



# ALTERACIONES DE LOS ASTROCITOS EN EL ENVEJECIMIENTO Y EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Tesis doctoral presentada por

SILVIA GARCÍA MATAS

para optar al grado de

**Doctor por la Universidad de Barcelona**

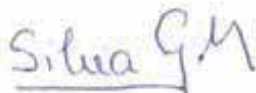
Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. Rosa Cristòfol y la Dra. Coral Sanfeliu en el Departamento de Isquemia Cerebral y Neurodegeneración del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB, CSIC-IDIBAPS).

Tesis adscrita al Departamento de Biología Celular, Inmunología y Neurociencias de la Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona.

Programa de Neurociencias, bienio 2004-2006.

Barcelona, noviembre de 2009

**Firma de la interesada:**



SILVIA GARCIA MATAS

**Firma del tutor:**



Dr. JORDI ALBERCH VIÉ

Catedrático de universidad. Departamento de Biología Celular, Inmunología y Neurociencias de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona.

**Firma de los directores de la tesis:**



Dra. ROSA CRISTÒFOL MARTÍNEZ  
Científico titular



Dra. CORAL SANFELIU PUJOL  
Investigador Científico

Departamento de Isquemia Cerebral y Neurodegeneración  
IIBB, CSIC-IDIBAPS

Este trabajo ha sido realizado dentro del proyecto del Instituto de Salud Carlos III (PI-030467) titulado "Alteraciones de la función neuroprotectora de los astrocitos activados en el envejecimiento y la enfermedad de Alzheimer" y del proyecto del Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2006-13092-C02-02) titulado "Mecanismos de envejecimiento cerebral: papel de GSK3 $\beta$ /CDK5 y de las sirtuinas en cultivos de neuronas y astrocitos".

Silvia García Matas ha recibido una beca predoctoral de *Formació de Personal Investigador* de la Generalitat de Catalunya (FI) entre los años 2005 y 2008.

A los que me han acompañado en mi camino  
a los que he acompañado en el suyo,  
y a mis siempre incondicionales acompañantes...  
mis padres.

Si el cerebro fuese tan sencillo que  
nosotros pudiésemos comprenderlo,  
nosotros seríamos tan sencillos que  
no podríamos entenderlo.

*Albert Einstein* (científico, 1879-1955)

Queda prohibido no sonreír a los problemas,  
no luchar por lo que quieres,  
abandonar todo por miedo,  
no convertir en realidad tus sueños.

*Pablo Neruda* (poeta, 1904-1973)

La tesis que tenéis entre vuestras manos es el resultado de cinco años de trabajo durante los que he compartido muchas vivencias. Me gustaría expresar en estas líneas toda mi gratitud a las personas que han compartido mi camino durante este tiempo ya que sin todos vosotros la realización de este sueño no hubiera sido posible.

En primer lugar quería dar las gracias a mis directoras de tesis, la Dra. Rosa Cristòfol y la Dra. Coral Sanfeliu. Gracias por darme la oportunidad de unirme a vuestro grupo de investigación y realizar esta tesis, por vuestros consejos y ayuda durante estos años. Gracias Rosa por escucharme y animarme en la escritura de esta tesis. Gracias Coral por la energía que me has transmitido y tu entusiasmo por la ciencia.

Gracias a todos los compañeros y amigos del Departamento de Isquemia Cerebral y Neurodegeneración, que son las personas con las que he compartido esta experiencia y han convivido conmigo cada día, en momentos buenos, alegrías y penas, ilusiones y desencuentros. Compartir con vosotros todos estos momentos ha sido un verdadero placer y un bonito viaje del que me llevo un montón de gratos recuerdos. En primer lugar quería agradecer a todos los que han formado parte de nuestro grupo de Neurodegeneración y envejecimiento en el laboratorio 607. A María gracias por darme la bienvenida al grupo y ayudarme en mis primeros Westerns. A Cristina por tu alegría y simpatía y por compartir conmigo muchos momentos tanto dentro como fuera del laboratorio, te deseo que tengas mucha suerte y disfrutes haciendo tu tesis. A Raquel, gracias por tu entusiasmo y ganas de aprender, por acompañarme a mi primer partido de baloncesto y apoyarme en los momentos difíciles, te deseo también mucho éxito en la realización de tu tesis. A Jessica, quiero agradecerte tu cariño y tu ayuda en mis experimentos, eres muy especial y te deseo que llegues a ser una gran médica. A Yoelvis, gracias por tu simpatía y buen carácter, tu alegría nos ha contagiado a todos, te deseo mucha suerte y que disfrutes haciendo la tesis. A Susana, gracias por tu simpatía en el trabajo, te deseo también mucha suerte en la realización de tu tesis. A Elisenda, gracias por apoyarme estos últimos meses en la realización de la tesis, felicidades por tu futura maternidad. A Albert Parull, gracias por tu ayuda en el laboratorio.

También quiero agradecer a los compañeros en prácticas que han compartido laboratorio durante estos años, os deseo lo mejor en vuestro futuro.

A mis otros compañeros y amigos del laboratorio 607. A Jero, gracias por tu amistad durante todos estos años, por los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio, por apoyarme en los momentos difíciles que los que nos dedicamos a la ciencia padecemos a veces. Te deseo lo mejor en la realización de tu tesis y que consigas lo que te propones. A Laura, por tu simpatía y alegría que nos ha hecho disfrutar de buenos momentos juntas estos años. Suerte en la lectura de tu tesis este mes de noviembre. A Lola, Esther, Silvia, Anghara gracias por los momentos que hemos compartido juntas en el laboratorio durante estos años.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 610 de isquemia cerebral. A Noelia, gracias por tu amistad, por todo el cariño que me has regalado, por escucharme, comprenderme y ayudarme, gracias por todos los momentos compartidos, las ilusiones y confianzas; te deseo lo mejor en tu futuro. A Fernando, gracias por tantos buenos recuerdos, por tu amistad, por ayudarme con los experimentos in vivo, eres una persona fantástica, generosa y leal, también te deseo mucha suerte y que consigas lo que te propones. A Esther Pozas, gracias por tus consejos y apoyo durante estos años, te deseo que tu pasión por la ciencia siga adelante y te de muchos frutos. A Miriam, gracias por tu simpatía y porque siempre dedicas palabras amables a los que te rodean, te deseo que disfrutes mucho realizando la tesis. A Anna Serra, gracias por tu buen humor y los buenos momentos que hemos compartido juntas, te deseo lo mejor y que pronto leas tu tesis. A Leo, gracias por la alegría y optimismo que contagias por el laboratorio, espero que todo te vaya muy bien. A David te agradezco las charlas que hemos compartido y los buenos consejos que me has dado, te deseo que disfrutes en todo lo que haces. A Rebeca, gracias por tu simpatía y todas las vivencias compartidas, te deseo que sigas contagiando tu alegría y tengas mucha suerte en tu futuro. A M<sup>a</sup> Eugenia, gracias por todos tus consejos, tus confianzas y por tu sensibilidad, espero que encuentres lo que buscas. También quería agradecer vuestra ayuda a Isabel, Roser, Xevi, Raul, Santi, Abraham, Felix, Ester Verdager, Paqui y Amanda.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 613. A Nuria gracias por los momentos compartidos tanto dentro como fuera del laboratorio, te deseo mucha suerte en la realización de tu tesis. A Aroa gracias por tu simpatía y los buenos momentos compartidos, espero que sigas disfrutando con lo que haces. A Pilar, gracias por tu alegría y tu sonrisa contagiosa espero que el futuro sea como deseas. A Kamil gracias por compartir muy buenos ratos juntas y a Marco por tu buen humor en todo momento.

A todos los compañeros del Departamento a los que admiro y me han animado en la realización de esta tesis trabajando juntos: al Dr. Eduard Rodriguez, a la Dra. Anna Planas, al Dr. Joan Serratosa, a la Dra. Nuria de Vera, al Dr. Tomás Santalucia, a la Dra Came Solà, al Dr. Josep Saura, a la Dra. Valèrie Petenief, a la Dra. Lluïsa Camón y al Dr. Carles Justicia.

A la Dra. Cristina Suñol y su grupo, por ayudarme en la realización de esta tesis y compartir juntos las sesiones científicas que resolvían muchas de mis dudas y me creaban algunas nuevas. Especialmente gracias a Iolanda, Zoila y Mireia.

Al Dr. Paco Artigas y su grupo, gracias por permitirme aprender con vosotros la cirugía cerebral en especial quiero agradecer al Dr. Albert Adell su dedicación, cariño y paciencia conmigo al enseñarme a trabajar por primera vez con animales in vivo. Gracias a Mercè, Xavi, Analia y Judith por ayudarme en mis primeras operaciones.

Gracias a las técnicas del servicio de histología del IIBB, especialmente a M<sup>a</sup> Ángeles y a Silvia que me han ayudado mucho con todas las preparaciones histológicas y las tinciones inmunohistoquímicas.

También al resto de compañeros de departamentos del IIBB, gracias a todos por los momentos compartidos durante estos maravillosos años. A todas las personas que cuando me he cruzado con ellos en los pasillos me han saludado y me han dedicado una sonrisa.

Gracias a las Dra. Teresa Rodrigo y la Dra. Victoria Chamizo por su paciencia al enseñarme comportamiento animal en el laboratorio animal de la Facultad de Psicología. A Pep Marimon por ayudarme con los experimentos en el laberinto acuático de Morris por ser tan simpático y generoso con todos. Gracias a Roser por tus consejos en el laboratorio y tu ayuda con los animales en el estabulario.

Gracias a la Dra. Arancha Ortega por sus consejos en las técnicas de histología de nuestro modelo de rata de Alzheimer y a la Dra. Lydia Giménez por su entusiasmo en el estudio del comportamiento animal que se contagia a su alrededor y nos animaba en nuestras reuniones científicas.

Gracias al Dr. Rafael del Cabo y todo su equipo de investigación del Laboratory of Experimental Gerontology del NIH en Baltimore. Por acogerme en su grupo y hacerme sentir como en casa en un país extranjero. Gracias a Evelyn, a Jack, a Kevin y a Robin por los viajes compartidos y por no hacerme sentir nunca sola.

Al Dr. Pere Mir, gracias por animarme a dedicarme a la ciencia durante estos años y apoyarme en la realización de esta tesis.

A los animales que han dado la vida por la investigación, gracias a vosotros, nuestro conocimiento avanza y espero que ayude a que todos podamos vivir sanos más tiempo. Espero que ahora disfruteis de un destino en libertad...

Este camino no lo hubiera podido recorrer sin el apoyo, el cariño, la ayuda y la comprensión de muchas personas que no se dedican a la ciencia pero que han sido muy importantes durante estos años.

A mis amigos de la biblioteca Canyelles, a Dolors por tu amistad desde que era una niña, por tu apoyo, por animarme y aconsejarme en tantos momentos en que te he pedido ayuda. A Francesc, a Maite, a Dani, a Maria, a Susana, a Pau, a Francisco y a Victor gracias por todos los buenos ratos vividos estos años.



A Sonia gracias por tu amistad desde la universidad, por tu alegría, tus consejos, las fiestas juntas, las confidencias, las ilusiones compartidas; no dejes nunca de ser como eres. A Laura, por tu sensibilidad, tu bondad, tu cariño, los viajes compartidos en los que hemos descubierto nuevos caminos, espero que sigamos descubriéndolos juntas.

A Fraçoise Birkigt, gracias por ser una gran amiga, animarme a estudiar y apoyarme desde que era una niña, por enseñarme a ver la vida con ojos nuevos y a apreciar la naturaleza.

A mis abuelos y la familia que me ha apoyado para seguir con mis estudios. A mi abuelito Antonio que aunque no está, sé que me está viendo y disfrutaría mucho leyendo otro libro esta vez escrito por su nieta, gracias por el cariño que me dedicaste y tus consejos que ahora aprecio más que nunca. A mi abuela Trinidad que siempre me ha animado a seguir adelante tanto en los buenos como los malos momentos, verte y hablar contigo me enseña cada día a apreciar la vida. A Oliva, M<sup>a</sup> del Mar, Ricardo y M<sup>o</sup> Teresa por apoyarme en mis estudios, escucharme y compartir juntos muchos buenos momentos.

Quiero dedicar esta tesis a mis padres, Antonio y Juana: por todo el amor que me habéis dado sin condiciones. Por apoyarme siempre, por los momentos vividos que nunca olvidaré, por hacerme sentir siempre querida y por hacerme ver nuevos horizontes con ojos abiertos. Gracias por compartir conmigo la ilusión de hacer esta tesis. Gracias por enseñarme que el esfuerzo y el trabajo son el mejor camino para realizar tus sueños. Gracias por creer en mí desde el principio. ¡Os quiero muchísimo!

Y finalmente, a todos aquellos que de alguna manera u otra me han ayudado, aunque su nombre no figure en estas líneas, sin vosotros tampoco habría sido posible.

Gracias a todos, me siento muy afortunada de haberos conocido, a todos y cada uno de vosotros, nos vemos por el camino...

# ÍNDICE

---

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. EL ENVEJECIMIENTO.....</b>	<b>2</b>
1.1 DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS .....	2
1.2 TEORÍAS DEL ENVEJECIMIENTO .....	3
1.2.1 Teorías evolutivas .....	3
1.2.1.1 Teoría de la mutación acumulada .....	4
1.2.1.2 Teoría de pleiotropía antagonística .....	4
1.2.1.3 Teoría del soma desechable.....	4
1.2.2 Teorías estocásticas .....	4
1.2.2.1 Teoría de la mutación somática y reparación del DNA.....	4
1.2.2.2 Teoría de los radicales libres/ estrés oxidativo y daño mitocondrial.....	5
1.2.3 Teorías del desarrollo y genéticas .....	8
1.2.3.1 Teoría de los genes determinantes de la longevidad .....	8
1.2.3.2 Teoría de los síndromes de envejecimiento acelerado.....	9
1.2.3.3 Teoría neuroendocrina.....	10
1.2.3.4 Teoría inmunológica.....	11
1.2.3.5 Teoría de la senescencia celular .....	11
1.3 ENVEJECIMIENTO CEREBRAL .....	12
1.3.1 Cambios macroscópicos.....	12
1.3.2 Cambios microscópicos.....	13
1.3.3 Cambios moleculares .....	14
1.3.3.1 Factores de crecimiento .....	14
1.3.3.2 Suministro energético .....	15
1.3.3.3 Excitotoxicidad .....	16
1.3.3.4 Homeostasis del calcio.....	16
1.3.3.5 Estrés oxidativo.....	18
<b>2 LA MEMORIA Y EL APRENDIZAJE ESPACIAL.....</b>	<b>28</b>
2.1 DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LA MEMORIA .....	28
2.2 CARACTERÍSTICAS DE LA MEMORIA Y EL APRENDIZAJE ESPACIAL .....	28
2.3 EL HIPOCAMPO.....	30
2.3.1 Estructura interna del hipocampo.....	30
2.3.1.1 Zonas histológicas .....	31
2.3.1.2 Conexiones hipocampales.....	33
2.3.2 El hipocampo y la memoria espacial .....	36
2.3.2.1 Estudio de las bases neuroanatómicas del aprendizaje espacial .....	36
2.3.2.2 Sistemas de neurotransmisión y aprendizaje espacial.....	39
2.3.2.3 Cambios en el aprendizaje espacial durante el envejecimiento .....	40

<b>3 LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER .....</b>	<b>42</b>
3.1 DEFINICIÓN .....	42
3.2 TEORÍAS SOBRE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER .....	42
3.2.1 Hipótesis amiloidea .....	42
3.2.1.1 Factores genéticos.....	44
3.2.2 Hipótesis Tau .....	46
3.2.3 Hipótesis colinérgica .....	48
3.3 FACTORES DE RIESGO Y DESENCADENANTES.....	48
3.3.1 La edad.....	48
3.3.2 Hipercolesterolemia.....	49
3.3.3 Diabetes.....	49
3.3.4 Inflamación .....	50
3.3.5 Estrés oxidativo.....	50
3.4 NEUROPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER .....	53
3.4.1 Aspectos macroscópicos.....	53
3.4.2 Aspectos microscópicos .....	53
3.4.2.1 Los depósitos de beta-mieloides .....	55
3.4.2.2 Procesamiento de APP .....	57
3.4.2.3 A $\beta$ fibrilar .....	58
3.4.3.4 A $\beta$ soluble .....	59
3.4.3.5 Ovillos neurofibrilares y PHF de la proteína tau .....	60
3.4.3.6 La proteína tau .....	60
3.4.3.7 La fosforilación de tau .....	62
<b>4 LOS ASTROCITOS .....</b>	<b>66</b>
4.1 DESCRIPCIÓN .....	66
4.2 MARCADORES.....	66
4.3 FUNCIONES.....	69
4.3.1 Neurogénesis y sinaptogénesis.....	69
4.3.2 Mantenimiento de la homeostasis iónica .....	69
4.3.3 Formación de la barrera hematoencefálica .....	71
4.3.4 Control del flujo sanguíneo .....	72
4.3.5 Regulación del metabolismo energético .....	72
4.3.6 Función anticitotóxica .....	74
4.3.6.1 Captación de glutamato .....	74
4.3.6.2 Función antioxidante .....	74
4.3.7 Función neurotrófica .....	75
4.3.8 Regulación de la transmisión sináptica .....	76
4.3.9 Función inmunológica.....	78
4.4 LOS ASTROCITOS EN EL ENVEJECIMIENTO .....	79
4.5 LOS ASTROCITOS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	80
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>82</b>
<b>1. OBJETIVOS.....</b>	<b>83</b>
1.1 OBJETIVO GENERAL .....	83
1.2. OBJETIVOS CONCRETOS .....	83

<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>84</b>
<b>1. CULTIVOS CELULARES .....</b>	<b>85</b>
1.1 CULTIVOS DE ASTROCITOS DE RATA Y RATÓN .....	85
1.2 CULTIVOS DE NEURONAS DE RATA Y RATÓN .....	86
1.3 COCULTIVOS DE NEURONAS Y ASTROCITOS DE RATA Y RATÓN .....	87
<b>2. MÉTODOS DE MEDIDA DE VIABILIDAD NEURONAL.....</b>	<b>88</b>
2.1 TINCIÓN DE CÉLULAS MUERTAS .....	88
2.2 TINCIÓN INMUNOCITOQUÍMICA Y TINCIÓN CON BISBENZIMIDA .....	88
<b>3. MÉTODO DE MEDIDA DE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL.....</b>	<b>89</b>
3.1 ENSAYO DE MTT .....	89
<b>4. MÉTODO DE MEDIDA DE CAMBIOS DE POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL .....</b>	<b>90</b>
4.1 TINCIÓN CON RODAMIDA 123 .....	91
<b>5. MÉTODO DE MEDIDA DE CAPTACIÓN DE GLUTAMATO .....</b>	<b>91</b>
5.1 DETERMINACIÓN DE LA CAPTACIÓN DE [ <sup>3</sup> H] GLUTAMATO EN ASTROCITOS.....	91
<b>6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT .....</b>	<b>92</b>
6.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES .....	92
6.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS .....	92
6.3 WESTERN-BLOT.....	93
6.3.1 Preparación de muestras .....	94
6.3.2 SDS- PAGE (SDS- <i>PoliAcrylamide Gel Electrophoresis</i> ).....	94
6.3.3 Transferencia por electroblotting .....	95
6.3.4 Inmunoblot.....	95
6.3.5 Detección por quimioluminiscencia.....	96
6.3.6 Análisis por densitometría.....	96
<b>7. PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS .....</b>	<b>97</b>
7.1 INFUSIÓN INTRACRANEAL AGUDA.....	97
7.2 INFUSIÓN CRÓNICA INTRACEREBROVENTRICULAR CON MINIBOMBAS OSMÓTICAS .....	98
<b>8. PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO .....</b>	<b>99</b>
8.1 LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS .....	99
<b>9. DISECCIÓN DEL CEREBRO E HISTOLOGÍA.....</b>	<b>101</b>
9.1 DISECCIÓN DEL CEREBRO PARA CORTES DE CRIOSTATO .....	101
9.2 HISTOLOGÍA PARA CORTES DE CRIOSTATO.....	101
9.3 DISECCIÓN DEL CEREBRO PARA CORTES DE MICRÓTOMO .....	102
9.3.1 Sacrificio y perfusión de los animales .....	102
9.3.2 Deshidratación e inclusión de los bloques .....	102
9.3.3 Cortes en micrótomo .....	102
9.4 HISTOLOGÍA PARA CORTES DE MICRÓTOMO .....	102
9.4.1 Tinción con tioflavina .....	102
9.4.2 Tinción con fluorojade .....	103
9.4.3 Tinción PERL's prussian blue.....	103
9.4.4 Histoquímica con lectina de tomate .....	104
9.4.5 Inmunohistoquímica .....	104
9.5 DISECCIÓN DEL CEREBRO PARA CORTES DE VIBRÁTOMO .....	108
9.5.1 Sacrificio y perfusión de los animales .....	108
9.5.2 Cortes en vibrátomo .....	108
9.6 HISTOLOGÍA PARA CORTES DE VIBRÁTOMO .....	108
9.6.1 Inmunohistoquímica .....	108

<b>RESULTADOS.....</b>	<b>110</b>
1. <b>PRIMER ARTÍCULO</b>	
Astrocytes aged in vitro show a decreased neuroprotective capacity <i>Journal of Neurochemistry</i> , 2007, <b>101</b> , 794-80 .....	<b>111</b>
2. <b>SEGUNDO ARTÍCULO</b>	
Dysfunction of astrocytes in senescence-accelerated mice SAMP8 reduce their neuroprotective capacity <i>Aging Cell</i> , 2008, <b>7</b> , 630-640 .....	<b>125</b>
3. <b>TERCER ARTÍCULO</b>	
Expression of GDNF transgene in astrocytes improves cognitive déficits in aged rats <i>Neurobiology of Aging</i> , 2008, <b>29</b> , 1366-1379.....	<b>138</b>
4. <b>CUARTO ARTÍCULO</b>	
In vitro and in vivo activation of astrocytes by beta amyloid is potentiated by prooxidant agents Aceptado en <i>Journal of Alzheimer's Disease</i> .....	<b>154</b>
 <b>DISCUSIÓN.....</b>	 <b>190</b>
 <b>CONCLUSIONES.....</b>	 <b>200</b>
 <b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	 <b>202</b>

---

## ABREVIATURAS

---

<b>A<math>\beta</math></b>	péptido $\beta$ -amiloide
<b>ADN</b>	ácido desoxiribonucleico
<b>ADNmt</b>	ácido desoxiribonucleico mitocondrial
<b>AHP</b>	hiperpolarización (de <i>afterhyperpolarization</i> )
<b>ApoE</b>	apolipoproteína E
<b>APP</b>	proteína precursora de $\beta$ -amiloide
<b>ATP</b>	adenosina trifosfato
<b>BACE</b>	$\beta$ -secretasa (de <i><math>\beta</math>-amyloid cleaving enzyme</i> )
<b>BAD</b>	de <i>bcl-2 family member protein</i>
<b>BDNF</b>	factor neurotrófico derivado del cerebro ( <i>brain-derived neurotrophic factor</i> )
<b>BHE</b>	barrera hematoencefálica
<b>BSA</b>	albúmina sérica bovina (de <i>bovine serum albumin</i> )
<b>BSO</b>	butionina sulfoximina
<b>CA</b>	cuernos de Amón
<b>CaMKII</b>	calcio calmodulina proteína quinasa dependiente II
<b>CDK5</b>	quinasa dependiente de ciclina 5
<b>CREB</b>	de <i>cAMP response element binding protein</i>
<b>DIV</b>	días in vitro
<b>DMEM</b>	Medio Eagle modificado por Dulbecco (de <i>Dulbecco's Modified Eagle medium</i> )
<b>EA</b>	enfermedad de Alzheimer
<b>Erk</b>	quinasas reguladas extracelularmente
<b>FBS</b>	suero fetal bovino (de <i>foetal bovine serum</i> )
<b>FGF</b>	factores de crecimiento de fibroblasto (de <i>fibroblast growth factor</i> )
<b>GD</b>	giro dentado

---

---

<b>GDNF</b>	factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (de <i>glial cell-derived</i> )
<b>GFAP</b>	proteína ácida fibrilar glial
<b>GLAST</b>	glutamato/aspartato transportador
<b>GLT1</b>	transportador de glutamato 1
<b>GPX</b>	glutación peroxidasa
<b>GSH</b>	glutación
<b>GST</b>	glutación s- transferasa
<b>GSK-3</b>	glucógeno sintasa quinasa-3
<b>GSSG</b>	glutación oxidado
<b>HNE</b>	4- hidroxí-2-nonenal
<b>hTGFβ1</b>	factor crecimiento transformante β1 humano ( de <i>human Transforming growth factor beta 1</i> )
<b>IGF</b>	factor de crecimiento de la insulina (de <i>insulin growth factor</i> )
<b>IL</b>	interleukina
<b>iNOS</b>	óxido nítrico sintasa inducible
<b>JAK</b>	janus quinasa
<b>LTD</b>	depresión a largo plazo (de <i>long-term depression</i> )
<b>LTP</b>	potenciación a largo plazo (de <i>long-term potentiation</i> )
<b>MAP</b>	proteína asociada a microtúbulos
<b>MARK</b>	quinasa reguladora de afinidad entre MAPs/ microtúbulos
<b>MDA</b>	malondialdehído
<b>MHC</b>	complejo mayor de histocompatibilidad
<b>NADH</b>	dinucleótico adenina nicotina reducido
<b>NADPH</b>	nicotiamida-adenina dinucleotido fosfato reducido
<b>NGF</b>	factor de crecimiento nervioso (de <i>nerve growth factor</i> )
<b>NKCC</b>	cotransportador Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -2Cl <sup>-</sup>

---

<b>NMDA</b>	receptor N-metil-D-aspartato
<b>NOS</b>	óxido nítrico sintasa
<b>NPDPK</b>	quinasas no dirigidas por prolina
<b>NT</b>	neurotrofina
<b>8-OHdG</b>	8-hidroxi-2-deoxiguanosina
<b>ONF</b>	ovillos neurofibrilares
<b>pABA</b>	ácido paraaminobenzoico
<b>PDPK</b>	quinasas dirigidas por prolina
<b>PHFs</b>	filamentos de forma helicoidal (de <i>paired helicoidal filaments</i> )
<b>PKA</b>	proteína quinasa A dependiente de AMPcíclico
<b>PKC</b>	proteína quinasa C
<b>PP1</b>	proteína fosfatasa 1 (de <i>protein phosphatase 1</i> )
<b>PP2B</b>	proteína fosfatasa 2B o calcineurina
<b>PPA</b>	proteína precursora de péptido $\beta$ -amiloide
<b>PRRs</b>	receptores de reconocimiento de patógenos
<b>PS</b>	presinilina
<b>PVDF</b>	de <i>polyvinylidene fluoride</i>
<b>RC</b>	restricción calórica
<b>ROS</b>	especies reactivas de oxígeno
<b>SAM</b>	ratones de senescencia acelerada (de <i>senescence accelerate mice</i> )
<b>SAMP</b>	de <i>senescence accelerate mice prone</i>
<b>SAMR</b>	de <i>senescence accelerate mice resistance</i>
<b>sAPP</b>	fragmentos de proteína precursora de $\beta$ -amiloide solubles
<b>SBTI</b>	inhibidor de tripsina (de <i>Soybean Trypsin Inhibitor</i> )
<b>SNC</b>	sistema nervioso central
<b>SOD</b>	superóxido dismutasa
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	factores de crecimiento transformante $\alpha$ (de <i>transforming growth factor <math>\alpha</math></i> )



<b>TGF-<math>\beta_1</math></b>	factores de crecimiento transformante $\beta_1$ ( <i>de transforming growth factor- <math>\beta_1</math></i> )
<b>Th</b>	células T CD4 helper
<b>THR</b>	treonina
<b>TLR</b>	receptores de tipo Toll
<b>TNF</b>	factor de necrosis de tumor
<b>VOCC</b>	canales de calcio dependientes de voltaje ( <i>de voltage-operated <math>Ca^{2+}</math> channels</i> )

# INTRODUCCIÓN



El tema de esta tesis ha sido el estudio de los mecanismos de neurodegeneración asociados al envejecimiento cerebral y el papel que desempeñan los astrocitos como neuroprotectores utilizando modelos animales *in vitro* e *in vivo*. Los astrocitos son las células más abundantes del cerebro y su función es muy importante, además de dar soporte trófico a las neuronas tienen una función anticitotóxica y modulan la actividad neuronal. El papel de los astrocitos y su activación en el envejecimiento es un proceso poco conocido. Por eso nuestro trabajo ha seguido esta línea de investigación porque un mayor conocimiento de esta célula glial puede ayudarnos a entender los cambios fisiopatológicos que conlleva el paso de los años en el cerebro humano. El envejecimiento cerebral es un factor de riesgo de enfermedades neurodegenerativas y nuestro laboratorio está especialmente interesado en el estudio de la enfermedad de Alzheimer por su alta incidencia en la población de edad avanzada.

## 1. EL ENVEJECIMIENTO

---

### 1.1 DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS

---

Denham Harman, biogerontólogo padre de la teoría de los radicales libres, postuló que el envejecimiento es el resultado de la acumulación de cambios en el organismo que ocurren a lo largo del paso del tiempo y que causan un incremento en la probabilidad de enfermedad y muerte del individuo. Bernard Strehler, gerontólogo americano, definió el envejecimiento como un proceso universal que ocurre en todas las especies, intrínseco cuyo origen debe ser endógeno y no depende de factores extrínsecos, progresivo ya que los cambios se dan a lo largo de la vida y deletéreo llevando a una pérdida de funciones en el organismo (Viña et al., 2007).

Hay cinco características comunes en el envejecimiento de los mamíferos:

- a) El aumento de la mortalidad después de la madurez.
- b) Cambios bioquímicos en la composición de los tejidos.
- c) Disminución progresiva en las funciones fisiológicas.
- d) Menos habilidad para responder a estímulos ambientales.
- e) Aumento de la susceptibilidad y vulnerabilidad a las enfermedades (Troen, 2003).

El envejecimiento se compone de cambios en el orden morfológico, psicológico, funcional y bioquímico que se caracterizan por una pérdida progresiva en el tiempo de la capacidad de adaptación y la capacidad de reserva del organismo, que produce un aumento progresivo de la vulnerabilidad ante situaciones de estrés y finalmente la muerte. Un buen ejemplo es la disminución de la capacidad de los ancianos a soportar temperaturas extremas, infecciones y en

general situaciones de estrés. En el envejecimiento es importante la pérdida de visión, de audición, de memoria, de coordinación motora y otras funciones neuronales. La mayoría de órganos vitales sufren atrofia o degeneración. El sistema inmune está debilitado y el organismo es más susceptible a traumas, infecciones u otros factores de estrés. La incidencia de cáncer y de enfermedades neurodegenerativas aumenta exponencialmente con la edad (Viña et al., 2007).

El envejecimiento se ha definido primero como una etapa de la vida y posteriormente como un proceso de deterioro en el que se suman una pérdida de funciones fisiológicas necesarias para mantener constante el medio interno con el paso de los años. La muerte es el final de este proceso que no permite mantener este equilibrio llamado homeostasis (Viña et al., 2007).

Hay que diferenciar entre el envejecimiento fisiológico que está exclusivamente relacionado con el paso del tiempo con cambios en los órganos y sistemas del organismo y el envejecimiento patológico caracterizado por la presencia de alteraciones secundarias a enfermedades o por influencias ambientales.

## **1.2 TEORÍAS DEL ENVEJECIMIENTO**

---

Durante este siglo se ha propuesto un gran número de teorías para explicar la naturaleza del envejecimiento. Por la naturaleza multicausal del envejecimiento, resulta improbable que una teoría única pueda explicar todos sus mecanismos. Es importante tener en cuenta que:

- a) En el envejecimiento están implicados diferentes genes, se han llegado a señalar hasta 100 genes implicados en la evolución de la longevidad. También hay mutaciones múltiples que afectan a todos los procesos del envejecimiento.
- b) El envejecimiento ocurre a todos los niveles: a nivel molecular, nivel celular y nivel tisular.

Todos estos fenómenos del envejecimiento no los puede explicar un mecanismo único, por lo tanto, la teoría que valore la naturaleza multicausal será la que conseguirá un acercamiento científico más racional (Pardo, 2003).

Muchas teorías y clasificaciones se han propuesto para explicar el envejecimiento humano, nosotros clasificaremos estas teorías en evolutivas, estocásticas y genéticas.

### **1.2.1 TEORÍAS EVOLUTIVAS**

Las teorías evolutivas están en contra de un envejecimiento programado ya que argumentan que los individuos están programados para sobrevivir, no para morir. Las teorías evolutivas se basan en dos principios: la fuerza de la evolución disminuye con la edad y que la longevidad requiere una inversión energética para el mantenimiento somático y la reparación celular que

compite con la inversión requerida para el crecimiento, desarrollo y la reproducción del individuo (Kirkwood, 2002). Hay tres teorías evolutivas que no son excluyentes entre si y pueden dar lugar en un futuro a una única teoría evolutiva (Gavrilov & Gavrilova NS, 2002).

#### **1.2.1.1 Teoría de la mutación acumulada**

Esta teoría se basa en la acumulación de mutaciones en líneas celulares germinales con el paso de los años que no son reparadas ya que la fuerza de la selección es muy débil. Esta “sombra en la selección” permite que una gran variedad de alelos con efectos deletéreos se acumulen a lo largo de generaciones con gran heterogeneidad en su distribución entre individuos de cada población (Kirkwood & Austad, 2000).

#### **1.2.1.2. Teoría de pleiotropía antagonística**

Esta teoría postula que los genes pleiotrópicos con efectos beneficiosos tempranos son seleccionados positivamente por su beneficio en la supervivencia aunque tengan efectos deletéreos en las edades avanzadas del individuo (Kirkwood & Austad, 2000).

#### **1.2.1.3 Teoría del soma desechable**

Esta teoría sugiere que la senescencia es el resultado de un desajuste entre la supervivencia tardía y la fecundidad temprana. La teoría del soma desechable afirma que los recursos energéticos son mejor utilizados para el mantenimiento de las células reproductoras que para mantener las células con una longevidad somática indefinida y por tanto las células no reproductoras del cuerpo son prescindibles (Kirkwood & Rose, 1991).

### **1.2.2 TEORÍAS ESTOCÁSTICAS**

Dentro de estas vamos a citar un conjunto de teorías que consideran el envejecimiento como consecuencia de alteraciones que dañan moléculas vitales de forma aleatoria y se acumulan a lo largo del tiempo.

#### **1.2.2.1 Teoría de la mutación somática y reparación del DNA**

La teoría de la mutación somática, que en un principio consideraba que las radiaciones ionizantes eran la causa de mutaciones en el DNA de las células somáticas y esto era la causa del envejecimiento, se ha ido ampliando a otras causas exógenas ambientales como agentes químicos y endógenos como los radicales libres (Vijg, 2000) (Figura 1). Las radiaciones aumentan más la mortalidad celular que su envejecimiento sobre todo debido a la transformación neoplásica de las células (Turler, 2000). La teoría de la reparación del DNA señala una disfunción en los mecanismos de reparación del DNA como los causantes de la acumulación de mutaciones tanto en el ADN nuclear como el mitocondrial. Actualmente varios

modelos de ratones transgénicos y knock-out de algunos de los sistemas de reparación del ADN muestran un aumento de mutación en el genoma que lleva a una pérdida funcional que depende del tipo celular (Ono et al., 2002) Estas células tienen diferente grado de degeneración con una mayor tasa de neoplasia y mortalidad (Vijg et al., 2006).

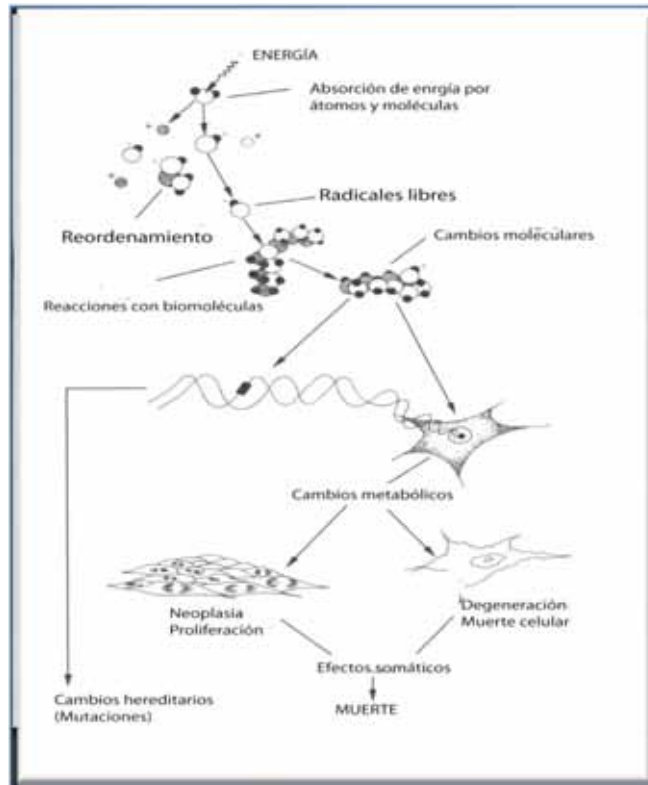
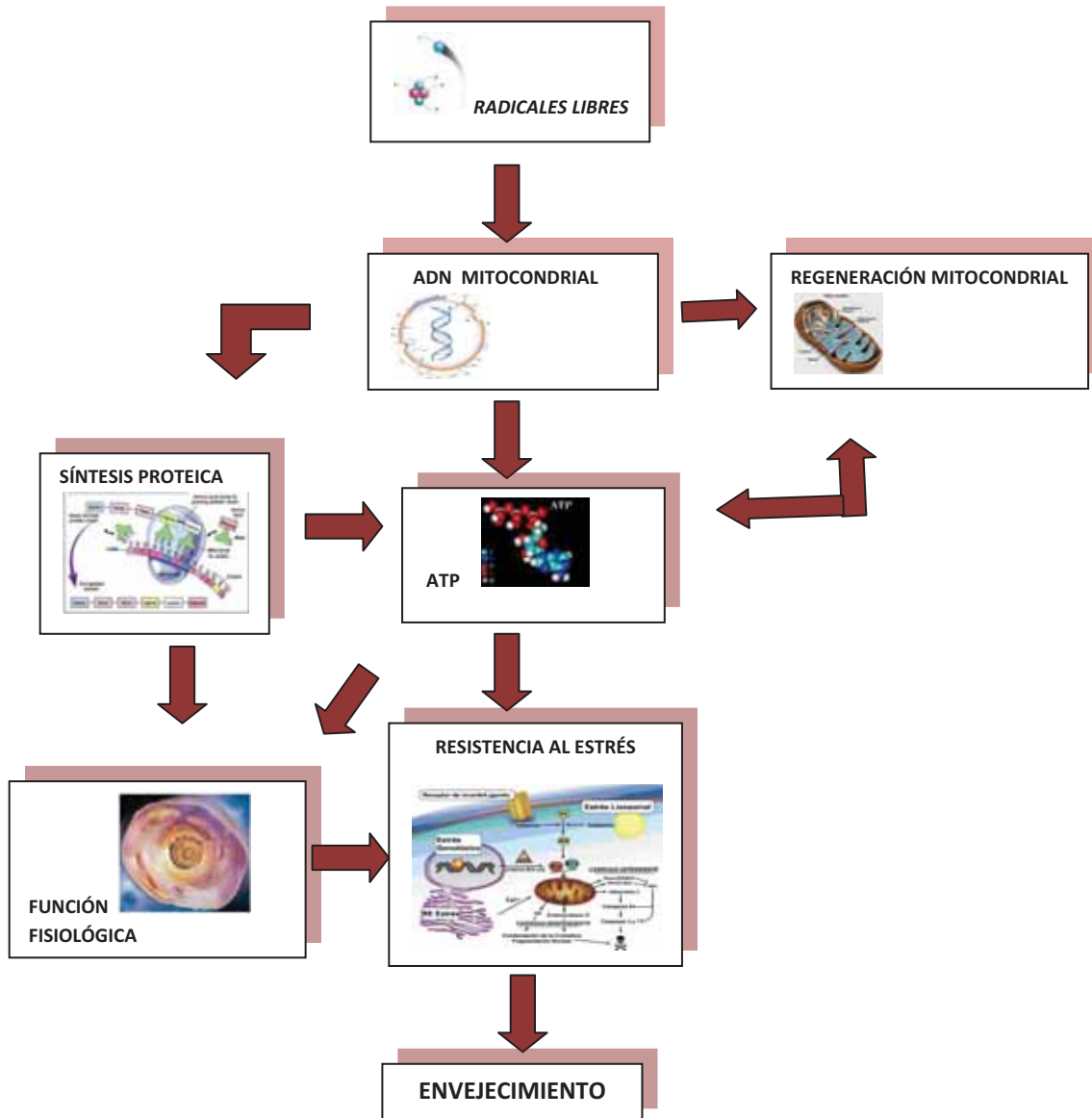


Figura 1. Teoría mutación somática. Adaptado Dani et al, 1997.

### 1.2.2.2 Teoría de los radicales libres/ estrés oxidativo y daño mitocondrial

Inicialmente Harman propuso la teoría de los radicales libres que postula que los cambios en el envejecimiento son debidos al daño que los radicales libres causan en las biomoléculas (Harman, 1981, 2003). Los radicales libres son moléculas que contienen un electrón desemparejado que es altamente reactivo y que pueden oxidar ácidos nucleicos, proteínas y lípidos conduciendo a una pérdida en su función con el paso del tiempo. En el envejecimiento enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y la catalasa están disminuidos (Biesalski, 2002). Así los sistemas antioxidantes son incapaces de contrarrestar el ambiente oxidante y se producen daños en los tejidos. Hay datos que abalan esta teoría, los radicales como las especies reactivas de oxígeno parecen tener un papel regulador en la expresión diferencial de genes, la replicación celular, la diferenciación y la apoptosis (Suzuki et al., 1997). La producción de radicales en el corazón, riñón, e hígado de varios mamíferos se encontró inversamente proporcional a su longevidad (Sohal et al., 1989). Los animales viejos muestran un mayor índice de oxidación que los jóvenes y acumulan más macromoléculas oxidadas (Stadtman, 1992; Sohal

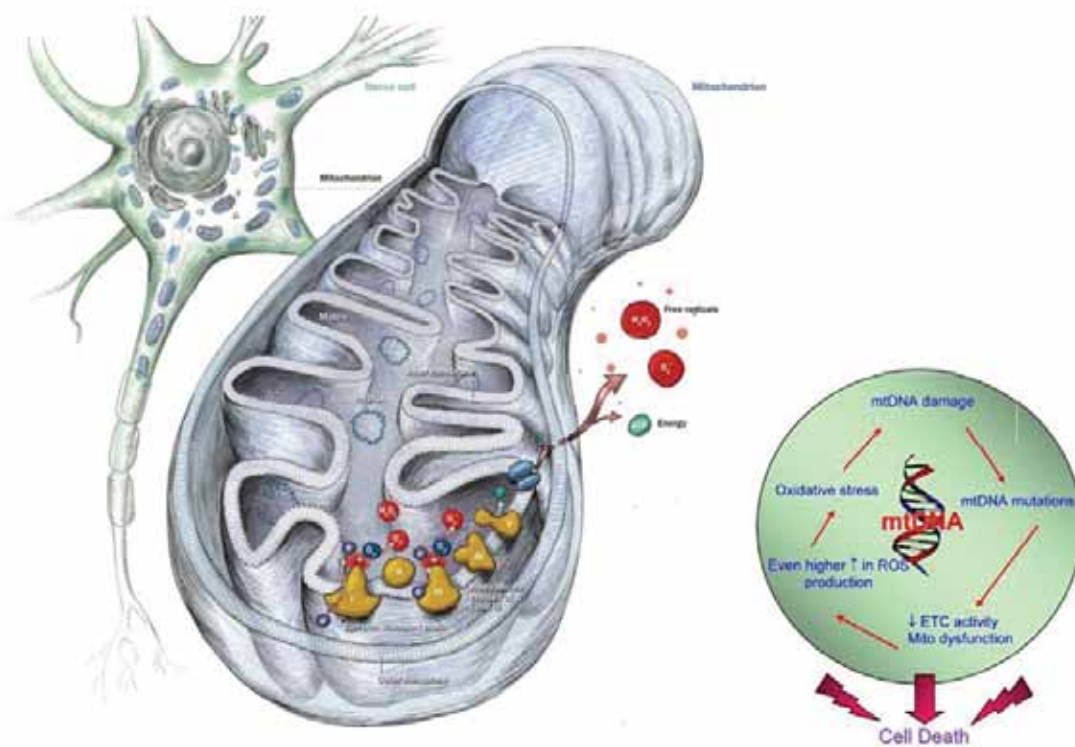
et al., 1993). Una evidencia importante es que la mosca *Drosophila* sobre expresando Cu/Zn superóxido dismutasa y catalasa muestra un incremento tanto de la media de vida como de la esperanza de vida (Orr & Sohal, 1994). Posteriormente Miquel y colegas propusieron la teoría del estrés oxidativo (EO) y daño mitocondrial. Esta teoría postula que el envejecimiento es el resultado del daño causado por las especies reactivas de oxígeno en el genoma mitocondrial de las células postmitóticas (Miquel, 1998; Viña et al., 2007).



**Figura 2. Teoría mitocondrial del envejecimiento. Adaptado de Miquel J., 1998.**

Esta teoría se basa en el hecho que las especies reactivas de oxígeno atacan el ADN mitocondrial (ADNmt). El ADNmt acumula mutaciones en las células somáticas donde la producción de ATP se ve comprometida junto a la síntesis de proteínas y la regeneración mitocondrial. Así la función celular se encuentra alterada y disminuye su resistencia ante

situaciones de estrés que conlleva a una senescencia celular con más posibilidad de entrar en apoptosis (Figura 2) (Miquel, 1998). La mitocondria es la principal fuente de especies reactivas de oxígeno (ROS) y esta teoría sugiere que la mutación del ADNmt produce una deficiencia en la fosforilación oxidativa aumentando la producción de ROS. El aumento de la generación de ROS conlleva a un incremento de estrés oxidativo y a su vez un aumento en la mutagénesis del ADNmt. Esto causa un ciclo vicioso que exponencialmente incrementa el daño oxidativo, la disfunción celular y culmina en la muerte de la célula (Hiona & Leeuwenburgh, 2008) (Figura 3).



**Figura 3. Ciclo vicioso de la teoría mitocondrial. Adaptado de Hiona & Leeuwenburgh, 2008.**

La teoría del estrés oxidativo y daño mitocondrial está relacionada con la teoría del axis mitocondria lisosomal donde acúmulos de desecho de la célula como la lipofuscina son resultados de un daño lisosomal causado por ROS que impide la correcta renovación mitocondrial y se da un aumento de estrés oxidativo que daña más a la mitocondria y se produce un desajuste bioenergético, decaimiento funcional y muerte celular (Brunk & Terman, 2002).

La teoría del estrés oxidativo y daño mitocondrial es la teoría más apoyada por diferentes grupos de investigación actualmente (Balaban et al. 2005; Muller et al., 2007). Hay muchas evidencias que apoyan esta teoría. Por ejemplo las mitocondrias de animales viejos producen más ROS que las de los jóvenes (Sohal & Sohal, 1990). Además hay una correlación inversa



entre la producción de peróxidos mitocondriales y la longevidad en mamíferos (Sohal & Sohal, 1991; Barja et al., 1994). Se produce daño oxidativo en lípidos y proteínas mitocondriales (Ames et al., 1995). El ADNmt es más susceptible a la mutación con el paso de los años y su fragmentación se relaciona con la apoptosis celular (Ozawa, 1997; Yoneda, 1995). Recientemente se ha demostrado la conexión entre la mutación mitocondrial y el envejecimiento a través de la creación de un ratón knock-in con la polimerasa mitocondrial defectuosa (PolgA) que acumula daños en su ADNmt y el animal experimenta un envejecimiento acelerado que le causa una muerte prematura (Trifunovic et al., 2004).

### 1.2.3 TEORÍAS DEL DESARROLLO Y GENÉTICAS

Las teorías del desarrollo y genéticas consideran el envejecimiento como un proceso continuo del desarrollo y maduración genéticamente controlado.

#### 1.2.3.1 Teoría de los genes determinantes de la longevidad

La hipótesis central es que la aparición y evolución de genes reguladores que mantienen los procesos vitales de la vida por más tiempo, suministran una ventaja selectiva para las especies. Esta hipótesis propuesta por Cutler predice que pueden existir genes clave determinantes de longevidad de naturaleza reguladora que son capaces de gobernar la tasa de envejecimiento del cuerpo entero (Pardo, 2003). Hay una amplia evidencia que en muchas especies la longevidad máxima está bajo control genético aunque su heredabilidad es menor del 35% (Finch & Tanzi, 1997). Hay mutaciones en determinados genes que pueden modificar la senescencia en diferentes especies. Por ejemplo en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* hay diversos genes que pueden modificar su longevidad como *age-1* altera el promedio de envejecimiento; *daf-2* y *daf-23* que activan un retraso del desarrollo; *spe-26* reduce la fertilidad; y *clk-1* altera el reloj biológico (Murakami & Johnson, 1996). El gen *daf-2* codifica para un miembro de la familia de los receptores de insulina/IGF y su mutación puede doblar la esperanza de vida con la participación del gen *daf-16*. El gen *daf-16* es un factor de transcripción que interviene en la vía de transducción de la insulina entre otras cuya mutación incrementa la longevidad (Murphy et al., 2003). La capacidad de los mutantes *daf* para detoxificar los ROS puede ser un mecanismo que intervenga en su incremento de longevidad (Sampayo et al., 2003). SIR2 es otro gen que aumenta la longevidad en nematodos, es un NAD-histona diacetilasa cuya función entre otras es silenciar genes (Shore, 2000). SIR2 es esencial en la transducción de señales metabólicas y actúa reduciendo el daño somático (Lin & Guarente, 2003). SIR2 además incrementa la longevidad regulando negativamente la vía de señalización de la insulina/IGF (Tissenbau & Guarente, 2001). La restricción calórica (RC) extiende la vida desde levaduras a mamíferos (Masoro, 2002) pero no actúa en ausencia de SIR2 (Lin et al., 2000). Los beneficios de la RC no se debe a una reducción de la tasa metabólica sino a una eficiencia bioenergética que reduce el daño oxidativo (Masoro, 2002). En mamíferos, proteínas homologas a las codificadas por SIR2

llamadas sirtuinas promueven la longevidad, entre ellas SIRT1 reprime FOXO el homólogo en mamíferos de DAF-16 (Motta et al., 2004) y regula su actividad en respuesta al estrés oxidativo (EO) (Brunet et al., 2004). FOXO3a protege frente al estrés oxidativo estimulando la reparación del DNA y incrementando las defensas antioxidantes (Tran et al., 2002; Kops et al., 2002). La expresión de esta proteína está incrementada en células nulas en  $p66^{shc}$  (Nemoto S, Finkel T. 2002). Los ratones nulos en  $p66^{shc}$  tienen una longevidad aumentada en un 30% (Lithgow, 2000). La proteína p66 (shc) está implicada en señales de transducción en respuestas mitogénicas y apoptóticas y es necesaria para activar p53 a inducir apoptosis y aumentar los niveles de ROS (Trinei et al., 2002). Los ratones heterocigotos knock-out para el receptor IGF (Factor de crecimiento de la insulina) viven un 26% más; tienen reducida la actividad de la proteína  $p66^{shc}$  y esto puede ser su mecanismo de resistencia al EO (Holzenberger et al., 2003). Los ratones Snell dwarf contienen también una única mutación en *Pit-1* dw que altera el desarrollo de la pituitaria, disminuye su producción de hormona del crecimiento, tirotrópina y prolactina y también aumentan su longevidad del 25 al 50% (Flurkey et al., 2002). Estudios en hombres centenarios han encontrado que genes en el cromosoma 4 están asociados con una mayor longevidad (Perls et al., 2002). Además hay algunas variantes de la apolipoproteína E (ApoE) que están en ancianos centenarios que disminuyen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y la enfermedad de Alzheimer (Schächter et al., 1994).

### 1.2.3.2 Teoría de los síndromes de envejecimiento acelerado

Hay enfermedades donde la mutación de un solo gen lleva a una enfermedad con características de senescencia acelerada. Estas enfermedades son llamadas progerias y las más importantes son la enfermedad de Hutchinson-Gilford y el síndrome de Werner.

El síndrome de Werner es una enfermedad autosómica recesiva, los pacientes desarrollan prematuramente arteriosclerosis, intolerancia a la glucosa, osteoporosis, pérdida del pelo, atrofia en la piel, menopausia, cataratas y presentan más tumores. Estos enfermos mueren antes de los 50 años. El gen responsable de esta enfermedad es *wrn*, está localizado en el cromosoma 8 y codifica para una ADN helicasa (King & Bohr, 2005).

El síndrome de Hutchinson-Gilford es extremadamente raro, es una enfermedad autosómica recesiva, estos enfermos se caracterizan por una corta estatura, bajo peso corporal, pérdida del cabello, disminución de la movilidad y rasgos faciales de anciano. Los fallos cardiovasculares suelen producirles la muerte cerca de los 13 años. El gen responsable es la mutación en LMNA que da lugar a la proteína Laminina A alterada (Hennekam, 2006).

A nivel molecular, en estos síndromes se produce una falta de reparación, replicación y expresión correcta del material genético. Con el estudio de estas enfermedades podemos comprobar cómo la mutación de un solo gen nos produce una enfermedad con características de

envejecimiento prematuro actuando a nivel de todo el organismo. (Olster et al., 2002; Hennekam, 2006).

Hay varios modelos de ratones que desarrollan procesos de envejecimiento acelerado. Entre ellos cabe destacar el ratón *klotho*, mutante en este gen que produce la pérdida funcional de la proteína de membrana que codifica. Presentan una vida media de 9 semanas y se consideran que comienzan a envejecer a las 4 semanas. Presentan retraso del crecimiento, actividad disminuida, involución del timo, calcificación pobre, atrofia de la piel, arterosclerosis, enfisema pulmonar y lipodistrofia. Otro modelo murino de envejecimiento prematuro son los ratones SAM (senescence accelerate mouse) que presentan unos fenotipos diferentes según las cepas y la causalidad genética de su envejecimiento es compleja y implica varios genes no determinados. Los SAM se han desarrollado por selección fenotípica a partir de ratones de raza AKR/J basándose en los cambios observados en su envejecimiento. Se han obtenido nueve cepas de envejecimiento acelerado (SAMP) y tres resistentes al mismo (SAMR) que sirven como controles. Los ratones SAMP presentan amiloidosis, neoplasias, osteoporosis, debilidad, fallos respiratorios y auditivos, defectos en el aprendizaje y memoria, cataratas y atrofia cerebral. Sus fenotipos son distintos según cada cepa (Kuro-o, 2001). Los ratones SAMP8 son un modelo reconocido de envejecimiento que desarrollan déficits de aprendizaje y memoria. Tienen cambios neuropatológicos como el depósito del péptido betamieloide ( $A\beta$ ), hiperfosforilación de tau, deterioro de las espinas dendríticas y cambios neuroquímicos. Los cerebros de los ratones SAMP8 padecen estrés oxidativo que se incrementa con la edad (Tomobe & Nomura, 2009).

### 1.2.3.3 Teoría neuroendocrina

Esta teoría propone que la disfunción del sistema neuroendocrino con la pérdida de la funcionalidad neuronal y de sus hormonas asociadas es clave en el envejecimiento. El eje hipotálamo-hipofisario adrenal sería el regulador del envejecimiento en el organismo. Debido a que el sistema neuroendocrino regula el crecimiento, el desarrollo, la reproducción, el metabolismo entre otros aspectos fisiológicos, su cambio funcional puede conducir al envejecimiento (Mobbs, 1996). Evidencias de esta teoría es la participación del cerebro y el ovario en la menopausia (Wise et al., 1996). Además la reducción en la neurotransmisión dopaminérgica se produce en cepas de rata de vida corta (Gilad & Gilad, 1987), mientras que la levodopa puede prolongar la longevidad en ratones (Cotzias et al., 1977) y la esperanza de vida en humanos (Rajput, 2001). Actualmente se considera que los cambios que se producen con la edad en el sistema neuroendocrino son una manifestación secundaria del fenotipo del envejecimiento y que tiene un origen celular. Otra crítica a esta teoría es que hay organismos que padecen el envejecimiento sin poseer sistema neuroendocrino.

#### 1.2.3.4 Teoría inmunológica

Esta teoría postula al sistema inmunológico como causante del envejecimiento en base a dos observaciones. Primero, que la capacidad de respuesta sistema inmune disminuye con la edad y se evidencia como la reducción de la respuesta de células T a mitógenos y su reducida resistencia a enfermedades infecciosas. Segundo que los fenómenos autoinmunes aumentan con la edad y hay un aumento de autoanticuerpos (Troen, 2003).

Hay diferentes evidencias como que la involución notable de la masa y composición del timo que se observa en ratones viejos y humanos es responsable de la pérdida de la inmunidad defensiva (Pardo, 2003). A nivel molecular cambios en longevidad en ratones se han visto relacionados con alelos específicos del complejo mayor de histocompatibilidad asociados a la susceptibilidad a linfomas e enfermedades infecciosas (Yunis & Salazar, 1993; Caruso et al., 2001). También esta teoría se ha criticado y los efectos que se dan en el sistema inmunitario se consideran secundarios al fenotipo en el envejecimiento. Además hay especies sin sistema inmunitario que padecen el envejecimiento.

#### 1.2.3.5 Teoría de la senescencia celular

Hayflick comprobó la capacidad replicativa finita de los fibroblastos que después se ha comprobado en otras células *in vitro* (Hayflick, 1997). Diversos estudios observan que la capacidad replicativa de los fibroblastos en cultivo esta inversamente relacionado con la longevidad de los donantes en diferentes especies de vertebrados (Rohme, 1981; Pignolo et al., 1992). La hipótesis del telómero postula que el telómero podría ser el reloj que determina la pérdida de la capacidad proliferativa de las células. La longitud de los telómeros desciende progresivamente en las células somáticas que se dividen en el organismo, y lo mismo sucede durante el envejecimiento de los fibroblastos en cultivo (Harley et al, 1990). Se ha comprobado que la telomerasa, enzima responsable de mantener la longitud del telómero, se encuentra reprimida durante la diferenciación de las células somáticas, lo que explica la pérdida de ADN telomérico y por tanto la capacidad replicativa finita de las células (Olovnikov, 1996). El acortamiento del tamaño de los telómeros es un factor importante en inducir una capacidad finita de división de las células humanas produciendo diferenciación, senescencia o apoptosis. Las señales producidas en el DNA dañado de los telómeros contribuyen a la activación de p53 (Aubert & Lansdorp, 2008). El aumento de actividad de p53 reduce la incidencia de cáncer pero incrementa la senescencia celular y el riesgo de apoptosis. El envejecimiento sería el precio a pagar para evitar el cáncer (Ferbere & Lowe, 2002).

### 1.3 EL ENVEJECIMIENTO CEREBRAL

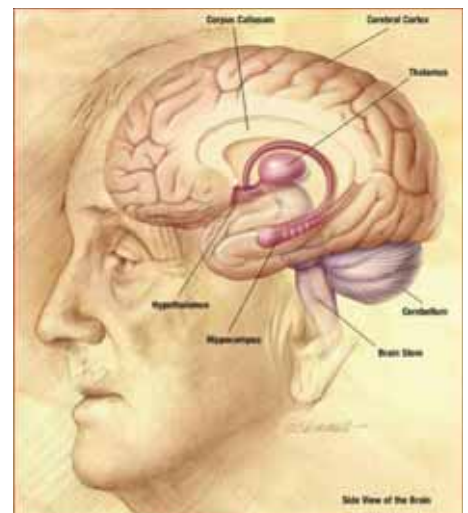
Es muy difícil separar lo que es el envejecimiento normal del patológico en el sistema nervioso, en concreto en el envejecimiento del cerebro. Los cambios cerebrales debidos al envejecimiento se han estudiado desde el siglo XIX y aún hay muchas incógnitas por investigar. Durante el envejecimiento normal, el cerebro sufre cambios morfológicos y funcionales afectando a los árboles dendríticos, la sinapsis, la neurotransmisión, la circulación y el metabolismo que se reflejan en alteraciones motoras y sensoriales, en el sueño, la memoria y el aprendizaje. (Mariani et al., 2005) Muchas de las alteraciones patológicas que se observan al microscopio en enfermedades como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson también se observan en el cerebro de una persona clínicamente normal. La diferencia en muchos casos es sólo cuantitativa en cuanto al número de alteraciones (Ramírez-Expósito & Martínez-Martos, 1999). En este capítulo empezaré describiendo los cambios cerebrales a nivel macroscópico y luego a nivel microscópico, celular y molecular.

#### 1.3.1 CAMBIOS MACROSCÓPICOS

El peso medio del cerebro humano desde los 20 a los 65 años es de unos 1400 g. Después de los 65 años se ve una disminución notable hasta llegar a 1150 g de media cuando se superan los 100 años (Dani et al., 1997). La reducción del volumen aumenta de 0.1- 0.2% entre los 30-50 años y de 0.3-0.5% por encima de los 70 años. (Esiri, 2007). Las diferentes regiones del cerebro sufren diferentes cambios macroscópicos durante el envejecimiento (Figura 4). En la corteza cerebral, sobretudo su lóbulo frontal, tiene tendencia a disminuir alrededor del 10-12%, en contraste con el córtex parieto-temporo-occipital donde las variaciones son mínimas. (Dani et al., 1997). Además se han descrito ensanchamiento de ventrículos, ensanchamiento de giros y surcos y aumento del líquido cefalorraquídeo. (Anderton, 1997)

Estos resultados están probablemente relacionados con el uso de las zonas corticales: mientras las entradas sensoriales todavía conectan al individuo con estímulos sociales en la vejez, las actividades motoras disminuyen más rápidamente con la edad. La disminución macroscópica de la sustancia blanca es 2 o 3 veces mayor que la de la sustancia gris, esto puede ser debido a la disminución en los diámetros de mielina. (Raz & Rodrigue, 2006; Dani et al., 2007).

**Figura 4. Cerebro de hombre envejecido. Google imágenes**

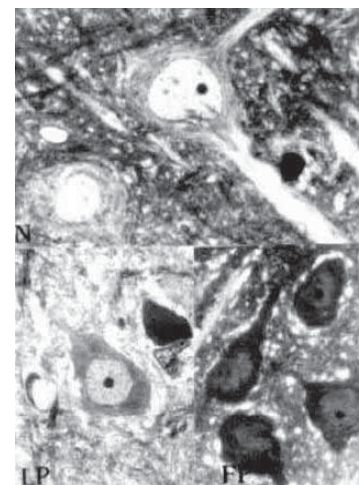


### 1.3.2 CAMBIOS MICROSCÓPICOS.

Los estudios microscópicos sobre la pérdida neuronal han sido controvertidos. Los estudios iniciales que comenzaron en los años 50 consideraban que el cerebro envejecido sufría una importante pérdida neuronal y daban importancia a zonas como la corteza cerebral, el hipocampo y las células de Purkinje (Hall et al., 1975). La pérdida neuronal y el cambio en sus dendritas varían acorde con las diferentes partes del cerebro en el envejecimiento y en condiciones neurodegenerativas. Por eso es difícil estimar la magnitud de la pérdida neuronal en los cerebros humanos ya que muchos de los cerebros de personas mayores de 80 años están afectados por placas amiloideas y neurofilamentos asociados en algunos casos de la enfermedad de Alzheimer y en otros sujetos están afectados por enfermedades cerebrovasculares, hechos que pueden alterar las estimaciones celulares (Neuropathology group, 2001). Actualmente los estudios con métodos estereológicos nos muestran datos más conservadores con una pérdida neuronal escasa en general. (Hof & Morrison, 2004). La disminución en el tamaño neuronal y en el número de dendritas a lo largo de los años es marcadamente visible particularmente en la corteza cerebral (Terry et al., 1987; Jacobs et al., 1997). Además se observa degeneración en los axones mielinizados de las capas más internas de la corteza e incluso de la sustancia blanca (Peter et al., 1994).

Además de lo anteriormente descrito encontramos las siguientes alteraciones microscópicas que ocurren en el cerebro envejecido:

- Incremento de lipofucsina en las neuronas: es una agregación intracelular de proteínas y lípidos con carbohidratos y trazas de metales imposibles de degradar. (Brunk & Terman, 2002). El complejo lipofucsina/ceroide resulta de la excesiva oxidación de proteínas que contienen hierro y el entrecruzamiento que se produce en su formación presumiblemente en el compartimento lisosomal (Keller et al., 2004).
- Las neuronas picnóticas (Figura 5) aumentan en el envejecimiento. Estas se caracterizan por presentar en su citoplasma microvacuolas, acúmulos de lipofucsina y polirribosomas fuertemente disgregados, además de un retículo endoplasmático fragmentado y disperso, y mitocondrias con desorganización de sus crestas (Ramírez- Expósito & Martínez-Martos, 1999).



**Figura 5. Neuronas picnóticas. Ramírez- Expósito & Martínez- Martos, 1999.**

**Neuronas teñidas con azul de toluidina. N- neuronas normales, LP- levemente picnóticas y FP- fuertemente picnóticas**

- Incremento del número de corpora amylacea: son cuerpos esféricos de poliglicosaminoglicanos, que en las tinciones se identifican como positivos al ácido periódico de Schiff (PAS). Están preferentemente distribuidos alrededor de los vasos sanguíneos o cerca de las superficies pial o endopial. Algunos están localizados ultraestructuralmente cerca de los astrocitos. (Mrak et al., 1997).
- Incremento en la cantidad de productos finales de avanzada glicosilación. La glicosilación no enzimática de proteínas origina productos tempranos de glicosilación (productos de Amadori), los cuales posteriormente en la etapa irreversible de la reacción se transforman en productos finales de glicosilación avanzada (AGEs) (Schmitt, 2006).
- Acúmulos de hierro. El hierro llega al cerebro por mecanismos activos de captación a través de la barrera hematoencefálica, pero se conoce poco de cómo se libera y como se acumula. El hierro es componente esencial de muchas enzimas en el cerebro, pero altas concentraciones de hierro reactivo pueden facilitar el estrés oxidativo. (Zecca et al., 2004)
- Incremento en el número y tamaño de astrocitos y microglía. Estas células gliales suelen desempeñar una función neuroprotectora, pero como respuesta a las alteraciones neuronales ocupan el parénquima que deja libre el tejido neuronal (Esiri, 2007).
- Presencia de placas amiloideas difusas y de neuronas con mayor reactividad a neurofilamentos. Posiblemente son cambios neurodegenerativos relacionados con la enfermedad de Alzheimer (Vickers et al., 1994)

### 1.3.3 CAMBIOS MOLECULARES

El envejecimiento celular en el cerebro está caracterizado por una disminución en la reserva homeostática, definido como la capacidad de las células a responder ante los efectos desestabilizadores del estrés. Así las células envejecidas del cerebro mantienen su actividad metabólica basal o a bajos niveles pero padecen déficits funcionales ante altos niveles de estimulación y situaciones de estrés que pueden ser patológicas, como pueden ser un trauma, la isquemia cerebral u otros sucesos excitotóxicos (Toescu, 2005). En este apartado veremos algunos de los cambios moleculares que se observan en el envejecimiento cerebral. Estudiaremos con especial atención los cambios en la mitocondria durante el envejecimiento y como el estrés oxidativo actúa sobre ella que como hemos visto es una de las teorías más sólidas que explican el envejecimiento.

#### 1.3.3.1 Factores de crecimiento

Los factores neurotróficos son polipéptidos que desarrollan su función al unirse a receptores de la superficie celular llamados trk produciendo su activación (Connor & Dragunow, 1998). En el envejecimiento hay una progresiva disminución de factores de crecimiento. En el envejecimiento patológico la falta de determinados factores de crecimiento

puede ser causa de apoptosis por falta de modulación o represión de la maquinaria de muerte (Boonman & Isacson, 1999). El factor de crecimiento nervioso (NGF de *nerve growth factor*) tiene efectos neurotróficos y neuroprotectores en el sistema nervioso central. En el envejecimiento se mantienen los niveles de NGF pero se observa una disminución de la vía de señalización del NGF sobretodo en neuronas colinérgicas, que contribuye a cambios neurotóxicos observados en el envejecimiento y en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA) (Sofroniew, 2001). El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, de *brain-derived neurotrophic factor*) tiene un papel central en la supervivencia neuronal y su regeneración. En el envejecimiento se produce una reducción de su expresión y la de sus receptores provocando una disminución en la capacidad de aprendizaje y memoria, además de una mayor susceptibilidad al daño neuronal y una disminución en su actividad. La falta de regulación por el BDNF puede ser importante en la etiología de enfermedades como EA, Parkinson y enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple (Sohrabji & Lewis, 2006). La neurotrofina 3 (NT-3) tiene funciones neurotróficas en el cerebro y su expresión disminuye con el envejecimiento, lo cual puede contribuir a la atrofia neuronal y a la pérdida de memoria que se produce durante el envejecimiento (Connor & Dragunow, 1998). El factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF de *glial cell-derived neurotrophic factor*) es importante para el correcto funcionamiento principalmente de las neuronas dopaminérgicas. Su efecto trófico sobre otros tipos neuronales está poco estudiado. Durante el envejecimiento y en la enfermedad de Parkinson se ve reducida la expresión de GDNF. Se está estudiando que la atrofia neuronal de algunas enfermedades como la enfermedad de Parkinson y la EA puedan ser tratadas con la administración de GDNF (Behrstock & Svendsen, 2004). El factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$  de *transforming growth factor- $\alpha$* ) tiene función neurotrófica y se encuentra aumentado en procesos de neurodegeneración. También lo expresan los astrocitos en procesos de astrogliosis (Connor & Dragunow, 1998). Los factores de crecimiento de la insulina (IGF de *insulin-like growth factor*) previenen la neurodegeneración y el daño neuronal y su expresión disminuye con la edad. La pérdida de IGF con la edad puede contribuir a la pérdida cognitiva del cerebro envejecido (van Dam & Aleman, 2004).

### 1.3.3.2 Suministro energético

Las neuronas tienen unos requerimientos energéticos mayores que las demás células del organismo. Tales requerimientos derivan fundamentalmente de la necesidad de abastecer de energía (ATP) de forma continuada la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  presente en su membrana, y de cuyo funcionamiento dependen, entre otros procesos, tanto la homeostasis iónica como el mantenimiento del potencial de membrana que es imprescindible para la fisiología neuronal. De hecho más del 40% del ATP producido por la mitocondria se destina a este fin (Ames, 1992). El envejecimiento cerebral está asociado a una continua disminución de la capacidad de producir



ATP tanto por la disminución de cantidad de mitocondrias en sus células como por la disminución de la fosforilación oxidativa en mitocondrias disfuncionales (Toescu, 2005). La disfunción mitocondrial es debida en su mayor parte a la reducción de la transferencia de electrones por los complejos I y IV (Navarro & Boveris, 2007). Las mitocondrias de murinos envejecidos muestran una disminución en su potencial de membrana, un incremento de la oxidación de sus fosfolípidos y proteínas y un aumento de su tamaño y fragilidad. La actividad de los complejos I, IV y la del óxido nítrico sintasa (mtNOS) se correlaciona con la función cognitiva y la media de vida y es inversamente proporcional con la oxidación de sus moléculas. Condiciones que incrementan la vida media como el ejercicio moderado, el suplemento de vitamina E y la restricción calórica también mejoran la función mitocondrial y el estado cognitivo del animal (Boveris & Navarro, 2008).

#### 1.3.3.3 Excitotoxicidad

El glutamato es uno de los principales neurotransmisores excitatorios del SNC. Un aumento en las cantidades de glutamato se ha descrito en la corteza cerebral de ratas envejecidas (Peinado et al., 2000). En el cerebro envejecido se ha observado que no hay un aumento de liberación de este neurotransmisor pero si una disminución de su recaptación por parte de las neuronas (Segovia et al., 2001). El aumento del glutamato extracelular puede conducir a procesos de excitotoxicidad tanto en neuronas como en células gliales produciendo su muerte. Estos procesos de excitotoxicidad se producen por cambios en la homeostasis del calcio, la producción ROS y la inducción de cascadas apoptóticas. Proteínas como p53, Bax y Par-4 inducen el aumento de permeabilidad de la membrana mitocondrial que conducen a la liberación del citocromo c y la activación de proteasas como la caspasa-3. Estas cascadas excitotóxicas se originan en las dendritas posinápticas causando pérdida de la plasticidad sináptica y degeneración local. Las células poseen mecanismos antiexcitotóxicos como las vías neurotróficas, las vías de respuesta al estrés, la activación de proteínas de supervivencia como las chaperonas, las proteínas de unión a calcio y la inhibición de las proteínas proapoptóticas. Hay evidencias que relacionan los procesos excitotóxicos con enfermedades como la EA, Parkinson, Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica (Mattson, 2003).

#### 1.3.3.4 Homeostasis del calcio

La disminución del estado cognitivo durante el envejecimiento se ha relacionado con la disfunción de la homeostasis del calcio sobretodo en el hipocampo (Foster & Kumar, 2002). La entrada de calcio en la célula se produce mayoritariamente a través de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) y los canales de calcio dependientes de voltaje (VOCC de *voltage-operated Ca<sup>2+</sup> channels*). En el cerebro envejecido de animales murinos se ha observado un aumento de receptores VOCC y una disminución de los NMDA (Toescu et al., 2004). En estos animales se

produce un aumento de la entrada de calcio intracelular a través de los receptores y de la movilización del calcio almacenado en orgánulos como la mitocondria, el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi (Figura 6) (Wojda et al., 2008). Los niveles de calcio no se normalizan a través de los sistemas de buffering que en las neuronas envejecidas están disminuidos (Buchholz et al., 2007).

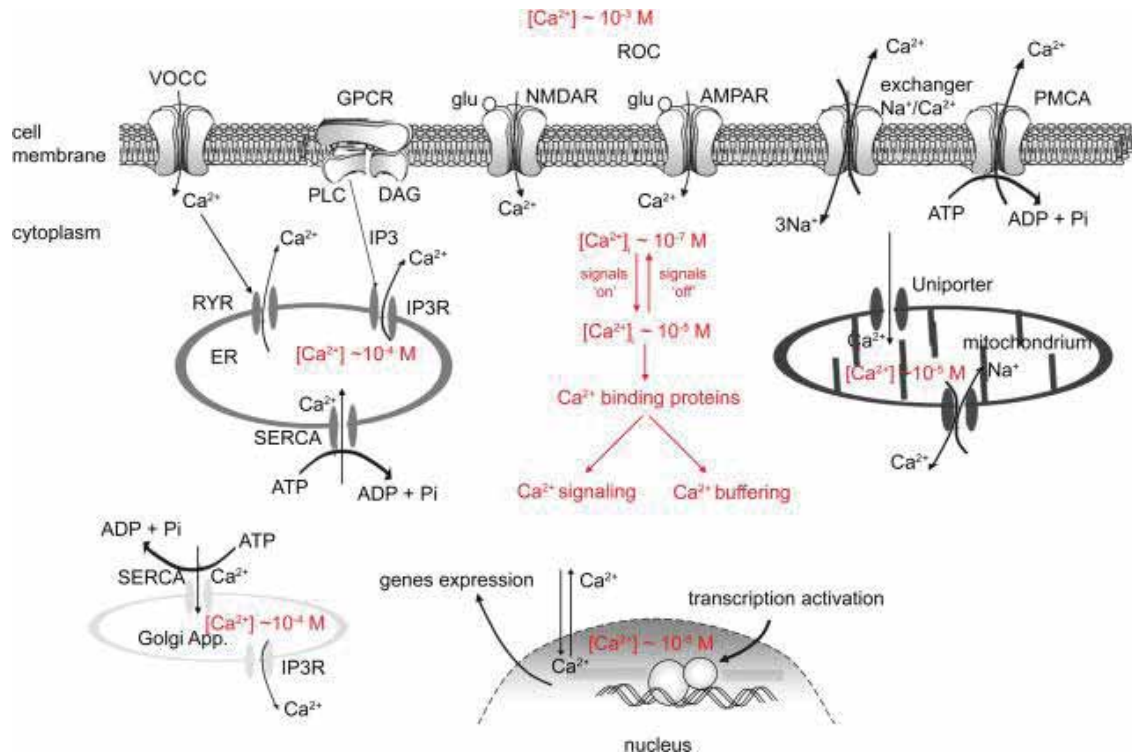


Figura 6. Homeostasis del calcio en una neurona sana. Wodja et al., 2008

El aumento de calcio dentro de la neurona produce un aumento de la hiperpolarización (AHP de *afterhyperpolarization*) después del potencial de acción. También produce un aumento de la depresión a largo plazo (LTD de *long-term depression*) y una disminución de la potenciación a largo plazo (LTP de *long-term potentiation*) (figura 7). El cambio en el equilibrio LTP/LTD, favoreciendo la LTD actúa disminuyendo la transmisión sináptica. Esto puede ayudar a la pérdida cognitiva observada en el envejecimiento cerebral (Foster & Kumar, 2002). El aumento del calcio intracelular altera el equilibrio de la actividad entre quinasas y fosfatasas incrementando la actividad de la calcineurina. La calcineurina defosforila algunas proteínas como BAD (de *bcl-2 family member protein*), CREB (de *cAMP response element binding protein*) e inhibidor-1 (I-1). BAD defosforilada se traslada del citosol a la membrana mitocondrial que induce a la apoptosis. CREB defosforilada inhibe su paso al núcleo y está asociado a una disminución de la viabilidad celular. La defosforilación de I-1 activa la proteína fosfatasa 1 (PP1 de *protein phosphatase 1*) que defosforila los receptores de glutamato (NMDAR, AMPAR) disminuyendo la actividad sináptica. La defosforilación de los receptores

NMDA y la proteína CREB disminuyen la plasticidad sináptica en el cerebro envejecido (Foster, 2007).

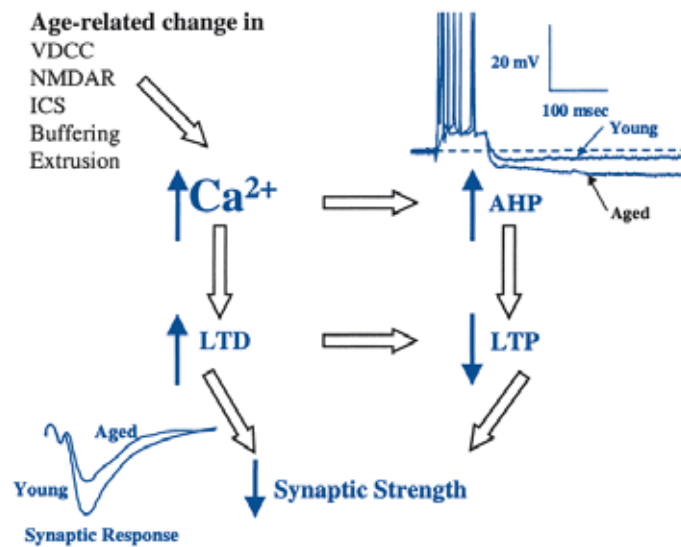


Figura 7. Aumento de calcio intracelular y efecto sobre la sinapsis. Foster & Kumar, 2002

### 1.3.3.5 Estrés oxidativo

El envejecimiento cerebral está asociado con el estrés oxidativo entendido como una progresiva pérdida de equilibrio entre las defensas antioxidantes y las concentraciones intracelulares de los agentes prooxidantes como las especies reactivas de oxígeno (ROS). Estos tipos de radicales libres son los que tienen un mayor impacto en los procesos de estrés oxidativo durante el envejecimiento. El estrés oxidativo puede dañar a las células mediante la oxidación de los lípidos de sus membranas, sus proteínas y su DNA (Serrano & Klann, 2004).

