,075$ ) en aquesta edat. D'altra banda, la localització dels clústers amiloïdes no mostra una relació espacial directa amb la localització dels vasos sanguinis (Fig. 20A), ni amb els vasos IgG positius (Fig. 20B) ni amb els vasos amb amiloïde (Fig. 20C). A més a més, als 12 mesos d'edat tots els vasos amb dipòsits d'A $\beta_{40}$  mostren alteracions de la BHE amb acumulació d'IgG a les seves parets, però diversos capil·lars IgG positius no mostren amiloïde a les seves parets (Fig. 20D).



**Fig. 20** Imatges de seccions cerebrals d'animals SAMP8 de 12 mesos d'edat marcats amb PECAM; B40 i IgG. (A): Clústers d'A $\beta_{40}$  (vermell) associats a vasos (verd), (fletxa groga); clústers sense proximitat de cap vas, (fletxa vermella); vasos sense clústers adjacents, (fletxa verda). B: Clústers d'A $\beta_{40}$  (verd) associats a vasos amb la BHE alterada (vermell), (fletxa groga); vasos amb la BHE alterada sense clústers adjacents, (fletxa vermella); clústers sense proximitat de vasos amb la BHE alterada, (fletxa verda). (C): Clústers d'A $\beta_{40}$  (vermell) associats a vasos amb amiloïdosi (groc), (fletxa groga); clústers associats a vasos sense amiloïdosi (verd), (fletxa vermella). (D): Vasos amb amiloïdosi i alteració de la BHE (groc), (fletxa groga); vasos amb la BHE alterada (vermell) sense amiloïdosi, (fletxa vermella).

## **Conclusions**

Tal i com s'esperava, els ratolins SAMP8 mostren un acusat augment del nombre de dipòsits amiloides a l'hipocamp. Els ratolins SAMP8 mostren nivells de CAA més elevats que els ratolins ICR-CD1. A més a més, la CAA i les alteracions de la BHE augmenten amb l'edat. Els clústers d'A $\beta$ <sub>40</sub> no estan directament associats amb la localització dels vasos sanguinis, dels vasos amb disrupció de la BHE o amb vasos positius amiloides. Als 12 mesos d'edat, tots els vasos amb agregats amiloides a les seves parets mostren alteracions de la BHE. Tanmateix, hi ha vasos amb acumulació d'IgG que no presenten amiloide a les seves parets.



**Title:** Cerebral amyloid angiopathy, blood-brain barrier disruption and amyloid accumulation in SAMP8 mice.

**Authors:** Jaume del Valle<sup>1,3</sup>, Joaquim Duran-Vilaregut<sup>1,3</sup>, Gemma Manich<sup>1</sup>, Mercè Pallàs<sup>2,3</sup>, Antoni Camins<sup>2,3</sup>, Jordi Vilaplana<sup>1,3\*</sup>, Carme Pelegrí<sup>1,3\*</sup>.

\* Contributed equally to this study

**Affiliations:** <sup>1</sup>Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n., 08028 Barcelona, Spain. <sup>2</sup>Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n., 08028 Barcelona, Spain. <sup>3</sup>CIBERNED Centros de Biomedicina en Red de Enfermedades Neurodegenerativas. Spain.

**Corresponding author:** Carme Pelegrí, Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Av. Joan XXIII s/n. 08028 Barcelona. Telephone: (+34) 93 4024505. Fax: (+34) 93 4035901. E-mail: [carmepelegri@ub.edu](mailto:carmepelegri@ub.edu)



## ABSTRACT

SAMP8 mice have recently been proposed as a model of Alzheimer's disease and an early amyloid deposition has been described in its hippocampus. The A $\beta$  peptide deposition within the walls of cerebral vessels and cerebrovascular dysfunction might be an early event in the mechanisms of AD. Here we studied the time-course levels of vascular amyloid deposition and blood-brain barrier (BBB) disruption in SAMP8 and ICR mice in the CA1 subzone of the hippocampus. In addition, we studied in SAMP8 mice the association between amyloid deposits and BBB disruption as well as the association between the amyloid clusters in the parenchyma and amyloid deposition in blood vessels. We report here that SAMP8 mice show more positive amyloid vessels than age-matched ICR mice and at 12 months of age this deposition increases in both strains. As expected, amyloid clusters increase with aging in SAMP8 mice but not in ICR mice. Moreover, an increase in the number of IgG positive vessels can be observed at 12 months of age in both strains, being the levels higher for SAMP8 than for ICR. On the other hand, amyloid cluster deposition shows no direct spatial association with the amyloid vessels and with the BBB disrupted vessels. What's more, at 12 months of age all the vessels with amyloid deposition showed BBB disruption with IgG deposition, but several capillaries with IgG deposition showed no amyloid within their walls. Thus, we describe here that SAMP8 show BBB alterations, an early amyloid deposition and an increased cerebral amyloid angiopathy. In addition, we have showed that amyloid aggregates are not directly associated with neither blood vessels, BBB disrupted vessels or amyloid vessels. Whether BBB disruption and amyloid pathology in this model of late onset AD are cause, consequence or epiphenomenon, needs further investigation.

## 1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) was first described as a rare case of dementia (Alzheimer, 1907). However, nowadays AD is the most common form of dementia and by the year 2050 it will affect more than a hundred million people worldwide.

Late-onset AD is the most common form of AD (more than 90%), appearing after 65 years of age (Kern and Behl, 2009), and although some genetic risk factors such as the ApoE  $\epsilon$ 4 allele have been described (Corder et al., 1993), susceptibility to late-onset AD shows no apparent familial aggregation (Bertram and Tanzi, 2008). On the other hand, mutations in the genes encoding the presenilins (PS) and amyloid precursor protein (APP) lead to early-onset familial AD in rare families with onset of disease occurring prior to age 65 (Williamson et al., 2009).

At the present time, most of the AD studied models are mice carrying one or more mutations in APP, tau or the PS (Götz and Ittner., 2008; Bryan et al., 2009). These mutations, which are fully penetrant, reproduce several pathophysiological aspects of AD and guarantee the onset of the disease, however, as they are replicating the familial early-onset AD, they account for less than 5% of all AD cases (Tanzi and Bertram, 2005). There also exist some non-transgenic AD models available such as chemically induced lesion models (Van Dam and Deyn, 2006) or the SAMP8 (senescence-accelerated mice prone 8) mice (Morley et al., 2004) that show an age-dependent progressive A $\beta$  deposition (del Valle et al., 2010) similar than the observed in late-onset AD.

SAMP8 mice show several indicative characteristics of aged humans such as reduced lifespan, lordosis, loss of hair and reduced physical activity (Hamamoto et al., 1984, Takeda et al., 1994). Notably, SAMP8 also show other characteristics seen in AD patients, such as learning and memory deficits (Nomura and Okuma, 1999; Spangler et al., 2002), brain microvessels defects (Ueno et al., 2001), alteration of the cholinergic system (Onozuka et al., 2002) and other neurotransmitter changes (Flood et al., 1998; Kondziella et al., 2002; Nomura et al., 1997). In addition, SAMP8 has recently been proposed as a neurodegeneration model (Takeda, 2009) due to spongy degeneration (Yagi et al., 1989), neuronal cell loss (Kawamata et al., 1997), and gliosis (Nomura and Okuma, 1999) in the brain.

Several scientific hypothesis have been published and revised trying to explain the pathogenesis of AD, among them one can find the cholinergic hypothesis (Bartus et al., 1982; Francis et al., 1999), the amyloid cascade hypothesis (Hardy and Higgins, 1992; Hardy 2006; Pimplikar, 2009), the tau and tangle hypothesis (Mudher and Lovestone, 2002), the oxidative stress hypothesis (Markesbery, 1997) or the two hit hypothesis (Zhu et al., 2004). In 1989, it was suggested that the possible importance of a failing blood brain barrier (BBB) and the vascular defects present in AD might be important in the development of the disease (Scheibel et al., 1989) and several years later the neurovascular hypothesis was proposed (Zlokovic, 2005). Briefly, this hypothesis claims that in AD, a defective clearance of amyloid  $\beta$  peptide ( $A\beta$ ) across the BBB, the senescence of the cerebrovascular system and an altered angiogenesis could lead to neurovascular uncoupling, vessel regression, brain hypoperfusion and neurovascular inflammation. These facts would lead to BBB disruption, to chemical imbalance in the neuronal environment and to synaptic and neuronal dysfunction, injury and loss (Zlokovic, 2005).

According to the neurovascular hypothesis, the SAMP8 mice should have disturbances in the BBB. Actually, several studies have been carried out to assess BBB integrity in SAMP8 mice. Some of them report no disturbances in BBB integrity (Banks et al., 2000; Moinuddin et al., 2000) while some others describe BBB disruption (Ueno et al., 1993; Hosokawa and Ueno 1999, Ueno et al., 2001; Nonaka et al., 2002, Pelegrí et al., 2007; del Valle et al., 2009). Although some contradiction could be seen in these results, it should be taken into account that the different studies have used different techniques, substances and dyes, and they have also targeted different molecules to assess BBB integrity, which would explain the differences in the results obtained.

BBB disruption, vascular dysfunction and the transport of  $A\beta$  across the BBB are key factors in the neurovascular hypothesis. According to this, decreased brain-to-blood or enhanced blood-to-brain transport of  $A\beta$  by the brain endothelial cells would lead to increased brain  $A\beta$  levels and thus contribute to AD. In fact, decreased clearance of  $A\beta$  across the BBB and by cells of the neurovascular unit may contribute to cerebral amyloid angiopathy (CAA) and parenchymal  $A\beta$  deposits (Bell and Zlokovic, 2009). In addition, the estimates of the prevalence of CAA from autopsy series are on the order of 10% to 40% in the general elderly population and approximately 80% in brains with accompanying AD (Greenberg et al., 2004).

CAA is defined as the A $\beta$  peptide deposition within the walls of the leptomeninges and parenchymal arteries, arterioles, and capillaries. It can produce degeneration of smooth muscle cells, ischemic white matter damage, fibrinoid necrosis, and dementia (Jellinger, 2007). Moreover, cerebrovascular dysfunction might be an early event in the mechanisms of AD (Iadecola, 2004) and it has been suggested that this dysfunction may precede cognitive decline and onset of neurodegenerative changes in AD and AD models (Bell and Zlokovic, 2009).

In this study, we measured the time-course levels of vascular amyloid deposition and BBB disruption in SAMP8 and ICR mice. In addition, we studied in SAMP8 mice the association between amyloid deposits and BBB disruption as well as the association between the amyloid clusters in the parenchyma and amyloid deposition in blood vessels.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Animals**

Three, 6, 9 and 12 month-old male SAMP8 and ICR-CD1 mice were studied. Six animals of each age and strand were used. They were kept in standard conditions of temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and 12:12-h light-dark cycles (300 lux/0 lux). Throughout the study, they had access to food and water *ad libitum*. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering. Studies were performed in accordance with the institutional guidelines for the care and use of laboratory animals established by the Ethical Committee for Animal Experimentation at the University of Barcelona.

### **2.2. Brain processing**

The animals were anaesthetized with 80 mg/Kg of sodium pentobarbital by an intraperitoneal injection. The thoracic cavity was opened and the animals received an intracardiac gravity-dependent perfusion of 50 mL of phosphate buffered saline (PBS, pH = 7.2). After the perfusion, brains were dissected, frozen by immersion in isopentane chilled in dry ice and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until sectioning. Thereafter, frozen brains were embedded in OCT cryostat-embedding compound (Tissue-Tek, Torrance, CA), cut into 20- $\mu\text{m}$ -thick sections on a cryostat (Leyca Microsystems, Germany) at  $-22^\circ\text{C}$ , and placed on slides. The hippocampus was located with the help of a mouse brain atlas between bregma -1.06 and -4.04 (Paxinos and Franklin, 2001), and sections of the central zone of the hippocampus (at about bregma -2.30) were selected. Slides containing brain sections were fixed with acetone for 10 min at  $4^\circ\text{C}$ , allowed to dry at room temperature and then frozen at  $-20^\circ\text{C}$  until staining.

### **2.3. Immunohistochemistry**

Slides were allowed to thaw at room temperature before being rehydrated with PBS for 5 min. Sections were then blocked and permeabilized with PBS containing 1% BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and 0.1% Triton-X-100 (Sigma-Aldrich) for 20 min. After two 5-min washes in PBS, brain sections were incubated with the primary antibody (see below) overnight in the dark at  $4^\circ\text{C}$ . After a new wash, slides were incubated for 1 h at room temperature in the dark with the secondary antibody (see below). Slides were washed again and nuclear staining was performed by incubation in Hoechst (H-33258, Fluka, Madrid, Spain) at 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS for 10 min at

room temperature in the dark. Finally, slides were washed and coverslipped with Prolong Gold antifade reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). Staining controls were performed by incubating with PBS instead of the primary antibody or both primary and secondary antibodies.

To characterize  $A\beta_{40}$  clusters and  $A\beta_{40}$  deposition in blood vessels, the rabbit polyclonal antibody to  $A\beta_{40}$  (ab10147, Abcam, Cambridge, UK), henceforth referred to as B40, was used diluted 1:50 in PBS containing 1% BSA (PBS-BSA); this antibody reacts only with the cleaved  $A\beta_{40}$  isoform and has no crossreactivity with  $A\beta_{42}$  nor with APP. Blood vessels were stained with the rat monoclonal anti-mouse PECAM-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), diluted 1:50 in PBS-BSA. AlexaFluor 546 goat anti-mouse IgG (Invitrogen Molecular Probes, Carlsbad, CA) diluted 1:250 in PBS-BSA was used to stain endogenous IgG. AlexaFluor 488 donkey anti-rat IgG, AlexaFluor 488 donkey anti-rabbit IgG and AlexaFluor 555 donkey anti-rabbit IgG (Invitrogen) were used as secondary antibodies.

Images were taken with a fluorescence laser microscope (BX41, Olympus, Germany) and stored in tiff format. All images for each set of experiments were acquired with the same microscope, laser and software settings. Image treatment and analysis were performed by means of the Image J program (National Institute of Health, USA).

#### **2.4. Quantification of amyloid accumulation and IgG deposition**

To quantify amyloid burden, three blinded observers analyzed the brain sections as previously described (del Valle et al., 2010). Briefly, a B40 or IgG stained brain section of each animal was observed with a laser microscope (BX41, Olympus, Germany). Each observer quantified the number of clusters in the CA1 hippocampal subzone of the brain. Similarly, each observer quantified the number of positive vessels for IgG and B40, confirming the endothelial nature of the staining with the help of PECAM staining in the CA1 hippocampal subzone. The mean number obtained by the three observers was used for statistical analysis.

## **2.5. Statistical analyses**

Statistical analyses were performed by means of the ANOVA, using STATISTICA for Windows (StatSoft Inc.). Differences were considered significant when  $p < 0.05$ . *Post hoc* comparisons were performed using the LSD test (planned comparisons).

### **3. Results**

#### **3.1. Microscopic visualization of amyloid, mouse IgG and PECAM staining in brain sections**

A microscopic inspection of immunostained brain sections with the PECAM, B40 and anti-mouse IgG antibodies was performed before proceeding with the image acquisition and the quantification of  $\beta_{40}$  amyloid clusters,  $\beta_{40}$  amyloid positive vessels and IgG positive vessels. An image of a representative hippocampus stained with B40 and anti-mouse IgG antibodies from each strain at 6 and 12 months of age can be seen in Figure 1.

Both SAMP8 and ICR strains present  $A\beta_{40}$  amyloid vessels at all ages and the number of these vessels seems to increase with age. In addition, SAMP8 mice give the impression to exhibit more amyloid vessels than ICR mice (Fig. 1). In addition, in SAMP8 mice some  $A\beta_{40}$  clusters start to appear at 3 months of age and become present in all the hippocampus at 6 months, they spread in number and extent at 9 months of age and at 12 months they can be seen throughout almost all the CA1 studied zones. On the other hand, some  $\beta_{40}$  amyloid clusters are rarely seen in ICR mice and no increase in the number of clusters seems to appear in this strain (Fig. 1).

A similar pattern of IgG positive vessels staining can be seen in the two strains. From 3 to 9 months of age very few IgG positive vessels appear and the 12-month-old animals show an increase of the positive IgG vessels although some more staining seems to appear in SAMP8 mice than in ICR mice (Fig. 1). In addition, some IgG staining can be seen around some ventricular areas, in which the presence of circumventricular organs without BBB is well known and around the choroid plexus and the hippocampal fissure where IgG staining is also expected.

#### **3.2. Time course of $A\beta_{40}$ amyloid deposition in blood vessels and in brain parenchyma**

Amyloid positive vessels appeared in the hippocampus of both strains at all ages after B40 staining. The ANOVA statistical analysis showed significant differences due to the Strain and Age factor. However, the interaction Strain-Age did not reach significance, suggesting that aging does not affect differently both strains. Post hoc comparisons show that SAMP8 mice exhibit higher levels of CA1 amyloid positive vessels than age-matched ICR mice ( $F_{1,56}=19,393$ ;  $p<0,01$ ). In addition, the comparisons between



different ages point that in both strains, old mice of 12 months show more amyloid vessels than younger, say 3 months, or adult ages from 6 to 9 months ( $F_{3,56}=3,646$ ;  $p<0,05$ ) (Fig. 2A).

In addition, brain  $\beta_{40}$  staining showed highly reactive extracellular amyloid granular structures up to  $3\mu\text{m}$  in size in the hippocampus of some animals. These granular structures appeared rarely isolated but almost always clustered. Neither the clusters nor the granules were found outside the hippocampus.

Statistical analysis performed by ANOVA indicates that the factors Strain and Age have significant effects on the number of B40 clusters in the hippocampus ( $F_{1,56}=114,803$ ;  $p<0,01$  and  $F_{1,56}=40,043$ ;  $p<0,01$  respectively) and also that the Strain-Age interaction is significant ( $F_{3,56}=38,142$ ;  $p<0,01$ ). In other words, both Strain and Age factors have an effect in the number of clusters and aging does not have the same effect on the two strains. Similar to previously described (del Valle et al., 2010), post-hoc comparisons using LSD test indicate that SAMP8 animals show a significant increase of  $A\beta_{40}$  amyloid clusters every 3 months with the exception of the comparison between 6 and 9 months where although an increase in the amount of clusters can be seen, it is not statistically significant. What's more, the ICR show no increase in the number of clusters during all the studied ages. Post-hoc comparisons between strains indicate that from 6 months onwards, SAMP8 animals present significantly more  $A\beta_{40}$  amyloid clusters in their CA1 than ICR at the respective ages (Fig. 2B).

### **3.3. Time course of IgG vessel deposition**

At 12 months of age, IgG positive vessels appeared in a regular pattern in both strains and very few IgG positive vessels were seen in the CA1 subzone of the hippocampus at 3, 6 and 9 months of age. The analysis of variance (ANOVA) of the number of IgG positive vessels revealed no significance to the Strain factor. On the other hand, the Age factor reached significance ( $F_{3,43}=11,129$ ;  $p<0,01$ ) showing that aging affects the IgG permeability in both strains. Post hoc comparisons showed higher IgG positive vessels at 12 months for the both strains than the other studied ages. Moreover, although the Strain-Age interaction did not reach significance ( $F_{3,43}=2,458$ ;  $p=0,075$ ), it did show a tendency where aging has a stronger effect in SAMP8 than in ICR mice. In this sense, at 12 months of age, old SAMP8 mice seem to have a more disrupted BBB with a higher number of IgG positive vessels than old ICR mice (Fig. 2C) although no significant levels are reached.

### **3.4 Colocalization studies**

In 12 months-old SAMP8 mice, several pictures were taken in order to find the spatial relationship between amyloid clusters and blood vessels; amyloid clusters and BBB disrupted vessels and with positive amyloid vessels. In addition, the colocalization of BBB disrupted vessels with the amyloid positive vessels was studied. In Figure 3A it can be seen that although there are some amyloid clusters adjacent to some vessels, there are also some other clusters with no vessel association. Similarly, amyloid clusters can be seen near BBB disrupted vessels but also both pathological features can be observed without any spatial association of the other (Fig. 3B). Moreover, the amyloid accumulation in vessels is not necessary to take place near the amyloid clusters as some amyloid vessels can be seen adjacent to the clusters and some other with no cluster proximity (Fig 3C). Finally, almost all amyloid vessels were found to colocalize with IgG staining but not all the IgG vessels showed  $\beta_{40}$  accumulation (Fig. 3D).

#### 4. Discussion

In this study, we have found a higher amount of A $\beta$ <sub>40</sub> positive vessels in the CA1 subzone of the hippocampus of SAMP8 than age-matched ICR mice. What's more, we describe that as early as at 3 months of age SAMP8 mice show higher levels of CAA than age-matched ICR mice.

The presence of CAA is not exclusive of AD patients as the prevalence of CAA in AD individuals and in the elderly population without AD is, respectively, >80% and 10–40%, (Attems et al., 2007; Greenberg et al., 2004) and the incidence of CAA in humans increases with age to almost 100% past the age of 80 (Dickstein et al., 2010). On the other hand, there has been a strong association between CAA and cognitive impairment in AD (Attems et al., 2007) and older age and vascular diseases are identified as significant risk factors for future mild cognitive impairment (MCI) (Luck et al., 2010).

The SAMP8 mouse has been described to mimic the behavioral and cognitive deficits observed in AD patients and other transgenic models (Pallàs et al., 2008). Our results indicate that not only SAMP8 mice show higher levels of CAA but also that both strains show an increase of CAA at 12 months of age compared to young and adult mice, indicating that aging increases the risk of CAA. Whether the different levels of CAA between SAMP8 and ICR are sufficient enough to meet the different performance in cognitive tests, and the role in cognitive functions that aging has with the increased CAA requires further investigation.

As in previous results from our group (del Valle et al., 2010), brain A $\beta$ <sub>40</sub> staining showed highly reactive extracellular amyloid granular structures up to 3 $\mu$ m in size in the hippocampus of some animals and no  $\beta$ <sub>40</sub> clusters increase can be seen in ICR mice from 3 to 12 month of age. However, the fact that there exists some vascular amyloid deposition, and taking into account that an increase in amyloid deposition has been described at 15 months of age (del Valle et al., 2010), leads us to say that from 12 months of age onwards ICR mice start to present some typical features of aging that are also present in pathological brains with AD but the degree of these alterations is not as high as that of SAMP8 mice. On the other hand, we can see that 12-months-old SAMP8 mice show an increase in the number of  $\beta$ <sub>40</sub> clusters than younger litters. Taking these results with the increased CAA levels and previous studies from our group, it can be deduced that in SAMP8 mice cerebral amyloid levels start to be

pathologically increased at six months of age but they are really high at the age of 12 months.

Taking into account that the origin of A $\beta$  in blood vessel walls is still poorly understood (Jellinger, 2007), and assuming that in SAMP8 mice a marked amyloid deposition do not appear until 6 months of age (del Valle et al., 2010), it would be interesting to investigate whether the amyloid vessel deposition can contribute to the onset and progression of AD in these mice or it is just a consequence of the increased A $\beta$  cerebral levels in SAMP8.

Several studies have tested the BBB status in SAMP8 mice. Although there is some controversy, most of them show BBB alterations (Ueno et al., 2001; Pelegrí et al., 2007; del Valle et al., 2009) at different ages. Here we also quantified the number of disrupted vessels with IgG accumulation and we saw that at 12 months of age, SAMP8 mice show a disrupted BBB. However, despite the fact that ICR mice also show some disruption of the BBB, it appears that the level of disruption is higher in SAMP8 mice although no significant levels have been reached. We believe that an increase in the number of the studied mice would give this significance. In addition, different ages of onset of BBB disruption have been reported to SAMP8 mice and, instead of contradictory results they would be complementary, as different methods have been used to assess the BBB integrity and the BBB is not a unique component but a complex structure formed by tight junctions, different transporters and enzymes of the brain endothelial cells and some pericytes, astrocyte end feet and neurons that altogether form the neurovascular unit with a role in the BBB integrity (Abbott et al., 2006).

It is important to consider that, again at 12 months of age, both strains show a disrupted BBB, another pathological feature that has been described in AD, but this disruption seems more severe in SAMP8 mice. In AD, aging is the principal risk factor, although it's neither necessary nor sufficient to develop the disease. In addition, aging is a significant risk factor in the effect of the A $\beta$  on endothelium-dependent function of cerebral and peripheral vessels (Price et al., 2004). In other words; although old ICR mice show some pathological features that can be associated with AD, it is normal as the animals are becoming old and ageing favors these alterations. On the other hand, SAMP8 mice show several very early AD-like pathological features that deteriorate with age and are aggravated by their accelerated ageing and an increased A $\beta$  deposition, making the SAMP8 mice a very useful tool to study late-onset Alzheimer's disease.

With regard to the localization of the amyloid clusters, amyloid vessels and IgG disrupted vessels, the results show that in SAMP8 mice some amyloid clusters are adjacent to some vessels but there are also some other clusters without close proximity to blood vessels, pointing that the amyloid deposition in clusters is not necessarily placed near to or related to blood vessels. Similarly, the comparison of the amyloid cluster deposition with the amyloid vessels and with the BBB disrupted vessels localization exhibited no direct association between these features. Although some authors have suggested that amyloid deposits accumulate near and around cerebral capillaries (Vinters et al., 1994; Kumar-Singh et al., 2005), our results are in consonance with some other authors, who claim that capillaries play only a limited direct role, if any, in amyloid plaque formation, and that the apparent association of amyloid plaques and capillaries is no more than a chance contact (Kawai et al., 1990) and with those who claim that amyloid deposition blood vessel walls may not be instrumental in the formation of senile plaques (Lippa et al., 1993).

Finally, the neurovascular unit and the BBB are severely affected by CAA (Bell and Zlokovic, 2009) and a disrupted BBB can favor the amyloid accumulation in blood vessels (Zlokovic 2005). In fact, it has been described that A $\beta$  fibrils can increase the permeability of endothelial cells and induce stress fiber formation, disruption and aggregation of actin filaments and cellular gap formation (Nagababu et al., 2009). Moreover, A $\beta$  has been demonstrated to produce proinflammatory, proapoptotic and proangiogenic responses in the endothelial cells that make up the BBB (Dickstein et al., 2006). Here, we found that all the vessels with amyloid deposition showed BBB disruption with IgG deposition. Nevertheless, we also found several capillaries with IgG deposition and no amyloid accumulation within their walls. This fact could be explained because at 12 months of age there is a marked increase in the number of IgG positive vessels and we have not analyzed all the amyloid fragments that can be deposited in the vessel walls. Another possible explanation could be because the A $\beta$  toxicity produced by soluble oligomers and the amyloid vessel deposition process takes place after the disruption of the BBB in the vessel. It could also be possible that while A $\beta$  deposition disrupts the BBB, there may be another silent mechanism that produces BBB alterations with no direct association with the amyloid aggregates.

## 5. Bibliography

- Abbott NJ, Rönnebeck L, Hansson E. 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 7, 41-53.
- Alzheimer A. 1907. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine. Z. Psychiatrie Psychisch-Gerichtliche Med.* 64, 146-148.
- Attems J, Quass M, Jellinger KA, Lintner F. 2007. Topographical distribution of cerebral amyloid angiopathy and its effect on cognitive decline are influenced by Alzheimer disease pathology. *J Neurol Sci.* 257, 49-55.
- Banks WA, Farr SA, Morley JE., 2000. Permeability of the blood-brain barrier to albumin and insulin in the young and aged SAMP8 mouse. *J. Gerontol.* 55A, B601-B606.
- Bartus RT, Dean RL 3rd, Beer B, Lippa AS. 1982. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science.* 217(4558), 408-14.
- Bell RD, Zlokovic BV. 2009. Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 118(1), 103-13.
- Bertram L, Tanzi RE. 2008. Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 768-778.
- Bryan KJ, Lee HG, Perry G, Smith MA, Casadesus G. 2009. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease: behavioral testing and considerations. In *Methods of Behavioral Analysis in Neuroscience*, 2nd edition, Buccafusco, J.J. (Ed.). Taylor & Francis Group, Boca Raton, 1-18.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science.* 26, 921-923.
- Del Valle J, Duran-Vilaregut J, Manich G, Camins A, Pallàs M, Vilaplana J, Pelegrí C. 2009. Time-course of blood-brain barrier disruption in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice. *Int J Dev Neurosci* 27, 47-52.
- Del Valle J, Duran-Vilaregut J, Manich G, Casadesús G, Smith MA, Camins A, Pallàs M, Pelegrí C, Vilaplana J. 2010. Early amyloid accumulation in the hippocampus of SAMP8 mice. *J Alzheimers Dis.* 2010 Jan;19(4):1303-15.
- Dickstein DL, Walsh J, Brautigam H, Stockton SD Jr, Gandy S, Hof PR. 2010. Role of vascular risk factors and vascular dysfunction in Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med.* 77(1), 82-102.
- Dickstein DL, Walsh J, Brautigam H, Stockton SD Jr, Gandy S, Hof PR. 2010. Role of vascular risk factors and vascular dysfunction in Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med.* 2010 Jan;77(1):82-102.
- Flood JF, Farr SA, Uezu K, Morley JE. 1998. Age-related changes in septal serotonergic, GABAergic and glutamatergic facilitation of retention in SAMP8 mice. *Mech Ageing Dev.* 105, 173-88.

- Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK. 1999. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 66(2), 137-47.
- Götz J, Ittner LM. 2008. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurosci*. 9, 532-544.
- Greenberg SM, Gurol ME, Rosand J, Smith EE. 2004. Amyloid angiopathy-related vascular cognitive impairment. *Stroke*. 35, 2616–2619.
- Hamamoto H, Honma A, Irino M, Matsushita T, Toda K, Matsumura M, Takeda T. 1984. Grading score system: a method for evaluation of the degree of senescence in senescence accelerated mouse (SAM). *Mech. Ageing Dev*. 26, 91-102.
- Hardy J. 2006. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis: an update and reappraisal. *J Alzheimers Dis*. 9(3 Suppl), 151-3.
- Hardy JA, Higgins GA. 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. 256(5054), 184-5.
- Hosokawa M, Ueno M. 1999. Aging of blood-brain barrier and neuronal cells of eye and ear in SAM mice. *Neurobiol Aging*. 20, 117-123.
- Iadecola C. 2004. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*. 5(5), 347-60.
- Jellinger KA. 2007. The enigma of vascular cognitive disorder and vascular dementia. *Acta Neuropathol*. 113(4), 349-88.
- Kawai M, Kalara RN, Harik SI, Perry G. 1990. The relationship of amyloid plaques to cerebral capillaries in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 137, 1435-46.
- Kawamata T, Nakamura S, Akiguchi I. 1994. Dystrophic changes in axon accumulating nitric oxide synthase are accelerated with age in dorsal colime nuclei of senescence-accelerated mice (SAMP8). In: Takeda T et al (eds) *The SAM model of senescence*. Elsevier Sciences BV, Amsterdam, pp 347-350.
- Kern A, Behl C. 2009. The unsolved relationship of brain aging and late-onset Alzheimer disease. *Biochim Biophys Acta*. 1790(10), 1124-32.
- Kondziella D, Bidar A, Urfjell B, Sletvold O, Sonnewald U. 2002. The pentylene-tetrazole-kindling model of epilepsy in SAMP8 mice: behavior and metabolism. *Neurochem. Int*. 40, 413–418.
- Kumar-Singh S, Pirici D, McGowan E, Serneels S, Ceuterick C, Hardy J, Duff K, Dickson D, Van Broeckhoven C. 2005. Dense-core plaques in Tg2576 and PSAPP mouse models of Alzheimer's disease are centered on vessel walls. *Am J Pathol*. 167, 527-43.
- Lippa CF, Hamos JE, Smith TW, Pulaski-Salo D, Drachman DA. 1993. Vascular amyloid deposition in Alzheimer's disease. Neither necessary nor sufficient for the local formation of plaques or tangles. *Arch Neurol*. 50, 1088-92.
- Luck T, Riedel-Heller SG, Lippa M, Wiese B, Wollny A, Wagner M, Bickel H, Weyerer S, Pentzek M, Haller F, Moesch E, Werle J, Eisele M, Maier W, van den Bussche H, Kaduszkiewicz H; AgeCoDe Study Group. 2010. Risk factors for incident mild cognitive

- impairment--results from the German Study on Ageing, Cognition and Dementia in Primary Care Patients (AgeCoDe). *Acta Psychiatr Scand.* 121, 260-72.
- Markesbery WR. 1997. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 23(1), 134-47.
  - Moinuddin A, Morley JE, Banks WA. 2000. Regional Variations in the Transport of Interleukin-1 across the Blood-Brain Barrier in ICR and Aging SAMP8 Mice. *Neuroimmunomodulation.* 8, 165-70.
  - Morley JE, Banks WA, Kumar VB, Farr SA. 2004. The SAMP8 mouse as a model for Alzheimer disease: studies from Saint Louis University. *International Congress Series.* 1260, 23-28.
  - Mudher A, Lovestone S. 2002. Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands? *Trends Neurosci.* 25(1), 22-6.
  - Mudher A, Lovestone S. 2002. Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands? *Trends Neurosci.* 25, 22-26.
  - Nagababu E, Usatyuk PV, Enika D, Natarajan V, Rifkind JM. 2009. Vascular endothelial barrier dysfunction mediated by amyloid-beta proteins. *J Alzheimers Dis.* 17(4), 845-54.
  - Nomura Y, Kitamura Y, Ohnuki T, Arima Y, Yamanaka Y, Sasaki K, Oonuma Y. 1997. Alterations in acetylcholine, NMDA, benzodiazepine receptors and protein kinase C in the brain of the senescence-accelerated mouse: an animal model useful for studies on cognitive enhances. *Behav. Brain Res.* 83, 51-55.
  - Nomura Y, Okuma Y. 1999. Age-related defects in lifespan and learning ability in SAMP8 mice. *Neurobiol. Aging* 20, 111-115.
  - Nonaka N, Banks WA, Mizushima H, Shioda S, Morley JE. 2002. Regional differences in PACAP transport across the blood-brain barrier in mice: a possible influence of strain, amyloid beta protein, and age. *Peptides.* 23(12), 2197-202.
  - Onozuka M, Watanabe K, Fujita M, Tomida M, Ozono S. 2002. Changes in the septohippocampal cholinergic system following removal of molar teeth in the aged SAMP8 mouse. *Behav. Brain Res.* 133, 197-204.
  - Pallas M, Camins A, Smith MA, Perry G, Lee HG, Casadesus G. 2008. From aging to Alzheimer's disease: unveiling "the switch" with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8). *J Alzheimers Dis.* 15(4), 615-24.
  - Pelegrí C, Canudas AM, del Valle J, Casadesús G, Smith MA, Camins A, Pallàs M, Vilaplana J. 2007. Increased permeability of blood-brain barrier on the hippocampus of a murine model of senescence. *Mech. Ageing Dev.* 128, 522-528.
  - Pimplikar SW. 2009. Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 41(6), 1261-8.
  - Price JM, Hellermann A, Hellermann G, Sutton ET. 2004. Aging enhances vascular dysfunction induced by the Alzheimer's peptide beta-amyloid. *Neurol Res.* 26, 305-11.
  - Scheibel AB, Duong TH, Jacobs R. 1989. Alzheimer's disease as a capillary dementia. *Ann Med.* 21(2), 103-7.



- Spangler EL, Patel N, Speer D, Hyman M, Hengemihle J, Markowska A, Ingram DK. 2002. Passive avoidance and complex maze learning in the senescence accelerated mouse (SAM): age and strain comparisons of SAM P8 and R1. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 57, B61–B68.
- Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K, Hosono M, Akiguchi I, Katoh H. 1994. A novel murine model of aging, Senescence-Accelerated Mouse (SAM). *Arch Gerontol Geriatr.* 19, 185-92.
- Takeda T. 2009. Senescence-Accelerated Mouse (SAM) with Special References to Neurodegeneration Models, SAMP8 and SAMP10 Mice. *Neurochemical Research.* 34, 639-59.
- Tanzi RE, Bertram L. 2005. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell.* 120, 545-555.
- Ueno M, Akiguchi I, Hosokawa M, Shinnou M, Sakamoto H, Takemura M, Keiichi Higuchi K. 2001. Age-related changes in the brain transfer of blood-borne horseradish peroxidase in the hippocampus of senescence-accelerated mouse. *Acta Neuropathologica.* 93, 233-240.
- Ueno M, Akiguchi I, Yagi H, Naiki H, Fujibayashi Y, Kimura J, Takeda T. 1993. Age-related changes in barrier function in mouse brain. I. Accelerated age-related increase of brain transfer of serum albumin in accelerated senescence prone SAM-P/8 mice with deficits in learning and memory. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 16, 233-248.
- Van Dam D, De Deyn PP. 2006. Drug discovery in dementia: the role of rodent models. *Nat Rev Drug Discov.* 5(11), 956-70.
- Vinters HV, Secor DL, Read SL, Frazee JG, Tomiyasu U, Stanley TM, Ferreiro JA, Akers MA. 1994. Microvasculature in brain biopsy specimens from patients with Alzheimer's disease: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Ultrastruct Pathol.* 18, 333-348.
- Williamson J, Goldman J, Marder KS. 2009. Genetic aspects of Alzheimer disease. *Neurologist.* 15(2), 80-6.
- Yagi H, Irino M, Matsushita T, Katoh S, Umezawa M, Tsuboyama T, Hosokawa M, Akiguchi I, Tokunaga R, Takeda T. 1989. Spontaneous spongy degeneration of the brain stem in SAM-P/8 mice, a newly developed memory-deficient strain. *J Neuropathol Exp Neurol.* 48, 577-90.
- Zhu X, Raina AK, Perry G, Smith MA. 2004. Alzheimer's disease: the two-hit hypothesis. *Lancet Neurol.* 3(4), 219-26.
- Zlokovic BV. 2005. Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 28(4), 202-8.

## Figure legends

**Figure 1** Representative images of CA1 hippocampal regions stained with the B40 (A-D) and the anti-IgG antibodies (E-H) and Hoechst (I-L). In A-D, arrows indicate some clusters of  $A\beta_{40}$  granules and arrowheads indicate some amyloid vessels. In E-H arrowheads indicate some IgG positive vessels. Rad: stratum radiatum, Py: pyramidal layer, Or: oriens layer.

**Figure 2** Time course of  $A\beta_{40}$  amyloid deposition in blood vessels (A),  $A\beta_{40}$  amyloid clusters (B) and IgG vessel deposition (C) in the CA1 hippocampal region. Values are means  $\pm$  S.E.M. Statistical differences due to the factors strain and age are detailed in the results section.

**Figure 3** Characterization of spatial relationship in the hippocampus between blood vessels (green) and  $A\beta_{40}$  clusters (red) (A);  $A\beta_{40}$  clusters (green) and IgG positive vessels (red) (B); vessels (green),  $A\beta_{40}$  clusters (red) and amyloid vessels (yellow) (C) and amyloid vessels (green) and IgG positive vessels (red) (D). **A:** red arrows indicate some  $A\beta_{40}$  clusters with no spatial relationship to blood vessels, green arrows show some isolated vessels and yellow arrows indicate some  $A\beta_{40}$  clusters adjacent to blood vessels. **B:** red arrows indicate some IgG positive vessels with no spatial relationship to  $A\beta_{40}$  clusters, green arrows show some isolated  $A\beta_{40}$  clusters and yellow arrows indicate some  $A\beta_{40}$  clusters adjacent to IgG positive vessels. **C:** red arrows indicate some  $A\beta_{40}$  clusters adjacent to blood vessels with no vascular amyloid deposition and yellow arrows indicate some  $A\beta_{40}$  clusters adjacent to amyloid positive vessels. **D:** yellow arrows indicate colocalization of IgG positive vessels and vessels with amyloid deposition within their walls, red arrows some IgG positive vessels with no amyloid deposition.

Figure 1

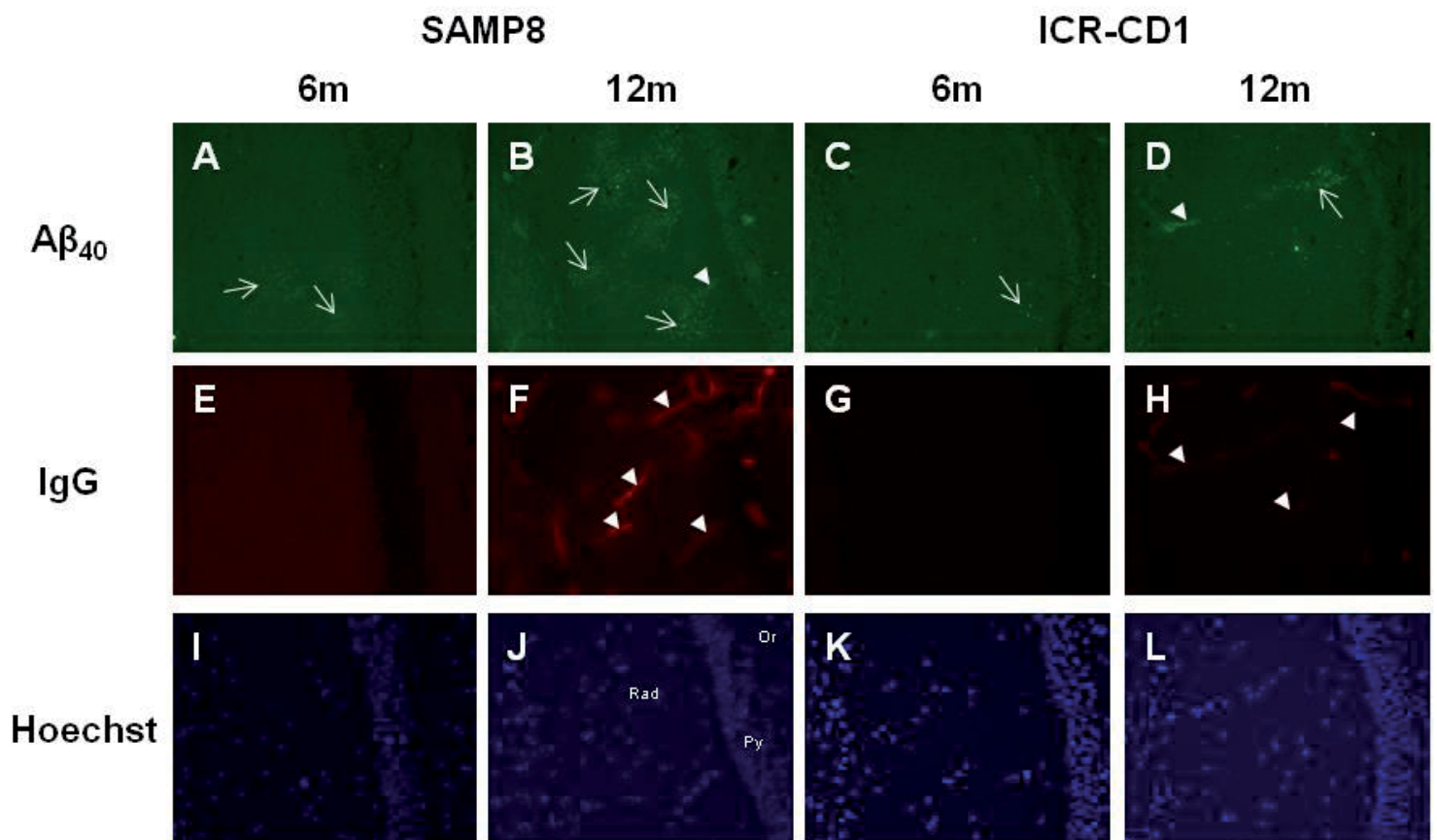


Figure 2

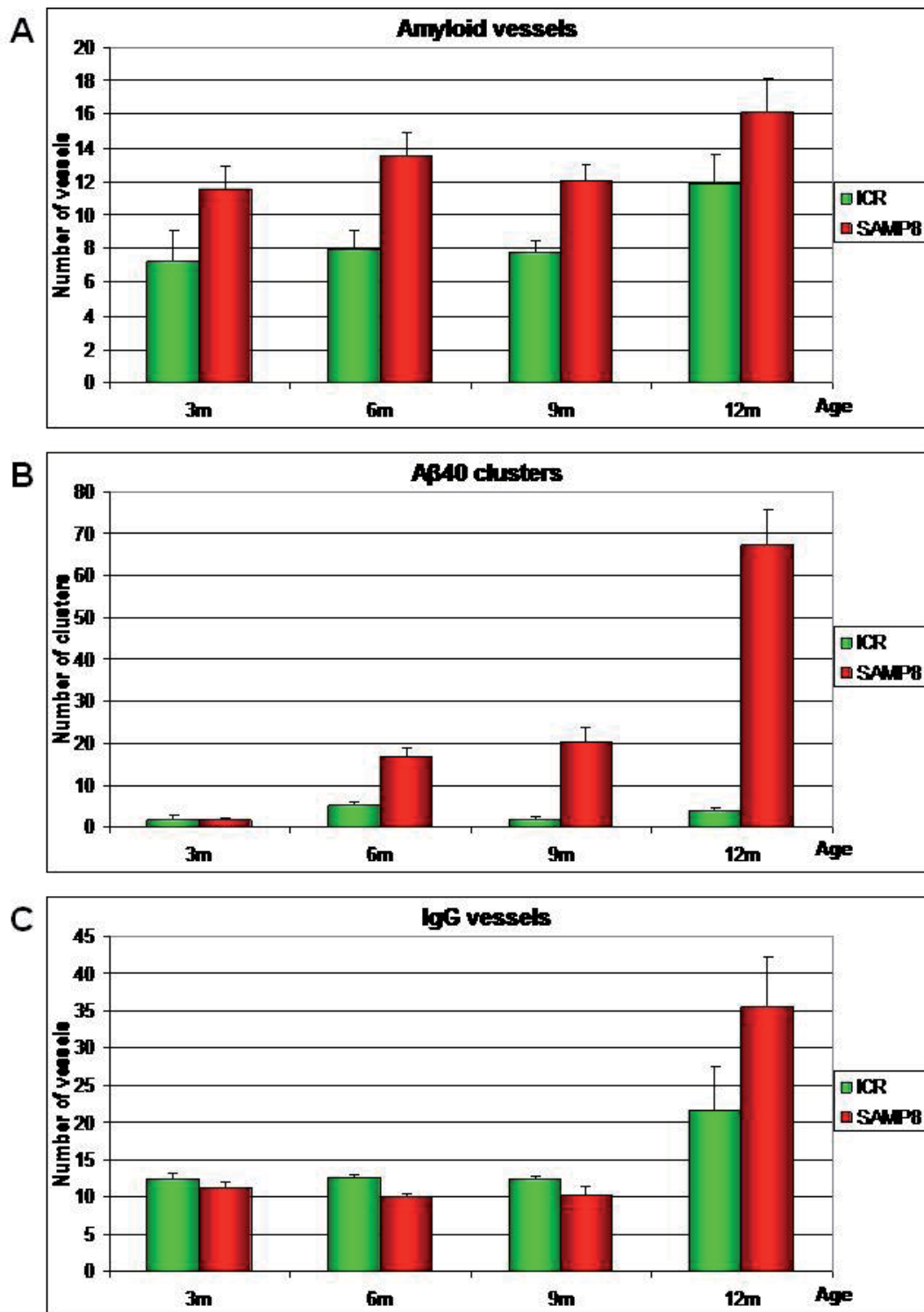
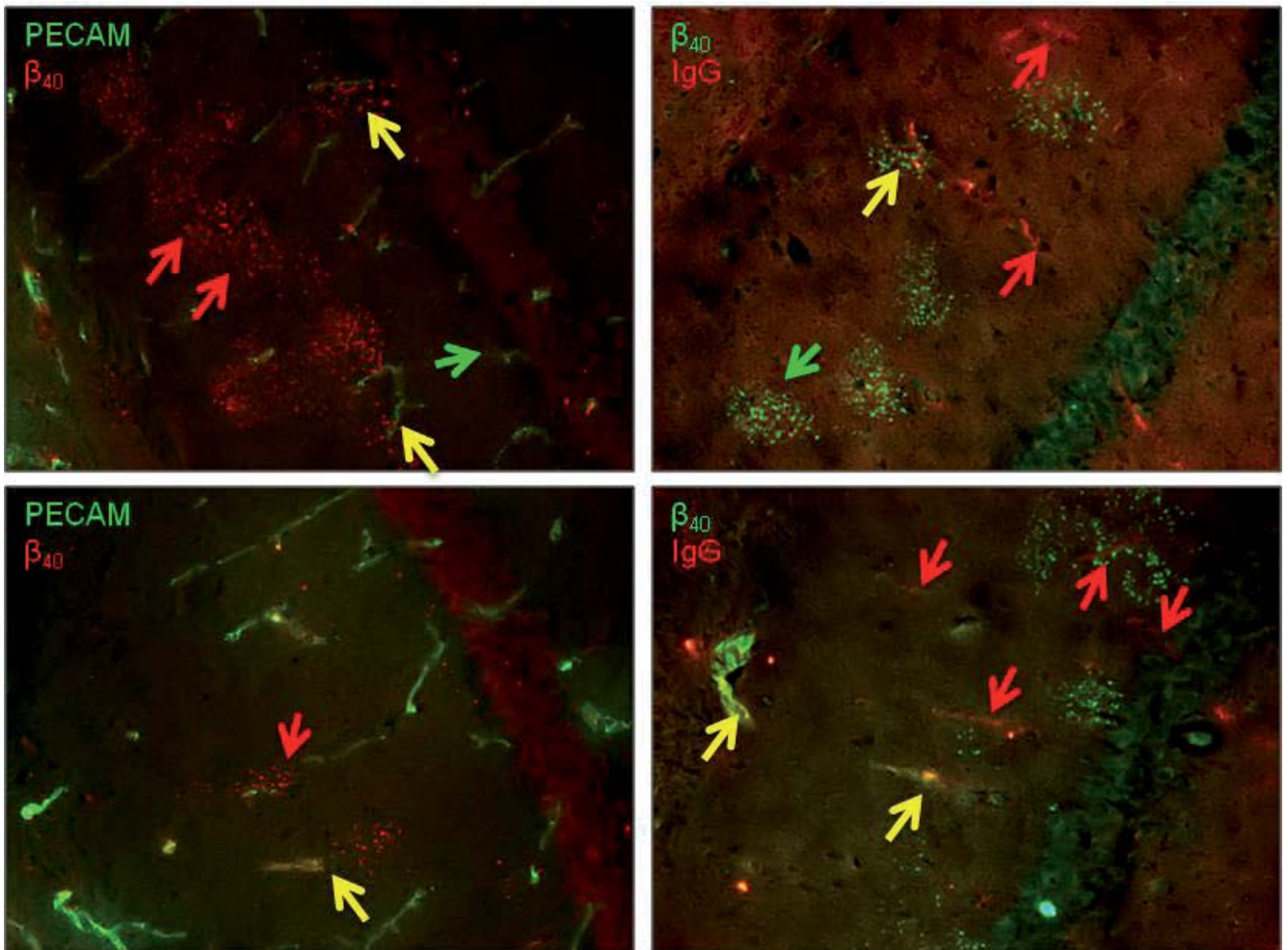


Figure 3



## **IV. Discussió**



La BHE és una barrera fisiològica entre la circulació sistèmica i el SNC. Aquesta barrera limita i regula l'intercanvi de substàncies entre la sang i el parènquima cerebral i és imprescindible per al manteniment de l'homeòstasi del SNC. La integritat de la BHE és imprescindible per al bon funcionament del SNC i s'ha comprovat que alteracions del SNC poden modificar la integritat de la BHE. A més, també s'han descrit modificacions de la permeabilitat i dels mecanismes de transport a través de la BHE relacionats amb la senescència (Mooradian, 1988), i s'observa que la majoria de malalties que comporten alteracions del SNC cursen amb alteracions de la permeabilitat de la BHE. Entre elles trobem l'encefalitis i la meningitis (Tunkel i Scheld, 1993), l'esclerosi múltiple (Moor *et al.*, 1994), la demència relacionada amb la sida (Rhodes, 1991), l'epilèpsia adquirida (Seiffert *et al.*, 2004), alguns desordres psiquiàtrics (Black, 1994) i la MA (Claudio, 1996).