#### 1.3.3.5.1 Especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son sustancias químicas que contienen uno o más átomos de oxígeno y que son capaces de dar o extraer electrones de otras moléculas. Las ROS se pueden dividir en dos grupos: los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno no radical (tabla 1).

ROS RADICALES LIBRES	ROS NO RADICALES
$O_2^{\cdot\cdot}$ Oxígeno molecular : diradical	$^1O_2$ Singlete de oxígeno
$O_2^{\cdot-}$ Anión superóxido	HOCl Ácido hidrocioruro
$OH^{\cdot}$ Radical hidroxilo	$H_2O_2$ Peróxido de hidrógeno
$NO^{\cdot}$ Óxido nítrico	$ONOO^-$ Peroxinitrito

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno. Juurlink, 1997.

Los radicales libres son sustancias químicas que presentan uno o más electrones desapareados. Su orbital externo puede tener dos electrones por lo que son altamente inestables y tienen elevada reactividad. Dos radicales libres pueden compartir sus electrones desapareados para formar un enlace covalente. Por otra parte, el radical libre puede ceder su electrón desapareado (radical reductor) a un no radical o puede extraer un electrón (radical oxidativo) a otras moléculas. (Halliwell, 1989). Según esta definición, el oxígeno molecular es un diradical libre que extrae electrones de otros compuestos con los cuales reacciona y esto es motivo de que sea un agente oxidante.

#### 1.3.3.5.2 Bioquímica del ROS

Anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ): La mayor fuente de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) en la célula es la mitocondria. Se produce cuando un pequeño número de electrones se escapan prematuramente durante la fosforilación oxidativa y se unen al oxígeno molecular (Kovacic et al 2005). También puede ser producido por flavoenzimas como la xantino oxidasa (Kuppusamy & Zweier, 1989), lipoxigenasa y cicloxigenasa (Kontos et al., 1985; McIntyre M, Bohr, 1999). Se considera un radical menos tóxico que el radical hidroxilo (Nordberg & Arner, 2001). La producción de  $O_2^{\cdot-}$  aumenta en el hipocampo de ratas viejas (Antier et al., 2004). La producción de anión superóxido en las mitocondrias de cerebro de ratones envejecidos aumenta con respecto a animales jóvenes (Miyazawa et al., 2009).

Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ): Se produce cuando la célula intenta detoxificar el anión superóxido a través de la enzima superóxido dismutasa (SOD) (reacción a, tabla 2). Una vez formado el peróxido de hidrógeno se detoxifica a través de las enzimas antioxidantes catalasa, glutatión peroxidasa y peroxiredoxinas (Chae et al., 1999; Miyazawa et al., 2009) (reacción b, tabla 2). La acumulación de  $H_2O_2$  puede sobrepasar la capacidad de las enzimas antioxidantes y

producir el radical hidroxilo (Halliwell, 1999) y el ácido hidrocioruro (Winterbourn et al., 2000). Se ha demostrado que cortes de hipocampo de ratas envejecidas producen más peróxido de hidrógeno que las jóvenes (Serrano & Klann, 2004). La cantidad de  $H_2O_2$  producido por las mitocondrias de cerebro de ratas envejecidas aumenta respecto a las ratas jóvenes (Petrosillo et al., 2008).

Ácido hidrocioruro (HOCl): Se forma a partir de  $H^+$ ,  $Cl^-$  y  $H_2O_2$  y es catalizado por la enzima mieloperoxidasa (Rossi et al., 1985) (reacción c, tabla 2).

Radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ): Se puede formar a partir del ácido hidrocioruro con el anión superóxido o iones metálicos (Nordberg & Arner, 2001) (reacciones d y e, tabla 2). También se puede formar a través de la reacción de Fenton en presencia de metales de transición como el hierro y el cobre (reacción f y g, tabla 2) (Liochev & Fridovich, 2002). El radical hidroxilo se considera el más tóxico ya que puede atacar proteínas, lípidos y ácidos nucleicos cuando se produce cerca de ellos. Las células no presentan mecanismos de detoxificación contra  $OH^\cdot$ , su defensa principal es evitar su formación.

Óxido nítrico ( $NO^\cdot$ ): Este radical se forma a partir de la oxidación de una arginina a  $NO^\cdot$  y citrulina; esta reacción está catalizada por la óxido nítrico sintasa (NOS). Esta reacción es dependiente de calcio-calmodulina y utiliza FMN, FAD y tetraopterina como cofactores (Dawson et al., 1994). Se han descrito cuatro isoformas de la NOS: tres de ellas actúan de forma constitutiva y corresponden a la nNOS por estar presente principalmente en neuronas, la eNOS por su localización inicial en endotelio vascular y la mtNOS por ser mitocondrial; la expresión de la cuarta isoforma requiere la presencia de inductores como las citocinas o el LPS, por lo que se le denomina iNOS, se detecta fundamentalmente en células del sistema inmune, aunque puede ser inducida prácticamente en cualquier tipo celular (Knowles & Moncada, 1994). Los cambios detectados en los niveles de producción de  $NO^\cdot$  en ciertas regiones del cerebro de animales viejos podrían ser la base de las pérdidas de memoria y aprendizaje propias de la vejez (Noda et al., 1997). En el cerebro envejecido se ha observado un aumento de producción de  $NO^\cdot$  por algunos astrocitos (MacCann et al., 2005). En homogenados de corteza cerebral de ratas envejecidas se ha observado una disminución de la producción de  $NO^\cdot$  en sus mitocondrias y una disminución de la nNOS (Bustamante et al., 2008).

Peroxinitrito ( $ONOO^-$ ): El  $NO^\cdot$  puede unirse al anión superóxido dando lugar al potente agente oxidante peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (Hwang et al., 2007) (reacción h, tabla 2). A pH fisiológico el peroxinitrito se protona para formar ácido peroxinitroso (reacción i, tabla 2) que a su vez puede dismutarse dando el radical hidroxilo y el dióxido de nitrógeno (reacción j, tabla 2). Estos dos radicales tienen un alto poder oxidante. El peroxinitrito también es capaz de interactuar con peróxido de hidrógeno y formar el singlete de oxígeno (reacción k, tabla 2).

(Dimascio et al., 1994). Un incremento de peroxinitrito se ha observado en el hipocampo y corteza de ratas envejecidas (Shin et al., 2002).

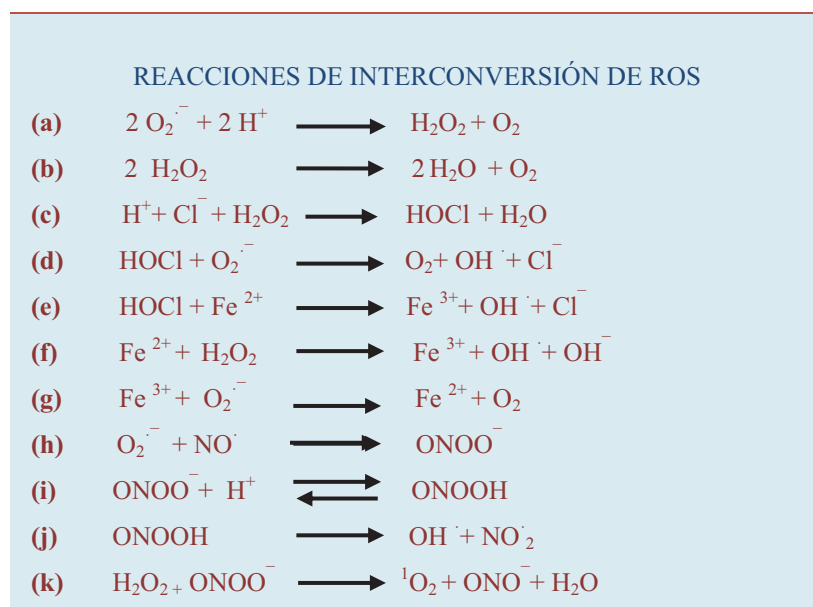


Tabla 2. Reacciones de interconversión de ROS. Poon et al., 2004a

### 1.3.3.5.3 Mecanismos de defensa antioxidantes

Las células aeróbicas poseen mecanismos de defensa antioxidantes que protegen frente al estrés oxidativo. Estos mecanismos de defensa pueden ser enzimáticos o no enzimáticos.

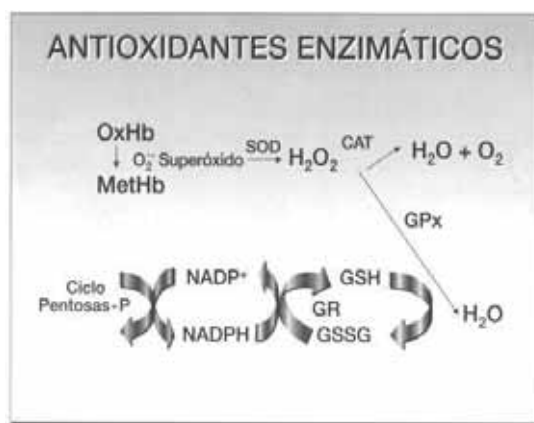
#### Mecanismos de defensa enzimáticos

Los enzimas de la familia SOD son la primera línea de defensa antioxidante. Estos enzimas destruyen el radical libre superóxido para convertirlo en peróxido de hidrógeno que después se dismutará en agua a través del enzima catalasa o glutatión peroxidasa (GPX). (Figura 9). Existen tres enzimas de SODs diferentes con diferente localización celular: la Cobre/Zinc- SOD (Cu/Zn-SOD) es el enzima mayoritario del citosol; la SOD manganeso (Mn-SOD) es un enzima mitocondrial, y la SOD extracelular, localizada también en el fluido cerebroespinal los vasos cerebrales, la linfa y el fluido sinovial (Landis & Tower, 2005). Los ratones knock-out de Mn-SOD padecen cardiomiopatía y no sobreviven más de 3 semanas de edad. Los ratones knock-out de Cu/Zn-SOD son más sensibles a la toxicidad por paraquat aunque presentan fenotipo normal y sólo presentan diferencias cuando sufren traumatismos. (Reaume, 1996). La actividad de las enzimas SOD en los cerebros de murinos envejecidos

presentan cambios que son controvertidos según el estudio. Se han descrito estudios donde la actividad de la Cu/Zn-SOD y la Mn-SOD no se modifican (Sohal et al., 1994; Hamilton et al., 2001), mientras que en otros estudios se observa una disminución de la actividad de la Cu/Zn-SOD (Gupta et al., 1991; Semsei et al., 1991.) y de la SOD total (Ehrenbrink et al., 2006) o un aumento de la actividad de la Mn-SOD (McGahon et al., 1999; O'Donnell et al., 2000). En el cerebro de ratones envejecidos se ha observado un aumento de la actividad de la Mn-SOD (Navarro et al., 2002). En los cerebros de ratones SAMP8 no se han encontrado cambios de actividad de la SOD total (Sato et al., 1996) mientras que se ha observado un descenso de la actividad de la Cu/Zn-SOD en los cerebros de ratones SAMP1 (Stvolinskii et al., 2003).

Los enzimas que eliminan el peróxido de hidrógeno convirtiéndolo en agua y oxígeno molecular son la catalasa y GPX (Figura 8). El enzima catalasa está localizado principalmente en los peroxisomas. Es uno de los enzimas más eficientes conocidos ya que no se satura a ninguna concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Lledías, 1998). Aunque no es un enzima imprescindible para la vida tiene un papel importante frente al estrés oxidativo. La actividad de la catalasa en el cerebro también presenta cambios controvertidos. Se ha visto en diferentes estudios con ratas envejecidas. Hay estudios en que se observa una disminución de la actividad (Semsei et al., 1991; O'Donnell et al., 2000) otros que describen un aumento (Sohal et al., 1994; Devi & Kiran, 2004) y otros estudios donde no se ven cambios significativos (Hussain et al., 1995; Hamilton et al., 2001, Ehrenbrink et al., 2006). La actividad de la catalasa en el cerebro de ratones SAMP8 está disminuida (Sureda et al., 2006).

A diferencia de la catalasa, el enzima GPX puede convertir cualquier peróxido, en agua y oxígeno molecular. El GPX se encuentra en el citosol y la mitocondria. La actividad de la GPX necesita glutatión (GSH) que se oxida en este proceso. En el cerebro de ratas envejecidas se ha visto un aumento de glutatión oxidado (Calabrese et al., 2004). La GPX depende directamente de la actividad de la glutatión reductasa y del estado redox (relación entre NADPH/NADP<sup>+</sup>) para reducir el glutatión oxidado de nuevo a GSH (Ross & Moldeus, 1991). La GPX es la mayor fuente de protección ante bajos niveles de estrés mientras que la enzima catalasa protege frente a altos niveles de estrés oxidativo (Matés & Sánchez-Jiménez, 1999). La actividad de la GPX se ha estudiado en el cerebro de ratas envejecidas observándose diferencias entre estudios. Algunos autores han encontrado un aumento de la actividad (Sohal et al., 1994 & Hussain et al., 1995) mientras otros autores no han visto cambios (O'Donnell et al., 2000 & Hamilton et al., 2001). Incluso se ha observado que estos cambios de actividad pueden depender del sexo del animal produciéndose un aumento en los machos y una disminución en las hembras (Ehrenbrink et al., 2006). En los ratones SAMP8 también hay diferencias en la actividad de la GPX según los sexos, ya que disminuye en los machos pero no cambia en el cerebro de las hembras (Sureda et al., 2006).



Cuadro 5.

**Figura 8. Mecanismos enzimáticos de defensa antioxidantes.** [www.institutobiologico.com](http://www.institutobiologico.com)

Las heat-shock proteins son otras proteínas que ayudan en la defensa antioxidantes entre ellas podemos destacar la hemoxigenasa y la ubiquitina. La hemoxigenasa (HO) se encarga de catabolizar el grupo hemo dando biliverdina, hierro y CO. Hay tres isoformas: la inducible o HO-1, la constitutiva HO-2 y la última descubierta sólo en ratas HO-3 (Goldbaum & Richter-Landsberg, 2001). En el cerebro predomina la HO-2. La inmunoreactividad a la HO-1 está aumentada en neuronas y astrocitos en el envejecimiento cerebral y en las enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la edad (Iijima et al. 1999; Schipper 2004; Schipper et al., 2006). La HO-1 se encuentra aumentada en cerebros sometidos a estrés oxidativo y en pacientes con Alzheimer (Poon et al 2004b). La ubiquitina es la proteína que marca las proteínas que serán degradadas por el proteosoma y protege a la célula contra los daños que produce el peróxido de hidrógeno (Poon et al 2004a).

#### Mecanismos de defensa no enzimáticos

Tanto el NADPH como el GSH pueden participar en los mecanismos no enzimáticos de detoxificación de ROS. El NADPH, puede proteger directamente del daño por el singlete de oxígeno (Bodaness, 1982). El GSH también elimina ROS directamente, formando el radical glutatilo, después dos radicales glutatilo reaccionan para formar glutatión oxidado (GSSG). El GSH es capaz de participar en la conjugación no enzimática con algunos productos químicos, como es el caso de la n-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI) y el citocromo reactivo P450. Los agentes antioxidantes, como el  $\alpha$ -tocoferol (Vitamina E) y el ácido ascórbico (Vitamina C), reaccionan directamente con el radical hidroxilo para formar compuestos más estables. La vitamina E también actúa sobre el radical peróxido lipídico (LOO $\cdot$ ) que es reducido dentro de la membrana C. La vitamina E se puede regenerar gracias a la vitamina C (Figura 9). Así la vitamina E protege de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados y a las proteínas ricas en grupos tiol. (Chan, 1993)



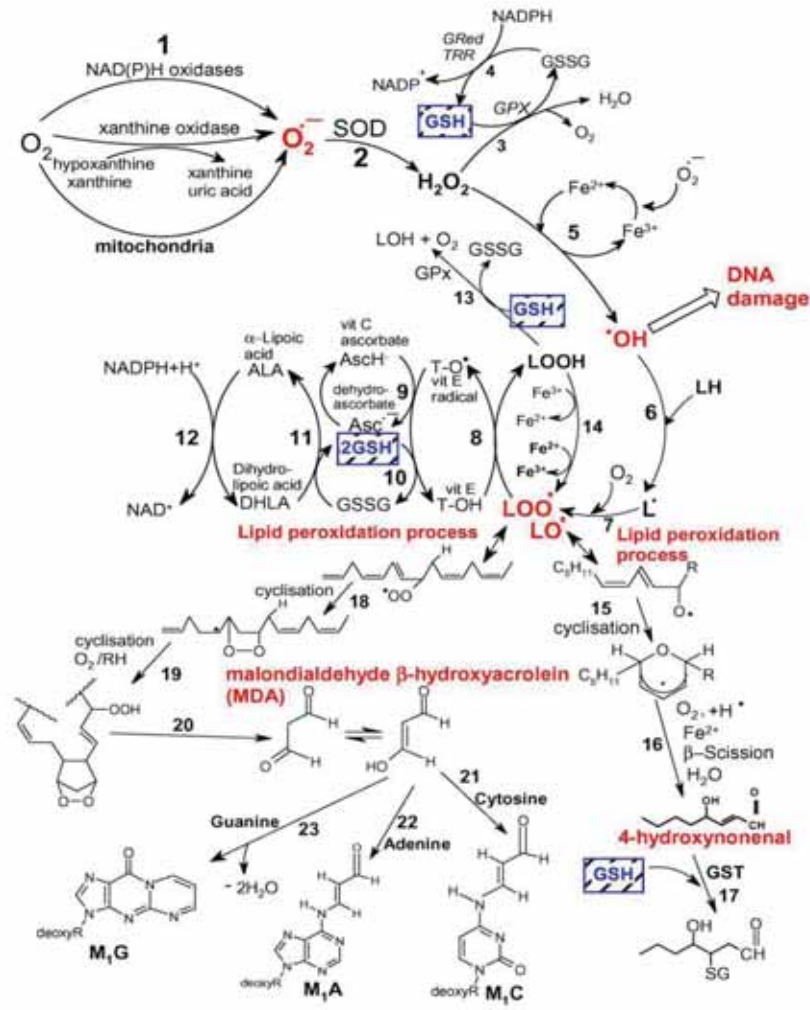


Figura 9. Resumen de las reacciones de ROS. Valko et al., 2007

**RESUMEN DE LAS REACCIONES DE ROS, SU ACCIÓN Y VIAS ANTIOXIDANTES**

En el esquema de la figura 9 se muestra un resumen de las reacciones que conlleva el ROS, sus acciones sobre macromoléculas y algunas vías antioxidantes. Reacción 1: el anión superóxido se forma a través del proceso de reducción del oxígeno molecular mediado por NADPH oxidasa y xantina oxidasa o la semiubiquinona componente de la cadena de transporte de electrones. Reacción 2: El radical superóxido se dismuta por la superóxido dismutasa (SOD) a peróxido de hidrógeno. Reacción 3: El peróxido de hidrógeno se degrada más eficientemente por el enzima glutatión peroxidasa (GPx) que requiere glutatión (GSH) como donador de electrones. Reacción 4: El glutatión oxidado (GSSG) se vuelve a reducir a GSH por el enzima glutatión reductasa (GRed) que necesita NADPH como donador de electrones. Reacción 5: Algunos metales de transición ( $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{+}$ ) pueden transformar el peróxido de hidrógeno al radical hidroxilo (reacción de Fenton). Reacción 6: El radical hidroxilo puede robar un electrón de los ácidos grasos poliinsaturados (LH) y aumentar el radical lipídico (L) en las cadenas carbonadas de los lípidos. Reacción 7: El radical lipídico (L) puede además interaccionar con la molécula de oxígeno para formar el radical peróxido lipídico (LOO•). Si este radical no es reducido por antioxidantes se producen las reacciones de lipoperoxidación (reacciones 15-23). Reacción 8: el radical peróxido lipídico

( $\text{LOO}\cdot$ ) es reducido dentro de la membrana por la forma reducida de la Vitamina E ( $\text{T-OH}$ ) dando lugar a la formación de hidroperóxido lipídico y el radical de la Vitamina E ( $\text{T-O}\cdot$ ).  
Reacción 9: La regeneración de la Vitamina E por la Vitamina C. Reacción 10: Regeneración de la Vitamina E por GSH. Reacción 11. El glutatión oxidado (GSSG) y el radical ascorbilato ( $\text{Asc}\cdot^-$ ) son reducidos por el ácido dihidrolipoico que pasa a ácido  $\alpha$ -lipoico. Reacción 12: Regeneración de ácido dihidrolipoico a partir de ácido  $\alpha$ -lipoico usando NADPH. Reacción 13: Los hidroperóxidos lipídicos son reducidos a alcoholes y dioxígeno por la GPx usando el GSH como donador de electrones. Reacciones de lipoperoxidación: Reacción 14: Hidroperóxidos lipídicos pueden reaccionar rápidamente con  $\text{Fe}^{2+}$  para formar radicales lípido alcóxido ( $\text{LO}\cdot$ ), o en menor grado con  $\text{Fe}^{3+}$  para formar radicales peróxido ( $\text{LOO}\cdot$ ). Reacción 15: El radical alcóxido ( $\text{LO}\cdot$ ) derivado por ejemplo del ácido araquidónico sufre reacciones de ciclación para formar anillos de hidroxiperóxidos. Reacción 16: Estos anillos sufren reacciones como  $\beta$  escisiones para formar 4 HNE. Reacción 17: 4 HNE se transforma en aductos de glutatiol catalizado por la glutatión s-transferasa (GST). Reacción 18: El radical peroxilo localizado en la posición interna del ácido graso puede sufrir una ciclación para formar peróxidos cíclicos adyacentes a un radical de carbono central. Reacción 19: Este radical puede ser reducido para formar hidroperóxido o puede padecer una segunda ciclación para formar un peróxido bicíclico. Reacción 20: Producción de malondialdehído (MDA). Reacciones 21,22, 23: MDA puede reaccionar con bases de DNA como la citosina, adenina y guanina dando aductos  $\text{M}_1\text{C}$   $\text{M}_1\text{a}$  y  $\text{M}_1\text{G}$ .

#### 1.3.3.5.4 Efecto del ROS sobre macromoléculas en el envejecimiento

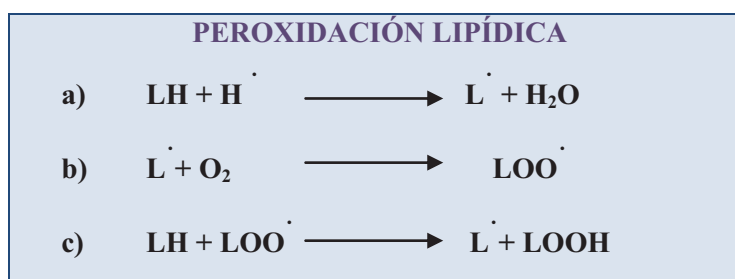
Efectos sobre proteínas: Las modificaciones químicas que producen las ROS sobre los complejos proteicos pueden ser diferentes distinguiendo si actúan sobre la cadena polipeptídica o sobre los componentes no proteicos. Las modificaciones sobre la cadena polipeptídica pueden afectar al enlace peptídico y a las cadenas laterales con residuos de aminoácidos. Las modificaciones de la parte no proteica están mejor estudiadas en proteínas que contienen grupos hemo. Bajo condiciones de estrés oxidativo las proteínas pierden el hierro lo que conlleva a la pérdida de la actividad enzimática. Estos grupos de proteínas incluyen por ejemplo algunos enzimas del ciclo de Krebs (Lushchak, 2007). Los grupos tiol de la cadena polipeptídica son especialmente susceptibles al ataque oxidativo por ROS (Fridovich, 1986). Por ejemplo, el singlete de oxígeno puede oxidar grupos sulfidriilo e inactivar directamente proteínas como la glutatión reductasa, la GPX i la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa (Tabatabaie et al., 1994). También se ha demostrado que el hipoclorito puede oxidar grupos sulfidriilo alterando la función de las proteínas que intervienen en el transporte de glucosa, transporte de aminoácidos y en la actividad de la bomba de sodio (Schraufstatter et al., 1990). Todos los residuos de aminoácidos son sensibles a la oxidación proteica pero los que contienen el grupo sulfuro (cisteína y metionina) y los grupos ácidos amino aromáticos (tirosina, fenilalanina y triptófano) son los más susceptibles a la oxidación (Davies, 1987). También tienen lugar descarboxilaciones y

desaminaciones que producen la rotura de la cadena polipeptídica y entrecruzamientos que interfiere en la función de la proteína (Dean et al. 1993). Durante el envejecimiento las proteínas oxidadas se acumulan y la oxidación de estas proteínas conlleva su pérdida de funcionalidad (Stedtman, 1995). Se ha estudiado la acumulación de grupos carbonilos como marcador de envejecimiento. Se ha observado un aumento del nivel de grupos carbonilos en la corteza frontal y occipital de personas ancianas (Smith et al., 1991). Además también se ha observado este aumento en la corteza de envejecidas ratas (Aksenova et al., 1998; Cakatay et al., 2001) e incluso en homogenados de cerebro de modelos caninos envejecidos (Head et al., 2002). También se ha visto este aumento en el cerebro de ratas con problemas de aprendizaje espacial (Nicolle et al., 2001). El aumento de proteínas con grupos carbonilos no se debe sólo a su aumento del daño oxidativo en la célula sino a que durante el envejecimiento hay una disminución de su degradación ya que se ha comprobado una disminución de la actividad del proteosoma. Es decir por una parte aumenta las ROS producidas en la mitocondria durante el envejecimiento que actúa sobre proteínas creando enlaces carbonilo (Sohal & Dubey, 1994), y por otra parte las ROS actúan sobre el proteosoma inhibiendo su actividad (Keller et al., 2002). Las proteínas no degradadas se acumulan y sus partes más oxidadas de los residuos aminoacídicos que son hidrófobos tienden a unirse y formar agregados de proteínas no funcionales (Widmer et al. 2006). La dificultad de aprendizaje que se da con la edad puede estar relacionada con la concentración de carbonilos que se dan en la corteza cerebral y la reducción de la capacidad motora con la oxidación proteica que tiene lugar en el cerebelo. (Foster et al. 1996). El nivel de proteínas 3-nitrotirosina es otro marcador de oxidación proteica y se forma cuando se nitrosila el anillo aromático de los residuos de tirosina de las proteínas (Butterfield & Stadtman, 1997). La nitrosilación de las proteínas lleva a su pérdida funcional y a la alteración de sus vías implicadas. (Kanski et al., 2003). El incremento de 3-NT se ha observado en el hipocampo y corteza de ratas envejecidas (Shin et al., 2002); en el líquido cefalorraquídeo de personas envejecidas (Tohgi et al., 1999) y en la sustancia blanca de la zona subcortical de monos viejos (Sloane et al., 1999).

Efectos sobre los ácidos nucleicos: El ADN también puede ser dañado por ROS. Las ROS puede provocar rotura de las cadenas del ADN, deleciones, cambio de bases e incluso aberraciones en los cromosomas (Sastre et al., 1999). Por ejemplo el radical hidroxilo puede extraer hidrógenos del esqueleto deoxiribosafosfato del ADN dando como consecuencia la rotura de la doble hélice. Los radicales hidroxilo también pueden reaccionar con las bases del ADN, y a veces dan como resultado mutagénesis por una incorrecta incorporación de las bases durante la replicación del ADN (Breen & Murphy, 1995). Las roturas de la cadena de ADN también pueden ser debidas a la producción de ácido nítrico seguido de peroxinitrito (Zhang et al., 1994). El daño oxidativo provoca mutaciones que se acumulan mayoritariamente en el ADN mitocondrial debido a que no está protegido por histonas produciéndose una disfuncionalidad

que conlleva a una disminución de la producción de ATP (Johns, 1995). Un marcador de daño oxidativo sobre el ADN que se puede observar en el envejecimiento es el de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) (Wong et al 2006). Se ha observado aumento de 8-OHdG en el cerebro de ratas macho envejecidas (Bokov et al., 2004).

Efectos sobre los lípidos: Las ROS tienen efectos importantes sobre los lípidos. El anión superóxido puede esterificar la membrana de los fosfolípidos con la consecuente liberación de ácidos grasos libres (Deby & Goutier, 1990). Los ácidos grasos insaturados son inmediatamente oxidados por ROS. El radical hidroxilo puede extraer un átomo de hidrógeno de la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos dando lugar a radicales lipídicos (reacción a, tabla 3). Normalmente los radicales lipídicos se combinan con el oxígeno para obtener radicales peróxidos (reacción b, tabla 3). El radical peróxido se convierte en hidroperóxido al extraer un átomo de hidrogeno del grupo metileno adyacente en la cadena hidrocarbonada, y así se va propagando la formación de radicales lipídicos (reacción c, tabla 3) (Braugher & Hall, 1989).



**Tabla 3. Reacciones de peroxidación lipídica. Juurlink, 1997.**

El mayor aldehído producto de la lipoperoxidación es el 4- hidroxil-2-nonenal (HNE) (Figura 9). Un producto final de la peroxidación del ácido araquidónico es el malondialdehído (MDA). El MDA es mutagénico en bacterias y células de mamífero y carcinogénico en ratas. El HNE es menos mutagénico pero es el mayor producto tóxico de la peroxidación lipídica (Valko et al., 2007). Los niveles de HNE se han visto aumentados en el hipocampo de perros viejos (Hwang et al., 2007). Los niveles de MDA se han encontrado aumentados en homogenados de cerebro de ratones viejos (Leutner et al., 2001); en el hipocampo de ratas viejas (Cini & Moretti, 1995) y en el citoplasma de las neuronas y los astrocitos del hipocampo de personas envejecidas (Dei et al., 2002). Las peroxidaciones lipídicas inducen cambios en la fluidez y la permeabilidad de las membranas lipídicas y pueden llevar a la pérdida de función de las membranas en la célula.

## 2. LA MEMORIA Y EL APRENDIZAJE ESPACIAL

---

### 2.1 DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LA MEMORIA

---

Durante el envejecimiento patológico se da una progresiva pérdida de memoria. La memoria es la capacidad mental que posibilita a un sujeto registrar, conservar y evocar las experiencias (ideas, imágenes, acontecimientos, sentimientos, etc.).

La memoria se puede clasificar según su duración en:

1. Memoria inmediata: Su duración es de unos pocos milisegundos y permite retener datos simples como un número de teléfono o un nombre.
2. Memoria de trabajo o de corto plazo: Se aplica a un proceso activo que está siendo actualizado de manera continua por la experiencia de un momento determinado como por ejemplo marcar un número de teléfono después de mirarlo en la agenda. Tiene subdivisiones como un registro espacio-visual para imágenes mentales y un circuito fonológico para elementos verbales.
3. Memoria de largo plazo: Almacén donde se guarda la información durante días, semanas, meses o años.

La memoria se puede clasificar según su contenido en:

1. Memoria declarativa (o explícita): Contiene los hechos del mundo y los acontecimientos personales del pasado que es necesario recuperar de manera consciente para recordarlos. Se compone de la memoria episódica y la memoria semántica:
  - Memoria episódica: Contiene la información relativa a sucesos acontecidos a lo largo de tu historia personal en un momento y lugar determinados.
  - Memoria semántica: Contiene información que no varía, como por ejemplo el número de horas que tiene el día o las capitales de provincia de Andalucía. Contiene la información cultural del individuo.
2. Memoria de procedimiento (o implícita): Contiene el aprendizaje y conservación de destrezas y habilidades, como peinarse o montar en bicicleta. Estos procedimientos se automatizan y no precisan de una ejecución consciente (De la Vega & Zambrano, 2007).

### 2.2 CARACTERÍSTICAS DE LA MEMORIA Y EL APRENDIZAJE ESPACIAL

---

Actualmente se considera que las principales regiones involucradas en los procesos de la memoria son los lóbulos frontales y temporales, el tálamo, la circunvolución del cíngulo, los ganglios basales, el hipocampo, la amígdala, los cuerpos mamilares del hipotálamo, los núcleos anterior y mediodorsal del tálamo, los núcleos del septo y la corteza entorrinal. Estas estructuras se relacionan entre sí por medio de una serie de vías: trigono o fórnix, estricta terminal, fascículo mamilotalámico o de Vicq d'Azyr, comisura anterior, por los circuitos límbicos, formados por un componente interno que relaciona distintas estructuras de este sistema. Uno de ellos es el descrito

por Papez (1937): hipocampo, fórnix, tubérculos mamilares, núcleos anteriores del tálamo y corteza cingulada, considerado habitualmente como un sistema activador de la memoria. Este conjunto anatómico está implicado en la adquisición y la evocación, puesto que su lesión bilateral ocasiona una amnesia anterógrada masiva y un trastorno retrógrado más limitado (Casanova-Sotolongo et al, 2004).

La memoria consiste en múltiples mecanismos especializados en codificar, almacenar y recuperar información acerca de rutas, configuraciones y localizaciones espaciales (Kessels, 2001). Esta memoria puede ser evaluada mediante modelos animales en los que la solución de la tarea depende de la información espacial disponible.

Los estudios de memoria en modelos animales hacen servir la navegación en los roedores. Los roedores pueden adoptar cuatro sistemas de navegación: orientación, guía, cartográfico y de integración de ruta (Vicens, 2003). Durante un aprendizaje de orientación, los animales aprenderán a emplear programas motores estereotipados y localizarán el camino hacia un lugar aprendiendo series de movimientos de orientación. De forma contraria, el aprendizaje de guía se basa en el empleo de estímulos señal hacia los que los animales aprenderán a aproximarse por hallarse asociados con la meta (Benhamou, 1997). Sin embargo, el aprendizaje cartográfico se basa en la localización de un lugar con respecto a la configuración de pistas disponibles en el entorno circundante y utiliza la relación de distancia, dirección y posición de las pistas estimulares para señalar la ubicación de un objeto. Implica el uso de señales distales con las que los animales se forman una representación de su entorno (mapa cognitivo) mediante el que localizan la meta. La integración de la ruta consiste en un proceso de actualización de la información cuando las pistas ambientales no ofrecen la suficiente, mediante un sistema interno de referencia basado en el lugar de salida antes de iniciar la navegación, por lo que el animal podría utilizar principalmente pistas cinestésicas y señales vestibulares (Santín et al, 2000) . Así una estrategia de orientación es completamente diferente de una estrategia cartográfica. No obstante aun se desconoce con precisión cuáles son los principios que gobiernan las formas de memoria que intervienen en la navegación espacial basada en la representación de relaciones entre los objetos del entorno. (Matthews & Best, 1997; Rodrigo et al, 1997) Principalmente, podemos establecer que existen dos teorías que proponen dos tipos de representaciones diferentes (Kelly, 2007):

1. La teoría del mapa cognitivo (O'Keefe & Nadel, 1978) defiende que los animales representan relaciones espaciales de tipo topográfico entre los estímulos, y para ello realizan cálculos métricos, como la estimación de la distancia y relaciones angulares entre los objetos.
2. La teoría relacional (Eichenbaum, 1999), propone que la representación del espacio se desarrolla mediante una amplia colección de codificaciones en la que se superponen determinados rasgos de las representaciones episódicas determinando y restringiendo la

representación global de las relaciones espaciales entre las pistas. Ello niega la necesidad de formar mapas cognitivos en sentido estricto.

## 2.3 EL HIPOCAMPO

La memoria declarativa se aprende rápidamente, se necesita gran flexibilidad y en su base neuroanatómica está envuelto el hipocampo (McClelland, 1995). Sin embargo la memoria de procedimiento se aprende lentamente, es inflexible y su base neuroanatómica son los ganglios basales (Knowlton et al 1996). La navegación cartográfica se aprende rápidamente, necesita gran flexibilidad y su base neuroanatómica es el hipocampo (Morris et al, 1982; Redish 1999). Sin embargo la navegación de orientación y el aprendizaje de guía se aprende lentamente, es inflexible y necesita el núcleo caudado (parte de los ganglios basales) (Packard & McGaugh, 1996).

La región hipocámpica en humanos parece ser crucial para la memoria declarativa (Cohen & Squire, 1980, Vargha-Khadem et al, 1997), independientemente de la modalidad sensorial, y no pueden recordarse ni expresarse explícitamente cuando esta región ha sufrido algún daño. (Victor & Agamanolis, 1990)

### 2.3.1 ESTRUCTURA INTERNA DEL HIPOCAMPO

El hipocampo forma parte del sistema límbico y se ubica en el interior del lóbulo temporal (Figura 10). Al observar un corte coronal aparece como una estructura en forma de C que protruye hacia el cuerno inferior del ventrículo lateral por lo que se denomina también como Cuerno de Ammón. El hipocampo se relaciona de modo estrecho con el giro dentado adyacente y en conjunto integran una estructura en forma de S. Es de color amarillo claro, debido a que está cubierto por una capa de sustancia blanca que se llama álveo, que corresponde a fibras mielinizadas, es decir, a los axones de las células piramidales del hipocampo. En un corte transversal se ve cómo el álveo se continúa con la fimbria. La fimbria es un paquete de fibras piramidales del hipocampo, que se continúan con los pilares del fórnix. El hipocampo se encuentra en estrecha comunicación con diversas regiones de la corteza cerebral en lo que podría considerarse un sistema, la formación hipocámpica. En él se incluyen además del hipocampo, el giro dentado (GD) y el subículo (Kafifi & Bergman, 2006).



Figura 10. Hipocampo en el cerebro humano. Figura modificada de Squire & Kandel, 2000.

Similarmente en la rata, cuando apartamos el neocórtex posterior y temporal aparece el hipocampo como una región alargada en forma de oreja (Figura 11). El hipocampo puede dividirse en porción dorsal que está al lado del septo, una porción posterior que comienza a curvarse en la zona ventral y lateral y la porción ventral situada en la porción temporal del cerebro. La parte del hipocampo visible en su zona dorsal es el hipocampo propiamente dicho mientras que el giro dentado está en la zona interna detrás de esta estructura. La fimbria es una larga región compuesta de fibras que está en el lateral del hipocampo. El fórnix dorsal (f, Figura 11) que se sitúa cerca de la línea media está por debajo del cuerpo calloso (O'Keefe & Nadel, 1978).

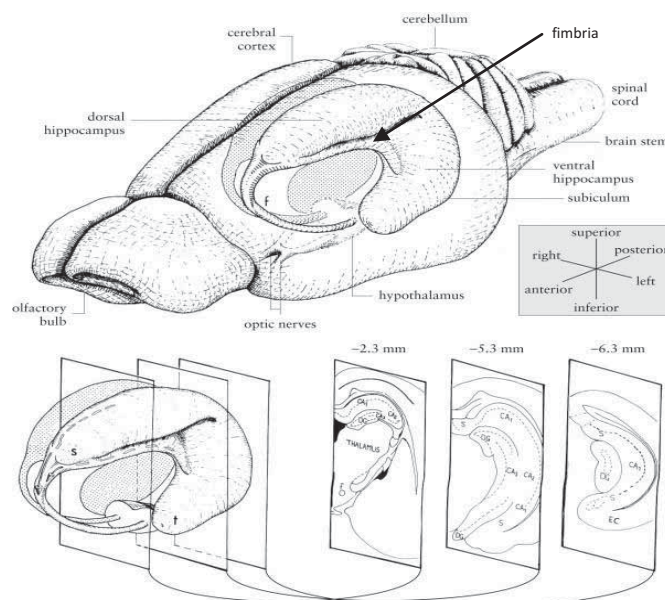


Figura 11. Cerebro de rata con la estructura septo hipocámpica. Amaral & Witter, 1995.

### 2.3.1.1 Zonas histológicas

El hipocampo tiene una estructura laminar de tres capas (Figura 12), las cuales son:

**Capa oriens o polimórfica:** Es la zona más superficial y está constituido por las dendritas basales de las neuronas de la capa piramidal y por neuronas intrínsecas pues sus axones no salen del hipocampo. Estas neuronas son de diferentes formas y tamaños, y sus axones se arborizan en forma de canasto alrededor de las neuronas piramidales del segundo estrato (células en canasta). Liberan GABA que inhibe a las neuronas piramidales, y cada una de ellas se relaciona con 200 a



500 neuronas piramidales. En consecuencia, se cree que el número de neuronas intrínsecas es mucho menor que el de las neuronas piramidales (Kafifi & Bergman, 2006).

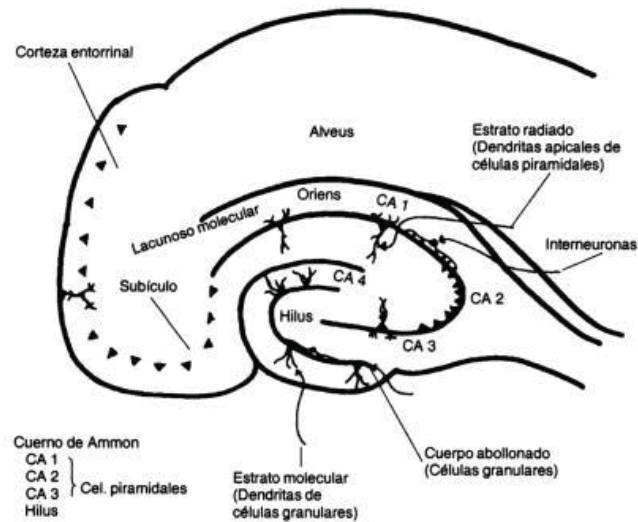
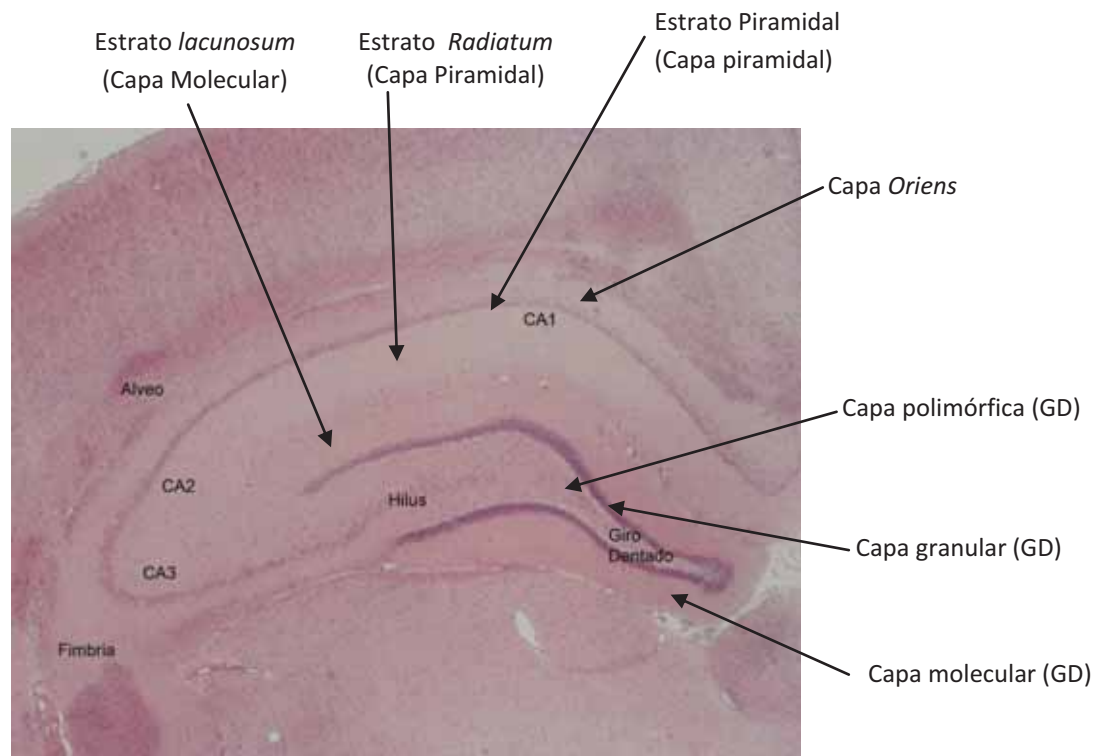


Figura 12. Estructura laminar del hipocampo. Alcaraz Romero, 2000.

**Capa piramidal:** Está formado por dos estratos (Figura 13): 1) el estrato piramidal dividido en los campos CA1 (cuerno de Amón), CA2, CA3 y CA4 o hilus, en los cuales se encuentran las neuronas piramidales, 2) el estrato *radiatum* en el que se encuentran las dendritas apicales de las neuronas piramidales. (Alcaraz Romero, 2000). Solamente las neuronas del estrato piramidal envían sus prolongaciones fuera del hipocampo, de tal manera que son las únicas neuronas que están respondiendo a los estímulos que llegan al hipocampo. Sus axones van a constituir el álveo y la fimbria, por lo tanto se puede decir que la célula piramidal es una neurona principal o extrínseca, en cambio, las neuronas de los otros dos estratos son neuronas intrínsecas, por el hecho de que sus axones van a dirigirse a hacer sinapsis con las prolongaciones, con las dendritas de las células piramidales, formándoles una especie de canasta alrededor, cuyo rol es liberar un neurotransmisor inhibitorio, en el fondo son como controladoras de las células piramidales (Kafifi & Bergman, 2006).

**Capa molecular:** Está formada por dos capas de fibras compuestas de dendritas de células granulares, una llamada *estratum lacunosum* compuesto por la parte más distal las dendritas de las neuronas piramidales (Figura 13) y otra conocida como capa de las fibras tangenciales. (Alcaraz Romero, 2000).

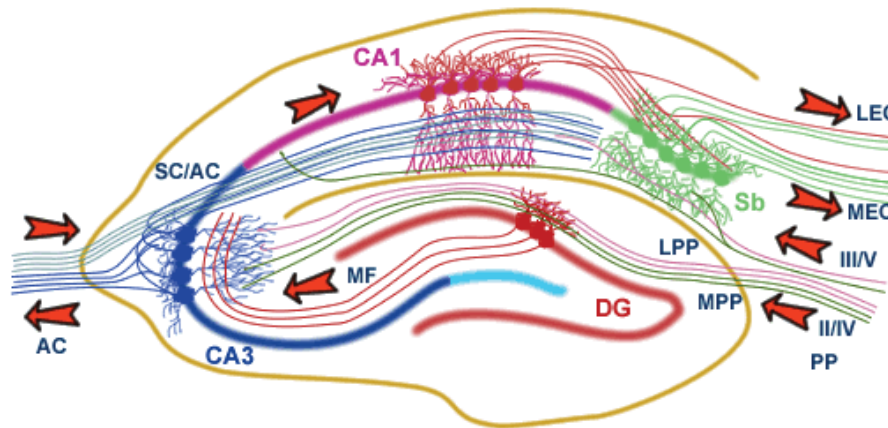
El giro dentado (GD) también tiene tres capas: 1) la capa molecular que consta de las dendritas apicales de las células granulares, 2) la capa granular donde se sitúan las neuronas granulares 3) la capa polimórfica que consta de las dendritas basales de las neuronas granulares (Alcaraz Romero, 2000).



**Figura 13. Corte transversal de hipocampo de ratona teñido con hematoxilina y eosina 3X; S. García Matas.**

### 2.3.1.2 Conexiones hipocampales

La información fluye hacia y a lo largo del hipocampo por medio de tres vías principales (Figura 14): 1) la vía perforante que circula desde la corteza entorrinal del giro parahipocampal a las células granulares del giro dentado. 2) La vía de las fibras musgosas que va desde las células granulares del giro dentado a las piramidales de la región CA3 del hipocampo. 3) La vía colateral de Schaffer que proyecta desde las células de región CA3 a las de la región CA1. (Kafifi & Bergman, 2006).



**The Hippocampal Network:** The hippocampus forms a principally uni-directional network, with input from the Entorhinal Cortex (EC) that forms connections with the Dentate Gyrus (DG) and CA3 pyramidal neurons via the Perforant Path (PP - split into lateral and medial). CA3 neurons also receive input from the DG via the mossy fibres (MF). They send axons to CA1 pyramidal cells via the Schaffer Collateral Pathway (SC), as well as to CA1 cells in the contralateral hippocampus via the Associational Commissural pathway (AC). CA1 neurons also receive input directly from the Perforant Path and send axons to the Subiculum (Sb). These neuron in turn send the main hippocampal output back to the EC, forming a loop.

Figura 14. Vías aferentes y eferentes del hipocampo. [www.bristol.ac.uk](http://www.bristol.ac.uk)

### 2.3.1.2.1 Vías aferentes

La mayor parte de la aferencia extrínseca a la formación hipocámpica proviene del área entorrinal (área de Brodmann 28) del giro parahipocámpico y, en menor grado, de la zona septal. Otras aferencias incluyen las que proceden del hipocampo contralateral, el hipotálamo, la amígdala, el tálamo, el locus ceruleus, los núcleos del rafe y el área tegmentaria ventral de Tsai. (Kafifi & Bergman, 2006).

Las principales aferencias del hipocampo llegan al giro dentado y al subículo por dos vías principales. La principal aferencia, que describió por primera vez Ramón y Cajal, sigue a través del área subicular adyacente (la pérfora) en camino hacia el giro dentado por donde entra al hipocampo y en consecuencia se denomina vía perforante. (Figura 14) Una aferencia más pequeña llega al hipocampo en la superficie ventricular, en donde se forma el alveus (axones de neuronas piramidales hipocámpicas) y, por consiguiente, se llama vía alvear. El área entorrinal sirve como una compuerta importante entre la corteza cerebral y el hipocampo. La información de muchas áreas corticales (cortezas límbica, sensorial de modalidad específica y de asociación multimodal) en los lóbulos frontal, temporal, parietal y occipital que trasladan información visual, auditiva y somatosensorial converge en la corteza entorrinal y el giro parahipocámpico posterior. A su vez, la corteza entorrinal propaga esta información cortical al hipocampo (Martin & Clark, 2007).

Hay otra aferencia del giro dentado al área CA3 del hipocampo que es la vía de las fibras musgosas (Figura 15). Dentro de la capa piramidal esta la vía colateral de Schaffer que proyecta desde las células de la región CA3 a las de la región CA1. La aferencia que se origina en CA1 va

al subículo y forma una eferencia hacia las capas IV y V de la corteza entorrinal (Martin & Clark, 2007). Esta última es la que se daña en grado más intenso en la enfermedad de Alzheimer y es el sitio del inicio temprano de la afección.

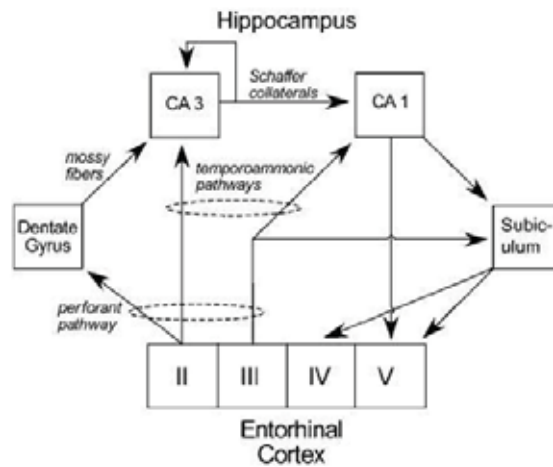


Figura 15: Circuito hipocámpico. Martin & Clark, 2007.

#### 2.3.1.2.2 Vías eferentes

La eferencia de la formación hipocámpica consiste en axones de neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo y el subículo (Figura 15). Los axones de neuronas granulosas en el giro dentado no tienen conexiones extrínsecas, sino que terminan de modo local como fibras musgosas en neuronas piramidales hipocámpicas del área CA3 (Martin & Clark, 2007). El hipocampo y el subículo se proyectan a la corteza entorrinal. A partir de este sitio se median impulsos a las áreas corticales de asociación límbica, sensorial específica y multimodal. Otra eferencia mayor del hipocampo discurre hacia el subículo. El hipocampo y el subículo contribuyen con fibras al fórnix, el tracto eferente de la formación hipocámpica. (Redish, 2001) Las fibras que se originan en el subículo conforman el principal componente del fórnix y se distribuyen, a través de su división poscomisural, a los cuerpos mamilares del hipotálamo y el núcleo anterior del tálamo. Las fibras de origen hipocámpico del fórnix constituyen su división precomisural más pequeña y se distribuyen a los núcleos septales, el área medial de la corteza frontal, los núcleos hipotalámicos anterior y preóptico, y el estriado ventral (Kafifi & Bergman, 2006).

## 2.3.2 EL HIPOCAMPO Y LA MEMORIA ESPACIAL

### 2.3.2.1 Estudio de las bases neuroanatómicas del aprendizaje espacial.

Existe amplia evidencia del papel crítico que juega el hipocampo en la memoria declarativa en humanos y la espacial en roedores. En 1978, O'Keefe y Nadel propusieron que el hipocampo podría ser la estructura cerebral a través de la cual se forma el mapa cognitivo que permite al animal navegar en el espacio. Los animales realizarían una representación de las relaciones espaciales mediante las estimaciones de la distancia y las relaciones entre estímulos. Investigaciones posteriores indicaron que esta estructura podría ser importante en la formación del engrama, observando que la potenciación a largo plazo (LTP de *long-term potentiation*) ocurre más rápidamente en el hipocampo. Aunque la LTP del hipocampo se ha asociado a diversos tipos de aprendizaje, se ha relacionado más claramente con el aprendizaje espacial (D'Hooge & De Dyen, 2001). Los circuitos del hipocampo son marcadamente plásticos, y esta capacidad está mediada en gran parte por procesos de potenciación y depresión a largo plazo. Los mecanismos de plasticidad sináptica en el hipocampo son un paso hacia la formación de la memoria a largo plazo y su alteración podría subyacer a los déficits de memoria observados en sujetos de edad avanzada (Shapiro, 2001). El descubrimiento de O'Keefe y Dostrovsky (1971) sobre la existencia de las células de lugar en el hipocampo, las cuales se activan cuando el animal se encuentra en una localización concreta dentro de un ambiente, percibe un estímulo o desarrolla una conducta en un lugar concreto (Nadel, 1991) evidencia la importancia de esta estructura en el aprendizaje espacial. Estas células son algunas neuronas piramidales de las regiones CA1 y CA3 que disparan correlativamente a la posición del animal en el entorno, y se hallan activas durante la exploración y la localización de lugares (Weiner et al., 1989). El hipocampo contendría un mapa cognitivo formado por células de lugar con el que el animal podría moverse en su entorno. Estas células han sido descritas en ratas y ratones y parecen codificar una representación polimodal del lugar (Cho et al., 1998), lo que apoyaría la hipótesis de que el hipocampo está implicado en la formación del mapa cognitivo (Cain, 1998). Durante el envejecimiento se podría modificar el patrón de activación de las células de lugar, aunque los datos no son totalmente concluyentes (Tanila et al., 1997). Los estudios donde se ha lesionado el hipocampo han subrayado también el papel crucial del hipocampo en la memoria espacial tanto en humanos como en animales. Algunos estudios en hombres muestran que el hipocampo derecho participa en la codificación y recuerdo de la memoria espacial (topográfica) (Maguire et al., 1998). Otro estudio muestra cambios morfológicos en los hipocampos de personas que utilizan en mayor medida su memoria espacial (Maguire et al., 2000). Además pacientes con lesiones hipocampales presentan graves dificultades para encontrar la plataforma en un test virtual del laberinto de agua (Astur et al., 2002). Se ha observado que estudios de imagen y lesión del hipocampo para actividades de navegación en humanos se corresponden bien con los estudios en ratas y primates mostrando como resultado un importante

déficit en la navegación espacial. Sin embargo, nuestra comprensión de los mecanismos exactos mediante los que se procesa la información espacial no se conocen totalmente, habiéndose propuesto distintas hipótesis de trabajo. La teoría del mapa cognitivo (O'Keefe y Nadel, 1978) postula que el hipocampo es una estructura clave en la navegación cartográfica. Experimentos con el laberinto de agua apoyarían esta teoría, ya que las lesiones tanto del propio hipocampo como de otras estructuras de la formación hipocampal causan un grave deterioro en esta tarea. Por otra parte, los modelos relacionales inciden en el papel del hipocampo en la formación de relaciones complejas y flexibles entre los estímulos, y no solamente en las relaciones meramente topográficas (Eichenbaum, 1999). El hipocampo actuaría como instrumento puente que permitiría integrar los diferentes rasgos conductuales de la información en sus ambientes (Eichenbaum et al., 1999). Los trabajos realizados con el laberinto de agua también sugieren la implicación del sistema hipocampal en la formación de asociaciones o representaciones complejas entre los estímulos (D'Hooge & De Deyn, 2001). Esta idea concuerda con la evidencia neuroanatómica y neurofisiológica que muestra cómo el hipocampo integra múltiples áreas corticales relevantes para la percepción y la memoria, e interviene en la codificación de las asociaciones entre las características espaciales y temporales de los estímulos ambientales (Kessels et al., 2001).

Aunque la formación hipocampal es central para el aprendizaje espacial, el mecanismo neurobiológico subyacente a este aprendizaje podría implicar la acción coordinada con otras regiones cerebrales. Se ha observado que los animales con lesión en el hipocampo pueden llegar a desarrollar aprendizaje espacial, lo que hace pensar que hay otras estructuras implicadas en este aprendizaje (Ramos 2003). Las células de lugar, aparte del hipocampo, también se encuentran en el subículo, lo que indicaría su implicación en la memoria espacial (Calton & Taube, 2009). Ranck (1984) descubrió unas células en la corteza parietal que son las células de dirección de la cabeza con propiedades complementarias a las células de lugar del hipocampo. Estas células se han encontrado en otras zonas del cerebro como el postsubiculum, el tálamo, los núcleos mamilares y el núcleo tegmental dorsal (Calton & Taube, 2009). Su actividad parece relacionarse con la orientación de la cabeza con respecto al entorno, independientemente de su localización, apoyando la hipótesis de que la corteza parietal integra y procesa tanto la información visual como la relativa al movimiento, ya que su lesión deteriora la ejecución en tareas espaciales. Una propiedad importante de estas células es que son capaces de mantener su actividad aun cuando las pistas ambientales se hayan eliminado o las luces se hayan apagado (Taube et al., 1990), ello sugiere que las células direccionales, al igual que las células de lugar hipocampales, poseen memoria y no son activadas simplemente por la estimulación sensorial, sino que representan algunos aspectos del entorno (Poucet, 1993). El hipocampo es importante para la orientación en el espacio y el córtex parietal posterior participa en integrar esta información con la ruta planificada (Calton & Taube, 2009).

En la corteza entorrinal se han encontrado dos tipos más de células que localizan el animal en el espacio: son las células de red y las células de límite. Las células de red fueron descritas por primera vez por Hafting y su equipo en 2005, y son células cuyos patrones de emisión de señales funcionan como coordenadas en un mapa y se activan cuando la posición del animal coincide con el vértice de una cuadrícula regular de triángulos equiláteros en los que dividimos el espacio. Estas células muestran que el córtex entorrinal dorsocaudado medial contiene un mapa neural del ambiente espacial bien direccionado, orientado y topográficamente organizado (Hafting et al., 2005). Las células de límite fueron descubiertas por Solstad y su equipo en 2008, y son células que se activan cuando el animal llega al límite de un ambiente, así podrían definir el perímetro del ambiente y por ello servir como referencia de marco para los lugares situados dentro, controlando la actividad de los otros tres tipos celulares. Estas células de límite suponen menos de un 10 por ciento de la población de células locales pero pueden encontrarse en toda la corteza entorrinal además de en una región cerebral adyacente, el parasubiculum, donde se mezclan con las células de dirección de la cabeza y las células de red (Solstad et al., 2008).

De forma colectiva las células de lugar, las células de dirección de la cabeza, las células de red y las células de límite constituyen un circuito que traduce los indicios visuales en información sobre la "auto-localización", para que así se pueda comprender y recordar donde se encuentran objetos importantes y los animales se muevan en el entorno sin perderse.

Desde el punto de vista neuroanatómico la contribución de la corteza parietal y en el procesamiento de la información espacial podría depender del grado de funcionalidad del hipocampo (Thinus-Blanc, 1996). La corteza parietal está implicada en el aprendizaje espacial tanto en la localización espacial allocéntrica, relacionada con la formación de los mapas cognitivos e implicado en la consolidación de la memoria, como en la egocéntrica basada en la propia situación del cuerpo. Además se ha implicado a esta zona en el almacenamiento de la información espacial durante largos periodos de tiempo (Kesner 2009; Save & Poucet, 2009). El papel de estas dos estructuras no puede aislarse de otras áreas cuya actividad está implicada en la integración y procesamiento que se hace del entorno. Las lesiones del núcleo accumbens, que actúa como una especie de puente entre el sistema límbico y motor (Ploeger et al., 1994), deterioran la ejecución en el laberinto de Morris. También se ha sugerido que el estriado intervendría en la organización espacial de la conducta aunque de forma distinta al hipocampo (Ahmed, 2008). El estriado sería el sustrato neural de la localización espacial allocéntrica, mientras que el núcleo caudado intervendría en la localización egocéntrica (Devan et al., 1996; Ahmed, 2008). También se ha implicado el núcleo *accumbens* en colaboración con el hipocampo y el estriado en las tareas de aprendizaje espacial (Redish & Touretzky, 1997; Burgess, 2008). Lesiones en los cuerpos mamilares también deterioran el aprendizaje espacial ya que deterioran las señales de las células de dirección de la cabeza (Sharp & Koester, 2008).

Las lesiones cerebelosas y de los núcleos basales deterioran la ejecución en el laberinto de agua, sugiriendo su implicación en los aspectos procedimentales de la tarea (D'Hoodge & De Deyn, 2001). Otras regiones cerebrales como el tálamo y la corteza prefrontal participan en el aprendizaje espacial. El tálamo como principal estación de relevo (Conway, 1998) y la corteza prefrontal en la planificación y adaptación a las condiciones cambiantes en situaciones complejas (Granon & Poucet, 1995). Otros estudios implican varias regiones como el presubiculum, el tálamo anterior, la corteza retrosplenial, la corteza parietal y el estriado que ayudarían al hipocampo en su función de adquirir, consolidar y almacenar la información que requiere el aprendizaje espacial (Moser, 2008). Además el descubrimiento de las células de red y de límite demuestran que la corteza entorrinal y el parasubiculum ayudan al animal a localizarse en el espacio e intervienen en el aprendizaje espacial (Solstad et al., 2008).

### **2.3.2.2 Sistemas de neurotransmisión y aprendizaje espacial**

Diversos sistemas de neurotransmisión han sido estudiados en relación con el aprendizaje y la memoria espacial, aunque una inspección detallada de los datos revela que la acetilcolina y el glutamato han sido los más investigados (Myhrer, 2003). En general, las manipulaciones farmacológicas que suprimen la actividad colinérgica (escopolamina, mecamilamina ...) producen déficits en la ejecución en el laberinto de agua. Sin embargo, los efectos de agonistas colinérgicos como la nicotina dependen de distintos factores, como la especie, la dosis, el régimen de administración y la duración del tratamiento. En ratas, su administración aguda antes del entrenamiento mejora este aprendizaje tanto si presentan déficits, por envejecimiento o lesiones, como si son animales intactos (Riekkinen & Riekkinen, 1997; Hodges et al, 1995). Sin embargo en ratones NMRI intactos no se ha observado tal mejora tras el tratamiento agudo con nicotina (Lamberty & Gower, 1991), aunque en la cepa C57 se ha descrito un incremento de la tasa de aprendizaje tras la administración crónica (Bernal et al.1999). Los sistemas noradrenérgico y serotoninérgico pueden mejorar los procesos de memoria espacial mediados por el sistema colinérgico. (McNamara & Skelton, 1993).

El sistema glutamatérgico también interviene en este aprendizaje, ya que los antagonistas de los receptores NMDA, incluso a pequeñas dosis, deterioran la adquisición de estas tareas de forma específica (Caramanos & Shapiro, 1994; Rinson & Stanton, 1995). Además la LTP en la mayoría de las sinapsis del hipocampo depende de la actividad de dichos receptores (Cain, 1998). Se ha evaluado el posible papel del sistema dopaminérgico, observándose que al inhibir la transmisión dopaminérgica, mediante la administración de neurolépticos, se impide el aprendizaje espacial (Ploeger et al., 1994). Además hay evidencias de la modulación dopaminérgica en el mantenimiento de la LTP. La fuerte tetanización de la vía colateral de Schaffer produce aumento de dopamina en cortes de hipocampo (Frey et al, 1990), y el bloqueo o ausencia de los receptores de



dopamina D1-D5 impide la transmisión en CA1 (Matthies et al., 1997, O'Carroll & Morris, 2004). La activación del sistema GABA también deteriora la capacidad espacial de los animales (D'Hooge & De Deyn, 2001). En cambio el sistema monoaminérgico es necesario para desarrollar la tarea del laberinto acuático de Morris pero no para el aprendizaje espacial per se. (McNamara & Skelton, 1993)

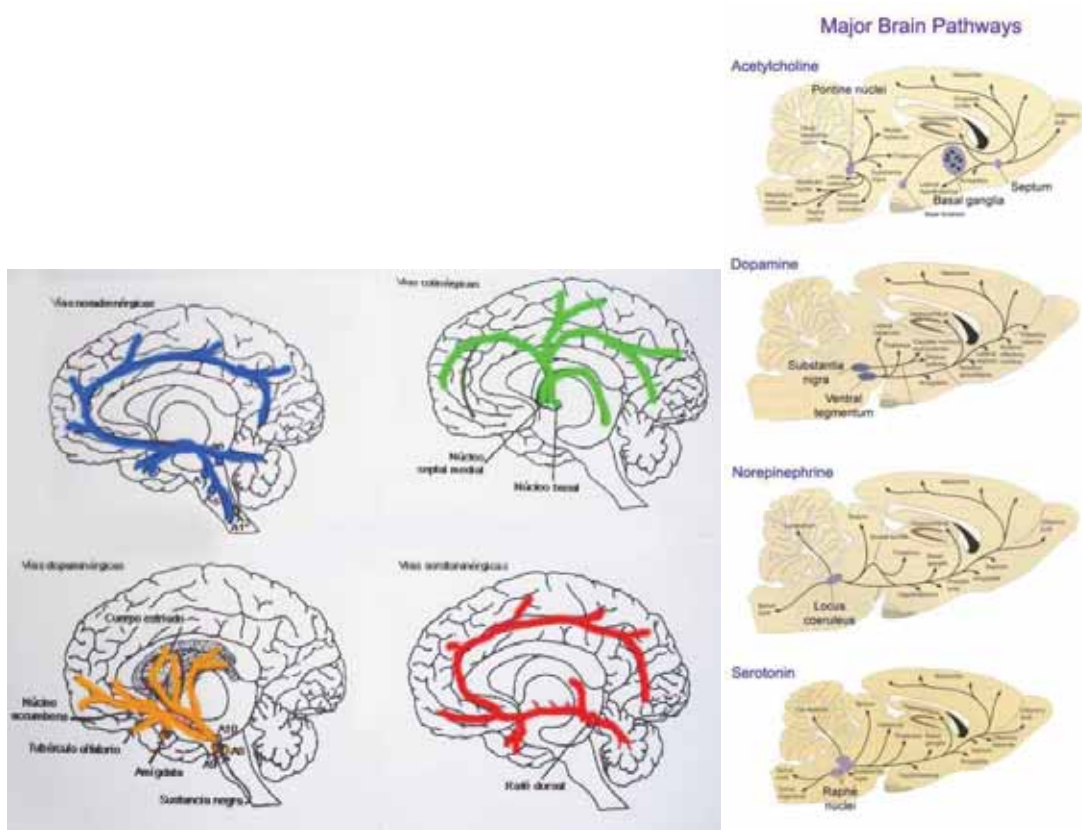


Figura 16. Vías de neurotransmisión en el cerebro. [www.analissmusical.com/vías nerviosas &](http://www.analissmusical.com/vías_nerviosas_)  
[www.colorado.edu](http://www.colorado.edu).

### 2.3.2.3 Cambios en el aprendizaje espacial durante el envejecimiento

Los animales viejos adquieren la mayoría de las tareas espaciales más lentamente que los jóvenes. No obstante, existe gran variabilidad interindividual, ya que algunos animales viejos aprenden esta tarea tan eficientemente como los jóvenes, mientras otros muestran marcado deterioro (Gallagher et al., 1993; Wood & Dudchenko, 2003; Winocur et al., 2008). Estudios anatómicos y electrofisiológicos confirman que el hipocampo de las ratas envejecidas tienen pérdida de sinapsis en el GD, también hay pérdida de sinapsis funcionales en el área CA1 y una disminución de la respuesta al receptor NMDA en las sinapsis de la vía perforante en las células granulares del GD. Además hay una alteración de la regulación del calcio en el área CA1. Estas

alteraciones pueden perjudicar la plasticidad sináptica que incluyen déficits en la inducción y el mantenimiento de la LTP y la depresión a largo plazo en el hipocampo (Rosenzweig & Barnes, 2003). La alteración de los mecanismos de plasticidad sináptica del hipocampo podría ser una de las causas del deterioro espacial observado en el envejecimiento (Shapiro, 2001). El paradigma de navegación espacial parece ser un modelo apropiado para evaluar tales déficits, ya que las representaciones del entorno dependen en gran medida de un funcionamiento hipocampal eficiente, el cual puede verse deteriorado en el proceso de envejecimiento en humanos y animales (Barnes, 1998). Al interpretar los déficits espaciales asociados al envejecimiento hay que considerar que en el aprendizaje en el laberinto acuático se necesita retener información durante un periodo relativamente largo, siendo menores los requerimientos de la memoria reciente, cuyo déficit es un síntoma característico del envejecimiento animal y humano (Bartus, 2000). En estudios virtuales de navegación espacial también se ha observado que las personas ancianas también ejecutan peor las tareas que las personas jóvenes (Zakzanis et al., 2009).

### 3. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

---

#### 3.1 DEFINICIÓN

---

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva y es la demencia más prevalente de la gente mayor de 65 años: afecta al 7-10% de los individuos mayores de 65 años y, posiblemente, al 40% de aquellos que sobrepasan los 80 (Wimo et al., 2003). La mayoría de los casos de la EA son esporádicos (95%), mientras que solo un 5% tiene un patrón de herencia dominante (enfermedad de Alzheimer familiar). La EA se caracteriza clínicamente por el deterioro de la memoria a corto plazo, la afasia (pérdida del habla), apraxia (imposibilidad de realizar movimientos coordinados) y agnosia (pérdida de la facultad de reconocer a personas o cosas), sumado a estos se da una reducida capacidad de juicio, de toma de decisiones y de orientación, además de modificaciones en el estado de ánimo y de alteraciones psicóticas y de la conducta (Cummings, 2004; Robert et al., 2005). Los cerebros de los enfermos de Alzheimer, descritos por primera vez por el neurólogo alemán Alois Alzheimer en 1906, presentan placas seniles y ovillos neurofibrilares y se produce una pérdida neuronal y atrofia cerebral. El componente mayoritario de las placas seniles es el péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) y los ovillos neurofibrilares están formados por la proteína tau hiperfosforilada (Harris & Fahrenholz, 2005). La localización de las alteraciones neuropatológicas se sitúan fundamentalmente en la corteza cerebral, sobre todo en las áreas temporoparietales, el hipocampo y la amígdala (Walsh & Selkoe, 2004).

#### 3.2 TEORÍAS SOBRE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

---

Todavía no se ha establecido con precisión el mecanismo patogénico de la enfermedad. Sin embargo, la misma parece ser un trastorno heterogéneo, con interrelación de una serie de factores genéticos y adquiridos a lo largo de la vida. Se han formulado diferentes teorías y entre ellas la más aceptada es la hipótesis amiloidea.

##### 3.2.1 HIPÓTESIS AMILOIDEA

La hipótesis amiloidea se formuló hace dos décadas y considera que la producción patológica de los péptidos de  $A\beta$  son la mayor causa de la muerte y disfunción de las neuronas que conllevan a la demencia en la EA. Este conduciría posteriormente al daño en los axones mediante procesos inflamatorios, la alteración en la estructura del citoesqueleto microtubular neuronal y la aparición de los cambios neurofibrilares y neurodegenerativos, con el resultado final de la muerte neuronal (Hardy & Selkoe, 2002). Factores genéticos o ambientales son los causantes de la desregulación en el procesamiento de APP que es el principio de una cascada de reacciones que llevarán a desarrollar la EA. El mal procesamiento de APP lleva a la superproducción de  $A\beta$ -42 que llevará a

la formación del núcleo de las placas seniles maduras o se depositará en forma de placas difusas. La formación de placas seniles activan la microglía y la astrogliá, causando daño oxidativo, fosforilación y agregación de tau llevando a la pérdida neuronal y disfunción sináptica (Figura 17) (Verdile et al., 2004). Además de ser una de las características neuropatológicas de la EA, la distribución y el número de placas seniles correlaciona con la pérdida cognitiva en la enfermedad (Cummings et al., 1996). Actualmente se estudia cual es la forma de A $\beta$  que tiene un papel principal en la enfermedad, si las formas agregadas o las formas solubles de este péptido (Lambert et al., 1998; Wash et al., 1999; Hardy & Selkoe, 2002). En estudios recientes sobre el papel del péptido amiloide intraneuronal se ha demostrado que contribuye a la patología de la EA facilitando la hiperfosforilación de tau, impidiendo la correcta función de la mitocondria y el proteosoma y desencadenando dishomeostasis del calcio y pérdida de la sinapsis nerviosas afectando a la LTP (Figura 18) (LaFerla et al., 2007). En estudios con ratones transgénicos 3xTgAD se han visto alteraciones cognitivas y no cognitivas asociadas a demencia (síntomas neuropsiquiátricos de demencia, *BPSD*), a edades tempranas en las que solo se detecta A $\beta$  intraneuronal (Giménez-Llort et al., 2007).

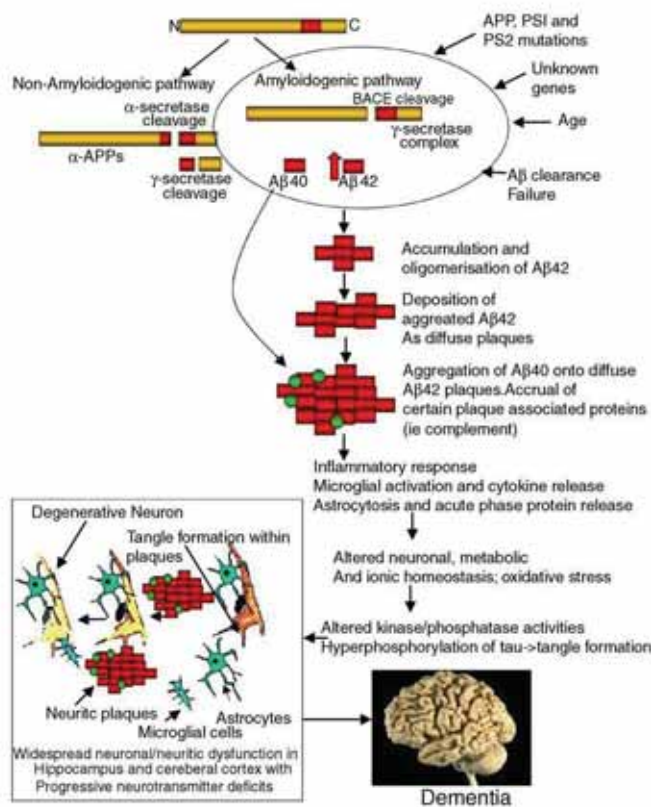


Figura 17: Hipótesis amiloidea. Verdile et al., 2004.

Hay varios estudios que avalan la hipótesis amiloidea. En estudios genéticos se ha visto que mutaciones en la presenilina 1 y la presenilina 2 alteran el metabolismo del APP a través de un efecto directo sobre la  $\gamma$ -secretasa. Además las mutaciones en el gen que codifica para la proteína tau da lugar a una demencia frontotemporal con parkinsonismo donde se observan grandes depósitos de tau en forma de ovillos neurofibrilares (ONF) pero no se detecta acumulación de A $\beta$  ni formación de placas difusas o seniles. Hay datos que sugieren que en la cascada patogénica de la EA, la alteración en el procesamiento del APP tiene lugar antes de que se den las alteraciones en tau. Así, los ratones transgénicos que sobreexpresan APP y tau humana mutada muestran mayor formación de ONF en comparación con los ratones que sólo sobreexpresan tau. Además se ha observado que en cultivos neuronales de hipocampo de ratón la toxicidad del A $\beta$  es dependiente de la proteína tau. Otros estudios relacionan cambios en el metabolismo del A $\beta$  con el riesgo en la EA de aparición tardía. (Hardy & Selkoe, 2002).

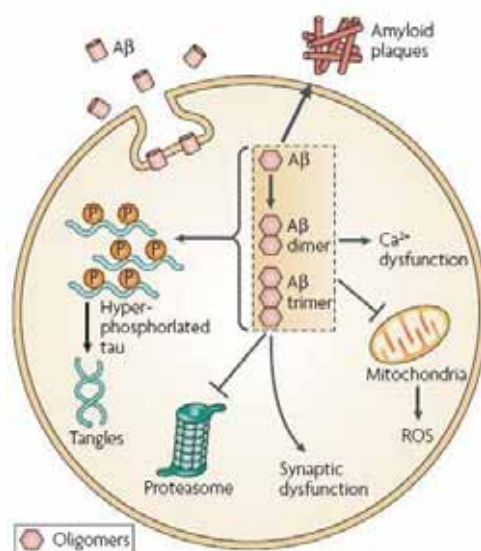


Figura 18. Efectos patológicos del A $\beta$  intraneuronal. LaFerla et al., 2007.

### 3.2.1.1 Factores genéticos

Las mutaciones génicas causantes de los casos familiares abalan la hipótesis amiloidea de la enfermedad. Hasta el momento se han reportado 3 cromosomas implicados en su patogenia: 1, 14 y 21, aunque actualmente hay estudios que relacionan más cromosomas implicados (Bird, 2008). La primera mutación se describió en el gen de la proteína precursora de  $\beta$ -amiloide (APP) en el cromosoma 21 (Verdile et al, 2004). Hasta la fecha se han descrito dieciséis mutaciones diferentes. Todas las mutaciones afectan a los exones 16 y 17, cerca de los lugares implicados en la proteólisis de la APP por las diferentes secretasas (Figura 19). Los pacientes con síndrome de Down de más de

40 años desarrollan cambios similares a los enfermos de EA porque la trisomía del par 21 proporciona a las víctimas una doble "dosis" del programa genético productor de EA (Bird, 2008).

Las mutaciones en los genes de la presinilina 1 (PS1) en el cromosoma 14 y de la presinilina 2 (PS2) en el cromosoma 1 también están relacionados con una forma dominante de EA. Las presinilinas son proteínas transmembrana del RE y el aparato de Golgi. La PS1 contiene 467 aminoácidos y la PS2 contiene 448 aminoácidos, muy conservados entre especies. Se conocen más de 50 mutaciones en la PS1 y dos mutaciones en la PS2 que llevan a las mismas disfunciones que las mutaciones en APP alterando el procesamiento del APP y liberando más A $\beta$ -42. La interacción entre APP y las presinilinas en el RE interviene en la producción de A $\beta$ -42 (Czech, 2000).

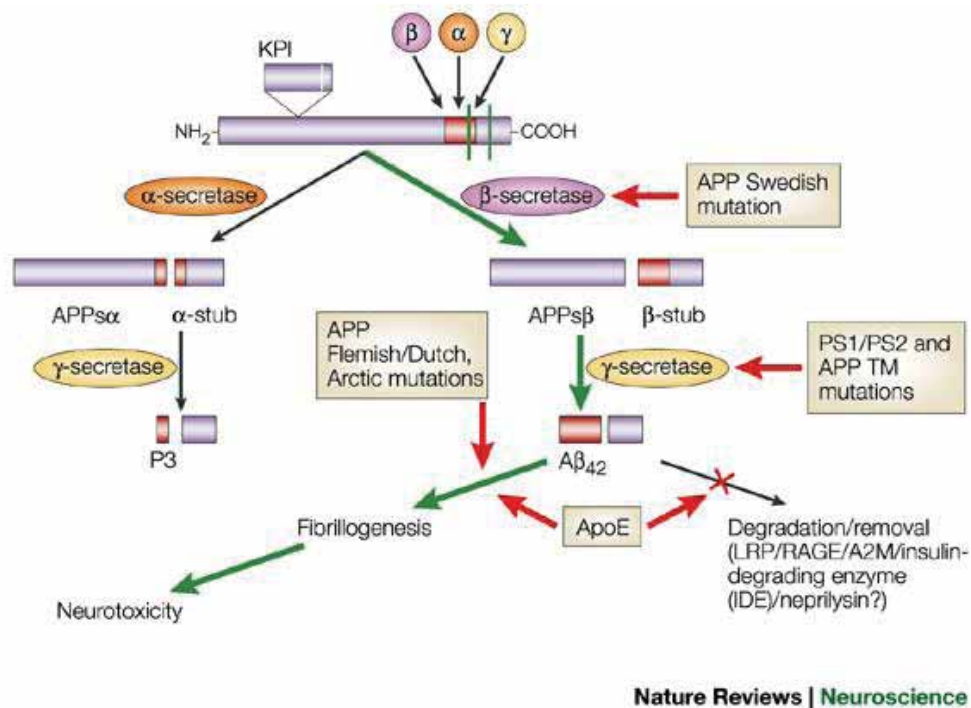


Figura 19: Mutaciones en genes involucrados en AD. Sangram et al., 2002.