S'han utilitzat diversos mètodes per investigar la integritat de la BHE en models animals, essent els més utilitzats els que avaluen l'extravasació de substàncies endògenes i traçadors exògens dels capil·lars cerebrals. Aquestes substàncies només poden ésser presents al parènquima cerebral en cas d'alteracions de la BHE. Alguns autors proposen que les respostes patològiques a diferents insults poden ser heterogènies i que poden aparèixer diferents alteracions de la BHE a les zones cerebrals i als diferents segments de la vasculatura cerebral (Nitsch i Klatzo, 1983; Ge *et al.*, 2005). Aquestes propostes ens van encaminar a desenvolupar mètodes que poguessin caracteritzar l'estat de la BHE a les diferents zones cerebrals d'interès en contra de mètodes ja establerts on la disgregació mecànica del cervell no permet localitzar les hipotètiques diferències d'integritat de la BHE.

D'acord amb l'objectiu 1.1 en el que ens vàrem proposar establir un mètode per avaluar la permeabilitat de substàncies endògenes (i també exògenes) a la BHE, vàrem escollir estudiar el comportament de la IgG. En animals sans amb la BHE intacta, la IgG plasmàtica no pot creuar la BHE. D'aquesta manera, la presència d'IgG al parènquima cerebral és gairebé nul·la. De fet, només es pot trobar aquesta proteïna als OCV i als plexes coroides, ja que els seus capil·lars són fenestrats i permeten la difusió lliure de les proteïnes i soluts d'alt pes molecular entre la sang i aquestes estructures.

Diversos treballs han utilitzat la caracterització de l'extravasació de la IgG per estudiar les alteracions de la BHE en diversos models animals de malalties del SNC. En el nostre cas, al primer article vam desenvolupar un mètode que permet avaluar i, de



manera important, quantificar, la permeabilitat de la IgG a través de la BHE i, d'aquesta manera, poder donar un nivell de disrupció de la BHE. El mètode es basa en determinar els límits dels vasos cerebrals i els límits de difusió de la IgG extravasada adjacent al vas. Com més alterada estigui la BHE, hi haurà més gradient de difusió d'IgG i més extensió ocuparà en el parènquima cerebral. Amb aquest mètode es pot quantificar l'extensió de l'extravasació de substàncies endògenes com la IgG i obtenir així valors objectius sobre els diferents nivells d'integritat de la BHE a les diferents zones estudiades.

Els valors positius de marcatge d'IgG que hem trobat en diversos animals es podrien explicar per diferents mecanismes: 1) Síntesi local d'IgG al parènquima cerebral, deguda a una hipotètica activació microglial que respondria a una resposta immunitària, 2) alteracions dels transportadors responsables de l'intercanvi d'IgG a través de la BHE i 3) alteracions de les TJ que permetrien el flux paracel·lular de la sang cap el cervell de l'IgG i altres substàncies. La primera de les tres opcions implicaria un marcatge d'IgG no només als capil·lars cerebrals si no a altres zones del cervell on les cèl·lules de la micròglia es trobessin activades, a més, sembla coherent pensar que si hi ha una acumulació de cèl·lules secretores d'IgG al voltant dels capil·lars cerebrals hauríem de trobar una gran quantitat de nuclis cel·lulars tenyits per Hoechst al voltant d'aquests nuclis, i els resultats obtinguts no mostren aquest fet. Per la segona opció cal tenir en compte que la BHE disposa de transportadors que són capaços d'eliminar l'IgG cerebral cap al torrent sanguini a una gran velocitat mitjançant transcitosi inversa (Schlachetzki *et al.*, 2002); si hi hagués un dèficit en l'eliminació d'IgG cerebral hauríem de poder trobar marcatge de manera indeterminada per tot el parènquima cerebral i no només als vasos sanguinis. En relació a la última opció, caldria ressenyar que els nostres resultats mostren una disminució gradual de la intensitat de marcatge de la IgG des del vas sanguini cap al parènquima. Aquesta disminució de intensitat vindria donada per IgG que en extravasar-se a través d'un vas amb la BHE alterada va disminuint gradualment la seva concentració a mesura que s'allunya d'aquest vas. Per tots aquests motius ens inclinem a pensar que la presència d'IgG envoltant els vasos sanguinis es deu a una extravasació d'aquesta substància a través d'una BHE alterada.

D'altra banda, en el segon article es descriu un nou mètode per determinar i localitzar alteracions de la BHE mitjançant la perfusió intracardíaca dels traçadors exògens EB i Hoechst en una solució de PBS amb paraformaldehid (PFA) que es pot aplicar a models murins de trastorns del SNC. Diversos estudis han utilitzat diferents traçadors

exògens que no són capaços de creuar una BHE en estat òptim, per tal de valorar la seva possible extravasació al parènquima cerebral en cas de disrupcions a la BHE.

Els traçadors exògens se solen administrar per via intravenosa o intraperitoneal i després d'un cert temps de circulació pel torrent sanguini s'avalua la seva presència al parènquima cerebral. L'administració de traçadors per via enteral o parenteral s'ha de dur a terme amb l'animal encara viu, amb la conseqüent incomoditat o patiment de l'animal. A més a més, caldria tenir en compte que la simple inoculació de substàncies exògenes en un organisme viu pot produir per si sola canvis de la pressió osmòtica i oncòtica del torrent sanguini i aquests canvis podrien donar a lloc a alteracions artefacte de la BHE, així com conduir a falsos positius.

Dels diferents mètodes possibles per determinar la presència de traçadors exògens a la BHE, la densitometria òptica, o diferents tècniques de microscòpia són les que tenen una distribució més ampla. La densitometria òptica pot permetre una quantificació acurada de la quantitat de traçador extravasat i, amb això, donar un valor objectiu del nivell de disrupció de la BHE, però té l'inconvenient que al disgregar el teixit per al seu anàlisi no permet una fina distinció de les estructures afectades o quins capil·lars mostren alteració de la BHE i quins no. D'aquesta manera, no es poden distingir alteracions lleus disseminades per tot el teixit d'alteracions fortes i localitzades de la BHE. A més a més, l'extravasació fisiològica dels OCV i els plexes coroides podria emascarar lleus alteracions de la BHE en altres estructures. La microscòpia òptica i electrònica s'han usat també per tal de localitzar de manera més precisa les zones de trencament de la BHE. Sorgeix amb aquestes tècniques, però, una gran dificultat de dur a terme múltiples marcatges per tal de colocalitzar diferents estructures en zones d'interès.

A l'hora de posar a punt un nou mètode per analitzar la integritat de la BHE, és útil disposar de diferents zones amb estats diferents de la BHE al mateix cervell. Per això vàrem escollir el model de trencament de BHE per criolesió, ja que l'alteració de la BHE es pot limitar a una zona localitzada, en el nostre cas, el còrtex cerebral dret; a més a més, el plexe coroides també es va usar com a control positiu d'extravasació.

Els traçadors EB i Hoechst van ser escollits perquè mostren diferents propietats hidrofíliques i tenen diferents coeficients de difusió, per això, els dos marcadors tenyeixen diferents estructures i permeten la visualització de diferents característiques. L'EB emet fluorescència quan s'uneix a proteïnes i el Hoechst quan es troba unit a

DNA. Quan s'administren junts seguint el mètode còctel, els dos traçadors no només tenyeixen el nucli de la lesió sinó que apareix un anell envoltant la lesió on també hi ha marcatge positiu que va desapareixent de manera gradual. Al nucli de la lesió l'EB tenyeix tot el parènquima i el Hoechst tots els nuclis cel·lulars; però a l'anell l'EB només tenyeix algunes cèl·lules mentre que el Hoechst segueix marcant tots els nuclis cel·lulars. El marcatge positiu d'algunes cèl·lules amb EB es podria deure al fet que els axons lesionats d'algunes neurones creuen o fan connexió al nucli de la lesió i capten proteïnes plasmàtiques durant o just després de la lesió (Loberg i Torvik, 1991).

Tal i com era d'esperar, als cervells dels animals amb operació testimoni i en les zones sense lesió, la fluorescència d'EB i Hoechst van aparèixer al plexe coroïdal i als CVO, on els capil·lars són fenestrats. En les altres zones cerebrals l'EB i el Hoechst només van aparèixer associats a alguns vasos sanguinis. La fluorescència observada en els vasos de les regions intactes va ser probablement deguda a la presència d'albumina o altres proteïnes retingudes a la membrana basal dels vasos o bé per la presència d'altres proteïnes de la membrana endotelial.

Si observem l'EB amb un microscopi de fluorescència no apareixerà fluorescència a no ser que es trobi unit a alguna proteïna, normalment l'albumina, que aleshores emet una fluorescència de color vermell brillant (Olsson, 1966). De fet, l'EB s'ha utilitzat com un indicador de l'albumina sèrica després de l'administració intravenosa (Wolman *et al.*, 1981). Aquestes observacions han portat a alguns investigadors a administrar el traçador prèviament unit a l'albumina per tal de poder observar fluorescència (Hawkins i Egleton, 2006). Amb l'objectiu d'avaluar la necessitat d'incloure proteïna a la solució del còctel es van crear dos grups d'animals, un dels quals va rebre la solució de còctel amb albumina. Els resultats van mostrar que els dos grups van mostrar els mateixos patrons de fluorescència i les mateixes zones de lesió amb un marcatge similar de les cèl·lules de la perifèria de la lesió. De fet, quan un cervell mostra alteracions en la BHE, és plausible que certes proteïnes plasmàtiques apareguin al parènquima cerebral després de creuar la BHE (Murakami *et al.*, 1998). Per tant, l'EB administrat amb el mètode còctel s'uneix a aquestes proteïnes prèviament extravasades i emet fluorescència, amb el que la unió prèvia *in vitro* de l'EB a albumina exògena no és necessària. A més, l'albumina podria generar una pressió oncòtica i osmòtica inadequades que podrien alterar la BHE per turgència o crenació de les CEC. D'aquesta manera, en cas de voler administrar una solució d'albumina caldria determinar-ne prèviament la concentració òptima per minimitzar els possibles efectes a la BHE. En qualsevol cas, si el complex EB-albumina fos capaç de creuar la BHE, l'EB

lliure també podria creuar-la i unir-se a proteïnes prèviament extravasades. Per tots aquests motius vàrem concloure que tot i que la concentració d'albumina a la solució fos òptima, no és necessària la presència d'aquesta proteïna a la solució de còctel.

En diversos estudis, l'EB i altres traçadors, com el blau tripà o l'HRP s'han administrat per via intravenosa o intraperitoneal. L'administració sistèmica presenta el problema del tractament *in vivo* dels animals i les mateixes substàncies administrades podrien alterar *per se* la BHE mentre circulen pel torrent sanguini. A més, alguns traçadors poden quedar retinguts a la fracció adiposa, alterada en algunes malalties, generant biaixos en els resultats, especialment en la via intraperitoneal. El fet d'incloure els traçadors en una solució fixadora de PFA minimitza a més la variabilitat causada pels mateixos traçadors.

Per tal de poder comparar el nostre mètode còctel amb d'altres més convencionals prèviament descrits a la literatura on les vies intravenosa i intraperitoneal eren les escollides, vàrem crear dos grups d'animals on vàrem administrar els traçadors per aquestes vies. En el grup on l'administració dels traçadors es va produir per via intravenosa, la fluorescència de l'EB va aparèixer a les mateixes zones que el grup de còctel, tot i que la seva intensitat va ser lleugerament menor; d'altra banda el Hoechst va tenyir tots els nuclis del parènquima cerebral i no només els de les zones amb la BHE danyada. Quan es va usar la via intraperitoneal, els dos traçadors van seguir el mateix patró que a la via intravenosa, però amb una intensitat encara menor. D'aquesta manera, l'administració dels traçadors per aquestes dues vies no va resultar satisfactòria per als nostres objectius.

Tenint en compte que els complexos EB-proteïna i Hoechst-DNA emeten fluorescència a unes longituds d'ona característiques, l'aplicació d'aquest mètode permet utilitzar tècniques d'immunohistoquímica posteriors a la perfusió intracardíaca brindant així l'oportunitat de caracteritzar els diferents canvis i processos cel·lulars implicats en la disrupció de la BHE i comparar-ho amb les zones on no hi ha hagut alteracions de la BHE. De fet, vàrem aplicar diferents marcatges immunohistoquímics per tal de caracteritzar la naturalesa de les cèl·lules EB<sup>+</sup>, i vàrem poder concloure que són neurones, en concordança amb el descrit prèviament per Loberg i Torvik (1991).

D'altra banda vàrem analitzar la idoneïtat de dos medis de muntatge diferents ja que en el mètode còctel els dos traçadors presenten diferents propietats lipòfiles. En una

primera aproximació, vàrem observar com es podien obtenir bones visualitzacions i imatges d'EB i Hoechst sense usar cap medi de muntatge. Tanmateix, l'òptima resposta a la no utilització de medi de muntatge és només parcialment satisfactòria ja que en el cas de voler obtenir imatges de més qualitat o en objectius de més magnificació, l'ús d'oli d'immersió és necessari. En cas d'usar Prolong Gold<sup>®</sup>, un medi similar al mowiol, el marcatge de Hoechst es pot apreciar de manera nítida i adequada però l'EB tendeix a dispersar-se a través, i fins i tot fora, del teixit. De fet, varis autors han utilitzat mowiol per a muntar seccions amb marcatge per EB, però en el nostre treball no va proporcionar resultats acurats ja que el temps entre el muntatge i la observació s'havia de reduir al mínim, tenint en compte la capacitat de l'EB per difondre a través del teixit. Per contra, l'ús d'Entellan<sup>®</sup> com a medi de muntatge lipòfil ens va proporcionar unes característiques adients per a la correcta visualització de l'EB ja que aquest traçador no difon i les estructures marcades es poden apreciar adequadament; per contra, la fluorescència del Hoechst pot perdre intensitat amb el pas del temps.

En resum, el mètode còctel es pot aplicar a una gran quantitat de models animals, és ràpid i reproduïble i permet la correcta visualització de les zones amb trencament de la BHE. Aquest mètode permet la utilització de tècniques de immunohistoquímica que ajudin a caracteritzar diferents processos que tenen lloc en el trencament de la BHE o d'altres processos inherents al model animal. A més, el fet de que els traçadors s'administrin un cop l'animal ja ha estat sacrificat i aquests no necessiten un temps de recirculació pel torrent sanguini, minimitza el possible efecte que poden tenir els mateixos traçadors en la disrupció de la BHE i minimitza la manipulació de l'animal *in vivo* i el seu patiment. A més a més, el fet d'administrar els marcadors en una solució fixadora, ens permet conèixer l'estat de la BHE en aquell precís moment i s'eviten posteriors alteracions que es podrien derivar de la manipulació del teixit.

Diversos autors han estudiat l'estat de la BHE en ratolins SAMP8. De fet, els resultats que s'han publicat no són concloents ja que mentre alguns estudis han descrit que els animals de la soca SAMP8 presenten alteracions en la BHE, altres autors han conclòs que no existeixen tals alteracions. De fet, s'ha descrit una extravasació de traçadors o proteïnes plasmàtiques augmentada en ratolins SAMP8 en comparació a soques control, a més, també s'ha observat una major presència al parènquima cerebral d'aquestes molècules en ratolins d'edat avançada en comparació a animals més joves (Ueno *et al.*, 1993, 2001a, b; Hosokawa i Ueno, 1999). Per contra, altres estudis no han detectat canvis en la permeabilitat de la BHE degut a una retenció nul·la de

traçadors en el parènquima cerebral i a un transport no alterat de diferents proteïnes com la insulina o l'albumina (Banks *et al.*, 2000, 2001; Moinuddin *et al.*, 2000). Tot i la gran quantitat de resultats publicats amb l'objectiu de descriure l'estat de la BHE en animals SAMP8, s'hauria de considerar que els diferents autors i els diferents treballs publicats han utilitzat diferents tècniques per avaluar l'estat de la BHE. A més a més, dins d'una mateixa tècnica s'han avaluat diferents traçadors o proteïnes plasmàtiques i això podria ser un factor determinant en l'aparent contradicció i variabilitat dels resultats publicats fins avui.

Per tant, d'acord amb l'objectiu 1.2 i amb la voluntat d'esclarir l'estat de la BHE en ratolins SAMP8 i, en cas d'haver-hi alteracions, quina era la seva evolució temporal, vàrem avaluar la permeabilitat de la BHE a la IgG endògena. En aquest sentit, en el primer estudi es va determinar l'extravasació d'IgG a 3, 7 i 12 mesos d'edat en ratolins SAMP8 i els valors es van comparar amb els obtinguts en ratolins SAMR1, una soca genèticament relacionada, però resistent a la senescència accelerada. L'estudi es va centrar en l'hipocamp d'aquests animals, on alguns informes indiquen la presència de trastorns de la BHE en animals SAMP8, i en el plexe coroïdal, on es preveia que la extravasació d'IgG es produís en les dues soques.

En la observació amb el microscopi de fluorescència, es va poder apreciar com apareixia marcatge positiu d'IgG als vasos grans de la fissura hipocampal en totes les edats de les dues soques. De fet, s'ha documentat que aquests vasos presenten una permeabilitat més alta a diferents substàncies (Dietrich *et al.*, 1991). A més a més, també va aparèixer un intens marcatge positiu per a IgG als plexes coroides de tots els grups estudiats. Aquests dos controls positius van corroborar que el marcatge d'IgG era positiu a les zones on no hi havia BHE o aquesta tenia una permeabilitat augmentada.

D'altra banda, els vasos de l'hipocamp dels animals de 3 i 7 mesos no van mostrar marcatge positiu per IgG, donant a pensar que no hi ha alteracions en la permeabilitat de la BHE a la IgG en aquestes dues soques. Tanmateix, els ratolins SAMP8 de 12 mesos d'edat sí van mostrar un clar marcatge d'aquesta proteïna als vasos de l'hipocamp, mentre que als animals SAMR1, tot i mostrar també un marcatge positiu, la intensitat va ser molt menor. Quan es va procedir a quantificar l'EE de l'IgG es va veure com els valors eren significativament més alts per a SAMP8. Tot i això, per tal de valorar la quantitat d'IgG que es trobava fora els vasos, es va restar l'EE del diàmetre dels vasos, obtenint així uns valors d'EE relatius que van seguir mostrant

valors significativament més alts per a ratolins SAMP8 en comparació a animals SAMR1. A més a més, no van aparèixer diferències en el VD de les dues soques. D'aquesta manera, es podia concloure que la BHE dels ratolins SAMP8 mostra alteracions en la permeabilitat de la BHE a substàncies plasmàtiques com la IgG dependents de l'edat, i que aquestes alteracions són més grans que les mostrades per ratolins SAMR1.

En altres estudis on s'ha avaluat l'estat de la BHE mitjançant la permeabilitat a proteïnes presents al torrent sanguini, Ueno *et al.* (1993) va descriure que en l'hipocamp de ratolins SAMP8 de 13 mesos d'edat la transferència d'albumina sèrica radioactiva es trobava incrementada en relació amb ratolins SAMR1 de la mateixa edat i amb ratolins SAMP8 joves de 3 mesos. Tanmateix, altres estudis on es va administrar albumina radioactiva per via intravenosa, van mesurar la relació cervell/sèrum d'aquesta proteïna i no van observar canvis en la relació cervell/sèrum d'albumina, ni en animals SAMP8 joves ni en els vells, mostrant que no hi ha retenció cerebral d'aquesta proteïna i, per tant, que no hi havia alteracions de permeabilitat de la BHE en animals SAMP8 (Banks *et al.*, 2000).

Els nostres resultats presenten concordança amb els presentats per Ueno *et al.* (1993), en els que els ratolins SAMP8 presenten alteracions de la BHE dependents de l'edat no només a l'albumina si no també a la IgG. D'altra banda, tot i que la funcionalitat dels transportadors d'efluència d'IgG a la BHE dels animals SAMP8 no ha estat descrita, els increments en la permeabilitat d'ambdues substàncies ens fan pensar que les proteïnes creuen la BHE per la via paracel·lular. En aquest sentit, si l'acumulació d'IgG fos deguda a alteracions en el seu transport, aquestes alteracions no podrien explicar els canvis en la permeabilitat de l'albumina a la BHE ni la seva major presència al parènquima cerebral.

Al tercer article vàrem estudiar la integritat de la BHE dels ratolins SAMP8 als 3, 6, 9, 12 i 15 mesos d'edat i els resultats van ser comparats amb animals SAMR1 i ICR-CD1, essent els animals d'aquesta darrera soca uns ratolins control sans i genèticament no emparentats amb les soques SAM que han estat usats en una extensa quantitat d'estudis com a soca control. El mètode que es va fer servir va ser el descrit pel nostre grup al segon article. Tenint en compte que s'han descrit alteracions en la BHE de malalts amb MA al còrtex i hipocamp, vàrem analitzar la permeabilitat de la BHE a l'EB en tres zones cerebrals diferents: l'hipocamp, la fissura hipocampal i el còrtex. Com que els resultats que vàrem obtenir i les diferències en l'extravasació de l'EB no van

ser tan marcats com en d'altres models animals (Duran-Vilaregut *et al.*, 2009) o com al propi model de criolesió, vàrem quantificar la intensitat seguint el mètode descrit per Vilaplana i Laviaille (1999), on el valor mig de gris es pren com a l'equivalent del valor mitjà de la fluorescència de la regió estudiada i s'interpreta com a l'extravasació mitjana en unitats arbitràries.

El resultat principal que vam extreure del tercer article és que mentre la permeabilitat de la BHE a l'EB es manté estable durant tota la vida dels ratolins ICR a les tres zones estudiades, els ratolins SAMP8 i SAMR1 mostren un increment progressiu de la permeabilitat de la BHE a l'EB a partir dels 6 mesos d'edat.

L'aparició d'alteracions en la BHE de ratolins SAMR1 pot resultar xocant a primer terme, però varis estudis han descrit també alteracions patològiques en aquesta soca, com una marcada disminució dels fotoreceptors i cèl·lules ganglionars en edats avançades (Shoji *et al.*, 1998), alteracions en l'audició dependents de l'edat (Takeda *et al.*, 1997), limfomes no tímics, sarcomes histiocítics i quists ovàrics (Takeda, 1999). L'augment de la permeabilitat de la BHE a molècules de mida petita però no a substàncies de pes molecular elevat significaria una altre de les alteracions patològiques d'aquesta soca.

D'altra banda, els valors obtinguts als 3 mesos d'edat són inesperats ja que els nivells d'extravasació d'EB són més alts que als 6 mesos d'edat en totes les soques i zones estudiades. Tot i que aquest fet no el vàrem poder justificar en el seu moment, sí que vàrem dur a terme els anàlisis estadístics amb i sense el grup de 3 mesos d'edat i vam obtenir diferències significatives similars, indicant la validesa de l'anàlisi i corroborant l'augment de l'extravasació de l'EB dependent de l'edat de les soques SAMP8 i SAMR1. A més, tot i que els valors obtinguts al còrtex dels animals ICR són més alts que els de les soques SAMP8 i SAMR1, l'extravasació en aquesta regió no mostra una progressió clara amb l'edat. A més a més, s'ha descrit atròfia cortical en ratolins SAMP8 (Kawamata *et al.*, 1994) i alteracions en les capes II i III d'altres soques SAM (Shimada, 1999) fet que no descartem que també pugui succeir en aquestes soques i que podria explicar el perquè dels diferents valors d'extravasació d'EB en ratolins SAM i ICR a l'escorça cerebral.

L'extravasació de l'HRP ha estat usada també per varis autors com a un indicador de la integritat de la BHE. Ueno *et al.* (1997) van administrar HRP a ratolins SAMP8 i SAMR1 de 3 i 13 mesos. Van descriure un marcatge difús en animals SAMP8 de 13



mesos d'edat i aquest marcatge no es va poder observar en animals SAMP8 de 3 mesos ni en cap dels dos grups d'edat dels ratolins SAMR1. Encara que hem trobat que la permeabilitat de l'EB augmenta amb l'edat en ratolins SAMP8 i SAMR1, s'ha de tenir en compte que el pes molecular de l'EB (961 Da) és molt menor que el de l'HRP (40 kD). Per tant, el fet que trobem alteracions en la BHE tant en els animals SAMP8 com en els SAMR1 no entrem en contradicció amb els resultats descrits anteriorment ja que nosaltres descrivim alteracions de la BHE a substàncies molt més petites que les utilitzades per Ueno *et al.* (1997). I els animals SAMR1 bé podrien patir lleugeres alteracions en la BHE que quedessin paleses per l'extravasació de l'EB i no pas per la de l'HRP.

Al primer i tercer article es van descriure alteracions de la BHE a substàncies endògenes com la IgG i una disrupció de la BHE que augmenta amb l'edat a marcadors exògens com l'EB. A més a més, mentre la permeabilitat a l'EB augmenta a partir dels 6 mesos d'edat, la permeabilitat a la IgG no augmenta fins als 12 mesos. Aquests fets podrien ser deguts a les diferents mides moleculars de les substàncies usades. D'aquesta manera, al presentar l'EB un pes molecular més baix (0,96 kDa), disrupcions suaus de la BHE ja podrien ser suficients per permetre el pas d'aquest traçador del torrent sanguini al parènquima cerebral. En canvi, degut a que la IgG té un pes molecular molt més alt (170 kDa), farien falta afectacions més greus de la BHE perquè aquesta proteïna fos capaç d'abandonar la circulació sistèmica i aparèixer al parènquima cerebral. En darrer terme, al primer article es descriuen alteracions de la BHE que han tingut lloc abans del sacrifici de l'animal i al segon article es descriuen les alteracions de la BHE que tenen els ratolins en el mateix moment del seu sacrifici.

El fet que hi hagi disrupcions en la BHE de l'hipocamp dels ratolins SAMP8 ja a partir sis mesos d'edat i que aquesta pertorbació es magnifiqui als 12 mesos d'edat pot suggerir un nexa d'unió entre aquests alteracions i els dèficits en l'aprenentatge i la memòria descrits en animals SAMP8 (Takeda, 2009). Tanmateix, podria ser possible que tots dos fets fossin conseqüència d'un factor etiopatogènic comú, com per exemple un augment en la seva càrrega d'A $\beta$ . En aquest sentit, l'augment de la càrrega d'A $\beta$  pot generar pertorbacions a la BHE i, al mateix temps, aquestes alteracions poden afavorir l'augment d'A $\beta$  i acabar produint alteracions de l'homeòstasi del parènquima cerebral i afectacions neuronals.

Com a apunt final dels articles 1 i 3 podem concloure que la BHE de la soca SAMP8 mostra alteracions en la seva integritat que s'agreugen amb l'edat. A més a més, el fet

d'usar dos mètodes diferents, ens ha permès determinar dues edats d'inici diferents i també dues alteracions de permeabilitat diferents.

La MA es caracteritza a nivell neuropatològic per una acumulació de NFT de la proteïna tau hiperfosforilada i per plaques neurítiques que contenen A $\beta$ . Aquests dos trets són encara necessaris per a un diagnòstic post mortem de la malaltia. Actualment, la majoria dels models animals utilitzats per estudiar la MA són ratolins amb una o més mutacions en les proteïnes que juguen un paper important en el processament de l'APP o la tau (Götz i Ittner, 2008; Bryan *et al.*, 2009). Les mutacions de l'APP i de les presenilines són totalment penetrants i garanteixen l'aparició de la malaltia, replicant la fisiopatologia de la MA d'inici precoç. No obstant això, la MA d'inici precoç representa menys del 5% de tots els casos d'MA (Tanzi i Bertram, 2005).

Tanmateix, avui en dia no hi ha un model murí de la MA que no estigui manipulat genèticament i que presenti un increment d'agregats d'A $\beta$  dependent de l'edat similar al que es produeix en la MA esporàdica, responsable de més del 90% dels casos en humans d'aquesta malaltia.

La soca de ratolins SAMP8 és una soca no modificada genèticament que presenta diverses característiques similars amb els éssers humans d'edat avançada i que també comparteix altres característiques descrites en pacients amb MA com dèficits en l'aprenentatge i memòria i altres trets neuropatològics (Takeda *et al.*, 2009). Tenint en compte aquestes característiques, no és sorprenent que els ratolins SAMP8 hagin estat proposats com a model animal de la MA (Morley *et al.*, 2004; Pallàs *et al.*, 2008).

Tant els oligòmers d'A $\beta$  com els petits dipòsits amiloides han estat postulats com a importants espècies neurotòxiques en la patogènia de la MA a causa dels seus efectes tòxics sobre les cèl·lules. Diversos estudis realitzats en ratolins han estudiat l'acumulació dels pèptids A $\beta$  per obtenir una millor comprensió de la MA, però en la majoria dels casos, aquests estudis han utilitzat ratolins transgènics, imitant així la MA d'inici precoç.

La presència d'agregats d'A $\beta$  en ratolins SAMP8 és motiu de controvèrsia. Per exemple, alguns investigadors han descrit un major nivell de la càrrega amiloïdal al parènquima cerebral basada en informes de la sobreproducció d'APP i A $\beta$  (Morley *et al.*, 2000; Takemura *et al.*, 1993) i un augment a l'hipocamp i l'escorça cerebral de l'expressió de l'ARNm de l'APP als 6 mesos d'edat (Tha *et al.*, 2000). D'altra banda,

molt pocs informes, però, descriuen agregats amiloides en ratolins SAMP8 (Takemura *et al.*, 1993; Fukunari *et al.*, 1994; Morley *et al.*, 2000). De manera sorprenent uns autors han descrit que aquests dipòsits apareixen ja als dos mesos (Takemura *et al.*, 1993) mentre que d'altres diuen que l'aparició dels dipòsits no es produeix abans dels 16 mesos d'edat (Morley *et al.*, 2000). Degut a que les dades sobre els dipòsits d'A $\beta$  no són concloents, en un article recent del creador de les soques SAM es posa de manifest la necessitat d'una clarificació sobre aquest assumpte (Takeda, 2009).

Degut a aquesta necessitat i a que la presència d'agregats d'A $\beta$  és encara avui en dia essencial per a la validació d'un model acurat de MA i d'acord amb el segon objectiu plantejat en aquesta tesi, en el quart article es van dur a terme marcatges immunohistoquímics per avaluar la presència d'agregats amiloides en cervell de ratolins SAMP8. A més, i amb l'objectiu de descriure una evolució de la deposició amiloïdal, especialment dels pèptids A $\beta_{40}$ , A $\beta_{42}$  i la proteïna APP, vam determinar els agregats d'aquests pèptids a diverses edats dels ratolins SAMP8 i vam comparar els resultats amb les soques control SAMR1 i ICR-CD1.

Els resultats que vam obtenir ens van mostrar una clara presència de dipòsits amiloides dependents de l'edat en l'hipocamp dels ratolins SAMP8. La immunotinció amb l'anticòs 4G8 ens va permetre l'observació de clústers de grànuls amiloides, que es van localitzar principalment a l'*stratum radiatum* de l'hipocamp. A mesura que els ratolins van envellir, els clústers es van estendre a altres regions de l'hipocamp i el seu nombre va anar augmentant. A més a més, l'ús de l'anticòs 12F4, que permet detectar específicament el pèptid A $\beta_{42}$ , va mostrar patró molt similar a l'obtingut amb 4G8. Per tant, aquests resultats ens han permès concloure que en SAMP8 els grànuls amiloides agrupats en clústers estan essencialment formats per A $\beta_{42}$ . A més, els nostres resultats van indicar també alguns grànuls, en menor quantitat, marcats amb A $\beta_{40}$ , fet que concorda amb la menor tendència a agregar-se i la major solubilitat d'aquest pèptid. A més, s'ha descrit que les plaques neurítiques estan compostes inicialment per A $\beta_{42}$  i, posteriorment, incorporen A $\beta_{40}$  (Tahara *et al.*, 2006).

Els dipòsits amiloides dels animals SAMP8 apareixen principalment a l'*stratum radiatum* de la regió CA1 de l'hipocamp, on les neurones piramidals de CA1 reben senyals principalment des de CA3 a través de les col·laterals de Schaffer. Curiosament, s'ha descrit com la pèrdua de neurones CA1 es correlaciona amb la gravetat de la demència (Bobinski *et al.*, 1997) i amb els diferents estadis de Braak (Rössler *et al.*, 2002). A més a més, també s'ha vist com hi ha una correlació lineal

entre la pèrdua de neurones a CA1 i la disminució de volum de l'hipocamp, suggerint que l'atròfia de l'hipocamp es deu a una reducció neuronal (Kril *et al.*, 2004). D'altra banda, s'ha suggerit que les neurones de CA1 pateixen una pèrdua de contactes sinàptics funcionals de les col·laterals de Schaffer més que una pèrdua d'estimulació per part d'aquesta via o un debilitament de les sinapsis (Rosenzweig i Barnes, 2003). La presència de clústers de grànuls amiloides a l'*stratum radiatum* de CA1 en els ratolins SAMP8 podria estar relacionada amb una disfunció neuronal en aquesta regió paral·lela a la observada en malalts de MA. Tanmateix, caldria aprofundir més en aquest tema per poder arribar a més conclusions.

Al quart article també vam trobar nivells basals de cúmuls amiloides dels 3 als 12 mesos d'edat en les dues soques control, amb valors que van augmentar als 15 mesos d'edat, tot i no arribar als nivells expressats en SAMP8. Aquest resultat és consistent amb el descrit en cervells de ratolins d'edat avançada, ens els que es van trobar dipòsits de material fibril·lar en alguns individus (Jucker *et al.*, 1994). No obstant això, tot i la forta relació trobada entre la MA i l'acumulació d'A $\beta$ , s'ha descrit un nombre significatiu d'individus sense diagnòstic clínic de MA i que van mostrar dipòsits amiloides en morir (Dickson *et al.*, 1992), i es creu que aproximadament la meitat de les persones majors de 65 anys presenten algun dipòsit d'A $\beta$  en els seus cervells, essent la meitat d'aquests individus asimptomàtics (Aizenstein *et al.*, 2008). Per tant, els nivells d'acumulació amiloïdal aquí descrits no són en cap cas incompatibles amb resultats d'articles anteriors, ja que dins les edats estudiades seria del tot versemblant trobar individus malalts o sans amb agregats amiloides dins les soques SAMR1 i ICR-CD1.

D'altra banda, també s'han descrit diverses molècules en associació als dipòsits d'A $\beta$ , com diferents fragments amiloides (Güntert *et al.*, 2006), ubiquitina i  $\alpha$ -sinucleïna (Yang *et al.*, 2000) i proteïnes de la matriu extracel·lular (Van Duinen *et al.*, 1995). A més a més, també s'ha pogut observar un increment del marcatge de l'APP ja sigui formant dipòsits en axons (Bramlett *et al.*, 1997) o en neurones (Justicia *et al.*, 2008) després de dany neuronal i també s'ha descrit APP en agregats d'A $\beta$  (Arai *et al.*, 1990). Malgrat que alguns estudis anteriors no van trobar cúmuls d'APP en ratolins SAMP8 (Kato *et al.*, 1997), nosaltres vam observar la presència de l'APP en grànuls d'A $\beta_{42}$  i també diferents fragments d'APP formant grànuls que no contenien A $\beta_{42}$ . En conjunt, aquests resultats indiquen una organització complexa i variable d'estructures granulars, amb el predomini del pèptid A $\beta_{42}$ .

Com a apunt final del quart article, seria interessant remarcar que els ratolins SAMP8 present dipòsits amiloides a l'hipocamp que incrementen en nombre i extensió dels 3 als 15 mesos d'edat. Aquests dipòsits estan constituïts per grànuls agrupats en clústers de pèptid  $A\beta_{42}$  principalment. Tanmateix, es pot observar igualment la presència del pèptid  $A\beta_{40}$  i altres fragments d'APP en aquests grànuls. A més a més, també es descriu l'evolució temporal de l'acumulació amiloïdal als ratolins SAMP8, SAMR1 i ICR-CD1, aquests dos últims utilitzats com a soques control amb un procés normal d'envelliment. Segons el nostre punt de vista, aquest estudi és el primer a caracteritzar l'evolució espacial i temporal de la deposició d' $A\beta$  en aquestes tres soques de ratolins.

En el cinquè i últim article vam estudiar l'acumulació d' $A\beta$  als vasos sanguinis cerebrals i l'alteració de la BHE en ratolins SAMP8 i ICR de 3, 6, 9 i 12 mesos d'edat. A més a més, vam estudiar també la relació espacial entre els clústers amiloides i la posició dels vasos sanguinis cerebrals, i amb els vasos amb disrupcions de la BHE i amb acumulació d' $A\beta$  a les parets. Per acabar, també vam establir la relació entre els vasos amb angiopatia amiloïdal i alteració de la BHE.

La disrupció de la BHE, disfuncions vasculares i una alteració en el transport d' $A\beta$  són factors claus en la hipòtesi neurovascular. Segons aquesta hipòtesi, una disminució en l'efluència d' $A\beta$  cerebral o un pas incrementat des del torrent sanguini al parènquima cerebral pot augmentar els nivells d' $A\beta$  cerebrals i contribuir amb la patologia de la MA. A més, una eliminació deficient d' $A\beta$  per part de les CEC pot contribuir a la CAA i a la formació de dipòsits amiloïdals (Bell i Zlokovic, 2009).

En la CAA, l' $A\beta$  es diposita a les parets vasculares de les leptomeninges i a les artèries, arterioles i capil·lars del parènquima cerebral i pot produir degeneració de les cèl·lules de la musculatura llisa vascular, dany isquèmic a la matèria blanca, necrosi fibril·lar i demència (Jellinger, 2007). A més, s'ha descrit que la disfunció cerebrovascular pot ser un episodi primerenc en l'evolució de la MA (Iadecola, 2004) i s'ha suggerit que aquesta disfunció pot precedir el declivi cognitiu i l'aparició dels canvis neurodegeneratius en la MA i en models d'aquesta malaltia (Bell i Zlokovic, 2009).

Segons la hipòtesi neurovascular, els ratolins SAMP8 haurien de mostrar no només alteracions de la BHE, fet que ja s'ha descrit en el primer i tercer articles, si no també CAA. Al cinquè article vàrem trobar una quantitat de vasos  $A\beta_{40}$  positius a l'hipocamp de ratolins SAMP8 més gran que en ratolins ICR de la mateixa edat. A més a més,

aquests nivells de CAA superiors apareixen ja als 3 mesos d'edat i es mantenen fins als 12 mesos d'edat. L'origen de l'A $\beta$  dipositat als vasos és encara incert (Jellinger, 2007) i tenint en compte que una marcada deposició d'A $\beta$  no apareix fins als 6 mesos d'edat, seria interessant investigar si aquesta acumulació amiloïdal als vasos contribueix a l'aparició i evolució de la MA en aquests ratolins o és només conseqüència dels elevats nivells d'A $\beta$  cerebrals.

La presència de CAA no és exclusiva dels malalts amb MA, ja que la prevalença de CAA en individus amb MA i en la tercera edat és de més d'un 80% i de un 10-40% respectivament (Attems *et al.*, 2007; Greenberg *et al.*, 2004), a més la incidència de CAA en humans augmenta fins a gairebé el 100% un cop es sobrepassen els 80 anys d'edat (Dickstein *et al.*, 2010). D'altra banda, s'ha descrit una forta correlació entre la CAA i el declivi cognitiu en la MA (Attems *et al.*, 2007) i tant l'edat avançada com patologies vasculares s'identifiquen com a factors importants de risc per patir MCI (Luck *et al.*, 2010). Els ratolins SAMP8 presenten diverses característiques similars als malalts de MA com alteracions del comportament i de la memòria (Pallàs *et al.*, 2008). Els nostres resultats indiquen que no només aquests ratolins presenten nivells majors de CAA, sinó que als 12 mesos d'edat tant els ratolins SAMP8 com la soca control ICR presenten nivells més elevats de CAA, indicant que l'envelliment afecta també a la CAA. Si aquesta diferència en la CAA té un paper o no en el declivi cognitiu de la soca SAMP8 requereix més investigació.

D'altra banda, en concordança amb resultats que ja havíem obtingut prèviament, la tinció amb un anticòs dirigit contra l'A $\beta_{40}$  va mostrar estructures extracel·lulars granulars de fins a 3 $\mu$ m de grandària a l'hipocamp d'alguns animals. En aquest últim estudi, tot i que no van aparèixer un increment en els clústers amiloides en els ratolins ICR i sí nivells de CAA, s'hauria de tenir en compte que l'increment de clústers descrits per ICR no té lloc fins als 15 mesos d'edat. D'aquesta manera, i degut a que a partir dels 12 mesos d'edat els ratolins ICR presenten uns nivells elevats de CAA i que posteriorment, als 15 apareixen ja de manera significativa clústers amiloides, podem concloure que a partir dels 12 mesos d'edat comença ja a aparèixer la patologia amiloïdal i que aquesta s'accentua als 15 mesos d'edat, tot i que no arriba als nivells mostrats pels ratolins SAMP8. De la mateixa manera, i d'acord amb resultats obtinguts prèviament, la patologia amiloïdal en SAMP8 apareix ja als 3 o 6 mesos d'edat accentuant-se als 12 mesos, on les alteracions de la BHE i el nivell de CAA es fa més palès.

En relació a la BHE, en aquest últim article es van marcar els vasos amb IgG a la seva paret per tal de relacionar la posició dels vasos amb la BHE trencada amb la posició de vasos amb CAA i clústers d'A $\beta$ . A més a més, vàrem quantificar el nombre de vasos amb marcatge positiu per IgG com a una mesura de trencament de la BHE. En aquest sentit, vam trobar que el nombre de vasos IgG positius va augmentar als 12 mesos d'edat en SAMP8 i, tot i que aquest augment també es va poder observar en ICR, els nivells de SAMP8 van ser superiors als de la soca control. Aquests resultats van mostrar concordança amb els resultats publicats anteriorment, on tot i que l'edat afecta la integritat de la BHE en ratolins SAMP8 de manera acusada, una alteració menor també es pot apreciar en les soques control.

Seria important destacar que, una altra vegada als 12 mesos d'edat, les dues soques mostren alteracions similars a les que presenten individus amb MA, en aquest cas disrupcions en la BHE tot i que la disrupció és més severa en ratolins SAMP8. En la MA, l'envelliment és el factor de risc principal, tot i que no és ni necessari ni suficient per desenvolupar la malaltia. A més, l'envelliment també és un factor de risc important en l'efecte de l'A $\beta$  en les funcions endotelials cerebrals i vasos perifèrics (Price *et al.*, 2004). D'aquesta manera, tot i que els ratolins ICR presenten alguns trets comuns amb la MA, aquest fet seria del tot normal ja que l'aparició d'aquestes característiques es produeix a edat avançada i l'envelliment incideix en aquestes alteracions.

En relació a la localització dels clústers amiloides, els vasos amiloides i els vasos amb IgG, els resultats mostren que en SAMP8 alguns clústers es troben adjacents a alguns vasos, però que també hi ha alguns clústers no associats a cap vas, indicant que els agregats amiloides no estan necessàriament localitzats a un vas sanguini. De manera similar, la localització dels clústers amiloides no va mostrar ningun tipus de relació de proximitat amb els vasos amb acumulació amiloïdal a les seves parets ni amb vasos amb la BHE alterada. Tot i que alguns autors han suggerit que els dipòsits amiloides tenen lloc adjacents i al voltant dels capil·lars cerebrals (Vinters *et al.*, 1994; Kumar-Singh *et al.*, 2005), els nostres resultats estarien en consonància amb el publicat per altres autors, que suggereixen que els capil·lars juguen un paper limitat, o fins i tot nul, en la formació d'agregats amiloides i que la possible associació entre agregats i capil·lars és aleatòria (Kawai *et al.*, 1990), essent també la deposició d'amiloide a les parets dels vasos no instrumental per a la formació de plaques senils (Lippa *et al.*, 1993).

Finalment, la CAA afecta seriosament la unitat neurovascular i la BHE (Bell i Zlokovic, 2009) i alteracions en la BHE poden afavorir l'acumulació d'A $\beta$  en vasos sanguinis (Zlokovic, 2005). De fet, s'ha descrit que les fibres d'A $\beta$  poden incrementar la permeabilitat de les CEC i induir la formació de fibres d'estrès, generar alteracions i agregació de filaments d'actina i formació de porus cel·lulars (Nagababu *et al.*, 2009). A més, l'A $\beta$  produeix respostes proinflamatòries, proapoptòtiques i proangiogèniques a les CEC (Dickstein *et al.*, 2006). En aquest últim article, hem descrit que els vasos amb acumulació amiloïdal presenten alteracions de la BHE degut a la presència d'IgG. No obstant, també hem observat vasos amb IgG que no van presentar deposició d'A $\beta_{40}$  a les parets. Això podria ser degut a que no hem avaluat totes les espècies amiloides que es poden dipositar a les parets dels vasos sanguinis, a que la toxicitat produïda per A $\beta$  es deu bàsicament a oligòmers solubles i a que el procés d'acumulació amiloïdal als vasos és posterior a la disrupció de la BHE. També es pot considerar que mentre la deposició d'A $\beta$  als vasos altera la BHE, hi ha un altre mecanisme patològic, comú o no, que genera disrupcions de la BHE.

Per acabar, en els articles inclosos en aquesta tesi hem descrit que la soca de ratolins SAMP8 presenta alteracions de la BHE, una marcat increment de dipòsits amiloïdals i un augment de CAA. A més a més, hem demostrat que els agregats amiloides no estan directament associats amb els vasos sanguinis, ni amb vasos amb la BHE alterada o amb vasos amb deposició amiloïdal. Encara és necessari dilucidar si les alteracions de la BHE i la patologia amiloide són causa i conseqüència l'un de l'altre o bé dos fenòmens que coincideixen sense relació entre ells.





## **V. Conclusions**



- The imaging methodology specially designed to measure BBB disturbances by anti-IgG staining allows the quantification of IgG extravasation and its extension. Therefore, this method permits to objectively analyze and quantify the existence of disturbances in the BBB.
- When using the cocktail method, the red EB fluorescence can be seen in brain areas with a disrupted BBB while the Hoechst fluorescence can be seen in the nuclei in that same region. EB and Hoechst fluorescence can also be observed in the choroid plexus and circumventricular organs, where there is no functional BBB. Thus, the cocktail method is suitable to be used to find current BBB disturbances.
- Neither SAMP8 nor SAMR1 mice aged 3 or 7 months showed positive staining for IgG extravasation. On the other hand, a clear IgG staining was observed in the hippocampus of 12-month-old SAMP8 mice, while only a weak extravasation appeared in age-matched SAMR1 animals.
- Evans blue permeability remains stable throughout the lifespan of ICR-CD1 mice, meaning there are no BBB alterations in this strain of mice. On the other hand, SAMP8 and SAMR1 show a progressive increase of BBB permeability to EB from 6 to 15 months of age in the cortex, the hippocampus and the hippocampal fissure.
- The effect that age has in the integrity of BBB is different in SAMP8 than in SAMR1 and ICR-CD1 mice. SAMP8 mice exhibit higher BBB disturbances due to the aging process than the other two studied strains.
- Highly clustered extracellular amyloid granular structures up to 3 $\mu$ m in size can be found in the hippocampus of some animals. No amyloid clusters have been found outside the hippocampus.
- The composition of the amyloid granules is complex and variable. There is a greater prevalence of A $\beta$ <sub>42</sub> in granular structures than other amyloid fragments. However, A $\beta$ <sub>40</sub> and some other APP fragments can be found in the granules. In addition, there are some amyloid granules with no A $\beta$ <sub>42</sub>, A $\beta$ <sub>40</sub> or APP fragments presence.

- SAMP8 mice show higher amyloid levels in the hippocampus than both ICR and SAMR1 mice.
- In SAMP8 mice, there is an increase in the amyloid deposits from 3 to 15 months of age. On the other hand, SAMR1 and ICR exhibit some basal levels of amyloid accumulation from 3 to 12 months of age, but significant values are not reached until 15 months of age.
- The SAMP8 strain of mice present higher levels of  $\beta_{40}$  amyloid positive vessels in the CA1 subzone of the hippocampus than age-matched ICR mice. This increased degree of CAA appears as early as at 3 months of age and is maintained throughout the lifespan of the animals.
- Both SAMP8 and ICR strains show an increase of CAA at 12 months of age compared to young and adult mice, indicating that aging increases the risk of CAA.
- There is no direct association between the location of blood vessels in the hippocampus and where the amyloid clusters are formed.
- The comparison of the amyloid cluster placement with the BBB disrupted vessels localization exhibit no direct relationship.
- Amyloid clusters show no direct association with the localization of the amyloid positive vessels.
- At 12 months of age, all the vessels with amyloid deposition show a disruption in the BBB with IgG deposition. In addition, several capillaries with IgG deposition can be found with no amyloid accumulation within their walls.
- Taking advantage of the fact that SAMP8 is a non genetically modified strain of mice, they are a very useful tool to investigate the different pathogenic mechanisms of late-onset AD.
- It has not been possible to establish a direct relationship between BBB alterations, CAA and amyloid deposition in SAMP8 mice.

## **VI. Bibliografia**



## A

- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 7, 41-53.
- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. 2010. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 37, 13-25.
- Aizenstein HJ, Nebes RD, Saxton JA, Price JC, Mathis CA, Tsopelas ND, Ziolkowski SK, James JA, Snitz BE, Houck PR, Bi W, Cohen AD, Lopresti BJ, DeKosky ST, Halligan EM, Klunk WE. 2008. Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly. *Arch. Neurol.* 65, 1509-1517.
- Akiyama H, Akiyama H, Sugiyama H, et al. 1988. Morphological changes of the strain of senescence accelerated mouse (SAM-P/8). In: Takeda T, Matsuo T, Akiyama H, Hosokawa M (eds) *Proceedings of the first SAM Kyoto symposium*. Fuji Printing Business Company, Kyoto, pp 67-76.
- Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strommeyer R, Tooyama I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T. 2000. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 21, 383-421.
- Allen SJ, MacGowan SH, Treanor JJ, Feeney R, Wilcock GK, Dawbarn D. 1991. Normal beta-NGF content in Alzheimer's disease cerebral cortex and hippocampus. *Neurosci Lett.* 131, 135-9.
- Allen B, Ingram E, Takao M, Smith MJ, Jakes R, Virdee K, Yoshida H, Holzer M, Craxton M, Emson PC, Atzori C, Migheli A, Crowther RA, Ghetti B, Spillantini MG, Goedert M. 2002. Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. *J Neurosci.* 22, 9340-51.
- Alonzo NC, Hyman BT, Rebeck GW, Greenberg SM. 1998. Progression of cerebral amyloid angiopathy: accumulation of amyloid-beta40 in affected vessels. *J Neuropathol Exp Neurol.* 57, 353-9.
- Alvarez-García O, Vega-Naredo I, Sierra V, Caballero B, Tomás-Zapico C, Camins A, García JJ, Pallàs M, Coto-Montes A. 2006. Elevated oxidative stress in the brain of senescence-accelerated mice at 5 months of age. *Biogerontology.* 7, 43-52.
- Alzheimer A. 1907. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine. Z. Psychiatrie Psychisch-Gerichtliche Med.* 64, 146-148.