En los casos esporádicos de la EA se ha establecido la influencia de diversos genes. En el cromosoma 19 se encuentra el gen de la apolipoproteína E (ApoE), implicado tanto en las formas familiares de comienzo tardío, como en la EA esporádica (Lovestone & McLoughlin, 2002). La posesión, por herencia, del alelo 4 del gen ApoE, en el cromosoma 19 parece ser uno de los factores mejor caracterizados para posibilitar la aparición de la EA. La ApoE es una proteína plasmática implicada en el transporte del colesterol y otros lípidos en los diferentes tejidos. Es

sintetizada primariamente por el hígado y el cerebro, y constituye la principal apolipoproteína expresada en el tejido cerebral, preferentemente en la glía. El gen apoE tiene 3 isoformas E2, E3 y E4. La más frecuente es la E3 (constituye el 78 % de los alelos presentes en población caucasiana) y la menos frecuente es la E2 (constituye el 7 %). Se ha observado que el E4 (15 % de alelos en población caucasiana) aumenta el riesgo de padecer la EA mientras que el E2 probablemente reduce el riesgo o es un gen protector. Sin embargo, muchas personas con EA no tienen el gen tipo E4 de la misma manera que otras personas con el gen E4 no desarrollan la enfermedad.

Se están estudiando otros genes ligados a padecer EA en los cromosomas 2, 7, 9, 10, 12, 15 y 19. (Bird, 2008)

### 3.2.2 HIPÓTESIS TAU

Aunque la hipótesis amiloidea es la más aceptada hay otras hipótesis que pretenden explicar la EA. Mientras los defensores de la hipótesis amiloidea defienden el papel central del A $\beta$  en la patogenia de la EA (Hardy & Selkoe, 2002) otros investigadores defienden la hipótesis tau que propone los ONF como los elementos más importantes de la enfermedad (Mudher & Lovestone, 2002). Para respaldar la hipótesis Tau hay estudios que indican que las alteraciones cognitivas en los enfermos de Alzheimer están directamente asociadas a la hiperfosforilación de tau (Delacourt, 2005).

La hipótesis de tau propone que la unión de tau a los microtúbulos está alterada por un aumento en la fosforilación de tau que puede ser debida directamente a mutaciones en el gen de esta proteína. Una disminución de la proteína tau unida a microtúbulos aumenta la proteína tau libre que bajo las condiciones apropiadas se autoagrega formando filamentos apareados helicoidales. La pérdida de la unión de tau a los microtúbulos da como resultado la pérdida de la función de los microtúbulos. El proceso de la agregación de tau en ausencia de mutaciones no es conocido pero puede ser el resultado del incremento en la fosforilación, la acción de proteasas o la exposición a polianiones como los glicosaminoglicanos (Figura 20) (Mudher & Lovestone, 2002).

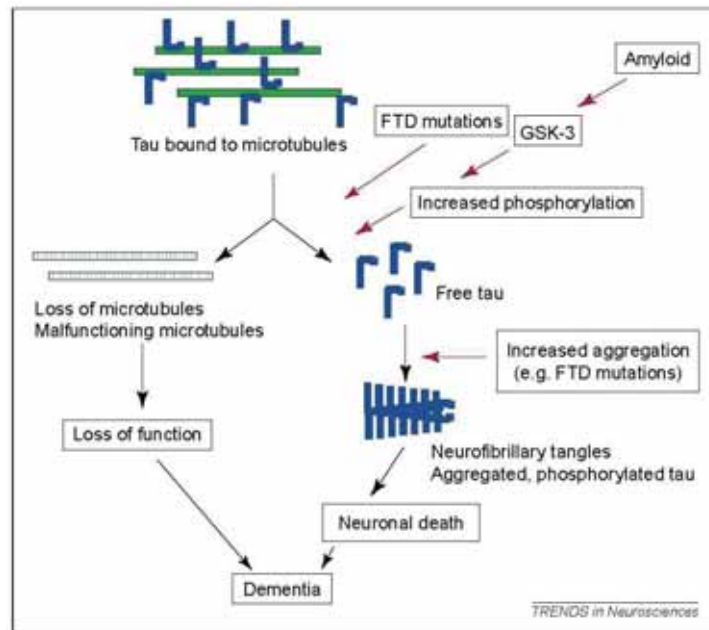


Figura 20. Hipótesis tau. Mudher & Lovestone; 2002

Estudios recientes sugieren una nueva vía de señalización que relacionaría la hipótesis amiloidea y la hipótesis de tau en una misma cascada de alteraciones bioquímicas, es la hipótesis de señalización de wnt. La alteración de esta vía disminuye el metabolismo no amiloigénico del APP que conlleva a la sobreproducción de A $\beta$ . El A $\beta$  activa diversas quinasas entre ellas la glicógeno sintetasa kinasa (GSK3), que pueden causar la hiperfosforilación de tau (Figura 21) (Ávila & Hernández, 2007; Hooper et al 2008; Mudher & Lovestone, 2002).

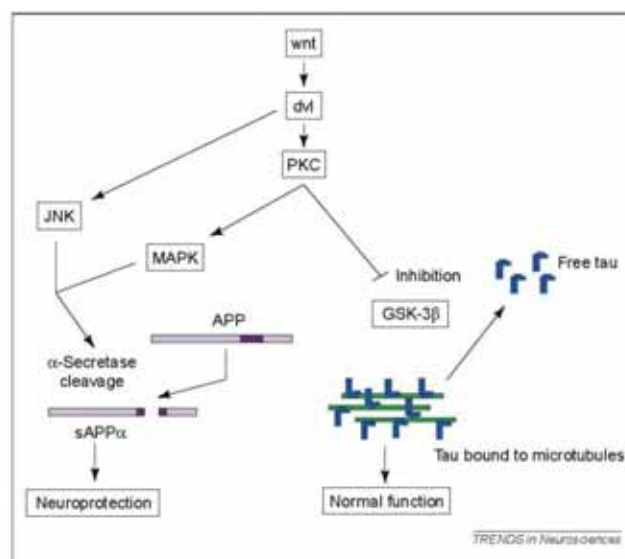


Figura 21. Vía wnt. Mudher & Lovestone, 2002.



### 3.2.3 HIPÓTESIS COLINÉRGICA

Las alteraciones histopatológicas en la EA se producen siguiendo un patrón característico, en el que determinadas zonas cerebrales y poblaciones neuronales resultan afectadas siguiendo un orden determinado. Los cambios tienden a comenzar en el lóbulo temporal medial, a través de la corteza de asociación, desde allí se proyectan hacia el núcleo basal de Meynert (Whitehouse, 1982), la fuente primaria de neuronas colinérgicas, para seguir luego las proyecciones de éste hacia el hipocampo y la corteza frontal, parietal y occipital. Así, a mediados de los años 70, se demuestra un déficit específico de las enzimas colinoacetiltransferasa (ChAT) y acetilcolinesterasa en el material proveniente de la autopsia de pacientes con EA, y se establece una correlación entre el déficit colinérgico y la disfunción cognitiva. La enzima ChAT es esencial para la síntesis de acetilcolina (ACh) y se relaciona con la deficiencia del neurotransmisor en el origen del proceso mórbil. En la década de los 80, se describe una pérdida de neuronas colinérgicas en los núcleos basales y se publica que existen correlaciones entre la pérdida de neuronas en los núcleos basales, el déficit de ChAT y las placas neuríticas. Todos estos datos permiten formular la «hipótesis colinérgica» sobre la fisiopatología de la EA (Bartus et al., 1982) que postula la existencia de una relación entre la lesión de tipo degenerativo de la transmisión cerebral colinérgica y los síntomas más precoces de la EA, especialmente las alteraciones cognoscitivas, memoria y aprendizaje (García, 2002). En estudios más recientes se ha observado además de un descenso en el número de neuronas colinérgicas una disminución en el número de receptores colinérgicos en las neuronas de la corteza cerebral de individuos posmortem. Esta disminución también se ha observado *in vitro* tras la exposición a A $\beta$  (Wevers et al., 2000). Además de los cambios en la actividad de acetilcolinesterasa se ha observado que esta enzima puede potenciar la agregación de A $\beta$  y su neurotoxicidad (Bartolini et al., 2003; Dumont et al., 2006).

## 3.3 FACTORES DE RIESGO Y DESENCADENANTES

---

Hay factores de riesgo que pueden contribuir a desencadenar la enfermedad y cursan con la misma como la inflamación y el estrés oxidativo. Además el envejecimiento es el factor de riesgo más importante junto con sus cambios metabólicos como son la hipercolesterolemia y la diabetes.

### 3.3.1 LA EDAD

En la actualidad la edad es el principal marcador de riesgo de la EA, de tal forma que la prevalencia de la enfermedad se duplica cada 5 años a partir de los 60 años de edad; pasa del 1% entre los 60 y los 65 años al 4.3 % a los 75 años, hasta llegar al 28.5% a los 90 años (Barranco-Quintana, 2005).

### 3.3.2 HIPERCOLESTEROLEMIA

En la EA también se plantea que existe una relación entre deposición amiloide y colesterolemia. Mediante la utilización de un modelo de ratón transgénico de amiloidosis, se demostró que la hipercolesterolemia inducida por la dieta daba como resultado una dramática aceleración de los cambios bioquímicos y neuropatológicos en el ratón transgénico y se detectó un incremento en la concentración y deposición del péptido A $\beta$  en el SNC ( Refolo et al, 2000). Otros investigadores también fundamentaron la conexión entre el colesterol elevado y la patología amiloide *in vivo*. En un estudio donde se emplearon ratones transgénicos con el gen del APP, que expresa la mutación de EA familiar Suiza, el incremento del colesterol dietético condujo a reducciones en los niveles cerebrales de fragmentos de APP solubles (sAPP) y A $\beta$  en cerebro que correlacionaron negativamente con los niveles de colesterol en suero (Howland,1998). Esta reducción en los sAPP conllevó al procesamiento amilogénico del APP y finalmente una producción incrementada de A $\beta$ . Estos resultados demuestran que el procesamiento de APP y el nivel de péptidos A $\beta$  pueden ser modulados *in vivo* por la hipercolesterolemia y sustenta las evidencias de que el colesterol juega un papel en la formación del amiloide (Pappolla, 2002). Dos estudios epidemiológicos sugieren que altos niveles de colesterol en la década de los cuarenta puede ser un factor de riesgo para la EA aunque otros estudios no han reproducido estos resultados (Notkola et al., 1998; Kivipelto et al., 2001). En otros estudios se ha observado que la administración de estatinas reduce el riesgo de padecer EA (Sjögren et al., 2006).

### 3.3.3 DIABETES

Aunque no todos los diabéticos tipo 2 llegan a desarrollar la EA y no todos los pacientes con Alzheimer son diabéticos, estudios en poblaciones extensas han demostrado que, comparados con los individuos sanos de la misma edad y sexo, los que padecen diabetes tipo 2 tienen el doble de probabilidades de desarrollar la EA. La razón de esta asociación no es conocida, aunque las sospechas iniciales se han centrado en los problemas cardiovasculares provocados por la diabetes, los cuales podrían contribuir a la demencia de la EA a través de bloqueos de la circulación cerebral (Luchsinger, 2008). Por otro lado, las personas con diabetes tipo 2 presentan una característica resistencia a la acción de la insulina. Como compensación, el páncreas libera más insulina, y la consecuencia de este mayor nivel de insulina en sangre sería una inflamación que podría contribuir a la lesión cerebral de la EA, incluso a través de su intervención en la formación de las placas de amiloide (Craft, 2007). La insulina puede regular directamente la plasticidad sináptica implicada en el aprendizaje y la memoria. La desregulación de las vías de señalización de la insulina en el cerebro se ha relacionado con la EA. Además la insulina participa en la regulación del metabolismo del péptido amiloide y de tau promoviendo la formación de placas y ovillos (Biessels et al., 2005).

En otro estudio reciente en el que se han incluido 1.173 individuos de 75 años o más, se ha encontrado que incluso en las personas con diabetes incipiente poco manifiesta, la probabilidad de desarrollar EA se eleva en un 70%, y esta probabilidad se eleva aún más si el individuo padece hipertensión arterial (Xu et al., 2007).

### 3.3.4 INFLAMACIÓN

En los cerebros de los enfermos de la EA se ha encontrado una reacción inflamatoria crónica local en la que no interviene la reacción antígeno-anticuerpo. En esta inflamación local intervienen más de 40 sustancias inflamatorias producidas por las neuronas, los astrocitos y las células microgliales locales, y se activa el sistema del complemento. Las siguientes sustancias relacionadas con la inflamación cerebral aparecen en los depósitos de amiloide de la EA: 1) proteínas del sistema del complemento de C1 a C9, 2) inhibidores del complemento, 3) reactantes de fase aguda: proteína reactiva C, componente P de amiloide,  $\alpha_1$ -antiquimiotripsina,  $\alpha_1$ -antitripsina,  $\alpha_2$ -macroglobulina, pentraxina neuronal, 4) citocinas y factores de crecimiento: interleucina 1, interleucina 6, proteína quimioatrayente de monocitos 1, molécula asociada al crecimiento ligadora de heparina, TGF- $\beta_1$ , cistatinas, factor de crecimiento básico de fibroblastos, 5) sistemas de la trombina y la plasmina, 6) sustratos para receptores de lipoproteínas: lipoproteinlipasa, apoE, receptor de lipoproteína de baja densidad, lactoferrina, 7) otros: proteínas de choque de calor, proteoglicanos, comogranina, molécula de adhesión celular 1, kaliceína y catepsinas (Toledo, 2006). Es probable que esta reacción inflamatoria se ponga en marcha como respuesta a alguna agresión, como la alteración en el equilibrio entre la producción y la degradación de A $\beta$  y el depósito de sustancias que la microglía trata de digerir, activándose y activando a su vez el sistema de complemento (Blasko et al., 2004). Recientes experimentos demuestran que los mediadores inflamatorios promueven el proceso de APP aumentando la regulación de beta secretasa 1 (Heneka & O'Banion, 2007). La manifestación estructural más obvia de la inflamación en los tejidos afectados por la EA es la activación de abundantes células de la microglía. Las células de microglía rodean los depósitos de amiloide de la placa senil y esta interacción estimula su activación, tras la cual la microglía fagocita y degrada los depósitos de A $\beta$ . Los astrocitos también se activan y secretan mediadores proinflamatorios como la proteína S100 $\beta$  incrementando la inflamación local (Rogers, 2008). La importancia de la inflamación en la patogénesis de la EA está indirectamente confirmada por investigaciones epidemiológicas que muestran una disminución de la incidencia de la EA en personas usando antiinflamatorios, especialmente los antiinflamatorios no esteroideos (Zilka et al., 2006).

### 3.3.5 ESTRÉS OXIDATIVO

Unas de las características comunes en las enfermedades neurodegenerativas son la relación entre el estrés oxidativo y la apoptosis neuronal. En la fisiopatología de la EA se conoce que el estrés

oxidativo desempeña un rol importante. Los radicales libres en exceso peroxidan la membrana lipídica, oxidan proteínas y como consecuencia dañan la membrana plasmática y las proteínas del citoesqueleto, además de afectar el RNA y DNA nuclear. En el cerebro, el intenso proceso metabólico, las bajas concentraciones de glutatión y catalasa, y el aumento de la proporción de ácidos grasos poli-insaturados condicionan que el tejido cerebral sea muy susceptible al daño oxidativo (Gibson & Huang, 2005; Smith, 1996)

La mayoría de los estudios han demostrado un aumento de los marcadores de peroxidación lipídica en los cerebros de los pacientes con EA, incluidas las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), MDA (Marcus et al., 1998; DiClerio, 2000), HNE (Markesbery & Lovel, 1998) y algunos isoprostanos (Pratico, 1998), especialmente en el córtex temporal y el hipocampo. La fluidez de la membrana mitocondrial está disminuida en el córtex cerebral de los pacientes con EA, dato que parece deberse a un aumento de los procesos de peroxidación lipídica (Mecocci et al., 1997). Además se ha observado que la peroxidación lipídica precede a la formación de placas amiloides (Pratico, 2001). Hay un aumento de proteínas oxidadas en la corteza frontal de pacientes con EA (Carney et al., 1994), en la corteza parietal inferior y en el hipocampo (Hensley et al., 1995) coincidiendo con zonas ricas en placas seniles. Mecocci et al. (1994) describieron un aumento de la concentración del indicador del daño del ADN 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OHdG) en el lóbulo parietal de los pacientes con EA. En algunos estudios también se ha visto un aumento de la oxidación de algunas bases del ADN en la corteza parietal, temporal, occipital y frontal y en el hipocampo (Gabbitta et al., 1998), que incluso puede estar presente en los estadios iniciales de la EA (Nunomura et al., 2001) y que parece ser mayor en los ovillos neurofibrilares, las neuritas distróficas y los astrocitos reactivos (Iida et al., 2002).

Hay una acumulación de hierro y de aluminio en las placas seniles (Jellinger et al., 1990) y en los ovillos neurofibrilares (Good et al., 1992), que podría contribuir al estrés oxidativo (Pappolla et al., 1992). La homeostasis del zinc (Zn) y cobre (Cu) está desregulada en la EA y esto afecta al metabolismo de la APP dando lugar a procesos neurotóxicos. En 1990 Ashley Bush descubrió que el Zn (II) y Cu (II) inducían agregación de A $\beta$ , y que en su ausencia las placas seniles en muestras de tejidos celulares se disolvían. Fue establecido que la combinación de A $\beta$  con iones metálicos genera peróxido de hidrógeno y origina radicales hidróxilos que ocasionan daño oxidativo en el cerebro (Multhaup et al., 2002).

En los ovillos neurofibrilares de pacientes con EA se ha detectado nitrotirosina, pero no en los cerebros de los controles sin dichas estructuras, lo que implica al NO y a la formación del radical libre peroxinitrito en la patogenia de la EA asociada al estrés oxidativo (Smith et al., 1997). La nitrotirosina se ha detectado en las neuronas, los astrocitos y los vasos sanguíneos de los pacientes con EA y no en los controles, y se colocaliza con la expresión anormal de NOS neuronal en las células corticales piramidales (Luth et al., 2002).

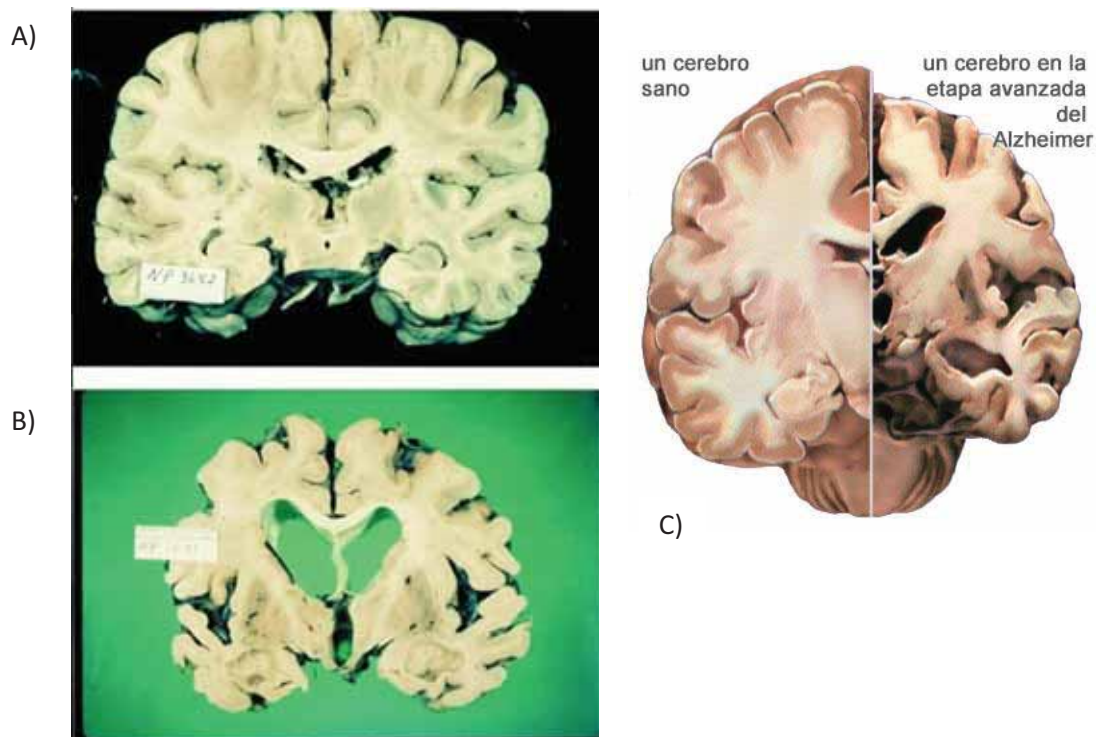
Los fragmentos 1-42 y 1-40 de A $\beta$  humana son capaces de generar por sí mismos una producción de peróxido de hidrógeno por un mecanismo que involucra la reducción de Fe<sup>3+</sup> o Cu<sup>2+</sup> mediante la reacción de Fenton (Huang et al., 1999). El fragmento 25-35 de proteína amiloide es capaz también de inducir un daño oxidativo al ADN mitocondrial (Bozner et al., 1997), así como inducir la muerte neuronal apoptótica, que es mediada por el peróxido de hidrógeno, HNE y caspasa-3 y que puede ser prevenida por vitamina E y N-acetilcisteína (Velez-Pardo et al., 2002). Otros estudios han demostrado, después de la exposición de células a proteína A $\beta$ , un deterioro en la homeostasis del calcio, al cual le sigue la oxidación de las bombas de calcio de membranas. El incremento del calcio intracelular conduce a la activación de la NOS neuronal y, consecuentemente, aumenta la concentración del NO intracelular, este reacciona con el anión radical superóxido, proveniente de la cascada del ácido araquidónico, de la mitocondria o de la conversión de xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa, dando lugar al peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). Este último puede dar lugar a formas transicionales activas con potenciales reactivos comparables al radical hidroxilo. La demostración de la peroxinitración extensiva de proteínas en el cerebro afectado por la EA sugiere el papel patológico del ONOO<sup>-</sup> en esta enfermedad. (Canzoniero & Sneider, 2005; Scorziello, 2004). En modelos de ratones transgénicos de EA con aumento de la expresión de la APP y en otros modelos experimentales se ha observado aumento del daño oxidativo (Smith et al., 1998), de la peroxidación lipídica que precede a la formación de la placa amiloide (Drake, 2003), de la producción de nitrotirosina (Matsuoka et al., 2001) y de la expresión de Cu/Zn-SOD y de hemoxigenasa-1 en los alrededores de los depósitos de amiloide (Pappolla et al. 1998). También se ha descrito aumento del estrés oxidativo en los ratones transgénicos con mutaciones de presenilina-1 (LaFontaine, 2002).

La mitocondria constituye uno de los compartimentos celulares más susceptible a sufrir daño oxidativo. En particular, el ADNmt, por su proximidad a la cadena de transporte de electrones, la carencia de histonas protectoras y de mecanismos eficientes de reparación es un blanco potencial para el impacto de las especies reactivas derivadas del oxígeno y el nitrógeno. En este sentido, se han observado altos niveles de mutaciones en el ADNmt del lóbulo temporal de pacientes con EA, que a su vez mostró niveles elevados de daño oxidativo (Mecocci et al., 1994). La toxicidad del A $\beta$  involucra directamente a la mitocondria (Yan & Stern, 2005) y su agregación incrementa los niveles intracelulares de Ca<sup>2+</sup> y de NO en astrocitos (Canevari et al. 2004; Sultana et al., 2006)

### 3.4 NEUROPATHOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

#### 3.4.1 ASPECTOS MACROSCÓPICOS

La atrofia cerebral aparece prácticamente siempre en las fases clínicas de la enfermedad de Alzheimer y afecta preferentemente al lóbulo temporal, incluyendo las regiones entorrinal y subicular, así como el hipocampo, y la amígdala. Los lóbulos parietales y frontales están menos alterados. La atrofia afecta a la corteza cerebral, que parece más delgada y con circunvoluciones atróficas, y a la sustancia blanca; se caracteriza, además, por una dilatación de los ventrículos, más marcada en las astas temporales. La atrofia es generalmente simétrica, pero también puede haber atrofia lobular frontal, temporal u occipital asimétrica. La atrofia cerebral suele ser más grave en las formas familiares de inicio precoz que en las formas esporádicas de inicio tardío. El grado de atrofia cerebral se relaciona con el progreso de la enfermedad (Ferrer-Abizanda, 2006) (Figura 22).



**Figura 22: A) Cerebro sano B) cerebro con la Enfermedad de Alzheimer C) Imagen comparando los hemisferios cerebrales de un hombre sano y un paciente con la enfermedad de Alzheimer. Bird, 2008.**

#### 3.4.2 ASPECTOS MICROSCÓPICOS

A nivel microscópico, la patología incluye la aparición de ovillos neurofibrilares, placas seniles o neuríticas, depósitos de amiloide en vasos sanguíneos y meníngeos, degeneración gránulo-vacuolar en neuronas piramidales del hipocampo, gliosis reactiva, aumento de las células de la microglía y acúmulos de lipofucsina. Además de todas estas marcas histopatológicas se ha descrito la presencia de los llamados cuerpos de Hirano (Hirano, 1994). Los cuerpos de Hirano son

inclusiones citoplasmáticas descritas en una variedad de enfermedades neurodegenerativas que producen lesiones persistentes, caracterizadas por la presencia de filamentos de actina y otras proteínas asociadas, entre las que se encuentra la proteína tau (Maciver & Harrington, 1995). Los hechos distintivos de la EA, aunque no exclusivos, son los relacionados con los depósitos del péptido A $\beta$  y con los depósitos intracelulares de proteína tau fosforilada. Los depósitos de A $\beta$  aparecen como parenquimatosos difusos o focales: placas seniles (principalmente placas difusas, placas primitivas y placas neuríticas), depósitos difusos subpiales y perivasculares; y angiopatía amiloidea en los vasos cerebrales y de las meninges (Figura 23). La patología tau se manifiesta en neuritas distróficas alrededor de los depósitos de A $\beta$  en las placas neuríticas, en neuronas con degeneración neurofibrilar (ovillos neurofibrilares o *tangles*), en neuronas aisladas con depósito de tau pero sin formación de fibrillas (*pre-tangles*), y en prolongaciones neuronales denominados hilillos del neuropilo (Duyckaerts & Dickson, 2003) (Figura 23). Además, la pérdida neuronal es un fenómeno progresivo en la evolución de la EA, y con toda probabilidad directamente responsable del deterioro cognitivo (Holf et al., 1999). Estudios cuantitativos han confirmado que la pérdida neuronal está muy marcada en la corteza entorrinal, en la corteza temporal, en el córtex parietal, especialmente en las capas II y III, y en la región CA1 del hipocampo. Otras regiones que presentan pérdida neuronal son la amígdala, el núcleo basal de Meynert, el locus ceruleus y los núcleos del rafe. Las alteraciones sinápticas son importantes en la EA. Por una parte, hay una pérdida de dendritas en las neuronas piramidales de la corteza cerebral y del hipocampo. Por otra, se ha observado una importante reducción en la expresión de proteínas asociadas a la vesícula sináptica y, en menor medida, a la membrana presináptica (Masliah & Salmon, 1999).

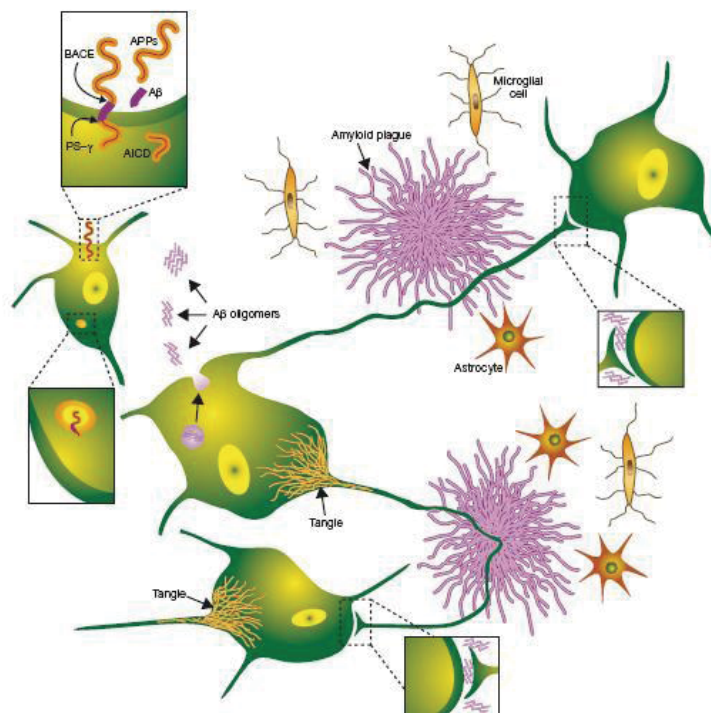


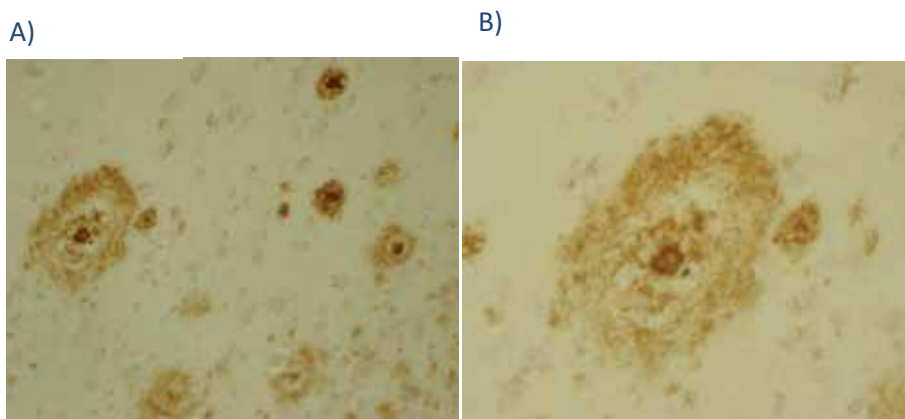
Figura 23. Modelo de patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Selkoe, 2004.

**FORMACIÓN DE PLACAS SENILES Y OVILLOS NEUROFIBRILARES**

En la figura 23 vemos el proceso de formación de placas seniles; este proceso comienza cuando las moléculas de APP en la membrana plasmática o de las vesículas intracelulares son procesadas por la  $\beta$ -secretasa (BACE) y el complejo presinilina- $\gamma$ -secretasa (PS- $\gamma$ ) para liberar la región A $\beta$ . Una parte de los péptidos A $\beta$  pueden oligomerizarse, inicialmente intravesicularmente y puede ser liberado al líquido intersticial donde puede interferir con la sinapsis nerviosa. Los oligómeros de A $\beta$  pueden polimerizarse en fibrillas de betamieloide y agregarse formando placas seniles provocando la disfunción de los axones y dendritas adyacentes. Además hay formación de ovillos neurofibrilares (*tangles*) a través de la activación de kinasas en el citoplasma neuronal provocando la hiperfosforilación de la proteína tau asociada a microtúbulos que se desorganizan al desprenderse de la proteína tau. La proteína tau fosforilada polimeriza en filamentos insolubles, se agrega y forma los ovillos neurofibrilares. Las placas seniles provocan la activación de la microglía y los astrocitos generando un proceso inflamatorio local que contribuye a la neurotoxicidad.

**3.4.2.1 Los depósitos de beta-amiloide**

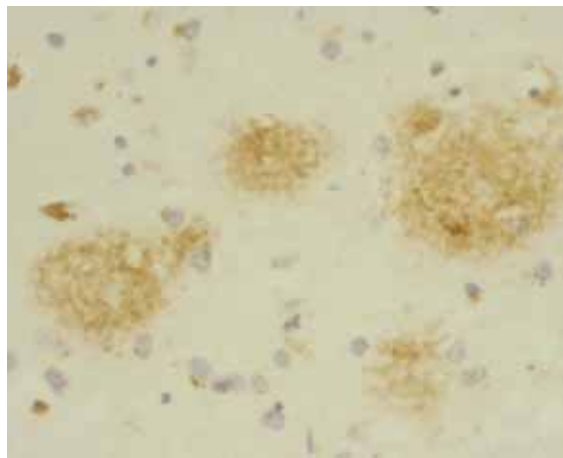
Las placas neuríticas: Tienen una zona central densa de amiloide compuesta principalmente de A $\beta$ 40 rodeada por una zona más difusa compuesta principalmente de A $\beta$ 42, su tamaño varía de 10 a 120  $\mu$ m y también varía su grado de compactación. Se encuentran asociadas a axones y dendritas dañadas. Estas neuritas se encuentran dilatadas, presentan formas tortuosas y anomalías ultraestructurales como lisosomas anormalmente alargados y muchas mitocondrias y filamentos fosforilados compuestos principalmente por proteína tau fosforilada. Estas placas se encuentran estrechamente asociadas a microglía activada y astrocitos reactivos (Selkoe, 2001) (Figura 24).



**Figura 24:** Placas neuríticas de un enfermo de la enfermedad de Alzheimer teñidas con el anticuerpo anti-A $\beta$  clon 4G8. A) Objetivo de 20X; B) Objetivo de 40X. S. García Matas.



Las placas difusas: son depósitos difusos parenquimatosos de A $\beta$ 42 y tienen un tamaño variable de pocas micras a un centenar de micras de diámetro, y muestran contornos irregulares. Estas placas no contienen neuritas distróficas, aunque sí pueden estar atravesadas por procesos neuríticos. Se desconoce si las placas difusas son precursoras o no de las placas neuríticas. Se ha observado un aumento de inmunoreactividad para las distintas proteínas relacionadas con las sinapsis en las placas difusas, incluyendo sinaptofisina, SNAP-25, así como proteína priónica celular (PrP<sup>c</sup>), factores de transcripción (Myc, NFk-B) y canales iónicos. Todo ello nos hace pensar que las placas difusas no son inocuas, ya que se acompañan de cambios que pueden afectar a la función sináptica. Se desconoce si estas modificaciones son coincidentes, primarias o secundarias al depósito de A $\beta$ 42 (Ferrer-Abizanda, 2006) (Figura 25).

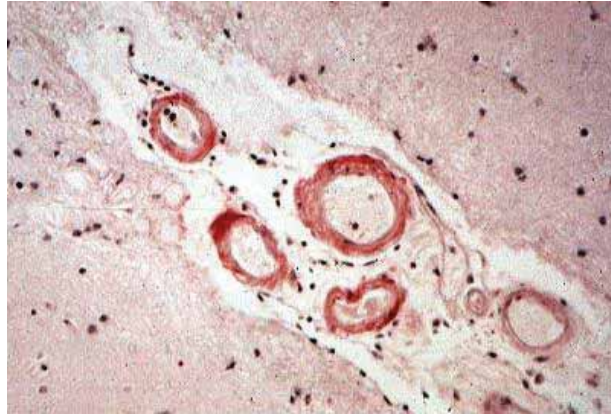


**Figura 25: Placas difusas de un enfermo de Alzheimer teñidas con el anticuerpo anti-A $\beta$  clon 4G8. Objetivo de 40X. S García Matas.**

Los depósitos difusos subpiales: se encuentran frecuentemente en el presubiculum y en la corteza entorrinal, pero también en otras regiones. Se componen principalmente de formas mutadas aminoterminal de péptido A $\beta$  y contienen A $\beta$ 42 (Ferrer-Abizanda, 2006).

Las placas algodonosas: son globulosas, difusas y con pocas neuritas distróficas. Son inmunoreactivas a A $\beta$ 42 y aparecen acompañando a las placas difusas y a la angiopatía amiloidea grave, pero son particularmente llamativas en la EA familiar de inicio precoz asociadas a mutaciones de PS1 en el exón 9 (Ferrer-Abizanda, 2006).

La angiopatía amiloidea: afecta a los vasos de las meninges y a los de la corteza cerebral, y es extraño que aparezca en la sustancia blanca. El péptido A $\beta$  es frecuentemente fibrilar y sobretodo inmunoreactivo para A $\beta$ 42. Su acumulación altera la función de la barrera hematoencefálica sobretodo en la corteza occipital. Por otra parte los vasos son más vulnerables y pueden presentar hemorragias cerebrales (Figura 26). (Ferrer-Abizanda, 2006).



**Figura 26: Angiopatía amiloide que afecta a los vasos meníngeos y parenquimales.**  
<http://www.iqb.es/neurologia/enfermedades/alzheimer>

### 3.4.2.2 Procesamiento APP

El A $\beta$  es un péptido de 39- 42 aminoácidos derivado del APP por la acción de dos aspartil proteasas la  $\beta$ -secretasa y la  $\gamma$ -secretasa y es el mayor constituyente de las placas amiloides en los pacientes de EA (Citron, 2004).

La APP es una glicoproteína de membrana de tipo I ubicua y el gen que la codifica está localizado en el cromosoma 21. Su función no está bien conocida aunque parece estar implicada en la regulación de la formación de la sinapsis y en la plasticidad sináptica. Esta proteína sufre modificaciones postraduccionales como las glicosilaciones, fosforilaciones, la sulfatación de sus tirosinas y procesamientos proteolíticos que dan lugar a diferentes fragmentos proteicos (Selkoe, 2004).

El APP puede ser procesado mayoritariamente a través de dos vías, la vía de la  $\alpha$ -secretasa que no es amilogénica y la vía amilogénica de la  $\beta$ -secretasa. Cuando el APP es proteolizado por la  $\alpha$ -secretasa da lugar a la  $\alpha$ APPs, que se libera al espacio extracelular, y el fragmento C-terminal de 83 residuos (C83) que queda unido a la membrana. Estudios in vitro sugieren que sAPP $\alpha$  podría tener un papel neuroprotector, trófico, inhibidor de proteasas o como molécula de adhesión celular. El fragmento C83 es proteolizado por  $\gamma$ -secretasa y da lugar al fragmento hidrofóbico p3 cuya función en la EA no es conocido (Mudher & Lovestone, 2002; Selkoe, 2004).

En la vía de la  $\beta$ -secretasa, proteína también llamada BACE ( $\beta$ -amyloid cleaving enzyme), el APP se proteoliza en  $\beta$ APPs que es liberada y un fragmento C-terminal de 99 residuos (C99) que se retiene en la membrana. El fragmento C99 es proteolizado por la  $\gamma$ -secretasa produciéndose los péptidos A $\beta$ <sub>40</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub> (Citron, 2004; Selkoe, 2004) (Figura 27).

La formación de  $A\beta$  es un proceso normal en los mamíferos pero en un pequeño número de individuos, la sobreexpresión y/o la alteración en su degradación, especialmente de la forma con 42 aminoácidos ( $A\beta_{42}$ ), parece ser suficiente para causar la EA (Walsh & Selkoe, 2007).

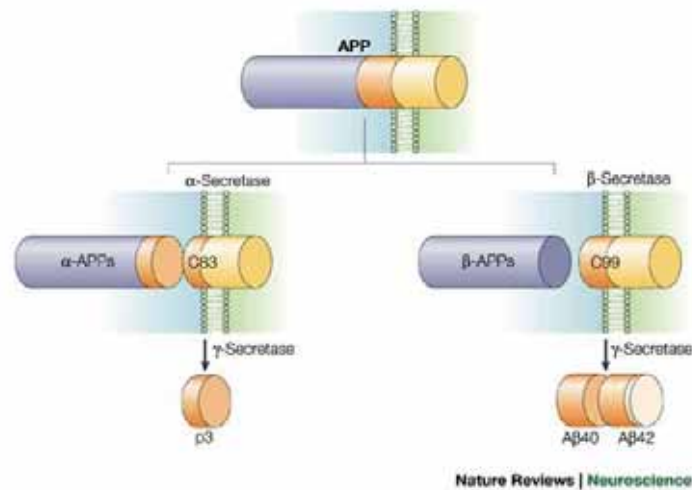
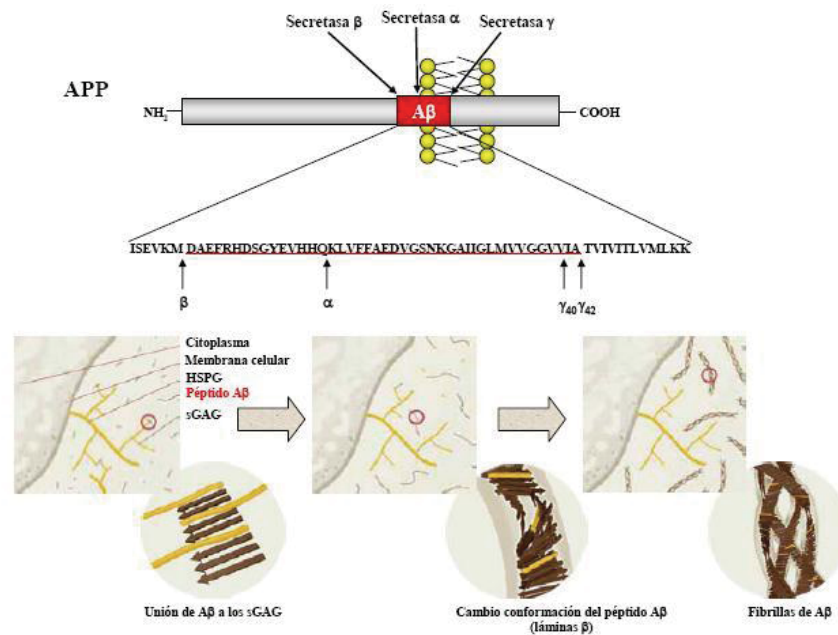


Figura 27. Procesamiento del APP. Citron, 2004.

### 3.4.2.3 $A\beta$ fibrilar

El péptido  $A\beta$  tiene un peso molecular de 4 kDa. El péptido constituido por 42 aminoácidos ( $A\beta_{42}$ ), es la forma más hidrofóbica y, particularmente, más propenso a agregarse y por eso se cree que es el más tóxico (Selkoe, 2001). Se ha descrito como los proteoglicanos heparán sulfato (HSPGs; moléculas ancladas a la matriz extracelular) favorecen la agregación del péptido  $A\beta$ . El péptido  $A\beta$  tiene un dominio de unión a heparina (Clarris et al., 1997), mediante el cual es capaz de unirse a los glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs), que forman parte de los HSPGs. Los GAGs promueven un cambio estructural que favorece la formación de láminas beta, siendo responsable de la formación de las fibrillas de  $\beta$ -amiloide. Estas fibrillas se depositan alrededor de las células formando las placas (Figura 28).

El péptido  $A\beta$  al agregarse es capaz de inducir apoptosis en modelos in vitro e in vivo (Forloni, 1993; Selkoe, 2001). Además, el péptido  $A\beta$  puede estimular la liberación de citoquinas y quimioquinas por parte de células asociadas a las placas seniles (microglía y astrocitos) y producir ROS que pueden producir neurodegeneración y muerte neuronal.



**Figura 28: Procesamiento de APP y formación de fibrillas del péptido beta-amiloide. Adaptado de Iqbal et al., 1997.**

#### 3.4.2.4 A $\beta$ soluble

Algunos estudios sugieren que hay una asociación entre el A $\beta$  soluble y la demencia en la EA (Kuo et al., 1996; Lue et al., 1999., McLean et al., 1999).

Al principio se pensó que únicamente el A $\beta$  agregado fibrilar era tóxico pero más tarde se vio que existían agregados no fibrilares solubles, que fueron llamados protofibrillas (Walsh et al., 1997). Al añadir protofibrillas de A $\beta$  a cultivos de neuronas corticales de ratón se produce una disminución de la viabilidad neuronal (Hartley et al., 1999). Los oligómeros de A $\beta$  son potentes neurotoxinas que alteran la funcionalidad de los receptores de glutamato tipo NMDA, inhiben la inducción de la potenciación a largo plazo (LTP) y reducen la densidad de las espinas dendríticas (Selkoe, 2008). Se ha demostrado que una de las vías moleculares implicadas en la neurotoxicidad de los oligómeros solubles de A $\beta$  es la sobreexpresión de la pentraxina neuronal 1 (NP1) (Abad et al., 2006). Otros mecanismos implicados incluyen receptores de membrana como los receptores nicotínicos, integrinas, TNF-R1, RAGE, FPRL y p75NTR y sus mediadores intracelulares como GSK3, PKC, PI3K, Akt, FAK, la familia MAPK, la familia Src y cdk5 (Balleza-Tapia y Peña, 2009).

### 3.4.2.5 Ovillos neurofibrilares y filamentos apareados helicoidales de proteína tau

Los ovillos neurofibrilares están formados por haces de filamentos no unidos a membranas y ocupan una gran parte del citoplasma perinuclear (Figura 30). Estos filamentos permanecen tras la muerte neuronal, en el espacio extracelular dando lugar a los ovillos neurofibrilares extracelulares (Fukutani et al., 1995). Se encuentran, fundamentalmente, en la corteza entorrinal (lámina II y IV), corteza asociativa, hipocampo CA1, subículo y amígdala (Arriagada et al., 1992). Los filamentos están compuestos principalmente de proteína tau fosforilada y pueden ordenarse en haces (Figura 29 A). La gran mayoría consisten en dos filamentos apareados en forma helicoidal uno sobre el otro (PHFs de *paired heliocidal filaments*), con una longitud entre los entrecruzamientos, o periodicidad, de entre 65-80 nm y un grosor de entre 10-30 nm (Figura 29B y 29C) pero también pueden formarse filamentos rectos de menor grosor de unos 15nm y sin estructura helicoidal (SF) (Figura 29D) (Wischik et al., 1997)

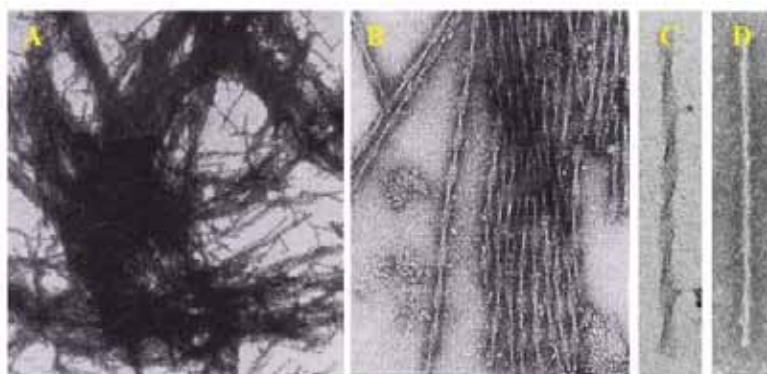


Figura 29. Ovillos neurofibrilares, PHFs, SF visualizados con microscopia electrónica. Wischik et al., 1997.

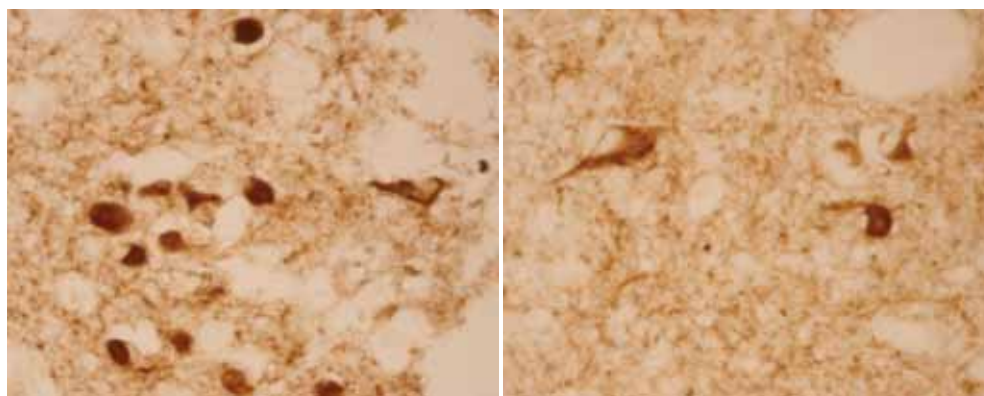


Figura 30. Ovillos neurofibrilares en el córtex de un enfermo de Alzheimer. Tinción con anticuerpo anti-tau. Objetivo de 40X. Jessica López Regal.

### 3.4.2.6 La proteína tau

La proteína tau se encuentra en el sistema nervioso central adulto en cinco isoformas derivadas de la codificación alternativa del gen tau localizado en el cromosoma 17q21-22. Se aisló por primera vez como una proteína asociada a microtúbulos (MAP) que facilitaba la polimerización de la

tubulina, al igual que otras MAPs (Drubin & Kirschner, 1986; Kanai et al., 1992). Esta proteína tiene dos dominios: el dominio de proyección y el dominio de unión a microtúbulos. El dominio de proyección se llama así por proyectarse desde la superficie de los microtúbulos, para así interactuar con otros elementos del citoesqueleto y de la membrana celular; incluye una región rica en aminoácidos ácidos y otra rica en prolinas. Se cree que mediante este dominio la proteína tau es capaz de interactuar con otras proteínas como la fosfolipasa C y distintas quinasas. El dominio de unión a microtúbulos regula el ritmo de polimerización de los microtúbulos y los estabiliza. A ambos lados de este dominio, se encuentran dos regiones ricas en prolinas que presentan residuos de serina y treonina que al fosforilarse afectan a la capacidad de unión de tau a los microtúbulos. Este dominio está también implicado en la unión con otras proteínas como la proteína fosfatasa 2A o la presenilina 1 (Figura 31). Se cree que el extremo amino pueda ser crucial en la estabilización y organización de ciertos tipos de axones (Buee et al., 2000) y puede estar implicado en la generación de conformaciones patológicas que favorecen la polimerización de tau (Gamblin et al., 2003). Por el contrario, el extremo carboxilo terminal de la proteína tau inhibe el proceso de polimerización o agregación, inhibición que se puede revertir parcialmente por fosforilación y completamente por truncación (Abraha et al., 2000).

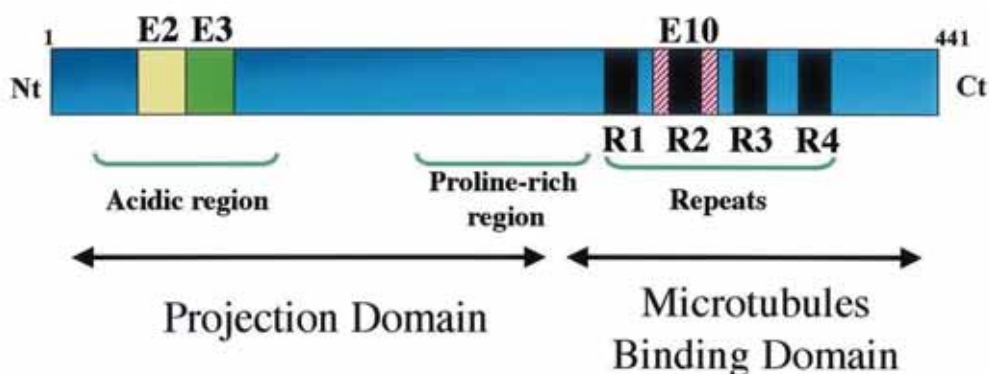


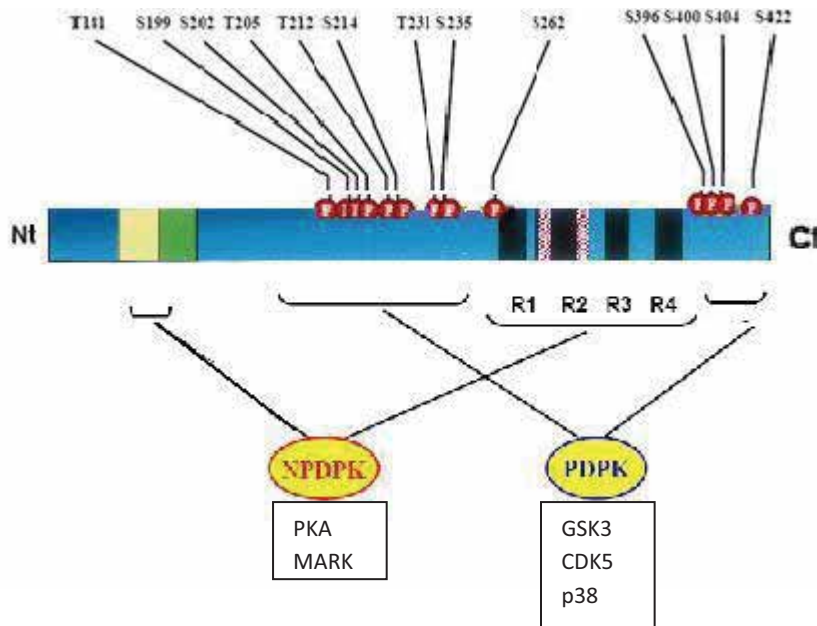
Figura 31. Proteína tau y sus dominios. Buee et al., 2000.

La proteína tau se expresa predominantemente en células nerviosas, en las que promueve la polimerización y estabilización de los microtúbulos (Drubin & Kirschner, 1986). Tau es una proteína citosólica que se encuentra principalmente en los axones de las neuronas, aunque puede aparecer asociada a la membrana celular (Arrasate et al., 2000; Brandt et al., 1995; Maas et al., 2000). La proteína tau es importante en neurogénesis, mantenimiento y transporte axonal.

### 3.4.2.7 Fosforilación de tau

La proteína tau puede ser fosforilada en serinas, treoninas y tirosinas (Baudier et al., 1987; Gómez-Ramos et al., 2004). La isoforma de tau de mayor tamaño presente en el SNC contiene 441 aminoácidos, de los cuales 19 sitios son susceptibles de fosforilación en serina y treonina. Estos sitios se han dividido en dos grupos principalmente. En un primer grupo se incluyen los sitios que son modificados por quinasas dirigidas por prolina (PDPK), como son la glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3), la quinasa dependiente de ciclina 5 (CDK5) (Pelech, 1995), proteínas quinasa activadas por mitógeno (MAPK), las quinasas activadas por estrés (SAPK) (Buee-Scherrer & Goedert, 2002) y las quinasas reguladas extracelularmente (Erk) (Maccioni et al., 2001) como la quinasa c-Jun amino terminal (Atzori et al., 2001) y la cdc2 (Ledesma et al., 1992). En un segundo grupo están aquellos residuos modificados por quinasas no dirigidas por prolina (NPDPK), como la proteína quinasa A dependiente de AMPcíclico (PKA) (Sironi et al., 1998; Steiner et al., 1990), la proteína quinasa C (PKC) (Correas et al., 1992), la calcio-calmodulina quinasa II (CaMKII) (Sironi et al., 1998), la quinasa reguladora de afinidad entre MAPs/ microtúbulos (MARK) (Drewes et al., 1997) y la caseína quinasa II (Correas et al., 1992).

Como regla general, PDPK a tau en las regiones ricas en prolinas adyacentes a la región de las repeticiones, y las no dirigidas por prolinas lo hacen en la región de unión a tubulina, salvo la caseína quinasa II que modifica aminoácidos cercanos a los aminoácidos ácidos codificados por los exones 2 y 3 en el extremo amino terminal (Figura 32) (Greenwood et al., 1994). En muchos casos, la fosforilación regula la unión de tau a los microtúbulos o a membranas (Brandt et al., 1995). Por tanto, la fosforilación parece ser la forma predominante, mediante la cual, se regula la función de tau. Además, la fosforilación de tau puede afectar al transporte axonal, ya que tau puede unirse tanto a los microtúbulos, impidiendo la unión de moléculas motoras, como a la quinesina (Vershinin et al., 2007). También, recientemente se ha relacionado la neurotoxicidad inducida por tau en distintas tauopatías con su asociación a actina, ya que tau fosforilado es capaz de promover cambios en el citoesqueleto de actina (Fulga et al., 2007).



**Figura 32. Representación de los principales sitios de hiperfosforilación de la isoforma de mayor tamaño de la proteína tau. Adaptado de Buee et al., 2000 y Gómez-Ramos et al., 2004.**

Las quinasas como la GSK-3 y la CDK5 parecen estar implicadas directamente en la fosforilación anómala de tau en la EA (Figura 33) (Pelech, 1995). La GSK-3 $\beta$  se activa e inactiva cuando se fosforila en tirosina 216 y en serina 9, respectivamente. In vivo, la GSK-3 $\beta$  activada fosforila la proteína tau en sitios comunes a los PHFs (Lovestone et al., 1996) y además colocaliza con tau fosforilada en cerebros de pacientes con la EA (Shiurba et al., 1996). En un modelo murino se encontró que la fosforilación de tau por GSK-3 facilita su agregación en polímeros filamentosos (Engel et al., 2006b). La GSK-3 $\beta$  interacciona con la PS1 que a su vez interacciona con  $\beta$  y  $\delta$  cateninas implicadas en la adhesión celular (Noll et al., 2000). El péptido A $\beta$  se encuentra también involucrado en un aumento de la fosforilación de tau por GSK-3, incrementando la actividad enzimática de la quinasa (Alvarez et al., 1999). El péptido A $\beta$  parece ser sólo tóxico cuando la proteína tau está presente en las neuronas ya que estudios in vitro muestran que neuronas hipocámpales de ratones knock out de tau no presentan neurodegeneración en presencia de A $\beta$  (Rapoport et al., 2002). El efecto activador sobre GSK-3 puede ser debido a que el péptido A $\beta$  se comporta como un antagonista del receptor de insulina, lo cual impide que la GSK-3 se inhiba (Xie et al., 2002). También se ha visto que agregados esféricos del péptido A $\beta$  son altamente neurotóxicos y activan GSK-3, que después fosforila a tau (Hoshi et al., 2003). La sola adición del péptido A $\beta$  se ha visto que es suficiente para la formación de filamentos de tau, similares a los PHFs en cultivos de neuroblastoma humano (Ferrari et al., 2003).

La CDK5 también parece estar implicada en la patogénesis de la EA. La CDK5 se activa tras la proteólisis mediante calpaína de su proteína reguladora p35 dando lugar a p25 (Figura 33). La proteína calpaína puede activarse en procesos de estrés oxidativo o de aumento de la concentración de calcio intracelular y por tanto promueve el aumento de actividad de CDK5; los niveles de calpaína están aumentados en la EA (Lee et al., 2000). Se ha visto que la fosforilación de tau por



quinasas como CDK5, estimula la posterior fosforilación por GSK-3 (Ishiguro, 1997; Cho & Johnson, 2003).

La sobreexpresión de p25 en un ratón transgénico resulta en pérdida neuronal y acumulación de tau hiperfosforilado, sugiriendo que la desregulación de CDK5 por p25, podría estar implicada en el desarrollo de patologías neurofibrilares (Cruz et al., 2003).

Se han implicado también a las p38 MAP quinasas en las tauopatías. Así, se ha visto un incremento en las tinciones inmunológicas para p38 activa (fosforilada) en cerebros de pacientes de AD (Hensley et al., 1999; Sun et al., 2003). Tau puede ser fosforilado por p38 *in vitro* (Reynolds et al., 1997) y, al igual que la GSK-3, se activa con A $\beta$  microagregado (Giovannini et al., 2002). La quinasa p38 se activa en situaciones de estrés celular, como estrés osmótico (Jenkins et al., 2000) o estrés oxidativo (Zhu et al., 2000), este último está relacionado con estadios tempranos de la enfermedad de Alzheimer (Smith et al., 1996).

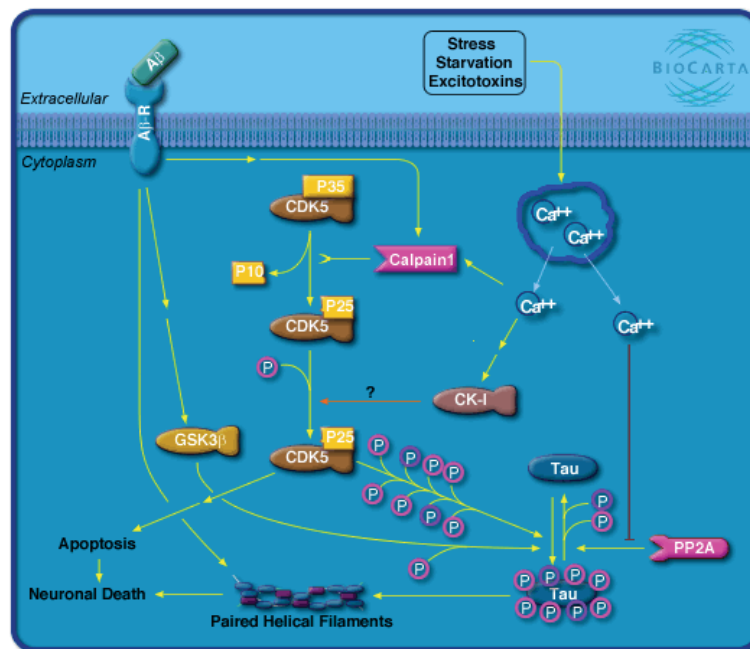


Figura 33. Fosforilación de tau mediada por GSK3 $\beta$  y CDK5. [www.biocarta.com](http://www.biocarta.com)

Varias fosfatasa son capaces de desfosforilar la proteína tau. Entre ellas se encuentra la proteína fosfatasa 1 (PP1), la proteína fosfatasa 2A (PP2A), la proteína fosfatasa 2B (PP2B o calcineurina, fosfatasa dependiente de Ca<sup>2+</sup>) y la proteína fosfatasa 2C (PP2C) (Cohen & Cohen, 1989).

Las proteínas PP1, PP2A y PP2B purificadas, pueden desfosforilar tau *in vitro* (Liu et al., 2005). Sin embargo, en cultivos primarios corticales de neuronas, PP2A y PP2B son las más implicadas (Saito et al., 1995). En otros trabajos, realizados utilizando cortes de cerebro, en los que se ha inhibido la actividad fosfatasa de PP2A y PP2B, se ha comprobado que la inhibición selectiva de PP2A con ácido okadáico, causa hiperfosforilación de tau y fosforilación en sitios comunes a los que se encuentran en la enfermedad de Alzheimer. Dicha fosforilación se correlaciona con una reducción de la capacidad de unión a microtúbulos e imposibilidad de estimular el ensamblaje de

éstos. Esto no ocurre cuando se inhibe selectivamente a la PP2B con ciclosporina A (Gong et al., 2000). De estos resultados se deduce que PP2A participa de una forma más activa en la regulación de la fosforilación de tau *in vivo* y que alteraciones en su regulación, podrían originar hiperfosforilación anormal de tau. También se cree que es la PP2A la que actúa en un mayor número de sitios de fosforilación (Gong et al., 2000). La PP2A se une a tau, a través de su dominio de unión a microtúbulos (Sontag et al., 1999).

## 4 LOS ASTROCITOS

---

### 4.1 DESCRIPCIÓN

---

Los astrocitos constituyen las células más abundantes del SNC. A lo largo de la evolución la proporción de éstos frente a la de neuronas ha ido en aumento de tal manera que en organismos menos evolucionados como la sanguijuela hay una proporción de un astrocito por cada 25 neuronas, mientras que en el cerebro humano la proporción se ve incrementada a 1.4 astrocitos por cada neurona (Heneka et al., 2007), lo cual supone aproximadamente el 50% del volumen cerebral humano (Chen & Swanson, 2003). Mientras que durante décadas se pensó que los astrocitos eran unas células pasivas que tenían principalmente una función estructural, actualmente cada vez se conocen más funciones que desarrollan estas células gliales. Los astrocitos presentan un amplio número de funciones que son determinantes para el desarrollo, funcionamiento y supervivencia de las neuronas, tales como el mantenimiento de la homeostasis iónica, soporte metabólico de las neuronas, regulación del metabolismo energético, recaptación de neurotransmisores, transmisión sináptica y excitabilidad neuronal, detoxificación, neuroprotección, desarrollo y mantenimiento de la barrera hematoencefálica, además de guiar la migración neuronal y colaborar en la función inmunitaria del SNC (Markiewicz & Lukomska, 2006).

Aunque existe más de una clasificación, la más utilizada es la descrita por Andriezen y Doelliker ya a finales del siglo XIX, que distingue los astrocitos en dos grandes poblaciones de acuerdo a sus características morfológicas y distribución dentro del SNC. Estos dos grupos se han mantenido con el tiempo y se conocen como astrocitos protoplasmáticos y astrocitos fibrosos. Los astrocitos protoplasmáticos, presentes en la sustancia gris, se caracterizan por su morfología arborescente, con un gran número de prolongaciones con muchas ramificaciones. Por su parte, los astrocitos fibrosos, presentes en la sustancia blanca, tienen formas más estrelladas con prolongaciones largas poco ramificadas (Reichenbach & Wolburg, 2005).

### 4.2 MARCADORES

---

Los astrocitos representan una población heterogénea, ya que en ella existen pocos genes que se expresen de forma ubicua, de tal manera que existen muchas diferencias entre los astrocitos de diferentes regiones (Volterra & Meldolesi, 2005). Por ello, el estudio de los astrocitos mediante marcadores específicos ha sido de gran importancia. Algunos de los marcadores más frecuentes son la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), la vimentina y la S-100 $\beta$ . Vimentina y GFAP son filamentos intermedios que forman parte del citoesqueleto de los astrocitos (Figura 34). La vimentina coexiste con la GFAP en los astrocitos inmaduros y a medida que maduran el GFAP reemplaza la vimentina (Eng & Ling, 2005). La GFAP es la principal proteína que compone los

filamentos intermedios en los astrocitos maduros del SNC. Su nombre proviene de su gran contenido en aminoácidos ácidos y su morfología fibrosa. Sus propiedades bioquímicas son que es una proteína insoluble en solventes acuosos, su tendencia a agregarse o polimerizar, es susceptible a proteasas neutras y tiene epítomos específicos que la hacen buen marcador antigénico. Tiene un peso molecular de 48 KD en ratón, 49 KD en humanos y 51 KD en rata. La fosforilación y defosforilación de residuos de su región aminoterminal regulan su polimerización. En condiciones fisiológicas la mayoría de las proteínas GFAP se encuentran formando filamentos intermedios de 10 nm. Cuando alguna de las diferentes serinas (Ser8, Ser-13, Ser-14, Ser-34) o treonina (Thr-7) de los residuos aminoacídicos de la región aminoterminal de GFAP se fosforila la proteína se despolimeriza y adopta su forma soluble. Diferentes quinasas pueden fosforilar GFAP como la PKA, PKC, CaMKII y Rho-quinasa (Eng & Ling, 2005).

La GFAP está implicada en muchos procesos funcionales de la célula, tales como el mantenimiento de la estructura, el movimiento, la comunicación celular, y el funcionamiento de la barrera hematoencefálica. En ratones knockout de GFAP se ha visto que carecen de filamentos intermedios en el hipocampo y en la sustancia blanca de la médula espinal. También se ha demostrado que, en estos ratones cuando llegan a ser viejos hay una degeneración de múltiples funciones de los astrocitos; la mielinización puede ser defectuosa, la estructura de la sustancia blanca deteriorada, y hay cambios apreciables en la barrera hematoencefálica. Esto nos sugiere que la expresión de GFAP es esencial para mantener la estructura de la sustancia blanca, la integridad de la barrera hematoencefálica y su ausencia conlleva a la desmielinización del SNC (Eng et al. 2000). También se ha propuesto que la GFAP desempeñe un papel en las interacciones entre astrocitos y neuronas. *In vitro*, usando mRNA antisentido, se ha observado que los astrocitos que carecen de GFAP no mantienen la misma estructura, afectando a la interacción entre astrocitos y neuronas (Ghirnikar et al., 1994). Una mutación en el gen de GFAP situado en el cromosoma 17 (17q21) lleva a la formación de una estructura proteica defectuosa y provoca la enfermedad de Alexander que se manifiesta por la aparición de retraso mental y anomalías físicas (Quinlan et al., 2007)

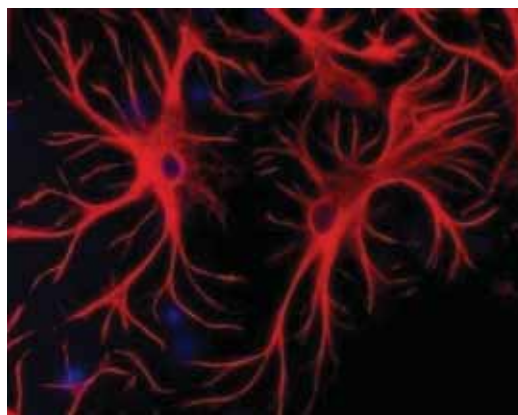


Figura 34: Astrocitos teñidos con anticuerpo anti-GFAP. [www.encorbio.com](http://www.encorbio.com)

Se produce un incremento gradual de la GFAP durante la vida adulta en ratones, ratas y humanos. O'Callaghan (1991) propuso a la proteína GFAP como un sensible biomarcador temprano de neurotoxicidad. Un aumento de mRNA de GFAP se ha asociado con la enfermedad de Alzheimer y de Creutzfeldt- Jacob (Eng et al., 2000). Los astrocitos reaccionan frente a agresiones ya sean físicas o químicas con un aumento de expresión de GFAP en un proceso llamado astrogliosis. Esta respuesta astrocitaria sirve como un microsensor del daño microambiental en cualquier lugar del SNC. La astrogliosis se da en muchas enfermedades como la esclerosis múltiple, la adrenoleucodistrofia, la enfermedad de Alexander, la esclerosis lateral amiotrófica, el síndrome de Down y las enfermedades de Huntington, Wilson, Pick, Parkinson y Alzheimer (Pekny & Nilsson, 2005).

La S100 $\beta$  es otra proteína que sirve como marcador de los astrocitos. Pertenece a la familia S100 llamada así porque es soluble al 100% en una solución saturada de sulfato de amonio. El gen que la codifica está situado en el cromosoma 21 (21q22.3) y su peso molecular es de 21 KDa. S100 $\beta$  es una proteína que se une al calcio y es producida mayoritariamente por los astrocitos en el SNC. Su actividad está relacionada con la regulación de la función intracelular del calcio implicado en muchos procesos como es la fosforilación de proteínas, la actividad enzimática, la proliferación y diferenciación celular. También actúa sobre la dinámica del citoesqueleto, la organización estructural de las membranas, la homeostasis intracelular del calcio, la inflamación y protección frente al daño oxidativo (Sen & Belli, 2007). Recientes estudios sugieren que la secreción de S100 $\beta$  puede producir acciones paracrinas y autocrinas en neuronas y glía. (Tateishi et al., 2006). Se ha propuesto que los niveles de S100 $\beta$  en varias áreas del cerebro podrían estar regulados por serotonina (Wilson et al., 1998). En relación con la proteína GFAP, la proteína S100 $\beta$  puede inhibir su polimerización. La función de la proteína S100 $\beta$  puede variar dependiendo de la concentración, mientras que a concentraciones extracelulares nanomolares estimula el crecimiento neuronal y su supervivencia, a niveles micromolares estimula in vitro la expresión de citoquinas proinflamatorias, promueve la expresión de iNOS, incrementa la expresión de APP y puede inducir apoptosis (Li et al., 1998; Rothermundt et al., 2003). La proteína A $\beta$  estimula la síntesis de S100 $\beta$  en astrocitos in vitro (Peña et al., 1995). En los cerebros de pacientes de AD se han encontrado elevados niveles de S100 $\beta$ , tanto su mRNA como la proteína (Mrak et al., 1996). Durante el envejecimiento se ha visto incrementado el mRNA de S100 $\beta$  en ratas (Kato et al., 1990). En ratones de senescencia acelerada la proteína S100 $\beta$  y su mRNA están significativamente incrementados (Griffin et al., 1998).

## 4.3 FUNCIONES

### 4.3.1 NEUROGÉNESIS Y SINAPTOGÉNESIS

Aunque la mayoría de los astrocitos maduran más tarde que las neuronas durante el desarrollo embrionario, un estudio reciente mostró cómo los astrocitos hipocampales pueden promover la neurogénesis en el cerebro adulto de ratas a partir de precursores neuronales mediante factores solubles y de membrana (Song et al, 2002). Además se ha demostrado la existencia de precursores neuronales con características astrocíticas, como la expresión de GFAP y la presencia de uniones gap. Las células progenitoras neuronales se encuentran principalmente en dos zonas del cerebro adulto, la zona subventricular y la zona subgranular del giro dentado. Diferentes estudios han demostrado la capacidad de los astrocitos de dar lugar a dichas células progenitoras neuronales tanto *in vitro* (Itoh et al, 2006) como *in vivo* (Ihrle et al, 2008).

La formación de sinapsis se produce durante el desarrollo postnatal una vez que los astrocitos se han diferenciado, y diversos estudios han demostrado que esto podría ser debido al hecho de que la sinaptogénesis requiere grandes cantidades de colesterol, que las neuronas obtendrían a partir de los astrocitos. Además, los astrocitos también juegan un papel importante en la maduración de terminales postsinápticas mediante la producción de factores como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) o el factor neurotrófico dependiente de actividad (Pfrieger, 2002)

### 4.3.2 MANTENIMIENTO DE LA HOMEOSTASIS IÓNICA

Los astrocitos regulan la concentración de muchos iones y participan así en el mantenimiento del pH contribuyendo a la correcta funcionalidad cerebral. Mediante transportadores monocarboxilados acoplados a protones se cotransportan protones ( $H^+$ ) y lactato desde los astrocitos al espacio extracelular creando un gradiente de protones y después los cotransportan a través de la membrana neuronal modulando la captación del lactato. Las neuronas son la mayor fuente de dióxido de carbono ( $CO_2$ ) que es el producto final de la oxidación del piruvato. Los astrocitos pueden metabolizar el  $CO_2$  a través de la anhidrasa carbónica que sintetiza ácido carbónico ( $H_2CO_3$ ) a partir de  $CO_2$  y agua y reversiblemente degrada el ácido carbónico en  $H^+$  y bicarbonato ( $HCO_3^-$ ) (Deitmer, 2001). Los astrocitos tienen varios sistemas para transportar  $H^+$  y  $HCO_3^-$  fuera de la célula. La salida de  $H^+$  conlleva a una alcalinización de los astrocitos y una acidificación del espacio extracelular (Figura 35). Este puede ser un mecanismo feedback negativo que reduce la actividad sináptica ya que los protones afectan al estado redox del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), reduciendo la magnitud de excitación por glutamato.

Los astrocitos tienen un papel crítico en tamponar el incremento de potasio ( $K^+$ ) extracelular que resulta de la actividad sináptica neuronal (Kofuji & Newman, 2004). El aumento de la concentración de  $K^+$  tiene un máximo crítico de 10 a 12 mM. El mantenimiento de esta



### 4.3.3 FORMACIÓN DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA

La barrera hematoencefálica (BHE) es una barrera tanto física como funcional entre los vasos sanguíneos y el encéfalo. La BHE tiene diferentes funciones, suple al encéfalo con nutrientes esenciales, permite la excreción de productos de desecho, restringe el flujo de iones al poseer transportadores específicos y mantiene constante el pool de neurotransmisores en el SNC, además de ser un sistema de defensa. La base estructural de esta barrera está dada por el hecho de que las células endoteliales de los capilares en el sistema nervioso central poseen uniones estrechas. Esto es, que los espacios que quedan entre célula y célula son extremadamente pequeños, a diferencia de lo que ocurre en la mayor parte de los lechos capilares del organismo. Esto permite el pasaje sólo de las partículas más pequeñas. Además de las uniones estrechas de las células endoteliales, la barrera está reforzada por los pericitos y los pies terminales astrocíticos (podocitos), que son proyecciones de los astrocitos fibrosos que rodean los capilares y proveen un refuerzo estructural adicional. A través de los podocitos los astrocitos secretan proteoglicano heparán sulfato, laminina y fibronectina que integran la lámina basal de la BHE (Banister et al, 1998) (Figura 36). Los astrocitos contribuyen a las uniones estrechas así como a la expresión de transportadores de las células endoteliales mediante la secreción de diversos factores, como el factor transformante de crecimiento  $\beta$  (TGF $\beta$ ) y el factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF) (Abbott et al, 2006).

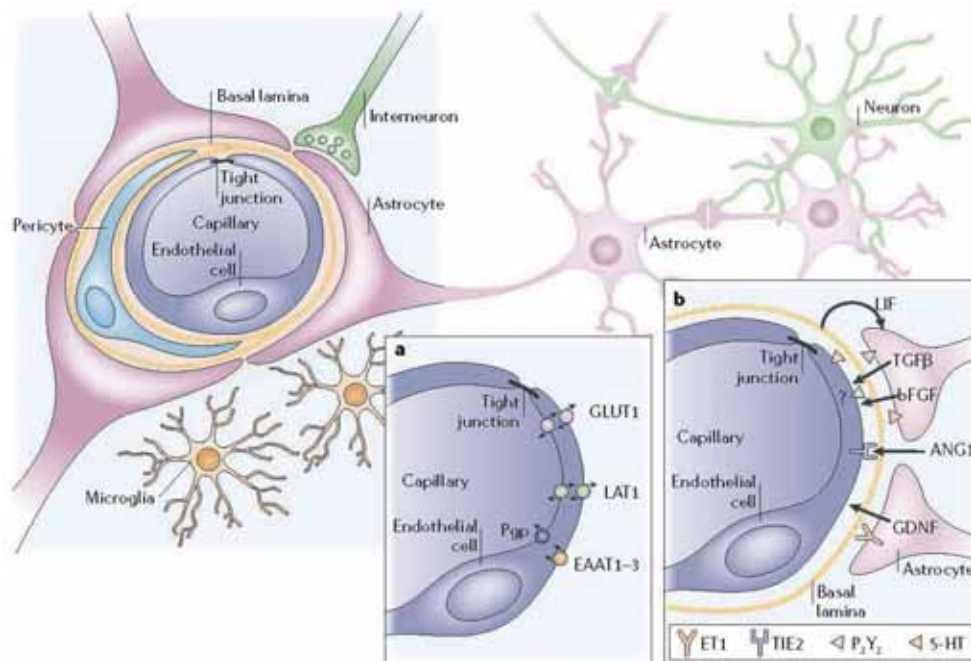


Figura 36. Componentes celulares de la barrera hematoencefálica. Abbott et al, 2006.



#### 4.3.4 CONTROL DEL FLUJO SANGUÍNEO

Los astrocitos envuelven las células endoteliales de los vasos sanguíneos a través de los podocitos creando lo que se conoce como unidad gliovascular. Esta unión permite a los astrocitos regular el flujo sanguíneo en función de la actividad neuronal. Los mediadores químicos procedentes de las neuronas producen en los astrocitos la salida del calcio del retículo endoplasmático hacia el citosol. Esta ola de calcio se propaga hasta el podocito del astrocito, donde activa la fofolipasa A2, la cual genera ácido araquidónico. Este ácido graso puede ser procesado bien por la enzima ciclooxigenasa para finalmente producir derivados de prostaglandinas vasodilatadoras, o bien por el citocromo p450, para convertirlo en ácido 20-hidroxiciclopentanoico que es un compuesto vasoconstrictor controlando así el flujo sanguíneo (Verhratsky & Toescu, 2006; Volterra & Meldolesi, 2005).