- Alzheimer's Association. 2008. Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's and Dementia*. 4, 110-133.
- Amano T, Nakanishi H, Oka M, Yamamoto K. 1995. Increased expression of cathepsins E and D in reactive microglial cells associated with spongiform degeneration in the brain stem of senescence-accelerated mouse. *Exp Neurol*. 136, 171-82.
- Amenta F, Bronzetti E, Sabbatini M, Vega JA. 1998. Astrocyte changes in aging cerebral cortex and hippocampus: a quantitative immunohistochemical study. *Microsc Res Tech*. 43, 29-33.
- American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition (DSM-IV)*. Washington, DC: American Psychiatric Association. 1994, 143-147.
- Andersen AH, Zhang Z, Zhang M, Gash DM, Avison MJ. 1999. Age-associated changes in rhesus CNS composition identified by MRI. *Brain Res*. 829, 90-8.
- Andreeva AY, Krause E, Müller EC, Blasig IE, Utepbergenov DI. 2001. Protein kinase C regulates the phosphorylation and cellular localization of occludin. *J Biol Chem*. 276, 38480-6.
- Arai H, Lee V, Otvos Jr L, Greenberg B, Lowery D, Sharma SK, Schmidt ML, Trojanowski JQ. 1990. Defined neurofilament, tau, and beta-amyloid precursor protein epitopes distinguish alzheimer from non-alzheimer senile plaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 2249-2253.
- Arancio O, Zhang HP, Chen X, Lin C, Trinchese F, Puzzo D, Liu S, Hegde A, Yan SF, Stern A, Luddy JS, Lue LF, Walker DG, Roher A, Buttini M, Mucke L, Li W, Schmidt AM, Kindy M, Hyslop PA, Stern DM, Du Yan SS. 2004. RAGE potentiates A $\beta$ -induced perturbation of neuronal function in transgenic mice. *EMBO J*. 23, 4096-105.
- Archer J. 1975. Rodent sex differences in emotional and related behavior. *Behav Biol*. 14, 451-79.
- Attems J, Quass M, Jellinger KA, Lintner F. 2007. Topographical distribution of cerebral amyloid angiopathy and its effect on cognitive decline are influenced by Alzheimer disease pathology. *J Neurol Sci*. 257, 49-55.
- Avila J. 2004. The influence of aging in one tauopathy: Alzheimer 's disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 52, 410-3.
- Avramopoulos D. 2009. Genetics of Alzheimer's disease: recent advances. *Genome Med*. 1, 34.

## **B**

- Bachurin S, Bukatina E, Lermontova N, Tkachenko S, Afanasiev A, Grigoriev V, Grigorieva I, Ivanov Y, Sablin S, Zefirov N. 2001. Antihistamine agent dimebon as a novel neuroprotector and a cognition enhancer, *Ann NY Acad Sci.* 939 425-435.
- Bachurin SO, Shevtsova EP, Kireeva EG, Oxenkrug GF, Sablin SO. 2003. Mitochondria as a target for neurotoxins and neuroprotective agents. *Ann N Y Acad Sci.* 993, 334-44.
- Bailey TL, Rivara CB, Rocher AB, Hof PR. 2004. The nature and effects of cortical microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Neurol Res.* 26, 573-8.
- Balda MS, Whitney JA, Flores C, González S, Cerejido M, Matter K. 1996. Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J Cell Biol.* 134, 1031-49.
- Bales KR, Verina T, Dodel RC, Du Y, Altstiel L, Bender M, Hyslop P, Johnstone EM, Little SP, Cummins DJ, Piccardo P, Ghetti B, Paul SM. 1997. Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition. *Nat Genet.* 17, 263-4.
- Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. 2004. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis.* 16, 1-13.
- Ballatore C, Lee VMY, Trojanowski JQ. 2007. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nature Reviews Neuroscience.* 8, 663-672.
- Banks WA, Farr SA, Morley JE., 2000. Permeability of the blood-brain barrier to albumin and insulin in the young and aged SAMP8 mouse. *J. Gerontol.* 55A, B601-B606.
- Banks WA, Moinuddin A, Morley JE. 2001. Regional transport of TNF- $\alpha$  across the blood-brain barrier in young ICR and young and aged SAMP8 mice. *Neurobiol Aging.* 22, 671-6.
- Bartus RT, Dean RL 3rd, Beer B, Lippa AS. 1982. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science.* 217, 408-14.
- Bartus RT, Dean RL. 1985. Developing and utilizing animal models in the search for an effective treatment for age-related memory disturbances. *Normal aging, Alzheimer's disease and senile dementia: Aspects on etiology, pathogenesis, diagnosis and treatment.* Gottfries CG. Brussels. Éditions de l'Université de Bruxelles, 231-65.

- Bazzoni G, Martinez-Estrada OM, Orsenigo F, Cordenonsi M, Citi S, Dejana E. 2000. Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *J Biol Chem.* 275, 20520-6.
- Bazzoni G, Dejana E. 2004. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev.* 84, 869-901.
- Begley DJ. 2004. ABC transporters and the blood-brain barrier. *Curr Pharm Des.* 10, 1295-312.
- Bell RD, Sagare AP, Friedman AE, Bedi GS, Holtzman DM, Deane R, Zlokovic BV. 2007. Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. *J Cereb Blood Flow Metab.* 27, 909-918.
- Bell RD, Zlokovic BV. 2009. Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 118, 103-13.
- Bendayan R, Ronaldson PT, Gingras D, Bendayan M. 2006. In situ localization of P-glycoprotein (ABCB1) in human and rat brain. *J Histochem Cytochem.* 54, 1159-67.
- Bernacki J, Dobrowolska A, Nierwińska K, Małecki A. 2008. Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier. *Pharmacol Rep.* 60, 600-22.
- Bertram L, Tanzi RE. 2008. Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 768-778.
- Berzin TM, Zipser BD, Rafii MS, Kuo-Leblanc V, Yancopoulos GD, Glass DJ, Fallon JR, Stopa EG. 2000. Agrin and microvascular damage in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 21, 349-55.
- Biedl A, Kraus R. 1898. Über einer bisher unbekannte toxische Wirkung der Gallensauren auf das Zentral-nervensystem. *Zentralblatt Innere Medizin* 19, 1185-1200.
- Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI. 1985. The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J. Cell Biol.* 101, 1371-1378.
- Bitner RS, Nikkel AL, Markosyan S, Otte S, Puttfarcken P, Gopalakrishnan M. 2009. Selective alpha7 nicotinic acetylcholine receptor activation regulates glycogen synthase kinase3 beta and decreases tau phosphorylation in vivo. *Brain Res.* 1265, 65-74.
- Black PH. 1994. Central nervous system-immune system interactions: psychoneuroendocrinology of stress and its immune consequences. *Antimicrob Agents Chemother.* 38, 1-6.
- Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. 2006. Alzheimer's disease. *Lancet.* 368, 387-403.

- Bobinski M, Wegiel J, Tarnawski M, Bobinski M, Reisberg B, De Leon MJ, Miller DC, Wisniewski HM. 1997. Relationships between regional neuronal loss and neurofibrillary changes in the hippocampal formation and duration and severity of Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 414-420.
- Bodick NC, Offen WW, Levey AI, Cutler NR, Gauthier SG, Satlin A, Shannon HE, Tollefson GD, Rasmussen K, Bymaster FP, Hurley DJ, Potter WZ, Paul SM. 1997. Effects of xanomeline, a selective muscarinic receptor agonist, on cognitive function and behavioral symptoms in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 54, 465-73.
- Bolmont T, Clavaguera F, Meyer-Luehmann M, Herzig MC, Radde R, Staufenbiel M, Lewis J, Hutton M, Tolnay M, Jucker M. 2007. Induction of tau pathology by intracerebral infusion of amyloid-beta -containing brain extract and by amyloid-beta deposition in APP x Tau transgenic mice. *Am J Pathol.* 171, 2012-20.
- Bons N, Mestre N, Petter A. 1991. Senile plaques and neurofibrillary changes in the brain of an aged lemurian primate, *Microcebus murinus*. *Neurobiol. Aging.* 13, 99-105.
- Bouchaud C, Bosler O. 1986. The circumventricular organs of the mammalian brain with special reference to monoaminergic innervation. *Int. Rev. Cytol.* 105, 283-327.
- Bowen RL, Smith MA, Harris PL, Kubat Z, Martins RN, Castellani RJ, Perry G, Atwood CS. 2002. Elevated luteinizing hormone expression colocalizes with neurons vulnerable to Alzheimer's disease pathology. *J Neurosci Res.* 70, 514-8.
- Bowser R, Smith MA. 2002. Cell cycle proteins in Alzheimer's disease: plenty of wheels but no cycle. *J Alzheimers Dis.* 4, 249-54.
- Bramlett HM, Kraydieh S, Green EJ, Dietrich WD. 1997. Temporal and regional patterns of axonal damage following traumatic brain injury: A beta-amyloid precursor protein immunocytochemical study in rats. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 56, 1132-1141.
- Brandt R, Leger J, Lee G. 1995. Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J. Cell Biol.* 131, 1327-1340.
- Brion JP, Tremp G, Octave JN. 1999. Transgenic expression of the shortest human tau affects its compartmentalization and its phosphorylation as in the pretangle stage of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 154, 255-270.
- Brion JP. 2006. Immunological demonstration of tau protein in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 9(3 Suppl), 177-85.
- Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi HM. 2007. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia.* 3, 186-191

- Bryan KJ, Lee HG, Perry G, Smith MA, Casadesus G. 2009. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease: behavioral testing and considerations. In *Methods of Behavioral Analysis in Neuroscience*, 2nd edition, Buccafusco, J.J. (Ed.). Taylor & Francis Group, Boca Raton, 1-18.
- Butterfield DA, Poon HF, St Clair D, Keller JN, Pierce WM, Klein JB, Markesbery WR. 2006a. Redox proteomics identification of oxidatively modified hippocampal proteins in mild cognitive impairment: insights into the development of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 22, 223-232.
- Butterfield DA, Reed T, Perluigi M, De Marco C, Coccia R, Cini C, Sultana R. 2006b. Elevated protein-bound levels of the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal, in brain from persons with mild cognitive impairment. *Neurosci Lett.* 397, 170-173.
- Butterfield DA, Reed T, Newman SF, Sultana R. 2007. Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free Radic Biol Med.* 43, 658-677.

## C

- Caballero B, Vega-Naredo I, Sierra V, Huidobro-Fernández C, Soria-Valles C, De Gonzalo-Calvo D, Tolivia D, Gutierrez-Cuesta J, Pallas M, Camins A, Rodríguez-Colunga MJ, Coto-Montes A. 2008. Favorable effects of a prolonged treatment with melatonin on the level of oxidative damage and neurodegeneration in senescence-accelerated mice. *J Pineal Res.* 45, 302-11.
- Caccamo A, Oddo S, Billings LM, Green KN, Martinez-Coria H, Fisher A, LaFerla FM. 2006. M1 receptors play a central role in modulating AD-like pathology in transgenic mice. *Neuron.* 49, 671-82.
- Cairns NJ, Chadwick A, Luthert PJ, Lantos PL. 1992. Astrocytosis, beta A4-protein deposition and paired helical filament formation in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.* 112, 68-75.
- Canudas AM, Gutierrez-Cuesta J, Rodríguez MI, Acuña-Castroviejo D, Sureda FX, Camins A, Pallàs M. 2005. Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau in senescence-accelerated mouse (SAM). *Mech Ageing Dev.* 126, 1300-4.
- Carmeliet P, Jain RK. 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 407, 249-57.

- Casas C, Sergeant N, Itier JM, Blanchard V, Wirths O, van der Kolk N, Vingtdoux V, van de Steeg E, Ret G, Canton T, Drobecq H, Clark A, Bonici B, Delacourte A, Benavides J, Schmitz C, Tremp G, Bayer TA, Benoit P, Pradier L. 2004. Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated Abeta42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. *Am J Pathol.* 165, 1289-300.
- Cash AD, Aliev G, Siedlak SL, Nunomura A, Fujioka H, Zhu X, Raina AK, Vinters HV, Tabaton M, Johnson AB, Paula-Barbosa M, Avila J, Jones PK, Castellani RJ, Smith MA, Perry G. 2003. Microtubule reduction in Alzheimer's disease and aging is independent of tau filament formation. *Am J Pathol.* 162, 1623-7.
- Caspersen C, Wang N, Yao J, Sosunov A, Chen X, Lustbader JW, Xu HW, Stern D, McKhann G, Yan SD. 2005. Mitochondrial Abeta: a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease. *FASEB J* 19, 2040-2041.
- Chapman PF, White GL, Jones MW, Cooper-Blacketer D, Marshall VJ, Irizarry M, Younkin L, Good MA, Bliss TV, Hyman BT, Younkin SG, Hsiao KK. 1999. Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci.* 2, 271-6.
- Chavez JC, LaManna JC. 2002. Activation of hypoxia-inducible factor-1 in the rat cerebral cortex after transient global ischemia: potential role of insulin-like growth factor-1. *J Neurosci.* 22, 8922-31.
- Chee FC, Mudher A, Cuttle MF, Newman TA, MacKay D, Lovestone S, Shepherd D. 2005. Over-expression of tau results in defective synaptic transmission in *Drosophila* neuromuscular junctions. *Neurobiol Dis* 20, 918-928.
- Chen GH, Wang YJ, Wang XM, Zhou JN. 2004. Accelerated senescence prone mouse-8 shows early onset of deficits in spatial learning and memory in the radial six-arm water maze. *Physiol Behav.* 82, 883-90.
- Cheng H, Yu J, Jiang Z, Zhang X, Liu C, Peng Y, Chen F, Qu Y, Jia Y, Tian Q, Xiao C, Chu Q, Nie K, Kan B, Hu X, Han J. 2008. Acupuncture improves cognitive deficits and regulates the brain cell proliferation of SAMP8 mice. *Neurosci Lett.* 432, 111-6.
- Cho DH, Nakamura T, Fang J, Cieplak P, Godzik A, Gu Z, Lipton SA. 2009. S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science.* 324, 102-105.
- Cirritto JR, Yamada KA, Finn MB, Sloviter RS, Bales KR, May PC, Schoepp DD, Paul SM, Mennerick S, Holtzman DM. 2005a. Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid beta levels in vivo. *Neuron.* 48, 913-922.
- Cirritto JR, Deane R, Fagan AM, Spinner ML, Parsadanian M, Finn MB, Jiang H, Prior JL, Sagare A, Bales KR, Paul SM, Zlokovic BV, Pivnicka-Worms D, Holtzman

- DM. 2005b. P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid-beta deposition in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest.* 115, 3285-90.
- Citron M. 2004. Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 5, 677-85.
  - Claudio L. 1996. Ultrastructural features of the blood-brain barrier in biopsy tissue from Alzheimer's disease patients. *Acta Neuropathol.* 91, 6-14.
  - Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S, Probst A, Fraser G, Stalder AK, Beibel M, Staufenbiel M, Jucker M, Goedert M, Tolnay M. 2009. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol.* 11, 909-13.
  - Combs CK, Karlo JC, Kao SC, Landreth GE. 2001. beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J Neurosci.* 21, 1179-88.
  - Combs C. 2009. Inflammation and microglia actions in Alzheimer's disease. *J Neuroimmune Pharmacol.* 4, 380-8.
  - Conn PJ, Jones CK, Lindsley CW. 2009. Subtype-selective allosteric modulators of muscarinic receptors for the treatment of CNS disorders. *Trends Pharmacol Sci.* 30, 148-55.
  - Connor B, Young D, Lawlor P, Gai W, Waldvogel H, Faull RL, Dragunow M. 1996. Trk receptor alterations in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res.* 42, 1-17.
  - Connor B, Young D, Yan Q, Faull RL, Synek B, Dragunow M. 1997. Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res.* 49, 71-81.
  - Contestabile A. 2010. The history of the cholinergic hypothesis. *Behav Brain Res.* Article in press.
  - Cooper JD, Salehi A, Delcroix JD, Howe CL, Belichenko PV, Chua-Couzens J, Kilbridge JF, Carlson EJ, Epstein CJ, Mobley WC. 2001. Failed retrograde transport of NGF in a mouse model of Down's syndrome: reversal of cholinergic neurodegenerative phenotypes following NGF infusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 10439-44.
  - Cordenonsi M, D'Atri F, Hammar E, Parry DA, Kendrick-Jones J, Shore D, Citi S. 1999. Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin. *J Cell Biol.* 147, 1569-82.
  - Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. 1993. Gene dose of apolipoprotein E type

4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 26, 921-923.

- Crum RM, Anthony JC, Bassett SS, Folstein MF. 1993. Population-based norms for the Mini-Mental State Examination by age and educational level. *JAMA*. 269, 2386-2391.
- Crutcher KA, Scott SA, Liang S, Everson WV, Weingartner J. 1993. Detection of NGF-like activity in human brain tissue: increased levels in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 13, 2540-50.
- Cummings JL. 1987. Dementia syndromes: neurobehavioral and neuropsychiatric features. *J Clin Psychiatry*. 48, 3-8.
- Cummings BJ, Head E, Ruehl W, Milgram NW, Cotman CW. 1996a. The canine as an animal model of human aging and dementia. *Neurobiol Aging*. 17, 259-68.
- Cummings BJ, Satou T, Head E, Milgram NW, Cole GM, Savage MJ, Podlisny MB, Selkoe DJ, Siman R, Greenberg BD, Cotman CW. 1996b. Diffuse plaques contain C-terminal A beta 42 and not A beta 40: evidence from cats and dogs. *Neurobiol Aging*. 17, 653-9.

## D

- Dauchy S, Dutheil F, Weaver RJ, Chassoux F, Daumas-Duport C, Couraud PO, Scherrmann JM, De Waziers I, Declèves X. 2008. ABC transporters, cytochromes P450 and their main transcription factors: expression at the human blood-brain barrier. *J Neurochem*. 107, 1518-28.
- David JP, Ghozali F, Fallet-Bianco C, Wattez A, Delaine S, Boniface B, Di Menza C, Delacourte A. 1997. Glial reaction in the hippocampal formation is highly correlated with aging in human brain. *Neurosci Lett*. 235, 53-6.
- Davies L, Wolska B, Hilbich C, Multhaup G, Martins R, Simms G, Beyreuther K, Masters CL. 1988. A4 amyloid protein deposition and the diagnosis of Alzheimer's disease: prevalence in aged brains determined by immunocytochemistry compared with conventional neuropathologic techniques. *Neurology*. 38, 1688-93.
- Davies JM, Lowry CV, Davies KJ. 1995. Transient adaptation to oxidative stress in yeast. *Arch Biochem Biophys*. 317, 1-6.
- Davis J, Xu F, Deane R, Romanov G, Previti ML, Zeigler K, Zlokovic BV, Van Nostrand WE. 2004. Early-onset and robust cerebral microvascular accumulation of amyloid beta-protein in transgenic mice expressing low levels of a vasculotropic



- Dutch/Iowa mutant form of amyloid beta-protein precursor. *J Biol Chem.* 279, 20296-306.
- Dawson JD, Anderson SW, Uc EY, Dastrup E, Rizzo M. 2009. Predictors of driving safety in early Alzheimer disease. *Neurology.* 72, 521-527.
  - de la Torre JC. 2004. Alzheimer's disease is a vasocognopathy: a new term to describe its nature. *Neurol Res.* 26, 517-24.
  - De Strooper B. 2003. Aph-1, Pen-2, and nicastrin with presenilin generate an active  $\gamma$ -secretase complex. *Neuron* 38, 9-12.
  - Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* 11, 1156-66.
  - Deane R, Du Yan S, Subramanian RK, LaRue B, Jovanovic S, Hogg E, Welch D, Manness L, Lin C, Yu J, Zhu H, Ghiso J, Frangione B, Stern A, Schmidt AM, Armstrong DL, Arnold B, Liliensiek B, Nawroth P, Hofman F, Kindy M, Stern D, Zlokovic BV. 2003. RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med.* 9, 907-13.
  - Deane R, Wu Z, Sagare A, Davis J, Du Yan S, Hamm K, Xu F, Parisi M, LaRue B, Hu HW, Spijkers P, Guo H, Song X, Lenting PJ, Van Nostrand WE, Zlokovic BV. 2004. LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of A $\beta$  isoforms. *Neuron.* 43, 333-44.
  - Deane R, Sagare A, Hamm K, Parisi M, Lane S, Finn MB, Holtzman DM, Zlokovic BV. 2008. apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain. *J Clin Invest.* 118, 4002-13.
  - Deeken JF, Löscher W. 2007. The blood-brain barrier and cancer: transporters, treatment, and Trojan horses. *Clin Cancer Res.* 13, 1663-74.
  - Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. 2008. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci.* 121, 2115-22.
  - Del Zoppo GJ, Milner R, Mabuchi T, Hung S, Wang X, Koziol JA. 2006. Vascular matrix adhesion and the blood-brain barrier. *Biochem Soc Trans.* 34, 1261-6.
  - Desai AK, Grossberg GT, Sheth DN. 2004. Activities of daily living in patients with dementia: clinical relevance, methods of assessment and effects of treatment. *CNS Drugs.* 18, 853-875.
  - Dhenain M. 2001. Age-related cognitive and neurobiological alterations in animals. *Handbook of Neuropsychology* (2nd Ed.). Boller F and Cappa S. Amsterdam. Elsevier, 6, 1-21.

- Dhenain M, Chenu E, Hisley CK, Aujard F, Volk A. 2003. Regional atrophy in the brain of lissencephalic mouse lemur primates: measurement by automatic histogram-based segmentation of MR images. *Magn Reson Med.* 50, 984-92.
- Dhenain M. 2008. Preclinical MRI and NMR Biomarkers of Alzheimer's Disease: Concepts and Applications. *Magnetic Resonance Insights.* 2, 75-91.
- Dias-Santagata D, Fulga TA, Duttaroy A, Feany MB. 2007. Oxidative stress mediates tau-induced neurodegeneration in *Drosophila*. *J Clin Invest.* 117, 236-45.
- Dickson DW, Crystal HA, Mattiace LA, Masur DM, Blau AD., Davies P, Yen S, Aronson S. 1992. Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. *Neurobiol. Aging* 13, 179-189.
- Dickstein DL, Biron KE, Ujii M, Pfeifer CG, Jeffries AR, Jefferies WA. 2006. Abeta peptide immunization restores blood-brain barrier integrity in Alzheimer disease. *FASEB J.* 20, 426-33.
- Dickstein DL, Walsh J, Brautigam H, Stockton SD Jr, Gandy S, Hof PR. 2010. Role of vascular risk factors and vascular dysfunction in Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med.* 2010 Jan;77(1):82-102.
- Dietrich WD, Halley M, Valdes I, Busto R. 1991. Interrelationships between increased vascular permeability and acute neuronal damage following temperature-controlled brain ischemia in rats. *Acta Neuropathol* 81, 615-625.
- Dodart JC, Mathis C, Saura J, Bales KR, Paul SM, Ungerer A. 2000. Neuroanatomical abnormalities in behaviorally characterized APP(V717F) transgenic mice. *Neurobiol Dis.* 7, 71-85.
- Dodart JC, Marr RA, Koistinaho M, Gregersen BM, Malkani S, Verma IM, Paul SM. 2005. Gene delivery of human apolipoprotein E alters brain Abeta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102, 1211-6.
- Donahue JE, Flaherty SL, Johanson CE, Duncan JA 3rd, Silverberg GD, Miller MC, Tavares R, Yang W, Wu Q, Sabo E, Hovanesian V, Stopa EG. 2006. RAGE, LRP-1, and amyloid-beta protein in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 112, 405-15.
- Doody RS, Gavrilova SI, Sano M, Thomas RG, Aisen PS, Bachurin SO, Seely L, Hung D; dimebon investigators. 2008. Effect of dimebon on cognition, activities of daily living, behaviour, and global function in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet.* 372, 207-15.
- Drake J, Link CD, Butterfield DA. 2003. Oxidative stress precedes fibrillar deposition of Alzheimer's disease amyloid beta-peptide (1-42) in a transgenic *Caenorhabditis elegans* model. *Neurobiol Aging.* 24, 415-20.

- Driscoll M, Gerstbrein B. 2003. Dying for a cause: invertebrate genetics takes on human neurodegeneration. *Nat Rev Genet.* 4, 181-94.
- Drzezga A, Lautenschlager N, Siebner H, Riemenschneider M, Willoch F, Minoshima S, Schwaiger M, Kurz A. 2003. Cerebral metabolic changes accompanying conversion of mild cognitive impairment into Alzheimer's disease: a PET follow-up study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 30, 1104-1113.
- Duran-Vilaregut J, del Valle J, Camins A, Pallàs M, Pelegrí C, Vilaplana J. 2009. Blood-brain barrier disruption in the striatum of rats treated with 3-nitropropionic acid. *Neurotoxicology.* 30, 136-43.

## E

- Ebnet K, Aurrand-Lions M, Kuhn A, Kiefer F, Butz S, Zander K, Meyer zu Brickwedde MK, Suzuki A, Imhof BA, Vestweber D. 2003. The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: a possible role for JAMs in endothelial cell polarity. *J Cell Sci.* 116, 3879-91.
- Edamatsu R, Mori A, Packer L. 1995. The spin-trap N-tert- $\alpha$ -phenyl-butyl nitronone prolongs the life span of the senescence accelerated mouse. *Biochem Biophys Res Commun.* 211, 847-849
- Eehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K. 2003. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol* 160, 113-123.
- Ehrlich P. 1885. Das Sauerstoffbeduerfnis des Organismus: Eine Farbenanalytische Studie. Hirschwald, vol. 8, 167.
- el-Bacha RS, Minn A. 1999. Drug metabolizing enzymes in cerebrovascular endothelial cells afford a metabolic protection to the brain. *Cell Mol Biol.* 45, 15-23.
- Engelhardt B, Wolburg-Buchholz K, Wolburg H. 2001. Involvement of the choroid plexus in central nervous system inflammation. *Microsc Res Tech.* 52, 112-129.
- Epis R, Gardoni F, Marcello E, Genazzani A, Canonico PL, Di Luca M. 2010. Searching for new animal models of Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmacology.* 626, 57-63.