#### 4.3.5 REGULACIÓN DEL METABOLISMO ENERGÉTICO

La posición que ocupan los astrocitos entre las neuronas y los capilares sanguíneos contactando con ellos a través de los podocitos nos muestra que los astrocitos pueden regular la entrada y distribución de los sustratos energéticos a las neuronas (Kacem et al., 1998). También se ha demostrado que los astrocitos expresan un gran número de receptores y transportadores para muchos de los neurotransmisores (Hösli & Hösli, 1993). Esta característica proporciona a los astrocitos la capacidad de ajustar su función y mantener el microambiente metabólico necesario para la buena funcionalidad neuronal.

Los astrocitos tienen un papel principal en el metabolismo energético cerebral. La glucosa del flujo sanguíneo, que es el principal sustrato para el cerebro adulto, entra en el parénquima cerebral a través del transportador de glucosa GLUT1 situado en las células endoteliales que forman los capilares. La glucosa es captada principalmente por los astrocitos mediante el transportador GLUT1 aunque también por las neuronas que poseen el transportador GLUT3. En los astrocitos la glucosa se almacena en forma de glicógeno. A través de la conversión basal de glucosa en lactato y su liberación al espacio extracelular, especialmente por los astrocitos, el pool extracelular de lactato se mantiene. La activación neuronal induce diferentes respuestas de metabolismo energético en los astrocitos. El glicógeno puede ser proteolizado a glucosa. La glucosa puede ser metabolizada a lactato por la activación de la lactato deshidrogenasa 5 (Pellerin & Magistretti, 2005). Otras tipos de respuestas son desencadenadas por la activación neuronal de las sinapsis glutamatérgicas. El glutamato liberado puede ser recaptado por los astrocitos a través de los transportadores de glutamato 1 (GLT1) o el glutamato/aspartato (GLAST) (Danbolt, 2001). Como estos transportadores cotransportan glutamato y sodio, la concentración intracelular de sodio aumenta y activa la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa  $\alpha_2$  específica de células gliales. El ATP consumido por la bomba ATPasa y la conversión de glutamato a glutamina a través de la glutamina sintasa pueden activar la glicolisis y la formación de

lactato. El lactato se libera por los astrocitos a través de un transportador monocarboxilado específico el MCT1. Las neuronas activadas captan el lactato del medio extracelular a través de su propio transportador monocarboxilado específico MCT2. El lactato se convertirá en piruvato que luego entrará en el ciclo de los ácido tricarboxílicos (Figura 37). El uso de lactato además de la glucosa por parte de las neuronas puede tener diferentes propósitos, como el aumento del potencial redox al aumentar el dinucleótido adenina nicotina reducido (NADH) y la generación de ATP que puede ser utilizado para sintetizar glutamato. La glutamina también puede ser captada por la neurona a través de sus transportadores específicos y convertida en glutamato por la glutaminasa antes de ser acumulada en las vesículas sinápticas vía transportadores vesiculares de glutamato, así se completa el ciclo glutamato/glutamina. Por último la tercera respuesta es la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato en los astrocitos que conlleva a la formación de prostaglandinas que pueden actuar sobre los vasos sanguíneos causando vasodilatación (Pellerin & Magistretti, 2005).

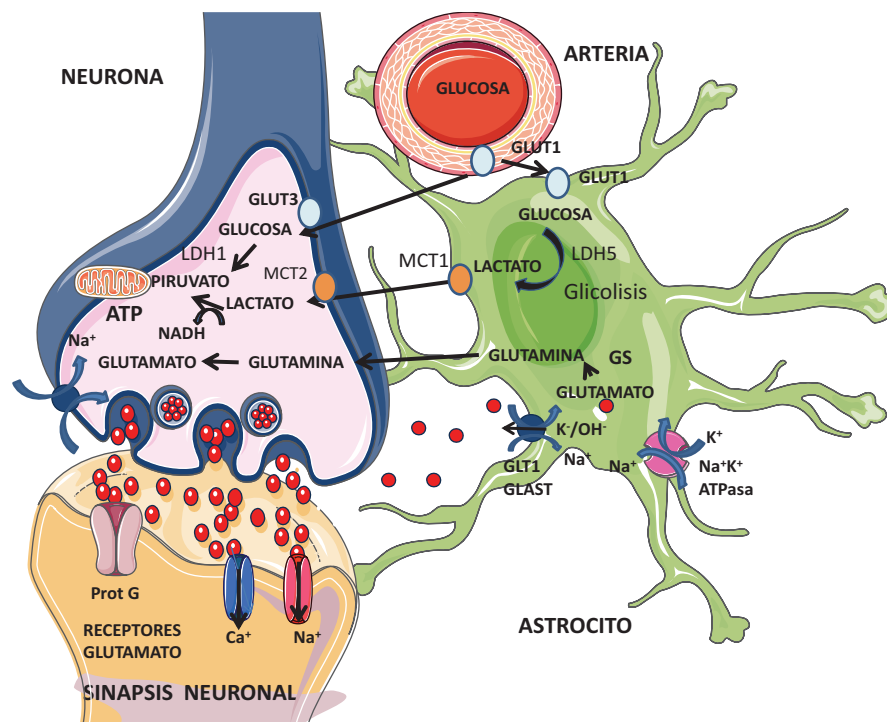


Figura 37. Metabolismo energético neurona-astrocito. Adaptado de Pellerin & Magistretti, 2005.

### 4.3.6 FUNCIÓN ANTICITOTÓXICA

La captación de glutamato y la función antioxidante de los astrocitos protegen a las neuronas frente a niveles tóxicos que pueden llegar a adquirir el neurotransmisor glutamato y los radicales libres.

#### 4.3.6.1 Captación de glutamato

Como ya he descrito en el apartado anterior los astrocitos recaptan glutamato del espacio sináptico a través de sus transportadores GLT1 y GLAST. Muchos estudios revelan que las neuronas son sensibles a altos niveles de glutamato y se despolarizan ocasionando una disregulación del calcio intracelular e incluso pueden llegar a morir. Así los astrocitos colaboran en la supervivencia neuronal. La inactivación de GLAST y GLT1 produce niveles elevados de glutamato extracelular, neurodegeneración excitotóxica y parálisis en ratas (Rothstein et al., 1996). Los ratones deficientes en GLT1 tienen mayor mortalidad y tienen una muerte neuronal selectiva en las neuronas de la zona CA1 del hipocampo (Tanaka et al., 1997). Los ratones deficientes en GLAST tienen descoordinación motora y son más susceptibles al daño cerebral (Watase et al., 1998). Así la captación de este neurotransmisor es necesario para la correcta transmisión sináptica.

#### 4.3.6.2 Función antioxidante

El estrés oxidativo es una de las causas de degeneración neuronal. Los antioxidantes de bajo peso molecular como el ácido ascórbico, el glutatión y el  $\alpha$ -tocoferol, juntamente con los enzimas antioxidantes, constituyen las defensas celulares contra el estrés oxidativo. Los astrocitos presentan elevadas concentraciones de estos antioxidantes, así como un alto nivel de SOD, catalasa, glutatión reductasa y glutatión peroxidasa (Wilson, 1997). Esta elevada concentración de enzimas antioxidantes de los astrocitos puede proteger a las neuronas de su entorno en condiciones de estrés oxidativo (Dringen, 2000). Estudios llevados a cabo en cocultivos de neuronas y astrocitos demuestran que los astrocitos pueden proteger a las neuronas de la muerte inducida por peróxido de hidrógeno (Desagher et al., 1996). Existen evidencias de que el glutatión presente en los astrocitos puede ser responsable de la neuroprotección. El glutatión es el principal antioxidante del cerebro. Los astrocitos contribuyen al contenido neuronal de glutatión de manera indirecta. El glutatión es liberado por los astrocitos y proteolizado en el dipéptido cisteína y glicina; la cisteína es recaptada por las neuronas para sintetizar glutatión de novo (Dringen, 2000). Igual que el glutatión, el ascorbato es un antioxidante importante que reacciona directamente con los agentes oxidantes y puede servir como cofactor para reducir el glutatión oxidado y el  $\alpha$ -tocoferol. Entre los astrocitos y las neuronas hay un ciclo de reciclaje del ascorbato (Wilson, 1997). Los astrocitos también pueden producir de forma inducible la hemoxygenasa que actúa en el metabolismo del grupo hemo y es importante en la prevención de la utilización de hierro para la producción de ROS.

#### 4.3.7 FUNCIÓN NEUROTRÓFICA

Los astrocitos segregan una serie de factores de crecimiento que son unas proteínas cuya función es la de permitir la supervivencia y diferenciación neuronal. Los astrocitos segregan los siguientes factores de crecimiento:

Neurotrofinas (NT): Los astrocitos segregan el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina 3 (NT-3) y la neurotrofina 4 (NT-4). Las neurotrofinas tienen al menos 3 funciones importantes: ejercer efectos tróficos sobre el sistema nervioso, ejercer efectos moduladores sobre las sinapsis y participar en la regulación de la respuesta inmune. Las NT son esenciales para la supervivencia neuronal durante el desarrollo, así como durante la maduración del SNC (Lachyankar et al., 1997). El BDNF ha adquirido particular interés por su función crítica en el aprendizaje. En este sentido la supresión de la expresión de BDNF en modelos animales causó severas deficiencias en el aprendizaje y en la memoria espacial. La adición de esta NT a concentraciones nanomolares es capaz de estimular la actividad neuronal en el hipocampo, la corteza y el cerebelo (Allen & Dawbarn, 2006). La expresión y liberación de BDNF por parte de los astrocitos es regulada por glutamato extracelular a través de receptores metabotrópicos (Jean et al., 2008). La expresión de BDNF se incrementa después de un daño cerebral, como parte de la respuesta de los astrocitos a las citoquinas y mediadores inflamatorios secretados por células inmunes (Kerschensteiner et al., 2003). La expresión y secreción astrocitaria de NGF se incrementa tras la exposición a los peroxinitritos, esto sugiere que en la expresión de NGF en los astrocitos reactivos puede estar implicado el estrés oxidativo (Vargas et al., 2004). La expresión astrocitaria de NGF y BDNF y sus receptores se incrementa tras una isquemia focal transitoria en el cerebro de monos (Tonchev et al., 2008). Una lesión excitotóxica en el estriado de ratón produce un aumento de la expresión de las neurotrofinas NT-3 y NGF (Chen et al., 2006).

Factores de crecimiento de los fibroblastos (FGF): Los astrocitos son una de las mayores fuentes de FGF-2 sobre todo en corteza e hipocampo (Riva & Mochetti, 1991) El FGF actúa mejorando la supervivencia neuronal sobre todo tras un episodio isquémico o un daño traumático en el cerebro (Alzheimer & Werner, 2002).

Citoquinas neuroreguladoras: Los astrocitos expresan el factor de crecimiento ciliar (CNTF) y el factor inhibitorio de leucemia que pueden activar la vía Janus quinasa (JAK). El CNTF estimula la supervivencia y diferenciación neuronal y astrocitaria (Richardson, 1994)

Factores de crecimiento del epidermo y factores de crecimiento transformante (TGF): Los astrocitos expresan TGF  $\alpha$  y neuregulinas. Se ha observado su incremento en la astrogliosis y se sugiere su acción autocrina y activadora de los astrocitos (Rabchevsky et al., 1998). Los astrocitos aumentan la síntesis de TGF $\beta$ 1 tras una lesión isquémica y tienen acción antiapoptótica (Vivien & Ali, 2006). En enfermos de EA se ha encontrado el TGF $\beta$  aumentado en el líquido cerebroespinal y está asociado a placas neuríticas y ovillos neurofibrilares. En ratones transgénicos que

sobreexpresan APP con mutación FAD (Tg2576) se ha observado que los astrocitos sobreexpresan TGF $\beta$  (Vivien & Ali, 2006).

Factores de crecimiento de la insulina (IGF): In vitro, el IGF-1 promueve la proliferación astrogliar y oligodendrogliar. Además se incrementa en procesos de isquemia y remielinización atribuyéndosele una acción neuroprotectora (Gluckman et al., 1992; McMorris et al., 1993).

Factores neurotróficos derivados de la línea celular glial (GDNF): Los astrocitos segregan GDNF y persefina (Jaszai et al., 1998). El GDNF fue purificado y clonado a partir de la línea celular glial de rata B49 en base a sus efectos de supervivencia y diferenciación sobre las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo (Choi-Lumberg et al., 1997). Además el GDNF actúa sobre la supervivencia de neuronas noradrenérgicas, podría mediar en la respuesta de las neuronas dopaminérgicas frente a la lesión (Gash et al., 1998) y actuar a nivel de proliferación y diferenciación de las motoneuronas espinales (Sagot et al., 1996). El trasplante de astrocitos modificados genéticamente para que expresen GDNF en el estriado mejora la neuroprotección en un modelo de rata de la enfermedad de Parkinson (Ericson et al., 2005). Durante la isquemia cerebral la expresión astrogliar de GDNF aumenta en el estriado y la corteza cerebral además la administración exógena de GDNF puede disminuir el volumen de infarto (Wei et al., 2000). El tratamiento con GDNF en conejos inyectados con A $\beta$  mejora la apoptosis neuronal que el péptido amiloide genera pero no previene la hiperfosforilación de tau (Ghribi et al., 2004). El GDNF interacciona con su receptor GFR $\alpha$  y este forma un heterodímero con el receptor tirosina quinasa c-ret. Este complejo activa las vías ras/raf y fosfoinositol-3 quinasa (Saarma & Sariola, 1999).

#### 4.3.8 REGULACIÓN DE LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA

Aunque los astrocitos a menudo envuelven las sinapsis nerviosas se les consideraba participantes pasivos. Recientemente se ha demostrado que hay una comunicación activa entre las neuronas y los astrocitos en las sinapsis. Los neurotransmisores secretados por las neuronas presinápticas evocan un incremento del calcio intracelular en los astrocitos. Los astrocitos activos liberan neurotransmisores incluyendo glutamato y ATP. Estos neurotransmisores vuelven a la terminal presináptica y pueden aumentar o bloquear la salida de nuevos neurotransmisores. Los neurotransmisores secretados por los astrocitos pueden actuar sobre las neuronas postsinápticas produciendo respuestas excitatorias o inhibitorias. Además, los astrocitos recaptan neurotransmisores liberados por los terminales presinápticos (Anderson & Swanson, 2000). Esta participación activa de los astrocitos en la sinápsis neuronal ha llevado al concepto de sinápsis tripartita (Newman, 2003) (Figura 38).

Los astrocitos expresan una gran variedad de receptores para neurotransmisores como el glutamato, GABA, adrenalina, ATP, serotonina, acetilcolina y diversos péptidos (Porter & McCarthy, 1996).

La activación de estos receptores produce una activación glial a través del aumento del calcio intracelular que se propaga en olas de calcio a las células astrocitarias vecinas. Este proceso se realiza o bien a través de la difusión de inositol (1,4,5)-trifosfato (IP<sub>3</sub>) por las gap junctions o bien a través de la salida de ATP que actúa como mensajero extracelular (Newman, 2001). El incremento del calcio intracelular regula la sinapsis activando la secreción de glutamato y ATP los cuales actúan sobre las neuronas. En el hipocampo la despolarización de las interneuronas inhibitorias conlleva la potenciación de la transmisión sináptica a través de la secreción de glutamato por los astrocitos vecinos (Kang et al., 1998). La liberación de ATP puede modular la sinapsis, excitando neuronas vecinas directamente a través de receptores P2X; el ATP una vez convertido en adenosina también puede potenciar o inhibir la transmisión sináptica. Además el ATP puede activar a otras células gliales a través de receptores purinérgicos (Figura 38) (Newman, 2003).

Los astrocitos también pueden liberar cofactores químicos como la D-serina que es el cofactor activador del receptor NMDA. Los astrocitos son la única fuente de D-serina en el SNC y es un importante modulador de la transmisión glutamatérgica mediada por receptores NMDA (Schell et al., 1995). Otro mecanismo es la regulación astrogliar de los niveles de iones extracelulares. La actividad neuronal está influenciada por las variaciones en las concentraciones extracelulares de los iones K<sup>+</sup> y H<sup>+</sup> (Chesler & Kaila, 1992). Estas variaciones pueden alterar la transmisión sináptica, así el aumento de los niveles de K<sup>+</sup> despolariza las terminales sinápticas mientras que el H<sup>+</sup> bloquea los canales presinápticos de calcio. Los astrocitos pueden modular la transmisión sináptica controlando directamente la sinaptogénesis (Ullian et al., 2001).

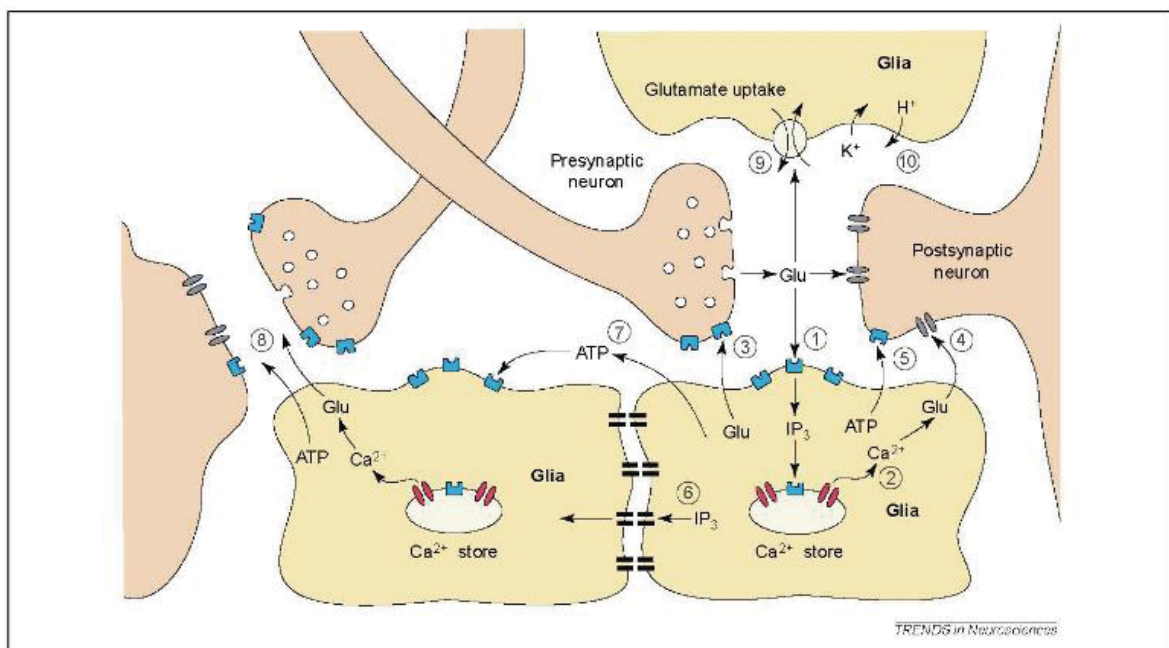


Figura 38. Mecanismos de regulación glial de la transmisión sináptica. Newman, 2003.

#### 4.3.9 FUNCIÓN INMUNOLÓGICA

Los astrocitos también participan en la respuesta inmunitaria y como son más numerosos que la microglía, es posible que sea el componente mayoritario del sistema inmune innato del SNC (Dong & Benveniste, 2001).

Los astrocitos responden a diferentes patrones moleculares asociados a patógenos como los lipopolisacáridos, el peptidoglicano o los motivos CpG del ADN no metilado, incrementando la expresión de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias. Los astrocitos expresan receptores de tipo Toll (TLR): TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 y TLR9 (Bowman et al., 2003) además de otros receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs) como la proteína quinasa R, las proteínas NOD1 y NOD2, los receptores scavenger, el receptor de manosa y los factores y receptores del sistema del complemento (Farina et al., 2007). Todos estos PRRs son importantes para el reconocimiento primario de agentes infecciosos y de las señales de peligro endógeno.

Los mediadores inflamatorios liberados por los astrocitos y la microglía después de la activación de los PRRs activan células vecinas, amplifican la respuesta inmune inicial y modifican la permeabilidad de la BHE para permitir la infiltración de los leucocitos que dirigirán la respuesta adaptativa. Estos mediadores participan en la inflamación y la inmunosupresión siendo el equilibrio entre estas dos respuestas fundamental ya que la desregulación de estas vías pueden desencadenar un proceso crónico de neuroinflamación y neurodegeneración. Los astrocitos son una fuente importante de citoquinas y quimioquinas inmunológicamente relevantes y por lo tanto es un tipo celular importante en la modulación de la respuesta inflamatoria.

Cuando tiene lugar una infección en el SNC, las células inmunitarias periféricas que se infiltran hacia el parénquima cerebral también secretan citoquinas proinflamatorias que contribuyen a mantener la activación astrocitaria. Los astrocitos responden frente a la estimulación con interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) produciendo más citoquinas y quimioquinas inflamatorias (Meeuwssen et al., 2003), que aumentan la expresión de las moléculas necesarias para funcionar como células presentadoras de antígenos y la capacidad de presentar antígenos a las células T (Soos et al., 1998) (Figura 39).

El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II es fundamental para la respuesta inmune mediante la presentación de los antígenos procesados por las células T. El MHC de clase II se expresa de manera constitutiva en las células presentadoras de antígeno del sistema inmunitario y puede ser inducido en los astrocitos y la microglía. En los astrocitos el IFN- $\gamma$  es el inductor más potente del MHC de clase II (Dong & Benveniste, 2001). La activación de las células T CD4 helper (Th) en el sistema nervioso es muy importante en la regulación de la respuesta inmune, en la inflamación y en el proceso de reparación. Existen dos tipos de linfocitos Th según la batería de

citoquinas que producen (Romagnani, 1997) y sus funciones efectoras. Los linfocitos Th1 producen Interleuquina 2 (IL-2), IFN- $\gamma$  y TNF- $\beta$ . Th1 es el fenotipo proinflamatorio que permite la activación de los macrófagos y la destrucción del tejido (Abbas et al., 1996). Las células Th2 producen IL-4, IL-10, IL-13, citoquinas con actividad antiinflamatoria que inhiben las respuestas Th1 y la activación de macrófagos. La microglía es una célula presentadora de antígeno muy eficiente dirigida a la estimulación de células Th1 y Th2. Los astrocitos modulan la respuesta Th2 principalmente (Aloisi et al., 2000). Por tanto astrocitos y microglía podrían participar de forma diferente en el desarrollo de la respuesta inmune en el SNC.

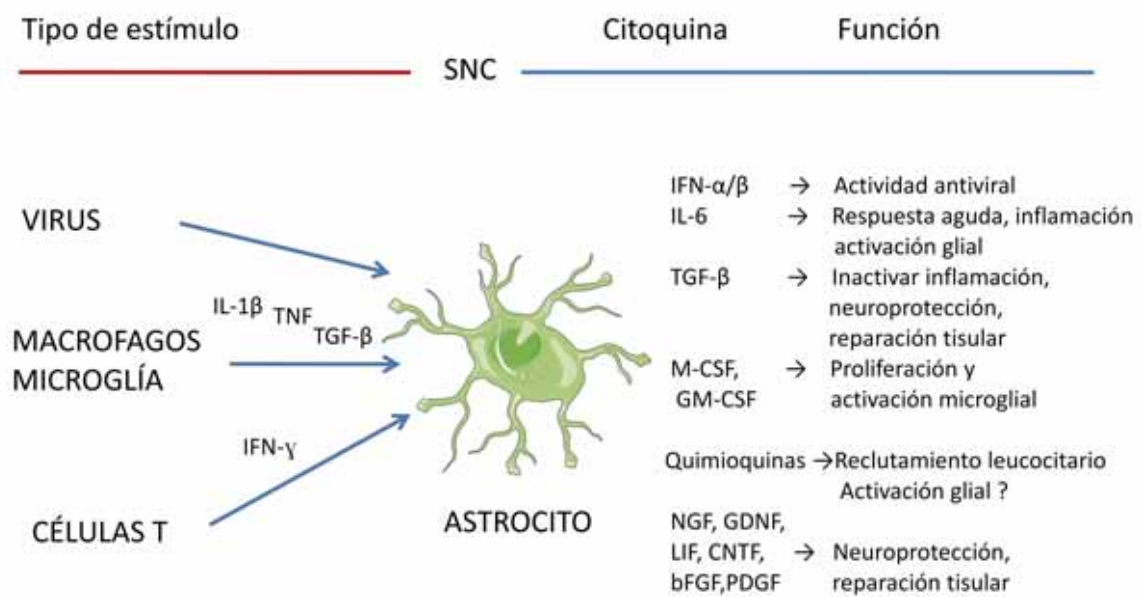


Figura 39. Citoquinas secretadas por astrocitos. Aloisi, 2005.

#### 4.4 LOS ASTROCITOS EN EL ENVEJECIMIENTO

En el envejecimiento cerebral hay un aumento relativo de células gliales. Se estima que el número de astrocitos aumenta un 20% en el córtex y otras regiones cerebrales (Peinado et al., 1998; Rozovsky et al., 1998). Un temprano estado de gliosis reactiva es una de las características que diferencian a los astrocitos en el cerebro durante el envejecimiento. La principal característica de los astrocitos reactivos es el aumento de GFAP y de la proteína S100 $\beta$ . (Sheng et al., 1996; Nichols, 1999). Un incremento de GFAP se produce gradualmente durante la vida adulta en ratones, ratas y humanos (Eng et al., 2000). El mRNA de GFAP también se encuentra incrementado en ratones durante el envejecimiento (Kohama et al., 1995). El aumento de GFAP puede ser resultado a la respuesta inflamatoria y del estado oxidativo en el cerebro envejecido. Durante el envejecimiento se ha visto incrementado el mRNA de S100 $\beta$  en ratas y humanos (Mrak et al., 1996; Sheng et al., 1996). En ratones de senescencia acelerada (SAM) la proteína S100 $\beta$  y su



mRNA están significativamente incrementados (Griffin et al., 1998). La sobreexpresión de S100 $\beta$  en los astrocitos se considera como una respuesta neuroprotectora al daño neuronal. La astrogliosis también conlleva un aumento del tamaño del núcleo, se dispersa la cromatina y aumenta el número de mitocondrios, ribosomas y aparato de Golgi. En el envejecimiento los astrocitos presentan un acúmulo mayor de proteína tau aunque no presentan ovillos neurofibrilares (Schultz et al., 2000). También presentan alteraciones en los niveles de calcio citosólico que pueden incrementar el nivel de tau hiperfosforilado (Mattson et al., 1991). En cultivos de astrocitos envejecidos se han visto aumento de producción de anión superóxido, lipoperoxidación y oxidación proteica aunque las defensas antioxidantes se mantienen o incrementan (Papadopoulos et al. 1998; Klamt et al. 2002). En el envejecimiento se puede presentar un aumento del estrés oxidativo y de las proteínas de estrés que pueden alterar la homeostasis del calcio y la generación extracelular de ATP. La microglía al ser activada puede secretar IL-1 que induce la expresión de S100 $\beta$  en los astrocitos, que a su vez aumenta los niveles intracelulares de calcio (Mrak et al., 1995). La oxidación de proteínas reguladoras del calcio como el receptor inositol (1,4,5)-trifosfato o la proteína calcio/calmodulina en los astrocitos pueden modificar las concentraciones de calcio modificando la liberación de ATP alterando así las sinapsis en neuronas vecinas (Peuchen et al., 1996). No se conoce bien el papel de los astrocitos en el envejecimiento cerebral y es un gran tema de estudio que intentaremos abordar en el transcurso de esta tesis.

#### 4.5 LOS ASTROCITOS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

---

En la EA los astrocitos son componentes de las placas neuríticas (Shao et al., 1997). Los astrocitos presentan una marcada astrogliosis caracterizada por una hipertrofia celular y sobreexpresión de GFAP, S100 $\beta$ , moléculas de adhesión y presentadoras de antígenos como el MHC (Edwards & Robinson, 2006; Frohman et al., 1989). El A $\beta$  está implicado en la activación de los astrocitos (Markiewicz & Lukomska, 2006). Los astrocitos presentan depósitos de A $\beta$  ya que lo captan para participar en su degradación y estos depósitos pueden producir la degeneración de estas células astrocitarias (Nagele et al., 2004; Kurt et al. 1999; Dewiitt et al., 1998). Estudios in vitro muestran que los astrocitos de ratón internalizan y degradan el péptido A $\beta$  y esta actividad se reduce si no se expresa la apolipoproteína E (Koistinaho et al., 2004). También se ha demostrado que el péptido A $\beta$  interviene en la homeostasis del calcio cambiando su patrón de señalización y genera ROS al incrementarse los niveles de calcio que activan la NADH oxidasa (Abramov et al., 2004). El péptido A $\beta$  produce disminución en los niveles de los transportadores GLT-1 y GLAST de los astrocitos ocasionando una disminución en la captación de glutamato probablemente mediado a través del estrés oxidativo (Matos et al. 2008). Los astrocitos activados por el péptido A $\beta$  producen citoquinas como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ , quimioquinas, proteínas del complemento,

tromboxanos, factores de coagulación, proteasas, inhibidores de proteasas y ROS que pueden causar daño neuronal (Johnstone et al., 1999). Las quimioquinas liberadas por los astrocitos atraen la microglía que expresa productos proinflamatorios contribuyendo a una mayor neurodegeneración (Tuppo & Arias, 2005). Una vía mediadora de estos procesos inflamatorios en la glía está regulada por la familia de factores de transcripción CCAAT/ enhancer binding protein (C/EBP) (Ejarque-Ortiz et al., 2007) que se encuentran elevados en los astrocitos de pacientes de EA (Li et al., 2004). En los cerebros con EA se ha encontrado un aumento de expresión de NO por parte de los astrocitos que contribuye al daño neuronal. (Simic et al. 2000). Los astrocitos de los pacientes de EA también presentan más tau hiperfosforilada. Esta patología se ha asociado a la reducción de la expresión y funcionalidad de los transportadores de glutamato GLT1 y GLAST (Maragakis & Rothstein, 2006). En estudios en ratones transgénicos GFAP/ tau P301 L cuyos astrocitos expresan tau bajo el control del promotor GFAP, se ha observado que la sobreexpresión de tau correlaciona con una disminución en la expresión de los transportadores GLT1 y GLAST que causa una disminución en la captación de glutamato por parte de los astrocitos (Dabir et al., 2006). La alteración funcional de los astrocitos en la EA es todavía objeto de estudio y hay mucho que investigar en este campo que podría ayudar a comprender mejor esta enfermedad.

# OBJETIVOS

---

---

## **1. OBJETIVOS**

---

### **1.1 OBJETIVO GENERAL**

---

Caracterización de los astrocitos en procesos de envejecimiento y evaluación de su efecto neuroprotector en modelos in vivo e in vitro. La finalidad de estos estudios es ayudar a conocer el desencadenamiento y la progresión de enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento y en concreto de la enfermedad de Alzheimer. La aportación de nuevos conocimientos puede sentar las bases de futuras terapias preventivas del envejecimiento patológico.

### **1.2 OBJETIVOS CONCRETOS**

---

1. Establecer modelos in vitro para el estudio del envejecimiento de los astrocitos.
2. Caracterizar el envejecimiento de los astrocitos in vitro y evaluar su capacidad neuroprotectora.
3. Estudiar si los astrocitos de los ratones SAMP8 in vitro presentan características de senescencia que expliquen su papel en las alteraciones bioquímicas y de comportamiento observados in vivo en los ratones SAMP8 envejecidos.
4. Estudiar los efectos del envejecimiento de los astrocitos en la relación neurona-astrocito.
5. Estudiar la función neurotrófica de los astrocitos observando si un aumento de su capacidad neurotrófica mejora la funcionalidad neuronal en el envejecimiento.
6. Estudiar in vitro e in vivo si en un ambiente de estrés oxidativo, como se produce durante el envejecimiento, los astrocitos tienen una respuesta más elevada al péptido betamieloide in vitro e in vivo.

# MATERIALES Y MÉTODOS



## 1. CULTIVOS CELULARES

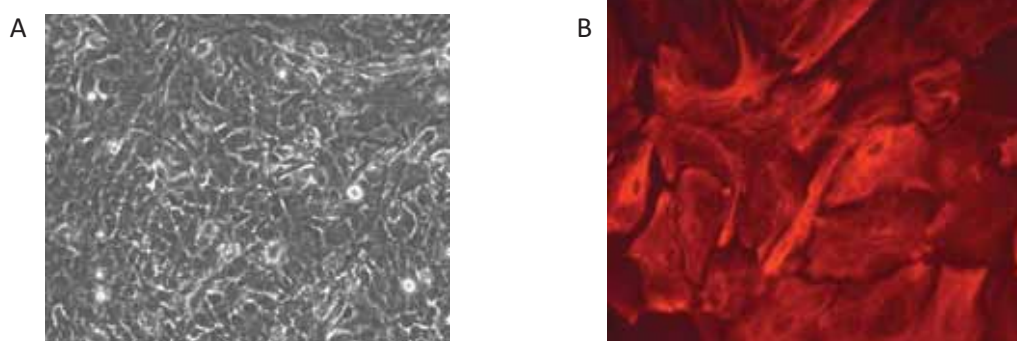
---

### 1.1 CULTIVOS DE ASTROCITOS DE RATA Y RATÓN

---

Los cultivos primarios enriquecidos en astrocitos se prepararon a partir de corteza cerebrales de ratas Fisher 344 o ratones SAMP8 y SAMR1 (Figura 40), postnatales de 2 días de edad. Por cada cultivo se usa una camada, las cabezas de los neonatos se bañan en alcohol y se decapitan. En una cabina de flujo horizontal se extrae el cerebro asépticamente y se mantiene en una placa de Petri con PBS sobre hielo. De cada cerebro se descarta el cerebelo y los lóbulos olfatorios, y se separan los dos hemisferios cerebrales. Con la ayuda de una lupa binocular, se diseccionan los hemisferios libres de meninges. En la cabina de flujo vertical con la ayuda de unas tijeras se corta el tejido en trozos pequeños, se pasa a un tubo Falcon de 50 ml y se centrifuga durante 3 minutos a 1000 rpm. Se elimina el sobrenadante con una pipeta Pasteur y se resuspende el pellet en una solución de tripsina-EDTA en PBS. Se incuba el tejido en la solución de tripsinización durante 25 minutos a 37°C en agitación de 100 rpm. Después se añade una solución para parar la tripsinización de 12 ml de medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Mod Eagle médium suplementado con bicarbonato sódico 26.3 mM y glutamina 2.5 mM) con 10% FBS (de *foetal bovine serum*) y 0.2 ml de DNasa (10mg/ml). Se mezcla por inversión y se disocia el tejido mecánicamente, disgregando la mezcla con una pipeta de 10 ml repetidamente hasta conseguir una suspensión unicelular. Después se centrifuga 7 minutos a 1000 rpm y se descarta el sobrenadante con una pipeta Pasteur. Se añade 20ml de DMEM con 20% de FBS y se homogeneiza con una pipeta. Se filtra la suspensión con un filtro de 70 µm y se cuenta el número de células en el hemocitómetro (cámara de Neubauer). Se añade medio de cultivo DMEM con fungisona (0.25 µg/ml), gentamicina (100 µg/ml) y 20% FBS a la solución hasta obtener una densidad de siembra de 300.000 células/ml. Después de sembrar, las células se mantienen en el incubador a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% CO<sub>2</sub>, y 95% de aire. El medio se cambia cada 3 o 4 días disminuyendo la concentración durante las dos primeras semanas de FBS de 20% a 15% y finalmente al 10%. En los experimentos con astrocitos de ratones SAM, estos fueron usados a los 21 días *in vitro* (DIV). En los experimentos con astrocitos de rata, se realizaron cultivos secundarios: a las dos semanas del cultivo los astrocitos están confluentes y se lavan con PBS para eliminar los restos de suero, luego se tripsinizan. Se deja actuar la tripsina (10mg/ml) dentro del incubador durante 5 minutos aproximadamente hasta que se observa que las células se desprenden. Neutralizamos la acción de la tripsina añadiendo PBS con 20% FBS, recuperamos la suspensión y centrifugamos 5 minutos a 1000 rpm, luego se siembran a 250.000 células/ml en el medio DMEM suplementado con antibióticos y 10% FBS en placas o flacones NUNC pretratados con poli-L-lisina. Los experimentos se realizaron a los 10 DIV y a los 90 DIV.

Estos últimos cultivos fueron tratados de 10  $\mu\text{mol/L}$  con citosina arabinosa para evitar la proliferación celular y así evitar que se incremente el porcentaje de células microgliales.



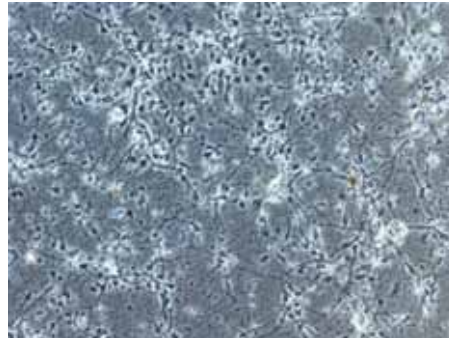
**Figura 40: Cultivo de astrocitos murino; a) contraste fase, objetivo de 20X; b) teñido con GFAP, objetivo de 40X. S. García-Matas.**

## 1.2 CULTIVOS DE NEURONAS DE RATA Y RATÓN

---

Los cultivos primarios de neuronas se prepararon a partir de corteza cerebrales de embriones de 15 días de ratas Fisher 344 o ratones SAMP8 y SAMR1 (Figura 41). Cada cultivo se realiza a partir de una hembra gestante y con unas tijeras se abre el útero, se retira la placenta y se obtienen los embriones. Después se extrae el cerebro de los fetos en condiciones estériles y se mantienen en una placa de Petri con PBS en hielo. Con la ayuda de una lupa binocular, se descarta el cerebelo y los lóbulos olfatorios, y se separan los dos hemisferios cerebrales. Se diseccionan las meninges de cada hemisferio y los hemisferios se mantienen en PBS frío. En una campana de flujo vertical se transfiere el tejido a una placa de teflón estéril, y se tritura en pequeños trozos usando una cuchilla estéril. Se transfiere con una pipeta Pasteur a un tubo Falcon y se añade una solución de Krebs con 0.1% BSA (de *bovine serum albumin*) con 150 mM  $\text{MgSO}_4$ . Se centrifuga brevemente hasta 1000 rpm y se para inmediatamente, se descarta el sobrenadante, se transfiere el tejido a una solución de tripsinización compuesta de Krebs-0.1% BSA con 150 mM  $\text{MgSO}_4$  y 0.25 mg/ml Tripsina (o Tripsina-EDTA) + 0.1mg/ml DNAsa. Finalmente se incuba durante 15 minutos a 37° en el baño con agitación. A continuación se añade una solución de Krebs-0.1% BSA con 150 mM  $\text{MgSO}_4$  y 16  $\mu\text{g/ml}$  DNAsa a la suspensión de células y se centrifuga 5 minutos a 1000 rpm. Se quita el sobrenadante y se añade una solución para parar la tripsinización del tejido que consta de Krebs-0.1% BSA con 150 mM  $\text{MgSO}_4$  y 0.15 mg/ml SBTI (de *Soybean Trypsin Inhibitor*). Con una cánula conectada a una jeringa estéril se disgrega mecánicamente el tejido hasta que la solución se vea turbia. Finalmente se transfiere la suspensión a una solución N-DMEM (medio DMEM con 26.2 mM de bicarbonato sódico, 0.2 mM de glutamina; 100 mU/L insulina B, 7  $\mu\text{M}$  ácido paraaminobenzoico (pABA), 100  $\mu\text{g/ml}$  gentamicina y 0.25  $\mu\text{g/ml}$  fungisona) suplementada con

10% FBS y atemperada a 37°. Se centrifuga durante 5 minutos a 1000 rpm. El pellet se resuspende en el medio N-DMEM, se cuentan el número de células con la cámara Neubauer, y se resuspende en un volumen conocido de N-DMEM con 10% FBS hasta conseguir una densidad de  $1.5 \times 10^6$  células/ml para la siembra en flascos o placas NUNC pretratados con poli-D-lisina.



**Figura 41. Cultivo de neuronas neocorticales de ratón SAM. Objetivo 20X. S. García-Matas.**

### 1.3 COCULTIVOS DE NEURONAS Y ASTROCITOS DE RATA Y RATÓN

---

Para estudiar la neuroprotección que ejercen los astrocitos se realizaron cocultivos de neuronas y astrocitos de ratas Fisher 344 en un estudio, y de ratones SAMP8 y SAMR1 en otro. Se realizó el cultivo de neuronas según se ha descrito en el apartado anterior y se sembraron a una densidad de  $1.5 \times 10^6$  células/ml directamente sobre una monocapa confluyente de astrocitos de rata de 10 DIV o 90 DIV en portaobjetos con 8 cámaras de NUNC, o sobre astrocitos de ratón de 15 DIV en cubreobjetos redondos dentro de placas NUNC de 24 pozos. El medio utilizado fue N-DMEM con 10% FBS. La supervivencia neuronal se ensayó en neuronas de rata a los 14 días de cocultivo y en las neuronas de ratón a los 12 días de cocultivo.



## 2. MÉTODOS DE MEDIDA DE VIABILIDAD NEURONAL

---

### 2.1 TINCIÓN DE CÉLULAS MUERTAS

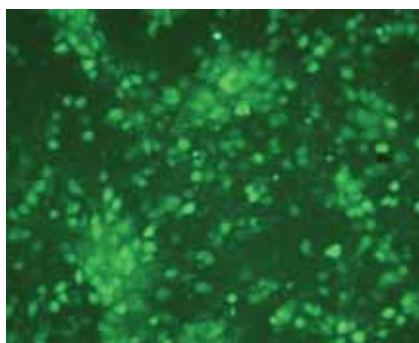
---

Se utilizó la tinción de yoduro de propidio para identificar las células muertas en los cocultivos de neuronas y astrocitos sin fijar. El yoduro de propidio se internaliza en las células con la membrana dañada y produce fluorescencia al intercalarse entre los ácidos nucleicos. Por tanto los núcleos de las células dañadas quedan teñidos con fluorescencia roja. Se añade la solución de yoduro de propidio al medio de cultivo a una concentración final de 7.5  $\mu\text{M}$  y se deja actuar durante 30 minutos. Después se hace un lavado con PBS a 37°C y se fijan las células con paraformaldehído al 4% y se hacen fotografías con el microscopio invertido Nikon Eclipse E1000 de fluorescencia contabilizándose las células muertas.

### 2.2 TINCIÓN INMUNOCITOQUÍMICA Y TINCIÓN CON BISBENZIMIDA

---

Para identificar las neuronas hemos utilizado una técnica de tinción inmunocitoquímica contra el antígeno nuclear neuronal Neu N o el neurofilamento NF (Figura 42). Como estos antígenos son intracelulares se han de permeabilizar las células con 0.25% Tritón X100 en PBS durante 30 minutos. A continuación se hace un lavado con PBS para eliminar los restos de detergente. Después se bloquean las uniones inespecíficas con suero de cabra al 3% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Se diluye el anticuerpo monoclonal Neu N o NF a 1:200 en PBS con 1% de suero de cabra. La incubación con este anticuerpo primario se realiza durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realizan cuatro lavados de 5 minutos con PBS a temperatura ambiente. A continuación se incuba con el anticuerpo secundario antimouse Alexa Fluor 488 (Molecular Probes), que tiene fluorescencia verde, diluido en PBS con el 1% de suero durante 1 hora a temperatura ambiente.



**Figura 42. Cultivo de neuronas neocorticales de ratón SAM teñidas con Neu N Objetivo 40X. S. García-Matas.**

Después de teñir las neuronas con Neu N o NF (en color verde), realizamos dos lavados con PBS y procedemos a teñir los núcleos con fluorescencia azul de todas las células del cultivo con bisbenzimidida 5  $\mu$ M en PBS (Figura 43). Después los cubreobjetos o portaobjetos se montan y se determina la supervivencia neuronal contando en campos elegidos sistemáticamente con el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E 1000 las neuronas inmunoreactivas a NeuN o NF que no están teñidas con yoduro de propidio.

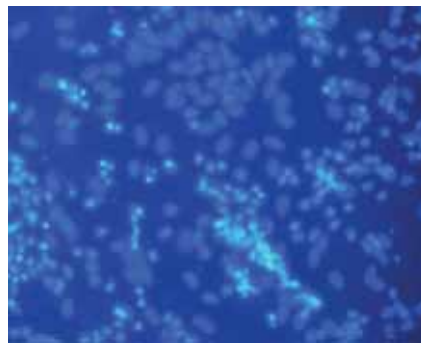


Figura 43. Cocultivo de neuronas y astrocitos neocorticales de rata teñidas con bisbenzimidida. Objetivo de 40X. S. García-Matas.

### 3. MÉTODO DE MEDIDA DE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL

---

#### 3.1 ENSAYO DEL MTT

---

El ensayo del MTT para medir la actividad mitocondrial de los astrocitos en cultivo y que también se aplica para medir citotoxicidad fue desarrollado por Mosmann (1983) y se realizó siguiendo las modificaciones de Hansen et al. (1989). Las células viables con mitocondrias activas pueden metabolizar la sal de tetrazolio (MTT) y dan lugar a la formación de cristales de formazan que son insolubles y de color violáceo.

Se preparan dos soluciones:

- Solución MTT: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenilo tetrazolio bromidido se disuelve a la concentración de 5mg/mL en PBS. Se esteriliza por filtración, se ha de proteger de la luz y se conserva a 4°C.
- Solución de lisis: Se utiliza para lisar las células y disolver los cristales. Se prepara un 20% de sodio docecilo sulfato (SDS) disuelto en N, N-dimetilo formamida/agua (1:1) a pH 7.4.

El ensayo del MTT se lleva a cabo en placas de 96 pozos. Se sacan las placas del incubador y se añade 10  $\mu$ L de solución de MTT a cada pozo a una concentración final de 500  $\mu$ g/mL. Se ponen

las placas en el incubador y se dejan 2 horas. Durante este tiempo las células viables con mitocondrias activas reducirán la sal de MTT dando lugar a la formación de cristales. Para hacer el blanco se dejan algunos pozos sin añadir la solución de MTT, pero sí que se añade la solución de lisis. Para disolver los cristales, se añade 100  $\mu$ L de solución de lisis a cada pozo y se incuban las placas en la estufa a 37 °C durante toda la noche. Se mide la densidad óptica a 560 i 620 nm en el espectofotómetro. Se utilizan los valores de la absorbancia a 620 nm como referencia y se obtiene la diferencia respecto a la absorbancia a 560 nm para eliminar el ruido de fondo.

Los resultados se calculan según:

$$\text{Porcentaje de reducción de MTT} = \frac{[(DO-DO_0) / (DO_C - DO_0)] * 100}{1}$$

Donde DO es la absorbancia de cada pozo,  $DO_C$  es la media de absorbancia de los pozos control y  $DO_0$  es la media de absorbancia de los pozos usados como blanco.

#### 4. MÉTODO DE MEDIDA DE CAMBIOS DE POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

---

##### 4.1 TINCIÓN CON RODAMINA 123

---

La Rodamina 123 es un colorante fluorescente que se acumula en las mitocondrias activas en función de la diferencia de potencial de su membrana.

Se preparan las siguientes soluciones:

- Medio de incubación: solución salina tamponada con HEPES (SSTH): 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.8 mM  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0.62 mM  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 10 mM HEPES y 6 mM glucosa; pH: 7.4.
- Solución de rodamina 123: se prepara una solución madre que contiene 1.05 mg de rodamina 123 por mL de etanol absoluto. Esta solución se puede congelar protegida de la luz.

El ensayo se lleva a cabo en células cultivadas en placas NUNC de 96 pozos. Se hacen dos lavados con medio de incubación a 37 °C. Después se añade 5  $\mu$ L de la solución de rodamina 123 1:10 por pocillo siendo la concentración final de 5  $\mu$ g/mL. Se dejan algunos pocillos sin solución de rodamina 123 como control blanco. La placa se coloca en una estufa de incubación a 37 °C protegida de la luz y se incuba durante 1 hora. Finalizada la incubación se saca el contenido de la placa y se hacen dos lavados con 100  $\mu$ L de medio de incubación. Se realiza la lectura a las longitudes de onda de excitación 485 y de emisión 530.

Los resultados se calculan según:

$$\text{Porcentaje relativo de acumulación de rodamina 123: } \frac{R-R_0}{R_0} * 100$$

Donde R es la fluorescencia del pocillo y  $R_0$  es el valor promedio de los pocillos control.

## 5. MÉTODO DE MEDIDA DE LA CAPTACIÓN DE GLUTAMATO

---

### 5.1 DETERMINACIÓN DE LA CAPTACIÓN DE $[^3\text{H}]$ GLUTAMATO EN ASTROCITOS

---

Para determinar la captación de glutamato se utilizó una técnica radiactiva con glutamato tritiado en cultivo de astrocitos en placas de 96 pozos.

En algunos experimentos los cultivos de astrocitos fueron preincubados con concentraciones de 0-1000  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 30 minutos antes de realizarse la determinación de captación de glutamato; también se observó el efecto de antioxidantes preincubando los cultivos de astrocitos con antioxidantes como el propilgallato (50  $\mu\text{mol/L}$ ), trolox (100  $\mu\text{mol/L}$ ) y curcumina (10  $\mu\text{mol/L}$ ) durante 30 minutos en los que también estuvieron expuestos a peróxido de hidrógeno.

Se preparan las siguientes soluciones:

- Solución salina tamponada con HEPES-2 (SSTH2): 136 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1.0 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM HEPES, 9 mM glucosa a pH 7.3.
- Solución de glutamato tritiado: glutamato tritiado 9.8 nM (500 nCi/mL) en SSTH2.
- Soluciones de glutamato frío: soluciones de 2000, 1000, 500, 250, 100, 50, 10, 5, 1  $\mu\text{M}$  de ácido glutámico en SSTH2.

Sacamos la placa del cultivo de astrocitos del incubador y se elimina el medio de cultivo por aspiración. Se realiza un lavado con 100  $\mu\text{L}$  de SSTH2 caliente. Se saca el tampón SSTH2 por aspiración y se añaden las soluciones atemperadas a 37 °C de glutamato frío y tritiado. Se incuba en el baño a 37 °C durante 10 minutos con agitación. Después se recoge el medio de incubación con una pipeta multicanal. Para eliminar el glutamato tritiado no captado se hacen tres lavados con 100  $\mu\text{L}$  de SSTH2 frío. Finalmente el medio de incubación y los lavados se mezclan con 5 mL de líquido de centelleo (Optiphase "Hisafe 2") y la radioactividad se mide en un espectrómetro en centelleo líquido. Las células se digieren añadiendo 70  $\mu\text{L}$  de NaOH 0.2 N y se deja toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se deja la placa durante 4 horas en agitación orbital. Se determina las proteínas en 15  $\mu\text{L}$  y el resto de solución se cuenta su radiactividad en 5ml de líquido de centelleo. Para determinar la concentración de proteínas se sigue el método de Bradford. Se prepara una solución patrón de albumina sérica bovina de 90  $\mu\text{g/mL}$  y se realiza una curva patrón con las siguientes concentraciones 0, 0.9, 2.25, 4.5, 6.75, 9 y 13.5  $\mu\text{g}$  en 150  $\mu\text{L}$  de agua y 50  $\mu\text{L}$  de NaOH 0.2N. A 15  $\mu\text{L}$  de las muestras se le añaden 185  $\mu\text{L}$  de agua. Se pipetea todas las soluciones en una placa de 96 pocillos y se le añaden a todos 50  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford. Se agitan todos los pozos con una pipeta multicanal. Se espera 30 minutos y se lee la placa en el espectrofotómetro a 595nm.

## 6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN-BLOT

---

### 6.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

---

Se prepara la siguiente solución:

- Tampón RIPA (de *ristocetin-induced platelet agglutination buffer*) compuesto por 0.1 % duodecil sulfato sódico (SDS), 0.5% deoxicolato sódico, 1% Igepal AC-630 disuelto en 10 mM de PBS.

Además se le añade el coctel de inhibidores de proteasas (Complete; Boehringer Mannheim) y el inhibidor de fosfatasas ortovanadato de sodio (NaVa) a 1 mM.

Tras sacar los cultivos en flascos del incubador se agitan en la estufa a 150 rpm durante 4 horas para eliminar el máximo de células microgliales. Para obtener los extractos celulares, se aspira el medio de cultivo y se hacen dos lavados con PBS frío. Se añade directamente al flascón el tampón RIPA que contiene detergentes que lisarán la membrana celular y que lleva un coctel de inhibidores de proteasas que impedirán la degradación de la muestra. Se deja el flascón 10 minutos en hielo y después se deshace con una pipeta Pasteur. Se comprueba en el microscopio que esté todo disgregado. Se recoge el lisado con un rascador y una pipeta Pasteur en un eppendorf que se mantiene en hielo. Se congelan las muestras a -20 °C. Cuando vayan a utilizarse las muestras se descongelarán y se sonificarán durante 10 segundos para obtener una solución homogénea.

### 6.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

---

La determinación de la concentración de proteínas se hace siguiendo el método de Bradford descrito en 1976. El reactivo de Bradford (Coomassie Brilliant Blue G-250) cambia su máximo de absorción desde 465 nm a 595 nm cuando interacciona con los enlaces peptídicos.

Las soluciones que se usan en este ensayo son:

- BioRad Protein Assay (Biorad)
- Solución BSA: Albumina de suero bovina a 0.2 mg/mL

A partir de la solución madre de BSA se prepara una curva patrón con diferentes concentraciones conocidas de BSA (1-20 µg/mL) en agua Milli-Q. Las muestras se preparan mezclando 5 µL del extracto proteico con 795 µL de agua. Finalmente se añade 200 µL de reactivo de Bradford, se agita y se incuban durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación se transfieren 200 µL a una placa de 96 pozos y se mide la absorbancia a 595 nm. La concentración de proteínas de

cada muestra se calcula interpolando el valor de la absorbancia de cada muestra en la recta patrón de BSA que se prepara en cada ensayo.

### 6.3 WESTERN-BLOT

El método de Western-Blot se utiliza para detectar la expresión o modificación de proteínas específicas a partir de un extracto proteico. El primer paso es separar las proteínas según su peso molecular mediante un gel de electroforesis. A continuación, las proteínas se transfieren a una membrana de PVDF (de *Polyvinylidene fluoride*). La membrana se incuba con un anticuerpo específico para la proteína que se quiere detectar (anticuerpo primario) (Figura 44). Después de lavar la membrana para eliminar el exceso de anticuerpo primario, la membrana se expone a otro anticuerpo que reconocerá la porción específica de la especie presente en el anticuerpo primario. Cuando la detección se hace por quimioluminiscencia, el anticuerpo secundario lleva unido un enzima peroxidasa que se utiliza en conjunción con un agente luminiscente y la reacción produce luminiscencia en proporción a la cantidad de proteína. Se hace contactar un film fotográfico con la membrana y la exposición crea una señal. La intensidad de la señal se cuantifica por densitometría.

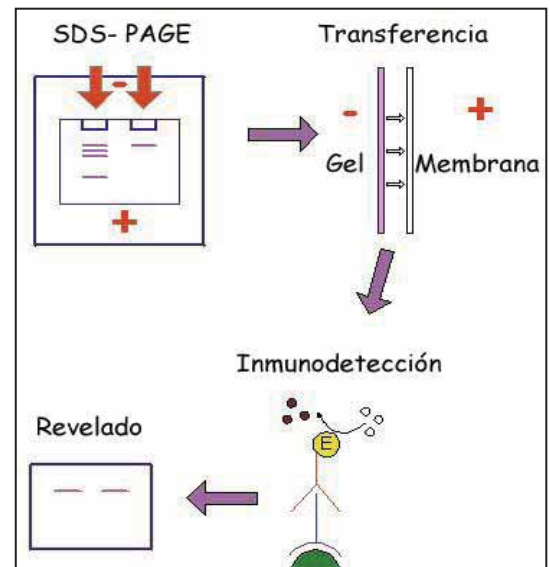
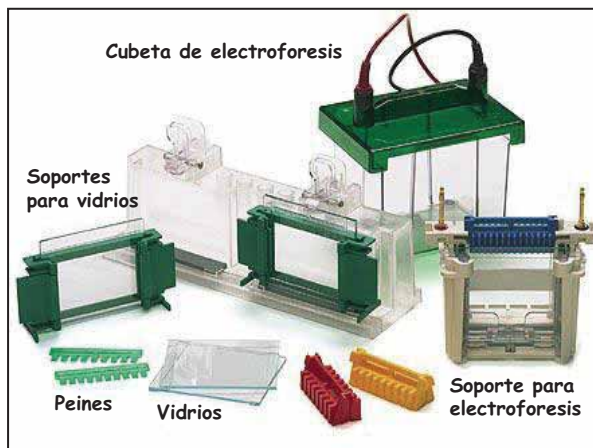


Figura 44: Componentes y esquema de Western-Blot.

Las soluciones que se preparan para esta técnica son las siguientes:

- Solución 1: 0.75 M Tris-base, pH 8.8 con HCl, 0.2% dodecilo sulfato de sodio (SDS)
- Solución 2: 30% Acrilamida /Bis solución, 37,5:1 (BioRad)
- Solución 3: 0.25 Tris base, ajustar a pH 6.8 , 0.2% SDS en agua Milli-Q
- Persulfato amónico (PSA): 13% de persulfato amónico.
- TEMED: TEMED (Sigma).
- Tampón electrolito: 25 mM Tris-base, 192 mM glicina en agua destilada, 0.1 % SDS.
- Tampón de transferencia: 25 mM Tris-base, 192 mM glicina, 20% v/v metanol en agua destilada.
- Tampón de carga: 0.5 M NaPi (pH7)= 0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>+ 0.5 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20% glicerol, 4% SDS, 10% DTT (2,4-ditiotreitol), 0.05% de azul de Bromofenol en agua destilada.
- Tampón T-TBS: 0.02M Tris HCl, ajustar a pH7.5, 0.150 M NaCl, 0.05% Tween 20 en agua destilada.
- Solución de luminol: 1.25 mM Luminol Na, 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.1M Tris HCl, ajustamos el pH a 8.6.
- Solución *Enhancer*: 11 mg ácido P-OH-cumárico en 10 ml de DMSO.

### 6.3.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Después de determinar la concentración de proteínas, se calcula el volumen de la muestra necesario para cargar 15-30 µg de proteína. Las muestras con el tampón de carga se hacen hervir a 100 °C durante 5 minutos para desnaturalizar totalmente las proteínas.

### 6.3.2 SDS-PAGE (SDS *PoliAcrylamide Gel Electrophoresis*)

En los geles de acrilamida con SDS, las proteínas se mantienen desnaturalizadas. El SDS se une a las proteínas, las despliega y les confiere carga negativa. Durante la electroforesis, las proteínas migraran hacia el electrodo positivo. Las proteínas pequeñas avanzan más rápidamente a través de la malla de acrilamida, de manera que las proteínas quedan separadas según su peso molecular. El porcentaje de acrilamida determina la resolución del gel, una mayor concentración de acrilamida permitirá separar mejor las proteínas de bajo peso molecular.

Para hacer la electroforesis se ha utilizado el kit Mini-Protean de BioRad (Figura 44). Se preparan dos geles, un gel separador y, por encima, un gel apilador (stacking) con poros grandes de poliacrilamida (4%). El gel apilador se prepara a pH 6.8, dos unidades de pH por debajo del tampón de electroforesis. Haciendo correr la muestra en estas condiciones se consigue que las proteínas se agrupen y entren en el gel separador a la vez. Los geles se preparan según la tabla 5.

	6%	8%	10%	12%	15%	stacking
<b>Solución 1</b>	4mL	4mL	4mL	4mL	4mL	-
<b>Solución 2</b> (acrilamida 30%)	1'6mL	2'16mL	2'68mL	3'2mL	4ml	0'225ml
<b>Solución 3</b>	-	-	-	-	-	0'975 ml
<b>Agua</b>	2'4 mL	1'84 mL	1'32 mL	0'8mL	-	0'775 mL
<b>TEMED</b>	10µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	5 µL
<b>PSA</b>	40 µL	40 µL	40 µL	40 µL	40 µL	20 µL
<b>Volumen Total</b>	8mL	8mL	8mL	8mL	8mL	2ml

**Tabla 5: Preparación de geles de acrilamida a diferentes concentraciones.**

Una vez el gel ha polimerizado se colocan en la cubeta de electroforesis que se llena con el tampón de electroforesis 1X. Las muestras se cargan en los pozos del gel con la jeringa Hamilton. Reservamos un carril para cargar el marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Standards, BioRad). Se conecta la cubeta a la fuente de electroforesis y las proteínas se hacen correr a 100 vatios hasta que se observa que el frente llega al final del gel. El tampón de carga lleva un colorante, el azul de Bromofenol para poder observar el avance del frente.

### 6.3.3 TRANSFERENCIA POR ELECTROBLOTTING

Para que las proteínas sean accesibles a la detección con el anticuerpo se transfieren desde el gel a una membrana de PVDF (Immobilon, Millipore). El gel de acrilamida se pone en contacto con la membrana y mediante el paso de corriente las proteínas migran hacia la membrana, manteniendo la misma organización que tenían en el gel. Para que las proteínas queden unidas a la membrana es necesario activarla. La activación de la membrana de PVDF se realiza 2 minutos en metanol, y un minuto en tampón de transferencia hasta que se equilibra. Montamos la transferencia poniendo las esponjas, el papel Whatman, el gel y la membrana en contacto. La transferencia se hace a 100 vatios durante 90 minutos.

### 6.3.4 INMUNOBLOT

La membrana se activa durante 3 minutos en metanol y se hacen dos lavados de 10 minutos con T-TBS. La membrana se incuba durante una hora con solución de bloqueo de uniones inespecíficas que consta de T-TBS con 5% BSA y 5% de leche en polvo a temperatura ambiente. A continuación se realizan otros dos lavados de 10 minutos con T-TBS. La membrana se incuba con el anticuerpo primario diluido en T-TBS y 1% de leche en polvo durante toda la noche en agitación a 4°C. Al día siguiente se hacen dos lavados de 10 minutos con T-TBS para eliminar el exceso de anticuerpo. A continuación la membrana se incuba con el anticuerpo secundario unido al



enzima peroxidasa diluido en T-TBS y 1% de leche en polvo. Finalmente se realizan varios lavados con T-TBS.

### 6.3.5 DETECCIÓN POR QUIMIOLUMINISCENCIA

La membrana se incuba con 2 mL de solución luminol y 40  $\mu$ L de solución *enhancer* durante un minuto. La detección de la luz producida por la reacción de la peroxidasa se realiza poniendo en contacto la membrana con una película fotográfica dentro de un casete.

### 6.3.6 ANÁLISIS POR DENSITOMETRÍA

El análisis de la densidad de las bandas se ha realizado utilizando el software Quantity One (BioRad). Los valores se expresan como la ratio entre la densidad de la banda de la proteína en estudio y la densidad de una proteína control de carga como la  $\beta$ -tubulina o actina.

Anticuerpo primario	Dilución	Isotipo	Casa comercial
<b>GFAP</b>	1:40000	Mouse monoclonal	Sigma
<b>S100<math>\beta</math></b>	1:500	Mouse monoclonal	Sigma
<b>iNOS</b>	1:200	Rabbit polyclonal	Chemicon International
<b>SOD-1</b>	1:1000	Sheep polyclonal	Calbiochem
<b>Nitrotyrosine</b>	1:1000	Mouse monoclonal	Abcam
<b><math>\alpha</math>-actina/<math>\beta</math>-actina</b>	1:10000	Mouse monoclonal	Stressgen Bioreagents
<b>HO-1</b>	1:1000	Mouse monoclonal	Stressgen Bioreagents
<b>GLAST</b>	1:500	Rabbit polyclonal	Alpha Diagnostic Inter.
<b>Tau p[Ser<sup>199</sup>]</b>	1:2000	Rabbit polyclonal	Biosource International
<b>Tau p[Ser<sup>396</sup>]</b>	1:2000	Rabbit polyclonal	Biosource International
<b>Pan-Tau</b>	1:2000	Rabbit polyclonal	Biosource International
<b>Gsk3<math>\beta</math> [Tyr<sup>216</sup>]</b>	1:1000	Rabbit polyclonal	Bioreagents
<b>Gsk3<math>\beta</math> [Ser<sup>9</sup>]</b>	1:1000	Rabbit polyclonal	Bioreagents
<b>Cdk5</b>	1:1000	Rabbit polyclonal	Santa Cruz Bio.
<b>p35</b>	1:1000	Rabbit polyclonal	Santa Cruz Bio.
<b>p25</b>	1:1000	Rabbit polyclonal	Santa Cruz Bio.

Tabla 5: Anticuerpos primarios usados en los experimentos de Western Blot.

Anticuerpo secundario	Dilución	Casa comercial
Anti- mouse Ig peroxidase linked antibody	1:2000	Sigma Chemical
Anti- rabbit Ig peroxidase linked antibody	1:2000	Sigma Chemical
Anti- sheep Ig peroxidase linked antibody	1:2000	Sigma Chemical

Tabla 6: Anticuerpos secundarios usados en los experimentos de Western Blot.

## 7. PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS

### 7.1 INFUSIÓN INTRACRANEAL AGUDA

La infusión intracraneal se ha realizado en dos estudios de esta tesis, en uno se ha administrado un vector viral en el hipocampo de ratas viejas y en el otro se ha administrado hTGFβ1 (de *human Transforming growth factor beta 1*) en el tálamo de ratas adultas. Primero se las anestesió intraperitonealmente con 10 mg/kg de xilacina (Rompún 2%, Bayer) y con 80 mg/kg de ketamina (Ketolar 50mg/mL, Pfizer). La infusión intracraneal se realizó con la ayuda de un aparato de estereotaxia. Para fijar el cráneo del animal se requiere insertar una barra en cada conducto auditivo externo, y para conseguir una absoluta inmovilización de la cabeza se fijan los incisivos superiores en un dispositivo horizontal (barra de incisivos) (Figura 45). Una vez colocado apropiadamente el animal en el aparato estereotáxico y usando como punto de referencia el *Bregma* (puntos de corte de la sutura longitudinal y la primera sutura transversal del cráneo), se puede localizar cualquier estructura anatómica del cerebro mediante el cálculo de sus coordenadas estereotáxicas registradas en un atlas estereotáxico. Para cada área cerebral, el atlas proporciona medidas exactas en las tres direcciones del espacio (antero-posterior AP, medio-lateral LL y dorso-ventral DV) con respecto a los puntos estereotáxicos de referencia.

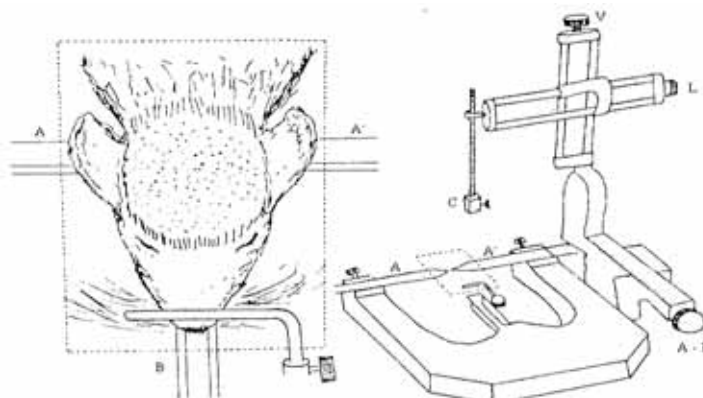
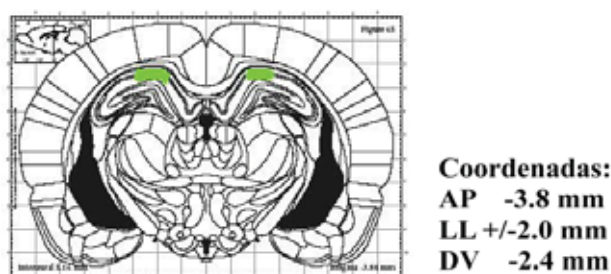


Figura 45: Representación esquemática de la colocación del animal en el aparato estereotáxico.

Una vez anestesiado el animal, se coloca en el aparato de estereotaxia con una manta térmica y se practica un corte longitudinal en la piel del cráneo separando la piel con pinzas bulldog de los laterales del cráneo. Tomando como punto de referencia el *Bregma* y empleando el atlas de anatomía de la rata de Paxinos y Watson (1986), se establecen las coordenadas bilaterales del punto exacto de infusión para introducir la cánula de acero inoxidable de 25 G. En el estudio de inyección de vectores virales las coordenadas del área CA1 del hipocampo para la infusión son AP = -3,8; LL= +/-2,0 y DV = -2,4 mm (Figura 46). En el estudio sobre el péptido betamieloide, las coordenadas para inyectar hTGF $\beta$ 1 bilateralmente en el tálamo son AP= -2.1 mm; L-L=  $\pm$  1.4 mm y DV= -4.6 mm. Una vez establecidas las coordenadas, se accede a ese punto practicando un pequeño orificio en el cráneo del animal sin romper la duramadre, se llena la cánula con la solución a inyectar y se introduce hasta la profundidad de la coordenada vertical, teniendo en cuenta el espacio que queda entre el cráneo y la corteza cerebral. La cánula está unida a una jeringa Hamilton llena de PBS y colocada en una bomba de microinfusión (Bioanalytical system INC, West Lafayette) a través de un tubo de Teflon. Una vez colocada la cánula se pone en marcha la bomba y se realiza la infusión. Después de parar la bomba se espera 5 minutos sin mover la cánula para evitar el reflujo de la solución. Se procede de la misma forma para la infusión bilateral de la solución. A continuación se cose la herida con seda trenzada (Lab Aragón) y se aplica yodo.



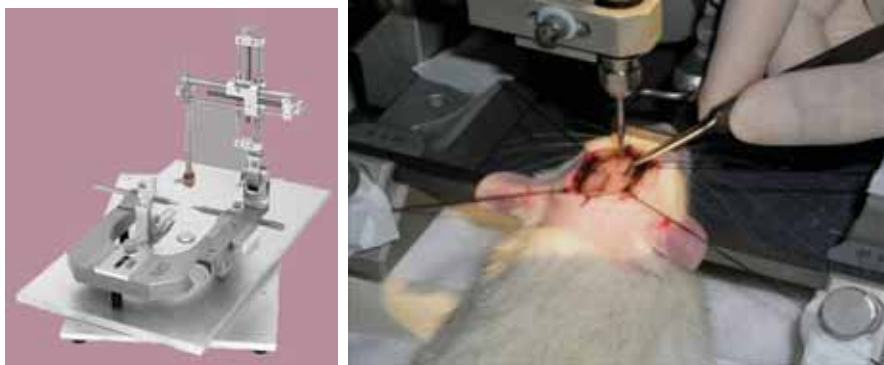
**Figura 46: Sección transversal marcando en verde la zona de infusión en CA1 del hipocampo de la ratona en el experimento de infusión de un vector viral. Paxinos & Watson, 1986.**

## 7.2 INFUSIÓN CRÓNICA INTRACEREBROVENTRICULAR CON MINIBOMBAS OSMÓTICAS

---

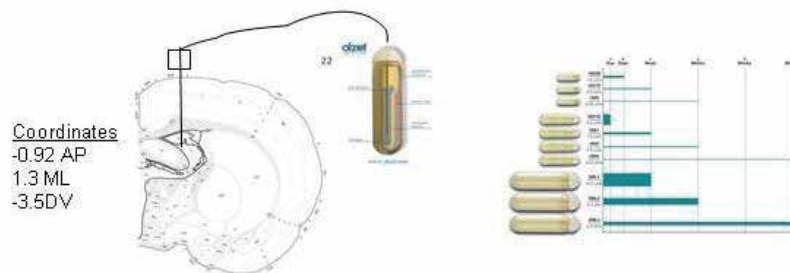
El día anterior al implante de las bombas Alzet, se realiza la dilución del péptido amiloide y el resto de los componentes para rellenar la bomba. Se rellena la bomba y se monta con el kit de infusión intracerebral de Alzet que se sumerge en un vaso de precipitados con salino y se introduce en una estufa a 37 °C durante toda la noche. El día de la cirugía las ratas se anestesian intraperitonealmente con 10 mg/kg de xilacina (Rompún 2%, Bayer) y con 80 mg/kg de ketamina (Ketolar 50mg/mL, Pfizer). Los animales se colocan con una manta térmica en el aparato estereotáxico y se realiza una incisión con el bisturí sobre la piel del cráneo hasta el cuello dejando

despejado el hueso. Se separa la piel de los laterales del cráneo con pinzas bulldog. Se miden las coordenadas del bregma y se realizan los agujeros (Figura 47).



**Figura 47: Procedimiento quirúrgico con el aparato estereotáxico.**

Las bombas osmóticas Alzet se colocan entre las regiones escapulares de las ratas y la cánula se implanta estereotáxicamente en el ventrículo lateral derecho cuando solo hay que implantar una bomba y en ambos ventrículos si se han de implantar dos, según las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson: AP:-0.9 mm; LL=  $\pm$  1.3 mm y DV= -3.5 mm hasta la duramadre (Figura 48). La cánula intracerebral se fija con cemento dental y tornillos en el cráneo y después se cose la herida con seda trenzada y se aplica yodo. Al final del experimento, las bombas se extraen y se comprueba el correcto funcionamiento, observando que todo su contenido ha sido administrado y que la bomba está intacta.



**Figura 48: Esquema de las bombas Alzet y su implantación intraventricular.**

## 8. PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO

### 8.1 LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS

Las pruebas de comportamiento para la memoria espacial y el aprendizaje se han llevado a cabo en un laberinto acuático descrito por Morris en 1981. Estas pruebas se han realizado en el laboratorio animal de Psicología en el campus Mundet de la UB, utilizando el equipo construido según detalla Chamizo et al., 2006. La piscina es circular de 1.60 m de diámetro y se vuelve opaca

tras añadir 100 mL/L de látex. La temperatura del agua se mantiene a  $22 \pm 1$  °C. Unas cortinas negras envuelven la piscina. Dentro del entorno de la piscina se ponen cuatro claves dispuestas en ángulos de 90° entre ellos: A) una luz fija de 40W, B) una pelota de playa, C) una estructura vertical de cubos blancos y D) tres botellas de 1.5 L envueltas con papel de aluminio (Figura 49). Dentro de la piscina hay una plataforma circular de 0.11 m sumergida 1 cm de la superficie y a 0.38 m de los laterales. Las claves y la plataforma son rotadas a las posiciones de 90°, 180°, 270° y 360° en cada ensayo para asegurarnos de que el animal se guía por estas claves para encontrar la plataforma. Un circuito cerrado de video registra los movimientos de cada animal y se analizan en el ordenador. Dependiendo del experimento se han realizado diferentes números de ensayos antes de realizar las pruebas de retención (ver resultados). Previo a los estudios se han realizado pruebas de entrenamiento con la plataforma visible o no, que consisten en 8 ensayos durante dos días pero sin colocar las claves en la piscina. En el entrenamiento las ratas tienen 90 segundos para localizar la plataforma y después se las deja 30 segundos en ella antes de sacarlas. Para los test de adquisición se colocan las claves en la piscina y se hacen ensayos de escape en las que el animal tiene 90 segundos para nadar y encontrar la plataforma sumergida que estaba entre dos claves (por ejemplo entre A y B). Cada animal realiza 4 ensayos de escape al día, un número determinado de días según cada experimento y según la latencia de escape durante la fase de adquisición se mira como va aprendiendo el animal. Después se realiza la prueba de retención de 60 segundos donde se hace nadar al animal en la piscina pero sin plataforma y se mide el tiempo que nada en el cuadrante correcto donde debía de estar localizada la plataforma. En uno de los estudios después de estas pruebas de comportamiento y previa comprobación de la extinción de la memoria previa se realizan las pruebas de inversión para estudiar la capacidad del animal de volver a aprender algo distinto de lo aprendido anteriormente. La inversión consiste en cambiar la plataforma de lugar es decir si antes estaba entre las claves A y B, se coloca en la inversión entre C y D y se realiza el mismo proceso de adquisición con ensayos de escape y las posteriores pruebas, analizando el tiempo que el animal nada en el cuadrante correcto.



**Figura 49: Laberinto acuático de Morris. S García Matas.**

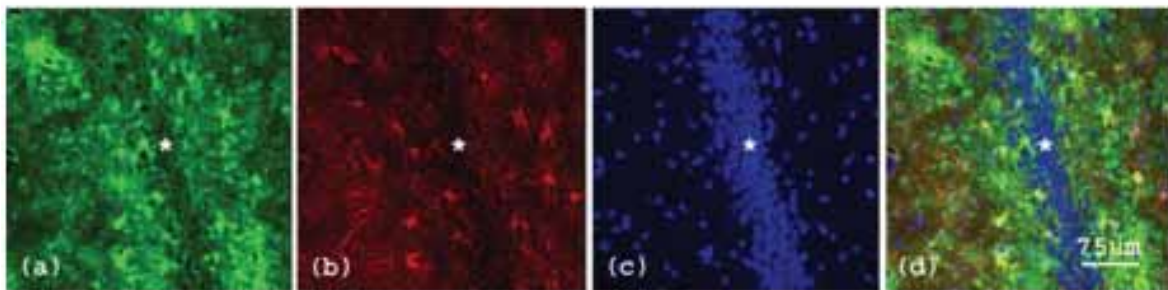
## 9. DISECCIÓN DEL CEREBRO E HISTOLOGÍA

### 9.1 DISECCIÓN DEL CEREBRO PARA CORTES DE CRIOSTATO

Después de realizar las pruebas de comportamiento con las ratas inyectadas con lentivirus, los animales se anestesian con 40 mg/kg de ketamina ip y se decapitan. A continuación se extraen los cerebros y se sumergen en una solución salina fría y se colocan en un bloqueador de cerebro Kopf. El cerebro se corta en tres bloques y luego se secciona sagitalmente por la línea media. El bloque que contiene el hemiserebro con el hipocampo dorsal se fija por inmersión en 10% de formaldehído disuelto en tampón fosfato y se crioprotege con 10%-30% de sacarosa en tampón fosfato. Después se congela en una placa metálica sobre hielo seco. Finalmente se realizan cortes de 16  $\mu\text{m}$  con un criostato (Microm) que se colocan sobre portaobjetos histogripados.

### 9.2 HISTOLOGÍA PARA CORTES DE CRIOSTATO

Los cortes de criostato se dejan secar. Para el bloqueo de uniones inespecíficas los cortes se incuban con una solución de 10% de suero de cabra, 1% de gelatina y 0.2% de Tritón X-100 durante 2 horas a 22°C. Después se incuban con los anticuerpos primarios: anti-GFAP monoclonal 1:400 (clone GA5, Sigma) y anti GFP (de *Green fluorescence protein*) policlonal 1:1000 (Abcam), disueltos en la solución anterior durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se hacen tres lavados de 5 minutos en PBS a temperatura ambiente. A continuación los cortes se incuban con los anticuerpos secundarios: antimouse Alexa fluor 546 rojo 1:1000 (Molecular Probes) para GFAP y antirabbit Alexa Fluor 488 verde 1:1000 (Molecular Probes) para GFP, en la solución de bloqueo a 22°C. Después se hacen dos lavados de 5 minutos con PBS a temperatura ambiente. Los cortes se sumergen en una solución de bisbenzimidá 5  $\mu\text{M}$  en PBS durante 20 minutos para teñir los núcleos de las células. Se hacen dos lavados de 5 minutos en PBS y los cortes se montan con cubreobjetos en Mowiol.



**Figura 50:** Tinción de GFP en verde, GFAP en rojo y núcleos azules con bisbenzimidá. Zona CA1 del hipocampo, \* capa de neuronas piramidal. Microscopía confocal. S García Matas.

### **9.3 DISECCIÓN DEL CEREBRO PARA CORTES DE MICROTOMO**

---

#### **9.3.1 SACRIFICIO Y PERFUSIÓN DE LOS ANIMALES**

Después de realizar las pruebas de comportamiento con las ratas con implante de bombas intraventriculares, los animales se anestesian intraperitonealmente con 80 mg/kg ketamina y 10mg/kg xilacina como relajante muscular. A continuación se colocan los animales en decúbito supino con sus extremidades extendidas y sujetas y se hace una incisión en la zona terminal del esternón cortando las costillas y separándolas. Se introduce una cánula en el ventrículo izquierdo del corazón hasta la aorta y se sujeta con hilo de sutura. Se perfunde el animal con 100 mL de 0.9% de salino con heparina a 37°C (100 UI/100mL) y después con 50 mL de 0.9 % salino a 37 °C mediante una bomba de perfusión para limpiar la sangre del sistema circulatorio, cortando las venas yugulares por donde saldrá el líquido perfundido. Después se perfunde el animal con 200 mL de formaldehído en tampón fosfato. Una vez el animal está suficientemente rígido los cerebros se extraen del cráneo, se cortan en bloques de 4 mm en el Stoelting Tissue Slicer y se colocan en casetes de biopsia para la posfijación en parformaldehído durante 24 horas a 4°C. Al día siguiente los casetes se lavan con tampón fosfato 0.01M pH 7.4 y después con agua a temperatura ambiente.

#### **9.3.2 DESHIDRATACIÓN E INCLUSIÓN DE LOS BLOQUES**

Los casetes con los bloques de cerebro se introducen en la máquina automática de inclusión en parafina (Shandon). El programa es el siguiente: dos lavados de 1 hora de agua corriente, dos lavados de 30 minutos de etanol al 70 %, dos lavados de 30 minutos de etanol al 96%, dos lavados de 30 minutos de etanol al 100%, dos lavados de 30 minutos de xilol y dos baños en parafina de 45 minutos. Una vez ejecutado el programa se extraen los casetes del incluso y se dejan en el baño de parafina caliente hasta hacer los bloques de parafina. Para hacer los bloques de parafina se cogen los moldes de acero inoxidable, se colocan los bloques y se dispensa la parafina líquida hasta rellenar el molde. Después se pone la tapa del casete y se deja enfriar en una placa fría. Cuando la parafina se ha solidificado se extrae el bloque embebido en parafina del molde.

#### **9.3.3 CORTES EN MICROTOMO**

Los bloques de parafina se cortan en el micrótopo (Leica) en cortes de 5-7  $\mu\text{m}$  y se montan en portaobjetos histogripados (Zymed).

### **9.4 HISTOLOGÍA PARA CORTES DE MICROTOMO**

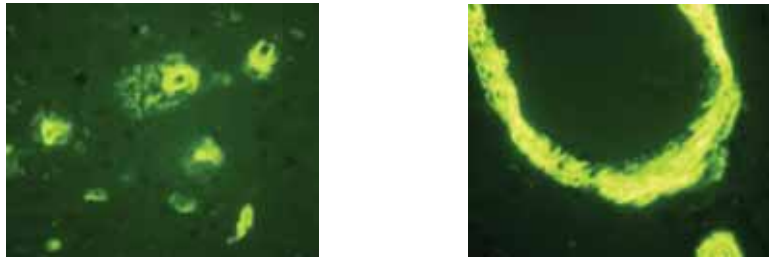
---

#### **9.4.1 TINCIÓN CON TIOFLAVINA**

La tinción con tioflavina nos permite visualizar los depósitos de A $\beta$ . Los cortes de parafina se desparafinan con tres lavados de 5 minutos de xilol y se hidratan. La hidratación se realiza siguiendo los siguientes pasos: dos lavados de 5 minutos con etanol 100°,

dos lavados de 5 minutos con etanol de 95°, dos lavados de 5 minutos con etanol de 70° y un lavado de 5 minutos con agua a temperatura ambiente.

Los cortes hidratados se sumergen primero en la solución fresca de tioflavina (Sigma) al 1% en agua destilada durante 8 minutos a temperatura ambiente y después en una solución de alcohol al 70% durante 6 minutos. Se hacen dos lavados de dos minutos en agua destilada. Finalmente los cortes se montan con los cubreobjetos en Mowiol (Figura 50).



**Figura 51: Tinción con tioflavina de acúmulos de betamieloide en el cerebro de rata. Objetivo de 40 X. S García Matas.**

#### 9.4.2 TINCIÓN CON FLUROJADE

La tinción con flurojade-B nos permite teñir las neuronas en degeneración (Schmued & Hopkins, 2000) y los astrocitos y microglía reactiva (Damjanac et al., 2007).

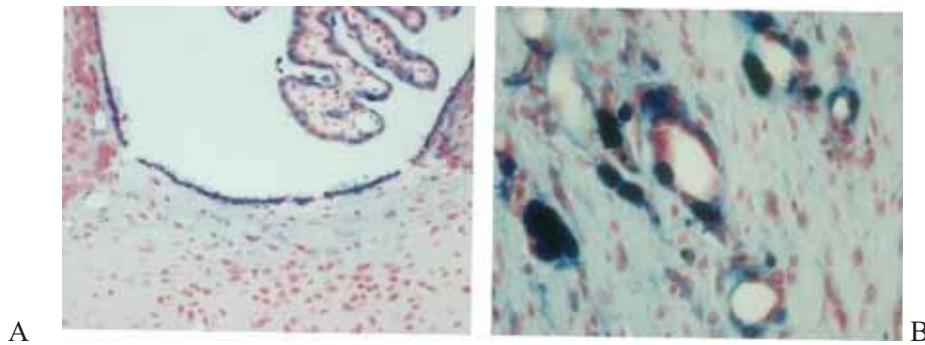
Una vez desparafinados e hidratados los cortes de tejido cerebral se sumergen en una solución de permanganato potásico 0.06% durante 10 minutos en agitación. Después se prepara la solución de tinción preparando una solución stock de Fluoro-Jade B 0.01% y una solución de ácido acético 0.1 % en agua milliQ. La solución de tinción de Fluoro- Jade B se prepara mezclando 4% solución stock en la solución de ácido acético. Los cortes se tiñen durante 20 minutos en la solución de tinción. A continuación se realizan tres lavados de un minuto en agua destilada. Se secan los cortes en una estufa a 50 °C durante 30 minutos. Se deshidratan los portaobjetos en xileno durante 5 minutos y se montan en DPX (Fluka).

#### 9.4.3 TINCIÓN PERLS' PRUSSIAN BLUE

Esta tinción nos permite teñir el hierro depositado en el tejido.

Se desparafinan e hidratan los cortes de tejido cerebral y se lavan en agua miliQ. A continuación se incuban los cortes durante 20 minutos en una solución mezcla a partes iguales de 2% potasio ferrocianido en agua milliQ y 2% de ácido hidroclicórico en agua milliQ. Posteriormente se lavan los cortes en agua milliQ. Finalmente se contrasta la tinción con una solución de neutral red que consta de 1% neutral red 1% ácido acético en agua milliQ. Se deshidratan los cortes con concentraciones descendientes de alcoholes y xilol y se montan en DPX.





**Figura 52: Tinción con PERLS y neutral red de a) ventrículo (Objetivo de 10 X) y b) septo (Objetivo de 40X) de rata tratada con A $\beta$ +BSO+Fe intraventricularmente. S García Matas**

#### 9.4.4 HISTOQUÍMICA CON LECTINA DE TOMATE

Se desparafinan e hidratan los cortes de tejido. Se procede a bloquear las peroxidases endógenas a temperatura ambiente mediante la inmersión de los cortes en una solución de bloqueo que consta de 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 30% metanol en PBS durante 15 minutos. Después se realizan tres lavados de 5 minutos en PBS. Posteriormente se realiza el tratamiento enzimático para permeabilizar el tejido a temperatura ambiente: primero se sumergen los cortes en una solución de 0.05% de saponina fresca en PBS durante 30 minutos. A continuación se hace un lavado de 5 minutos en PBS y después otro de 5 minutos en 0.2% Tritón X-100 en PBS. Al final del tratamiento se realizan dos lavados de 1 minuto en PBS.

Para la reacción histoquímica se realiza la incubación del tejido en 2.5  $\mu$ g/ mL de lectina de *Lycopersicon esculentum* biotinilada en 0.2% gelatina y 0.2% Tritón X-100 en PBS toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se hacen tres lavados de 5 minutos de los portaobjetos en 0.2% Tritón X-100 en PBS para eliminar los restos de lectina de tomate. Finalmente se aplica la solución ABC según las instrucciones del kit Vectastin (Vector laboratorios) y se revelan con diaminobenzidina tal como se explica en el apartado siguiente. Los cortes son deshidratados y se montan en DPX.

#### 9.4.5 INMUNOHISTOQUÍMICA

Una vez desparafinados e hidratados los cortes de tejido cerebral se sumergen en una solución de citrato 1.25 % pH6 (Zymed) en agua destilada. Los cortes se autoclavan inmersos en esta solución durante 5 minutos a 120 °C para exponer los epítomos.

A continuación se procede a bloquear las peroxidases endógenas a temperatura ambiente mediante la inmersión de los cortes en una solución de bloqueo que consta de 1 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 30 % metanol en PBS durante 15 minutos. Después se realizan tres lavados de 5 minutos en PBS.

Posteriormente se realiza el tratamiento enzimático para permeabilizar el tejido a temperatura ambiente: primero se sumergen los cortes en una solución de 0.05 % de saponina fresca en PBS durante 30 minutos. A continuación se hace un lavado de 5 minutos en PBS y después otro de 5

minutos en 0.2 % Tritón X-100 en PBS. Al final del tratamiento se realizan dos lavados de 1 minuto con PBS.

Después se hace el bloqueo de uniones inespecíficas a temperatura ambiente. Se prepara una solución con gelatina diluyendo 0.2 % gelatina y 0.2 % Tritón X-100 en PBS y con esta preparamos la solución de bloqueo de uniones inespecíficas, diluyendo 5 % del suero del animal en que se ha hecho el anticuerpo secundario en la solución con gelatina. Se aplica la solución de bloqueo sobre cada corte de tejido y se tapa con un plástico de la medida del portaobjetos. Se incuban los cortes con la solución de bloqueo durante 2 horas.

A continuación se realiza la incubación con el anticuerpo primario. Los anticuerpos monoclonales y policlonales se diluyen según la tabla 7 en 1 % suero de caballo (Vector) o 1% suero de cabra (Vector) respectivamente en la solución de gelatina. Se aplica la solución con el anticuerpo primario sobre el corte de tejido y se tapa con un plástico. Finalmente, los cortes se incuban dentro de una cámara húmeda de NUNC durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se hacen tres lavados de 5 minutos de los portaobjetos en 0.2% Tritón X-100 en PBS para eliminar los restos de anticuerpo primario.

Posteriormente se hace la incubación con el anticuerpo secundario biotinilado. Los cortes que se han incubado con anticuerpos monoclonales primarios se incuban en la solución con anticuerpo secundario biotinilado antimouse hecho en caballo (dilución 1:200) en 1 % de suero de caballo en solución de gelatina. Si los cortes se han incubado con anticuerpos policlonales se incuban en la solución con anticuerpo secundario biotinilado antirabbit hecho en cabra (dilución 1:200) en 1% suero de cabra en solución de gelatina. Se aplica la solución de bloqueo sobre cada corte de tejido del portaobjetos y se tapa con un plástico. Se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se saca el plástico y se sumergen los portaobjetos en 0.2% Tritón X-100 en PBS haciendo 3 lavados de 5 minutos a temperatura ambiente.

A continuación se hace la incubación con el complejo avidina- biotina-peroxidasa de rábano. Se prepara la solución ABC de Vectastin 30 minutos antes de su uso y se mantiene a 4°C protegida de la luz: se diluye 1/100 de solución A + 1/100 de solución B en el suero en el que se ha hecho el anticuerpo secundario en solución de gelatina. Se aplica la solución ABC sobre cada corte de tejido y se tapa con un plástico. Se incuba la solución durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se sacan los plásticos y se sumergen los portaobjetos en las cubetas de vidrio con una solución de 0.2 Tritón X-100 en PBS haciendo 2 lavados de 5 minutos a temperatura ambiente. Se hacen tres lavados de 5 minutos de PBS.

Finalmente se realiza el revelado con diaminobencidina (DAB). Se prepara la solución con 0.5% DAB (Pierce) y 0.05 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en PBS. Se sumergen los cortes en la solución de revelado

durante un tiempo variable y se observa al microscopio hasta que los cortes se tiñen de color marrón. Cuando se han teñido los cortes se para la reacción sumergiendo los cortes en PBS.

Los cortes se pueden deshidratar y montar, o contrastar con hematoxilina y/o eosina y después se deshidratan y se montan. Para contrateñir los portaobjetos se sumergen en una solución de hematoxilina de Harris (Sigma) recién filtrada durante 4 minutos. Se lavan con agua corriente hasta que se ve la coloración azul. Se sumergen los cortes en una solución de 1% HCl en etanol 95 % hasta que desaparece el color azul y se lavan en agua amoniacal (25 % NH<sub>3</sub> en agua destilada) hasta que aparece el color azul. Después se hacen hacen dos lavados: uno de 3 minutos en agua corriente y otro de 2 minutos en agua destilada. También se puede contrastar con eosina, se sumergen los cortes en eosina alcoholica (Sigma) durante 20 segundos y se lavan con agua corriente. Antes del montaje se hace una deshidratación rápida. En cubetas de vidrio se hacen dos lavados de 1 minutos en etanol al 70%, dos lavados de 1 minutos en etanol al 95 %, dos lavados de 1 minutos en etanol absoluto y finalmente dos lavados de 5 minutos de xilol. El montaje se hace con cubreobjetos y DPX o Entelan (Fluka).

Anticuerpo primario	Dilución	Isotipo	Casa comercial
<b>Acetilcolinesterasa</b>	1:100	Goat polyclonal	Chemicon
<b>β-amiloide (clon 4G8)</b>	1:150	Mouse monoclonal	Signet Lab
<b>ED-1 (clon CD68)</b>	1:100	Mouse monoclonal	Serotec
<b>Hemoxigenasa 1</b>	1:50	Mouse monoclonal	Stressgen
<b>8hidroxi-2deoxiguanosina</b>	1:50	Mouse monoclonal	Jaica
<b>Hidroxy-2-trans-nonanal</b>	1:100	Mouse monoclonal	Jaica
<b>GFAP</b>	1:300	Rabbit polyclonal	Sigma
<b>Nitrotirosina</b>	1:50	Mouse monoclonal	Abcam
<b>Superóxido dismutasa (Cu/Zn-SOD)</b>	1:100	Sheep polyclonal	Calbiochem
<b>Superóxido dismutasa (Mn-SOD)</b>	1:100	Sheep polyclonal	Calbiochem
<b>Ubiquitina</b>	1:50	Mouse monoclonal	Novacastra

**Tabla 7: Anticuerpos primarios usados en inmunohistoquímica para cortes parafina.**

Anticuerpo secundario	Dilución	Casa comercial
<b>Biotinilated Anti- mouse IgG (H+L)</b>	1:200	Vector
<b>Biotinilated Anti- rabbit IgG (H+L)</b>	1:200	Vector
<b>Biotinilated Anti-sheep IgG (H+L)</b>	1:200	Vector

Tabla 8: Anticuerpos secundarios usados en inmunohistoquímica para cortes parafina

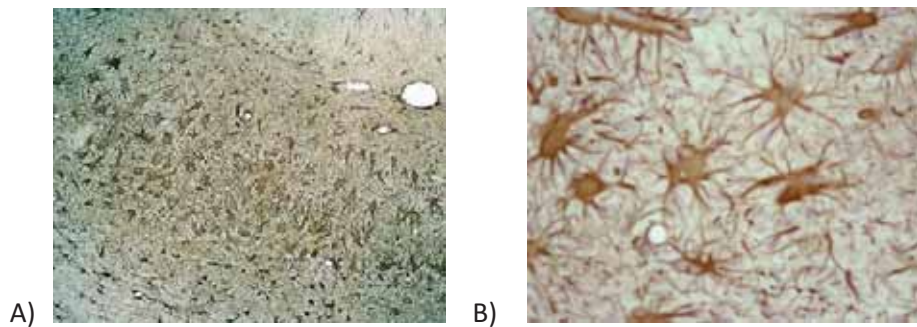


Figura 53. Tinción de GFAP en hipocampo con astrogliosis de cerebro de rata teñido con DAB. A) Objetivo de 10X B) Objetivo de 40X. S García Matas.

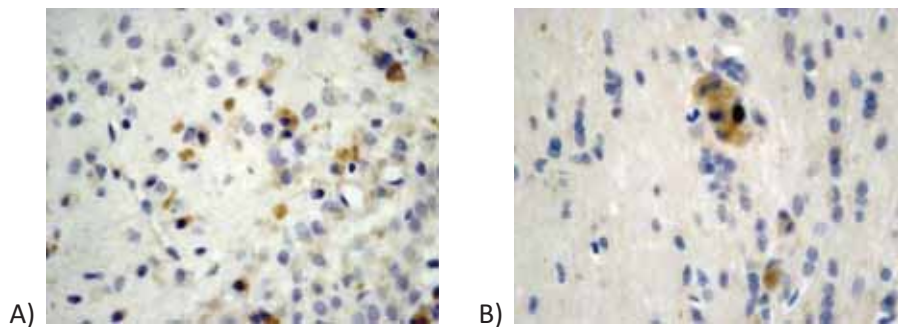


Figura 54. Tinción contra el péptido betamieloide (4G8) en septo (A) y cuerpo calloso (B) de cerebro de rata contratinción con hematoxilina. Objetivo de 40X. S García Matas.

## **9.5 DISECCIÓN DEL CEREBRO PARA CORTES DE VIBRÁTOMO**

---

### **9.5.1 SACRIFICIO Y PERFUSIÓN DE LOS ANIMALES**

Se procede igual que en el sacrificio y perfusión de los animales destinados a micrótopo apartado 9.3.1.

### **9.5.2 CORTES EN VIBRÁTOMO**

Los cortes de tejido cerebral de 4mm fresco se cortan con el vibrátomo (Leica) en secciones de 50  $\mu\text{m}$  que se sumergen en tampón fosfato.

## **9.6 HISTOLOGÍA PARA CORTES DE VIBRÁTOMO**

---

### **9.6.1 INMUNOHISTOQUÍMICA**

La cortes se procesan por flotación. Primero se realizan dos lavados con PBS durante 10 minutos.

A continuación se procede a bloquear las peroxidasas endógenas a temperatura ambiente mediante la inmersión de los cortes en una solución de bloqueo que consta de 3 % de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y 10 % metanol en PBS durante 25 minutos. Después se realizan tres lavados de 15 minutos en PBS y tres lavados de 0.5% tritón X-100 en PBS de 5 minutos cada uno.

Después se hace el bloqueo de uniones inespecíficas a temperatura ambiente igual que en la inmunohistoquímica para cortes de parafina

Los cortes se incuban toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario policlonal OX-6 o OX- 42 (Serotec) dilución 1:500 en 1% de suero de cabra en 0.2% gelatina 0.2% tritón en PBS.

Al día siguiente se realizan 5 lavados en 0.5% tritón X-100 en PBS de 5 minutos cada uno.

A continuación se incuba con el anticuerpo secundario biotinilado antirabbit diluido 1:200 en 1% en suero de cabra en 0.2% gelatina 0.2% tritón en PBS. Se hacen 5 lavados de 5 minutos en 0.5% tritón X-100 en PBS.

A continuación se hace la incubación con el complejo avidina- biotina-peroxidasa de rábano. Se prepara la solución ABC de Vectastin 30 minutos antes de su uso y se mantiene a 4°C protegida de la luz: se diluye 1/100 de solución A + 1/100 de solución B en 0.2% gelatina 0.2% tritón en PBS. Los cortes se sumergen en la solución ABC. Se hacen cinco lavados de 5 minutos en tritón X-100 en PBS.

Finalmente se realiza el revelado con diaminobencidina y/o se contratiñen con hematoxilina y se montan según el protocolo del apartado de inmunohistoquímica para cortes de parafina cuidando de montar los cortes flotantes con un pincel en portaobjetos gelatinados sin dejar pliegues.



**Figura 55: Tinción de OX 42 mostrando microglía acitivada en el córtex de cerebro de rata. Objetivo 20X. S García Matas.**

# RESULTADOS

---

---

## 1. PRIMER ARTÍCULO

---

# Astrocytes aged in vitro show a decreased neuroprotective capacity

M. Pertusa, S. García-Matas, E. Rodríguez-Farré, C. Sanfeliu and R. Cristòfol

Departament of Pharmacology and Toxicology, Institut d' Investigacions Biomèdiques de Barcelona, CSIC-IDIBAPS, Barcelona, Spain

Publicado en *Journal of Neurochemistry*, 2007, **101**, 794-805



## RESUMEN

Las alteraciones funcionales de los astrocitos puede afectar la viabilidad neuronal que acontece en el envejecimiento cerebral. En este estudio, evaluamos la capacidad neuroprotectora de los astrocitos en un modelo de envejecimiento *in vitro*. Hemos evaluado los cambios en el estrés oxidativo, la captación de glutamato y la expresión proteica en astrocitos corticales de rata en cultivos de 10 y 90 días *in vitro* (DIV). Los niveles de la proteína ácida fibrilar glial y S100 $\beta$  se incrementaron a los 90 días cuando las células eran positivas al marcador  $\beta$ -galactosidasa de senescencia. En los cultivos de astrocitos a largo plazo, la generación de especies reactivas de oxígeno fue incrementado y la actividad mitocondrial se encontraba disminuida. Simultáneamente, hubo un incremento de las proteínas detectadas positivamente para la nitrotirosina. La expresión de las proteínas Cu/Zn-superóxido dismutasa (SOD-1), la hemooxigenasa 1 (HO-1) y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) aumenta en los astrocitos envejecidos. La captación de glutamato en los astrocitos de 90 DIV era mayor que en los astrocitos de 10 DIV, y eran más vulnerables a la inhibición por la exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El incremento en la captación de glutamato fue probablemente debido a la regulación al alza del transportador glutamato/aspartato. Los astrocitos envejecidos tenían una menor capacidad de mantener la supervivencia neuronal. Estos hallazgos indican que los astrocitos pueden perder en parte su capacidad neuroprotectora durante el envejecimiento. Estos resultados también sugieren que los astrocitos envejecidos pueden contribuir a exacerbar el daño neuronal en los procesos neurodegenerativos relacionados con la edad.

## Astrocytes aged *in vitro* show a decreased neuroprotective capacity

M. Pertusa, S. García-Matas, E. Rodríguez-Farré, C. Sanfeliu and R. Cristòfol

Department of Pharmacology and Toxicology, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, CSIC-IDIBAPS, Barcelona, Spain

### Abstract

Alterations in astrocyte function that may affect neuronal viability occur with brain aging. In this study, we evaluate the neuroprotective capacity of astrocytes in an experimental model of *in vitro* aging. Changes in oxidative stress, glutamate uptake and protein expression were evaluated in rat cortical astrocytes cultured for 10 and 90 days *in vitro* (DIV). Levels of glial fibrillary acidic protein and S100 $\beta$  increased at 90 days when cells were positive for the senescence  $\beta$ -galactosidase marker. In long-term astrocyte cultures, the generation of reactive oxygen species was enhanced and mitochondrial activity decreased. Simultaneously, there was an increase in proteins that stained positively for nitrotyrosine. The expression of Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD-1) and haeme

oxygenase-1 (HO-1) proteins and inducible nitric oxide synthase (iNOS) increased in aged astrocytes. Glutamate uptake in 90-DIV astrocytes was higher than in 10 DIV ones, and was more vulnerable to inhibition by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure. Enhanced glutamate uptake was probably because of up-regulation of the glutamate/aspartate transporter protein. Aged astrocytes had a reduced ability to maintain neuronal survival. These findings indicate that astrocytes may partially lose their neuroprotective ability during aging. The results also suggest that aged astrocytes may contribute to exacerbating neuronal injury in age-related neurodegenerative processes.

**Keywords:** aging, astrocytes, astrocyte-neuron cocultures, glutamate uptake, neuroprotection, oxidative stress.

*J. Neurochem.* (2007) **101**, 794–805.

The brain is particularly vulnerable to oxidative stress because of its high metabolic rate, high level of polyunsaturated fatty acids and low antioxidant defences. Free radicals are constantly generated in the brain *in vivo*. Moreover, excessive production of the superoxide radical and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in the presence of iron or copper ions can result in the generation of the highly reactive hydroxyl radical (Halliwell 1992). Increased generation of reactive oxygen species (ROS) is physiologically controlled by the antioxidant defence system. Therefore, a decrease in antioxidant capacity will compromise cell function. Astrocytes play a fundamental role in maintaining normal brain physiology and in determining brain's susceptibility to oxidative damage (for a review see Cotrina and Nedergaard 2002). They modulate neuronal activity by releasing many modulatory molecules, such as ATP, glutamate, growth factors and cytokines. They also propagate calcium waves over long distances. In addition, astrocytes possess a high content of GSH, high GSH metabolism and elevated catalase and superoxide dismutase (SOD-1) enzyme activity. This enables them to protect neurons against oxidative injury (Makar *et al.* 1994; Desagher *et al.* 1996; Dringen *et al.* 2000). However, astrocytes are also vulnerable to oxidative stress. Their reaction to low concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> involves generation of ROS, lipoperoxidation, and changes in antioxidant defences (Röhrdanz

*et al.* 2001). Astrocytes are the cell type that is mainly responsible for clearing extracellular glutamate, as they have high-affinity glutamate transporters (for a review see: Andersson and Swanson 2000). Glutamate uptake into astrocytes can also be inhibited by the direct oxidation of glutamate transporters (Volterra *et al.* 1994; Trotti *et al.* 1997).

From a physiological point of view, brain aging has been proposed as a progressive loss of neuronal homeostatic reserve without causing neuronal death (Toescu and Verkhratsky 2003). Changes in the function of astrocytes

Received July 24, 2006; revised manuscript received October 18, 2006; accepted November 9, 2006.

Address correspondence and reprint requests to Rosa Cristòfol, Department of Pharmacology and Toxicology, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, CSIC-IDIBAPS, Roselló 161, 08036-Barcelona, Spain. E-mail: rcmfat@iibb.csic.es

**Abbreviations used:** AD, Alzheimer's disease; DCF, dichlorofluorescein; DCFH-DA, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; DIV, days *in vitro*; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; FBS, foetal bovine serum; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GLAST, glutamate/aspartate transporter; GPX, glutathione peroxidase; HBSS, HEPES-buffered saline solution; HO-1, haeme oxygenase-1; iNOS, inducible nitric oxide synthase; MCI, mild cognitive impairment; PBS, phosphate-buffered saline; PFA, paraformaldehyde; ROS, reactive oxygen species; SOD-1, superoxide dismutase; TCA, tricarboxylic acid.

may reduce their neuroprotective capacity, contributing to the neuronal aging development. Oxidative stress is believed to play a key role in brain aging progression, although the molecular mechanisms involved are not clear. Numerous evidences on alterations in astrocyte function during aging have been related to changes in redox homeostasis. Astrocyte activation increases progressively during aging in most brain regions, as estimated by an increased expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and S100 $\beta$  protein; and GFAP and S100 $\beta$  mRNA (Amenta *et al.* 1988; O'Callaghan and Miller 1991; Kohama *et al.* 1995; Sheng *et al.* 1996; Morgan *et al.* 1997). Both proteins also increase with age in culture in mouse and rat cortical astrocytes (Andersson *et al.* 1994; Papadopoulos *et al.* 1998; Gottfried *et al.* 2002; Tramontina *et al.* 2002). S100 $\beta$  overexpression in astrocytes was considered as a neuroprotective response to neuronal damage. However, abundant evidence suggests that this response may be detrimental and accelerate age-related neurodegenerative processes (Sheng *et al.* 2000; Mrak and Griffin 2001). In addition, ROS production, lipoperoxidation and protein oxidation are elevated in several brain areas of aged rodents (for a review see: Poon *et al.* 2004) and in the brain of a senescence-accelerated animal model (Alvarez-García *et al.* 2006). It has been suggested that dysfunctional antioxidant defences contribute to cellular aging. However, opposing results in the expression or activity of the antioxidant enzymes have been reported (Benzi and Moretti 1995; Leutner *et al.* 2001; Balu *et al.* 2005; Comai *et al.* 2005; Siqueira *et al.* 2005; Keil *et al.* 2006). In aged astrocyte cultures, superoxide production, lipoperoxidation, protein oxidation and iron staining are also elevated, although antioxidant defences are maintained or increased (Papadopoulos *et al.* 1998; Gottfried *et al.* 2002; Klant *et al.* 2002). However, astrocytes aged in culture show higher vulnerability to oxidative injury than young astrocytes (Papadopoulos *et al.* 1998; Gottfried *et al.* 2002). On the contrary, changes in glial glutamate uptake have been observed during brain aging (for a review see: Segovia *et al.* 2001). In a previous work, Gottfried *et al.* (2002) have shown that glutamate uptake is more sensitive to oxidative stress in aged astrocytes in culture.

Haeme oxygenase-1 (HO-1) is a stress protein involved in haeme catabolism, giving biliverdin, free iron and CO. Biliverdin and its metabolite bilirubin are physiological radical scavengers that protect neurons against oxidative stress (Llesuy and Tomaro 1994; Dore *et al.* 1999). HO-1 immunoreactivity is augmented in neurons and astrocytes of the aged brain and in age-related neurodegenerative diseases (Iijima *et al.* 1999; Schipper 2004; Schipper *et al.* 2006). Although HO-1 overexpression is believed to act as a neuroprotective mechanism, recent evidence suggests that glial HO-1 has a toxic role when high expression levels are induced (Schipper 2004; Song *et al.* 2006).

There is an increasing interest in finding out whether changes in the above-mentioned astrocyte functions accelerate

aging processes. Such changes can alter synaptic efficacy and reduce neuronal survival. The aim of this study was to establish an *in vitro* model of astrocyte aging in order to study the neuroprotective ability of astrocytes. First, we assessed parameters of oxidative stress by measuring ROS generation, mitochondrial activity and the expression of GFAP, S100 $\beta$ , inducible nitric oxide synthase (iNOS) Cu/Zn SOD-1 and HO-1 proteins in rat cortical astrocytes maintained in culture for 10 and 90 days *in vitro* (DIV). Secondly, we evaluated the glutamate transport function of astrocytes by determining glutamate uptake and the expression of glutamate/aspartate transporter (GLAST) protein. Finally, astrocyte neuroprotection was tested by measuring cortical neuronal survival in cocultures with young and long-term astrocytes cultures.

## Materials and methods

### Materials

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), gentamycin and foetal bovine serum (FBS) were purchased from Gibco-BRL (Invitrogen, Paisley, UK). Culture plates, chamber slides and flasks were from NUNC (Roskilde, Denmark). L-[<sup>3</sup>H]-Glutamate (specific activity, 51 Ci/mmol) was purchased from PerkinElmer Inc. (Wellesley, MA, USA). The fluorescent probe 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) was obtained from Molecular Probes (Leiden, The Netherlands). L-Glutamic acid, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT), sodium orthovanadate, trolox, *n*-propyl gallate, curcumin, anti-GFAP and anti-S100 $\beta$  primary antibodies, anti-rabbit, anti-mouse and anti-sheep horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were obtained from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Anti-NeuN and anti-iNOS antibodies were obtained from Chemicon International (Temecula, CA, USA); anti-SOD-1 antibody from Calbiochem (La Jolla, CA, USA); anti-2-nitrotyrosine antibody was from Abcam (Cambridge, UK); anti- $\alpha$ -actin and anti-HO-1 antibodies were from Stressgen Bioreagents (Victoria, BC, Canada); and anti-GLAST antibody was from Alpha Diagnostic International (San Antonio, TX, USA). The protease inhibitor cocktail Complete was from Roche Applied Science (Mannheim, Germany). The  $\beta$ -galactosidase staining kit was obtained from Cell Signalling Technology Inc. (Danvers, MA, USA). All other chemicals were of analytical grade.

### Preparation of astrocyte cultures

Primary cultures enriched in astrocytes were established from cerebral cortical tissue of 2-day-old Fisher 344 rats (Iffa-Credo, l'Arbresle, France). Cultures were prepared as described elsewhere (Fauconneau *et al.* 2002). Briefly, brains were dissected free of the meninges, diced into small cubes and dissociated by pipetting for 2 min with a Pasteur pipette in DMEM containing 100  $\mu$ g/mL gentamycin. The suspension was filtered through a 70- $\mu$ m pore size nylon mesh cell strainer (Becton and Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Cells were then seeded in flasks and maintained in DMEM supplemented with 20% FBS at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air. The culture medium was changed twice a week. After 15 days, confluent cultures were mildly trypsinized in the presence of 0.02% EDTA. They were then reseeded at

$0.25 \times 10^6$  cells/mL ( $0.75 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) in DMEM with 10% FBS in multi-well plates, chamber slides or flasks coated with poly-L-lysine. Experiments were performed at 7–10 days *in vitro* (10 DIV) and 3 months (90 DIV) after reseeded. The later cultures were treated with 10  $\mu$ mol/L cytosine arabinoside to curtail astrocyte proliferation and to maintain the purity of the cultures. Fresh medium was added once a week. Selected experiments were undertaken either by adding cytosine arabinoside to 10 DIV cultures or by not adding it to 90 DIV cultures. No effect of this antimetabolic agent on the assayed parameters was detected (data not shown).

#### Determination of neuronal survival in coculture with astrocytes

To study the neuronal protection response of 10- and 90-DIV astrocyte cultures, cocultures of neurons and astrocytes were prepared in eight chamber slides. Fresh neurons disaggregated from a fresh cerebral cortical tissue of 15-day foetuses were directly seeded at  $1.5 \times 10^6$  cells/mL ( $4.5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) on a confluent monolayer of 10- and 90-DIV astrocyte cultures. Sister pure neuron cultures were similarly processed. Neuronal survival was assessed at 14 DIV. Dead cells were detected by staining the cultures with 7.5  $\mu$ mol/L propidium iodide (red fluorescence) for 30 min. After that, cultures were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA). Neuronal living cells were identified by immunostaining with NeuN antibody. Cells were permeabilized with 0.25% Triton in PBS for 30 min, washed with PBS, incubated with goat serum to block unspecific binding sites at 22–24 °C, and incubated with mouse NeuN antibody (diluted 1 : 200) overnight at 4°C. Cultures were then washed with PBS and incubated with anti-mouse Alexa Fluor 488 (green fluorescence; Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) for 1 h at 22–24 °C. After washing with PBS, nuclei were stained by 5  $\mu$ mol/L bisbenzimidazole. Finally, cultures were mounted under coverslips. Randomly chosen fields were examined using a fluorescence microscope (Nikon Eclipse E1000; Nikon, Tokyo, Japan) and digitally photographed with a ColorView camera (Soft Imaging Systems, Stuttgart, Germany). Neuronal survival was determined by counting immunoreactive neurons to NeuN, which were not propidium iodide stained, using the analysis software (Soft Imaging System).

#### $\beta$ -Galactosidase staining

Astrocytes seeded on chamber slides were washed with PBS and fixed in 4% PFA in PBS for 30 min. This was followed by three washes with PBS. The degree of senescence in astrocyte cultures was evaluated using the senescence  $\beta$ -galactosidase staining kit following manufacture's instructions. This marker identifies senescent cells in culture (Dimri *et al.* 1995). Senescent astrocytes stained with a blue colour were observed using a microscope (Nikon Eclipse E1000) and digitally photographed with a ColorView camera.

#### Western blot analysis

After shaking the cultures for 4 h to eliminate microglial cells, the medium was removed and astrocytes were rinsed twice with PBS. Cells were lysed for 10 min on ice in ristocetin-induced platelet agglutination buffer [10 mmol/L PBS, 1% Igepal AC-630, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS)] containing a protease inhibitor cocktail (Complete) and 1 mmol/L orthovanadate. They were then collected and frozen at –20°C until assay. Protein extracts were quantified following the Bradford

method. Then, 15  $\mu$ g of the protein extracts were denatured at 100°C for 5 min, loaded onto a 15% SDS – polyacrylamide gel and electrophoresed. Proteins were transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P; Millipore, Bedford, MA, USA). This was incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: mouse anti-GFAP (diluted 1 : 40 000); mouse anti-S100 $\beta$  (diluted 1 : 500); sheep anti-SOD-1 (diluted 1 : 1000); mouse anti-nitrotyrosine (diluted 1 : 1000); rabbit anti-iNOS (diluted 1 : 200); mouse anti-HO-1 (diluted 1 : 1000); and rabbit anti-GLAST (diluted 1 : 500). Membranes were incubated for 1 h at 22–24 °C with horseradish peroxidase conjugated secondary antibodies. Proteins were detected with a chemiluminescence detection system based on the luminol reaction. Protein loading of the gels was controlled by staining blots with an antibody against  $\alpha$ -actin (diluted 1 : 10 000). The immunoreactive bands were digitalized and a densitometry analysis was performed using Quantity One software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The levels of protein immunoreactivity were normalized to that of  $\alpha$ -actin.

#### Glutamate uptake

The culture medium was removed and astrocytes were washed with warm HEPES-buffered saline solution (HBSS) (136 mmol/L NaCl, 5.4 mmol/L KCl, 1.2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1.4 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1.0 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 10 mmol/L HEPES) containing 9 mmol/L glucose at pH 7.3. Astrocyte cultures were then incubated for 10 min at 37°C in HBSS with 9.8 nmol/L (500 nCi/mL) of [<sup>3</sup>H]-glutamate and several concentrations of unlabeled glutamate in the range of 1–1000  $\mu$ mol/L. Uptake was terminated by removing the medium and washing the cells three times with ice-cold HBSS. This was immediately followed by cell lysis in 0.2 N NaOH. Aliquots were taken for liquid scintillation counting (with Optiphase 'Hisafe' cocktail) and for Bradford's protein assay using bovine serum albumin as the protein standard. Radioactivity was analysed by scintillation counting in a Wallac 1414 Liquid Scintillation Counter (PerkinElmer, Boston, MA, USA). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> effects on [<sup>3</sup>H]-glutamate uptake were checked using 9.8 nmol/L of labeled glutamate plus 100  $\mu$ mol/L unlabeled glutamate.

#### Mitochondrial activity

The mitochondrial activity of astrocyte cultures was determined by the MTT reduction assay (Hansen *et al.* 1989). At 10 and 90 DIV, MTT was added to the 96-well cultures to a final concentration of 0.5 mg/mL. At termination, formazan crystals were solubilized by adding 100  $\mu$ L of extraction buffer [20% SDS in *N,N*-dimethylformamide/water (1 : 1), pH 7.4] [Correction added after online publication (19/03/07); pH 7.4 should read pH 4.7] and incubating overnight at 37°C. Absorbance was measured at 560 nm with a 620-nm reference wavelength in a plate reader (iEMS Reader MF; Labsystems, Vantaa, Finland).

#### Reactive oxygen species generation

Intracellular generation of ROS was determined using DCFH-DA as described previously (Sebastià *et al.* 2004). Briefly, cultures in 96-well plates were washed in HBSS and loaded with 10  $\mu$ mol/L DCFH-DA for 20 min at 37°C. Wells were then washed with HBSS and 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) fluorescence was measured after 1 h incubation at 37°C in a fluorescence plate reader (Spectramax Gemini XS; Molecular Devices, Wokingham, UK) at

485 nm excitation/530 nm emission. The increase in intracellular ROS was quantified from a standard curve of DCF in methanol (0.5–100 nmol/L) and expressed as nmol of DCF/mg protein.

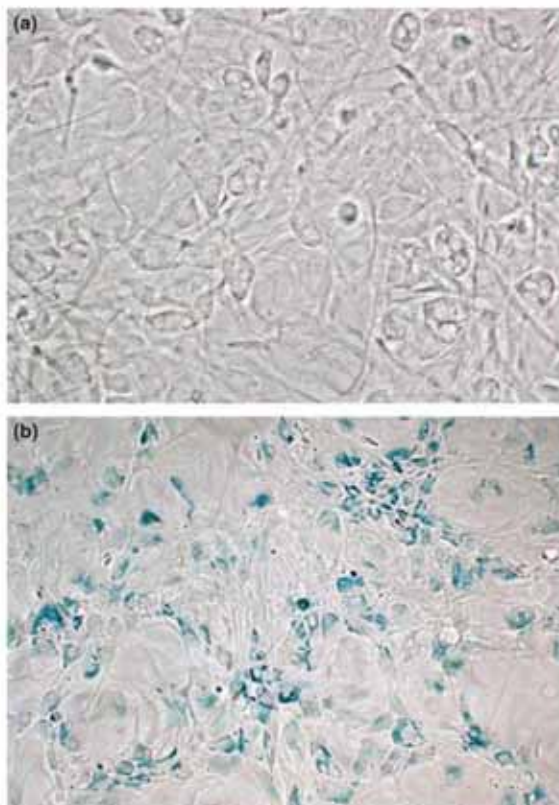
#### Statistical analysis

Experiments were performed with astrocytes from 3 to 6 primary cultures. Data were pooled and the results given as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance ( $p < 0.05$ ) was determined by Student's *t*-test and by one- or two-way ANOVA followed by Dunnett's or Bonferroni's multiple comparison tests, respectively.

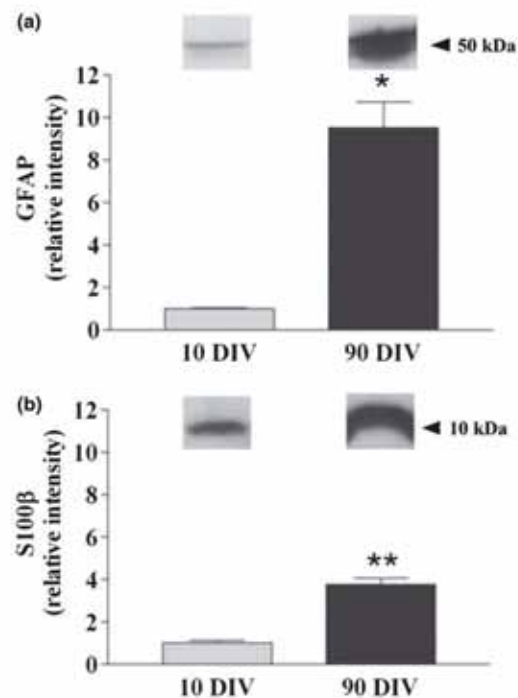
## Results

### Long-term astrocyte cultures presented characteristics of senescence and glial activation

Senescence characteristics in 10- and 90-DIV astrocyte cultures were evaluated using the  $\beta$ -galactosidase staining kit. Astrocytes with an intense blue stain were only clearly evident in 90 DIV cultures (Fig. 1). The expression of the glial proteins GFAP and S100 $\beta$  was determined by western blot in 10- and 90-DIV astrocytes. Long-term cultures showed an increase in GFAP and S100 $\beta$  bands. Densitometric analysis of the



**Fig. 1** A representative stain of  $\beta$ -galactosidase in astrocytes cultured for 10 (a) and 90 DIV (b). Blue-stained cells were only detected in 90 DIV cultures. A, B: 200 $\times$ .

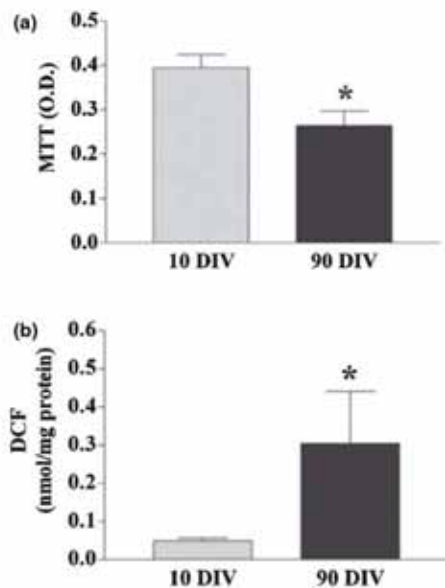


**Fig. 2** Representative immunoblots and densitometry analysis of the expression of GFAP (a) and S100 $\beta$  (b) proteins in 10- and 90-DIV astrocyte cultures. Graphs are the summary of results from experiments repeated with at least three different cultures. The levels of GFAP and S100 $\beta$  immunoreactivity were normalized to that of  $\alpha$ -actin and were expressed relative to the corresponding protein levels in 10-DIV cultures. Both protein levels were increased in 90-DIV astrocyte cultures. Data were compared by Student's *t*-test (\* $p < 0.01$  and \*\* $p < 0.001$ ).

immunoblots showed that GFAP and S100 $\beta$  protein levels in 90 DIV cultures were 10- and 4-fold higher, respectively, than levels in the 10 DIV cultures (Figs 2a and b). The total protein content was maintained along the period of *in vitro* aging ( $27.78 \pm 2.45$   $\mu$ g/well at 10 DIV vs.  $29.59 \pm 0.98$   $\mu$ g/well of 24-well plates at 90 DIV; lack of statistical significance).

### Oxidative stress increased with age in the cultures

Mitochondrial activity was evaluated by MTT assay in astrocytes cultured for 10 and 90 DIV (Fig. 3a). Long-term cultures presented a significant reduction in mitochondrial activity when compared with young cultures. However, protein levels were not affected by a longer culture period (data not shown). To explore whether the reduction in mitochondrial activity was associated with ROS production, basal levels of hydrogen peroxide generated for 1 h were determined by the use of a DCFH probe (Fig. 3b). Ninety-DIV astrocyte cultures produced sixfold more ROS than 10 DIV cultures, as indicated by the significantly higher amount of DCF fluorescence detected in these cultures. One result of increased ROS production may be protein oxidation.

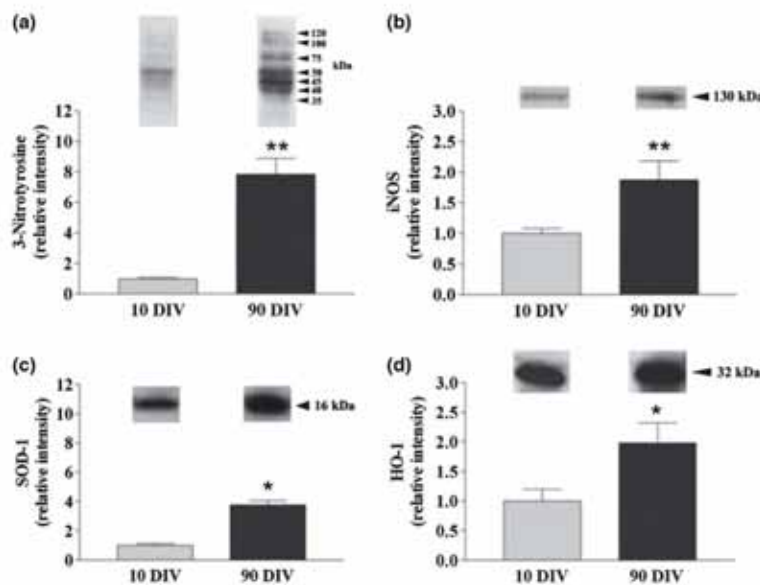
798 M. Pertusa *et al.*

**Fig. 3** Mitochondrial activity and ROS generation in 10- and 90-DIV astrocyte cultures. (a) Mitochondrial activity was measured by the MTT reduction assay. Data are expressed as absorbance (OD) of formazan and represent the mean  $\pm$  SEM of 4–6 independent cultures. Mitochondrial activity was reduced in 90-DIV astrocyte cultures ( $*p < 0.05$ ). (b) Intracellular ROS generation after 1 h, as measured by DCFH oxidation to DCF. Results are expressed as nmol of DCF/mg of protein and represent the mean  $\pm$  SEM of 4–6 independent cultures. Ninety-DIV cultures generated significantly more ROS than 10-DIV cultures ( $*p < 0.05$ ).

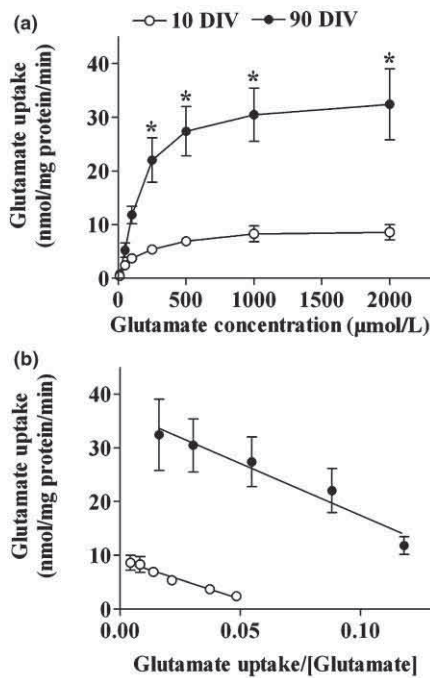
Therefore, we used western blot analysis to evaluate the presence of nitrotyrosine in proteins. Several proteins were observed, which stained positively for nitrotyrosine. We could quantify bands with an apparent molecular weight of approximately 120, 100, 75, 50, 45, 40 and 35 kDa. A significant increase in these proteins was detected in 90 DIV cultures, leading to a eightfold expression when compared with 10-DIV astrocyte cultures (Fig. 4a). Due that nitration of tyrosine residues in proteins is indicative of NO generation, we analysed the expression of iNOS protein by immunoblotting. Figure 4b shows that the iNOS expression level in 90-DIV astrocytes was twofold higher than that in 10-DIV astrocytes. The expression of SOD-1, the main superoxide radical scavenging enzyme, was determined by western blot. SOD-1 levels in 90 DIV cultures were 3.5-fold higher than that in the younger cultures (Fig. 4c). HO-1 protein is an enzyme that could be up-regulated by oxidative stress. Its expression level in short- and long-term cultures was also evaluated by immunoblotting. Astrocytes cultured for 90 DIV had a twofold expression level than those cultured for 10 DIV (Fig. 4d).

#### An increase in basal glutamate uptake was accompanied by up-regulation of GLAST expression in 90-DIV astrocytes

The ability of astrocytes to uptake glutamate was evaluated in 10 and 90 DIV cultures using different glutamate concentrations. Figure 5(a) shows that glutamate uptake in 90-DIV astrocyte cultures was significantly higher than that in 10 DIV cultures. Kinetic parameters obtained from the Eadie-Hofstee analysis revealed a statistically significant



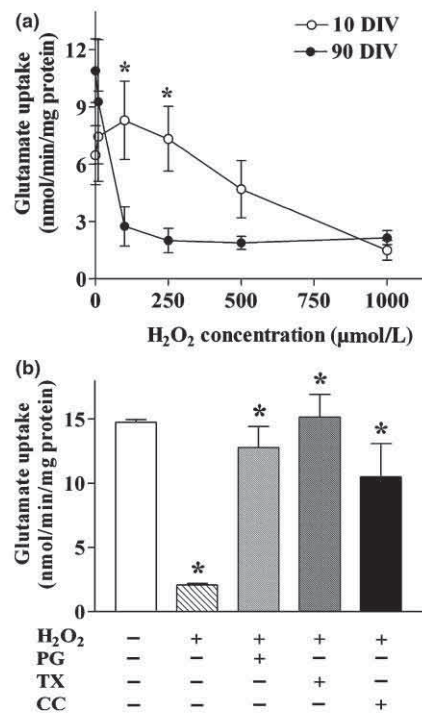
**Fig. 4** Representative immunoblots and densitometry analysis of the expression of nitrotyrosine (a), iNOS (b), SOD-1 (c), and HO-1 (d) proteins in 10- and 90-DIV astrocyte cultures. Graphs are the summary of results from experiments repeated with at least three different cultures. The levels of nitrotyrosine, iNOS, SOD-1 and HO-1 immunoreactivity were normalized to that of  $\alpha$ -actin and were expressed relative to the corresponding protein levels in 10-DIV cultures. All protein levels were higher in 90-DIV astrocyte cultures. Data were compared by Student's *t*-test ( $*p < 0.01$  and  $**p < 0.001$ ).



**Fig. 5** (a) Glutamate uptake in astrocytes cultured at 10 and 90 DIV. Astrocytes were incubated with 9.8 nmol/L [<sup>3</sup>H]-glutamate and several concentrations of unlabelled glutamate as described in Materials and methods section. Each point represents the mean ± SEM of five to six determinations. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's test showed that culture age ( $F_{1,65} = 83.2, p < 0.001$ ) and glutamate concentration ( $F_{6,65} = 16.67, p < 0.001$ ) had a significant effect ( $*p < 0.001$ ). (b) Eadie-Hofstee kinetic analysis of astrocyte glutamate uptake at 10 and 90 DIV. There was a significant increase in the  $V_{max}$  parameter of glutamate uptake in 90-DIV astrocyte cultures. However, there was no change in the  $K_m$  parameter.

increase in  $V_{max}$  in 90-DIV astrocytes when compared with 10-DIV astrocytes ( $V_{max} = 37 \pm 2$  and  $9 \pm 0.3$  nmol/mg protein/min,  $p < 0.01$ , respectively) (Fig. 5b). There were no statistically significant differences between  $K_m$  values for 10- and 90-DIV astrocytes ( $143 \pm 10$  μmol/L and  $193 \pm 25$  μmol/L, respectively). The exposure of astrocyte cultures to  $H_2O_2$  resulted in concentration-dependent glutamate uptake inhibition (Fig. 6a). This inhibitory effect was potentiated in 90 DIV cultures. This indicates that there was an increase in susceptibility to oxidation injury with age in culture. The antioxidants propyl gallate (50 μmol/L), trolox (100 μmol/L) and curcumin (10 μmol/L) reversed the  $H_2O_2$  inhibition in 90 DIV cultures (Fig. 6b), confirming the existence of a regulatory redox mechanism on the glutamate transporters similarly to that previously described in young astrocyte cultures (Volterra *et al.* 1994; Trotti *et al.* 1997; Sitar *et al.* 1999; Miralles *et al.* 2001).

In young and old cultures, the uptake was highly reduced by the inhibitor of glial glutamate transporter *L-trans-*

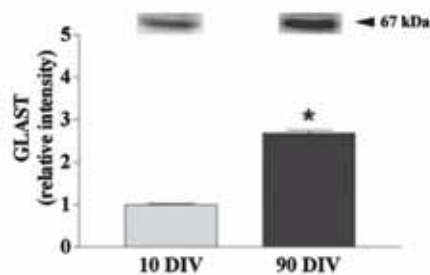


**Fig. 6** Glutamate uptake inhibition by hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) in 10- and 90-DIV astrocyte cultures. Astrocytes were incubated with 9.8 nmol/L [<sup>3</sup>H]-glutamate and 100 μmol/L of unlabelled glutamate. (a) Pre-incubation with different concentrations of  $H_2O_2$  for 30 min before [<sup>3</sup>H]-glutamate uptake measurement. (b) Effect of 50 μmol/L propyl gallate (PG), 100 μmol/L trolox (TX) and 10 μmol/L curcumin (CC) on 500 μmol/L  $H_2O_2$ -induced [<sup>3</sup>H]-glutamate uptake inhibition in 90-DIV astrocyte cultures. Cultures were exposed to PG, TX and CC 30 min before and during the  $H_2O_2$  treatment. Each point represents the mean ± SEM of five to six determinations. Statistical differences were determined by (a) Student's test ( $*p < 0.05$ ); (b) One-way ANOVA followed by Dunnet's test ( $*p < 0.001$  compared with all other groups).

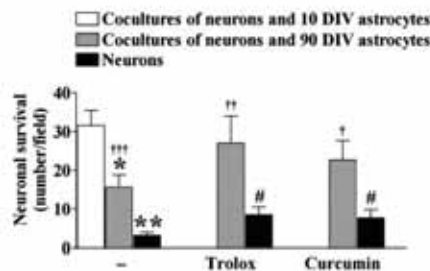
pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (to 85.75% and 79.09% for 15 and 90 DIV cultures, respectively). This suggests that the glial GLAST was mainly involved. Therefore, the expression of the GLAST transporter was examined in order to determine whether the increase in glutamate uptake observed in older astrocytes in culture was accompanied by an increase in GLAST protein levels. GLAST expression displayed an immunoreactive band with an apparent molecular mass of approximately 67 kDa (Fig. 7a). Western blot analysis revealed that GLAST expression in 90-DIV astrocytes was threefold higher than that in 10-DIV astrocytes (Fig. 7b).

**Ninety-DIV astrocytes showed reduced neuroprotective capacity**

The neuroprotective ability of astrocytes was tested in cocultures with cortical neurons by determining neuronal survival. Viable stained neurons were identified in pure

800 M. Pertusa *et al.*

**Fig. 7** A representative immunoblot of the expression of GLAST protein in 10- and 90-DIV astrocyte cultures. The anti-GLAST antibody recognized a transmembrane protein with a molecular mass of ~67 kDa. The graph is the summary of results from experiments repeated with at least three different cultures. The levels of GLAST immunoreactivity were quantified by normalization to  $\alpha$ -actin and were expressed relative to the corresponding protein levels of 10-DIV cultures. GLAST protein levels were higher in 90-DIV astrocyte cultures. Data were compared by Student's *t*-test (\* $p < 0.001$ ).



**Fig. 8** Neuronal survival in the absence or presence of 10- and 90-DIV astrocytes and the effect of the antioxidants trolox and curcumin. Cortical neurons were cultured on a monolayer of 10- and 90-DIV astrocyte cultures for 2 weeks. Living neurons in cocultures with astrocytes or in pure neuron cultures were identified by cell staining with NeuN antibody and propidium iodide, as described in Materials and methods section. Neuron cultures and cocultures with 90-DIV astrocytes were grown in the absence or the presence of the antioxidants trolox (10  $\mu$ mol/L) and curcumin (10  $\mu$ mol/L). Results are expressed as the number of living neurons by field and are the mean  $\pm$  SEM of five independent cocultures. Data were compared by Student's *t*-test (\* $p < 0.01$  and \*\* $p < 0.001$  relate to cocultures of neurons and 10-DIV astrocytes; \* $p < 0.05$  relates to neuron cultures without antioxidant treatments; † $p < 0.05$ , †† $p < 0.01$  and ††† $p < 0.001$  relate to the corresponding neuron cultures).

neuron cultures and in cocultures of neurons seeded on a monolayer of 10-DIV astrocytes or 90-DIV astrocytes for 2 weeks. After 2 weeks, the number of living cells in pure neuron cultures was notably reduced (Fig. 8). Cocultures of neurons with 10-DIV astrocyte cultures showed maximal neuroprotection, whereas 90-DIV astrocytes showed significantly reduced neuroprotection. Neuron cultures and cocultures of neurons with 90-DIV astrocytes were treated with the antioxidants trolox and curcumin. Both agents significantly

increased the number of living cells in pure neuron cultures. In cocultures with aged astrocytes, the presence of antioxidants also enhanced neuronal survival. However, this survival rate was not statistically different from that either in cocultures with 10-DIV astrocytes or in untreated cocultures.

## Discussion

The results of this study showed that astrocytes cultured 90 DIV acquired characteristics of senescence and generated higher levels of ROS than 10-DIV cultures. This was seen to have detrimental effects on neuronal protection. We observed an increase in GFAP and S100 $\beta$  proteins in older astrocytes in culture. Using a similar experimental approach, other authors also found increases in both of these proteins in mouse and rat cortical astrocytes cultured for 40–56 DIV compared with 7- to 10-DIV cultures (Papadopoulos *et al.* 1998; Gottfried *et al.* 2002; Tramontina *et al.* 2002). We found a higher level of GFAP at 90 DIV than that reported at 40 DIV (Papadopoulos *et al.* 1998; Gottfried *et al.* 2002). Our longer term astrocyte cultures could explain the major increase of GFAP expression. The expression of S100 $\beta$  at 90 DIV was slightly higher or in the same range than in the previous works (Gottfried *et al.* 2002; 40 DIV; Tramontina *et al.* 2002; 21–56 DIV). We have not determined the S100 $\beta$  secretion from the aged astrocytes *in vitro*, but the latter authors demonstrated a similar profile between cell accumulation and diminution of secretion from 7 to 56 DIV. In animal models of premature aging, such as senescence accelerated prone mice, increases in activated astrocytes overexpressing S100 $\beta$  and GFAP have been observed (Griffin *et al.* 1998; Wu *et al.* 2005). In the aging brain, astrocyte hyperplasia and hypertrophy occur in several areas, accompanied by an elevated content of GFAP and S100 $\beta$  (Amenta *et al.* 1988; Sheng *et al.* 1996; Nichols 1999). Furthermore, it is known that some activated phenotypes of aging glia are maintained *in vitro*, as overexpression of GFAP has been observed in cultures of astrocytes from aging cerebral cortex (Rozovsky *et al.* 1998). We also detected the presence of senescence  $\beta$ -galactosidase stain in 90-DIV cultured astrocytes.  $\beta$ -Galactosidase has been detected in cultured cells undergoing replicative senescence without proliferation (Dimri *et al.* 1995). It has also been found in aged brains after ischaemia (Takada *et al.* 2003). However, its cellular role is not known (Lee *et al.* 2006). The present article shows that astrocytes cultured for 90 DIV acquire aging and activation characteristics like those observed in the astrocytes of aged animals.

Glial fibrillary acidic protein and S100 $\beta$  overexpression has been related to enhanced oxidative stress. *In vitro*, Morgan *et al.* (1997) have shown up-regulation of the astrocyte GFAP gene by oxidative stress. Several authors have demonstrated that treatment of astrocyte cultures with



S100 $\beta$  results in activation of iNOS and NO release via the NF $\kappa$ B pathway (Hu *et al.* 1997; Lam *et al.* 2001). In this study, we observed an increase in ROS generation, accompanied by a remarkable enhancement in nitrated proteins in long-term astrocyte cultures. Nitration of tyrosine residues in cellular proteins is a good marker of oxidant generation derived from NO. Superoxide radicals react with NO to form the peroxynitrite radical, and this radical nitrates tyrosyl residues in proteins (Beckman 1996). We found an increase of iNOS protein expression in aged astrocytes indicative of NO production in these cultures. *In vivo* studies have reported controversial results on iNOS expression in cerebral cortex of aged rats (Uttenthal *et al.* 1998; Liu *et al.* 2004). NO-induced nitrosative stress can inhibit the mitochondrial respiratory chain in astroglial cell cultures. This leads to lower cellular energy (Calabrese *et al.* 2005). In this respect, we showed reduced mitochondrial activity in 90-DIV astrocyte cultures, probably derived from oxidative damage in mitochondria. Mitochondria are the major source of free radicals and may be also the major target for their damaging effects (Balaban *et al.* 2005). Several evidences suggest that mitochondrial oxidative stress is a cause of cell aging (Lee and Wei 2001; Sastre *et al.* 2003). For instance, it has been reported that decreased activities of mitochondrial complex enzymes were negatively associated to oxidative damage in brains from old mice (Kwong and Sohal 2000; Navarro 2004). Recently, lower membrane potential has been reported in astrocyte cultures from old mice (Lin *et al.* 2006). On the contrary, it has been suggested that chronic iNOS induction in astrocytes may lead to a decrease in GSH trafficking from astrocytes to neurones, thus preventing neuronal protection (Heales *et al.* 2004). In the present study, we examined the survival of cortical neurons at 2 weeks after coculturing with 10- and 90-DIV astrocytes. Long-term astrocytes were less able to protect cortical neurons than young astrocytes. This effect was partially counteracted by the addition of antioxidants to the cultures. This suggests that astrocyte's loss of antioxidant capacity may be one of the underlying factors behind the lack of neuroprotection in aging and age-related neurodegeneration. Accordingly, Lin *et al.* (2006) have demonstrated reduced neuroprotective ability of old astrocytes in cocultures with PC12 cells exposed to oxidative damage.

The immunoblotting studies revealed overexpression of HO-1 in 90-DIV astrocyte cultures. HO-1 expression in neurons and glia has been shown to increase against oxidative stress and traumatic injury (Fukuda *et al.* 1996; Dore *et al.* 1999; Llesuy and Tomaro 1994). HO-1 immunoreactivity is also augmented in brain aging and in age-related neurodegenerative diseases (Iijima *et al.* 1999; Schipper 2004). In general, this HO-1 overexpression has been considered as a neuroprotective response by generating the radical scavengers biliverdin and bilirubin. However, the chronic increase of HO-1 expression in astroglia in the

temporal cortex and hippocampus has been associated with neurofibrillary pathology, specific cognitive deficits in Alzheimer's disease (AD), and mild cognitive impairment (MCI) (Schipper *et al.* 2006). These authors suggested that glial HO-1 up-regulation in MCI may produce mitochondrial damage. Thus, this would contribute to the early development of certain neuropathological characteristics of AD. This proposal is based on *in vitro* studies, in which overexpression of HO-1 in rat astrocytes promotes mitochondrial iron sequestration (Schipper *et al.* 1999); free radical-induced MnSOD expression (Frankel *et al.* 2000); and oxidative damage to mitochondrial lipids, proteins and nucleic acids (Song *et al.* 2006). Accumulation of free ferrous iron generated from elevated HO-1 activity could result in a loss of cytoprotection (Suttner and Dennery 1999). Papadopoulos *et al.* (1998) detected iron staining and an increase in ferritin immunoreactivity in older astrocytes. In this article, HO-1 overexpression in astrocyte cultures may be early induced by increased generation of ROS. However, sustained HO-1 expression in long-term cultures would exacerbate alterations in mitochondrial activity and protein oxidation with detrimental consequences on astrocyte functions.

Antioxidant enzymes in astrocytes are considered to be a primary defence mechanism that protects neurons from oxidative damage. In our study, we have shown up-regulation of SOD-1 expression in astrocyte cultures with age. This result is in accordance with previous studies where increases in SOD and catalase activities were observed in cortical astrocytes cultured for 34–47 DIV compared with 7–13 DIV cultures (Papadopoulos *et al.* 1998; Klamt *et al.* 2002). In these studies, aged astrocytes had increased vulnerability to oxidative injury, and also elevated levels of lipoperoxidation and protein oxidation relative to young astrocyte cultures. As peroxidative stress has been shown to induce SOD activity (Benzi and Moretti 1995), the ROS generated in the initial periods of cultured astrocytes may induce SOD-1 overexpression as a protective mechanism. However, if this sustained response is not accompanied by elevated glutathione peroxidase (GPX) activity, the generation of hydrogen peroxide may increase with age, producing adverse effects. In fact, elevated levels of SOD-1 relative to GPX have been reported in aged murine brain (de Haan *et al.* 1992; Leutner *et al.* 2001). In addition, it has been shown that an altered antioxidant ratio SOD-1/GPX in cell lines leads to senescence-like changes (de Haan *et al.* 1996). On the contrary, in a recent paper, Son *et al.* (2005) demonstrated that a sequential induction of HO-1 and Mn-SOD could protect cultured astrocytes from a toxic dose of NO. In this sense, we cannot discard that simultaneous overexpression of HO-1 and SOD proteins may play a cytoprotective role under acute oxidative stress conditions. However, the data presented here suggest that the increase in HO-1 and SOD-1 expression in 90 DIV cultures may be detrimental, or at least is not enough to prevent the elevated levels of oxidative

stress shown in these cultures and to maintain a normal neuroprotective capacity.

Astrocytes have the ability to clear glutamate from the extracellular space, thus preventing neuronal excitatory damage. In the present article, the uptake of glutamate from the extracellular medium was evaluated for both of the astrocyte culture ages. Ninety-DIV cultures showed an increase in glutamate uptake. This was accompanied by overexpression of the glial GLAST. Gottfried *et al.* (2002) also demonstrated an increase in basal glutamate uptake in 40-DIV astrocyte cultures. We can consider that continuous increase in glutamate release in 90-DIV astrocytes may overexpress glutamate transporters and consequently increase glutamate uptake. In fact, Duan *et al.* (1999) revealed that glutamate could induce up-regulation of glutamate transport in murine cortical astrocyte cultures. *In vivo*, several studies have reported decreases in glutamate uptake in the cerebral cortex of aged rats when using neuronal synaptosomal preparations (Segovia *et al.* 2001). However, glutamate uptake was not modified in brain cortical slices of aged rats, with both neurons and astrocytes present (Dawson *et al.* 1989). Therefore, we can assume the presence of differential responses of neuronal and glial glutamate transport in brain aging. A reduced glutamate uptake in neurons together with an increased uptake in astrocytes may maintain normal synaptic glutamate concentration during aging. Indeed, extracellular glutamate brain concentrations have been reported unchanged during aging (Segovia *et al.* 2001).

Glutamate taken up by astrocytes is transformed into glutamine by the enzyme glutamine synthetase or is oxidized in the tricarboxylic acid (TCA) cycle (Bak *et al.* 2006). It has been reported that the metabolic fate of glutamate is concentration dependent, and the proportion of glutamate oxidized increases several times with higher extracellular concentration (Dienel and Cruz 2006). Therefore, glutamate derived from an increased uptake in aged astrocytes would have a higher entrance on the glutamate/TCA pathway than in the glutamate/GABA–glutamine cycle. However, an improvement on the metabolic status of the aged astrocyte is prevented by the decreased metabolic mitochondrial activity in these cells, as measured by MTT (mainly indicative of succinate-dehydrogenase activity, Slater *et al.* 1963).

Our results showed that glutamate uptake in young astrocytes was inhibited by acute H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment, according to previous studies in cortical astrocyte cultures (Volterra *et al.* 1994; Trotti *et al.* 1997). However, Gottfried *et al.* (2002) have found higher efficacy of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in inhibiting glutamate uptake in astrocyte cultures. Differences in animal strain or culture preparation methods – primary or secondary (replated) astrocytes – may account for these effects. Furthermore, similarly to previous studies, we found higher vulnerability of aged astrocytes to glutamate uptake inhibition by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Miralles *et al.* 2001; Gottfried *et al.* 2002).

Although these cells presented a high vulnerability to oxidative stress, the free-radical inhibitory effect on their glutamate transporters could still be reverted by the anti-oxidant agents: propyl gallate, trolox and curcumin. It is tempting to hypothesize that in circumstances with elevated oxidative stress, as in age-related neurodegenerative processes, the inhibition of glutamate uptake into astrocytes may increase the extracellular accumulation of glutamate. This may enhance the vulnerability of neurons to excitotoxicity. A decline in glutamate uptake in the cerebral cortex has been reported in AD. However, no correlation was found with the levels of glial glutamate transporters (Beckstrom *et al.* 1999; Westphalen *et al.* 2003).

In conclusion, we have shown that astrocytes cultured for 90 DIV acquire characteristics of senescence and activation like those observed in astrocytes of aged animals. Increased ROS generation and nitrosative stress occur, which leads to decreased mitochondrial activity with age. Overexpression of HO-1 and SOD-1 proteins may be an initial defence response against increased ROS generation. However, sustained up-regulation of both proteins may have detrimental consequences on astrocyte functions. In our study, aged astrocytes had a reduced ability to maintain neuronal survival. This is probably at least partly because of a loss of their antioxidant capacity, as neuronal survival was partially recovered by antioxidant agents. All these results suggest that astrocytes have a major role in brain aging progression. In addition, we observed increased glutamate uptake in aged astrocytes. This may initially counteract the reduced neuronal glutamate uptake observed in brain aging. Nevertheless, the higher vulnerability of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced glutamate uptake inhibition observed in aged astrocytes suggest that astrocytes are involved in the neuronal excitotoxicity that underlies age-related neurodegenerative processes. Altogether, these findings suggest that astrocytes partially lose their neuroprotective ability during brain aging and contribute to exacerbating neuronal injury in age-related neurodegenerative processes.

#### Acknowledgements

This study was supported by grants from FIS 03/0467 and Red CIEN V-2003-REDC10F-C from the Spanish Ministry of Health's Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) and the Generalitat de Catalunya's DURSI 2005/SGR/00826. M. Pertusa and S. García-Matas received an IDIBAPS and a Generalitat de Catalunya fellowship, respectively. We thank A. Parull for his skilful technical assistance.

#### References

Alvarez-García O., Vega-Naredo I., Sierra V., Caballero B., Tomas-Zapico C., Camins A., García J. J., Pallas M. and Coto-Montes A.

- (2006) Elevated oxidative stress in the brain of senescence-accelerated mice at 5 months of age. *Biogerontology* **7**, 43–52.
- Amenta F., Bronzetti E., Sabbatini N. and Vega J. A. (1988) Astrocyte changes in aging cerebral cortex and hippocampus: a quantitative immunohistochemical study. *Microsc. Res. Tech.* **43**, 29–33.
- Andersson C. M. and Swanson R. A. (2000) Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation and physiological functions. *Glia* **32**, 1–14.
- Andersson C., Brunso-Bechtold J. and Tytell M. (1994) Immunocytochemical and ultrastructural characterization of type 1 astrocytes and O-2A lineage cells in long-term co-cultures. *Brain Res.* **646**, 100–117.
- Bak L. K., Schousboe A. and Waagepetersen H. S. (2006) The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J. Neurochem.* **98**, 641–653.
- Balaban R. S., Nemoto S. and Finkel T. (2005) Mitochondria, oxidants and aging. *Cell* **120**, 483–495.
- Balu M., Sangeetha P., Haripriya D. and Panneerselvam C. (2005) Rejuvenation of antioxidant system in central nervous system of aged rats by grape seed extract. *Neurosci. Lett.* **383**, 295–300.
- Beckman J. S. (1996) Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 836–844.
- Beckstrom H., Julsrud L., Haugeto O., Dewar D., Graham D. I., Lehre K. P., Storm-Mathisen J. and Danbolt N. C. (1999) Interindividual differences in the levels of the glutamate transporters GLAST and GLT, but no clear correlation with Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* **55**, 218–229.
- Benzi G. and Moretti A. (1995) Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. *Free Radic. Biol. Med.* **19**, 77–101.
- Calabrese V., Colombrina C., Guagliano E. et al. (2005) Protective effect of carnosine during nitrosative stress in astroglial cell cultures. *Neurochem. Res.* **30**, 797–807.
- Comai S., Bertazzo A., Ragazzi E., Caparrotta L., Costa C. V. and Allegri G. (2005) Influence of age on Cu/Zn-superoxide dismutase and inole 2,3-dioxygenase activities in rat tissues. *Ital. J. Biochem.* **54**, 232–239.
- Cotrina M. L. and Nedergaard M. (2002) Astrocytes in the aging brain. *J. Neurosci. Res.* **67**, 1–10.
- Dawson R. Jr, Wallace D. R. and Meldrum M. J. (1989) Endogenous glutamate release from frontal cortex of adult and aged rats. *Neurobiol. Aging* **10**, 665–668.
- Desagher S., Glowinski J. and Premont J. (1996) Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *J. Neurosci.* **16**, 2553–2562.
- Dienel G. A. and Cruz N. F. (2006) Astrocyte activation in working brain: energy supplied by minor substrates. *Neurochem. Int.* **48**, 586–595.
- Dimri G. P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E. E., Linskens M., Rubelj J. and Pereira-Smith O. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92**, 9363–9367.
- Dore S., Takahashi M., Ferris C. D., Zaharky R., Hester L. D., Guastella D. and Snyder S. H. (1999) Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 2445–2450.
- Dringen R., Gutterer J. M. and Hirrlinger J. (2000) Glutathione metabolism in brain: metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defence against reactive oxygen species. *Eur. J. Biochem.* **267**, 4912–4916.
- Duan S., Anderson C. M., Stein B. A. and Swanson R. A. (1999) Glutamate induces rapid upregulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST. *J. Neurosci.* **23**, 10 193–10 200.
- Fauconneau B., Petegnief V., Sanfeliu C., Piriou A. and Planas A. M. (2002) Induction of heat shock proteins (HSPs) by sodium arsenite in cultured astrocytes and reduction of hydrogen peroxide-induced cell death. *J. Neurochem.* **83**, 1338–1348.
- Frankel D., Mehndate H. and Schipper H. M. (2000) Role of heme oxygenase-1 in the regulation of manganese superoxide dismutase gene expression in oxidatively-challenged astroglia. *J. Cell. Physiol.* **185**, 80–86.
- Fukuda K., Richmon J. D., Sato M., Sharp F. R., Panter S. S. and Noble L. J. (1996) Induction of heme-oxygenase 1 (HO-1) in glia after traumatic brain injury. *Brain Res.* **736**, 68–75.
- Gottfried C., Tramontina F., Gonçalves D., Gonçalves C. A., Moriguchi E., Dias R. D., Wofchuck S. T. and Souza D. O. (2002) Glutamate uptake in cultured astrocytes depends on age: a study about de effect of guanosine and the sensitivity to oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Mech. Ageing Dev.* **123**, 1333–1340.
- Griffin W. S. T., Sheng J. G. and Mrak R. E. (1998) Senescence-accelerated overexpression of S100β in brain of SAMP6 mice. *Neurobiol. Aging* **19**, 71–76.
- de Haan J. B., Newman J. D. and Kola I. (1992) Cu/Zn superoxide dismutase mRNA and enzyme activity, and susceptibility to lipid peroxidation, increases with aging in murine brains. *Mol. Brain Res.* **13**, 179–187.
- de Haan J. B., Cristiano F., Iannello R., Kelner M. J. and Kola I. (1996) Elevation in the ratio of Cu/Zn-superoxide dismutase to glutathion peroxidase leads to cellular senescence and this effect is mediated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 283–292.
- Halliwel B. (1992) Oxygen radicals as key mediators in neurological disease: fact or fiction. *Ann. Neurol.* **32**, S10–S15.
- Hansen M. B., Nielsen S. E. and Berg K. (1989) Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* **119**, 203–210.
- Heales S. J. R., Lam A. A. J., Duncan A. J. and Land J. M. (2004) Neurodegeneration or neuroprotection: the pivotal role of astrocytes. *Neurochem. Res.* **29**, 513–519.
- Hu J., Ferreira A. and Van Eldik L. J. (1997) S100β induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes. *J. Neurochem.* **69**, 2294–2301.
- Iijima N., Tamada Y., Hayashi S., Tanaka M., Ishihara A., Hasegawa M. and Ibata Y. (1999) Expanded expression of heme oxygenase-1 (HO-1) in the hypothalamic median eminence of aged as compared with young rats: an immunocytochemical study. *Neurosci. Lett.* **20**, 113–116.
- Keil U., Scherping I., Hauptmann S., Schuessel K., Eckert A. and Müller W. E. (2006) Piracetam improves mitochondrial dysfunction following oxidative stress. *Br. J. Pharmacol.* **147**, 199–208.
- Klamt F., Gottfried C., Tramontina F., Dal-Pizzol F., Conte da Frota M. L., Fonseca Moreira J. C., Dias R. D., Moriguchi E., Wofchuck S. and Souza D. O. (2002) Time-related increase in mitochondrial superoxide production, biomolecule damage and antioxidant enzyme activities in cortical astrocyte cultures. *Neuroreport* **13**, 1515–1518.
- Kohama S. G., Goss J. R., Finch C. E. and McNeill T. H. (1995) Increases of glial fibrillary acidic protein in the aging female mouse brain. *Neurobiol. Aging* **16**, 59–67.
- Kwong L. K. and Sohal R. S. (2000) Age-related changes in activities of mitochondrial electron transport complexes in various tissues of the mouse. *Arch. Biochem. Biophys.* **373**, 16–22.