## F

- Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM. 1998. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem.* 273, 29745-53.
- Farkas E, Luiten PG. 2001. Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol.* 64, 575-611.
- Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, Eckman CB, Tanzi RE, Selkoe DJ, Guenette S. 2003. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 4162-4167.
- Fassbender K, Simons M, Bergmann C, Stroick M, Lutjohann D, Keller P, Runz H, Kuhl S, Bertsch T, von Bergmann K, Hennerici M, Beyreuther K, Hartmann T. 2001. Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 5856-61.
- Feldman GJ, Mullin JM, Ryan MP. 2005. Occludin: structure, function and regulation. *Adv Drug Deliv Rev.* 57, 883-917.
- Ferrer I, Gomez-Isla T, Puig B, Freixes M, Ribé E, Dalfó E, Avila J. 2005. Current advances on different kinases involved in tau phosphorylation, and implications in Alzheimer's disease and tauopathies. *Curr Alzheimer Res.* 2, 3-18.
- Fiala M, Lin J, Ringman J, Kermani-Arab V, Tsao G, Patel A, Lossinsky AS, Graves MC, Gustavson A, Sayre J, Sofroni E, Suarez T, Chiappelli F, Bernard G. 2005. Ineffective phagocytosis of amyloid-beta by macrophages of Alzheimer's disease patients. *J Alzheimers Dis.* 7, 221-232.
- Flood JF, Farr SA, Uezu K, Morley JE. 1998. Age-related changes in septal serotonergic, GABAergic and glutamatergic facilitation of retention in SAMP8 mice. *Mech Ageing Dev.* 105, 173-88.
- Fossgreen A, Brückner B, Czech C, Masters CL, Beyreuther K, Paro R. 1998. Transgenic *Drosophila* expressing human amyloid precursor protein show gamma-secretase activity and a blistered-wing phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95, 13703-8.
- Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK. 1999. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 66, 137-47.

- Friedhoff LT, Cullen EI, Geoghagen NS, Buxbaum JD. 2001. Treatment with controlled-release lovastatin decreases serum concentrations of human beta-amyloid (A beta) peptide. *Int J Neuropsychopharmacol.* 4, 127-30.
- Fujibayashi Y, Yamamoto S, Waki A, Konishi J, Yonekura Y. 1998. Increased mitochondrial DNA deletion in the brain of SAMP8, a mouse model for spontaneous oxidative stress brain. *Neuroscience Letters.* 254, 109-112
- Fukunari A, Kato A, Sakai Y, Yoshimoto T, Ishiura S, Suzuki K, Nakajima T. 1994. Colocalization of prolyl endopeptidase and amyloid beta-peptide in brains of senescence-accelerated mouse. *Neurosci Lett.* 176, 201-4.
- Fukutani Y, Cairns NJ, Rossor MN, Lantos PL. 1996. Purkinje cell loss and astrocytosis in the cerebellum in familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 214, 33-6.
- Fulga TA, Schwab IE, Khurana V, Steinhilb ML, Spires TL, Hyman BT, Feany MB. 2007. Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo. *Nature Cell Biol.* 9, 139-148.
- Furuse M, Itoh M, Hirase T, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. 1994. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol.* 127, 1617-26.
- Furuse M, Sasaki H, Tsukita S. 1999. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol.* 147, 891-903.

## G

- Galasko D, Bennett DA, Sano M, Marson D, Kaye J, Edland SD. 2006. ADCS Prevention Instrument Project: assessment of instrumental activities of daily living for community-dwelling elderly individuals in dementia prevention clinical trials. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 20, S152-169.
- Galvan M, David JP, Delacourte A, Luna J, Mena R. 2001. Sequence of neurofibrillary changes in aging and Alzheimer's disease: a confocal study with phospho-tau antibody, AD2. *J. Alzheimers Dis.* 3, 417-425.
- Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, Guido T, Hagopian S, Johnson-Wood K, Khan K, Lee M, Leibowitz P, Lieberburg I, Little S, Masliah E, McConlogue L, Montoya-Zavala M, Mucke L, Paganini L, Penniman E, Power M, Schenk D, Seubert P, Snyder B, Soriano F, Tan H, Vitale J, Wadsworth S, Wolozin B, Zhao J. 1995.

Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F  $\beta$ -amyloid precursor protein. *Nature* 373, 523-527.

- Garzon DJ, Fahnestock M. 2007. Oligomeric amyloid decreases basal levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA via specific downregulation of BDNF transcripts IV and V in differentiated human neuroblastoma cells. *J Neurosci.* 27, 2628-2635.
- Gauthier S, Reisberg B, Zaudig M, Petersen R, Ritchie K, Broich K, Belleville S, Brodaty H, Bennett D, Chertkow H. 2006. Mild cognitive impairment. *Lancet.* 367, 1262-1270.
- Ge S, Song L, Patcher JS. 2005. Where is the blood-brain barrier ... really? *J Neurosci Res.* 79, 421-7.
- Gearing M, Rebeck GW, Hyman BT, Tigges J, Mirra SS. 1994. Neuropathology and apolipoprotein E profile of aged chimpanzees: implications for Alzheimer disease. *P. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 9382-6.
- Gilissen EP, Jacobs RE, Allman JM. 1999. Magnetic resonance microscopy of iron in the basal forebrain cholinergic structures of the aged mouse lemur. *J Neurol Sci.* 168, 21-7.
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, Mant R, Newton P, Rooke K, Roques P, Talbot C, Pericak-Vance M, Roses AD, Williamson R, Rossor M, Owen MJ, Hardy J. 1991. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704-706.
- Goldmann EE. 1909. Die äussere und innere Sekretion des gesunden und kranken Organismus im Lichte der 'vitalen Färbung. *Beitr. klin. Chir.* 64, 192-265.
- Goldmann EE. 1913. Vitalfärbung am Zentralnervensystem. *Abh. preuss. Akad. Wiss. Phys.-Math 1.* 1-60.
- Goss JR, Finch CE, Morgan DG. 1991. Age-related changes in glial fibrillary acidic protein mRNA in the mouse brain. *Neurobiol Aging.* 12, 165-70.
- Götz J, Probst A, Spillantini MG, Schäfer T, Jakes R, Bürki K, Goedert M. 1995. Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform. *EMBO J.* 14, 1304-1313.
- Götz J, Chen F, Barmettler R, Nitsch RM. 2001a. Tau filament formation in transgenic mice expressing P301L tau. *J Biol Chem.* 276, 529-34.
- Götz J, Chen F, van Dorpe J, Nitsch RM. 2001b. Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by A $\beta$  42 fibrils. *Science.* 293, 1491-5.

- Götz J, Nitsch RM. 2001c. Compartmentalized tau hyperphosphorylation and increased levels of kinases in transgenic mice. *Neuroreport*. 12, 2007-16.
- Götz J, Deters N, Doldissen A, Bokhari L, Ke Y, Wiesner A, Schonrock N, Ittner LM. 2007. A decade of tau transgenic animal models and beyond. *Brain Pathol*. 17, 91-103.
- Götz J, Ittner LM. 2008. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurosci*. 9, 532-544.
- Götz J, Götz NN. 2009. Animal models for Alzheimer's disease and frontotemporal dementia: a perspective. *ASN NEURO* 1(4):art:e00019.doi:10.1042/AN20090042
- Gray EG, Paula-Barbosa M, Roher A. 1987. Alzheimer's disease: paired helical filaments and cytomembranes. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 13, 91-110.
- Greenberg SM, Gurol ME, Rosand J, Smith EE. 2004. Amyloid angiopathy-related vascular cognitive impairment. *Stroke*. 35, 2616-9.
- Grieb P, Forster RE, Strome D, Goodwin CW, Pape PC. 1985. O<sub>2</sub> exchange between blood and brain tissues studied with <sup>18</sup>O<sub>2</sub> indicator dilution technique. *J Appl Physiol*. 58, 1929-1941.
- Griffith HR, Belue K, Sicola A, Krzywanski S, Zamrini E, Harrell L, Marson DC. 2003. Impaired financial abilities in mild cognitive impairment: a direct assessment approach. *Neurology*. 60, 449-457.
- Güntert A, Döbeli H, Bohrmann B. 2006. High sensitivity analysis of amyloid-beta peptide composition in amyloid deposits from human and PS2APP mouse brain. *Neuroscience* 143, 461-475.
- Guidi I, Galimberti D, Lonati S, Novembrino C, Bamonti F, Tiriticco M, Fenoglio C, Venturelli E, Baron P, Bresolin N, Scarpini E. 2006. Oxidative imbalance in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 27, 262-269.

## H

- Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB, Selkoe DJ. 1992. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*. 359, 322-25.
- Haass, C. 2004. Take five-BACE and the  $\gamma$ -secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide generation. *EMBO J*. 23, 483-488.

- Haass C, Selkoe DJ. 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 8, 101-112.
- Hansen RA, Gartlehner G, Webb AP, Morgan LC, Moore CG, Jonas DE. 2008. Efficacy and safety of donepezil, galantamine, and rivastigmine for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Clin Interv Aging*. 3, 211-25.
- Harbour JW, Dean DC. 2000. Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis, *Nat Cell Biol*. 2, E65-E67.
- Hardy JA, Higgins GA. 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. 256, 184-5.
- Hardy JA, Selkoe DJ. 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 297, 353-6.
- Harik N, Harik SI, Kuo NT, Sakai K, Przybylski RJ, LaManna JC. 1996. Time-course and reversibility of the hypoxia-induced alterations in cerebral vascularity and cerebral capillary glucose transporter density. *Brain Res*. 737, 335-8.
- Haskins J, Gu L, Wittchen ES, Hibbard J, Stevenson BR. 1998. ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol*. 141, 199-208.
- Hauptmann S, Keil U, Scherping I, Bonert A, Eckert A, Müller WE. 2006. Mitochondrial dysfunction in sporadic and genetic Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*. 41, 668-73.
- Hawkins BT, Davis TP. 2005. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev*. 57, 173-85.
- Hawkins BT, Egleton RD. 2006. Fluorescence imaging of blood-brain barrier disruption. *J Neurosci Meth*. 151, 262-7.
- Hawkins RA, O'Kane RL, Simpson IA, Viña JR. 2006. Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids. *J Nutr*. 136, 218S-26S.
- Head E, Moffat K, Das P, Sarsoza F, Poon WW, Landsberg G, Cotman CW, Murphy MP. 2005. Beta-amyloid deposition and tau phosphorylation in clinically characterized aged cats. *Neurobiol Aging*. 26, 749-63.
- Hellström-Lindahl E, Mousavi M, Zhang X, Ravid R, Nordberg A. 1999. Regional distribution of nicotinic receptor subunit mRNAs in human brain: comparison between Alzheimer and normal brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 66, 94-103.
- Hensley K, Hall N, Subramaniam R, Cole P, Harris M, Ak-senov M, Aksenova M, Gabbita SP, Wu JF, Carney JM, Lovell M, Markesbery WR, Butterfield DA. 1995.



Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *J Neurochem.* 65, 2146-2156.

- Hermann DM, Bassetti CL. 2007. Implications of ATP-binding cassette transporters for brain pharmacotherapies. *Trends Pharmacol Sci.* 28, 128-34.
- Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RL, Atwood CS, Johnson AB, Kress Y, Vinters HV, Tabaton M, Shimohama S, Cash AD, Siedlak SL, Harris PL, Jones PK, Petersen RB, Perry G, Smith MA. 2001. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 21, 3017-23.
- Hock C, Maddalena A, Raschig A, Müller-Spahn F, Eschweiler G, Hager K, Heuser I, Hampel H, Müller-Thomsen T, Oertel W, Wienrich M, Signorell A, Gonzalez-Agosti C, Nitsch RM. 2003. Treatment with the selective muscarinic m1 agonist talsaclidine decreases cerebrospinal fluid levels of A beta 42 in patients with Alzheimer's disease. *Amyloid.* 10, 1-6.
- Hoffman LB, Schmeidler J, Lesser GT, Beeri MS, Purohit DP, Grossman HT, Haroutunian V. 2009. Less Alzheimer disease neuropathology in medicated hypertensive than nonhypertensive persons. *Neurology.* 72, 1720-6.
- 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.
- Holsinger RM, Schnarr J, Henry P, Castelo VT, Fahnstock M. 2000. Quantitation of BDNF mRNA in human parietal cortex by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction: decreased levels in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res.* 76, 347-54.
- Honda M, Nakagawa S, Hayashi K, Kitagawa N, Tsutsumi K, Nagata I, Niwa M. 2006. Adrenomedullin improves the blood-brain barrier function through the expression of claudin-5. *Cell Mol Neurobiol.* 26, 109-18.
- Hong M, Zhukareva V, Vogelsberg-Ragaglia V, Wszolek Z, Reed L, Miller BI, Geschwind DH, Bird TD, McKeel D, Goate A, Morris JC, Wilhelmsen KC, Schellenberg GD, Trojanowski JJ, Lee VMY. 1998. Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17. *Science.* 282, 1914-1917.
- Hornsten A, Lieberthal J, Fadia S, Malins R, Ha L, Xu X, Daigle I, Markowitz M, O'Connor G, Plasterk R, Li C. 2007. APL-1, a *Caenorhabditis elegans* protein

related to the human beta-amyloid precursor protein, is essential for viability. Proc Natl Acad Sci USA. 104, 1971-6.

- Hosokawa M, Ueno M. 1999. Aging of blood-brain barrier and neuronal cells of eye and ear in SAM mice. Neurobiol Aging. 20, 117-123.
- Hsia AY, Masliah E, McConlogue L, Yu GQ, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Malenka RC, Nicoll RA, Mucke L. 1999. Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. Proc Natl Acad Sci USA. 96, 3228-33.
- Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G. 1996. Correlative memory deficits, A $\beta$  elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. Science. 274, 99-102.
- Hughes CP, Berg L, Danziger WI, Coben LA, Martin RI. 1982. A New Clinical Scale for the Staging of Dementia. Brit.J. Psychiat. 140, 566-572.
- Hunt A, Schonknecht P, Henze M, Seidl U, Haberkorn U, Schroder J. 2007. Reduced cerebral glucose metabolism in patients at risk for Alzheimer's disease. Psychiatry Res. 155, 147-154.

## !

- Iadecola C, Zhang F, Niwa K, Eckman C, Turner SK, Fischer E, Younkin S, Borchelt DR, Hsiao KK, Carlson GA. 1999. SOD1 rescues cerebral endothelial dysfunction in mice overexpressing amyloid precursor protein. Nat Neurosci. 2, 157-61.
- Iadecola C. 2004. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. Nat Rev Neurosci. 5, 347-60.
- Iijima K, Liu HP, Chiang AS, Hearn SA, Konsolaki M, Zhong Y. 2004. Dissecting the pathological effects of human Abeta40 and Abeta42 in Drosophila: a potential model for Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci USA. 101, 6623-8.
- Ikegami S, Shumiya S, Kawamura H. 1992. Age-related changes in radial-arm maze learning and basal forebrain cholinergic systems in senescence accelerated mice (SAM). Behav Brain Res. 51, 15-22.
- Ikonomic MD, Wecker L, Abrahamson EE, Wu J, Counts SE, Ginsberg SD, Mufson EJ, Dekosky ST. 2009. Cortical alpha7 nicotinic acetylcholine receptor and beta-amyloid levels in early Alzheimer disease. Arch Neurol. 66, 646-51.

- Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, Khatoon S, Li B, Liu F, Rahman A, Tanimukai H, Grundke-Iqbal I. 2005. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta*. 1739, 198-210.
- Ishihara T, Hong M, Zhang B, Nakagawa Y, Lee MK, Trojanowski JQ, Lee VMY. 1999. Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform. *Neuron* 24, 751-762.
- Ishihara T, Zhang B, Higuchi M, Yoshiyama Y, Trojanowski JQ, Lee VMY. 2001. Age-dependent induction of congophilic neurofibrillary tau inclusions in tau transgenic mice. *Am J Pathol* 158, 555-562.
- Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Hama E, Lee HJ, Saido TC. 2001. Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. *Science*. 292, 1550-1552.

## J

- Jackson GR, Wiedau-Pazos M, Sang TK, Wagle N, Brown CA, Massachi S, Geschwind DH. 2002. Human wild-type tau interacts with wingless pathway components and produces neurofibrillary pathology in *Drosophila*. *Neuron*. 34, 509-19.
- Jellinger KA. 2007. The enigma of vascular cognitive disorder and vascular dementia. *Acta Neuropathol*. 113, 349-88.
- Jeong BH, Jin JK, Choi EK, Lee EY, Meeker HC, Kozak CA, Carp RI, Kim YS. 2002. Analysis of the expression of endogenous murine leukemia viruses in the brains of senescence-accelerated mice (SAMP8) and the relationship between expression and brain histopathology. *J Neuropathol Exp Neurol*. 61, 1001-12.
- Jian Liu K, Rosenberg GA. 2005. Matrix metalloproteinases and free radicals in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med*. 39, 71-80.
- Jicha GA, Carr SA. 2010. Conceptual Evolution in Alzheimer's Disease: Implications for Understanding the Clinical Phenotype of Progressive Neurodegenerative Disease. *Journal of Alzheimer's disease*. 19, 253-272.
- Johansson K, Aignmark K, Norberg A. 1999. Narratives of care providers concerning picking behavior among institutionalized dementia sufferers. *Geriatr Nurs*. 20, 29-33.
- Johnson GVW, Hartigan, JA. 1999. Tau protein in normal and Alzheimer's disease brain: An update. *Journal of Alzheimer's Disease*. 1, 329-351.

- Jones RW, Kivipelto M, Feldman H, Sparks L, Doody R, Waters DD, Hey-Hadavi J, Breazna A, Schindler RJ, Ramos H; LEADe investigators. 2008. The Atorvastatin/Donepezil in Alzheimer's Disease Study (LEADe): design and baseline characteristics. *Alzheimers Dement.* 4, 145-53.
- Jucker M, Ingram DK. 1994. Age-related fibrillar material in mouse brain: Assessing its potential as a biomarker of aging and as a model of human neurodegenerative disease. *Ann. Ny. Acad. Sci.* 719, 238-247.
- Justicia C, Ramos-Cabrer P, Hoehn M. 2008. MRI detection of secondary damage after stroke: Chronic iron accumulation in the thalamus of the rat brain. *Stroke* 39, 1541-1547.

## **K**

- Kago T, Takagi N, Date I, Takenaga Y, Takagi K, Takeo S. 2006. Cerebral ischemia enhances tyrosine phosphorylation of occludin in brain capillaries. *Biochem Biophys Res Commun.* 339, 1197-203.
- Kalaria RN, Hedera P. 1995. Differential degeneration of the cerebral microvasculature in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 6, 477-480.
- Kalaria RN, Pax AB. 1995. Increased collagen content of cerebral microvessels in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 705, 349-52.
- Kale G, Naren AP, Sheth P, Rao RK. 2003. Tyrosine phosphorylation of occludin attenuates its interactions with ZO-1, ZO-2, and ZO-3. *Biochem Biophys Res Commun.* 302, 324-9.
- Kaletta T, Hengartner MO. 2006. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat Rev Drug Discov.* 5, 387-98.
- Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, Sisodia S, Malinow R. 2003. APP processing and synaptic function. *Neuron.* 37, 925-937.
- Kamiie J, Ohtsuki S, Iwase R, Ohmine K, Katsukura Y, Yanai K, Sekine Y, Uchida Y, Ito S, Terasaki T. 2008. Quantitative atlas of membrane transporter proteins: development and application of a highly sensitive simultaneous LC/MS/MS method combined with novel in-silico peptide selection criteria. *Pharm Res.* 25, 1469-83.
- Kampers T, Pangalos M, Geerts H, Wiech H, Mandelkow E. 1999. Assembly of paired helical filaments from mouse tau: implications for the neurofibrillary pathology in transgenic mouse models for Alzheimer's disease. *FEBS Letters.* 451, 39-44.

- Kanemitsu H, Tomiyama T, Mori H. 2003. Human neprilysin is capable of degrading amyloid beta peptide not only in the monomeric form but also the pathological oligomeric form. *Neurosci Lett.* 350, 113-116.
- Karasawa N, Nagatsu I, Sakai K, Nagatsu T, Watanabe K, Onozuka M. 1997. Immunocytochemical study of catecholaminergic neurons in the senescence-accelerated mouse (SAM-P8) brain. *J Neural Transm.* 104, 1267-75.
- Kato A, Fukunari A, Sakai Y, Nakajima T. 1997. Prevention of amyloid-like deposition by a selective prolyl endopeptidase inhibitor, Y-29794, in senescence-accelerated mouse. *J Pharmacol Exp Ther.* 283, 328-35.
- Katzman R, Fox P. 1999. The worldwide impact of dementia, Projections of prevalence and costs. In: Mayeux, R., Christen, Y. (Eds), *Epidemiology of Alzheimer's disease: from gene to prevention*, Springer-Verlag, New York, 1 -17.
- Kawai M, Kalaria RN, Harik SI, Perry G. 1990. The relationship of amyloid plaques to cerebral capillaries in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 137, 1435-46.
- Kawamata T, Nakamura S, Akiguchi I. 1994. Dystrophic changes in axon accumulating nitric oxide synthase are accelerated with age in dorsal colime nuclei of senescence-accelerated mice (SAMP8). In: Takeda T et al (eds) *The SAM model of senescence*. Elsevier Sciences BV, Amsterdam, pp 347-350.
- Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, Shoji M, Ashe KH, Younkin SG. 2001. Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 21, 372-81.
- Keller JN, Schmitt FA, Scheff SW, Ding Q, Chen Q, Butterfield DA, Markesbery WR. 2005. Evidence of increased oxidative damage in subjects with mild cognitive impairment. *Neurology.* 64, 1152-1156.
- Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, Hänninen T, Hallikainen M, Alhainen K, Soininen H, Tuomilehto J, Nissinen A. 2001. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *BMJ.* 322, 1447-51.
- Klein JA, Ackerman SL. 2003. Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *J Clin Invest.* 111, 785-793.
- Klepper J. 2010. Glucose transporter 1 (GLUT1) deficiency syndrome. *Journal of Pediatric Neurology.* 8, 107-108.
- Kohama SG, Goss JR, Finch CE, McNeill TH. 1995. Increases of glial fibrillary acidic protein in the aging female mouse brain. *Neurobiol Aging.* 16, 59-67.
- Kojro E, Fahrenholz F. 2005. The non-amyloidogenic pathway: structure and function of alpha-secretases. *Subcell. Biochem.* 38, 105 -127.

- Koson P, Zilka N, Kovac A, Kovacech B, Korenova M, Filipcik P, Novak M. 2008. Truncated tau expression levels determine life span of a rat model of tauopathy without causing neuronal loss or correlating with terminal neurofibrillary tangle load. *Eur J Neurosci.* 28, 239-246.
- Kraemer BC, Zhang B, Leverenz JB, Thomas JH, Trojanowski JQ, Schellenberg GD. 2003. Neurodegeneration and defective neurotransmission in a *Caenorhabditis elegans* model of tauopathy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100, 9980-5.
- Kril JJ, Hodges J, Halliday G. 2004. Relationship between hippocampal volume and CA1 neuron loss in brains of humans with and without Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 361, 9-12.
- Kumar-Singh S, Pirici D, McGowan E, Serneels S, Ceuterick C, Hardy J, Duff K, Dickson D, Van Broeckhoven C. 2005. Dense-core plaques in Tg2576 and PSAPP mouse models of Alzheimer's disease are centered on vessel walls. *Am J Pathol.* 167, 527-43.
- Kuret J, Congdon EE, Li G, Yin H, Yu X, Zhong Q. 2005. Evaluating triggers and enhancers of tau fibrillization. *Microscopy Research and Technique.* 67, 141-155.
- Lai CH, Kuo KH, Leo JM. 2005. Critical role of actin in modulating BBB permeability. *Brain Res Brain Res Rev.* 50, 7-13.

## L

- Lal-Nag M, Morin PJ. 2009. The claudins. *Genome Biol.* 10, 235.
- Lampugnani MG, Orsenigo F, Gagliani MC, Tacchetti C, Dejana E. 2006. Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *J Cell Biol.* 174, 593-604.
- Larson J, Lynch G, Games D, Seubert P. Alterations in synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampal slices from young and aged PDAPP mice. 1999. *Brain Res.* 840, 23-35.
- LeBel CP, Bondy SC. 1992. Oxidative damage and cerebral aging. *Prog Neurobiol.* 38, 601-9.
- Lee G, Newman ST, Gard DL, Band H, Panchamoorthy G. 1998. Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases, *J. Cell. Sci.* 111, 3167-3177.
- Leissring MA, Farris W, Chang AY, Walsh DM, Wu X, Sun X, Frosch MP, Selkoe DJ. 2003. Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents

- plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron*. 40, 1087-1093.
- Leonhardt H. 1980. Ependym und circumventriculäre Organe. In: Oksche A, Vollrath L (eds) *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*. Springer, Berlin, pp 177-666.
  - Lesné 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, 352-357.
  - Levi-Montalcini R, Angeletti PU. 1963. Essential role of the nerve growth factor in the survival and maintenance of dissociated sensory and sympathetic embryonic nerve cells in vitro. *Dev Biol* 7, 653-659.
  - Levitan D, Greenwald I. 1995. Facilitation of lin-12-mediated signalling by sel-12, a *Caenorhabditis elegans* S182 Alzheimer's disease gene. *Nature*. 377, 351-4.
  - Levy-Lahad E, Wijsman EM, Nemens E, Anderson L, Goddard KA, Weber JL, Bird TD, Schellenberg GD. 1995. A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science* 269, 970 -973.
  - Lewandowsky M. 1900. Zur lehre der cerebrospinalflussigkeit. *Zeitschrift Klinische Medizin*. 40, 480-494.
  - Lewis J, McGowan E, Rockwood J, Melrose H, Nacharaju P, Van Slegtenhorst M, Gwinn-Hardy K, Paul Murphy M, Baker M, Yu X, Duff K, Hardy J, Corral A, Lin WL, Yen SH, Dickson DW, Davies P, Hutton M. 2000. Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet*. 25, 402-5.
  - Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, Yen SH, Sahara N, Skipper L, Yager D, Eckman C, Hardy J, Hutton M, McGowan E. 2001. Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science*. 293, 1487-91.
  - Li X, Greenwald I. 1997. HOP-1, a *Caenorhabditis elegans* presenilin, appears to be functionally redundant with SEL-12 presenilin and to facilitate LIN-12 and GLP-1 signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94, 12204-9.
  - Li Y, Liu L, Barger SW, Griffin WS. 2003. Interleukin-1 mediates pathological effects of microglia on tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38-MAPK pathway. *J Neurosci*. 23, 1605-1611.
  - Link CD. 1995. Expression of human beta-amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92, 9368-72.