- Lam A. G. M., Koppal T., Akama K. T., Gao L., Craft J. M., Samy B., Schavoocky J. P., Watterson D. M. and Van Eldik L. J. (2001) Mechanism of glial activation by S100 $\beta$ : involvement of the transcription factor NF $\kappa$ B. *Neurobiol. Aging* **22**, 765–772.
- Lee H. S. and Wei Y. H. (2001) Mitochondrial alterations, cellular response to oxidative stress and defective degradation of proteins in aging. *Biogerontology* **2**, 231–244.
- Lee B. Y., Han J. A., Im J. S., Morrone A., Johung K., Goodwin E. C., Kleijer W. J., DiMaio D. and Hwang E. S. (2006) Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase is lysosomal  $\beta$ -galactosidase. *Aging Cell* **5**, 187–195.
- Leutner S., Eckert A. and Müller W. E. (2001) Ros generation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the aging brain. *J. Neural Transm.* **108**, 955–967.
- Lin D. T., Wu J., Holstein D., Upadhyay G., Rourk W., Muller E. and Lechleiter J. D. (2006) Ca<sup>2+</sup> signaling, mitochondria and sensitivity to oxidative stress in aging astrocytes. *Neurobiol. Aging* **28**, 99–111.
- Liu P., Smith P. F., Appleton I., Darlington C. L. and Bilkey D. K. (2004) Age-related changes in nitric oxide synthase and arginase in the rat prefrontal cortex. *Neurobiol. Aging* **25**, 547–552.
- Llesuy S. F. and Tomaro M. L. (1994) Heme oxygenase and oxidative stress: evidence of involvement of bilirubin as physiological protector against oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta* **1223**, 9–14.
- Makar T. K., Nedergaard M., Preuss A., Gelbard A. S., Perumal A. S. and Cooper A. J. L. (1994) Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain. *J. Neurochem.* **62**, 45–53.
- Miralles V. J., Martínez-López I., Zaragoza R., Borrás E., García C., Pallardó F. V. and Viña J. R. (2001) Na<sup>+</sup> dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2 and EAAT3) in primary astrocyte cultures. *Brain Res.* **922**, 21–29.
- Morgan T. E., Rozovsky I., Goldsmith S. K., Stone D. J., Yoshida T. and Finch C. E. (1997) Increased transcription of the astrocyte gene GFAP during middle-age is attenuated by food restriction: implications for the role of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **23**, 524–528.
- Mrak R. E. and Griffin W. S. T. (2001) The role of activated astrocytes and the neurotrophic cytokine S100 $\beta$  in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **22**, 915–922.
- Navarro A. (2004) Mitochondrial enzyme activities as biochemical markers of aging. *Mol. Aspects Med.* **25**, 37–48.
- Nichols N. R. (1999) Glial responses to steroids as markers of brain aging. *J. Neurobiol.* **40**, 585–601.
- O'Callaghan J. P. and Miller D. B. (1991) The concentration of glial fibrillary acidic protein increases with age in the mouse and rat brain. *Neurobiol. Aging* **12**, 171–174.
- Papadopoulos M. C., Koumenis I. L., Yuan T. Y. and Giffard R. G. (1998) Increasing vulnerability of astrocytes to oxidative injury with age despite constant antioxidant defenses. *Neuroscience* **82**, 915–925.
- Poon H. F., Calabrese V., Scapagnini G. and Butterfield D. A. (2004) Free radicals: key to brain aging and heme oxygenase as a cellular response to oxidative stress. *J. Gerontol.* **59A**, 478–493.
- Röhrdanz E., Schmuck G., Ohler S., Tran-Thi Q. H. and Kahl R. (2001) Changes in antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide in rat astroglial cells. *Arch. Toxicol.* **75**, 150–158.
- Rozovsky I., Finch C. E. and Morgan T. E. (1998) Age-related activation of microglia and astrocytes: *In vitro* studies show persistent phenotypes of aging, increased proliferation, and resistance to down-regulation. *Neurobiol. Aging* **19**, 97–103.
- Sastre J., Pallardó F. V. and Viña J. (2003) The role of mitochondrial oxidative stress in aging. *Free Radic. Biol. Med.* **35**, 1–8.
- Schipper H. M. (2004) Heme oxygenase expression in human central nervous system disorders. *Free Radic. Biol. Med.* **37**, 1995–2011.
- Schipper H. M., Bernier L., Mehindate K. and Frankel D. (1999) Mitochondrial iron sequestration in dopamine-challenged astroglia: role of heme oxygenase-1 and the permeability transition pore. *J. Neurochem.* **72**, 1802–1811.
- Schipper H. M., Bennett D. A., Liberman A., Bienias J. L., Schneider J. A., Kelly J. and Arvanitakis Z. (2006) Glial heme oxygenase-1 expression in Alzheimer and mild cognitive impairment. *Neurobiol. Aging* **27**, 252–261.
- Sebastiá J., Cristófol R., Pertusa M., Vilchez D., Torán N., Barambio S., Rodríguez-Farré E. and Sanfeliu C. (2004) Down's syndrome astrocytes have greater antioxidant capacity than euploid astrocytes. *Eur. J. Neurosci.* **20**, 2355–2366.
- Segovia G., Porras A., Del Arco A. and Mora F. (2001) Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech. Ageing Dev.* **122**, 1–29.
- Sheng J. G., Mrak R. E., Rovnaghi C. R., Kozłowska E., Van Eldik L. J. and Griffin W. S. T. (1996) Human brain S100 $\beta$  and S100 $\beta$  mRNA expression increases with age: pathogenic implications for Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **17**, 359–363.
- Sheng J. G., Mrak R. E., Bales K. R., Cordell B., Paul S. M., Jones R. A., Woodward S., Zhou X. Q., McGinness J. M. and Griffin W. S. T. (2000) Overexpression of the neurotrophic cytokine S100 $\beta$  precedes the appearance of neuritic  $\beta$ -amyloid plaques in APPV717F mice. *J. Neurochem.* **74**, 295–301.
- Siqueira I. R., Fochesatto C., De Andrade A., Santos M., Hagen M., Bello-Klein A. and Netto C. A. (2005) Total antioxidant capacity is impaired in different structures from aged brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* **23**, 663–671.
- Sitar S. M., Hanifi-Moghaddam P., Gelb A., Cechetto D. F., Siushansian R. and Wilson J. X. (1999) Propofol prevents peroxide-induced inhibition of glutamate transport in cultured astrocytes. *Anesthesiology* **90**, 1446–1453.
- Slater T. F., Sawyer B. and Straeuli U. (1963) Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim. Biophys. Acta* **77**, 383–393.
- Son E., Jeong J., Lee J., Jung D. Y., Cho G. J., Choi W. S., Lee M.-S., Kim S.-H., Kim I. K. and Suk K. (2005) Sequential induction of heme oxygenase-1 and manganese superoxide dismutase protects cultured astrocytes against nitric oxide. *Biochem. Pharmacol.* **70**, 590–597.
- Song W., Su H., Song S., Paudel H. K. and Schipper H. M. (2006) Over expression of heme oxygenase-1 promotes oxidative mitochondrial damage in rat astroglia. *J. Cell. Physiol.* **206**, 655–663.
- Suttner D. M. and Dennery P. A. (1999) Reversal of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-related cytoprotection with increased expression is due to reactive iron. *FASEB J.* **13**, 1800–1809.
- Takada J., Ooboshi H., Yao H., Kitazono T., Ibayashi S. and Iida M. (2003) Adenovirus-mediated gene transfer to ischemic brain is augmented in aged rats. *Exp. Gerontol.* **38**, 423–429.
- Toescu E. C. and Verkhratsky A. (2003) Neuronal ageing from an intraneuronal perspective: roles of endoplasmic reticulum and mitochondria. *Cell Calcium* **34**, 311–323.
- Tramontina F., Conte S., Gonçalves D., Gottfried C., Portela L. V., Vinade L., Salbego C. and Gonçalves C. A. (2002) Developmental changes in S100 $\beta$  content in brain tissue, cerebrospinal

## Reduced neuroprotection by aged astrocytes 805

- fluid, and astrocyte cultures of rats. *Cell. Mol. Neurobiol.* **3**, 373–378.
- Trotti D., Rizzini B. L., Rossi D., Haugeto O., Racagni G., Danbolt N. C. and Volterra A. (1997) Neuronal and glial glutamate transporters possess an SH-based redox regulatory mechanism. *Eur. J. Neurosci.* **9**, 136–1243.
- Uttenthal L. O., Alonso D., Fernández A. P. *et al.* (1998) Neuronal and inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine immunoreactivities in the cerebral cortex of the aging rat. *Microsc. Res. Tech.* **43**, 75–88.
- Volterra A., Trotti D., Tromba C., Floridi S. and Racagni G. (1994) Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes. *J. Neurosci.* **14**, 2924–2932.
- Westphalen R. I., Scott H. L. and Dodd P. R. (2003) Synaptic vesicle transport and synaptic membrane transporter sites in excitatory amino acid nerve terminals in Alzheimer disease. *J. Neural Transm.* **110**, 1013–1027.
- Wu Y., Zhang A. Q. and Yew D. T. (2005) Age related changes of various markers of astrocytes in senescence-accelerated mice hippocampus. *Neurochem. Int.* **46**, 565–574.

## 2. SEGUNDO ARTÍCULO

---

# Dysfunction of astrocytes in senescence-accelerated mice SAMP8 reduce their neuroprotective capacity

S. García-Matas<sup>1</sup>, J. Gutierrez-Cuesta<sup>2</sup>, A. Coto-Montes<sup>3</sup>, R. Rubio-Acero<sup>1</sup>,  
C. Díez-Vives<sup>1</sup>, A. Camins<sup>2</sup>, M. Pallàs<sup>2</sup>, C. Sanfeliu<sup>1</sup> and R. Cristòfol<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departament of Pharmacology and Toxicology, Institut d' Investigacions Biomèdiques de Barcelona, CSIC-IDIBAPS, Barcelona, Spain

<sup>2</sup> Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>3</sup> Department of Morphology and Cellular Biology, Faculty of Medicine, University of Oviedo, Oviedo, Spain

Publicado en *Aging Cell*, 2008, 7, 630-640

## RESUMEN

En etapas tempranas de los cerebros de ratones de senescencia acelerada (SAMP8) hay un incremento del estrés oxidativo y de la patología de tau. Los astrocitos desempeñan un importante papel, tanto en determinar la susceptibilidad cerebral al daño oxidativo como en la protección de las neuronas. En este trabajo, hemos estudiado los cambios en la fosforilación de tau, el estrés oxidativo y la captación de glutamato en cultivos primarios de astrocitos de la corteza de ratones neonatos SAMP8 comparados con los de ratones resistentes a la senescencia (SAMR1). Hemos demostrado un incremento de las formas anormales de fosforilación de tau en Ser<sup>199</sup> y Ser<sup>396</sup> en los astrocitos SAMP8 comparado con la de los ratones controles SAMR1. La actividad quinasa de Gsk3 $\beta$  y Cdk5, que regulan la fosforilación de tau, también está incrementada en los astrocitos de SAMP8. La inhibición de Gsk3 $\beta$  por litio o la de Cdk5 por roscovitina reducen la fosforilación de tau en Ser<sup>396</sup>. Además, hemos detectado un incremento de la generación del radical superóxido, que puede ser responsable del correspondiente incremento en la lipoperoxidación y la oxidación proteica. También hemos observado una reducción en el potencial de membrana mitocondrial en los astrocitos de los ratones SAMP8. La captación de glutamato en los astrocitos es un mecanismo crítico para el mecanismo de neuroprotección. Los astrocitos SAMP8 muestran una disminución en la captación de glutamato comparada con la de los controles SAMR1. Interesantemente, la supervivencia de las neuronas SAMP8 y SAMR1 en cocultivo con astrocitos SAMP8 estaba reducida de manera significativa. Nuestros resultados indican que las alteraciones de los cultivos de astrocitos de ratones SAMP8 son muy similares a las encontradas en los cerebros de los ratones SAMP8 de 1-5 meses. Además, nuestros resultados sugieren que estas preparaciones in vitro son adecuadas para el estudio a nivel molecular y celular de los procesos subyacentes en el envejecimiento temprano de este modelo murino. Es más, nuestro estudio apoya el argumento de que los astrocitos tienen un papel clave en la neurodegeneración durante el proceso de envejecimiento.

## Dysfunction of astrocytes in senescence-accelerated mice SAMP8 reduces their neuroprotective capacity

Silvia García-Matas,<sup>1</sup> Javier Gutierrez-Cuesta,<sup>2</sup>  
Ana Coto-Montes,<sup>3</sup> Raquel Rubio-Acero,<sup>1</sup>  
Cristina Díez-Vives,<sup>1</sup> Antoni Camins,<sup>2</sup> Mercè Pallàs,<sup>2</sup>  
Coral Sanfeliu<sup>1</sup> and Rosa Cristófol<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology and Toxicology, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, CSIC-IDIBAPS, E-08036 Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain

<sup>3</sup>Department of Morphology and Cellular Biology, Faculty of Medicine, University of Oviedo, 33006 Oviedo, Spain

### Summary

Early onset increases in oxidative stress and tau pathology are present in the brain of senescence-accelerated mice prone (SAMP8). Astrocytes play an essential role, both in determining the brain's susceptibility to oxidative damage and in protecting neurons. In this study, we examine changes in tau phosphorylation, oxidative stress and glutamate uptake in primary cultures of cortical astrocytes from neonatal SAMP8 mice and senescence-accelerated-resistant mice (SAMR1). We demonstrated an enhancement of abnormally phosphorylated tau in Ser<sup>199</sup> and Ser<sup>396</sup> in SAMP8 astrocytes compared with that of SAMR1 control mice. Gsk3 $\beta$  and Cdk5 kinase activity, which regulate tau phosphorylation, was also increased in SAMP8 astrocytes. Inhibition of Gsk3 $\beta$  by lithium or Cdk5 by roscovitine reduced tau phosphorylation at Ser<sup>396</sup>. Moreover, we detected an increase in radical superoxide generation, which may be responsible for the corresponding increase in lipoperoxidation and protein oxidation. We also observed a reduced mitochondrial membrane potential in SAMP8 mouse astrocytes. Glutamate uptake in astrocytes is a critical neuroprotective mechanism. SAMP8 astrocytes showed a decreased glutamate uptake compared with those of SAMR1 controls. Interestingly, survival of SAMP8 or SAMR1 neurons cocultured with SAMP8 astrocytes was significantly reduced. Our results indicate that alterations in astrocyte cultures from SAMP8 mice are similar to those detected in whole brains of SAMP8 mice at 1–5 months. Moreover, our findings

suggest that this *in vitro* preparation is suitable for studying the molecular and cellular processes underlying early aging in this murine model. In addition, our study supports the contention that astrocytes play a key role in neurodegeneration during the aging process.

**Key words:** Astrocytes; glutamate uptake; neuroprotection; oxidative stress; senescence-accelerated mice; tau protein.

### Introduction

The senescence-accelerated mouse (SAM) is comprised of a group of 12 strains developed from selective inbreeding of the AKR/J strain constructed by Takeda *et al.* (1981). The senescence-accelerated mouse prone-8 (SAMP8) strain manifests irreversible advancing senescence with pathological, biochemical and behavioural alterations, whereas the senescence-accelerated mice resistant-1 (SAMR1) strain presents a normal aging pattern (Takeda, 1999). For SAMP8 and SAMR1 strains, the median lifespans have been reported as 10 and 18.9 months of age, respectively (Takeda *et al.*, 1994). Interestingly, the former exhibits age-related learning and memory deficits, as well as  $\beta$ -amyloid-like deposits in the brain (Flood & Morley, 1998; Chen *et al.*, 2004). Furthermore, increases in hyperphosphorylated tau and cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) expressions and activation have also been detected in SAMP8 mice (Canudas *et al.*, 2005). For these reasons, SAMP8 mice are regarded as a suitable rodent model for studying the molecular mechanisms underlying cognitive impairment in aged subjects.

The free radical theory of aging contends that oxidative alterations in biomolecules brought about by reactive oxygen species (ROS) contribute to cellular dysfunction during aging (Harman, 1956). Indeed, increasing evidence of elevated oxidative stress in the aged SAMP8 brain has been reported. Increased levels of lipoperoxidation, carbonyl proteins and ROS in the brain of SAMP8 mice have been observed, together with learning and memory deficits as early as 1–5 months of age (Liu & Mori, 1993; Sato *et al.*, 1996a,b; Kurokawa *et al.*, 2001; Yasui *et al.*, 2002, 2003; Farr *et al.*, 2003; Poon *et al.*, 2004a; Alvarez-García *et al.*, 2006). In addition, chronic administration of antioxidants, such as melatonin,  $\alpha$ -lipoic acid, N-acetylcysteine and acetyl-L-carnitine, to SAMP8 mice not only reduced oxidative damage to neural lipids and proteins, but also lessened cognitive deficits (Okatani *et al.*, 2002; Yasui *et al.*, 2002; Farr *et al.*, 2003; Poon *et al.*, 2005). Decreases in superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase and glutathione peroxidase activities, as well as increases in acyl-CoA oxidase, which have been detected early in SAMP8 mice (1–12 months) compared with age-matched SAMR1 controls (Sato *et al.*, 1996b; Kurokawa *et al.*, 2001; Okatani *et al.*, 2002; Alvarez-García

### Correspondence

Rosa Cristófol, Department of Pharmacology and Toxicology, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, CSIC-IDIBAPS, Roselló 161, 6 floor, 08036-Barcelona, Spain. Tel.: +34 933638300; fax: +34-933638301; e-mail: rcmfat@iibb.csic.es

Accepted for publication 29 May 2008



*et al.*, 2006; Sureda *et al.*, 2006), may cause elevated generation of ROS. On the other hand, ROS generated by mitochondria or from other cell sites not only cause damage to mitochondrial components and DNA, but also trigger degradative processes that contribute to the aging process (Cadenas & Davies, 2000; Manczak *et al.*, 2005). In fact, mitochondrial DNA deletions as well as inefficient mitochondrial hyperactivity were found in the brain of 4- to 8-week-old SAMP8 mice (Fujibayashi *et al.*, 1998; Nishikawa *et al.*, 1998). Differential gene expression profile in 12-month-old SAMP8 hippocampus revealed up-regulation of cytochrome *c* oxidase subunit I and III from the respiratory chain (Cheng *et al.*, 2006).

Astrocytes play an essential role not only in maintaining normal brain physiology, but also in the brain's defence against oxidative damage (for a review, see Cotrina & Nedergaard, 2002). Astrocytes possess a great number of antioxidant systems, including glutathione, glutathione transferase, catalase and superoxide dismutase enzymes (Makar *et al.*, 1994; Dringen *et al.*, 2000). Although they are able to protect neurons from hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) toxicity (Deshager *et al.*, 1996), astrocytes remain vulnerable to oxidative stress, since they react to low concentrations of  $H_2O_2$  generating ROS and lipoperoxidation, and increasing antioxidant defences (Röhrdanz *et al.*, 2001). Furthermore, astrocytes are primarily responsible for clearing extracellular glutamate, thereby preventing neuronal excitotoxicity (for a review, see Anderson & Swanson, 2000). Thus, alterations in all these systems during aging may potentially reduce the neuroprotective capacity of astrocytes, further contributing to neurodegeneration. In fact, increasing evidence suggests that astrocytes play a significant role in neuronal aging. Heightened expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and S100  $\beta$  protein have been detected during aging in regions of the mouse and rat brain (O'Callaghan & Miller, 1991; Kohama *et al.*, 1995; Amenta *et al.*, 1998), as well as in mouse and rat cortical astrocytes aged in culture (Papadopoulos *et al.*, 1998; Gottfried *et al.*, 2002; Tramontina *et al.*, 2002; Pertusa *et al.*, 2007). Superoxide production, lipoperoxidation, protein oxidation, and iron staining remained elevated in aged astrocyte cultures, even though antioxidant defences had been maintained or increased (Papadopoulos *et al.*, 1998; Gottfried *et al.*, 2002; Klamt *et al.*, 2002; Pertusa *et al.*, 2007). Mitochondrial membrane potential in old astrocytes proved more depolarized than in young astrocytes (Lin *et al.*, 2006). Furthermore, changes in glial glutamate uptake have been observed during brain aging (for a review, see Segovia *et al.*, 2001). In aged astrocytes in culture, glutamate uptake was more vulnerable to inhibition by  $H_2O_2$  exposition (Gottfried *et al.*, 2002; Pertusa *et al.*, 2007). Recent studies have shown that PC12 cells co-cultured with old astrocytes were more sensitive to the oxidant *tert*-buthyl  $H_2O_2$  than those co-cultured with young astrocytes (Lin *et al.*, 2006). In addition, we have shown that astrocytes aged *in vitro* have a reduced ability to maintain neuronal survival (Pertusa *et al.*, 2007).

Until now, pathological neuronal dysfunction has been regarded as the main mechanism underlying the cognitive

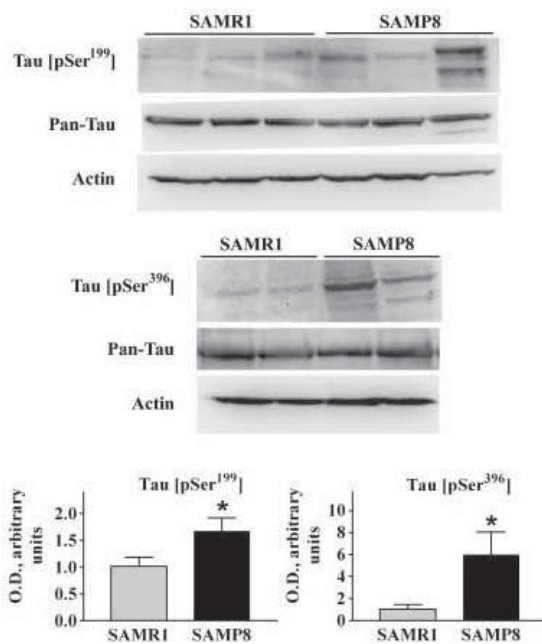
deficits in SAMP8 mice. However, some evidence suggests that altered astrocytes contribute to the accelerated senescence noted in this animal model. Increased astrogliosis and microgliosis have been reported in the hippocampus and cerebral cortex of SAMP8 mice (Nomura *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2005). In addition, D-serine, a glial modulator of nerve cells, is reportedly involved in the long term potentiation (LTP) dysfunction recorded in hippocampal slices from 12-month-old SAMP8 (Yang *et al.*, 2005a). The aim of this study was to explore whether SAMP8 astrocytes exhibit aged-related characteristics consistent with a possible role in the biochemical and behavioural alterations observed in aged SAMP8 mice. The study was performed in cortical astrocytes since many senescence-related biochemical changes of SAMP8 mice have been described in this brain area, as mentioned above. In SAMP8 astrocytes, we found hyperphosphorylation in some forms of tau, protein kinase Gsk3 $\beta$  and Cdk5 activation, and increases in overall oxidative stress status. Glutamate uptake in primary cultures of cortical astrocytes from SAMP8 mice was decreased compared to that from SAMR1 mice. We also explored the neuroprotective capacity of SAMR1 and SAMP8 astrocytes in co-cultures with cortical neurons from both strains. Here, we have demonstrated that SAMP8 astrocytes suffer reduced neuroprotective abilities.

## Results

### Changes in tau, Gsk3 $\beta$ and Cdk5 protein expression in SAMP8 astrocytes

The hyperphosphorylation of tau was evaluated by Western blot using two phosphorylation-dependent and site-specific antibodies against tau in SAMR1 and SAMP8 astrocytes. Densitometric analysis of the immunoblots in SAMP8 astrocytes showed a statistically significant increase in phosphorylated tau at Ser<sup>199</sup>/Ser<sup>396</sup> sites compared with SAMR1 controls (Fig. 1). The expression of two Ser/Thr protein kinases involved in regulating tau phosphorylation, Gsk3 $\beta$  and Cdk5, was also determined by Western blot. We detected a significant increase in phosphorylated Gsk3 $\beta$  at Tyr<sup>216</sup> (active form) and a significant decrease at Ser<sup>9</sup> (inactive form) in SAMP8 astrocytes compared with SAMR1 (Fig. 2a). These results indicated activation of Gsk3 $\beta$  kinase in SAMP8 astrocytes in culture. Figure 3(a) shows that Cdk5 immunoblots in SAMP8 and SAMR1 astrocytes were not significantly different, indicating similar Cdk protein expression for both strains. The induction of Cdk5 kinase activity was determined using p25/p35 labeling. The expression of p35 was decreased while that of p25 increased in SAMP8 compared with SAMR1. The calculated p25/p35 ratio showed increased Cdk5 activity in SAMP8 astrocyte cultures. When SAMP8 astrocyte cultures were treated for 48 h with 10 mM lithium, a specific inhibitor of Gsk3 $\beta$  activity, a significant increase and decrease of phosphorylated Gsk3 $\beta$  at Ser<sup>9</sup> and Tau at Ser<sup>396</sup>, respectively, was detected (Fig. 2b). Roscovitine (15  $\mu$ M), a non-specific Cdk5 kinase inhibitor, showed a tendency to decrease the p25/p35 ratio ( $p = 0.2163$ ) and tau phosphorylation at Ser<sup>396</sup> ( $p = 0.1375$ )

632 Reduced neuroprotection by SAMP8 astrocytes, S. García-Matas *et al.*

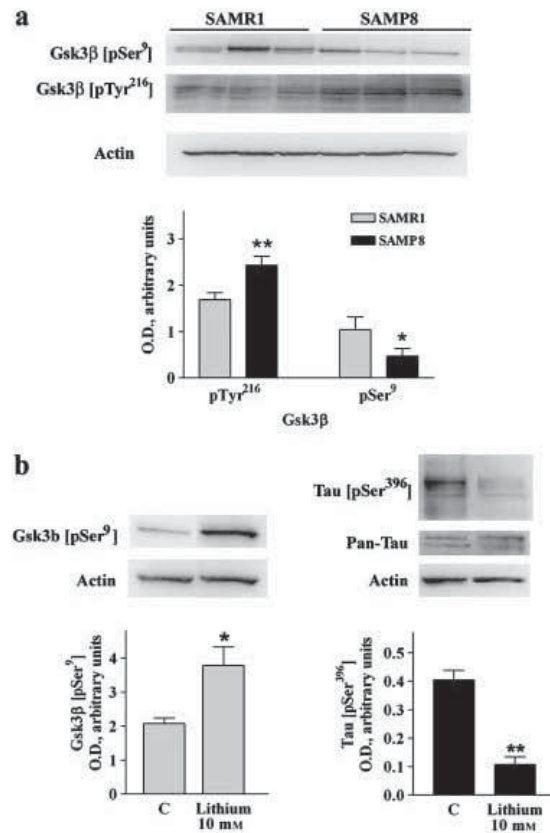


**Fig. 1** Representative immunoblots and densitometry analysis of tau protein phosphorylation in SAMR1 and SAMP8 astrocyte cultures. Tau phosphorylation was assessed using phosphorylation-dependent antibodies anti-tau [pSer<sup>199</sup>] and anti-tau [pSer<sup>396</sup>]. Graphs summarize the results from five separate experiments. The immunoreactivity levels of each band in the SAMR1 and SAMP8 cultures were first normalized to that of the corresponding Pan-Tau and then to  $\beta$ -actin. Both phosphorylated protein levels were increased in SAMP8 astrocyte cultures. Data were compared using the Student's *t*-test (\**p* < 0.05).

in SAMP8 astrocytes (Fig. 3b). Roscovitine effects did not reach statistical significance due to the high variability found between samples from different cultures.

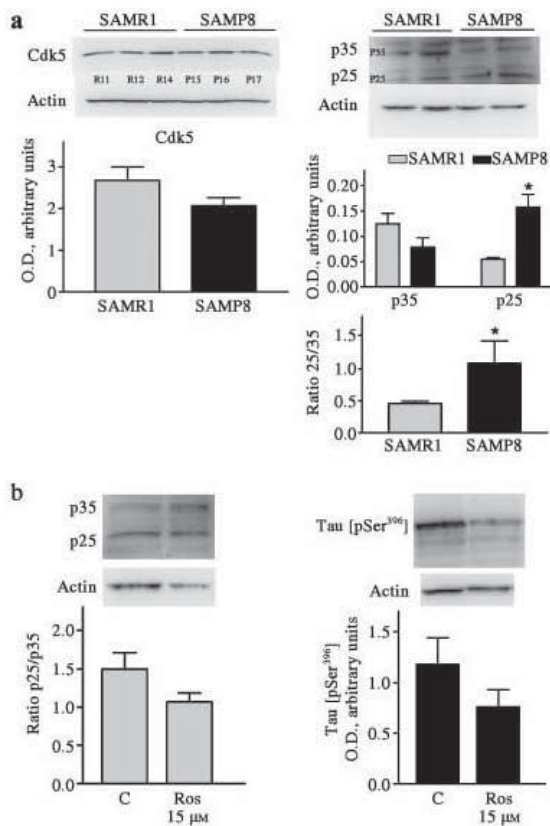
**Oxidative stress increase and mitochondrial membrane potential decrease in SAMP8 astrocytes**

Basal levels of superoxide anion radical generated for 1 h in SAMR1 and SAMP8 astrocytes were determined via a hydroethidium probe. As shown in Fig. 4, SAMP8 cultures produced significantly more superoxide radical than did those of SAMR1. No differences were observed between the two strains in terms of hydroperoxide generation (data not shown). The main source of superoxide radical production is the mitochondrial electron transport chain that occurs during normal respiration. Mn-superoxide dismutase transforms superoxide radical into H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which may diffuse through the mitochondrial membrane to the cytoplasm. As H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can be transformed into harmful radicals, increased generation of these oxidants may cause lipid and protein oxidation. Figure 5(a) shows significantly increased production of lipoperoxidation, as measured by malondialdehyde and 4-hydroxyalkenal accumulation, in SAMP8 astrocytes vs. SAMR1. Protein carbonyl formation, which is indicative of pro-

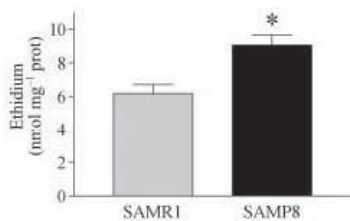


**Fig. 2** (a) Representative immunoblots and densitometry analysis of Gsk3 $\beta$  protein phosphorylation in SAMR1 and SAMP8 astrocyte cultures. Gsk3 $\beta$  phosphorylation was assessed using phosphorylation-dependent antibodies anti-Gsk3 $\beta$  [pSer<sup>9</sup>] and anti-Gsk3 $\beta$  [pTyr<sup>216</sup>]. Graphs summarize the results from three to seven separate experiments. The immunoreactivity levels of each band in the SAMR1 and SAMP8 cultures were normalized to that of the corresponding  $\beta$ -actin. The protein levels of Gsk3 $\beta$  [pTyr<sup>216</sup>] and Gsk3 $\beta$  [pSer<sup>9</sup>] increased and decreased, respectively, in SAMP8 astrocyte cultures vs. SAMR1. (b) Effects of the Gsk3 $\beta$  inhibitor lithium (10 mM, 48 h) on Gsk3 $\beta$  phosphorylation at Ser<sup>9</sup> and tau phosphorylation at Ser<sup>396</sup> in the SAMP8 astrocyte cultures. Graphs summarize the results from three to four separate experiments. The immunoreactivity levels of tau pSer<sup>396</sup> were first normalized to that of the corresponding Pan-Tau and then to  $\beta$ -actin. Lithium increased Gsk3 $\beta$  phosphorylation at Ser<sup>9</sup>, indicating enzyme activity inhibition, and decreased tau phosphorylation at Ser<sup>396</sup>. Data were compared using the Student's *t*-test (\**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01).

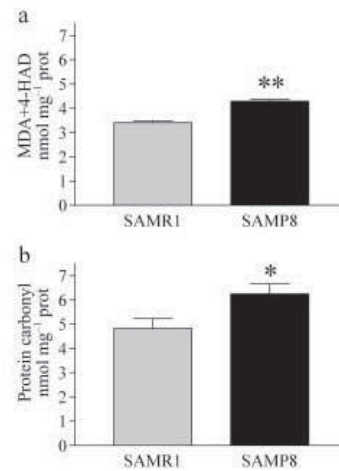
tein oxidation and protein damage, was significantly elevated in SAMP8 compared with those of SAMR1 (Fig. 5b). Enhanced free radical production may be related to changes in mitochondrial membrane potential. Therefore, we measured the accumulation of the fluorescent dye rhodamine 123, which is dependent on membrane potential, in SAMR1 and SAMP8 astrocyte cultures. SAMP8 astrocytes exhibited a significant reduction in the basal uptake of rhodamine 123 compared with SAMR1 astrocytes, indicative of lower mitochondrial membrane potential in those cultures (Fig. 6).



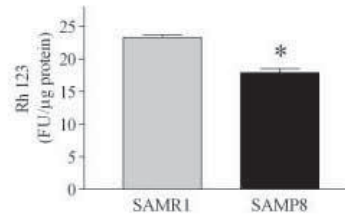
**Fig. 3** (a) Representative immunoblots and densitometry analysis of Cdk5, p35 and p25 proteins in SAMR1 and SAMP8 astrocyte cultures. Graphs summarize the results from three to five separate experiments. The immunoreactivity levels of each band in the SAMR1 and SAMP8 cultures were normalized to that of the corresponding β-actin. SAMP8 and SAMR1 Cdk5 protein levels were not different. The p25/p35 ratio indicated a decrease in p35 band intensity, which resulted in an increase in p25 band intensity in SAMP8 astrocytes. (b) Effects of the Cdk5 inhibitor roscovitine (15 μM, 48 h) on p35 and p25 proteins and tau phosphorylation at Ser<sup>206</sup> in the SAMP8 astrocyte cultures. Graphs summarize the results from 3–4 separate experiments. The immunoreactivity levels of tau pSer<sup>206</sup> were first normalized to that of the corresponding Pan-Tau and then to β-actin. Roscovitine slightly decreased the p25/p35 ratio ( $p = 0.2163$ ) and tau phosphorylation at Ser<sup>206</sup> ( $p = 0.1375$ ). Data were compared using the Student's *t*-test (\* $p < 0.05$ ).



**Fig. 4** Intracellular superoxide anion radical generation after 1 h in SAMR1 and SAMP8 astrocyte cultures, as measured by dihydroethidium oxidation to ethidium. Results are expressed as nmol of ethidium mg<sup>-1</sup> of protein and represent the mean ± SEM of three independent cultures. SAMP8 cultures generated significantly more superoxide radicals than did SAMR1 cultures. \* $p < 0.01$  compared with SAMR1 astrocytes by the Student's *t*-test.



**Fig. 5** Lipoperoxidation and carbonyl proteins in SAMR1 and SAMP8 astrocyte cultures. Lipoperoxidation (a) was expressed as nmol of malondialdehyde plus 4-hydroxyalkenal mg<sup>-1</sup> of protein and carbonyl proteins (b) were expressed as nmol of protein carbonyl mg<sup>-1</sup> of protein. Results represent the mean ± SEM of six independent cultures. We observed significantly more lipid and protein damage in SAMP8 cultures than in SAMR1 cultures. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.0001$  compared with SAMR1 astrocytes using the Student's *t*-test.

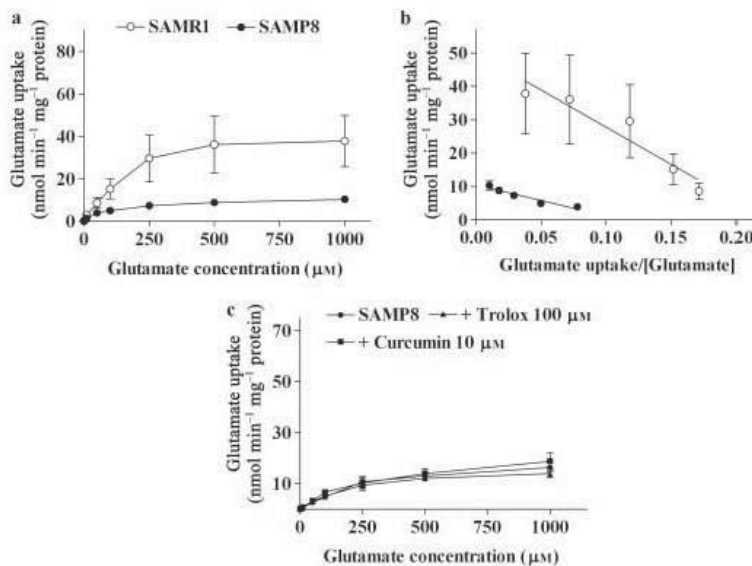


**Fig. 6** Mitochondrial membrane potential in SAMR1 and SAMP8 astrocyte cultures, as measured by the fluorescent dye rhodamine 123 (Rh 123). Results are expressed as fluorescence units (FU) of Rh 123 per μg of protein and represent the mean ± SEM of three independent cultures. SAMP8 astrocytes showed a reduced basal rhodamine 123 uptake. \* $p < 0.01$  compared with SAMR1 astrocytes using the Student's *t*-test.

**Decreased glutamate uptake in SAMP8 astrocytes**

The ability of astrocytes to uptake glutamate was evaluated in SAMR1 and SAMP8 cultures using an isotopic method with several glutamate concentrations. Figure 7(a) shows that glutamate uptake in SAMP8 astrocyte cultures was significantly lesser than in SAMR1 cultures. Kinetic parameters obtained from Eadie-Hofstee analysis revealed a statistically significant decrease in *K<sub>m</sub>* (92.78 ± 15.15 μM for SAMP8 and 222.2 ± 42.09 μM for SAMR1,  $p < 0.05$ ) and *V<sub>max</sub>* (10.49 ± 0.67 nmol protein<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> for SAMP8 and 49.99 ± 5.09 nmol mg<sup>-1</sup> protein min<sup>-1</sup> for SAMR1,  $p < 0.0001$ ) values in SAMP8 astrocytes (Fig. 7b). SAMP8 astrocytes treated with 100 μM trolox or 10 μM curcumin throughout the culture time period did not undergo a reversal of glutamate uptake inhibition (Fig. 7c). Expression of the glutamate-aspartate

634 Reduced neuroprotection by SAMP8 astrocytes, S. García-Matas et al.



**Fig. 7** (a) Glutamate uptake in SAMR1 and SAMP8 astrocyte cultures. Astrocytes were incubated with 9.8 nM [<sup>3</sup>H]-glutamate and several concentrations of unlabelled glutamate as described in the Experimental procedures. Each point represents the mean ± SEM of five to eight determinations. Two-way analysis of variance followed by Bonferroni's test showed that strain ( $F_{1,107} = 23.95, p < 0.0001$ ) and glutamate concentration ( $F_{8,107} = 9.63, p < 0.0001$ ) had a significant effect. (b) Values from (a) (glutamate uptake and unlabelled glutamate concentrations from SAMR1 and SAMP8 astrocytes) were used to construct the Eadie-Hofstee representation to calculate  $K_m$  and  $V_{max}$  kinetic parameters. There was a significant decrease in the  $K_m$  and  $V_{max}$  values of glutamate uptake in SAMP8 astrocyte cultures (see Results). (c) Glutamate uptake in SAMP8 astrocytes treated during the culture period with 100 μM trolox or 10 μM curcumin. No significant effects were observed.

transporter (GLAST) was examined by Western blot and no changes were observed between SAMP8 and SAMR1 astrocytes (data not shown).

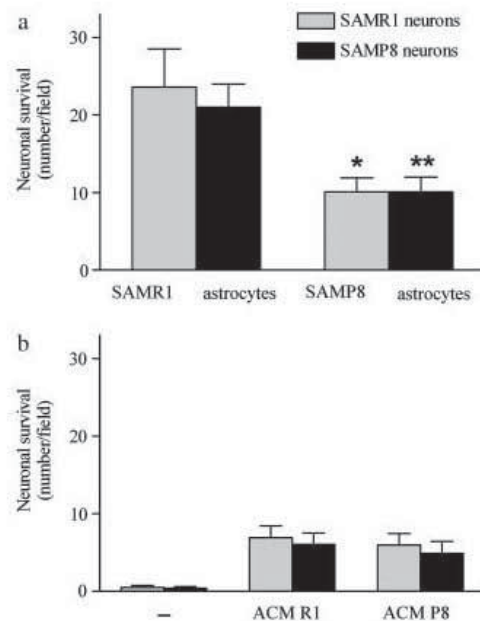
**SAMP8 astrocytes show reduced neuroprotective capacity**

The neuroprotective capacity of astrocytes was evaluated in co-cultures with cortical neurons by determining neuronal survival. Living neurons were identified by staining in co-cultures of SAMR1 or SAMP8 neurons seeded on a monolayer of either SAMR1 or SAMP8 astrocytes for 12 days. Thereafter, the number of living cells, either in SAMR1 or SAMP8 neurons, proved to be less in SAMP8 astrocyte co-cultures than in those of SAMR1 (Fig. 8a). These results revealed that SAMP8 astrocytes suffered a reduced neuroprotective capacity. No differences were found in the number of living neurons from SAMR1 or SAMP8 mice co-cultured with SAMP8 astrocytes. When SAMR1 and SAMP8 neurons were cultured in the presence of astrocyte-conditioned medium from SAMR1 or SAMP8 mice, their survival was higher than in the absence of astrocytes but lower than in co-cultures, and was similar for both types of astrocytes (Fig. 8b). These results suggested that differences in neuroprotective capacity are not due to a soluble compound secreted by astrocytes to the medium.

Taking into account the high astrocyte enrichment of the cultures, alterations observed in this work were attributed to the astrocyte population. However, some small contribution of contaminant microglial cells cannot be discarded.

**Discussion**

Although mainly present in neuronal cells, tau protein has also been found in the astrocytes and oligodendrocytes of some neural diseases (for review, see Avila et al., 2004). It has been



**Fig. 8** Neuronal survival of SAMR1 and SAMP8 neurons in the presence of (a) astrocytes or (b) astrocyte-conditioned medium (ACM) from SAMR1 and SAMP8 mice. Cortical neurons were cultured on a monolayer of SAMR1 and SAMP8 astrocyte cultures or with 48 h ACM for 12 days. Living neurons in both conditions were identified by cell staining using NeuN or NF antibody and propidium iodide. Results are expressed as the number of living neurons by field and represent the mean ± SEM of seven independent co-cultures. Number of astrocytes by field is  $230 \pm 13$  and  $237 \pm 16$  for SAMR1 and SAMP8 astrocytes, respectively. Data were compared using the Student's *t*-test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  related to co-cultures of neurons and SAMR1 astrocytes).

largely demonstrated that the hyperphosphorylation of tau reduces its binding to microtubules, thereby resulting in neurofibrillary degeneration. This process occurs systematically in the neurons of human entorhinal and hippocampal regions during aging

(Delacourte *et al.*, 2002, 2003). Recently, several authors reported an age-dependent pattern of glial tau aggregation in both human and baboon brains (Schultz *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2005b). Previous studies have shown that hyperphosphorylation of tau occurs in the brain of SAMP8 mice at 5 months of age (Canudas *et al.*, 2005; Sureda *et al.*, 2006). Consistent with these data, the present study has demonstrated increased tau phosphorylation at Ser<sup>199</sup> and Ser<sup>396</sup> in SAMP8 astrocyte cultures obtained from neonate brain, as compared with those of SAMR1 mice. Both sites have been shown to be phosphorylated *in vitro* by several protein kinases, such as Cdk5 and Gsk3 $\beta$  (see the review by Gong *et al.*, 2005). Our results showed an increase and decrease of the active (pTyr<sup>279</sup>) and inactive (pSer<sup>9</sup>) form, respectively, of Gsk3 $\beta$  in SAMP8 vs. SAMR1, thus indicating activation of this enzyme. In addition, an increase in the p25/p35 ratio in SAMP8 astrocytes also denoted activation of the Cdk5 kinase. It is worth noting that the presence of functional Cdk5/p35 in murine cortical astrocyte cultures was recently reported by He *et al.* (2007). Therefore, both protein kinases may be responsible for the hyperphosphorylation of tau in SAMP8 astrocytes. The increase of Cdk activity was in agreement with the results in early senescent SAMP8 brains reported in the above-mentioned study of Canudas *et al.* (2005). On the other hand, no changes were reported in the phosphorylation at pTyr<sup>279</sup> and pSer<sup>9</sup> sites of Gsk3 $\beta$  between SAMP8 and SAMR1 brain. We cannot discard an increase of Gsk3 $\beta$  kinase activity in the absence of Gsk3 $\beta$  phosphorylation changes in senescent mice *in vivo*, according to the findings in old p25 transgenic mice with constant Cdk5 over-activation (Plattner *et al.*, 2006). Therefore, in brains of early senescent SAMP8, Gsk3 $\beta$  kinase activity might be enhanced through Cdk5 activation. If this were the case, Gsk3 $\beta$  phosphorylation changes in astrocyte cultures would be indicative of inconsequential differences in the pathways of tau hyperphosphorylation as related to the brain tissue. The hyperphosphorylation of tau in cultures of SAMP8 neonate astrocytes may be considered as an early signal of an aging-related pathological process. The biological significance of astrocytic tau pathology in aging remains largely unknown. In certain diseases characterized by tau-based neurofibrillary pathology (tauopathies), tau aggregation in astrocytes appears to have no link with gliosis and, in fact, has been regarded as a degenerative process (Togo & Dickson, 2002). Moreover, a transgenic mouse model of human tau expression in astrocytes has shown an age-dependent pathology with abnormal tau phosphorylation leading to a focal neuron degeneration (Forman *et al.*, 2005).

The regulation of tau hyperphosphorylation at different sites by protein kinases is a complex mechanism not well known, that probably requires the synergistic action of two or more kinases (Sengupta *et al.*, 2006). Li *et al.* (2006) reported that Cdk5 phosphorylates tau at S<sup>404</sup> and enhances Gsk3 $\beta$ -catalysed tau phosphorylation at S<sup>400</sup> and S<sup>396</sup>, suggesting that Cdk5 primes tau for Gsk3 $\beta$  in the brain. In our work, tau hyperphosphorylation at S<sup>396</sup> was reduced by lithium and roscovitine, indicating a directly Gsk3 $\beta$ - and Cdk5-mediated tau hyperphosphorylation at this site in SAMP8 astrocytes. However, we cannot discard

that Gsk3 $\beta$ -mediated tau hyperphosphorylation at Ser<sup>396</sup> in SAMP8 astrocytes were a consequence of Cdk5-mediated phosphorylation at other sites in tau, as has been reported by Li *et al.* (2006) in rat brain. Further studies are necessary to identify the precise mechanisms underlying the hyperphosphorylation of tau in SAMP8 astrocytes.

There is wide consensus that free radicals are involved in the damaging processes associated with brain aging (Poon *et al.*, 2004b). Interestingly, there is significant evidence that SAMP8 mice (age 1–5 months) possess a more elevated oxidative status compared with SAMR1 controls (Liu & Mori, 1993; Sato *et al.*, 1996a,b; Kurokawa *et al.*, 2001; Yasui *et al.*, 2002, 2003; Farr *et al.*, 2003; Poon *et al.*, 2004a; Alvarez-García *et al.*, 2006). In the current study, we demonstrated that SAMP8 astrocyte cultures present increased superoxide radical generation, lipoperoxidation and carbonyl proteins vs. SAMR1, which is consistent with *in vivo* studies. Elevated oxidative stress and abnormally phosphorylated tau in SAMP8 astrocytes suggest that neonatal astrocytes matured in culture acquire characteristics similar to those observed *in vivo* in the brains of senescent SAMP8 mice. Thus, SAMP8 astrocyte cultures offer an effective model for studying the molecular and cellular processes underlying aging. Furthermore, these results support previous hypotheses contending that glial oxidative stress is involved in the aging process. In this context, several authors have demonstrated increased superoxide production, lipoperoxidation, protein oxidation and iron staining in astrocytes aged in culture (Papadopoulos *et al.*, 1998; Gottfried *et al.*, 2002; Klamt *et al.*, 2002; Pertusa *et al.*, 2007). It has been proposed that ROS generated by mitochondria accumulate during aging and are not only responsible for the damage present in mitochondrial components, but also cause degradative processes (Cadenas & Davis, 2000; Lenaz *et al.*, 2006). Accordingly, we have detected lower mitochondrial membrane potential in SAMP8 astrocytes, which may stem from the elevated oxidative stress detected in these cultures. These results are in agreement with studies carried out by Lin *et al.* (2006) in which astrocytes cultured from older mice exhibited lower mitochondrial membrane potential than astrocytes cultured from younger mice. Age-related correlations between increases in ROS production and decreases in mitochondrial membrane potential have also been detected in hippocampal neurons cultured from old rats (Parihar & Brewer, 2007). On the other hand, our results are in agreement with those authors who observed altered mitochondrial dysfunction in SAMP8 mice. For instance, Nishikawa *et al.* (1998) detected an early stage mechanism underlying the age-associated mitochondrial dysfunction present in SAMP8 mouse brain, and Xu *et al.* (2007) reported that platelet mitochondrial membrane potential as well as hippocampal and platelet ATP content in SAMP8 mice decreased at early age compared with SAMR1. Thus, our results support the contention that mitochondrial alterations may play a key role in the aging process.

The consequences of tau pathology on astrocyte function have not been thoroughly investigated. Recently, a transgenic mouse model used to investigate tau pathology in astrocytes

revealed some loss of function as a consequence of increased tau expression and abnormally phosphorylated, ubiquitinated and filamentous tau (Forman *et al.*, 2005; Dabir *et al.*, 2006). These transgenic mice manifested neurodegeneration and reduced glutamate transport in those cerebral regions with robust astrocytic tau expression. In our own SAMP8 astrocyte cultures, we also noted decreased glutamate uptake in tandem with the above-mentioned increases in abnormally phosphorylated tau and oxidative stress. Alterations in glial glutamate transport may result from oxidative injury. Trotti *et al.* (1997) reported that glutamate transporters are vulnerable to oxidants due to the fact that they possess a redox regulatory mechanism. We were unable to reverse the inhibition of glutamate uptake in SAMP8 astrocytes using trolox and curcumin antioxidant treatments, even though we did reverse H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced glutamate uptake inhibition in astrocyte aged in culture (Pertusa *et al.*, 2007). It is possible that a different antioxidant pattern treatment is required to reverse long-time oxidative effects. On the other hand, reduced glutamate uptake in the transgenic mouse of tau pathology has been associated with a decreased expression of glial glutamate transporters (Dabir *et al.*, 2006). However, we could not detect any reduction in GLAST transporter expression in SAMP8 astrocytes. It has been suggested that alterations in the trafficking of glutamate transporters by tau pathology may lead to reduced glutamate uptake (Dabir *et al.*, 2006). Additional studies are needed to evaluate the functional consequences of tau alterations in glial glutamate transport.

The role played by astrocytes in neuronal antioxidant defence is now widely understood (Deshager *et al.*, 1996). Previous studies have demonstrated that functional alterations in astrocytes aged *in vitro* (Pertusa *et al.*, 2007) or in astrocytes cultured from old mice (Lin *et al.*, 2006) lead to reduced neuronal survival. We examined the survival of cortical neurons from SAMR1 and SAMP8 mice 12 days after co-culturing with SAMR1 and SAMP8 astrocytes. The latter were less able to protect cortical neurons from both strains than were SAMR1 astrocytes. When SAMR1 and SAMP8 neurons were cultured with astrocyte-conditioned medium from SAMR1 or SAMP8 astrocytes, similar neuronal survival was attained. Therefore, differences in neuroprotective capacity seem not to be mediated by soluble compounds released from astrocytes to medium. The attained neuroprotection was lower than that observed in co-cultures. Accordingly, it is well known that survival of neurons cultured in conditioned medium from astrocytes is significantly prolonged in relation to pure neuronal cultures, but is lower than that obtained when neurons and astrocytes are co-cultured (Bauer & Tontsch, 1990; Walsh *et al.*, 1992). This suggests that several cellular mechanisms can underlie the neuroprotective role of astrocytes in addition to soluble factors. It can be suggested that alterations in oxidative stress, mitochondrial function, glutamate uptake and/or tau phosphorylation in SAMP8 astrocytes are underlying factors in the lost of neuroprotection. For instance, reduction in glial glutamate uptake capacity may elevate extracellular glutamate levels leading to neuronal excitotoxicity (Rohstein *et al.*, 1996). Thus, changes in astrocyte function may play a key role in determining

neuronal survival in the aged SAMP8 brain. Indeed, increases in GFAP expression and PK-11195 binding activity (a marker of gliosis), together with neurodegeneration, have been reported in the hippocampus and cerebral cortex of SAMP8 mice (Nomura *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2005; Sureda *et al.*, 2006). Altered astrocytic function may contribute not only to brain neurodegeneration, but also to the premature learning and memory deficits observed in this murine model of early aging.

In summary, we have shown that astrocytes cultured from neonatal SAMP8 mice present similar alterations to those described in the whole brains of SAMP8 mice at 1–5 months of age. Similar to what occurs during brain aging, increased ROS generation in SAMP8 astrocytes can lead to lipid and protein oxidation, which in turn can cause changes in mitochondrial activity, tau phosphorylation and glutamate transport. All of these alterations can compromise astrocyte functionality. In this context, we have shown that SAMP8 astrocytes have reduced neuroprotective ability. This finding is in agreement with our previous studies showing decreased neuroprotection in astrocytes aged in culture (Pertusa *et al.*, 2007). The present study demonstrates the dysfunction present in SAMP8 astrocytes and also supports the hypothesis that age-related alterations in astrocytes contribute to neurodegeneration.

## Experimental procedures

### Materials

SAMP8 and SAMR1 mice were provided by Harlan Interfauna Ibérica (Barcelona, Spain). Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), gentamycin and fetal bovine serum (FBS) were purchased from Gibco-BRL (Invitrogen, Paisley, UK). Culture plates, chamber slides and flasks were from NUNC (Roskilde, Denmark). L-[<sup>3</sup>H]-glutamate (specific activity, 51 Ci mmol<sup>-1</sup>) was purchased from PerkinElmer Inc. (Wellesley, MA, USA). The fluorescent probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), dihydroethidium and rhodamine-123 were obtained from Molecular Probes (Leiden, The Netherlands). L-glutamic acid, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT), trolox, curcumin, roscovitine and lithium chloride were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Anti-tau [pSer<sup>199</sup>], anti-tau [pSer<sup>396</sup>] and anti-Pan-Tau antibodies were from Biosource International Inc. (Camarillo, CA, USA), anti-Cdk5, anti-p35 and anti-p25 from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA), anti-Gsk3β [pTyr<sup>216</sup>] and anti-Gsk3β [pSer<sup>9</sup>] from Bioreagents (Golden, CO, USA), anti-GLAST antibody from Alpha Diagnostic International (San Antonio, TX, USA), anti-NeuN from Chemicon International (Temecula, CA, USA) and anti-neurofilament (NF) from DAKO (Glostrup, Denmark). All chemicals were of analytical grade.

### Astrocyte cultures

Primary cultures enriched in astrocytes were established using cerebral cortical tissue from 2-day-old SAMP8 and SAMR1 mice.

Brains were dissected free of the meninges, diced into small cubes and dissociated by incubation with a 0.5% trypsin-EDTA solution (Gibco) for 25 min. Cells were seeded at  $0.25 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup> ( $0.75 \times 10^5$  cells cm<sup>-2</sup>) in multiwell plates, chamber slides or flasks in DMEM supplemented with 2.5 mM glutamine, 100 µg mL<sup>-1</sup> gentamycin and 20% FBS at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air. The culture medium was changed every 3–4 days and FBS was progressively lowered to 10% during the first 2 weeks. Experiments were routinely carried out at 21 days *in vitro*. Established astrocyte cultures of both SAMR1 and SAMP8 consisted of 85–90% astrocytes, 10–15% microglia and 0.1–1% oligodendroglia. Neither cell death nor morphological alterations were observed in SAMP8 cultures.

### Neuronal survival in co-culture with astrocytes

To study the neuronal protective response of SAMR1 and SAMP8 astrocyte cultures, co-cultures of neurons and astrocytes were plated on 12-mm coverslips. Fresh neurons disaggregated from the cerebral cortical tissue of SAMR1 and SAMP8 15-day-old fetuses were directly seeded at  $1.5 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup> ( $4.5 \times 10^5$  cells cm<sup>-2</sup>) on a confluent monolayer of SAMR1 and SAMP8 astrocyte cultures. Cultured medium was DMEM supplemented with 0.2 mM glutamine, insulin B 100 mU L<sup>-1</sup>, pABA 7 µM and 10% FBS. Neuronal survival was assessed at 12 DIV. Dead cells were detected by staining the cultures with 7.5 µM propidium iodide (red fluorescence) for 30 min. Cultures were subsequently washed with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde. Living neurons were identified by immunostaining with NeuN or NF antibodies. Cells were permeabilized with 0.25% Triton in PBS for 30 min, washed with PBS, incubated with goat serum to block unspecific binding sites at room temperature, and incubated with mouse Neu-N or NF antibodies (diluted 1 : 200) overnight at 4 °C. Cultures were then washed with PBS and incubated with anti-mouse Alexa Fluor 488 (green fluorescence) for 1 h at room temperature. After washing with PBS, nuclei were stained with 5 µM bisbenzimidazole. Finally, cultures were mounted on microscope slides. Randomly chosen fields were examined using a fluorescence microscope (Nikon Eclipse E1000, Nikon, Tokyo, Japan) and digitally photographed with a ColorView camera (Soft Imaging Systems, Stuttgart, Germany). Neuronal survival was determined by counting immunoreactive neurons to NeuN or NF that were not propidium iodide stained, using the ANALYSIS software (Soft Imaging System). Astrocyte conditioned media were prepared from SAMR1 and SAMP8 astrocyte cultures at 21 DIV. For that purpose, astrocyte medium was changed to the neuronal medium used for co-cultures (see above). Conditioned media were collected after 48 h, centrifuged for 5 min at 300 × g and used immediately. Neurons were seeded in astrocyte-conditioned media supplemented with 30% of fresh neuronal medium to provide a complete nutrient provision. Media were partially changed every 4 days with fresh conditioned media. At 12 DIV, neuronal survival was measured by the same procedure as in co-cultures.

### Reactive oxygen species generation

Intracellular generation of hydroperoxides and superoxide anion radicals was determined using DCFH-DA and dihydroethidium, respectively, as previously described (Sebastià *et al.*, 2004). Briefly, cultures in 96-well plates were washed in HBSS and loaded with 10 µM DCFH-DA for 20 min at 37 °C. Wells were then washed with HBSS and basal 2'-7'-dichlorofluorescein (DCF) fluorescence was measured after 1 h incubation at 37 °C in a fluorescence plate reader (Spectramax Gemini XS, Molecular Devices, Wokingham, UK) at 485 nm excitation/530 nm emission. To measure superoxide anion generation, cultures in 96-well plates were loaded with 4.8 µM dihydroethidium and basal ethidium fluorescence was measured at 485 nm excitation/590 nm emission after 1 h at 37 °C.

### Lipid and protein damage

Lipid peroxidation and protein damage were determined as described previously (Alvarez-García *et al.*, 2006). Lipid peroxidation was measured by determining malondialdehyde and 4-hydroxyalkenal using a Lipid Peroxidation Assay Kit from Calbiochem (EMD Biosciences Inc., Darmstadt, Germany). Protein damage was determined as carbonylated proteins. The chromogene 2,4-dinitrophenylhydrazine reacted with the carbonyl groups of the damage proteins. Protein carbonyls were determined at 366 nm.

### Mitochondrial membrane potential

Changes in mitochondrial membrane potential were measured using rhodamine 123. Cultures in 96-well plates were incubated with 13 µM rhodamine 123 at 37 °C for 1 h. The cells were washed twice with HBSS, and fluorescence was determined at 507 nm excitation/529 nm emission.

### Western blot analysis

After shaking the cultures for 4 h to eliminate microglial cells, the medium was removed and astrocytes were rinsed twice with PBS. Cells were lysed for 10 min on ice in RIPA buffer (10 mM PBS, 1% Igepal AC-630, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate) containing a protease inhibitor cocktail (Complete) and 1 mM orthovanadate. They were then collected and frozen at -20 °C until assay. Protein extracts were quantified following the Bradford method. Subsequently, 15 µg of the protein extracts were denatured at 100 °C for 5 min, loaded onto a 15% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel and electrophoresed. Proteins were transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P, Millipore, Bedford, MA, USA). This was incubated overnight at 4 °C with the following primary polyclonal antibodies: anti-tau p[Ser<sup>199</sup>] and anti-tau p[Ser<sup>396</sup>] diluted to 1 : 2000; anti-Gsk3β p[Tyr<sup>216</sup>], anti-Gsk3β p[Ser<sup>9</sup>], anti-Cdk, and anti-p35/p25 diluted to 1 : 1000; anti-GLAST diluted to 1 : 500. Membranes were incubated for 1 h at room

638 Reduced neuroprotection by SAMP8 astrocytes, S. García-Matas *et al.*

temperature with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. Proteins were detected with a chemiluminescence detection system based on the luminol reaction. Protein loading of the gels was controlled by staining blots with an antibody against  $\beta$ -actin (diluted 1 : 10 000). The immunoreactive bands were digitalized and a densitometry analysis was performed using Quantity One software (Bio-Rad). The levels of protein immunoreactivity were normalized to that of  $\beta$ -actin. In some experiments, SAMP8 astrocytes were treated with 10 mM lithium and 15  $\mu$ M roscovitine for 48 h.

### Glutamate uptake

Astrocyte glutamate uptake was determined as previously described (Pertusa *et al.*, 2007). Glutamate culture medium was removed from 96-well cultures and astrocytes were washed with warm HEPES-buffered saline solution (HBSS) (136 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1.0 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  and 10 mM HEPES) containing 9 mM glucose at pH 7.3. Astrocyte cultures were then incubated for 10 min at 37 °C in HBSS with 9.8 nM (500 nCi  $\text{mL}^{-1}$ ) of [ $^3\text{H}$ ]-glutamate and several concentrations of unlabelled glutamate in the range of 1  $\mu$ M to 1000  $\mu$ M. Uptake was terminated by removing the medium and washing the cells three times with ice-cold HBSS. This was immediately followed by cell lysis in 0.2 N NaOH. Aliquots were taken for liquid scintillation counting (with Optiphase 'Hisafe' cocktail) and for Bradford's protein assay using bovine serum albumin as the protein standard. Radioactivity was analysed by scintillation counting in a Wallac 1414 Liquid Scintillation Counter (PerkinElmer).

### Statistical analysis

Experiments were performed with astrocytes from three to eight primary cultures (*n* for each experiment is indicated in the corresponding figure legend). Data were pooled and the results given as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance ( $p < 0.05$ ) was determined by the Student's *t*-test and two-way analysis of variance followed by Bonferroni's multiple comparison test.

### Acknowledgments

This study was supported by grants from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2006-13092-C02-02), Instituto de Salud Carlos III (RD06-0013-1004) and Generalitat de Catalunya (DURSI 2005/SGR/00826), and from Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED). S. García-Matas and R. Rubio-Acero received a Generalitat de Catalunya and IDIBAPS fellowship, respectively. We thank A. Parull for his skilful technical assistance.

### References

Álvarez-García O, Vega-Naredo I, Sierra V, Caballero B, Tomás-Zapico C, Camins A, García JJ, Pallás M, Coto-Montes A (2006) Elevated oxidative stress in the brain of senescence-accelerated mice at 5 months of age. *Biogerontology* **7**, 43–52.

Amenta F, Bronzetti E, Sabbatini N, Vega JA (1998) Astrocyte changes in aging cerebral cortex and hippocampus: a quantitative immunohistochemical study. *Microsc. Res. Tech.* **43**, 29–33.

Anderson CM, Swanson RA (2000) Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* **32**, 1–14.

Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F (2004) Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol. Rev.* **84**, 361–384.

Bauer HC, Tontsch U (1990) Glial-conditioned medium and attachment to ConA are essential for long-term culture of cortical neurons. *Int. J. Dev. Neurosci.* **8**, 151–158.

Cadenas E, Davies KJ (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 222–230.

Canudas AM, Gutierrez-Cuesta J, Rodríguez MI, Acuña-Castroviejo D, Sureda FX, Camins A, Pallás M (2005) Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau in senescence-accelerated mouse (SAM). *Mech. Ageing Dev.* **126**, 1300–1304.

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**, 883–890.

Cheng XR, Zhou WX, Zhang YX, Zhou DS, Yang RF, Chen LF (2006) Differential gene expression profiles in the hippocampus of senescence-accelerated mouse. *Neurobiol. Aging* **28**, 497–506.

Cotrina ML, Nedergaard M (2002) Astrocytes in the aging brain. *J. Neurosci. Res.* **67**, 1–10.

Dabir DV, Robinson MB, Swanson E, Zhang B, Trojanowski JQ, Lee VM-Y, Forman MS (2006) Impaired glutamate transport in a mouse model of tau pathology in astrocytes. *J. Neurosci.* **26**, 644–654.

Delacourte A, Sergeant N, Wattez A, Muraige CA, Lebert F, Pasquier F, David JP (2002) Tau aggregation in the hippocampal formation: an ageing or a pathological process? *Exp. Gerontol.* **37**, 1291–1296.

Delacourte A, Sergeant N, Buée L (2003) *In vitro* models of age-related neurodegenerative disorders. *Exp. Gerontol.* **38**, 1309–1317.

Deshager S, Glowinski J, Premont J (1996) Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *J. Neurosci.* **16**, 2553–2562.

Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J (2000) Glutathione metabolism in brain: metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defence against reactive oxygen species. *Eur. J. Biochem.* **267**, 4912–4916.

Farr SA, Poon HF, Dogrukol-Ak D, Drake J, Banks WA, Eyeran E, Butterfield DA, Morley JE (2003) The antioxidants  $\alpha$ -lipoic acid and N-acetylcysteine reverse memory impairment and brain oxidative stress in aged SAMP8 mice. *J. Neurochem.* **84**, 1173–1183.

Flood JF, Morley JE (1998) Learning and memory in the SAMP8 mouse. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **22**, 1–20.

Forman MS, Lal D, Zhang B, Dabir DV, Swanson E, Lee VM-Y, Trojanowski JQ (2005) Transgenic mouse model of tau pathology in astrocytes leading to nervous system degeneration. *J. Neurosci.* **25**, 3539–3550.

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. *Neurosci. Lett.* **254**, 109–112.

Gong CX, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2005) Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* **112**, 813–838.

Gottfried C, Tramontina F, Gonçalves D, Gonçalves CA, Moriguchi E, Dias RD, Wofchuck ST, Souza DO (2002) Glutamate uptake in cultured astrocytes depends on age: a study about the effect of guanosine and the sensitivity to oxidative stress induced by  $\text{H}_2\text{O}_2$ . *Mech. Ageing Dev.* **123**, 1333–1340.

Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **11**, 298–300.



- He Y, Li H-L, Xie W-Y, Yang C-Z, Yu CHA, Wang Y (2007) The presence of active Cdk5 associated with p35 in astrocytes and its important role in process elongation of scratched astrocyte. *Glia* **55**, 573–583.
- Klamt F, Gottfried C, Tramontina F, Dal-Pizzol F, Conte da Frota ML, Fonseca Moreira JC, Dias RD, Moriguchi E, Wofchuck S, Souza DO (2002) Time-related increase in mitochondrial superoxide production, biomolecule damage and antioxidant enzyme activities in cortical astrocyte cultures. *Neuroreport* **13**, 1515–1518.
- 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.
- Kurokawa T, Asada S, Nishitani S, Hazeki O (2001) Age-related changes in manganese superoxide dismutase activity in the cerebral cortex of senescence-accelerated prone and resistant mouse. *Neurosci. Lett.* **298**, 135–138.
- Lenaz G, Baracca A, Fato R, Genova ML, Solaini G (2006) New insights into structure and function of mitochondria and their role in aging and disease. *Antioxid. Redox. Signal* **8**, 417–437.
- Li T, Hawkes Ch, Qureshi HY, Kar S, Paudel HL (2006) Cyclin-dependent protein kinase 5 primes microtubule-associated protein tau site-specifically for glycogen synthase kinase 3 $\beta$ . *Biochemistry* **2006**, 3134–3145.
- 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.
- Lin DT, Wu J, Holstein D, Upadhyay G, Rourke W, Muller E, Lechleiter JD (2006) Ca<sup>2+</sup> signaling, mitochondria and sensitivity to oxidative stress in aging astrocytes. *Neurobiol. Aging* **28**, 99–111.
- Makar TK, Nedergaard M, Preuss A, Gelbard AS, Perumal AS, Cooper AJL (1994) Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide, and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain. *J. Neurochem.* **62**, 45–53.
- Manczak M, Jung Y, Park BS, Partovi D, Reddy PH (2005) Time-course of mitochondrial gene expressions in mice brains: implications for mitochondrial dysfunction, oxidative damage, and cytochrome c in aging. *J. Neurochem.* **92**, 494–504.
- 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. *Neurosci. Lett.* **254**, 69–72.
- 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**, 410–418.
- O'Callaghan JP, Miller DB (1991) The concentration of glial fibrillary acidic protein increases with age in the mouse and rat brain. *Neurobiol. Aging* **12**, 171–174.
- Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter R, Miyahara Y (2002) Melatonin reduces oxidative damage of neural lipids and proteins in senescence-accelerated mouse. *Neurobiol. Aging* **23**, 639–644.
- Papadopoulos MC, Koumenis IL, Yuan TY, Giffard RG (1998) Increasing vulnerability of astrocytes to oxidative injury with age despite constant antioxidant defenses. *Neuroscience* **82**, 915–925.
- Parihar MS, Brewer GJ (2007) Simultaneous age-related depolarization of mitochondrial membrane potential and increased mitochondrial reactive oxygen species production correlate with age-related glutamate excitotoxicity in rat hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.* **85**, 1018–1032.
- Pertusa M, García-Matas S, Rodríguez-Farré E, Sanfeliu C, Cristòfol R (2007) Astrocytes aged *in vitro* show a decreased neuroprotective capacity. *J. Neurochem.* **101**, 794–805.
- Plattner F, Angelo M, Giese KP (2006) The roles of cyclin-dependent kinase 5 and Glycogen synthase kinase 3 in tau hyperphosphorylation. *J. Biol. Chem.* **281**, 25457–25465.
- Poon HF, Castegna A, Farr SA, Thongboonkerd V, Lynn BC, Banks WA, Morley JE, Klein JB, Butterfield DA (2004a) Quantitative proteomics analysis of specific protein expression and oxidative modification in aged senescence-accelerated-prone 8 mice brain. *Neuroscience* **126**, 915–926.
- Poon HF, Calabrese V, Scapagnini G, Butterfield DA (2004b) Free radicals: key to brain aging and heme oxygenase as a cellular response to oxidative stress. *J. Gerontol. A Biol Sci Med Sci* **59**, 478–493.
- Poon HF, Farr SA, Thongboonkerd V, Lynn BC, Banks WA, Morley JE, Klein JB, Butterfield DA (2005) Proteomic analysis of specific brain proteins in aged SAMP8 mice treated with alpha-lipoic acid: implications for aging and age-related neurodegenerative disorders. *Neurochem. Intern.* **46**, 159–168.
- Röhrdanz E, Schmuck G, Ohler S, Tran-Thi QH, Kahl R (2001) Changes in antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide in rat astroglial cells. *Arch. Toxicol.* **75**, 150–158.
- Rohstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncel RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* **16**, 675–686.
- Sato E, Oda N, Ozaki N, Hashimoto S, Kurokawa T, Ishibashi S (1996a) Early and transient increase in oxidative stress in the cerebral cortex of senescence-accelerated mouse. *Mech. Ageing Dev.* **86**, 105–114.
- Sato E, Kurokawa T, Oda N, Ishibashi S (1996b) Early appearance of abnormality of microperoxisomal enzymes in the cerebral cortex of senescence-accelerated mouse. *Mech. Ageing Dev.* **92**, 175–184.
- Schultz C, Dehghani F, Hubbard CR, Thal DR, Struckhoff G, Braak E, Braak H (2000) Filamentous tau pathology in nerve cells, astrocytes, and oligodendrocytes of aged baboons. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **59**, 39–52.
- Sebastià J, Cristòfol R, Pertusa M, Vilchez D, Torán N, Barambio S, Rodríguez-Farré E, Sanfeliu C (2004) Down's syndrome astrocytes have greater antioxidant capacity than euploid astrocytes. *Eur. J. Neurosci.* **20**, 2355–2366.
- Segovia G, Porras A, Del Arco A, Mora F (2001) Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech. Ageing Dev.* **122**, 1–29.
- Sengupta A, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2006) Regulation of phosphorylation of tau by protein kinases in rat brain. *Neurochem. Res.* **31**, 1473–1480.
- 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**, 360–367.
- Takeda T (1999) Senescence-accelerated mouse (SAM): a biogerontological resource in aging research. *Neurobiol. Aging* **20**, 105–110.
- 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 (1994) Senescence-accelerated mouse (SAM): a novel murine model of aging. In *The SAM Model of Senescence* (Takeda T, ed.). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 15–22.
- Togo T, Dickson DW (2002) Tau accumulation in astrocytes in progressive supranuclear palsy is a degenerative rather than reactive process. *Acta Neuropathol. (Berl)* **104**, 398–402.
- Tramontina F, Conte S, Gonçalves D, Gottfried C, Portela LV, Vinade L, Salbego C, Gonçalves CA (2002) Developmental changes in S100B content in brain tissue, cerebrospinal fluid, and astrocyte cultures of rats. *Cell. Mol. Neurobiol.* **3**, 373–378.

**640** Reduced neuroprotection by SAMP8 astrocytes, S. Garcia-Matas *et al.*

- Trotti D, Rizzini BL, Rossi D, Haugeto O, Racagni G, Danbolt NC, Volterra A (1997) Neuronal and glial glutamate transporters possess an SH-based redox regulatory mechanism. *Eur. J. Neurosci.* **9**, 136–1243.
- Walsh E, Ueda Y, Nakanishi H, Yoshida K (1992) Neuronal survival and neurite extension supported by astrocytes co-cultured in transwells. *Neurosci. Lett.* **138**, 103–106.
- Wu Y, Zhang AQ, Yew DT (2005) Age related changes of various markers of astrocytes in senescence-accelerated mice hippocampus. *Neurochem. Int.* **46**, 565–574.
- Xu J, Shi Ch, Li Qi, Wu J, Forster EL, Yew DT (2007) Mitochondrial dysfunction in platelets and hippocampi of senescence-accelerated mice. *J. Bioenerg. Biomembr.* **39**, 195–202.
- Yang S, Qiao H, Wen L, Zhou W, Zhang Y (2005a) D-serine enhances impaired long-term potentiation in CA1 subfield of hippocampal slices from aged senescence-accelerated mouse prone/8. *Neurosci. Lett.* **379**, 7–12.
- Yang W, Ang LC, Strong MJ (2005b) Tau protein aggregation in the frontal and entorhinal cortices as a function of aging. *Dev. Brain Res.* **156**, 127–138.
- Yasui F, Matsugo S, Ishibashi M, Kajita T, Ezashi Y, Oomura Y, Kojo S, Sasaki K (2002) Effects of chronic acetyl-L-carnitine treatment on brain lipid hydroperoxide level and passive avoidance learning in senescence-accelerated mice. *Neurosci. Lett.* **334**, 177–180.
- Yasui F, Ishibashi M, Matsugo S, Kojo S, Oomura Y, Sasaki K (2003) Brain lipid hydroperoxide level increases in senescence-accelerated mice at an early age. *Neurosci. Lett.* **350**, 66–68.

### 3. TERCER ARTÍCULO

---

## Expression of GDNF transgene in astrocytes improves cognitive déficits in aged rats

S. García-Matas <sup>a,1</sup>, M. Pertusa <sup>a,1</sup>, H. Mammeri <sup>b,1</sup>, A. Adell <sup>c</sup>, T. Rodrigo <sup>d</sup>,  
J.Mallet <sup>b</sup>, R. Cristòfol <sup>a</sup>, C. Sarkis <sup>b</sup> C. Sanfeliu <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departament de Farmacologia i Toxicologia , Institut d' Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB), CSIC-IDIBAPS, Rosselló 161, 08036 Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Laboratoire de Génétique Moléculaire de la Neurotransmission et des Processus Neurodégénératifs, CNRS, Hopital de la Salpêtrière, 75013 Paris, France

<sup>c</sup> Departament de Neuroquímica, Institut d' Investigacions Biomèdiques de Barcelona, CSIC-IDIBAPS, 08036 Barcelona, Spain

<sup>d</sup> Unitat d'Experimentació Animal de Psicologia, Universitat de Barcelona, 08035 Barcelona, Spain

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this study.

## RESUMEN

El factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) ha sido ensayado por sus efectos neurotróficos contra la atrofia neuronal que causa déficits cognitivos en la vejez. Ratas Fisher 344 viejas con deterioros encontrados a través de test en el laberinto acuático de Morris recibieron inyecciones intrahipocampales en el área CA1 de vectores lentivirales. Estos vectores lentivirales codificaban para el GDNF humano o para el para la proteína verde fluorescente humana como control. Los vectores lentivirales recombinantes fueron construidos con un promotor del citomegalovirus humano y un pseudotipo de la glicoproteína del lisavirus Mokola que se transduce específicamente en astrocitos in vivo. Los astrocitos que secretan GDNF aumentan la función neuronal como se muestra en el incremento local de la síntesis de los neurotransmisores acetilcolina, dopamina y serotonina. Este efecto neurotrófico conduce a una mejoría cognitiva de las ratas a las dos semanas después de la transducción génica. El aprendizaje espacial y la memoria evaluados mostraron un aumento significativo de las habilidades cognitivas debidas a la exposición a GDNF, mientras que las ratas controles transducidas mantienen su rendimiento a nivel del azar. Estos resultados confirman un amplio espectro de acción del GDNF y abre nuevas posibilidades de la terapia génica para reducir la neurodegeneración relacionada con la edad.



## Expression of GDNF transgene in astrocytes improves cognitive deficits in aged rats

M. Pertusa<sup>a,1</sup>, S. García-Matas<sup>a,1</sup>, H. Mammeri<sup>b,1</sup>, A. Adell<sup>c</sup>, T. Rodrigo<sup>d</sup>,  
 J. Mallet<sup>b</sup>, R. Cristòfol<sup>a</sup>, C. Sarkis<sup>b</sup>, C. Sanfeliu<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Departament de Farmacologia i Toxicologia, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB), CSIC-IDIBAPS, Rosselló 161, 08036 Barcelona, Spain*

<sup>b</sup> *Laboratoire de Génétique Moléculaire de la Neurotransmission et des Processus Neurodégénératifs, CNRS, Hôpital de la Salpêtrière, 75013 Paris, France*

<sup>c</sup> *Departament de Neuroquímica, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, CSIC-IDIBAPS, 08036 Barcelona, Spain*

<sup>d</sup> *Unitat d'Experimentació Animal de Psicologia, Universitat de Barcelona, 08035 Barcelona, Spain*

Received 26 September 2006; received in revised form 14 February 2007; accepted 20 February 2007

Available online 30 March 2007

### Abstract

Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) was assayed for its neurotrophic effects against the neuronal atrophy that causes cognitive deficits in old age. Aged Fisher 344 rats with impairment in the Morris water maze received intrahippocampal injections at the dorsal CA1 area of either a lentiviral vector encoding human GDNF or the same vector encoding human green fluorescent protein as a control. Recombinant lentiviral vectors constructed with human cytomegalovirus promoter and pseudotyped with lyssavirus Mokola glycoprotein specifically transduced the astrocytes *in vivo*. Astrocyte-secreted GDNF enhanced neuron function as shown by local increases in synthesis of the neurotransmitters acetylcholine, dopamine and serotonin. This neurotrophic effect led to cognitive improvement of the rats as early as 2 weeks after gene transduction. Spatial learning and memory testing showed a significant gain in cognitive abilities due to GDNF exposure, whereas control-transduced rats kept their performance at the chance level. These results confirm the broad spectrum of the neurotrophic action of GDNF and open new gene therapy possibilities for reducing age-related neurodegeneration.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF); Lentiviral vector; Aging; Learning and memory; Gene therapy; Acetylcholine; Dopamine; Serotonin; Rat

### 1. Introduction

Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) is a member of the transforming growth factor  $\beta$  superfamily. It was first isolated from culture medium of rat B49 glioblastoma cells in a search of trophic factors for midbrain dopaminergic neurons (Lin et al., 1993, 1994). GDNF has remarkable regenerative and restorative effects upon nigrostriatal dopaminergic neurons (Bowenkamp et al., 1997; Gash

et al., 1996; Gill et al., 2003). Soon after its discovery, it was found that GDNF is a potent neurotrophic factor active on a broad spectrum of neuronal types and has neuroprotective effects in several experimental paradigms of nerve cell injury. For instance, GDNF reduces neuronal damage in axotomized neurons (Henderson et al., 1994; Oppenheim et al., 1995; Williams et al., 1996; Yan et al., 1995), in experimental brain trauma (Bakshi et al., 2006) and ischemia (Cheng et al., 2005; Kilic et al., 2003; Miyazaki et al., 1999; Wang et al., 1997), and in several excitotoxic (Martin et al., 1995; Nicole et al., 2001; Pérez-Navarro et al., 1996; Wong et al., 2005) and neurotoxic injuries modeling neurodegenerative diseases (Arenas et al., 1995; Ghribi et al., 2004; Ugarte et al.,

\* Corresponding author. Tel.: +34 933638338; fax: +34 933638301.