- Lippa CF, Hamos JE, Smith TW, Pulaski-Salo D, Drachman DA. 1993. Vascular amyloid deposition in Alzheimer's disease. Neither necessary nor sufficient for the local formation of plaques or tangles. *Arch Neurol.* 50, 1088-92.
- Lipton SA. 2005. The molecular basis of memantine action in Alzheimer's disease and other neurologic disorders: low-affinity, uncompetitive antagonism. *Curr Alzheimer Res.* 2, 155-65.
- Lischper M, Beuck S, Thanabalasundaram G, Pieper C, Galla HJ. 2010. Metalloproteinase mediated occludin cleavage in the cerebral microcapillary endothelium under pathological conditions. *Brain Res.* 1326, 114-27.
- Lister JP, Barnes CA. 2009. Neurobiological changes in the hippocampus during normative aging. *Arch Neurol.* 66, 829-33.
- Liu J, Mori A. 1993. Age-associated changes in superoxide dismutase activity, thiobarbituric acid reactivity and reduced glutathione level in the brain and liver in senescence accelerated mice (SAM): a comparison with ddY mice. *Mech Ageing Dev* 71, 23-30.
- Liu Y, Nusrat A, Schnell FJ, Reaves TA, Walsh S, Pochet M, Parkos CA. 2000. Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J Cell Sci.* 113, 2363-74.
- Loberg EM, Torvik A. 1991. Uptake of plasma proteins into damaged neurons. An experimental study on cryogenic lesions in rats. *Acta Neuropathol* 81, 479-85.
- Löscher W, Potschka H. 2005. Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat Rev Neurosci.* 6, 591-602.
- Luchsinger JA, Reitz C, Patel B, Tang MX, Manly JJ, Mayeux R. 2007. Relation of diabetes to mild cognitive impairment. *Arch Neurol.* 64, 570-5.
- Luck T, Riedel-Heller SG, Lippa M, Wiese B, Wollny A, Wagner M, Bickel H, Weyerer S, Pentzek M, Haller F, Moesch E, Werle J, Eisele M, Maier W, van den Bussche H, Kaduszkiewicz H; AgeCoDe Study Group. 2010. Risk factors for incident mild cognitive impairment--results from the German Study on Ageing, Cognition and Dementia in Primary Care Patients (AgeCoDe). *Acta Psychiatr Scand.* 121, 260-72.
- Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE, Rogers J. 1999. Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 155, 853-862.
- Lue LF, Walker DG, Rogers J. 2001. Modeling microglial activation in Alzheimer's disease with human postmortem microglial cultures. *Neurobiology & Aging.* 22, 945-956.



- Lyketsos CG, Lopez O, Jones B, Fitzpatrick AL, Breitner J, DeKosky S. 2002. Prevalence of neuropsychiatric symptoms in dementia and mild cognitive impairment: results from the cardiovascular health study. *JAMA*. 288, 1475-1483.

## **M**

- Maas T, Eidenmuller J, Brandt R. 2000. Interaction of tau with the neural membrane cortex is regulated by phosphorylation at sites that are modified in paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* 275, 15733-15740.
- Maeda S, Sahara N, Saito Y, Murayama M, Yoshiike Y, Kim H, Miyasaka T, Murayama S, Ikai A, Takashima A. 2007. Granular tau oligomers as intermediates of tau filaments. *Biochemistry*. 46, 3856-3861.
- Mandell KJ, McCall IC, Parkos CA. 2004. Involvement of the junctional adhesion molecule-1 (JAM1) homodimer interface in regulation of epithelial barrier function. *J Biol Chem*. 279, 16254-62.
- Markesbery WR. 1997. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*. 23, 134-47.
- Markesbery WR, Kryscio RJ, Lovell MA, Morrow JD. 2005. Lipid peroxidation is an early event in the brain in amnesic mild cognitive impairment. *Ann Neurol*. 58, 730-735.
- Markesbery WR, Schmitt FA, Kryscio RJ, Davis DG, Smith CD, Wekstein DR. 2006. Neuropathologic substrate of mild cognitive impairment. *Arch Neurol*. 63, 38-46.
- Masliah E, Mallory M, Hansen L, DeTeresa R, Terry RD. *Neurology*. 1993. Quantitative synaptic alterations in the human neocortex during normal aging. 43, 192-7.
- Masliah E, Mallory M, Alford M, DeTeresa R, Hansen LA, McKeel DW Jr, Morris JC. 2001. Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology*. 56, 127-9.
- Matsugo S, Kitagawa T, Minami S, Esashi Y, Oomura Y, Tokumaru S, Kojo S, Matsushima K, Sasaki K. 2000. Age-dependent changes in lipid peroxide levels in peripheral organs, but not in brain, in senescence-accelerated mice. *Neuroscience Letters*. 278, 105-108.
- Mattson MP, Chan SL, Duan W. 2002. Modification of brain aging and neurodegenerative disorders by genes, diet, and behavior. *Physiol Rev*. 82, 637-72.

- McConlogue L, Buttini M, Anderson JP, Brigham EF, Chen KS, Freedman SB, Games D, Johnson-Wood K, Lee M, Zeller M, Liu W, Motter R, Sinha S. 2007. Partial reduction of BACE1 has dramatic effects on Alzheimer plaque and synaptic pathology in APP Transgenic Mice. *J Biol Chem.* 282, 26326-34.
- McDermott JB, Aamodt S, Aamodt E. 1996. pti-1, a *Caenorhabditis elegans* gene whose products are homologous to the tau microtubule-associated proteins. *Biochemistry.* 35, 9415-23.
- McGeer PL, McGeer E, Rogers J, Sibley J. 1990. Anti-inflammatory drugs and Alzheimer disease. *Lancet.* 335, 1037.
- McGeer PL, McGeer EG. 2007. NSAIDs and Alzheimer disease: epidemiological, animal model and clinical studies. *Neurobiol Aging.* 28, 639-47.
- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. 1984. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of department of health and human services task force on Alzheimer's disease. *Neurology.* 34, 939-44.
- McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL. 1999. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 46, 860-866.
- McPhie DL, Coopersmith R, Hines-Peralta A, Chen Y, Ivins KJ, Manly SP, Kozlowski MR, Neve KA, Neve RL. 2003. DNA synthesis and neuronal apoptosis caused by familial Alzheimer disease mutants of the amyloid precursor protein are mediated by the p21 activated kinase PAK3. *J Neurosci.* 23, 6914-6927.
- Mena R, Edwards PC, Harrington CR, Mukaetova-Ladinska EB, Wischik CM. 1996. Staging the pathological assembly of truncated tau protein into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 91, 633-41.
- Michaelis ML, Ansar S, Chen Y, Reiff ER, Seyb KI, Himes RH, Audus KL, Georg GI. 2004.  $\beta$ -amyloid-induced neurodegeneration and protection by structurally diverse microtubule-stabilizing agents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 16, 1-30.
- Migliore L, Fontana I, Trippi F, Colognato R, Coppede F, Tognoni G, Nucciarone B, Siciliano G. 2005. Oxidative DNA damage in peripheral leukocytes of mild cognitive impairment and AD patients. *Neurobiol Aging.* 26, 567-573.
- Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Tateno K, Kunieda T, Komuro I. 2004. Vascular cell senescence and vascular aging. *J Mol Cell Cardiol.* 36, 175-83.
- Mitchell TW, Nissanov J, Han LY, Mufson EJ, Schneider JA, Cochran EJ, Bennett DA, Lee VM, Trojanowski JQ, Arnold SE. 2000. Novel method to quantify neuropil

threads in brains from elders with or without cognitive impairment. *J. Histochem. Cytochem.* 48, 1627-1638.

- Mitic LL, Anderson JM. 1998. Molecular architecture of tight junctions. *Annu Rev Physiol.* 60, 121-42.
- Miyamoto M, Kiyota Y, Yamazaki N, Nagaoka A, Matsuo T, Nagawa Y, Takeda T. 1986. Age-related changes in learning and memory in the senescence-accelerated mouse (SAM). *Physiol Behav.* 38, 399-406.
- Miyamoto M, Kiyota Y, Nishiyama M, Nagaoka A. 1992. Senescence-accelerated mouse (SAM): age-related reduced anxiety-like behavior in the SAM-P/8 strain. *Physiol Behav.* 51, 979-85.
- Miyamoto M. 1994. Characteristics of memory and behavioral disorders in SAMP8 mice. In: Takeda T (ed) *The SAM model of senescence.* Elsevier Science B.V, Amsterdam, pp 61-66.
- Miyamoto M. 1997. Characteristics of age-related behavioral changes in senescence-accelerated mouse SAMP8 and SAMP10. *Exp Gerontol.* 32, 139-148.
- Miyasaka T, Ding Z, Gengyo-Ando K, Oue M, Yamaguchi H, Mitani S, Ihara Y. 2005. Progressive neurodegeneration in *C. elegans* model of tauopathy. *Neurobiol Dis.* 20, 372-83.
- Moechars D, Dewachter I, Lorent K, Reversé D, Baekelandt V, Naidu A, Tesseur I, Spittaels K, Haute CV, Checler F, Godaux E, Cordell B, Van Leuven F. 1999. Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *J Biol Chem.* 274, 6483-92.
- Moinuddin A, Morley JE, Banks WA. 2000. Regional Variations in the Transport of Interleukin-1 across the Blood-Brain Barrier in ICR and Aging SAMP8 Mice. *Neuroimmunomodulation.* 8, 165-70.
- Moor AC, de Vries HE, de Boer AG, Breimer DD. 1994. The blood-brain barrier and multiple sclerosis. *Biochem Pharmacol.* 47, 1717-24.
- Mooradian AD. 1988. Effect of aging on the blood-brain barrier. *Neurobiol Aging.* 9, 31-9.
- Mooradian AD. 1997. Central nervous system complications of diabetes mellitus--a perspective from the blood-brain barrier. *Brain Res Brain Res Rev.* 23, 210-8.
- Morcos M, Hutter H. 2009. The model *Caenorhabditis elegans* in diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 16, 897-908.
- Morley JE, Kumar VB, Bernardo AE, Farr SA, Uezu K, Tumosa N, Flood JF. 2000. Beta-amyloid precursor polypeptide in SAMP8 mice affects learning and memory. *Peptides.* 21, 1761-7.

- Morley JE. 2002. The SAMP8 mouse: a model of Alzheimer disease? *Biogerontology*. 3, 57-60.
- Morley JE, Banks WA, Kumar VB, Farr SA. 2004. The SAMP8 mouse as a model for Alzheimer disease: studies from Saint Louis University. *International Congress Series*. 1260, 23-28.
- Morley JE, Farr SA, Banks WA, Johnson SN, Yamada KA, Xu L. 2010. A physiological role for amyloid-beta protein: enhancement of learning and memory. *J Alzheimers Dis*. 19, 441-9.
- Mosconi L, Sorbi S, de Leon MJ, Li Y, Nacmias B, Myoung PS, Tsui W, Ginestroni A, Bessi V, Fayyazz M, Caffarra P, Pupi A. 2006. Hypometabolism exceeds atrophy in presymptomatic early-onset familial Alzheimer's disease.
- Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K, McConlogue L. 2000. High-level neuronal expression of a $\beta$  1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci*. 20, 4050-4058.
- Mudher A, Lovestone S. 2002. Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands? *Trends Neurosci*. 25, 22-26.
- 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.
- Murakami K, Kawase M, Kondo T, Chan PH. 1998. Cellular accumulation of extravasated serum protein and DNA fragmentation following vasogenic edema. *J Neurotrauma*. 15, 825-35.
- Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R. 2001. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*. 63, 71-124.
- Murrell J, Farlow M, Ghetti B, Benson MD. 1991. A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science* 254, 97-99.

## N

- Nagababu E, Usatyuk PV, Enika D, Natarajan V, Rifkind JM. 2009. Vascular endothelial barrier dysfunction mediated by amyloid-beta proteins. *J Alzheimers Dis*. 17, 845-54.

- 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, 331-7.
- Nagasaki S, Ozono S, Kawamura S, Watanabe K, Yamamoto T, Onozuka M. 1995. Regional differences in the age-related reduction of the cerebellar cortical thickness in senescence-accelerated mice. *Med Sci Res* 23, 425-427.
- Nagy Z, Esiri MM, Smith AD. 1998. The cell division cycle and the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 87, 731-9.
- Nakahara H, Kanno T, Inai Y, Utsumi K, Hiramatsu M, Mori K, Packer L. 1998. Mitochondrial dysfunction in the senescence accelerated mouse (SAM). *Free Radic Biol Med.* 24, 85-92.
- Näslund J, Haroutunian V, Mohs R, Davis KL, Davies P, Greengard P, Buxbaum JD. 2000. Correlation between elevated levels of amyloid  $\beta$ -peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA.* 283, 1571-1577.
- Nico B, Frigeri A, Nicchia GP, Corsi P, Ribatti D, Quondamatteo F, Herken R, Girolamo F, Marzullo A, Svelto M, Roncali L. 2003. Severe alterations of endothelial and glial cells in the blood-brain barrier of dystrophic mdx mice. *Glia.* 42, 235-51.
- Nieset JE, Redfield AR, Jin F, Knudsen KA, Johnson KR, Wheelock MJ. 1997. Characterization of the interactions of alpha-catenin with alpha-actinin and beta-catenin/plakoglobin. *J Cell Sci.* 110, 1013-22.
- Nishikawa T, Takahashi JA, Fujibayashi Y, Fujisawa H, Zhu B, Nishimura Y, Ohnishi K, Higuchi K, Hashimoto N, Hosokawa M. 1998. An early stage mechanism of the age-associated mitochondrial dysfunction in the brain of SAMP8 mice; an age associated neurodegeneration animal model. *Neuroscience Letters.* 254, 69-72.
- Nishiyama M, Takahashi H, Miyamoto M. 1994. Senescence-accelerated mouse (SAMP8): an animal model for age-related circadian rhythm disorder. In: Takeda T (ed) *The SAM model of senescence.* Elsevier Science BV, Amsterdam, pp 393-396.
- Nitsch C, Klatzo I. 1983. Regional patterns of blood-brain barrier breakdown during epileptiform seizures induced by various convulsive agents. *J Neurol Sci* 59, 305-22.
- Nitsch RM. 1996. From acetylcholine to amyloid: neurotransmitters and the pathology of Alzheimer's disease. *Neurodegeneration.* 5, 477-82.
- Nitsch RM, Deng M, Tennis M, Schoenfeld D, Growdon JH. 2000. The selective muscarinic M1 agonist AF102B decreases levels of total Abeta in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 48,913-8.

- Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M, Tsukita S. 2003. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol.* 161, 653-60.
- Nomura Y, Wang BX, Qi SB, Namba T, Kaneko S. 1989. Biochemical changes related to aging in the senescence-accelerated mouse. *Exp Gerontol.* 24, 49-55.
- Nomura Y, Yamanaka Y, Kitamura Y, Arima T, Ohnuki T, Oomura Y, Sasaki K, Nagashima K, Ihara Y. 1996. Senescence-accelerated mouse. *Neurochemical studies on aging. Ann N Y Acad Sci.* 786, 410-8.
- Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, Jones PK, Ghanbari H, Wataya T, Shimohama S, Chiba S, Atwood CS, Petersen RB, Smith MA. 2001. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 60, 759-67.
- Nusrat A, Parkos CA, Verkade P, Foley CS, Liang TW, Innis-Whitehouse W, Eastburn KK, Madara JL. 2000. Tight junctions are membrane microdomains. *J Cell Sci.* 113, 1771-81.
- Nuutinen T, Suuronen T, Kauppinen A, Salminen A. 2009. Clusterin: a forgotten player in Alzheimer's disease. *Brain Res Rev.* 61, 89-104.

## O

- Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM. 2003a. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 24, 1063-70.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM. 2003b. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A $\beta$  and synaptic dysfunction. *Neuron.* 39, 409-21.
- O'Donnell ME, Lam TI, Tran LQ, Foroutan S, Anderson SE. 2006. Estradiol reduces activity of the blood-brain barrier Na-K-Cl cotransporter and decreases edema formation in permanent middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 26, 1234-49.
- Ogawa O, Zhu X, Lee HG, Raina A, Obrenovich ME, Bowser R, Ghanbari HA, Castellani RJ, Perry G, Smith MA. 2003. Ectopic localization of phosphorylated histone H3 in Alzheimer's disease: a mitotic catastrophe? *Acta Neuropathol.* 105, 524-8.

- Ohno M, Sametsky EA, Younkin LH, Oakley H, Younkin SG, Citron M, Vassar R, Disterhoft JF. 2004. BACE1 deficiency rescues memory deficits and cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron*. 41, 27-33.
- Ohtsuki S, Terasaki T. 2007. Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain; importance for CNS drug discovery and development. *Pharm Res*. 24, 1745-58.
- O'Keefe J, Nadel L. 1978. *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Clarendon Press, Oxford, UK. 570 pp.
- Olsson Y. 1966. Studies on vascular permeability in peripheral nerves. I. Distribution of circulating fluorescent serum albumin in normal, crushed and sectioned rat sciatic nerve. *Acta Neuropathol*. 7, 1-15.

## P

- Pallàs M, Camins A, Smith MA, Perry G, Lee HG, Casadesús G. 2008. From aging to Alzheimer's disease: unveiling "the switch" with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8). *J Alzheimers Dis*. 15, 615-24.
- Pardridge WM. 2005. Molecular biology of the blood-brain barrier. *Mol Biotechnol*. 30, 57-70.
- Paris D, Townsend K, Quadros A, Humphrey J, Sun J, Brem S, Wotoczek-Obadia M, DelleDonne A, Patel N, Obregon DF, Crescentini R, Abdullah L, Coppola D, Rojiani AM, Crawford F, Sebt SM, Mullan M. 2004. Inhibition of angiogenesis by Abeta peptides. *Angiogenesis*. 7, 75-85.
- Patterson MB, Mack JL, Neundorfer MM, Martin RJ, Smyth KA, Whitehouse PJ. 1992. Assessment of functional ability in Alzheimer disease: a review and a preliminary report on the Cleveland Scale for Activities of Daily Living. *AlzheimerDis Assoc Disord*. 6,145-163.
- Perry G, Nunomura A, Smith MA. 1998. A suicide note from Alzheimer disease neurons? *Nat Med*. 4, 897-8.
- Perry G, Zhu X, Smith MA. 2001. Do neurons have a choice in death? *Am J Pathol*. 158, 1-2.
- Petersen RC. 2004. Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *Journal of Internal Medicine*. 256, 183-94.

- Pezet S, Malcangio M. 2004. Brain-derived neurotrophic factor as a drug target for CNS disorders. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 8, 391-399.
- Picq JL. 2007. Aging affects executive functions and memory in mouse lemur primates. *Exp Gerontol*. 42, 223-32.
- Pimplikar SW. 2009. Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 41, 1261-1268.
- Piontek J, Winkler L, Wolburg H, Müller SL, Zuleger N, Piehl C, Wiesner B, Krause G, Blasig IE. 2008. Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *FASEB J*. 22, 146-58.
- United Nations. 2009. Population Division of the Department of Economic and Social Affairs of the United Nations Secretariat (2009). *World Population Prospects: The 2008 Revision*.
- Postina R, Schroeder A, Dewachter I, Bohl J, Schmitt U, Kojro E, Prinzen C, Endres K, Hiemke C, Blessing M, Flamez P, Dequenne A, Godaux E, van Leuven F, Fahrenholz F. 2004. A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest*. 113, 1456-64.
- Praticò D. 2008. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease: a reappraisal. *Trends Pharmacol Sci*. 29, 609-15.
- Price JM, Hellermann A, Hellermann G, Sutton ET. 2004. Aging enhances vascular dysfunction induced by the Alzheimer's peptide beta-amyloid. *Neurol Res*. 26, 305-11.
- Probst A, Götz J, Wiederhold KH, Tolnay M, Mistl C, Jaton AL, Hong M, Ishihara T, Lee VMY, Trojanowski JQ, Jakes R, Crowther RA, Spillantini MG, Bürki K, Goedert M. 2000. Axonopathy and amyotrophy in mice transgenic for human four-repeat tau protein. *Acta Neuropathol (Berl)*. 99, 469-481.
- Puchowicz MA, Xu K, Sun X, Ivy A, Emancipator D, LaManna JC. 2007. Diet-induced ketosis increases capillary density without altered blood flow in rat brain. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 292, E1607-15.

## **Q**

- Qiu WQ, Walsh DM, Ye Z, Vekrellis K, Zhang J, Podlisny M, Rosner MR, Safavi A, Hersh LB, Selkoe DJ. 1998. Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J Biol Chem*. 273, 32730-32738.



- Querfurth HW, LaFerla FM. 2010. Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 362, 329-44.

## R

- Raina AK, Zhu X, Rottkamp CA, Monteiro M, Takeda A, Smith MA. 2000. Cyclin' toward dementia: cell cycle abnormalities and abortive oncogenesis in Alzheimer disease. *J Neurosci Res.* 61, 128-33.
- Rao RK, Basuroy S, Rao VU, Karnaky Jr KJ, Gupta A. 2002. Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin-beta-catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress. *Biochem J.* 368, 471-81.
- Rascher G, Fishmann A, Kroger S, Duffner F, Grote EH, Wolburg H. 2002. Extracellular matrix and the blood-brain-barrier in glioblastoma multiforme: spatial segregation of tenascin and agrin. *Acta Neuropathol.* 104, 85-91.
- Reed TT, Pierce WM, Markesbery WR, Butterfield DA. 2009a. Proteomic identification of HNE-bound proteins in early Alzheimer disease: Insights into the role of lipid peroxidation in the progression of AD. *Brain Res.* 1274, 66-76.
- Reed TT, Pierce WM Jr, Turner DM, Markesbery WR, Butterfield DA. 2009b. Proteomic identification of nitrated brain proteins in early Alzheimer's disease inferior parietal lobule. *J Cell Mol Med.* 13, 2019-29.
- Reese TS, Karnovsky MJ. 1967. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 34, 207-217.
- Rhodes RH. 1991. Evidence of serum-protein leakage across the blood-brain barrier in the acquired immunodeficiency syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol.* 50, 171-83.
- Roher A, Esh C, Rahman A, Kokjohn TA, Beach TG. 2004. Atherosclerosis of cerebral arteries in Alzheimer's disease. *Stroke.* 35(suppl I), 2623-7.
- Rombouts SA, Goekoop R, Stam CJ, Barkhof F, Scheltens P. 2005. Delayed rather than decreased BOLD response as a marker for early Alzheimer's disease. *Neuroimage* 26, 1078-1085.
- Rosenzweig ES, Barnes CA. 2003. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog. Neurobiol.* 69, 143-179.
- Rossler M, Zarski R, Bohl J, Ohm TG. 2002. Stage-dependent and sector specific neuronal loss in hippocampus during Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 103, 363 -369.
- Roy S, Zhang B, Lee VM, Trojanowski JQ. 2005. Axonal transport defects: a common theme in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol.* 109, 5-13.

- Ruehl W, DePaoli A, Brnyette D. 1994. Pretreatment characterization of behavioral and cognitive problems in elderly dogs. *J. Vet. Internal. Med.* 8, 178.

## **S**

- Sagare A, Deane R, Bell RD, Johnson B, Hamm K, Pendu R, Marky A, Lenting PJ, Wu Z, Zarcone T, Goate A, Mayo K, Perlmutter D, Coma M, Zhong Z, Zlokovic BV. 2007. Clearance of amyloid-beta by circulating lipoprotein receptors. *Nat Med.* 13, 1029-31.
- Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, Itoh M, Fujimoto T, Furuse M, Takano H, Noda T, Tsukita S. 1998. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol.* 141, 397-408.
- Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S. 2000. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell.* 11, 4131-42.
- Sakakibara A, Furuse M, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Tsukita S. 1997. Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J Cell Biol.* 137, 1393-401.
- Sala SG, Muñoz U, Bartolomé F, Bermejo F, Martín-Requero A. 2008. HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin inhibits cell cycle progression at the G1/S checkpoint in immortalized lymphocytes from Alzheimer's disease patients independently of cholesterol-lowering effects. *J Pharmacol Exp Ther.* 324, 352-9.
- Samuraki M, Matsunari I, Chen WP, Yajima K, Yanase D, Fujikawa A, Takeda N, Nishimura S, Matsuda H, Yamada M. 2007. Partial volume effect-corrected FDG PET and grey matter volume loss in patients with mild Alzheimer's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 34, 1658-1669.
- Sandoval KE, Witt KA. 2008. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol Dis.* 32, 200-19.
- Sastre M, Klockgether T, Heneka MT. 2006. Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms. *Int J Dev Neurosci.* 24, 167-76.
- Sato E, Kurokawa T, Oda N, Ishibashi S. 1996a. Early appearance of abnormality of microperoxisomal enzymes in the cerebral cortex of senescence-accelerated mouse. *Mechanisms of Ageing and Development.* 92, 175-184.

- Sato E, Oda N, Ozaki N, Hashimoto SI, Kurokawa T, Ishibashi S. 1996b. Early and transient increase in oxidative stress in the cerebral cortex of senescence-accelerated mouse. *Mechanisms of Ageing and Development*. 86, 105-114.
- Satoh H, Zhong Y, Isomura H, Saitoh M, Enomoto K, Sawada N, Mori M. 1996. Localization of 7H6 tight junction-associated antigen along the cell border of vascular endothelial cells correlates with paracellular barrier function against ions, large molecules, and cancer cells. *Exp Cell Res*. 222, 269-74.
- Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ, Hulette C, Crain B, Goldgaber D, Roses AD. 1993. Association of apolipoprotein E allele  $\epsilon$ 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*. 43, 1467-72.
- Schecterson LC, Bothwell M. 2010. Neurotrophin Receptors: Old Friends with New Partners. *Developmental Neurobiology*. 70, 332-338.
- Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, DeKosky ST, Mufson EJ. 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 TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, Larson E, Levy-Lahad E, Viitanen M, Peskind E, Poorkaj P, Schellenberg G, Tanzi R, Wasco W, Lannfelt L, Selkoe D, Younkin S. 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, 864-70.
- Schlachetzki F, Zhu C, Pardridge WM. 2002. Expression of the neonatal Fc receptor (FcRn) at the blood-brain barrier. *J Neurochem*. 81, 203-6.
- Schmitz C, Rutten BP, Pielen A, Schäfer S, Wirths O, Tremp G, Czech C, Blanchard V, Multhaup G, Rezaie P, Korr H, Steinbusch HW, Pradier L, Bayer TA. 2004. Hippocampal neuron loss exceeds amyloid plaque load in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 164, 1495-502.
- Schultz C, Hubbard GB, Rüb U, Braak E, Braak H. 2000. Age-related progression of tau pathology in brains of baboons. *Neurobiol Aging*. 21, 905-12.
- Seiffert E, Dreier JP, Ivens S, Bechmann I, Tomkins O, Heinemann U, Friedman A. 2004. Lasting blood-brain barrier disruption induces epileptic focus in the rat somatosensory cortex. *J Neurosci*. 24, 7829-36.
- Selkoe DJ. 1991. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron*. 6, 487-498.