E-mail address: cspfat@iibb.csic.es (C. Sanfeliu).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this study.

2003). Therapeutic GDNF administration has raised expectations that it could be a preventive or palliative treatment for Parkinson's disease (for review see: Eslamboli, 2005; Fernández-Espejo, 2004), amyotrophic lateral sclerosis (for review see: Bohn, 2004; McGeer and McGeer, 2005) and Huntington's disease (for review see: Alberch et al., 2004).

GDNF is expressed in both neurons and astrocytes (Lin et al., 1993; Marco et al., 2002; Nicole et al., 2001; Schaar et al., 1993). It signals through the two-component receptor complex GFR $\alpha$ -1/Ret (Treanor et al., 1996), also expressed in both cell types (Nicole et al., 2001). An increase in astrocyte GDNF synthesis and protein expression is believed to play an active role in neuron survival and plasticity after ischemia (Miyazaki et al., 2001; Tokumine et al., 2003) and excitotoxic damage (Ho et al., 1995; Marco et al., 2002). Accordingly, experimental strategies of GDNF delivery by astrocytes have shown to be neuroprotective in vivo for motor neurons (Parsadanian et al., 2006; Zhao et al., 2004) and dopaminergic neurons (Cunningham and Su, 2002; Do Thi et al., 2004; Ericson et al., 2005).

Endogenous GDNF plays an important role in cognitive abilities as demonstrated by the impaired spatial learning performance of mice that are heterozygous for a targeted deletion of the GDNF gene (Gerlai et al., 2001). Spatial learning and memory is associated with intact hippocampus function and it has long been known that memory deficits in old age are similar to those produced by bilateral hippocampal lesions (Broadbent et al., 2004; Good, 2002). Different categories of agents, such as neurotrophins (Fischer et al., 1991, 1994; Martínez-Serrano et al., 1996), antioxidant agents (Levin et al., 2002; Nishiyama et al., 1997) and cholinergic drugs (Bontempi et al., 2003; Hernández et al., 2006), have been assayed in aged rodents in a search for effective and harmless treatments that reverse the memory loss of normal aging and ameliorate memory loss in pathological aging caused by Alzheimer's disease. The potential of GDNF against age-related cognitive deterioration has not been fully explored. In a previous study, spatial learning and memory improved in aged rats after i.c.v. administration of GDNF but no brain regional correlates were analyzed (Pelleymounter et al., 1999). We studied the restorative effects of GDNF on spatial learning and memory after local delivery into the hippocampus. For this purpose, the astrocytes of the dorsal CA1 hippocampal area of cognitively impaired aged Fisher 344 rats were transduced in vivo with a lentiviral vector expressing the human gene for GDNF. The efficacy of transgene delivery, either GDNF or the human green fluorescent protein (GFP) used as a control, and the behavioral and neurotransmitter changes shown by the aged rats were determined throughout the study. Brain regional GDNF gene expression allowed the evaluation of the involvement of the hippocampal CA1 function in maintaining spatial learning and memory through aging. Vector specificity for the GDNF gene transfer to astrocytes enabled the study of the neuroprotective potential of these glial cells in neurodegenerative processes.

## 2. Methods

### 2.1. Animal groups

Thirty male 7-month-old Fisher 344 rats retired from breeding were purchased from Charles River (Lyon, France) and kept in the animal house of the University of Barcelona until they were old. They were maintained in standard conditions of temperature and humidity, with two animals per cage, a 12-h light:12-h dark cycle, and food and water ad libitum. Only animals showing a healthy general status at 22 months of age were included in the study. A group of 10 young male rats of the same origin were used to test the viral stock. A further group of 10 6-month-old male Fisher 344 rats were included in the study for comparative neurotransmitter determinations. All handling and experimental procedures were approved by the Animal Ethics and Health Committees of the University of Barcelona.

### 2.2. Lentiviral vectors

A recombinant lentiviral vector encoding human GDNF was constructed for the specific transduction of astrocytes in vivo. The combination of the lyssavirus Mokola glycoprotein (Mokola G) pseudotype with the human cytomegalovirus promoter (CMV) allowed efficient transgene expression under these experimental conditions. A vector encoding GFP instead of GDNF was used as a control vector. Vectors were constructed and produced as previously described (Bemelmans et al., 2005; Naldini et al., 1996). Briefly, the plasmids Flap-CMV-GDNF-WPRE and Flap-CMV-GFP-WPRE were derived from the lentiviral vector genome. These plasmids contain the backbone of the lentiviral genome including the central Flap sequence (Zennou et al., 2000). The GDNF and GFP transgenes were under control of the CMV promoter. The woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element (WPRE) was added 3' to the GDNF or GFP gene to increase transgene expression (Zufferey et al., 1999). Lentiviral vector stocks were produced by transient co-transfection of 293 T cells with the vector genome plasmid, a packaging plasmid and a plasmid coding for the envelope that included the Mokola G gene. The cell supernatant for each transgene vector was harvested 48 h post-transfection, treated with DNase, filtered through 0.45  $\mu$ m pore-sized filters, and subjected to ultra-centrifugation at 64,000  $\times$  g for 90 min. The virus pellet was resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) and its physical titer was quantified by ELISA of the p24 capsid protein. Viral stocks were kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. At that moment, stocks were diluted with PBS to 30 ng/ $\mu$ l of p24 protein.

### 2.3. Behavioral testing

The behavioral test for spatial learning and memory was performed in a Morris water maze (Morris, 1981). The apparatus was modeled as described elsewhere (Chamizo et al.,

2006). Briefly, it measured 1.60 m in diameter and water was made opaque by the addition of 100 mL/L of latex. Water temperature was maintained at  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ . Black curtains surrounded the pool. Inside the black enclosure four landmarks hanging from a false black ceiling defined the position of the hidden platform: (A) a 40-W fixed light; (B) a beach ball with horizontal color drawings; (C) a vertical white structure with three truncated cones of decreasing size; and (D) three silver bottles bound by their neck. Landmark objects were hung at  $90^\circ$  distance. The platform had a diameter of 0.11 m and was placed between landmarks A and B, 1 cm below the surface and 0.38 m from the side. The landmarks and the platform were semi-randomly rotated with respect to the room ( $90^\circ$ ,  $180^\circ$ ,  $270^\circ$ ,  $360^\circ$ ) in a daily-equated way in order to ensure that the rats used these landmarks, rather than any inadvertently remaining static room cue, to locate the platform. A closed-circuit video camera recorded rat movements that were analyzed by computer. A pre-training test with the platform made visible, located 1 cm above the water surface, consisted of 8 trials during 2 days. The rat was given 90 s to find the platform, and then allowed to stay on for 30 s. When the rat did not reach the platform, it was picked up, placed on it and left there for 30 s. Rats that failed to find the visible platform were discarded from the study. For the acquisition test, the procedure was the same, but animals had to rely on the landmarks to find the hidden platform. Animals were given 4 escape trials per day for 12 days, a total of 48 trials. Latencies to reach the escape platform were recorded for each trial and averaged for the 4 daily trials. On the last day, a 60 s probe trial was performed with the platform removed. To analyze the rat's behavior, the surface of the pool was divided into four quadrants and the time that the rat spent in the quadrant where the platform was previously was calculated. Impaired aged rats were defined as those spending a time not different from chance performance (15 s out of 60 s) in the right quadrant during the spatial probe trial. Two weeks later, the impaired animals were divided in two groups that were treated for hippocampal astrocyte expression of GFP and GDNF, respectively (see surgical procedures below). Test assays were initiated 2 weeks after surgery, when rats were nearly 24 months old. Animals were given 4 escape trials per day and on the fourth day a probe trial was performed. This procedure continued, with a probe trial every 4 days until 48 escape trials had been conducted. Behavioral results for rats that did not survive until the end of the study were not included.

#### 2.4. Surgical procedures

A total of 23 aged rats underwent surgery: 7 rats of the GFP group, 8 rats of the GDNF group and 8 unimpaired rats. Animals were anesthetized with 10 mg/kg xylazine (Rompun 2%, Bayer) and 80 mg/kg ketamine (Ketolar 50 mg/ml, Pfizer) i.m., and placed in a stereotaxic apparatus. Bilateral infusions were performed into the CA1 area of the hip-

pocampus at the coordinates: anterior–posterior  $-3.8$  mm, medio-lateral  $\pm 2$  mm and dorso-ventral  $-2.4$  mm, from bregma and dural surface. The right coordinates to reach were previously checked in 3 animals discarded from the study. One microlitre of the vector solution was delivered to the application point with a 25-gauge stainless steel cannula (Small Parts Inc., Miami, FL) connected to a Hamilton syringe through a Teflon tube. The syringe was attached to a micro-infusion pump (Bioanalytical systems Inc., West Lafayette, IN). The cannula was left in position for 5 min after delivery to prevent the solution from surging back.

#### 2.5. Brain dissection and histology

After completion of the behavioral studies, animals were decapitated under light anesthesia with 40 mg/kg ketamine. Brains were quickly removed, immersed in cold saline solution and placed in a Kopf brain blocker. The cerebrum was cut into three blocks and then bisected sagittally at the midline. A block containing the half dorsal hippocampal area of selected animals from the GFP group was fixed by immersion in 10% phosphate buffered formaldehyde, cryoprotected with 10% sucrose and frozen on a stainless steel plate over dry ice. Slices  $16 \mu\text{m}$  thin were double-stained with the antibodies against GFP 1:1000 (polyclonal, Abcam, Cambridge, UK) and GFAP 1:400 (monoclonal, clone GA5, Sigma, St. Louis, MO), as previously described (Bemelmans et al., 2005). Secondary antibodies used were Alexa Fluor 488, 1:1000 and Alexa Fluor 546, 1:1000, respectively (Molecular Probes, Eugene, OR). Nuclei were counterstained with bis-benzimide (Sigma). For all other animals, both hemispheres were further dissected on a chilled glass plate, according to the procedure described in detail elsewhere (Baxter et al., 1999). Tissue samples for 6 hippocampal areas (dorsal and ventral CA1, dorsal and ventral CA2/3, dorsal and ventral dentate gyrus), 5 cerebral cortical areas (cingulate, frontal, temporal, entorhinal, parietal), septum and caudate (Paxinos and Watson, 1986), were weighed and frozen at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis.

#### 2.6. GDNF determination

The level of GDNF expression of the viral stock under the injection conditions used was tested in a group of 10 young rats of the same colony used for the experiment. A microinjection of the GDNF vector was performed in the dorsal CA1 area of the right hippocampus as described above. GFP vector was injected on the left side of half the animals and the other half were untreated. Rats were killed a week later, and the hippocampus dissected as described above. Regional tissue levels of GDNF were determined by ELISA with the GDNF  $E_{\text{max}}$  ImmunoAssay System kit (Promega), following the manufacturer's instructions. Long-term stability of this viral stock was previously checked and expression was stable for 1 year (unpublished data).

### 2.7. Choline acetyl transferase and monoamine neurotransmitter determinations

Choline acetyl transferase (ChAT) activity in the tissue samples was measured by the formation of  $^{14}\text{C}$  acetylcholine from  $^{14}\text{C}$  acetylcoenzyme-A (60 mCi/mmol; New England Nuclear, Perkin-Elmer, Wellesley, MA) and choline (Sigma). For this purpose, homogenates from left cerebral hemisphere regions were processed following the procedure described elsewhere (Araujo et al., 1990).

The monoamine neurotransmitters, dopamine and serotonin, the acid metabolites of dopamine 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA) and the acid metabolite of serotonin 5-hydroxyindoleacetic (5-HIAA) were analyzed in the right hemisphere tissue samples of GFP, GDNF and young rat groups. Tissue samples were homogenized in a cold solution of 0.4 M perchloric acid, 0.01% EDTA, 0.1% sodium bisulfite and 0.01% cystine and centrifuged at  $12,000 \times g$  for 30 min. The concentrations of neurotransmitters and metabolites in supernatants were determined by HPLC using a 3- $\mu\text{m}$  octadecylsilica (ODS) column (7.5 cm  $\times$  0.46 cm; Beckman) and detected amperometrically with a Hewlett-Packard 1049 detector set at oxidation potentials of 0.6 V (serotonin and 5-HIAA) and 0.7 V (dopamine, DOPAC and HVA). The mobile phase for 5-HT consisted of 0.15 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1.8 mM octyl sodium sulfate, 0.2 mM EDTA (pH 2.8 adjusted with phosphoric acid) and 30% methanol. The mobile phase for dopamine consisted of 0.15 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.46 mM octyl sodium sulfate, 0.5 mM EDTA (pH 2.8 adjusted with phosphoric acid), and 18% methanol. Both mobile phases were pumped at

0.7 mL/min. Quantitative analyses were performed by the external standard method.

### 2.8. Statistics

Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Statistical evaluation was performed with ANOVA procedures, followed by Bonferroni's or Newman-Keules's multi-range test for comparison of the mean group values.

## 3. Results

### 3.1. Astrocyte transduction with GFP and GDNF

The injection of lentiviral particles aimed at the dorsal CA1 hippocampal area yielded a wide GFP expression mainly in the stratum radiatum and also in the oriens layer of this area. No expression was detected outside the hippocampus. Transduced proteins were selectively expressed in astrocytes as demonstrated by overlapping of GFP and GFAP immunostaining whereas no GFP expression was detected in the neurons of the pyramidal molecular layer (GFP transduced rats, Fig. 1a–g). In a parallel study, we have confirmed the astrocyte-specific expression of the GFP reporter gene with this vector in several animal species (mouse, rat and non-human primate; Brizard et al., unpublished observations).

The ability of the GDNF-engineered lentiviral vector to drive a detectable production of GDNF was previously confirmed in a separate group of animals. GDNF levels determined by ELISA were higher in the dorsal CA1 trans-

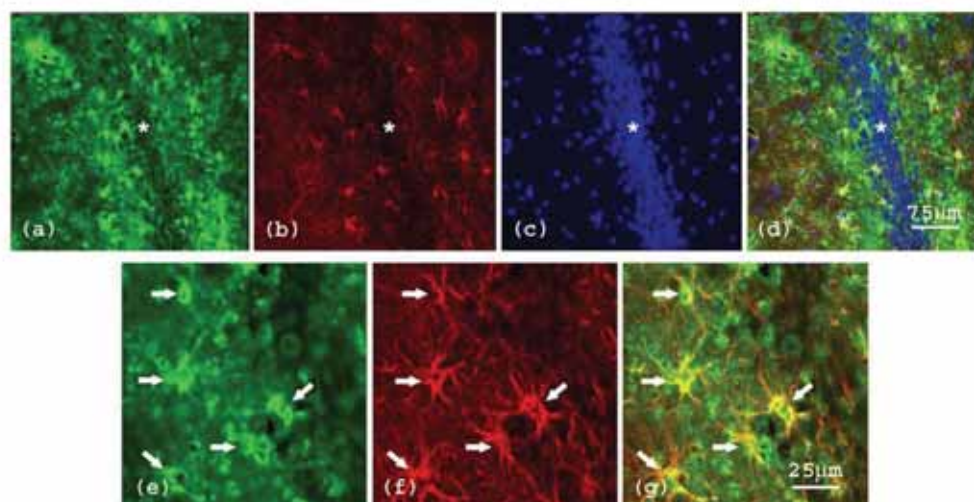


Fig. 1. Transgene expression of GFP driven by lentiviral vectors in the brain of aged rats. Confocal micrographs of a representative transduced CA1 region (a–d) show the immunostaining for GFP (green), for GFAP (red), the nuclei stained with bisbenzimidazole (blue) and triple staining, respectively. Asterisk indicates the pyramidal layer, with the oriens layer on the right and the stratum radiatum on the left of the images. Note that no GFP was detected in the neuron cell bodies of the pyramidal layer. At higher magnification, the cells secreting GFP (e) can be identified as GFAP immunostained astrocytes (f), showing in these cells double labeling (g) (see arrows). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)



1370

M. Pertusa et al. / Neurobiology of Aging 29 (2008) 1366–1379

Table 1  
Levels of GDNF after lentiviral transduction with hGDNF gene

	GDNF (pg/mg tissue)		
	GDNF (n=7)	GFP (n=3)	Naïve (n=3)
Hippocampus: Dorsal			
CA1	288.1 ± 54.6 <sup>ab</sup>	5.6 ± 3.6	9.8 ± 3.9
CA2/3	173.3 ± 48.9 <sup>ac</sup>	4.1 ± 1.8	6.5 ± 0.8
Dentate gyrus	52.5 ± 20.1	4.0 ± 1.1	6.3 ± 1.8
Hippocampus: Ventral			
CA1	96.2 ± 44.7	7.0 ± 3.0	7.9 ± 1.2
CA2/3	58.5 ± 23.5	2.8 ± 0.7	4.9 ± 2.2
Dentate gyrus	15.8 ± 4.0	5.5 ± 1.3	3.3 ± 1.1

Experimental groups: GDNF, right hippocampus of young rats transduced with human glial cell line derived neurotrophic factor in the dorsal CA1 area; GFP, left hippocampus transduced with the control vector expressing human green fluorescent protein in the dorsal CA1; naïve, untransduced left hippocampus. Results are the mean ± S.E.M., n = 7, 3 and 3, for GDNF, GFP and naïve group, respectively. Statistics: (a) significance of GDNF group as compared to GFP or naïve group, (b) significance of dorsal CA1 as compared to all the other regions, (c) significance of dorsal CA2/3 as compared to ventral dentate gyrus; ANOVA followed by Newman–Keuls' test at the significance level of  $p < 0.05$ .

duced with GDNF than in the GFP-transduced or untreated CA1 area of the contralateral side (Table 1). A lower GDNF over-expression was detected in the ipsilateral adjacent area CA2/3.

### 3.2. Improved performance of GDNF injected rats in the Morris water maze

Timing of the behavioral studies is indicated in Fig. 2a. The aged animals were clearly classified as non-impaired or learning-impaired, according to the results of the pre-test spatial probe trial (Fig. 2b, probe trial 0). Non-impaired rats spent  $27.8 \pm 3.6$  s ( $n = 8$ ) and impaired rats spent  $15.5 \pm 4.3$  s ( $n = 15$ ) out of the 60 s in the pool quadrant that previously contained the platform ( $p < 0.0001$  and  $p = 0.6746$  as against to chance value of 15 s, respectively). During prior training, latencies to find the hidden escape platform decreased steadily without significant group differences (two-way ANOVA, effect of day factor:  $F(11,211) = 4.915$ ,  $p < 0.0001$ ) (Fig. 2c).

In the spatial probe trials after surgery, the GDNF group showed steady learning improvement that was not present in the GFP group (Fig. 2b, probe trials 1–3). The latter rats kept their values of searching time in the correct quadrant at the chance level. By the end of the test-training period, GDNF rats showed values close to the unimpaired control group. The performance differences between GFP- and GDNF-injected rats were significant (ANOVA,  $F(1,44) = 9.869$ ,  $p = 0.0030$ ). No differences of latency to find the hidden platform during the 12 training days were detected between the two rat groups (Fig. 3d).

Swimming speed was not affected by either the surgery or the transgene expression. Pre-surgery values recorded

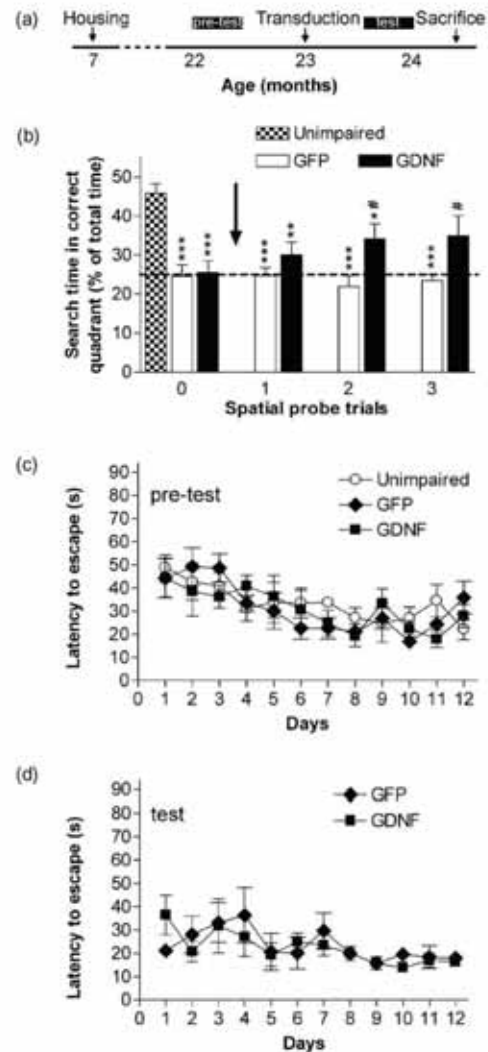


Fig. 2. Behavioral testing in the Morris water maze. (a) Experimental design scheduled for the aged rats, with pre-test and test indicating the behavioral studies performed before and after the surgical injection of the viral vectors, respectively. (b) Spatial probe trial results distinguished impaired and unimpaired rats in the pre-test (trial 0) and showed the steadily better performance of GDNF rats in the test (trials 1–3). Dotted line indicates chance performance. Arrow indicates surgery. Values are the mean ± S.E.M.,  $n = 6-8$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ , as compared with unimpaired rats; and # $p < 0.05$ , as compared to the GFP group; ANOVA followed by Newman–Keuls' test. (c) The latencies to escape during the pre-test training did not differ between GFP and GDNF rat groups. Values are the mean ± S.E.M.,  $n = 6-7$ . (d) The latencies to escape during the test training did not differ, either, between GFP and GDNF rat groups. Values are the mean ± S.E.M.,  $n = 6-7$ .

in the pre-test probe trial were  $21.58 \pm 1.24$  cm/s for the non-impaired rats,  $21.61 \pm 0.69$  cm/s for the GFP group and  $21.83 \pm 0.81$  cm/s for the GDNF group. Final swim speed measured in the last test probe trial was  $22.73 \pm 0.69$  cm/s

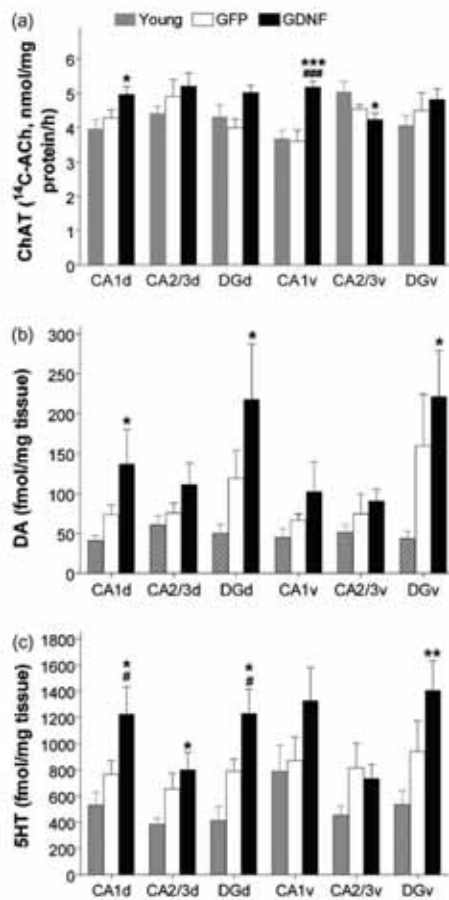


Fig. 3. Hippocampal regional concentration of neurotransmitters. (a) Choline acetyl transferase (ChAT) activity, indicative of acetylcholine levels, and (b) dopamine and (c) serotonin tissue levels. Young, 8-month-old rats; GFP, 24-month-old cognitively impaired rats transduced with human green fluorescent protein in the dorsal CA1 area; GDNF, 24-month-old cognitively impaired rats transduced with human glial cell line derived neurotrophic factor in the dorsal CA1. Numeric values are detailed in Tables 2–4, respectively. Values are the mean  $\pm$  S.E.M.,  $n = 6-8$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ , as compared with young rats; and \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  as compared to the GFP group; ANOVA followed by Newman–Keuls' test.

and  $21.89 \pm 1.07$  cm/s for the GFP and the GDNF groups, respectively.

### 3.3. Increase of neurotransmitter levels in the hippocampus after GDNF transduction

Tissue concentration of ChAT, indicative of acetylcholine levels, in selected brain regions of young and aged impaired rats is shown in Fig. 3a (hippocampus areas) and Table 2 (all brain areas assayed). Two-way ANOVA indicated an effect of the cerebral brain region ( $F(12,180) = 14.50$ ,  $p < 0.0001$ ) and of the rat group ( $F(2,180) = 7.56$ ,  $p = 0.0007$ ). By paired ANOVA testing, GDNF rat group was significantly different

Table 2  
Brain regional activity of choline acetyl transferase

	ChAT ( $^{14}\text{C}$ -ACh nmol/mg protein/h)		
	Young	GFP	GDNF
Hippocampus: Dorsal			
CA1	$3.97 \pm 0.26$	$4.28 \pm 0.23$	$4.97 \pm 0.23^{\text{a}}$
CA2/3	$4.42 \pm 0.20$	$4.90 \pm 0.50$	$5.21 \pm 0.38$
Dentate gyrus	$4.32 \pm 0.35$	$3.99 \pm 0.26$	$5.02 \pm 0.21$
Hippocampus: Ventral			
CA1	$3.69 \pm 0.23$	$3.61 \pm 0.32$	$5.18 \pm 0.17^{\text{a,b}}$
CA2/3	$5.05 \pm 0.29$	$4.54 \pm 0.12$	$4.23 \pm 0.19^{\text{a}}$
Dentate gyrus	$4.07 \pm 0.28$	$4.50 \pm 0.52$	$4.82 \pm 0.31$
Cortex			
Cingulate	$3.60 \pm 0.25$	$4.22 \pm 0.39$	$5.83 \pm 0.58^{\text{a,b}}$
Frontal	$3.36 \pm 0.30$	$3.26 \pm 0.14$	$4.06 \pm 0.46$
Parietal	$3.00 \pm 0.27$	$3.46 \pm 0.28$	$4.09 \pm 0.81$
Temporal	$3.03 \pm 0.24$	$3.20 \pm 0.39$	$3.24 \pm 0.45$
Entorhinal	$3.64 \pm 0.24$	$3.31 \pm 0.08$	$3.38 \pm 0.17$
Septum	$6.76 \pm 0.76$	$5.10 \pm 0.12$	$5.47 \pm 0.38$
Caudate	$1.82 \pm 0.32$	$3.22 \pm 0.69$	$2.33 \pm 0.27$

Experimental groups: Young, 8-month-old rats; GFP, 24-month-old cognitively impaired rats transduced with human green fluorescent protein in the dorsal hippocampus CA1; GDNF, 24-month-old cognitively impaired rats transduced with human glial cell line derived neurotrophic factor in the dorsal hippocampus CA1. Values are the mean  $\pm$  S.E.M. of 6–9 animals. Statistics: (a) significance of GFP or GDNF groups as compared to young rats and (b) significance of GDNF as compared to GFP group; ANOVA followed by Newman–Keuls' test at the significance level of  $p < 0.05$ .

from GFP and from young rat groups (not shown). In GDNF transduced rats, an increase was detected in the whole CA1 area, as against GFP rats; whereas the ventral part increased also over young rat values. Cingulate cortex ChAT increased in GDNF rats over the other two groups. There was a decrease in the ventral CA2/3 area of GDNF rats, as against the group of young rats.

Regional brain concentration of dopamine is shown in Fig. 3b (hippocampus areas) and Table 3 (all brain areas assayed) and its metabolites DOPAC and HVA are shown in Table 3. Two-way ANOVA for brain region and rat group indicated an effect of the brain region factor for the concentration of dopamine and its metabolites (not shown), whereas the rat group factor was significant for both metabolites DOPAC ( $F(2,321) = 12.98$ ,  $p < 0.0001$ ) and HVA ( $F(2,319) = 71.59$ ,  $p < 0.0001$ ). The group effect was significant for dopamine levels when the brain regions were restricted to the hippocampus ( $F(2,108) = 15.81$ ,  $p < 0.0001$ ). In this area, the increase of dopamine shown by the GDNF group was significant in the dorsal CA1 area and in the whole dentate gyrus, as against the group of young rats. A decrease of HVA in both aged GFP and GDNF groups was observed in the dorsal CA1 and CA2/3, cerebral cortical areas and septum. In the caudate region of both aged rat groups there was a decrease in both metabolites, DOPAC and HVA.

Regional brain concentration of serotonin is shown in Fig. 3c (hippocampus areas) and Table 4 (all brain areas assayed) and its metabolite 5-HIAA is shown in Table 4. Two-

Table 3  
Brain regional concentration of dopamine and its metabolites DOPAC and HVA

	Dopamine (fmol/mg tissue)			DOPAC (fmol/mg tissue)			HVA (fmol/mg tissue)		
	Young	GFP	GDNF	Young	GFP	GDNF	Young	GFP	GDNF
<b>Hippocampus: Dorsal</b>									
CA1	41 ± 6	74 ± 12	136 ± 44 <sup>a</sup>	264 ± 87	180 ± 31	293 ± 79	287 ± 43	114 ± 35 <sup>a</sup>	122 ± 28 <sup>a</sup>
CA2/3	61 ± 12	76 ± 12	111 ± 27	260 ± 73	192 ± 53	229 ± 52	211 ± 16	117 ± 26 <sup>a</sup>	123 ± 24 <sup>a</sup>
Dentate gyrus	50 ± 11	119 ± 35	217 ± 70 <sup>a</sup>	249 ± 91	237 ± 37	428 ± 115	257 ± 65	144 ± 29	173 ± 30
<b>Hippocampus: Ventral</b>									
CA1	45 ± 11	67 ± 8	102 ± 37	157 ± 24	179 ± 24	214 ± 60	201 ± 26	91 ± 12	159 ± 61
CA2/3	52 ± 9	75 ± 25	91 ± 15	264 ± 61	184 ± 75	228 ± 43	254 ± 37	251 ± 103	119 ± 22
Dentate gyrus	43 ± 10	150 ± 64	221 ± 58 <sup>a</sup>	255 ± 80	313 ± 122	370 ± 74	259 ± 40	152 ± 41	196 ± 74
<b>Cortex</b>									
Cingulate	193 ± 46	279 ± 58	156 ± 33	533 ± 95	510 ± 128	364 ± 122	633 ± 47	338 ± 86 <sup>a</sup>	233 ± 68 <sup>a</sup>
Frontal	139 ± 58	132 ± 17	126 ± 40	354 ± 73	233 ± 43	203 ± 46	554 ± 98	164 ± 25 <sup>a</sup>	115 ± 12 <sup>a</sup>
Parietal	62 ± 9	93 ± 12	114 ± 21 <sup>a</sup>	390 ± 113	311 ± 52	223 ± 49	776 ± 183	226 ± 27 <sup>a</sup>	163 ± 40 <sup>a</sup>
Temporal	701 ± 175	607 ± 149	633 ± 143	672 ± 146	501 ± 143	491 ± 47	590 ± 142	185 ± 39 <sup>a</sup>	172 ± 18 <sup>a</sup>
Entorhinal	299 ± 90	290 ± 64	436 ± 106	503 ± 89	323 ± 85	444 ± 47	455 ± 95	154 ± 31 <sup>a</sup>	184 ± 12 <sup>a</sup>
Septum	6702 ± 2156	7085 ± 1803	8081 ± 2165	9474 ± 2485	7844 ± 2300	9907 ± 2728	4437 ± 933	2476 ± 728 <sup>a</sup>	2483 ± 562 <sup>a</sup>
Caudate	22289 ± 3104	19901 ± 2339	19964 ± 3732	21965 ± 1829	10012 ± 2553 <sup>a</sup>	11653 ± 1707 <sup>a</sup>	10185 ± 850	3006 ± 613 <sup>a</sup>	3040 ± 429 <sup>a</sup>

Experimental groups: Young, 8-month-old untransduced rats; GFP, 24-month-old cognitively impaired rats transduced with human green fluorescent protein in the dorsal hippocampus CA1; GDNF, 24-month-old cognitively impaired rats transduced with human glial cell line derived neurotrophic factor in the dorsal hippocampus CA1. Values are the mean ± SEM of 6–9 animals. Statistics: (a) significance of GFP or GDNF groups as compared to young rats; ANOVA followed by Newman–Keuls' test at the significance level of  $p < 0.05$ .

Table 4  
Brain regional concentration of serotonin and its metabolite 5HIAA

	5HT (fmol/mg tissue)			5HIAA (fmol/mg tissue)		
	Young	GFP	GDNF	Young	GFP	GDNF
<b>Hippocampus: Dorsal</b>						
CA1	531 ± 99	766 ± 104	1225 ± 210 <sup>a,b</sup>	2259 ± 313	3097 ± 219	2787 ± 303
CA2/3	383 ± 50	656 ± 118	800 ± 136 <sup>a</sup>	1992 ± 264	3045 ± 601	2881 ± 340
Dentate gyrus	413 ± 107	91 ± 93	1230 ± 186 <sup>a,b</sup>	1729 ± 169	2888 ± 414 <sup>a</sup>	3454 ± 263 <sup>a</sup>
<b>Hippocampus: Ventral</b>						
CA1	789 ± 199	871 ± 181	1329 ± 256	2179 ± 236	3229 ± 262 <sup>a</sup>	3052 ± 345 <sup>a</sup>
CA2/3	454 ± 70	815 ± 188	733 ± 110	2210 ± 259	2799 ± 493	2210 ± 278
Dentate gyrus	535 ± 105	942 ± 235	1405 ± 229 <sup>a</sup>	2458 ± 228	2660 ± 539	3268 ± 371
<b>Cortex</b>						
Cingulate	770 ± 152	1300 ± 94 <sup>a</sup>	956 ± 143	1913 ± 232	3227 ± 1114	1669 ± 258
Frontal	1251 ± 158	1460 ± 226	1421 ± 203	1822 ± 158	1698 ± 244	1757 ± 221
Parietal	666 ± 136	1099 ± 187	1034 ± 181	1646 ± 203	1875 ± 304	1893 ± 237
Temporal	689 ± 104	1386 ± 313 <sup>a</sup>	985 ± 137	1477 ± 208	1978 ± 156	1609 ± 112
Entorhinal	1005 ± 287	1314 ± 224	1614 ± 243	1897 ± 230	2012 ± 234	2344 ± 285
<b>Septum</b>						
Septum	1384 ± 180	1972 ± 317	2084 ± 276	2963 ± 261	3590 ± 333	3713 ± 724
<b>Caudate</b>						
Caudate	736 ± 99	1352 ± 215 <sup>a</sup>	1131 ± 152	2038 ± 153	1991 ± 240	2354 ± 300

Experimental groups: Young, 8-month-old rats; GFP, 24-month-old cognitively impaired rats transduced with human green fluorescent protein in the dorsal hippocampus CA1; GDNF, 24-month-old cognitively impaired rats transduced with human glial cell line derived neurotrophic factor in the dorsal hippocampus CA1. Values are the mean ± S.E.M. of 6–9 animals. Statistics: (a) significance of GFP or GDNF groups as compared to young rats and (b) significance of GDNF as compared to GFP group; ANOVA followed by Newman-Keuls's test at the significance level of  $p < 0.05$ .

way ANOVA showed an effect of brain region (not shown) and rat group for serotonin and 5-HIAA ( $F(2,319) = 25.45$ ,  $p < 0.0001$  and  $F(2,319) = 13.91$ ,  $p < 0.0001$ , respectively). The GDNF group increased serotonin levels in the whole dorsal hippocampus and in the ventral dentate gyrus more than the GFP group. Both groups of aged rats showed a hippocampal increase of 5-HIAA in the dorsal dentate gyrus and the ventral CA1 area. Serotonin also increased in cingulate and temporal cortical areas and in the caudate of control GFP aged rats, as against young rats.

#### 4. Discussion

The over-expression of GDNF in hippocampal astrocytes induced a recovery of spatial cognitive abilities in aged impaired rats as demonstrated by an enhancement of memory retention of the platform location in the test probe trials. This better response in the Morris water maze cannot be attributed to a mere improvement of age-related motor impairment by GDNF. Several studies have shown that GDNF enhances motor function in aged rats and non-human primates, which has been related to dopaminergic induction and regeneration of the nigrostriatal pathway (Bowenkamp et al., 1996; Emerich et al., 1996; Grondin et al., 2003; Herbert and Gerhardt, 1997; Lapchak et al., 1997b). In the present study, GDNF was over-expressed only in a restricted area of the hippocampus and the swimming speed was not affected. In addition, we found no differences in the latency to escape between the rats expressing GDNF and control rats transduced with GFP during the test assays, where an increase in

swimming ability would help the rats to find the platform in a shorter time. Latency to escape to the platform is routinely recorded as an additional spatial learning and memory measure, but its outcome can be affected by external factors. This is not the case with probe trial performance, which is accepted as the most accurate measurement because it requires memory of the precise location of the platform (Bucci et al., 1995; Frick et al., 1995). Accordingly, in previous studies in our behavioral facilities, the probe trial was established as a reliable result for learning acquisition and retention under our experimental conditions (Prados and Trobalon, 1998).

The present results confirm the previous report of a significant recovery of cognitively impaired 2-year old Fisher 344 rats in the Morris water maze 2 weeks after an i.c.v. injection of GDNF (Pellemounter et al., 1999). The degree of spatial learning recovery after a GDNF transgene expression in dorsal CA1 astrocytes was similar to that obtained by earlier authors. Spatial learning and memory require the dorsal hippocampus to function (Compton, 2004; Porthuizen et al., 2004), with the CA1 area being particularly crucial for spatial discrimination tasks (Naghdi et al., 2003; Volpe et al., 1992). In old age, CA1 pyramidal neurons suffer a loss of functional synaptic contacts from the Schaffer collaterals and an alteration in  $Ca^{2+}$  regulation, both changes leading to plasticity and cognition deficits (Himeda et al., 2005; Rosenzweig and Barnes, 2003; Thibault et al., 2001). The absence of a generalized loss of cells and synapses in the hippocampus and the whole brain in normal aging (Hof and Morrison, 2004; Miller and O'Callaghan, 2005) facilitates amelioration of cognitive decline by neurotrophic action. Both GFR $\alpha$ 1 and Ret receptor molecules are highly expressed in the hip-

pocampal neurons of the pyramidal layer of the Ammon's horn (Burazin and Gundlach, 1999; Sarabi et al., 2000; Serra et al., 2005). Therefore, GDNF secreted by CA1 transduced astrocytes was able to exert its trophic action on local neurons. Ectopic fiber sprouting is unlikely because GDNF secreted by transduced astrocytes is poorly transported by neurons to distal areas (Ericson et al., 2005) (Mammeri H. et al., unpublished observations). Nevertheless, a histological study should be performed when long-lasting GDNF gene expression in hippocampus is planned, to rule out unwanted effects in projection areas.

Neurochemical changes in cognitively impaired aged rats have been extensively studied in a search for the causes underlying frequent memory loss in older individuals. Atrophy of acetylcholine containing neurons is considered a hallmark of aging and dementia (Terry and Buccafusco, 2003), but this cholinergic dysfunction occurs within a wider context of neurotransmitter system changes (Decker and McGaugh, 1991; Stemmelin et al., 2000). Cholinergic and monoaminergic neurotransmitter systems are involved in the spatial learning and memory processes in the hippocampus (El-Ghundi et al., 1999; Everitt and Robbins, 1997; McNamara and Skelton, 1993; Richter-Levin and Segal, 1996; Seamans et al., 1998). Hippocampus is a target cholinergic area and no local decrease of ChAT activity was reported in aged rats, confirming our results, whereas ChAT decreases have been found in the cholinergic cell body containing areas of the basal forebrain and striatum in cognitively impaired rats (Gallagher et al., 1990). Hippocampus receives its dopaminergic innervation from the midbrain and is integrated in the mesolimbic system. Many studies have demonstrated an age-related decline in dopaminergic neurotransmission, mainly in the nigrostriatal system (Gallagher et al., 1990; Lee et al., 1994; Mínguez et al., 1999). In addition, decreased density of dopamine receptors D1–D5 have been reported in several brain areas, including the hippocampus of aged rat and human (Amenta et al., 2001; Hemby et al., 2003; Kaasinen et al., 2000). We found a widespread decrease of dopamine metabolite HVA in aged rats, indicative of a lower turnover rate. The effect was higher in the caudate, in which both metabolites, DOPAC and HVA, decreased. The role of the serotonergic system in aging impairment has raised controversy. Several authors have reported unchanged or enhanced serotonin levels and turnover in aged rats (Gallagher et al., 1990; Lee et al., 1994), while others reported decreases (Mínguez et al., 1999). Confirming the former we found a trend to higher serotonin and 5-HIAA concentrations in several brain regions of the aged rats. As regards serotonin receptors, no age-induced or cognitive-related changes have been reported in 5HT1A receptor (Borg et al., 2006; Lazaris et al., 2003).

GDNF over-expression in CA1 astrocytes induced a local neurotrophic effect. ChAT activity, indicative of acetylcholine levels, rose in hippocampus. In a study of motor activity enhancement, 2 weeks of i.c.v. infusion of GDNF induced an increase in ChAT activity in the septum, hippocampus, striatum and cortex of aged rats (Lapchak et al.,

1997b). This study reported a similar enhancement of ChAT by GDNF or neural growth factor (NGF). The trophic effects of NGF on aged cholinergic neurons have been extensively studied (Rylett and Williams, 1994; Sofroniew et al., 2001). NGF binds with high affinity to the TrkA receptor, which is mainly located on cholinergic neurons in the basal forebrain nuclei and striatum (Holtzman et al., 1995). A partial recovery of the cognitive abilities in the Morris water maze, similar to that we obtained with GDNF, was reported initially (Fischer et al., 1987, 1991). In subsequent studies, an almost complete reversal was obtained either by a higher dosage through i.c.v. chronic infusion (Fischer et al., 1994) or by NGF-secreting cell implants at the two main cholinergic forebrain cell groups, nucleus basalis magnocellularis and medial septum/diagonal band of Broca (MS/DB) (Martínez-Serrano et al., 1996). Although hippocampus function resulted significantly enhanced by astrocyte-secreted GDNF, we did not obtain complete recovery of spatial learning. This could be due to a partial inability of locally expressed GDNF to recover the function of the circuitry entering the hippocampus from cholinergic cell bodies located in the MS/DB. A retrograde signaling of GDNF to these cell bodies (Coulpier and Ibáñez, 2004) may not be enough when functional terminals are already reduced. On the other hand, the complexity of the reciprocal cholinergic connections between CA1 and MS/DB (Gaykema et al., 1991; Nyakas et al., 1987) may modulate the functional response. In this regard, ventral CA1 that receives cholinergic afferents from a broader MS/DB area showed slightly higher ChAT enhancement than the greater GDNF-expressing dorsal CA1 area.

In addition to cholinergic enhancement, GDNF secreted by transduced astrocytes enhanced dopaminergic and serotonergic neurotransmission over control aged rats transduced with GFP. Dopamine and serotonin levels increased without the concentration of their metabolites rising, thus demonstrating a significant neurotransmitter synthesis increase. High variability of dopamine level led to a lack of statistical significance for its increase in the dorsal CA1 area, even though GDNF dopamine value nearly doubled the GFP group value. Given the reduction of dopamine receptor function in the hippocampus discussed above, the increased neurotransmitter levels would help to restore dopaminergic function. These tissue dopamine levels could hardly account for an increase in the risk of oxidative damage by dopamine auto-oxidation (Camp et al., 2000). However, the presence of hydroxylated adducts in hippocampus should be analyzed whenever a longer therapy is planned. While GDNF increased serotonin levels less than dopamine it similarly enhanced specific synaptic transmission, as long as there was no loss of serotonin receptors due to aging. As discussed above for the cholinergic neurotransmission, GDNF enhancement of the dopaminergic mesencephalic afferents (Gasbarri et al., 1997) and the serotonergic afferents from the median raphe (McKenna and Vertes, 2001) may not be enough to restore hippocampus functionality. Studies in Parkinson's disease models have demonstrated that GDNF induces higher func-

tional recovery when acting in the striatum terminals than in the substantia nigra dopaminergic bodies (Connor et al., 1999; Kirik et al., 2000). Therefore, an earlier and sustained therapy of GDNF in the hippocampus may be a better strategy for spatial memory recovery than its delivery to other targets. Nonetheless, the study of GDNF effects on other related brain areas should be considered.

GDNF showed a broad neurotrophic effect and probably also enhanced other neurotransmitters involved in learning and memory such as glutamate and GABA. GABAergic interneurons, present in the stratum pyramidale and stratum oriens express GFR $\alpha$ -1 (Sarabi et al., 2000), lose function with aging (Stanley and Shetty, 2004). Decrease of NMDA receptor density in the aged CA1 region correlates with spatial learning decline (Magnusson, 1998). GDNF has shown trophic effects on GABAergic neurons (García-Martínez et al., 2006) and neuroprotective effects against NMDA-mediated excitotoxicity (Nicole et al., 2001). Therefore GDNF may directly enhance these systems or/and counteract the alterations of the interactions between the different brain neurotransmitter systems that contribute to aging deterioration (Decker and McGaugh, 1991; Segovia et al., 2001).

The amelioration of senile neurons or damaged dysfunctional neurons in future human therapies may need a continuous supply of trophic factor (Niewiadomska et al., 2002). Chronic infusion of GDNF through a catheter implanted in the brain has been assayed in Parkinson's patients for periods of up to several years (Love et al., 2005), but may be accompanied by both practical and safety problems. Gene delivery *ex vivo* or *in vivo* allows selective local diffusion of the growth factor without undesirable side effects. Strategies in various experimental animal models of neural diseases include the implant of either astrocytes (Cunningham and Su, 2002; Do Thi et al., 2004; Ericson et al., 2005), neural progenitors (Akerud et al., 2001; Bakshi et al., 2006; Behrstock et al., 2006; Klein et al., 2005) or fibroblasts (Pérez-Navarro et al., 1996, 1999) engineered to secrete GDNF. However, the advances in the design of viral vectors convert *in vivo* gene therapy into an attractive strategy for long-term delivery of trophic factors to the nervous system. Neuroprotective effects in experimental models of neurodegenerative diseases have been obtained by direct *in vivo* transfer of GDNF gene with recombinant adenoviral (Acsadi et al., 2002; Bilanz-Bleuel et al., 1997; Choi-Lundberg et al., 1998; Do Thi et al., 2004; Lapchak et al., 1997a), adeno-associated (Eslamboli et al., 2005; Kirik et al., 2000; McBride et al., 2003; Wang et al., 2002) and lentiviral vectors (Brizard et al., 2006; Georgievska et al., 2002; Guillot et al., 2004; Kordower et al., 2000; Wong et al., 2005). Replication-defective lentiviral vectors are safe and can sustain a strong expression of transgenes for long periods (Naldini et al., 1996). They can efficiently transduce neurons and glial cells and cause minimal inflammatory and immunological responses (Mazarakis et al., 2001; Wong et al., 2006). The combination of viral particle pseudotyping

and gene promoter facilitates targeting of specific cell types (Bemelmans et al., 2005; Cronin et al., 2005). We constructed a lentiviral vector pseudotyped with Mokola G protein and its gene expression driven by the CMV promoter. This vector showed selectivity for transducing the astrocytes in the hippocampal area of injection.

In conclusion, a short chronic delivery of GDNF in the dorsal CA1 hippocampal astrocytes enhanced local cholinergic, dopaminergic and serotonergic transmission, leading to improved spatial learning and memory performance in cognitively impaired aged rats. Astrocytes proved to be an appropriated cell type for over-secreting GDNF in gene therapy strategies. Deficiencies were not totally reverted; suggesting that GDNF paracrine action in the CA1 area could be too restricted to obtain complete recovery of the complex behavioral learning task. Finally, lentiviral vectors showed high efficacy, making feasible longer chronic treatment which would probably have a better outcome. Therefore, the present results demonstrated the therapeutic value of lentiviral vectors expressing GDNF transgene in rat age-related cognitive decline. Further studies to explore the therapeutic possibilities of GDNF in human aging and Alzheimer's disease memory loss, are required.

#### Conflict of interest

The authors declare that there is no actual or potential conflict of interest.

#### Acknowledgements

This research was supported by grants FIS 03/0467 and Red CIEN V-2003-REDC10F-C from the Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias of the Ministry of Health and DURSI 2005/SGR/00826 of the Generalitat de Catalunya. M. Pertusa and S. García-Matas acknowledge a pre-doctoral fellowship from IDIBAPS and the Generalitat de Catalunya, respectively. We are grateful to Dr. H. Almirall and J.M. Marimón for their valuable advice and collaboration in the behavioral studies and to L. Campa and A. Parull for their skilful technical assistance. Confocal microscopic images were obtained by Dr. M. Calvo of the SCT of the University of Barcelona.

#### References

- Acsadi, G., Anguelov, R.A., Yang, H., Toth, G., Thomas, R., Jani, A., Wang, Y., Janakova, E., Mohammad, S., Lewis, R.A., Shy, M.E., 2002. Increased survival and function of SOD1 mice after glial cell-derived neurotrophic factor gene therapy. *Human Gen. Ther.* 13 (9), 1047–1059.
- Akerud, P., Canals, J.M., Snyder, E.Y., Arenas, E., 2001. Neuroprotection through delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor by neural stem cells in a mouse model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 21 (20), 8108–8118.

- Alberch, J., Pérez-Navarro, E., Canals, J.M., 2004. Neurotrophic factors in Huntington's disease. *Prog. Brain Res.* 146, 195–229.
- Amenta, F., Mignini, F., Ricci, A., Sabbatini, M., Tomassoni, D., Tayebati, S.K., 2001. Age-related changes of dopamine receptors in the rat hippocampus: a light microscope autoradiography study. *Mech. Ageing Dev.* 122 (16), 2071–2083.
- Araujo, D.M., Lapchak, P.A., Meaney, M.J., Collier, B., Quirion, R., 1990. Effects of aging on nicotinic and muscarinic autoreceptor function in the rat brain: relationship to presynaptic cholinergic markers and binding sites. *J. Neurosci.* 10 (9), 3069–3078.
- Arenas, E., Trupp, M., Akerud, P., Ibáñez, C.F., 1995. GDNF prevents degeneration and promotes the phenotype of brain noradrenergic neurons in vivo. *Neuron* 15 (6), 1465–1473.
- Bakshi, A., Shimizu, S., Keck, C.A., Cho, S., Lebold, D.G., Morales, D., Arenas, E., Snyder, E.Y., Watson, D.J., McIntosh, T.K., 2006. Neural progenitor cells engineered to secrete GDNF show enhanced survival, neuronal differentiation and improve cognitive function following traumatic brain injury. *Eur. J. Neurosci.* 23 (8), 2119–2134.
- Baxter, M.G., Frick, K.M., Price, D.L., Breckler, S.J., Markowska, A.L., Gorman, L.K., 1999. Presynaptic markers of cholinergic function in the rat brain: relationship with age and cognitive status. *Neuroscience* 89 (3), 771–780.
- Behrstock, S., Ebert, A., McHugh, J., Vosberg, S., Moore, J., Schneider, B., Capowski, E., Hei, D., Kordower, J., Aebischer, P., Svendsen, C.N., 2006. Human neural progenitors deliver glial cell line-derived neurotrophic factor to parkinsonian rodents and aged primates. *Gene Ther.* 13 (5), 379–388.
- Bemelmans, A.P., Bonnel, S., Houhou, L., Dufour, N., Nandrot, E., Helminger, D., Sarkis, C., Abitbol, M., Mallet, J., 2005. Retinal cell type expression specificity of HIV-1-derived gene transfer vectors upon sub-retinal injection in the adult rat: influence of pseudotyping and promoter. *J. Gene Med.* 7 (10), 1367–1374.
- Bilang-Bleuel, A., Revah, F., Colin, P., Locquet, I., Robert, J.J., Mallet, J., Horellou, P., 1997. Intrastriatal injection of an adenoviral vector expressing glial-cell-line-derived neurotrophic factor prevents dopaminergic neuron degeneration and behavioral impairment in a rat model of Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (16), 8818–8823.
- Bohn, M.C., 2004. Motoneurons crave glial cell line-derived neurotrophic factor. *Exp. Neurol.* 190 (2), 263–275.
- Bontempi, B., Whelan, K.T., Risbrough, V.B., Lloyd, G.K., Menzaghi, F., 2003. Cognitive enhancing properties and tolerability of cholinergic agents in mice: a comparative study of nicotine, donepezil, and SIB-1553A, a subtype-selective ligand for nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropsychopharmacology* 28 (7), 1235–1246.
- Borg, J., Andree, B., Lundberg, J., Halldín, C., Farde, L., 2006. Search for correlations between serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor expression and cognitive functions—a strategy in translational psychopharmacology. *Psychopharmacology (Berl.)* 185 (3), 389–394.
- Bowenkamp, K.E., Lapchak, P.A., Hoffer, B.J., Bickford, P.C., 1996. Glial cell line-derived neurotrophic factor reverses motor impairment in 16–17 month old rats. *Neurosci. Lett.* 211 (2), 81–84.
- Bowenkamp, K.E., Lapchak, P.A., Hoffer, B.J., Miller, P.J., Bickford, P.C., 1997. Intracerebroventricular glial cell line-derived neurotrophic factor improves motor function and supports nigrostriatal dopamine neurons in bilaterally 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Exp. Neurol.* 145 (1), 104–117.
- Brizard, M., Carcenac, C., Bemelmans, A.P., Feuerstein, C., Mallet, J., Savasta, M., 2006. Functional reinnervation from remaining DA terminals induced by GDNF lentivirus in a rat model of early Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 21 (1), 90–101.
- Broadbent, N.J., Squire, L.R., Clark, R.E., 2004. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (40), 14515–14520.
- Bucci, D.J., Chiba, A.A., Gallagher, M., 1995. Spatial learning in male and female Long-Evans rats. *Behav. Neurosci.* 109 (1), 180–183.
- Burazin, T.C., Gundlach, A.L., 1999. Brain Localization of GDNF/neurturin receptor (*c-ret*, GFR $\alpha$ -1 and  $\alpha$ -2) mRNAs in postnatal rat brain: differential regional and temporal expression in hippocampus, cortex and cerebellum. *Mol. Brain Res.* 73 (1–2), 151–171.
- Camp, D.M., Loeffler, D.A., LeWitt, P.A., 2000. L-DOPA does not enhance hydroxyl radical formation in the nigrostriatal dopamine system of rats with a unilateral 6-hydroxydopamine lesion. *J. Neurochem.* 74 (3), 1229–1240.
- Chamizo, V.D., Manteiga, R.D., Rodrigo, T., Mackintosh, N.J., 2006. Competition between landmarks in spatial learning: the role of proximity to the goal. *Behav. Process.* 71 (1), 59–65.
- Cheng, H., Huang, S.S., Lin, S.M., Lin, M.J., Chu, Y.C., Chih, C.L., Tsai, M.J., Lin, H.C., Huang, W.C., Tsai, S.K., 2005. The neuroprotective effect of glial cell line-derived neurotrophic factor in fibrin glue against chronic focal cerebral ischemia in conscious rats. *Brain Res.* 1033 (1), 28–33.
- Choi-Lundberg, D.L., Lin, Q., Schallert, T., Crippens, D., Davidson, B.L., Chang, Y.N., Chiang, Y.L., Qian, J., Bardwaj, L., Bohn, M.C., 1998. Behavioral and cellular protection of rat dopaminergic neurons by an adenoviral vector encoding glial cell line-derived neurotrophic factor. *Exp. Neurol.* 154 (2), 261–275.
- Compton, D.M., 2004. Behavior strategy learning in rat: effect of lesions of the dorsal striatum or dorsal hippocampus. *Behav. Process.* 67 (3), 335–342.
- Connor, B., Kozlowski, D.A., Schallert, T., Tillerson, J.L., Davidson, B.L., Bohn, M.C., 1999. Differential effects of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in the striatum and substantia nigra of the aged Parkinsonian rat. *Gene Ther.* 6 (12), 1936–1951.
- Coulpier, M., Ibáñez, C.F., 2004. Retrograde propagation of GDNF-mediated signals in sympathetic neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 27 (2), 132–139.
- Cronin, J., Zhang, X.Y., Reiser, J., 2005. Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. *Curr. Gene Ther.* 5 (4), 387–398.
- Cunningham, L.A., Su, C., 2002. Astrocyte delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor in a mouse model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 174 (2), 230–242.
- Decker, M.W., McLaugh, J.L., 1991. The role of interactions between the cholinergic system and other neuromodulatory systems in learning and memory. *Synapse* 7 (2), 151–168.
- Do Thi, N.A., Saillour, P., Ferrero, L., Dedieu, J.F., Mallet, J., Pannio, T., 2004. Delivery of GDNF by an E1E3/E4 deleted adenoviral vector and driven by a GFAP promoter prevents dopaminergic neuron degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Gene Ther.* 11 (9), 746–756.
- El Ghundi, M., Fletcher, P.J., Drago, J., Sibley, D.R., O'Dowd, B.F., George, S.R., 1999. Spatial learning deficit in dopamine D<sub>1</sub> receptor knockout mice. *Eur. J. Pharmacol.* 383 (2), 95–106.
- Emerich, D.F., Plone, M., Francis, J., Frydel, B.R., Winn, S.R., Lindner, M.D., 1996. Alleviation of behavioral deficits in aged rodents following implantation of encapsulated GDNF-producing fibroblasts. *Brain Res.* 736 (1–2), 99–110.
- Ericson, C., Georgievska, B., Lundberg, C., 2005. Ex vivo gene delivery of GDNF using primary astrocytes transduced with a lentiviral vector provides neuroprotection in a rat model of Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.* 22 (11), 2755–2764.
- Eslamboli, A., 2005. Assessment of GDNF in primate models of Parkinson's disease: comparison with human studies. *Rev. Neurosci.* 16 (4), 303–310.
- Eslamboli, A., Georgievska, B., Ridley, R.M., Baker, H.F., Muzyczka, N., Burger, C., Mandel, R.J., Annett, L., Kirik, D., 2005. Continuous low-level glial cell line-derived neurotrophic factor delivery using recombinant adeno-associated viral vectors provides neuroprotection and induces behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 25 (4), 769–777.
- Everitt, B.J., Robbins, T.W., 1997. Central cholinergic systems and cognition. *Annu. Rev. Psychol.* 48, 649–684.
- Fernández-Espejo, 2004. Pathogenesis of Parkinson's disease: prospects of neuroprotective and restorative therapies. *Mol. Neurobiol.* 29 (1), 15–30.
- Fischer, W., Victorin, K., Bjorklund, A., Williams, L.R., Varon, S., Gage, F.H., 1987. Amelioration of cholinergic neuron atrophy and spatial mem-

- ory impairment in aged rats by nerve growth factor. *Nature* 329 (6134), 65–68.
- Fischer, W., Björklund, A., Chen, K., Gage, F.H., 1991. NGF improves spatial memory in aged rodents as a function of age. *J. Neurosci.* 11 (7), 1889–1906.
- Fischer, W., Sirevaag, A., Wiegand, S.J., Lindsay, R.M., Björklund, A., 1994. Reversal of memory impairment in aged rats by nerve growth factor and neurotrophins 3 and 4/5 but not by brain-derived neurotrophic factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (18), 8607–8611.
- Frick, K.M., Baxter, M.G., Markowska, A.L., Olton, D.S., Price, D.L., 1995. Age-related spatial reference and working memory deficits assessed in the water maze. *Neurobiol. Aging* 16 (2), 149–160.
- Gallagher, M., Burwell, R.D., Kodsi, M.H., McKinney, M., Southerland, S., Vella-Rountree, L., Lewis, M.H., 1990. Markers for biogenic amines in the aged brain: relationship to decline in spatial learning ability. *Neurobiol. Aging* 11 (5), 507–514.
- Gasbarri, A., Sulli, A., Packard, M.G., 1997. The dopaminergic mesencephalic projections to the hippocampal formation in the rat. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiat.* 21, 1–22.
- García-Martínez, J.M., Pérez-Navarro, E., Gavalda, N., Alberch, J., 2006. Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes the arborization of cultured striatal neurons through the p42/p44 mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Neurosci. Res.* 83 (1), 68–79.
- Gash, D.M., Zhang, Z., Ovadia, A., Cass, W.A., Yi, A., Simmerman, L., Russell, D., Martin, D., Lapchak, P.A., Collins, F., Hoffer, B.J., Gerhardt, G.A., 1996. Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature* 380 (6571), 252–255.
- Gaykema, R.P.A., van der Kuil, J., Hersh, L.B., Luiten, P.G.M., 1991. Patterns of direct projections from the hippocampus to the medial septum-diagonal band complex: anterograde tracing with Phaseolus Vulgaris leucoagglutinin combined with immunohistochemistry of choline acetyltransferase. *Neuroscience* 43 (2–3), 349–360.
- Georgievska, B., Kirik, D., Rosenblad, C., Lundberg, C., Björklund, A., 2002. Neuroprotection in the rat Parkinson model by intrastriatal GDNF gene transfer using a lentiviral vector. *Neuroreport* 13 (1), 75–82.
- Gerlai, R., McNamara, A., Choi-Lundberg, D.L., Armanini, M., Ross, J., Powell-Braxton, L., Phillips, H.S., 2001. Impaired water maze learning performance without altered dopaminergic function in mice heterozygous for the GDNF mutation. *Eur. J. Neurosci.* 14 (7), 1153–1163.
- Ghribi, O., Herman, M.M., Pramoonjago, P., Spaulding, N.K., Savory, J., 2004. GDNF regulates the  $\beta$ -induced endoplasmic reticulum stress response in rabbit hippocampus by inhibiting the activation of gadd 153 and the JNK and ERK kinases. *Neurobiol. Dis.* 16 (2), 417–427.
- Gill, S.S., Patel, N.K., Hotton, G.R., O'Sullivan, K., McCarter, R., Bunnage, M., Brooks, D.J., Svendsen, C.N., Heywood, P., 2003. Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat. Med.* 9 (5), 589–595.
- Good, M., 2002. Spatial memory and hippocampal function: where are we now? *Psicológica* 23, 109–138.
- Grondin, R., Cass, W.A., Zhang, Z., Stanford, J.A., Gash, D.M., Gerhardt, G.A., 2003. Glial cell line-derived neurotrophic factor increases stimulus-evoked dopamine release and motor speed in aged rhesus monkeys. *J. Neurosci.* 23 (5), 1974–1980.
- Guillot, S., Azzouz, M., Deglon, N., Zum, A., Aebischer, P., 2004. Local GDNF expression mediated by lentiviral vector protects facial nerve motoneurons but not spinal motoneurons in SOD1<sup>G93A</sup> transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* 16 (1), 139–149.
- Hemby, S.E., Trojanowski, J.Q., Ginsberg, S.D., 2003. Neuron-specific age-related decreases in dopamine receptor subtype mRNAs. *J. Comp. Neurol.* 456 (2), 176–183.
- Henderson, C.E., Phillips, H.S., Pollock, R.A., Davies, A.M., Lemeulle, C., Armanini, M., Simmons, L., Moffet, B., Vandlen, R.A., Simpson, L.C., 1994. GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science* 266 (5187), 1062–1064.
- Herbert, M.A., Gerhardt, G.A., 1997. Behavioral and neurochemical effects of intranigral administration of glial cell line-derived neurotrophic factor on aged Fischer 344 rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282 (2), 760–768.
- Hernández, C.M., Parikh, V., Hohmadel, E.J., Davis, L.W., Middlemore, M.L., Warsi, S.P., Waller, J.L., Terry Jr., A.V., 2006. Comparison of galantamine and donepezil for effects on nerve growth factor, cholinergic markers, and memory performance in aged rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316 (2), 679–684.
- Himeda, T., Mizuno, K., Kato, H., Araki, T., 2005. Effects of age on immunohistochemical changes in the mouse hippocampus. *Mech. Ageing Dev.* 126 (6–7), 673–677.
- Ho, A., Gore, A.C., Weickert, C.S., Blum, M., 1995. Glutamate regulation of GDNF gene expression in the striatum and primary striatal astrocytes. *Neuroreport* 6 (10), 1454–1458.
- Hof, P.R., Morrison, J.H., 2004. The aging brain: morphomolecular senescence of cortical circuits. *Trends Neurosci.* 27 (10), 607–613.
- Holtzman, D.M., Kilbridge, J., Li, Y., Cunningham Jr., E.T., Lenn, N.J., Clary, D.O., Reichardt, L.F., Mobley, W.C., 1995. *TrkA* expression in the CNS: evidence for the existence of several novel NGF-responsive CNS neurons. *J. Neurosci.* 15 (2), 1567–1576.
- Kaasinen, V., Vilkinen, H., Hietala, J., Nagren, K., Helenius, H., Olsson, H., Farde, L., Rinne, J., 2000. Age-related dopamine D2/D3 receptor loss in extrastriatal regions of the human brain. *Neurobiol. Aging* 21 (5), 683–688.
- Kilic, U., Kilic, E., Dietz, G.P., Bahr, M., 2003. Intravenous TAT-GDNF is protective after focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* 34 (5), 1304–1310.
- Kirik, D., Rosenblad, C., Björklund, A., Mandel, R.J., 2000. Long-term rAAV-mediated gene transfer of GDNF in the rat Parkinson's model: intrastriatal but not intranigral transduction promotes functional regeneration in the lesioned nigrostriatal system. *J. Neurosci.* 20 (12), 4686–4700.
- Klein, S.M., Behrstock, S., McHugh, J., Hoffmann, K., Wallace, K., Suzuki, M., Aebischer, P., Svendsen, C.N., 2005. GDNF delivery using human neural progenitor cells in a rat model of ALS. *Hum. Gene Ther.* 16 (4), 509–521.
- Kordower, J.H., Emborg, M.E., Bloch, J., Ma, S.Y., Chu, Y., Leventhal, L., McBride, J., Chen, E.Y., Palfi, S., Roitberg, B.Z., Brown, W.D., Holden, J.E., Pyzalski, R., Taylor, M.D., Carvey, P., Ling, Z., Trono, D., Hantraye, P., Deglon, N., Aebischer, P., 2000. Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science* 290 (5492), 767–773.
- Lapchak, P.A., Araujo, D.M., Hilt, D.C., Sheng, J., Jiao, S., 1997a. Adenoviral vector-mediated GDNF gene therapy in a rodent lesion model of late stage Parkinson's disease. *Brain Res.* 777 (1–2), 153–160.
- Lapchak, P.A., Miller, P.J., Jiao, S., 1997b. Glial cell line-derived neurotrophic factor induces the dopaminergic and cholinergic phenotype and increases locomotor activity in aged Fischer 344 rats. *Neuroscience* 77 (3), 745–752.
- Lazaris, A., Bertrand, F., Lazarus, C., Galani, R., Stemmelin, J., Poirier, R., Kelche, C., Cassel, J.C., 2003. Baseline and 8-OH-DPAT-induced release of acetylcholine in the hippocampus of aged rats with different levels of cognitive dysfunction. *Brain Res.* 967 (1–2), 181–190.
- Lee, J.M., Ross, E.R., Gower, A., Paris, J.M., Martenson, R., Lorens, S.A., 1994. Spatial learning deficits in the aged rat: neuroanatomical and neurochemical correlates. *Brain Res. Bull.* 33 (5), 489–500.
- Levin, E.D., Christopher, N.C., Lateef, S., Elamir, B.M., Patel, M., Liang, L.P., Crapo, J.D., 2002. Extracellular superoxide dismutase overexpression protects against aging-induced cognitive impairment in mice. *Behav. Genet.* 32 (2), 119–125.
- Lin, L.F., Doherty, D.H., Lile, J.D., Bektesh, S., Collins, F., 1993. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260 (5111), 1130–1132.
- Lin, L.F., Zhang, T.J., Collins, F., Armes, L.G., 1994. Purification and initial characterization of rat B4 glial cell line-derived neurotrophic factor. *J. Neurochem.* 63 (2), 758–768.
- Love, S., Plaha, P., Patel, N.K., Hotton, G.R., Brooks, D.J., Gill, S.S., 2005. Glial cell line-derived neurotrophic factor induces neuronal sprouting in human brain. *Nat. Med.* 11 (7), 703–704.



- Magnusson, K.R., 1998. Aging of glutamate receptors: correlations between binding and spatial memory performance in mice. *Mech. Ageing Dev.* 104 (3), 227–248.
- Marco, S., Canudas, A.M., Canals, J.M., Gavaldà, N., Pérez-Navarro, E., Alberch, J., 2002. Excitatory amino acids differentially regulate the expression of GDNF, neurturin, and their receptors in the adult rat striatum. *Exp. Neurol.* 174 (2), 243–252.
- Martin, D., Miller, G., Rosendahl, M., Russell, D.A., 1995. Potent inhibitory effects of glial derived neurotrophic factor against kainic acid mediated seizures in the rat. *Brain Res.* 683 (2), 172–178.
- Martínez-Serrano, A., Fischer, W., Söderström, S., Ebendal, T., Björklund, A., 1996. Long-term functional recovery from age-induced spatial memory impairments by nerve growth factor gene transfer to the rat basal forebrain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (13), 6355–6360.
- Mazarakis, N.D., Azzouz, M., Rohll, J.B., Ellard, F.M., Wilkes, F.J., Olsen, A.L., Carter, E.E., Barber, R.D., Baban, D.F., Kingsman, S.M., Kingsman, A.J., O'Malley, K., Mitrophanous, K.A., 2001. Rabies virus glycoprotein pseudotyping of lentiviral vectors enables retrograde axonal transport and access to the nervous system after peripheral delivery. *Hum. Mol. Genet.* 10 (19), 2109–2121.
- McBride, J.L., Durning, M.J., Wu, J., Chen, E.Y., Leurgans, S.E., Kordower, J.H., 2003. Structural and functional neuroprotection in a rat model of Huntington's disease by viral gene transfer of GDNF. *Exp. Neurol.* 181 (2), 213–223.
- McGeer, E.G., McGeer, P.L., 2005. Pharmacological approaches to the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *BioDrugs* 19 (1), 31–37.
- McKenna, J.T., Vertes, R.P., 2001. Collateral projections from the median raphe nucleus to the median septum and hippocampus. *Brain Res. Bull.* 54 (6), 619–630.
- McNamara, R.K., Skelton, R.W., 1993. The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris water maze. *Brain Res. Rev.* 18 (1), 33–49.
- Miller, D.B., O'Callaghan, J.P., 2005. Aging, stress and the hippocampus. *Ageing Res. Rev.* 4 (2), 123–140.
- Minguez, J.M., Aldegunde, M., Paz-Valiñas, L., Recio, J., Sánchez-Barceló, E., 1999. Selective changes in the contents of noradrenaline, dopamine and serotonin in rat brain areas during aging. *J. Neural Trans.* 106 (11–12), 1089–1098.
- Miyazaki, H., Okuma, Y., Fuji, Y., Nagashima, K., Nombra, Y., 1999. Glial cell line-derived neurotrophic factor protects against delayed neuronal death after transient forebrain ischemia in rats. *Neuroscience* 89 (3), 643–647.
- Miyazaki, H., Nagashima, K., Okuma, Y., Nomura, Y., 2001. Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor induced by transient forebrain ischemia in rats. *Brain Res.* 922 (2), 165–172.
- Morris, R.G.M., 1981. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn. Motiv.* 12, 239–260.
- Naghdi, N., Majlessi, N., Bozorgmehr, T., 2003. The effects of anisomycin (a protein synthesis inhibitor) on spatial learning and memory in CA1 region of rats hippocampus. *Behav. Brain Res.* 139 (1–2), 69–73.
- Naldini, L., Blömer, U., Gage, F.H., Trono, D., Verma, I.M., 1996. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (21), 11382–11388.
- Nicole, O., Ali, C., Docagne, F., Plawinski, L., MacKenzie, E.T., Vivien, D., Buisson, A., 2001. Neuroprotection mediated by glial cell line-derived neurotrophic factor: involvement of a reduction of NMDA-induced calcium influx by the mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Neurosci.* 21 (9), 3024–3033.
- Niewiadomska, G., Komorowski, S., Baksalerska-Pazera, M., 2002. Amelioration of cholinergic neurons dysfunction in aged rats depends on the continuous supply of NGF. *Neurobiol. Aging* 23 (4), 601–613.
- Nishiyama, N., Moriguchi, T., Saito, H., 1997. Beneficial effects of aged garlic extract on learning and memory impairment in the senescence-accelerated mouse. *Exp. Gerontol.* 32 (1/2), 149–160.
- Nyakas, C., Luiten, P.G., Spencer, D.G., Traber, J., 1987. Detailed projection patterns of septal and diagonal band efferents to the hippocampus in the rat with emphasis on innervation of CA1 and dentate gyrus. *Brain Res. Bull.* 18 (4), 533–545.
- Oppenheim, R.W., Hounou, L.J., Johnson, J.E., Lin, L.F., Li, L., Lo, A.C., Newsome, A.L., Pevette, D.M., Wang, S., 1995. Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF. *Nature* 373 (6512), 334–336.
- Parsadanian, A., Pan, Y., Li, W., Myckatyn, T.M., Brakefield, D., 2006. Astrocyte-derived transgene GDNF promotes complete and long-term survival of adult facial motoneurons following avulsion and differentially regulates the expression of transcription factors of AP-1 and ATF/CREB families. *Exp. Neurol.* 200 (1), 26–37.
- Paxinos, G., Watson, C., 1986. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, second ed. Academic Press, Sydney.
- Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Baker, M.B., Healy, D., 1999. Glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) improves spatial learning in aged Fisher 344 rats. *Psychobiology* 27 (3), 397–401.
- Pérez-Navarro, E., Arenas, E., Reiriz, J., Calvo, N., Alberch, J., 1996. Glial cell line-derived neurotrophic factor protects striatal calbindin-immunoreactive neurons from excitotoxic damage. *Neuroscience* 75 (2), 345–352.
- Pérez-Navarro, E., Arenas, E., Marco, S., Alberch, J., 1999. Intrastriatal grafting of a GDNF-producing cell line protects striatonigral neurons from quinolinic acid excitotoxicity in vivo. *Eur. J. Neurosci.* 11 (1), 241–249.
- Porthuizen, H.H., Zhang, W.N., Jongen-Relo, A.L., Feldon, J., Yee, B.K., 2004. Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory. *Eur. J. Neurosci.* 19 (3), 705–712.
- Prados, J., Trobalon, J.B., 1998. Locating an invisible goal in a water maze requires at least two landmarks. *Psychobiology* 26 (1), 42–48.
- Richter-Levin, G., Segal, M., 1996. Serotonin, aging and cognitive functions of the hippocampus. *Rev. Neurosci.* 7 (2), 103–113.
- Rosenzweig, E.S., Barnes, C.A., 2003. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog. Neurobiol.* 69 (3), 143–179.
- Rylett, R.J., Williams, L.R., 1994. Role of neurotrophins in cholinergic-neurone function in the adult and aged CNS. *Trends Neurosci.* 17 (11), 486–490.
- Sarabi, A., Hoffer, B.J., Olson, L., Morales, M., 2000. GFR $\alpha$ -1 is expressed in parvalbumin GABAergic neurons in the hippocampus. *Brain Res.* 877, 262–270.
- Schaar, D.G., Sieber, B.A., Dreyfus, C.F., Black, L.B., 1993. Regional and cell-specific expression of GDNF in rat brain. *Exp. Neurol.* 124 (2), 368–371.
- Seamans, J.K., Floresco, S.B., Phillips, A.G., 1998. D1 receptor modulation of hippocampal-prefrontal cortical circuits integrating spatial memory with executive functions in the rat. *J. Neurosci.* 18 (4), 1613–1621.
- Segovia, G., Pomas, A., Del Arco, A., Mora, F., 2001. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech. Ageing Dev.* 122 (1), 1–29.
- Serra, M.P., Quartu, M., Mascia, F., Manca, A., Boi, M., Pisu, M.G., Lai, M.L., Del Fiaco, M., 2005. Ret, GFR $\alpha$ -1, GFR $\alpha$ -2 and GFR $\alpha$ -3 receptors in the human hippocampus and fascia dentata. *Int. J. Dev. Neurosci.* 23 (5), 425–438.
- Sofroniew, M.V., Howe, C.L., Mobley, W.C., 2001. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 1217–1281.
- Stanley, D.P., Shetty, A.K., 2004. Aging in the rat hippocampus is associated with widespread reductions in the number of glutamate decarboxylase-67 positive interneurons but not interneuron degeneration. *J. Neurochem.* 89 (1), 204–216.
- Stemmelin, J., Lazarus, C., Cassel, S., Kelche, C., Cassel, J.C., 2000. Immunohistological and neurochemical correlates of learning deficits in aged rats. *Neuroscience* 96 (2), 275–289.
- Terry Jr., A.V., Buccafusco, J.J., 2003. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and

- their implications for novel drug development. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306 (3), 821–827.
- Thibault, O., Hadley, R., Landfield, P.W., 2001. Elevated postsynaptic  $[Ca^{2+}]_i$  and L-type calcium channel activity in aged hippocampal neurons: relationship to impaired synaptic plasticity. *J. Neurosci.* 21 (24), 9744–9756.
- Tokumine, J., Kakinohana, O., Cizkova, D., Smith, D.W., Marsala, M., 2003. Changes in spinal GDNF, BDNF, and NT-3 expression after transient spinal cord ischemia in the rat. *J. Neurosci. Res.* 74 (4), 552–561.
- Treanor, J.J., Goodman, L., de Sauvage, F., Stone, D.M., Poulsen, K.T., Beck, C.D., Gray, C., Armanini, M.P., Pollock, R.A., Hefti, F., Phillips, H.S., Goddard, A., Moore, M.W., Buj-Bello, A., Davies, A.M., Asai, N., Takahashi, M., Vandlen, R., Henderson, C.E., Rosenthal, A., 1996. Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature* 382 (6586), 80–83.
- Ugarte, S.D., Lin, E., Klann, E., Zigmund, M.J., Perez, R.G., 2003. Effects of GDNF on 6-OHDA-induced death in a dopaminergic cell line: modulation by inhibitors of PI3 kinase and MEK. *J. Neurosci. Res.* 73 (1), 105–112.
- Volpe, B.T., Davies, H.P., Towle, A., Dunlap, W.P., 1992. Loss of hippocampal CA1 pyramidal neurons correlates with memory impairment in rats with ischemic or neurotoxin lesions. *Behav. Neurosci.* 106 (3), 457–464.
- Williams, L.R., Inouye, G., Cummins, V., Pellemounter, M.A., 1996. Glial cell line-derived neurotrophic factor sustains axotomized basal forebrain cholinergic neurons in vivo: dose–response comparison to nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277 (2), 1140–1151.
- Wang, Y., Lin, S.Z., Chiou, A.L., Williams, L.R., Hoffer, B.J., 1997. Glial cell line-derived neurotrophic factor protects against ischemia-induced injury in the cerebral cortex. *J. Neurosci.* 17 (11), 4341–4348.
- Wang, L.J., Lu, Y.Y., Muramatsu, S., Ikeguchi, K., Fujimoto, K., Okada, T., Mizukami, H., Matsushita, T., Hanazono, Y., Kume, A., Nagatsu, T., Ozawa, K., Nakano, I., 2002. Neuroprotective effects of glial cell line-derived neurotrophic factor mediated by an adeno-associated virus vector in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Gene Ther.* 9 (6), 381–389.
- Wong, L.F., Ralph, G.S., Walmsley, L.E., Bienemann, A.S., Parham, S., Kingsman, S.M., Uney, J.B., Mazarakis, N.D., 2005. Lentiviral-mediated delivery of Bcl-2 or GDNF protects against excitotoxicity in the rat hippocampus. *Mol. Ther.* 11 (1), 89–95.
- Wong, L.F., Goodhead, L., Prat, C., Mitrophanous, K.A., Kingsman, S.M., Mazarakis, N.D., 2006. Lentivirus-mediated gene transfer to the central nervous system: therapeutic and research applications. *Hum. Gene Ther.* 17 (1), 1–9.
- Yan, Q., Matheson, C., Lopez, O.T., 1995. In vivo neurotrophic effects of GDNF on neonatal and adult facial motor neurons. *Nature* 373 (6512), 341–344.
- Zennou, V., Petit, C., Guetard, D., Nerhbass, U., Montagnier, L., Charneau, P., 2000. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* 101 (2), 173–185.
- Zhao, Z., Alam, S., Oppenheim, R.W., Prevette, D.M., Evenson, A., Parsadanian, A., 2004. Overexpression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the CNS rescues motoneurons from programmed cell death and promotes their long-term survival following axotomy. *Exp. Neurol.* 190 (2), 356–372.
- Zufferey, R., Donello, J.E., Trono, D., Hope, T.J., 1999. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J. Virol.* 73 (4), 2886–2892.