- Selkoe DJ. 2001a. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* 81, 741-766.
- Selkoe DJ. 2001b. Clearing the brain's amyloid cobwebs. *Neuron.* 32, 177-80.
- Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL. 2007. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid- $\beta$  protein induce reversible synapse loss by modulating an nmda-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J. Neurosci.* 27, 2866 - 2875.
- Shayo M, McLay RN, Kastin AJ, Banks WA. 1997. The putative blood-brain barrier transporter for the beta-amyloid binding protein apolipoprotein j is saturated at physiological concentrations. *Life Sci.* 60, PL115-8.
- Sheng JG, Mrak RE, Griffin WS. 1994. S100 beta protein expression in Alzheimer disease: potential role in the pathogenesis of neuritic plaques. *J Neurosci Res.* 39, 398-404.
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HAR, Haines JL, Pericak-Vance M, Tanzi R, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH. 1995. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature.* 375, 754-760.
- Shibata M, Yamada S, Kumar SR, Calero M, Bading J, Frangione B, Holtzman DM, Miller CA, Strickland DK, Ghiso J, Zlokovic BV. 2000. Clearance of Alzheimer's amyloid- $\beta$ (1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest.* 106, 1489-99.
- Shimada A, Kuwamura M, Umemura T, Takada K, Ohama E, Itakura C. 1991. Modified Bielschowsky and immunohistochemical studies on senile plaques in aged dogs. *Neurosci Lett.* 129, 25-8.
- Shimada A, Kuwamura M, Awakura T, Umemura T, Takada K, Ohama E, Itakura C. 1992. Topographic relationship between senile plaques and cerebrovascular amyloidosis in the brain of aged dogs. *J Vet Med Sci.* 54, 137-44.
- Shimada A. 1999. Age-dependent cerebral atrophy and cognitive dysfunction in SAMP10 mice. *Neurobiol Aging.* 20, 125-36.
- Shoji M, Okada M, Ohta A, Higuchi K, Hosokawa M, Honda Y. 1998. A morphological and morphometrical study of the retina in aging SAM mice. *Ophthalmic Res.* 30, 172-179.

- Siesjö BK. 1978. Brain energy metabolism and catecholaminergic activity in hypoxia, hypercapnia and ischemia. *J Neural Transm Suppl.* 14, 17-22.
- Silverberg GD, Mayo M, Saul T, Rubenstein E, McGuire D. 2003. Alzheimer's disease, normal-pressure hydrocephalus, and senescent changes in CSF circulatory physiology: a hypothesis. *Lancet Neurol.* 2, 506-11.
- 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, 489-502.
- Simionescu M, Simionescu N, Palade GE. 1976. Segmental differentiations of cell junctions in the vascular endothelium. Arteries and veins. *J Cell Biol.* 68, 705-23.
- Simpson IA, Carruthers A, Vannucci SJ. 2007. Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *J Cereb Blood Flow Metab.* 27, 1766-91.
- Sink KM, Leng X, Williamson J, Kritchevsky SB, Yaffe K, Kuller L, Yasar S, Atkinson H, Robbins M, Psaty B, Goff DC Jr. 2009. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and cognitive decline in older adults with hypertension: results from the Cardiovascular Health Study. *Arch Intern Med.* 169, 1195-1202.
- Sjobeck M, Englund E. 2001. Alzheimer's disease and the cerebellum: a morphologic study on neuronal and glial changes. *Dement Geriatr Cogn Disord* 12, 211-218.
- Smith MA. 1998. Alzheimer disease. *Int. Rev. Neurobiol.* 42, 1-54.
- Soma T, Chiba H, Kato-Mori Y, Wada T, Yamashita T, Kojima T, Sawada N. 2004. Thr(207) of claudin-5 is involved in size-selective loosening of the endothelial barrier by cyclic AMP. *Exp Cell Res.* 300, 202-12.
- Sparks DL, Sabbagh MN, Connor DJ, Lopez J, Launer LJ, Browne P, Wasser D, Johnson-Traver S, Lochhead J, Ziolkowski C. 2005. Atorvastatin for the treatment of mild to moderate Alzheimer disease: preliminary results. *Arch Neurol.* 62, 753-7.
- Spector R, Johanson CE. 2007. Vitamin transport and homeostasis in mammalian brain: focus on Vitamins B and E. *J Neurochem.* 103, 425-38.
- Spittaels K, Van den Haute C, Van Dorpe J, Bruynseels K, Vandezande K, Laenen I, Geerts H, Mercken M, Sciot R, Van Lommel A, Loos R, Van Leuven F. 1999. Prominent axonopathy in the brain and spinal cord of transgenic mice overexpressing four-repeat human tau protein. *Am J Pathol.* 155, 2153-2165.
- Squire L. 1992. Memory and the hippocampus: A synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychological Review.* 99, 195-231.

- Staropoli JF, Abeliovich A. 2005. The ubiquitin-proteasome pathway is necessary for maintenance of the postmitotic status of neurons. *J Mol Neurosci.* 27, 175-83.
- Strittmatter WJ, Roses AD. 1995. Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92, 4725-4727.
- Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Burki K, Frey P, Paganetti PA, Waridel C, Calhoun ME, Jucker M, Probst A, Staufenbiel M, Sommer B. 1997. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94, 13287-92.
- Su B, Wang X, Nunomura A, Moreira PI, Lee HG, Perry G, Smith MA, Zhu X. 2008. Oxidative stress signaling in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 5, 525-32.
- Sugiyama H, Akiyama H, Akiguchi I, Kameyama M, Takeda T. 1987. Loss of dendritic spines in hippocampal CA1 pyramidal cells in senescence accelerated mouse (SAM)- a quantitative Golgi study. *Rinsho Shinkeigaku.* 27, 841-5.
- Sultana R, Piroddi M, Galli F, Butterfield DA. 2008. Protein levels and activity of some antioxidant enzymes in hippocampus of subjects with amnesic mild cognitive impairment. *Neurochem Res.* 33,2540-2546.
- Sultana R, Butterfield DA. 2010. Role of Oxidative Stress in the Progression of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 19, 341-353.
- Sureda FX, Gutierrez-Cuesta J, Romeu M, Mulero M, Canudas AM, Camins A, Mallol J, Pallàs M. 2006. Changes in oxidative stress parameters and neurodegeneration markers in the brain of the senescence-accelerated mice SAMP-8. *Exp Gerontol.* 41, 360-7.
- Szot P, Van Dam D, White SS, Franklin A, Staufenbiel M, De Deyn PP. 2009. Age-dependent changes in noradrenergic locus coeruleus system in wild-type and APP23 transgenic mice. *Neurosci Lett.* 463, 93-7.

## **I**

- Taddei A, Giampietro C, Conti A, Orsenigo F, Breviario F, Pirazzoli V, Potente M, Daly C, Dimmeler S, Dejana E. 2008. Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nat Cell Biol.* 10, 923-34.

- Taguchi K, Yamagata HD, Zhong W, Kamino K, Akatsu H, Hata R, Yamamoto T, Kosaka K, Takeda M, Kondo I, Miki T. 2005. Identification of hippocampus-related candidate genes for Alzheimer's disease, *Ann. Neurol.* 57, 585-588.
- Tahara K, Kim H, Jin J, Maxwell JA, Li L, Fukuchi K. 2006. Role of toll-like receptor signalling in A $\beta$  uptake and clearance. *Brain* 129, 3006 -3019.
- Takashima A, Murayama M, Murayama O, Kohno T, Honda T, Yasutake K, Nihonmatsu N, Mercken M, Yamaguchi H, Sugihara S, Wolozin B. 1998. Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3 and its substrate tau. *Proc. Natl Acad. Sci.* 95, 9637-9641.
- Takasugi N, Tomita T, Hayashi I, Tsuruoka M, Niimura M, Takahashi Y, Thinakaran G, Iwatsubo T. 2003. The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature.* 422, 438-41.
- Takeda A, Loveman E, Clegg A, Kirby J, Picot J, Payne E, Green C. 2006. A systematic review of the clinical effectiveness of donepezil, rivastigmine and galantamine on cognition, quality of life and adverse events in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry.* 21, 17-28.
- Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S, Irino M, Higuchi K, Matsushita T, Tomita Y, Yasuhira K, Hamamoto H, Shimizu K, Ishii M, Yamamuro T. 1981. A new murine model of accelerated senescence. *Mech Ageing Dev.* 17,183-94.
- Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K. 1991. Senescence-accelerated mouse (SAM): a novel murine model of accelerated senescence. *J Am Geriatr Soc.* 39, 911-9.
- Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K, Hosono M, Akiguchi I, Katoh H. 1994. A novel murine model of aging, Senescence-Accelerated Mouse (SAM). *Arch Gerontol Geriatr.* 19, 185-92.
- Takeda T, Matsushita T, Kurozumi M, Takemura K, Higuchi K, Hosokawa M. 1997. Pathobiology of the senescence-accelerated mouse (SAM). *Exp. Gerontol.* 32, 117-127.
- Takeda T. 1999. Senescence-accelerated mouse (SAM): a biogerontological resource in aging research. *Neurobiol. Aging.* 20, 105-110.
- Takeda T. 2009. Senescence-Accelerated Mouse (SAM) with Special References to Neurodegeneration Models, SAMP8 and SAMP10 Mice. *Neurochemical Research.* 34, 639-59.
- Takeichi M. 1995. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol.* 7, 619-27.

- Takemura M, Nakamura S, Akiguchi I, Ueno M, Oka N, Ishikawa S, Shimada A, Kimura J, Takeda T. 1993. Beta/A4 proteinlike immunoreactive granular structures in the brain of senescence-accelerated mouse. *Am J Pathol.* 142, 1887-1897.
- Tamaki C, Ohtsuki S, Iwatsubo T, Hashimoto T, Yamada K, Yabuki C, Terasaki T. 2006. Major involvement of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in the clearance of plasma free amyloid beta-peptide by the liver. *Pharm Res.* 23, 1407-16.
- Tan J, Town T, Paris D, Mori T, Suo Z, Crawford F, Mattson MP, Flavell RA, Mullan M. 1999. Microglial activation resulting from CD40-CD40L interaction after beta-amyloid stimulation. *Science.* 286, 2352-5.
- Tanaka J, Okuma Y, Tomobe K, Nomura Y. 2005. The age-related degeneration of oligodendrocytes in the hippocampus of the senescence-accelerated mouse (SAM) P8: a quantitative immunohistochemical study. *Biol Pharm Bull.* 28, 615-8.
- Tanzi RE, Bertram L. 2001. New frontiers in Alzheimer's disease genetics. *Neuron.* 32, 181-4.
- Tanzi RE, Bertram L. 2005. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell.* 120, 545-555.
- Taylor CJ, Nicola PA, Wang S, Barrand MA, Hladky SB. 2006. Transporters involved in regulation of intracellular pH in primary cultured rat brain endothelial cells. *J Physiol.* 576, 769-85.
- 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, 572-80.
- Tha KK, Okuma Y, Miyazaki H, Murayama T, Uehara T, Hatakeyama R, Hayashi Y, Nomura Y. 2000. Changes in expressions of proinflammatory cytokines IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 in the brain of senescence accelerated mouse (SAM) P8. *Brain Res.* 885, 25-31.
- Tomobe K, Nomura Y. 2009. Neurochemistry, neuropathology, and heredity in SAMP8: a mouse model of senescence. *Neurochem Res.* 34, 660-9.
- Trojanowski JQ, Smith AB, Hurn D, Lee VM. 2005. Microtubule-stabilising drugs for therapy of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders with axonal transport impairments. *Expert Opin Pharmacother.* 6, 683-6.
- Tsukita S, Furuse M, Itoh M. 2001. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2, 285-93.
- Tunkel AR, Scheld WM. 1993. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev.* 6, 118-36.



- Tuppo EE, Arias HR. 2005. The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 37, 289-305.
- Tuszynski MH. 2007. Nerve growth factor gene therapy in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 21, 179-89.

## U

- Ueno M, Akiguchi I, Yagi H, Naiki H, Fujibayashi Y, Kimura J, Takeda T. 1993. Age-related changes in barrier function in mouse brain. I. Accelerated age-related increase of brain transfer of serum albumin in accelerated senescence prone SAM-P/8 mice with deficits in learning and memory. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 16, 233-248.
- Ueno M, Akiguchi I, Hosokawa M, Shinnou M, Sakamoto H, Takemura M, Keiichi Higuchi K., 2001a. Age-related changes in the brain transfer of blood-borne horseradish peroxidase in the hippocampus of senescence-accelerated mouse. *Acta Neuropathologica.* 93, 233-240.
- Ueno M, Sakamoto H, Kanenishi K, Onodera M, Akiguchi I, Hosokawa M. 2001b. Ultrastructural and permeability features of microvessels in the hippocampus, cerebellum and pons of senescence-accelerated mice (SAM). *Neurobiol. Aging* 22, 469-478.
- Umeda K, Matsui T, Nakayama M, Furuse K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S. 2004. Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1. *J Biol Chem.* 279, 44785-94.

## V

- Van Dam D, Marescau B, Engelborghs S, Cremers T, Mulder J, Staufenbiel M, De Deyn PP. 2005. Analysis of cholinergic markers, biogenic amines, and amino acids in the CNS of two APP overexpression mouse models. *Neurochem Int.* 46, 409-22.
- Van Dam D, De Deyn PP. 2006. Drug discovery in dementia: the role of rodent models. *Nat Rev Drug Discov.* 5, 956-70.
- van Duijn CM, de Knijff P, Cruts M, Wehnert A, Havekes LM, Hofman A, Van Broeckhoven C. 1994. Apolipoprotein E4 allele in a population-based study of early-onset Alzheimer's disease. *Nature Genetics.* 7, 74-78.

- Van Duinen SG, Maat-Schieman MLC, Bruijn JA, Haan J, Roos RAC. 1995. Cortical tissue of patients with hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (dutch) contains various extracellular matrix deposits. *Lab. Invest.* 73, 183 -189.
- Van Uden E, Mallory M, Veinbergs I, Alford M, Rockenstein E, Masliah E. 2002. Increased extracellular amyloid deposition and neurodegeneration in human amyloid precursor protein transgenic mice deficient in receptor-associated protein. *J Neurosci.* 22, 9298-304.
- Vassar R. 2001. The  $\beta$ -secretase, BACE. A prime target for Alzheimers disease. *J Mol Neurosci.* 17, 157-170.
- Veld BA, Ruitenbergh A, Hofman A, Launer LJ, van Duijn CM, Stijnen T, Breteler MM, Stricker BH. 2001. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 345, 1515-21.
- Verbeek MM, Otte-Höller I, van den Born J, van den Heuvel LP, David G, Wesseling P, de Waal RM. 1999. Agrin is a major heparan sulfate proteoglycan accumulating in Alzheimer's disease brain. *Am J Pathol.* 155, 2115-25.
- Verbeek MM, Van Nostrand WE, Otte-Holler I, Wesseling P, De Waal RM. 2000. Amyloid-beta-induced degeneration of human brain pericytes is dependent on the apolipoprotein E genotype. *Ann N Y Acad Sci.* 903, 187-199.
- Verdile G, Fuller S, Atwood CS, Laws SM, Gandy SE, Martins RN. 2004. The role of beta amyloid in Alzheimer's disease: still a cause of everything or the only one who got caught? *Pharmacol Res.* 50, 397-409.
- Vilaplana J, Lavielle M. 1999. A method to quantify glial fibrillary acidic protein immunoreactivity on the suprachiasmatic nucleus. *J. Neurosci. Meth.* 88, 181-187.
- Vincent I, Zheng JH, Dickson DW, Kress Y, Davies P. 1998. Mitotic phosphoepitopes precede paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 19, 287-96.
- Vinters HV, Secor DL, Read SL, Frazee JG, Tomiyasu U, Stanley TM, Ferreira JA, Akers MA. 1994. Microvasculature in brain biopsy specimens from patients with Alzheimer's disease: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Ultrastruct Pathol.* 18, 333-348.
- Visser PJ, Scheltens P, Verhey FR. 2005. Do MCI criteria in drug trials accurately identify subjects with predementia Alzheimer's disease? *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 76, 1348-54.
- von Arnim CA, Kinoshita A, Peltan ID, Tangredi MM, Herl L, Lee BM, Spoelgen R, Hshieh TT, Ranganathan S, Battey FD, Liu CX, Bacskai BJ, Sever S, Irizarry MC,

Strickland DK, Hyman BT. 2005. The low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is a novel beta-secretase (BACE1) substrate. *J Biol Chem.* 280, 17777-85.

- Von braunmuhl A. 1956. Kongophile Angiopathie und senile Plaques bei greisen Hunden. *Arch Psychiatr Nervenkr Z Gesamte Neurol Psychiatr.* 194, 396-414.
- Vorbrodt AW. 1988. Ultrastructural cytochemistry of blood-brain barrier endothelia. *Prog Histochem Cytochem.* 18, 1-99.

## W

- Wallace DC. 1999. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science.* 283, 1482-1488.
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ. 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature.* 416, 535-9.
- Walsh DM, Selkoe DJ. 2007. A beta oligomers -- a decade of discovery. *J Neurochem.* 101, 1172-1184.
- Wang D, Pascual JM, Yang H, Engelstad K, Mao X, Cheng J, Yoo J, Noebels JL, De Vivo DC. 2006. A mouse model for Glut-1 haploinsufficiency. *Hum Mol Genet.* 15, 1169-79.
- Wang HY, Lee DH, D'Andrea MR, Peterson PA, Shank RP, Reitz AB. 2000.  $\beta$ -Amyloid (1-42) binds to  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor with high affinity: implications for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem.* 275, 5626-5632.
- Wang J, Dickson DW, Trojanowski JQ, Lee VM. 1999. The levels of soluble versus insoluble brain A distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. *Exp. Neurol.* 158, 328-337.
- Wang J, Markesbery WR, Lovell MA. 2006. Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in mild cognitive impairment. *J Neurochem.* 96, 825-832.
- Weber C, Fraemohs L, Dejana E. 2007. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol.* 7, 467-77.
- Welsh GI, Wilson C, Proud CG. 1996. GSK3: a SHAGGY frog story. *Trends Cell Biol.* 6, 274-9.
- Wiese AG, Pacifici RE, Davies KJ. 1995. Transient adaptation of oxidative stress in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys.* 318, 231-40.
- Willem M, Dewachter I, Smyth N, Van Dooren T, Borghgraef P, Haass C, Van Leuven F. 2004. Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 increases

amyloid deposition in brain parenchyma but reduces cerebrovascular amyloid angiopathy in aging BACE x APP[V717I] double-transgenic mice. *Am J Pathol.* 165, 1621-31.

- Williams TI, Lynn BC, Markesbery WR, Lovell MA. 2006. Increased levels of 4-hydroxynonenal and acrolein, neurotoxic markers of lipid peroxidation, in the brain in Mild Cognitive Impairment and early Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 27, 1094-9.
- Williamson J, Goldman J, Marder KS. 2009. Genetic aspects of Alzheimer disease. *Neurologist.* 15, 80-6.
- Wisniewski T, Frangione B. 1992. Apolipoprotein E: a pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid. *Neurosci Lett.* 135, 235-8.
- Witt KA, Mark KS, Hom S, Davis TP. 2003. Effects of hypoxia-reoxygenation on rat blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 285, H2820-31.
- Wittchen ES, Haskins J, Stevenson BR. 1999. Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. *J Biol Chem.* 274, 35179-85.
- Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Kraus J, Rascher-Eggstein G, Liebner S, Hamm S, Duffner F, Grote EH, Risau W, Engelhardt B. 2003. Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol.* 105, 586-92.
- Wolman M, Klatzo I, Chui E, Wilmes F, Nishimoto K, Fujiwara K, Spatz M. 1981. Evaluation of the dye-protein tracers in pathophysiology of the blood-brain barrier. *Acta Neuropathol.* 54, 55-61.
- Wong V. 1997. Phosphorylation of occludin correlates with occludin localization and function at the tight junction. *Am J Physiol.* 273, C1859-67.
- Wu Z, Guo H, Chow N, Sallstrom J, Bell RD, Deane R, Brooks AI, Kanagala S, Rubio A, Sagare A, Liu D, Li F, Armstrong D, Gasiewicz T, Zidovetzki R, Song X, Hofman F, Zlokovic BV. 2005. Role of the MEOX2 homeobox gene in neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. *Nat Med.* 11, 959-65.
- Wyss-Coray T, Mucke L. 2002. Inflammation in neurodegenerative disease -- a double-edged sword. *Neuron.* 35, 419-432.

## Y

- Yagi H, Irino M, Matsushita T, Katoh S, Umezawa M, Tsuboyama T, Hosokawa M, Akiguchi I, Tokunaga R, Takeda T. 1989. Spontaneous spongy degeneration of the brain stem in SAM-P/8 mice, a newly developed memory-deficient strain. *J Neuropathol Exp Neurol.* 48, 577-90.
- Yamamoto M, Ramirez SH, Sato S, Kiyota T, Cerny RL, Kaibuchi K, Persidsky Y, Ikezu T. 2008. Phosphorylation of claudin-5 and occludin by rho kinase in brain endothelial cells. *Am J Pathol.* 172, 521-33.
- Yamamoto T, Harada N, Kawano Y, Taya S, Kaibuchi K. 1999. In vivo interaction of AF-6 with activated Ras and ZO-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 259, 103-7.
- Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, Slattery T, Zhao L, Nagashima M, Morser J, Migheli A, Nawroth P, Stern D, Schmidt AM. 1996. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature.* 382, 685-91.
- Yang F, Ueda K, Chen P, Ashe KH, Cole GM. 2000. Plaque-associated a-synuclein (NACP) pathology in aged transgenic mice expressing amyloid precursor protein. *Brain Res.* 853, 381-383.
- Yang Y, Geldmacher DS, Herrup K. 2001. DNA replication precedes neuronal cell death in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 21, 2661-2668.
- Yang Y, Mufson EJ, Herrup K. 2003. Neuronal cell death is preceded by cell cycle events at all stages of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 23, 2557-63.
- Yang Y, Herrup K. 2007. Cell division In the CNS: Protective response or lethal event in post-mitotic neurons? *Biochim Biophys Acta.* 1772, 457-466.
- Yasui F, Ishibashi M, Matsugo S, Shosuke Kojoc, Oomura Y, Sasaki K. 2003. Brain lipid hydroperoxide level increases in senescence-accelerated mice at an early age. *Neuroscience Letters.* 350, 66-68.
- Yeung D, Manias JL, Stewart DJ, Nag S. 2008. Decreased junctional adhesion molecule-A expression during blood-brain barrier breakdown. *Acta Neuropathol.* 115, 635-42.

## Z

- Zekanowski C, Wojda U. 2009. Aneuploidy, chromosomal missegregation, and cell cycle reentry in Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol Exp.* 69, 232-253.

- Zhang B, Maiti A, Shively S, Lakhani F, McDonald-Jones G, Bruce J, Lee EB, Xie SX, Joyce S, Li C, Toleikis PM, Lee VM, Trojanowski JQ. 2005. Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model. *Proc Natl Acad Sci.* 102, 227-31.
- Zhao BQ, Wang S, Kim HY, Storrie H, Rosen BR, Mooney DJ, Wang X, Lo EH. 2006. Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke. *Nat Med.* 12, 441-5.
- Zhong Y, Enomoto K, Isomura H, Sawada N, Minase T, Oyamada M, Konishi Y, Mori M. 1994. Localization of the 7H6 antigen at tight junctions correlates with the paracellular barrier function of MDCK cells. *Exp Cell Res.* 214, 614-20.
- Zhu X, Raina AK, Smith MA. 1999. Cell cycle events in neurons. Proliferation or death? *Am J Pathol.* 155, 327-9.
- Zhu X, Rottkamp CA, Raina AK, Brewer GJ, Ghanbari HA, Boux H, Smith MA. 2000. Neuronal CDK7 in hippocampus is related to aging and Alzheimer disease. *Neurobiol Aging.* 21, 807-13.
- Zhu X, Raina AK, Perry G, Smith MA. 2004. Alzheimer's disease: the two-hit hypothesis. *Lancet Neurol.* 3, 219-226.
- Zhu Y, Lee CC, Lam WP, Wai MS, Rudd JA, Yew DT. 2007. Cell death in the Purkinje cells of the cerebellum of senescence accelerated mouse (SAMP(8)). *Biogerontology.* 8, 537-44.
- Zlokovic BV. 1996. Cerebrovascular transport of Alzheimer's amyloid beta and apolipoproteins J and E: possible anti-amyloidogenic role of the blood-brain barrier. *Life Sci.* 59, 1483-1497.
- Zlokovic BV. 2005. Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 28, 202-8.
- Zlokovic BV. 2006. Remodeling after stroke. *Nat Med.* 12, 390-1.
- Zlokovic BV. 2008. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron.* 57, 178-201.
- Zlotnik A, Gurevich B, Tkachov S, Maoz I, Shapira Y, Teichberg VI. 2007. Brain neuroprotection by scavenging blood glutamate. *Exp Neurol.* 203, 213-20.