#### 4. CUARTO ARTÍCULO

---

## In vitro and in vivo activation of astrocytes by beta amyloid is potentiated by prooxidant agents

S. García-Matas<sup>1</sup>, N. de Vera<sup>1</sup>, A. Ortega<sup>2</sup>, JM. Marimon<sup>3</sup>, A. Adell<sup>4</sup>,  
AM. Planas<sup>1</sup>, R. Cristòfol<sup>1</sup> and C. Sanfeliu<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departament d'Isquèmia Cerebral i Neurodegeneració, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB), CSIC-IDIBAPS, 08036 Barcelona, Spain.

<sup>2</sup> Departament d'Anatomia Patològica, Hospital Universitari Vall d'Hebron, 08035 Barcelona.

<sup>3</sup> Unitat d'Experimentació Animal de Psicologia, Universitat de Barcelona, 08035 Barcelona.

<sup>4</sup> Departament de Neuroquímica i Neurofarmacologia, IIBB, CSIC-IDIBAPS, 08036 Barcelona.

Acceptado en Journal of Alzheimer's Disease

## RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad devastadora dentro de las enfermedades neurodegenerativas. El mayor factor de riesgo para EA esporádica (que es el tipo predominante) es la edad. La neurotoxicidad por el péptido betamiloide ( $A\beta$ ) está propuesto como el primer paso de una cascada de eventos perjudiciales para la patología de la EA y las demencias. Participantes importantes de estos cambios cerebrales son las células gliales. Los astrocitos prestan apoyo vital a las neuronas, y también modulan la funcionalidad de la sinapsis. Por lo tanto, los efectos tóxicos del  $A\beta$  sobre los astrocitos colaborarían a desarrollar cambios neurodegenerativos que conducen a la EA. El envejecimiento disminuye la defensa antioxidante e induce estrés oxidativo. Hemos estudiado los efectos de  $A\beta_{42}$  sobre los cultivos de los astrocitos humanos en la presencia o ausencia de los agentes prooxidantes como butionina sulfoximina (BSO), un inhibidor de síntesis glutatión y  $FeSO_4$  que libera hierro redox activo. Condiciones prooxidantes potenciaron la toxicidad del  $A\beta$ , que se demostraron por la generación de radicales libres, cambios inflamatorios y apoptosis en los astrocitos humanos. Un tratamiento similar fue ensayado en la rata in vivo. Una mezcla del  $A\beta_{40}$  y  $A\beta_{42}$  o sólo del  $A\beta_{42}$  fue infundida intracerebroventricularmente durante 4 semanas. Otros grupos animales eran simultáneamente infundidos con BSO y Fe. Un análisis realizado 4 meses más tarde mostró un mayor deterioro cognitivo en el laberinto acuático de Morris con el tratamiento de  $A\beta$  conjuntamente con los tratamientos con agentes prooxidantes. Agentes prooxidantes también potenciaron la patología del tejido cerebral, así los estudios histológicos mostraron una mayor reactividad astrogliar, depósitos de  $A\beta$  y daño oxidativo en las neuronas hipocámpicas sensibles a EA. Para avanzar en la comprensión de la EA, resulta pertinente analizar los efectos de  $A\beta$  en modelos experimentales que imitan los cambios del cerebro relacionados con la edad, donde el estrés oxidativo potencia los efectos del  $A\beta$ .

**Title:**

*In vitro* and *in vivo* activation of astrocytes by amyloid  $\beta$  is potentiated by pro-oxidant agents

**Authors and affiliation:**

S García-Matas<sup>1</sup>, N de Vera<sup>1</sup>, A Ortega Aznar<sup>2</sup>, JM Marimon<sup>3</sup>, A Adell<sup>4</sup>, AM Planas<sup>1</sup>, R Cristòfol<sup>1</sup>, C Sanfeliu<sup>1</sup>.

1. Dept. Isquèmia Cerebral i Neurodegeneració, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB), CSIC-IDIBAPS, E-08036 Barcelona, Spain.

2. Dept. Anatomia Patològica (Neuropatologia), Hospital Universitari Vall d'Hebron, E-08035 Barcelona.

3. Unitat d'Experimentació Animal de Psicologia, Universitat de Barcelona, E-08035 Barcelona.

4. Departament de Neuroquímica i Neurofarmacologia, IIBB, CSIC-IDIBAPS, E-08036 Barcelona.

**Running title:**

Amyloid  $\beta$  activated astrocytes

**Correspondence:**

Dr Coral Sanfeliu

Dept. Brain Ischemia and Neurodegeneration

IIBB, CSIC-IDIBAPS

c/Rosselló 161, 6th floor

08036 Barcelona, Spain

Tel. (+34) 933638338

Fax. (+34) 933638301

coral.sanfeliu@iibb.csic.es

**Abstract:**

Alzheimer's disease (AD) is a devastating age-related neurodegenerative disease. Age is main risk factor for sporadic AD, which is the most prevalent type. Amyloid- $\beta$  peptide ( $A\beta$ ) neurotoxicity is the proposed first step in a cascade of deleterious events leading to AD pathology and dementia. Glial cells play an important role in these changes. Astrocytes provide vital support to neurons and modulate functional synapses. Therefore, the toxic effects of  $A\beta$  on astrocytes promote neurodegenerative changes that might lead to AD. Aging reduces astrocyte antioxidant defense and induces oxidative stress. We studied the effects of  $A\beta_{42}$  on cultures of human astrocytes in the presence or absence of the following pro-oxidant agents: buthionine sulfoximine (BSO), a glutathione synthesis inhibitor, and  $FeSO_4$ , which liberates redox active iron. Pro-oxidant conditions potentiated  $A\beta$  toxicity, as shown by the generation of free radicals, inflammatory changes and apoptosis. A similar treatment was assayed in rats *in vivo*. A combination of  $A\beta_{40}$  and  $A\beta_{42}$  or  $A\beta_{42}$  alone was infused intracerebroventricularly for 4 weeks. Other animal groups were also infused with BSO and  $FeSO_4$ . A long-term analysis that ended 4 months later showed higher cognitive impairment in the Morris water maze task, which was induced by  $A\beta$  plus pro-oxidant agent treatments. Pro-oxidant agents also potentiate brain tissue pathology. This was demonstrated in histological studies that showed highly increased astrocyte reactivity in AD-vulnerable areas,  $A\beta$  deposits and oxidative damage of AD-sensitive hippocampal neurons. To increase understanding of AD, experimental models should be used that mimic age-related brain changes, in which age-related oxidative stress potentiates the effects of  $A\beta$ .

**Key words:** human astrocyte cultures, rat model of Alzheimer's disease, amyloid- $\beta$  peptide, iron, oxidative stress, inflammation

## Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the main age-related neurodegenerative disease. Despite intensive research, its trigger mechanisms are elusive and no cure is available yet. At present, the most widely accepted theory is the amyloid cascade hypothesis which postulates a brain increase in amyloid- $\beta$  peptide ( $A\beta$ ) as the main causative agent of a cascade of molecular and cellular events leading to neurodegeneration and dementia [1]. Genetic and environmental influences induce an excess of  $A\beta$  generation by sensitive neurons during the metabolism of its precursor protein. Both intracellular and extracellular  $A\beta$  cause a number of interrelated derangements, including inflammation, facilitation of tau hyperphosphorylation, disruption of mitochondrial and proteasomal function, oxidative stress, alteration of calcium signaling and impairment of synaptic function [2, 3]. The main pathological hallmarks of the disease, amyloid plaques and fibrillary tangles, together with neuronal loss, are considered the ultimate consequences of this cascade of events.

In sporadic AD, which accounts for 95 % of AD cases, the main risk factor is age. Age also has an influence on familial AD, as the disease always occurs during late maturity. There is likely to be an interaction between cell environment, metabolism of amyloid- $\beta$  protein precursor ( $A\beta$ PP) and  $A\beta$  accumulation in AD throughout brain aging. One possible environmental influence is oxidative stress. Harman's free radical theory of aging [4] established the basis for discovering how oxidative damage accumulates in cells and leads to their deterioration with advancing age. Neurons are highly sensitive to oxidative damage because they have high metabolic activity, a high content of polyunsaturated fats and other oxidizable substrates, and relatively low antioxidant defenses [5]. This sets the conditions for increased  $A\beta$  generation in selectively vulnerable neurons in the aging brain. Pro-oxidant or oxidant agents have been shown to generate  $A\beta$  by increasing  $\beta$ -secretase and  $\gamma$ -secretase activity [6-9]. However,  $A\beta$  itself can induce the production of hydrogen peroxide or other reactive oxygen species (ROS) in concert with the redox active metal ions  $Fe^{2+}$  or  $Cu^+$  [10,11]. Iron and other biometals such as copper and zinc interact with  $A\beta$  and cause its aggregation [12,13]. Iron also interacts with  $A\beta$ PP at the translational level, as  $A\beta$ PP is post-transcriptionally regulated by iron regulatory proteins (IRPs) through a 5'UTR iron-responsive element (IRE) [14]. In brain aging, there is dysregulation of metal homeostasis and metals may accumulate in brain areas that are prone to neurodegeneration, which influences AD pathology [11, 15-17]. Accumulated iron in the AD brain appears to contribute significantly to the oxidative damage that is one of the earliest pathological changes in AD [18, 19].

In addition to neurons, astroglia are major components of the brain. Astrocytes have an important role, beyond the provision of metabolic and structural support for neurons. They are involved in  $\text{Ca}^{2+}$  signaling, gliotransmission and modulation of synaptogenesis [20-22]. Their involvement in cognitive brain function, either through neuronal support function or by direct information processing in the tripartite synapsis [23], adds relevance to their role in AD development. We previously demonstrated that aged astrocytes *in vitro* and astrocytes cultured from the senescence-accelerated mouse model SAMP8 have higher oxidative stress, lower antioxidant defense and a decreased capacity to support neuron survival [24, 25]. In addition, we detected proteomic changes that are indicative of brain AD-like functional deterioration in both astrocytes and neurons from SAMP8 [26]. Therefore, aged astrocytes may not effectively defend neurons against the development of AD. Indeed,  $\text{A}\beta$  triggers a neuroprotective response in healthy astrocytes, which involves either phagocytosis and degradation of  $\text{A}\beta$  [27] or increased secretion of neuroprotective factors [28, 29]. In contrast, aged astrocytes may have deficits in  $\text{A}\beta$  clearance and neurotrophic support and may even secrete pro-inflammatory agents, derived from their basal level of activation [30]. Accordingly, astrocytes from SAMP8 mice showed a higher level of reactive gliosis after  $\text{A}\beta_{42}$  treatment than cultures from non-senescent mice [31].

The aim of this study was to analyze how increased oxidative stress in the aging brain contributes to the development of AD pathology, with an emphasis on astrocytes. Human astrocyte cultures were used as an *in vitro* model to study the astrocyte response to  $\text{A}\beta_{42}$  in a pro-oxidant environment. This environment was created by glutathione depletion with buthionine sulfoximine (BSO) and the redox active iron compound  $\text{FeSO}_4$ . Next, we used a validated AD rat model with a four-week chronic intracerebroventricular (icv) infusion of a mixture of  $\text{A}\beta_{40}$  and  $\text{A}\beta_{42}$  [32]. In this *in vivo* model, we assayed the long-term effects of glutathione depletion and reactive iron with  $\text{A}\beta$ , BSO and  $\text{FeSO}_4$  doses according to a previous short-term study [33].

## Materials and methods

### Human astrocyte cultures

Human cortical brain tissue was obtained from normal, legally aborted fetuses at 14-16 weeks of gestation. Permission to use human fetal tissue was obtained from the ethics committee of the Spanish National Research Council (CSIC). Cultures of human cerebral cortical astrocytes were



prepared as described elsewhere [34]. Cell culture media and reagents were purchased from Gibco (Invitrogen, Paisley, United Kingdom). Plastic culture plates were from Nunc (Roskilde, Denmark). Briefly, after enzymatic digestion and dissociation of tissue samples, cells were suspended in minimum Eagle's medium (MEM) supplemented with 5% heat-decomplemented horse serum, 0.5% w/v D-glucose, 2 mM glutamine 200 µg/mL gentamycin and 0.5 µg/L fungizone. Cells were seeded in poly-L-lysine-coated culture plates and maintained in a humidified CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. Fresh medium was added weekly until the end of the study. To obtain highly enriched astrocyte cultures, cells were seeded at 2-3x10<sup>6</sup> cells/ml and submitted to limited *in vitro* passage. For this purpose, 1 month old cultures were extensively washed with PBS, mildly trypsinized in the presence of 0.02% EDTA, and reseeded at 1x10<sup>6</sup> cells/ml. Another passage was performed 2 weeks later. Alternatively, primary cultures were frozen in liquid nitrogen (cryoprotected with 10% DMSO in serum) at the first passage, and thawed later on to grow the highly enriched astrocyte cultures. Astrocytes were seeded for experiments at 0.5x10<sup>6</sup> cells/ml (1.5x10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup>) in 96-well plates and used after 2-3 days. Cultures consisted of 90–95% astrocytes, 5–10% microglia and 0.1–1% oligodendroglia as reported elsewhere [34]. All reagents used in the study were from Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO), unless otherwise stated.

### Hydroperoxide generation assay

Oxidative stress in astrocyte cultures was studied using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Molecular Probes, Invitrogen) to determine intracellular hydroperoxide generation [34]. The non-fluorescent probe DCFH-DA freely permeates the cell membrane. Once the DA Group has been hydrolyzed by cell esterases, DCFH may be oxidized to the fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). Either control cultures or cultures that had been pre-incubated 24 h with BSO 1mM were washed in HEPES and loaded with 10 µM of DCFH-DA from a stock solution of 2 mM in methanol. After 20 min of incubation at 37°C cells were washed again in HEPES and basal fluorescence was measured at 485 nm excitation/530 nm emission in a plate reader (Spectramax Gemini XS, Molecular Devices, MDS, Sunnivale, CA). Then, the agents FeSO<sub>4</sub> and Aβ<sub>42</sub> were added to the corresponding wells at concentrations of 25 µM and 20 µM, respectively. BSO was added to the pre-incubated wells when the probe was loaded and during the incubation with FeSO<sub>4</sub> and Aβ<sub>42</sub>. Fibrillar Aβ<sub>42</sub> was dissolved in DMSO [35]. The corresponding controls were incubated with the vehicle. After 4 h, fluorescence was measured again. The increase in intracellular ROS was quantified from a standard curve of DCF in methanol (0.5-100 nM) and expressed as the DCF generated per µg of protein. The concentration of proteins was determined by the Bradford method. Aβ peptides in the study were from Bachem (Bubendorf, Switzerland).

### Nitrite assay

Nitric oxide synthesis by activated astrocyte cultures was measured by the colorimetric Griess reaction that detects nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ), a stable reaction product of nitric oxide (NO) and molecular oxygen. Astrocytes were treated with 10 ng/ml of interleukin-1 $\beta$ , 10 ng/ml of interferon- $\gamma$ , or both. Next, experiments were performed with 1 mM BSO, 10  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  and 5  $\mu\text{M}$   $\text{A}\beta_{42}$ . Whenever present, BSO was additionally preincubated for 24 h. Agents were directly added to the culture media in the wells. After 3 days of exposure to the treatments, 50  $\mu\text{L}$  aliquots of culture supernatants were incubated with 50  $\mu\text{L}$  Griess reagent (1% sulphanilamide, 0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride and 5% phosphoric acid) at room temperature for 10 min and the optical density at 540 nm was then determined using a microplate reader (iEMS Reader MF, Labsystems, Finland). The nitrite concentration was determined from a sodium nitrite standard curve (1-50  $\mu\text{M}$ ).

### Immunocytochemistry and cell death staining

Morphological changes caused by exposure to cytokines or to BSO,  $\text{FeSO}_4$ , and  $\text{A}\beta_{42}$  for 3 days were analyzed in astrocytes that were immunostained with anti-glia fibrillary acidic protein (GFAP, Dako, Glostrup, Denmark). For that purpose, astrocyte cultures were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.2 % Triton X-100, and incubated with 3% normal goat serum to block nonspecific binding. Cultures were incubated overnight with the primary antibody at a dilution of 1:5000 in the presence of 1.5% blocking serum. The cells were washed and incubated with Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody (1:1500; Molecular Probes, Invitrogen) for 1 h. In addition, cell nuclei were stained with bisbenzimidazole (5  $\mu\text{M}$ ). The number of normal nuclei and that of condensed and fragmented nuclei, which are indicative of apoptosis, was counted with the analySIS image analysis software (Soft Imaging System, Münster, Germany). At least two fields (1.3  $\text{mm}^2$  / field) were microphotographed for each well.

### Animals and treatments

Male 3-month-old Sprague-Dawley rats that had been retired from breeding and weighed 300-350 g were purchased from Charles River (Lyon, France). They were kept at the University of Barcelona's animal facility in standard conditions of temperature and humidity, with two animals

per cage, a 12-h light, 12-h dark cycle, and food and water *ad libitum*. All handling and experimental procedures were approved by the Animal Ethics and Health Committees of the University of Barcelona.

Rats were infused icv for 4 weeks through an osmotic pump (see Surgical procedures) either with vehicle, pro-oxidant compounds, A $\beta$  or a combination of pro-oxidants and A $\beta$ . The pro-oxidant treatment was a mixture of FeSO<sub>4</sub> and BSO at the doses reported previously [33]. A $\beta$  was administrated as a mixture of A $\beta$ <sub>40</sub> and A $\beta$ <sub>42</sub> in human high density lipoprotein (HDL) as a carrier, with a previous injection of 10 ng transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) (R&D Systems, Minneanapolis, MN) into both anterodorsal thalamus nuclei, according to the *in vivo* rat model established by Frautschy and cols. [32]. The vehicle was HEPES 4 mM, pH 8. An additional group with the combination of pro-oxidants and a high dose of A $\beta$ <sub>42</sub> was added as a reference [33]. Therefore, rats were randomly assigned to one of five separate groups (6-8 animals per group): Group I, vehicle; Group II, 0.47 mg FeSO<sub>4</sub> heptahydrate (1.68  $\mu$ mol FeSO<sub>4</sub>) and 4.48 mg (20.16  $\mu$ mol) BSO; Group III, 20  $\mu$ g (10.1 nmol) A $\beta$ <sub>40</sub> and 30  $\mu$ g (15.1 nmol) A $\beta$ <sub>42</sub> in 80  $\mu$ g HDL; Group IV, FeSO<sub>4</sub>/BSO plus A $\beta$ <sub>40</sub>/A $\beta$ <sub>42</sub>; Group V, FeSO<sub>4</sub>/BSO plus 50  $\mu$ g (25.2 nmol) A $\beta$ <sub>42</sub>. The mixture of BSO and FeSO<sub>4</sub> was prepared in distilled water and administrated in a separate pump from A $\beta$  to avoid chemical interactions. The indicated doses are the total received at the end of the infusion period. The perfusion rate of the pumps was 0.25  $\mu$ l/h. All animals were subjected to brain histological studies after completion of the long-term behavioral studies, as described below. Three or four animals per group were added to the study to be sacrificed immediately after the brain infusion treatment and analyzed by brain histology.

### **Surgical procedures**

Rats were anesthetized with a mixture of ketamine 80 mg/kg (Ketolar 50 mg/ml<sup>®</sup>, Pfizer, Alcobendas, Madrid, Spain) and xylazine 5 mg/kg (Rompun<sup>®</sup>, Bayer, Kiel, Germany) that was intraperitoneally injected. Alzet model 2004 mini-osmotic pumps (Alzet Osmotic Pumps, Durect Corporation, Cupertino, CA), attached via polyethylene tubing to brain catheters (Alzet), were filled with the treatment solutions and stereotactically implanted into the lateral ventricles. Animals receiving pro-oxidants and A $\beta$  and controls had one minipump implanted in each lateral ventricle. The stereotactic coordinates were: anterior-posterior (AP) and medio-lateral (ML) to bregma -0.9 mm and  $\pm$  1.4 mm, respectively; dorso-ventral (DV) to dural surface: -3.5 mm. Animals receiving TGF $\beta$ 1 were injected immediately before pump implantation at the coordinates of the anterodorsal thalamus nuclei: AP -2.1 mm, ML  $\pm$  1.4 mm, and DV -4.6 mm, using a 25 G

stainless steel cannula (Small Parts Inc, Miami, FL) connected to a Hamilton syringe through a Teflon tube. The syringe was attached to a micro-infusion pump (Bioanalytical systems Inc., West Lafayette, IN). The cannula was left in position for 5 min after delivery to prevent the solution from surging back. At the end of the 4-week infusion period, rats were slightly anesthetized to remove the osmotic pumps. Pump patency and functionality were confirmed by verifying that the pump contents had been discharged and that the infusion apparatus was intact.

### **Behavioral testing**

The behavioral test for spatial learning memory was performed in a Morris water maze (MWM). The apparatus and procedures were basically as described elsewhere [36, 37]. The behavioral test was initiated 4 weeks after surgery when the treatment was complete. A pre-training test with no landmarks and a hidden platform consisted in 4 trials over 2 days. The rats were given 120 s to find the platform, and then allowed to remain on it for 30 s. Rats that did not reach the platform were picked up, placed on the platform and left there for 30 s. The procedure was the same in the acquisition test, but the animals had to rely on the landmarks to find the hidden platform. Animals were given 4 escape trials per day for 6 days, which amounted to a total of 24 trials. On the last day, a 60 s probe trial was performed with the platform removed. To analyze the rat's behavior, the surface of the pool was divided into four quadrants and the time that the rat spent in the quadrant where the platform had previously been located was calculated. To monitor long-term memory, animals were submitted to a new series of 2 escape trials followed by a 60 s probe trial at 1, 5 and 9 weeks after the end of the acquisition period. Three weeks later, a new training acquisition assay of 4 escape trials per day for 6 days was performed with reversal of the location of the submerged platform. A 60 s probe trial with the platform removed was performed on the last day. New probe trials, preceded by 2 escape trials, were performed after 1, 2 and 4 weeks. The study ended 4 months after the infusion treatment.

### **Rat brain dissection and histology**

Rats were anesthetized as described above and perfused with isotonic saline (0.9 % NaCl) with heparin, followed by isotonic saline and finally by buffered formaldehyde (4% formaldehyde in phosphate buffer 0.01 M pH 7.4). Brains were quickly removed, placed in a Stoelting Tissue Slicer and cut into 4 mm blocks. Tissue blocks were postfixed with buffered formaldehyde for 24 h, then washed with phosphate buffer for 24 h and finally washed with water. Next they were dehydrated

and embedded in paraffin. Paraffin-embedded blocks were sectioned at 5-7  $\mu\text{m}$  and mounted on Histogrip (Zymed laboratories, Invitrogen) coated slides for immunostaining. Paraffin-embedded sections were dewaxed in xylene and rehydrated through decreasing concentrations of ethanol before staining. The accuracy of the cannula placement was determined by hematoxylin or Nissl staining. Microglia immunostaining was carried out by free floating 50  $\mu\text{m}$  vibratome sections of non-paraffin-embedded rat brains. Antigen retrieval was performed by boiling the sections in 10 mM citrate buffer (pH 6) for 10 min. When sections had cooled, they were washed in saponin 0.05% in PBS and then in PBS. Normal serum (horse or goat, 1:5) in 0.2 % gelatin, 0.2 % Triton X-100 in PBS was used at room temperature to block non-specific reactions for 2 h. Sections were incubated with the appropriate antibody diluted in 0.2 % Triton X-100 and normal serum (1:20) in PBS at 4°C overnight. The following primary antibodies were used to detect specific brain tissue alterations: anti-A $\beta$  clone 4G8 (1:150; Signet, Dedham, MA), anti-8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OHdG) (1:50; JaiCA, Nikken SEIL, Fukuroi, Japan), anti-GFAP (1:300; Dako), anti-ubiquitin (1:50; Novocastra, Newcastle upon Tyne, England) and anti-macrophage complement receptor 3 (OX42, 1:500; AbD Serotec, Kidlington, UK). Sections were then washed in PBS and incubated with the appropriate biotinylated secondary antibody for 2 h at room temperature. Tomato lectin histochemistry was carried out on paraffin-embedded sections overnight at 4°C using biotinylated lectin from *Lycopersicum esculentum* (2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). The Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, CA) was used as per manufacturer's instructions, and the reaction was visualized with diaminobenzidine containing 0.1 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 5–10 min. Where required, sections were lightly counterstained with Harris' hematoxylin. Iron deposits were visualized by Pearl's Prussian blue staining and counterstaining with neutral red, following standard procedures. Selected paraffin sections were also stained with Fluoro-Jade B (following the protocol of the supplier, Chemicon International) to check for degenerating neurons and reactive astroglia [38]. Then, the tissue sections were dried, dehydrated through increasing ethanol concentrations and xylene, and mounted in DPX (Fluka, Buchs, Switzerland). Selected sections of A $\beta$  treated rats were also stained for A $\beta$  deposits with thioflavine S (1 % thioflavine S aqueous solution staining) followed by 70% ethanol differentiation. Then they were mounted in Mowiol (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Germany).

### Data analysis

Results are shown as mean  $\pm$  SEM. Statistics was performed with one way ANOVA and repeated measures ANOVA for *in vitro* and *in vivo* experiments, respectively. A post hoc Newman-Keuls test was used for group comparison (GraphPad Prism software, GraphPad, San Diego, CA).

## Results

### *In vitro* oxidative stress

Oxidative stress changes in human astrocyte cultures are shown in Fig.1. Depletion of glutathione by BSO did not increase the generation of hydroperoxides measured by DCFH-DA in normal culture conditions. Neither did A $\beta$  exposure. The presence of oxidant ferrous ion from FeSO<sub>4</sub> induced a small increase in hydroperoxide generation. However, a highly significant increase in DCF fluorescence was detected when both pro-oxidant agent treatments, BSO and FeSO<sub>4</sub>, were added to A $\beta$  exposure.

### *In vitro* inflammation

A three-day treatment with a mixture of interleukin-1 $\beta$  and interferon- $\gamma$  induced morphological changes and NO generation in the human astrocytes, both of which are indicative of an inflammatory response (Fig. 2). Unstimulated astrocytes generally exhibited a flattened and polygonal morphology, whereas activated astrocytes showed thinner and elongated cytoplasm processes and spherical nuclei in a stellate-like morphology. No changes were evident with interleukin-1 $\beta$ , but interferon- $\gamma$  and the mixed treatment of both cytokines induced a characteristic stellate morphology with long cytoplasmic processes (Fig. 2 A-D). The presence of nitrite formation in the culture medium, which is indicative of NO astrocyte generation, was also significantly enhanced by the mixed cytokine treatment (Fig. 2 E). The peptide A $\beta$  did not increase NO over control values ( $3.6 \pm 0.2 \mu\text{M}$ ), either alone ( $3.3 \pm 0.4 \mu\text{M}$ ) or in the presence of pro-oxidant agents ( $3.4 \pm 0.3 \mu\text{M}$ ). Therefore, we analyzed the presence of A $\beta$ -induced morphological changes, which are indicative of inflammation, in comparison to changes after the cytokine treatment (Fig. 3). The combined treatment of BSO, FeSO<sub>4</sub> and A $\beta$  caused a clear reorganization of the human astrocyte cytoskeleton, which was similar to that seen with cytokines. In contrast, A $\beta$  alone caused moderate changes (Fig. 3 A-D).

### *In vitro* cytotoxicity

No cytotoxicity was caused by BSO treatment or exposure to FeSO<sub>4</sub> or A $\beta$  alone in human astrocytes. However, a small increase in condensed nuclei which are indicative of apoptotic cell death, was detected after the combined treatment of BSO, FeSO<sub>4</sub> and A $\beta$  (Fig 3 D and E).

### ***In vivo* toxicity**

The treatment administered to Group IV (BSO/ FeSO<sub>4</sub> plus Aβ<sub>42</sub>/Aβ<sub>40</sub>), was highly toxic. Two out of 8 rats died during the experiment (and were excluded from the behavioral results). Rats in this group had more dilated cerebral ventricles than the other animals, which suggests that they had impaired CSF drainage.

### **Cognitive deterioration**

The time spent in the water maze quadrant where an escape platform has been located is a reliable indicator of rat learning and memory capacities in our experimental conditions, as discussed elsewhere [37]. Results of the probe trials for the different treatment groups are shown in Fig. 4. Rats infused with BSO and FeSO<sub>4</sub> showed learning acquisition, a pattern of retention and a post-acquisition period that did not differ from that of the control animals (Fig. 4A). When the platform position was changed (Fig. 4B), no differences were detected between rats treated with pro-oxidant agents and the control group. All the Aβ-treated groups had significantly decreased learning and memory (Fig. 4A and B). Reversal acquisition clearly evidenced lower cognitive capacities in groups treated with the mixture of BSO/FeSO<sub>4</sub> and Aβ, when either a mixture of Aβ<sub>40</sub> and Aβ<sub>42</sub> [32] was administered or a higher dose of Aβ<sub>42</sub> [33] (Fig. 4B).

### **Histological alterations**

Rats receiving Aβ (Groups III, IV and V) showed brain tissue deposits that stained positive for anti-Aβ antibody. Groups IV and V, in which rats were infused with BSO/ FeSO<sub>4</sub> in addition to Aβ, had much higher deposition than those in Group III. Diffuse plaques or precipitates were preferentially detected in areas next to the infused ventricle, such as corpus callosum and septum, but also in cerebral cortex, vessels and all over the brain. Aβ deposits were present in rats that were either immediately sacrificed after infusion or sacrificed at 4 months post-infusion. Brain septum presented a high density of Aβ precipitates mainly in Group IV. The septum is a cellular area in the rat, which contains neuron complexes highly interconnect with the hippocampus [39]. As expected, Aβ precipitates stained positive for thioflavine S (not shown). Representative histological images are shown in Fig. 5.

We did not detect iron precipitates in the brain tissue of rats from Groups I, II and III. Ferric iron was barely detected in the hippocampus, septum or other areas next to the infused ventricle of rats treated with the mixture of BSO/FeSO<sub>4</sub> and A $\beta$  (mainly Group V), which were sacrificed after infusion. Four months later, Group IV showed extensive iron staining. See representative histological images in Fig. 6.

Hypertrophic astrocytes that were highly reactive to anti-GFAP were mainly detected in rat Groups IV and V in the hippocampus, corpus callosum and frontal cortex. Inflammatory effects were detected at the end of the infusion and continued throughout the 4 months post-infusion. In the long term, Group IV astrocytes were more reactive than Group V. Fluoro-Jade B distinctly stained the most reactive astrocytes that were those in Group V rats sacrificed immediately after the infusion. Representative histological images are shown in Fig. 7.

Inflammatory effects were also shown by the presence of reactive microglia that were stained with anti-OX42 stain, mainly in the Group IV rats. Lectin staining showed more ramified microglia in A $\beta$ -treated groups. In the long term, Group IV rats still showed reactive microglia. Representative images are shown in Fig. 8.

No neuron damage was histologically detected in the rats sacrificed immediately after the pump-infusion, but alterations were detected in rats sacrificed at the end of the 4 month post infusion study. Oxidative DNA damage, as indicated by anti-8OHdG staining was high in Group IV and less extensive in Group V. It occurred mainly in hippocampal pyramidal neurons. Intraneuronal accumulation of ubiquitin and ubiquitinated proteins, as stained by the anti-ubiquitin antibody, was detected in neurons of the hippocampus and cortex of rats from Groups III and IV and was less intense in Group V. DNA oxidation was present in pyramidal neurons, whereas ubiquitin accumulation also occurred in other neuron types. Representative images are shown in Fig. 9.

## Discussion

Astrocytes are generally more resistant to toxins than neurons, but they are exposed to A $\beta$  damage. It is known that human astrocytes *in vitro* can bind and internalize A $\beta$ <sub>42</sub> [40, 41], as they do *in vivo*. In this work, *in vitro* incubation with A $\beta$ <sub>42</sub> induced poor toxic effects in human astrocytes, as seen by the absence of oxidative stress and cell death. Only slight morphological changes were appreciable, indicating some activation effect. This confirms a previous report in which cultures of human astrocytes were not killed by A $\beta$ <sub>40</sub> or A $\beta$ <sub>42</sub>, even when it was



intracellularly microinjected [42]. However, aggregated A $\beta_{40}$  was toxic to up to 50 % of the cultured rat astrocytes, probably through the generation of hydrogen peroxide [43], a major A $\beta$  neurotoxicity mechanism [44]. Changes in intracellular Ca $^{2+}$  signaling leading to mitochondrial impairment, oxidative stress and glutathione depletion were also reported in rat astrocyte cultures and caused by specific insertion of  $\beta$ -aggregated A $\beta_{42}$  into the astrocyte plasma membrane [45]. Therefore rat astrocytes are more vulnerable to A $\beta$  than human astrocytes *in vitro*, even though A $\beta$  probably induces oxidative stress in human astrocytes. In this case, A $\beta$  toxicity would increase in a pro-oxidant environment with lower antioxidant defense. Certainly, the toxic and inflammatory damage to human astrocytes caused by A $\beta_{42}$  increased greatly in the presence of redox active iron and an inhibitor of glutathione synthesis. As expected, depletion of glutathione *per se* did not induce oxidative stress, whereas Fe $^{2+}$  and BSO/Fe $^{2+}$  increased ROS generation but not cell death. The pro-oxidative effects of BSO and Fe $^{2+}$  partially mimic the oxidative stress of aged brain astrocytes, with lower antioxidant defense and free radical damage [24, 25]. The age-related iron homeostasis disruption leads to iron increase and also contributes to oxidative stress in the aged brain [15]. Incubation of cultured human astrocytes with A $\beta_{42}$  induced negligible ROS generation, which was highly significant in aged-like astrocytes, with impaired antioxidant defense and Fe $^{2+}$ -induced oxidative stress.

Human astrocytes *in vitro* show flat and polygonal morphology, even though they are multiple branched cells in the brain. This is also the case for murine astrocyte cultures. In the latter, several agents, including cytokines and A $\beta$ , induce skeletal reorganization to a stellate morphology, which is indicative of activation plastic changes [46-48]. Treatment with IL1 $\beta$  induced a stellate morphology in our human astrocyte cultures, as previously reported by other authors [49]. To a lesser extent, A $\beta$  exposure caused morphological changes that are indicative of activation. These changes were highly potentiated in a pro-oxidant environment when the peptide was co-incubated with FeSO $_4$  in glutathione-depleted astrocytes. We did not detect an increase in nitrite formation after these treatments. Activated astrocytes adjacent to A $\beta$  plaques in AD brain generate NO [50], whereas astrocytes in healthy brain do not. The astrocyte inducible enzyme NO synthase is activated by cytokines or other mediators of brain damage. Several authors have reported that A $\beta$  causes NO generation in murine astrocyte cultures in the presence of cytokines, that are either co-incubated [51] or released by contaminating microglia [52]. However, the peptide alone does not cause NO generation [53; but see 54]. We found that cultured human astrocytes generated NO after incubation with cytokines, but not with A $\beta$ . The mixture of IL1 $\beta$  and INF $\gamma$  caused nitrite production, as previously described [55, 56].

The mixed treatment of A $\beta_{42}$  plus BSO and Fe<sup>2+</sup> induced a low level of apoptotic death, which corroborates its toxic effects. An apoptotic pathway was also reported in cultured rat astrocytes, as induced by A $\beta$  toxicity [57]. The increased sensitivity of human astrocytes to A $\beta$  in the presence of iron and impaired redox homeostasis means that aged astrocytes are more liable to suffer A $\beta$  damage and enter into the AD vicious cycle of oxidative stress and inflammation than those in young individuals. Thus, aged astrocytes no longer carry out their functions of synapsis modulation and vital support to neurons. Instead, they contribute to AD pathophysiology.

The icv infusion of A $\beta$  in rat is a widely used AD model for pharmacological studies, as cognitive impairment and other AD-related pathologies can be reliably quantified [58, 59]. The 4-week combined A $\beta_{40}$ /A $\beta_{42}$  infusion in a model developed by Frautschy and cols. causes gliosis, deposition of A $\beta$  and delayed cognitive impairment [32]. It has been suggested that infused A $\beta_{42}$  induces oxidative stress and astrocytic dysfunction that are in the basis of the learning deficits [60]. Accordingly, we found a sustained decrease of cognitive abilities in the MWM. Twelve weeks after the first training, retention of reversal platform training was lower than in the control group, which indicated that long-term cognitive loss had occurred. Moderate AD related brain pathology was observed, as previously reported [32]. The infusion of a pro-oxidant treatment with BSO and Fe<sup>2+</sup> did not show toxic effects *per se* throughout the entire study. However, when treatments A $\beta_{40}$ /A $\beta_{42}$  plus BSO/Fe<sup>2+</sup> were simultaneously administrated, both behavioral and pathological studies showed increased toxicity. These rats had a similar, behaviorally impaired response to the A $\beta_{40}$ /A $\beta_{42}$  treated rats in the first training, but a worse response in late reversal training. Histologically, A $\beta$  deposits were highly increased, astrocytes were more reactive at the end of the treatment and they partially maintained activation throughout the 4-month study. Microglia was more reactive and iron deposits were present until the end of the study. As regards neurons, hippocampus pyramidal neurons showed highly oxidized DNA at 4 months after A $\beta_{40}$ /A $\beta_{42}$  plus BSO/Fe<sup>2+</sup>, whereas intraneuronal ubiquitin accumulation was similar to that caused by A $\beta_{40}$ /A $\beta_{42}$  treatment. Thus, in this rat model, A $\beta$  inhibits the neuronal ubiquitin proteasome system, as reported in AD patients [61, 62].

We knew from a previous study that post-acquisition icv infusion with A $\beta_{42}$  alone plus BSO and Fe<sup>2+</sup> induced decreased performance in the MWM tested immediately after the treatment [33]. When we tested this treatment in our long-term study, we found a long lasting spatial memory impairment, similar to that of the group treated with A $\beta_{40}$ /A $\beta_{42}$  plus BSO/Fe<sup>2+</sup>. Even though both rat groups were similarly impaired behaviorally, AD pathology was more intense in rats infused with A $\beta_{40}$ /A $\beta_{42}$  and BSO/ Fe<sup>2+</sup> than in those with A $\beta_{42}$  and BSO/ Fe<sup>2+</sup>. This could be partially related to the fact that iron deposits were long lasting in the first but not in the second group, where they

could only be detected in rats sacrificed immediately after infusion. Therefore, the interaction of iron with different A $\beta$  species can modulate the pathological outcome. It seems that a mixture of 20  $\mu$ g of A $\beta$ <sub>40</sub> plus 30  $\mu$ g of A $\beta$ <sub>42</sub> [32] can lead to longer lasting effects *in vivo* than 50  $\mu$ g of A $\beta$ <sub>42</sub> alone [33].

In AD, redox active iron has been reported both intraneuronally in vulnerable neurons [63] and associated with amyloid plaques and neurofibrillary tangles [64]. Iron was also increased in the A $\beta$  deposits of AD transgenic mice [65]. In our study we detected an inflammatory response in the astrocytes of rats treated with iron and A $\beta$ , which parallels the *in vitro* effects discussed above in human astrocytes. The increased oxidative stress seen in these rat hippocampal neurons may be partially derived from the impaired antioxidant capacity of the surrounding astrocytes. Early A $\beta$ -induced astrocyte derangements may contribute to neuron death by failure of antioxidant support [66]. In advanced stages of AD pathology, these chronic astrocyte alterations of oxidative stress and inflammation will further impair neuron functionality and contribute to the degenerative process [67, 68].

Overall we gathered *in vitro* and *in vivo* data that further confirm the involvement of redox reactive iron in the development of age-related AD pathology and suggest early A $\beta$  damage of frail, aged astrocytes. Therefore, the use of *in vitro* and *in vivo* aging models may help to understand the brain aging contribution to AD development and progression. In this line, Pallas and cols. have suggested that the use of the previously mentioned SAMP8, senescent mice with some incipient AD traits, may help to unveil “the switch” from aging to AD [69].

### Acknowledgments

This study was supported by grants SAF2006-13092-C02-02 from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación, RD06/0013/1004 (RETICEF) from the Instituto de Salud Carlos III, 062931 from Fundació La Marató de TV3 and by the European Network of Excellence DiMI (LSHB-CT-2005-512146). S García-Matas received a Generalitat (Autonomous Government of Catalonia) fellowship. We thank MA Marqués, J López Regal and A Parull for their skilful technical assistance. We thank Dr T Rodrigo for her assistance in the behavioral studies. We gratefully acknowledge Y Trejo, R López and Dr S Barambio from Tutor Médica Clinics (Barcelona) for providing the donated human tissue. The authors declare that there are no financial or commercial conflicts of interest.

## References

- [1] Selkoe DJ (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* **298**, 789-791.
- [2] 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.
- [3] LaFerla FM, Green KN, Oddo S (2007) Intracellular amyloid- $\beta$  in Alzheimer's disease. *Nature Rev* **8**, 499-509.
- [4] Harman, D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* **11**, 298-300.
- [5] Halliwell B (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* **97**, 1634-1658.
- [6] Tamagno E, Bardini P, Obbili A, Vitali A, Borghi R, Zaccheo D, Pronzato MA, Danni O, Smith MA, Perry G, Tabaton M (2002) Oxidative stress increases expression and activity of BACE in NT2 neurons. *Neurobiol Dis* **10**, 279-288.
- [7] Tamagno E, Guglielmotto M, Aragno M, Borghi R, Autelli R, Giliberto L, Muraca G, Danni O, Zhu X, Smith MA, Perry G, Jo DG, Mattson MP, Tabaton M (2008) Oxidative stress activates a positive feedback between the gamma- and beta-secretase cleavages of the beta-amyloid precursor protein. *J Neurochem* **104**, 683-695.
- [8] Shen C, Chen Y, Liu H, Zhang K, Zhang T, Lin A, Jing N (2008). Hydrogen peroxide promotes A $\beta$  production through JNK-dependent activation of  $\gamma$ -secretase. *J Biol Chem* **283**, 17721-17730.
- [9] Jin SM, Cho HJ, Jung ES, Shim MY, Mook-Jung I (2008) DNA damage-inducing agents elicit gamma-secretase activation mediated by oxidative stress. *Cell Death Differ* **15**, 1375-1384.
- [10] Khan A, Dobson JP, Exley C (2006) Redox cycling of iron by A $\beta$ <sub>42</sub>. *Free Radic Biol Med* **40**, 557-569.
- [11] Liu G, Huang W, Moir RD, Vanderburg CR, Lai B, Peng Z, Tanzi RE, Rogers JT, Huang X (2006) Metal exposure and Alzheimer's pathogenesis. *J Struct Biol* **155**, 45-51.

- [12] Huang X, Atwood CS, Moir RD, Hartshorn MA, Tanzi RE, Bush AI (2004) Trace metal contamination initiates the apparent auto-aggregation, amyloidosis, and oligomerization of Alzheimer's A $\beta$  peptides. *J Biol Inorg Chem* **9**, 954-960.
- [13] Exley C (2006) Aluminium and iron, but neither copper nor zinc, are key to the precipitation of  $\beta$ -sheets of A $\beta_{42}$  in senile plaque cores in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **10**, 173-177.
- [14] Rogers JT, Bush AI, Cho HH, Smith DH, Thomson AM, Friedlich AL, Lahiri DK, Leedman PJ, Huang X, Cahill CM (2008) Iron and the translation of the amyloid precursor protein (APP) and ferritin mRNAs: riboregulation against neural oxidative damage in Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans* **36**, 1282-1287.
- [15] Zecca L, Youdim MB, Riederer P, Connor JR, Crichton RR (2004) Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nature Rev* **5**, 863-873.
- [16] Adlar PA, Bush AI (2006) Metals and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **10**, 145-163.
- [17] Zhu WZ, Zhong WD, Wang W, Zhan CJ, Wang CY, Qi JP, Wang JZ, Lei T (2009) Quantitative MR 2009 Phase-corrected Imaging to Investigate Increased Brain Iron Deposition of Patients with Alzheimer Disease. *Radiology* **253**, 497-504.
- [18] Casadesus G, Smith MA, Zhu X, Aliev G, Cash AD, Honda K, Petersen RB, Perry G (2004) Alzheimer disease: Evidence for a central pathogenic role of iron-mediate reactive oxygen species. *J Alzheimers Dis* **6**, 165-169.
- [19] Zhu X, Su B, Wang X, Smith MA, Perry G (2007) Causes of oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Mol Life Sci* **64**, 2202-2210.
- [20] Elmariah SB, Hughes EG, Oh EJ, Balice-Gordon RJ (2005) Neurotrophin signaling among neurons and glia during formation of tripartite synapses. *Neuron Glia Biol* **1**, 1-11.
- [21] Halassa MM, Fellin T, Haydon PG (2007) The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med* **13**, 54-63.
- [22] Perea G, Navarrete M, Araque A (2009) Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* **32**, 421-431.
- [23] Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* **22**, 208-215.

- [24] Pertusa M, García-Matas S, Rodríguez-Farré E, Sanfeliu C, Cristòfol R (2007) Astrocytes aged in vitro show a decreased neuroprotective capacity. *J Neurochem* **101**, 794-805.
- [25] García-Matas S, Gutierrez-Cuesta J, Coto-Montes A, Rubio-Acero R, Díez-Vives C, Camins A, Pallàs M, Sanfeliu C, Cristòfol R (2008) Dysfunction of astrocytes in senescence-accelerated mice SAMP8 reduces their neuroprotective capacity. *Aging Cell* **7**, 630-640.
- [26] Díez-Vives C, Gay M, García-Matas S, Comellas F, Carrascal M, Abian J, Ortega-Aznar A, Cristòfol R, Sanfeliu C (2009) Proteomic study of neuron and astrocyte cultures from senescence-accelerated mouse SAMP8 reveals degenerative changes. *J Neurochem* **111**, 945-955.
- [27] Wyss-Coray T, Loike JD, Brionne TC, Lu E, Anankov R, Yan F, Silverstein SC, Husemann J. (2003) Adult mouse astrocytes degrade amyloid- $\beta$  in vitro and in situ. *Nat Med* **9**, 453-457.
- [28] Ramírez G, Toro R, Döbeli H, von Bernhardi R (2005) Protection of rat primary hippocampal cultures from A beta cytotoxicity by pro-inflammatory molecules is mediated by astrocytes. *Neurobiol Dis* **19**, 243-254.
- [29] Kimura N, Takahashi M, Tashiro T, Terao K (2006) Amyloid  $\beta$  up-regulates brain-derived neurotrophic factor production from astrocytes: rescue from amyloid  $\beta$ -related neuritic degeneration. *J Neurosci Res* **84**, 782-789.
- [30] Yu WH, Go L, Guinn BA, Fraser PE, Westaway D, McLaurin J (2002) Phenotypic and functional changes in glial cells as a function of age. *Neurobiol Aging* **23**, 105-115.
- [31] Lü L, Mak YT, Fang M, Yew DT (2009) The difference in gliosis induced by beta-amyloid and Tau treatments in astrocyte cultures derived from senescence accelerated and normal mouse strains. *Biogerontology* in press, DOI: 10.1007/s10522-009-9217-3.
- [32] Frautschy SA, Hu W, Kim P, Miller SA, Chu T, Harris-White ME, Cole GM (2001) Phenolic anti-inflammatory antioxidant reversal of A $\beta$ -induced cognitive deficits and neuropathology. *Neurobiol Aging* **22**, 993-1005.
- [33] Lecanu L, Greeson J, Papadopoulos (2006) Beta-amyloid and oxidative stress jointly induce neuronal death, amyloid deposits, gliosis, and memory impairment in the rat. *Pharmacology* **76**, 19-33.
- [34] Sebastià J, Cristòfol R, Pertusa M, Vílchez D, Torán N, Barambio S, Rodríguez-Farré E, Sanfeliu C (2004) Down's syndrome astrocytes have greater antioxidant capacity than euploid astrocytes. *Eur J Neurosci* **20**, 2355-2366.

- [35] Dahlgren KN, Manelli AM, Stine WB, Baker LK, Krafft GA, LaDu MJ (2002) Oligomeric and Fibrillar Species of Amyloid- $\beta$  peptides differentially Affect neuronal Viability. *J Biol Chem* **277**, 32046-32053.
- [36] Prados J, Trobalon JB (1998) Locating an invisible goal in a water maze requires at least two landmarks. *Psychobiology* **26**, 42-48.
- [37] Pertusa M, García-Matas S, Mammeri H, Adell A, Rodrigo T, Mallet J, Cristòfol R, Sarkis C, Sanfeliu C (2008) Expression of GDNF transgene in astrocytes improves cognitive deficits in aged rats. *Neurobiol Aging* **29**, 1366-1379.
- [38] Damjanac M, Rioux Bilan A, Barrier L, Pontcharraud R, Anne C, Hugon J, Page G (2007) Fluoro-Jade B staining as useful tool to identify activated microglia and astrocytes in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *Brain Res* **1128**, 40-49.
- [39] Haghdoost-Yazdi H, Pasbakhsh P, Vatanparast J, Rajaei F, Behzadi G (2009) Topographical and quantitative distribution of the projecting neurons to main divisions of the septal area. *Neurol Res* **31**, 503-513.
- [40] Nuutinen T, Huuskonen J, Suuronen T, Ojala J, Miettinen R, Salminen A (2007) Amyloid- $\beta$  1-42 induced endocytosis and clusterin/apoJ protein accumulation in cultured human astrocytes. *Neurochem Int* **50**, 540-547.
- [41] Nielsen HM, Veerhuis R, Holmqvist B, Janciauskiene S (2009) Binding and uptake of A $\beta$ 1-42 by primary human astrocytes in vitro. *Glia* **57**, 978-988.
- [42] Zhang Y, McLaughlin R, Goodyer C, LeBlanc A (2002) Selective cytotoxicity of intracellular amyloid  $\beta$  peptide<sub>1-42</sub> through p53 and Bax in cultured primary human neurons. *J Cell Biol* **156**, 519-529.
- [43] Brera B, Serrano A, de Ceballos M (2000)  $\beta$  Amyloid peptides are cytotoxic to astrocytes in culture: a role for oxidative stress. *Neurobiol Dis* **7**, 395-405.
- [44] Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D (1994) Hydrogen peroxide mediates amyloid  $\beta$  protein toxicity. *Cell* **7**, 817-828.
- [45] Abramov AY, Canevari L, Duchen MR (2003) Changes in intracellular calcium and glutathione in astrocytes as the primary mechanism of amyloid neurotoxicity. *J Neurosci* **23**, 5088-5095.
- [46] Merrill, JE (1991) Effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha on astrocytes, microglia, oligodendrocytes, and glial precursors in vitro. *Dev Neurosci* **13**, 130-137.

- [47] Jalonen TO, Charniga CJ, Wielt DB (1997)  $\beta$ -Amyloid peptide-induced morphological changes coincide with increased  $K^+$  and  $Cl^-$  channel activity in rat cortical astrocytes, *Brain Res* **746**, 85–97.
- [48] Meske V, Hamker U, Albert F, Ohm TG (1998) The effects of  $\beta$ /A4-amyloid and its fragments on calcium homeostasis, glial fibrillary acidic protein and S100 $\beta$  staining, morphology and survival of cultured hippocampal astrocytes. *Neuroscience* **85**, 1151-1160.
- [49] Liu W, Shafit-Zagardo B, Aquino DA, Zhao ML, Dickson DW, Brosnan CF, Lee SC (1994) Cytoskeletal alterations in human fetal astrocytes induced by interleukin-1 $\beta$ . *J Neurochem* **63**, 1625-1634.
- [50] Wallace MN, Geddes JG, Farquhar DA, Masson MR (1997) Nitric oxide synthase in reactive astrocytes adjacent to  $\beta$ -amyloid plaques. *Exp Neurol* **144**, 266-272.
- [51] Ayasolla K, Khan M, Singh AK, Singh I (2004) Inflammatory mediator and beta-amyloid (25-35)-induced ceramide generation and iNOS expression are inhibited by vitamin E. *Free Radic Biol Med* **37**, 325-338.
- [52] Akama KT, Van Eldik LJ (2000)  $\beta$ -Amyloid stimulation of inducible nitric-oxide synthase in astrocytes is interleukin-1 $\beta$ - and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ )-dependent, and involves a TNF $\alpha$  receptor-associated factor- and NF $\kappa$ B-inducing kinase-dependent signaling mechanism. *J Biol Chem* **275**, 7918-7924.
- [53] Li M, Sunamoto M, Ohnishi K, Ichimori Y (1996)  $\beta$ -Amyloid protein-dependent nitric oxide production from microglial cells and neurotoxicity. *Brain Res* **720**, 93-100.
- [54] White JA, Manelli AM, Holmberg KH, Van Eldik LJ, Ladu MJ (2005) Differential effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta 1-42 on astrocyte-mediated inflammation. *Neurobiol Dis* **18**, 459-465.
- [55] Lee SC, Dickson DW, Liu W, Brosnan CF (1993) Induction of nitric oxide synthase activity in human astrocytes by interleukin-1 $\beta$  and interferon- $\gamma$ . *J Neuroimmunol* **46**, 19-24.
- [56] Liu J, Zhao ML, Brosnan CF, Lee SC (1996) Expression of type II nitric oxide synthase in primary human astrocytes and microglia: role of IL-1 $\beta$  and IL-1 receptor antagonist. *J Immunol* **157**, 3569-3576.
- [57] Assis-Nascimento P, Jarvis KM, Montague JR, Mudd LM (2007) Beta-amyloid toxicity in embryonic rat astrocytes. *Neurochem Res* **32**, 1476-1482.



- [58] Dodart JC, May P (2005) Overview on rodent models of Alzheimer's disease. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 9, Unit 9.22.
- [59] Begum AN, Yang F, Teng E, Hu S, Jones MR, Rosario ER, Beech W, Hudspeth B, Ubeda OJ, Cole GM, Frautschy SA (2008) Use of copper and insulin-resistance to accelerate cognitive deficits and synaptic protein loss in a rat A $\beta$ -infusion Alzheimer's disease model. *J Alzheimers Dis* **15**, 625-640.
- [60] Malm T, Ort M, Tähtivaara L, Jukarainen N, Goldsteins G, Puoliväli J, Nurmi A, Pussinen R, Ahtoniemi T, Miettinen TK, Kanninen K, Leskinen S, Vartiainen N, Yrjänheikki J, Laatikainen R, Harris-White ME, Koistinaho M, Frautschy SA, Bures J, Koistinaho J (2006)  $\beta$ -Amyloid infusion results in delayed and age-dependent learning deficits without role of inflammation or beta-amyloid deposits. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 8852-8857.
- [61] Perry G, Friedman R, Shaw G, Chau V (1987) Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains. *Proc Acad Sci USA* **84**, 3033-3036.
- [62] Song S, Jung YK (2004) Alzheimer's disease meets the ubiquitin-proteasome system. *Trends Mol Med* **10**, 565-570.
- [63] Honda K, Smith MA, Zhu X, Baus D, Merrick WC, Tartakoff AM, Hattier T, Harris PL, Siedlak SL, Fujioka H, Liu Q, Moreira PI, Miller FP, Nunomura A, Shimohama S, Perry G (2005) Ribosomal RNA in Alzheimer disease is oxidized by bound redox-active iron. *J Biol Chem* **280**, 20978-20986.
- [64] Smith MA, Harris PL, Sayre LM, Perry G (1997) Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 9866-9868.
- [65] Smith MA, Hirai K, Hsiao K, Pappolla MA, Harris PL, Siedlak SL, Tabaton M, Perry G (1998) Amyloid-beta deposition in Alzheimer transgenic mice is associated with oxidative stress. *J Neurochem* **70**, 2212-2215.
- [66] Abramov AY, Canevari L, Duchen MR (2004) Calcium signals induced by amyloid  $\beta$  peptide and their consequences in neurons and astrocytes in culture. *Biochim Biophys Acta* **1742**, 81-87.
- [67] Heneka MT, O'Banion MK (2007) Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunology* **184**, 69-91.
- [68] Farfara D, Lifshitz V, Frenkel D (2008) Neuroprotective and neurotoxic properties of glial cells in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* **12**, 762-780.

[69] 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**,615-624.

## Figure legends

Fig. 1. Oxidative stress in human astrocyte cultures is increased by A $\beta$  in pro-oxidant conditions. Treatment with A $\beta_{42}$  alone did not generate reactive oxygen species, but A $\beta_{42}$  potentiated the effect of pro-oxidant agents. Astrocytes were incubated with A $\beta_{42}$  20  $\mu$ M (A $\beta_{42}$ ), FeSO<sub>4</sub> 25  $\mu$ M (Fe) and buthionine sulfoximine 1mM (BSO) for 4 h at 37°C. BSO was added 24 h before the addition of A $\beta_{42}$  and FeSO<sub>4</sub>. The reactive oxygen species generation was assayed by dichlorofluorescein (DCF) formation. Results are shown as the mean  $\pm$  SEM from duplicate determinations in four different cultures. Statistics: \*p<0.05, \*\*p<0.01 and \*\*\*p<0.001 as compared to control.

Fig. 2. Cytokine treatment causes activation of human astrocytes. Cultured astrocytes changed its polygonal shape to a smaller spherical body with long filamentous prolongations, known as stellate morphology, in the presence of active cytokines. Astrocyte morphology was visualized in astrocytes fixed with 4 % paraformaldehyde and stained with anti-GFAP antibody. Images show control astrocytes, and astrocytes exposed to interleukin-1 $\beta$  10 ng/ml (IL-1 $\beta$ ), interferon- $\gamma$  10 ng/ml (IFN- $\gamma$ ) or both for 3 days. Arrows indicate long cytoplasmic processes characteristic of the activated stellate morphology. Scale bar: 20  $\mu$ m. E) Nitrite accumulation in the respective culture media was measured using the Griess reagent. Results are shown as the mean  $\pm$  SEM of four determinations from two different cultures. Statistics: \*p<0.001 as compared to control.

Fig. 3. Pro-oxidant conditions trigger the toxic and inflammatory effects of A $\beta$  in human astrocyte cultures. Treatment with A $\beta_{42}$  alone caused a barely distinguishable change to an activated morphology. However, the mixed treatment with A $\beta_{42}$  and pro-oxidant agents caused astrocyte activation and apoptosis. A) Astrocytes were stained with anti-GFPA antibody and nuclei were counterstained with bisbenzimidazole. Images show control astrocytes, as well as astrocytes exposed to FeSO<sub>4</sub> 10  $\mu$ M (Fe) plus buthionine sulfoximine 1mM (BSO), those exposed to A $\beta_{42}$  5  $\mu$ M (A $\beta_{42}$ ), and those exposed to both treatments, for 3 days. BSO was added 24 h before the addition of A $\beta_{42}$  and FeSO<sub>4</sub>. Apoptotic nuclei show a bright fluorescence (arrow). B) The number of condensed and fragmented nuclei was recorded for the different treatments, as labeled in the graph. Results are shown as the mean  $\pm$  SEM of three to five determinations from two different cultures. Statistics: \*p<0.05 as compared to control.

Fig. 4. In vivo treatment with A $\beta$  causes a decreased cognitive capacity that is potentiated by pro-oxidant agents in adult rats. Cognitive behavioral testing in the Morris water maze of rats administrated with A $\beta$  and a pro-oxidant treatment showed long term cognitive loss. Pro-oxidant agents alone did not induce any effect on rat behavior. Rats were previously administrated icv for 4 weeks with: I, a vehicle (Control); II, a pro-oxidant treatment of 4.48 mg buthionine sulfoximine and 0.47 mg FeSO<sub>4</sub> heptahydrate (BSO/Fe); III, a mixture of 20  $\mu$ g A $\beta$ <sub>40</sub> and 30  $\mu$ g A $\beta$ <sub>42</sub> (A $\beta$ <sub>40</sub>/A $\beta$ <sub>42</sub>); IV, pro-oxidant treatment plus A $\beta$ <sub>40</sub> and A $\beta$ <sub>42</sub> mixture (A $\beta$ <sub>40</sub>/A $\beta$ <sub>42</sub> + BSO/Fe); and V, a pro-oxidant plus a high A $\beta$ <sub>42</sub> treatment of 50  $\mu$ g (A $\beta$ <sub>42</sub> + BSO/Fe). A) Probe trials performed after a 6 day acquisition period (week 0) and thereafter at 1, 5 and 9 weeks later. An initial stronger effect was seen in the group V as compared to the group IV. B) Probe trials performed after a reversal platform acquisition, initiated 3 weeks after the previous behavioral study at the end of acquisition (week 0) and 1, 2 and 4 weeks later. In the long term, both groups dosed with A $\beta$  plus pro-oxidants (IV and V) showed similarly high deleterious effects on cognition. Dotted lines indicate chance performance. Statistics: \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001 as compared to the indicated experimental group.

Fig. 5. Pro-oxidant agents potentiate brain A $\beta$  accumulation. A $\beta$  precipitates were found scattered in the brain tissue near the ventricular area where it was infused. Vessels also stained positive for A $\beta$ . The long term A $\beta$  accumulation was higher in the groups simultaneously dosed with pro-oxidant agents. Immunohistochemistry was performed with anti-A $\beta$  antibody 4G8 and nuclei were lightly counterstained with hematoxylin. A-D) Representative images of cerebral cortical capillary blood vessels in animals sacrificed after the infusion period. E-P) Representative images of frontal cortex, corpus callosum and septum of animals sacrificed at the end of the study, 4 months post treatment. Arrows point to A $\beta$  deposits and A $\beta$  positive capillary vessels. For details of treatment groups see the legend to Fig. 4. Scale bar = 20  $\mu$ m.

Fig. 6. Brain iron accumulation was caused by A $\beta$  treatment. Accumulated ferric iron was barely present in the brain rat after the infusion period and mainly in the group dosed with A $\beta$ <sub>42</sub> + BSO/Fe. However, 4 months later, the rats dosed with A $\beta$ <sub>40</sub>/A $\beta$ <sub>42</sub> + BSO/Fe showed extensive iron accumulation. Histochemistry was performed with Pearl's Prussian blue and tissue was counterstained with neutral red. A-D) Pyramidal layer of hippocampus CA1 of rats sacrificed at the end of the infusion period. E-H) Septum of rats sacrificed at the end of the study, 4 months later.

Arrows point to intra and extracellular precipitates. For details of treatment groups see the legend to Fig. 4. Scale bar = 20  $\mu\text{m}$  in A- D and 40  $\mu\text{m}$  in E-H.

Fig. 7. Pro-oxidant agents potentiate astrocyte activation induced by A $\beta$  treatment. Immediately after treatment, the higher astrocyte reactivity was caused by A $\beta_{42}$  + BSO/Fe, where astrocytes also stained positive for Fluoro-Jade B. Long term reactive astrocytes were mainly observed in rats treated with A $\beta_{40}$ /A $\beta_{42}$  + BSO/Fe. A-D) Images of immunohistochemistry with anti-GFPA antibody and light counterstain with hematoxylin in hippocampus Ammon's horn of rats sacrificed immediately after the infusion treatment. E-H) Fluoro-Jade B fluorescence staining of the same brain area and treatment groups than the previous images, as indicated. I-P) GFAP immunostaining in frontal cortex and corpus callosum of rats sacrificed at the end of the study, 4 months post treatment. Arrows point to reactive astrocytes. For details of treatment groups see the legend to Fig. 4. Scale bar = 80  $\mu\text{m}$  in A-H and 20  $\mu\text{m}$  in I-P.

Fig. 8. Pro-oxidant agents potentiate microglia activation induced by A $\beta$  treatment. Treatment with A $\beta_{40}$ /A $\beta_{42}$  + BSO/Fe caused microglia reactivity that was maintained up to the end of the study, 4 months after treatment. The other A $\beta$  treatments assayed caused short time reactivity. A-D) Microglia staining with *Lycopersicum esculentum lectin* histochemistry and light counterstain with hematoxylin in frontal cortex of rats sacrificed immediately after treatment. E-H) Immunostaining of reactive microglia with anti-OX42 in the corpus callosum of rats sacrificed at the end of the study. Arrows indicate reactive microglia. For details of treatment groups see the legend to Fig. 4. Scale bar = 20  $\mu\text{m}$  in A-D and 40  $\mu\text{m}$  in E-H.

Fig. 9. Brain neurons suffer a delayed damage after A $\beta$  and pro-oxidant agent treatment. Neuronal damage was not detected histologically in the early sacrificed rats, but only at the long term period assayed at 4 months post treatment. A-D) DNA oxidation, as indicated by staining with anti-8-OHdG antibody, was caused by A $\beta_{40}$ /A $\beta_{42}$  + BSO/Fe and in minor degree by A $\beta_{42}$  + BSO/Fe. E-H) Proteasome system dysfunction, as indicated by anti-ubiquitin antibody staining of intraneuronally accumulated ubiquitin, was caused by A $\beta_{40}$ /A $\beta_{42}$  in the presence or absence of pro-oxidants. After immunohistochemistry, tissue was lightly counterstained with hematoxylin. Arrows point to damaged pyramidal neurons. For details of treatment groups see the legend to Fig. 4. Scale bar = 20  $\mu\text{m}$ .

## FIGURES

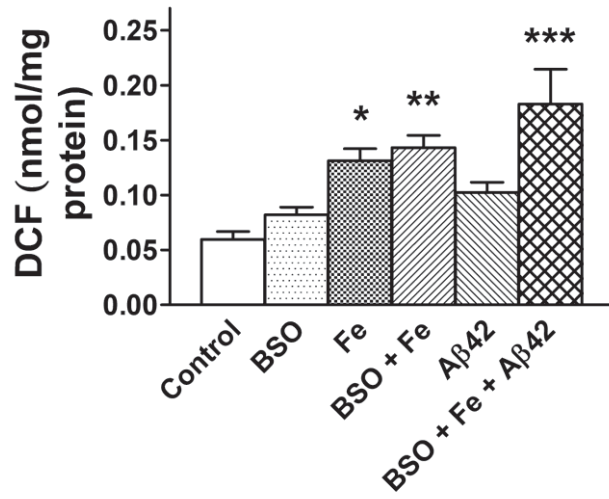


Figure 1

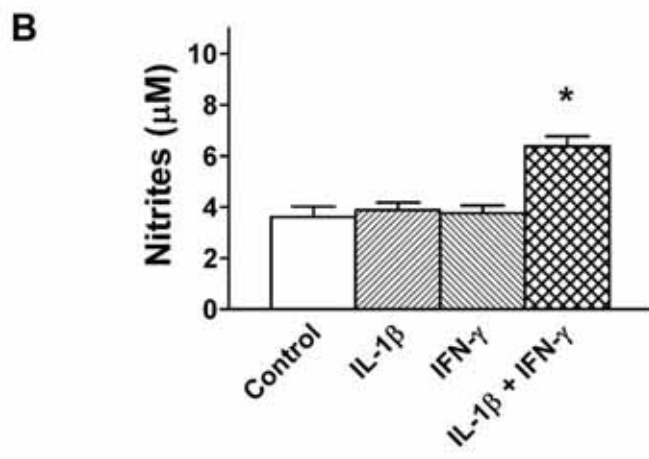
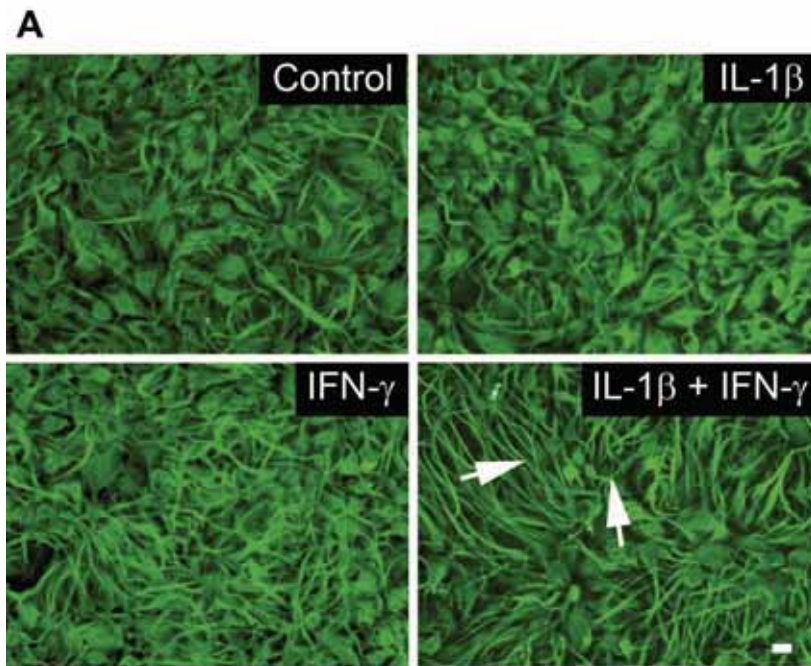


Figure 2

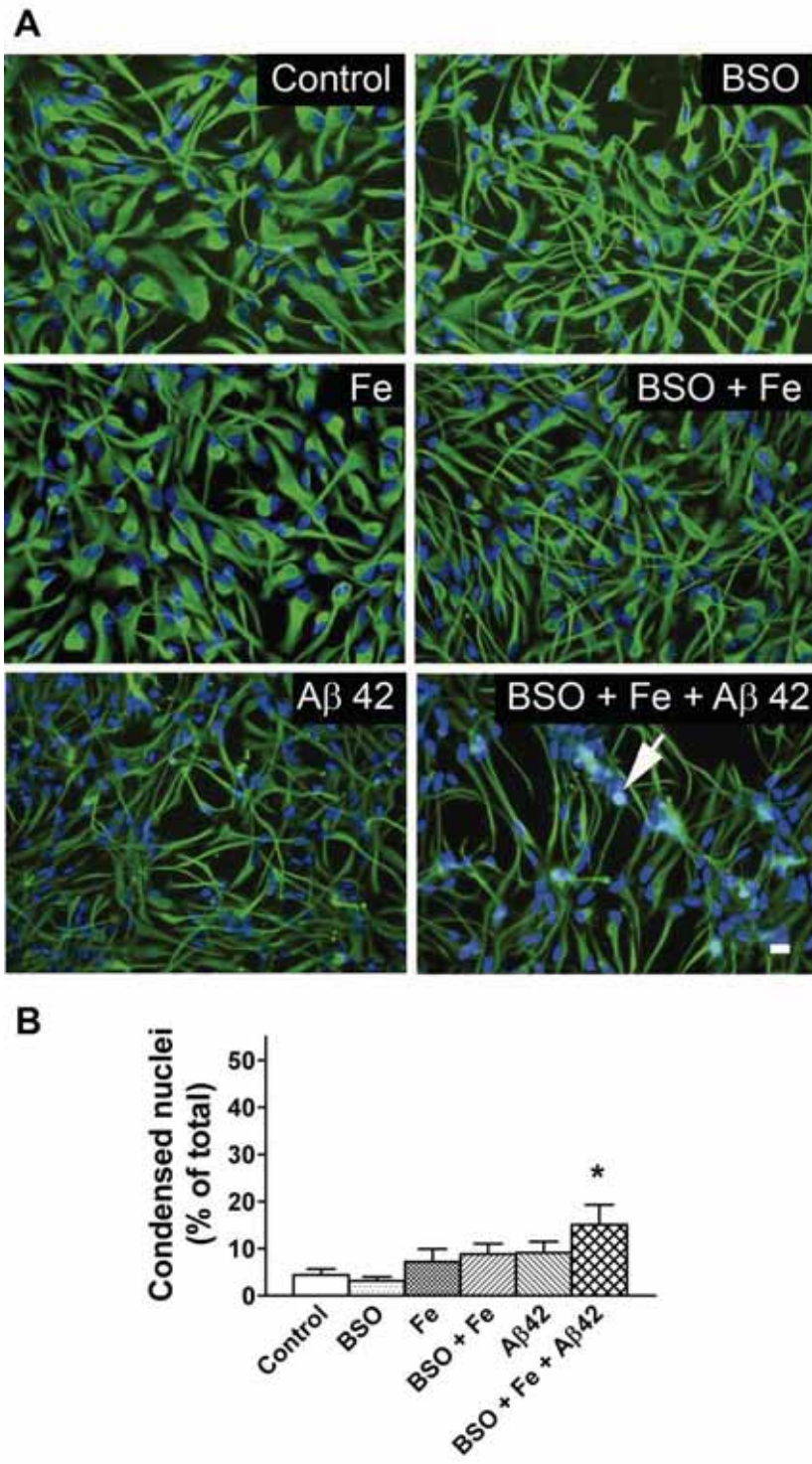


Figure 3



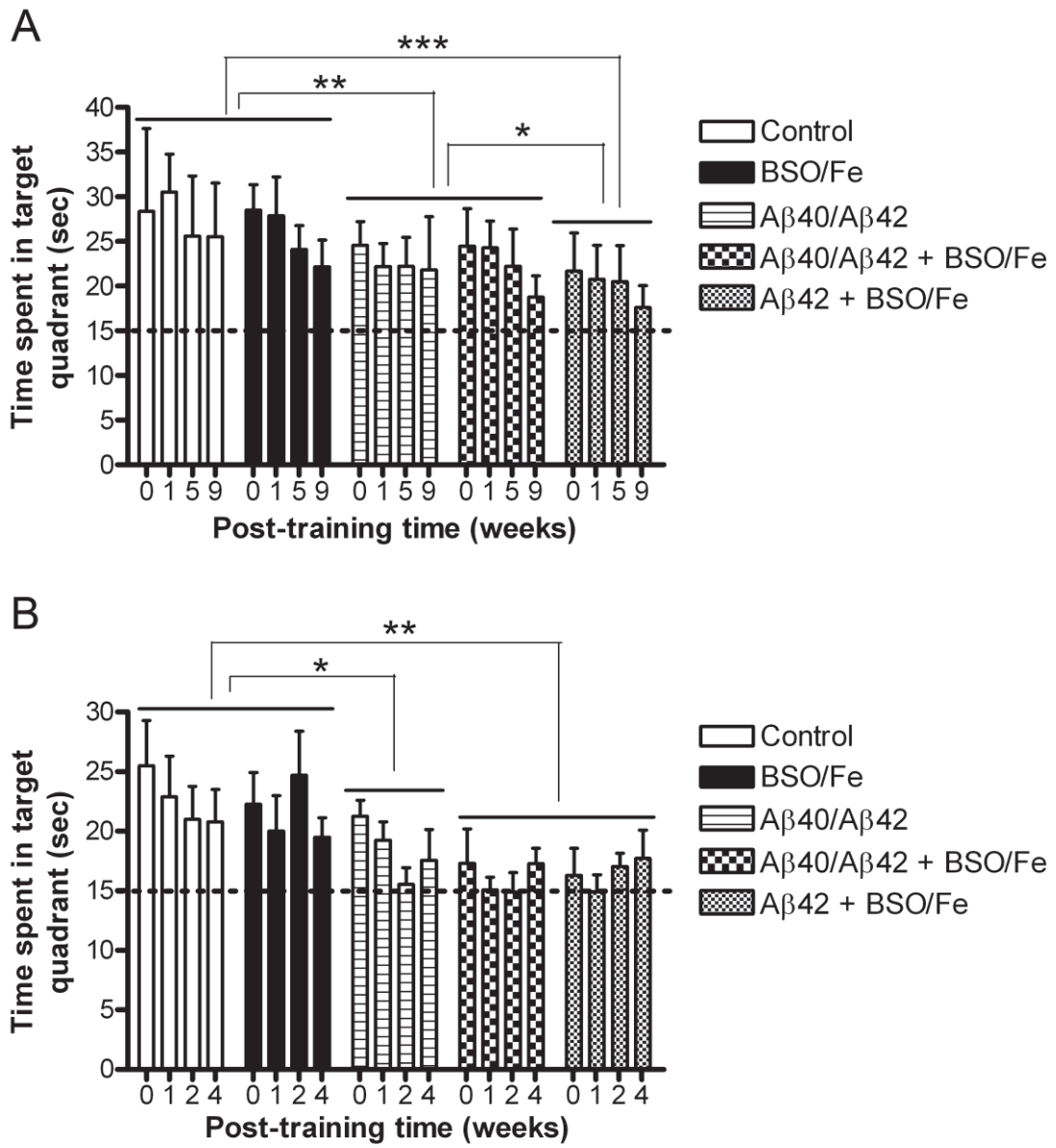


Figure 4

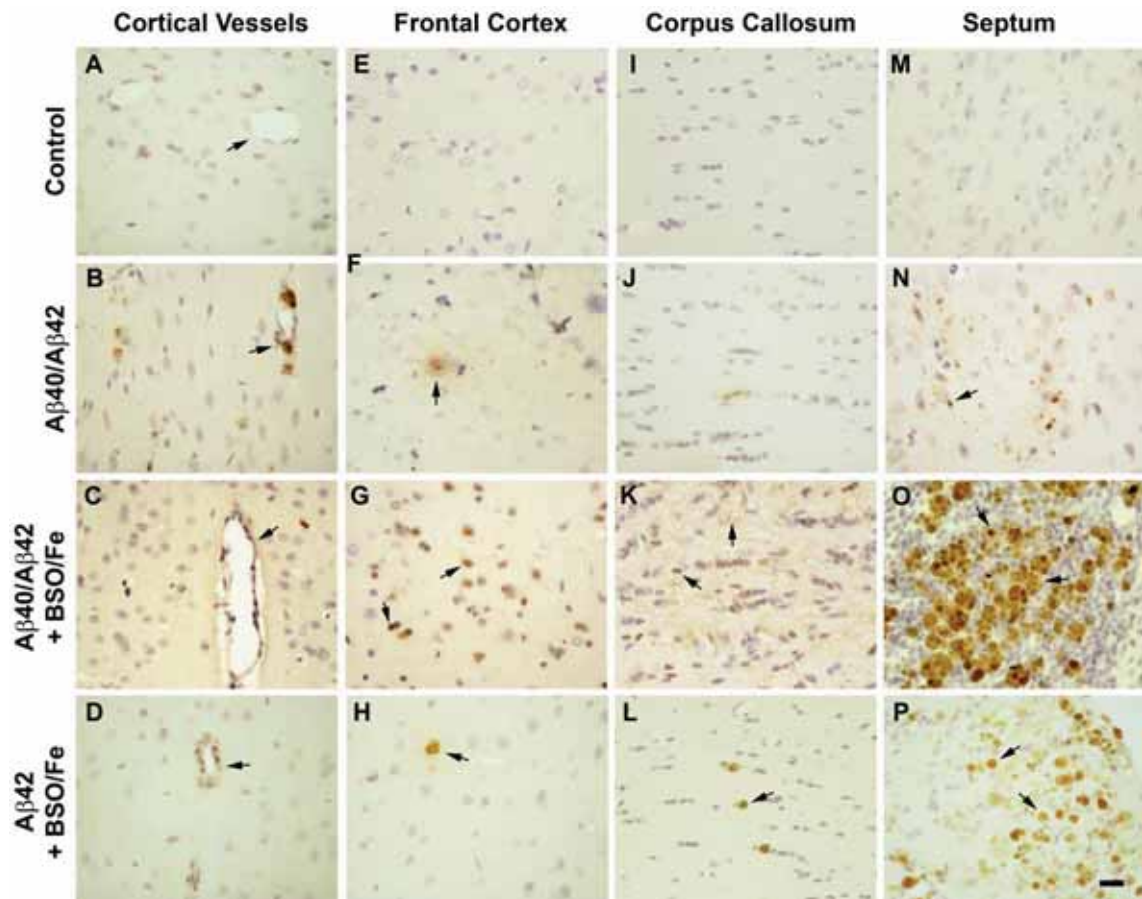


Figure 5

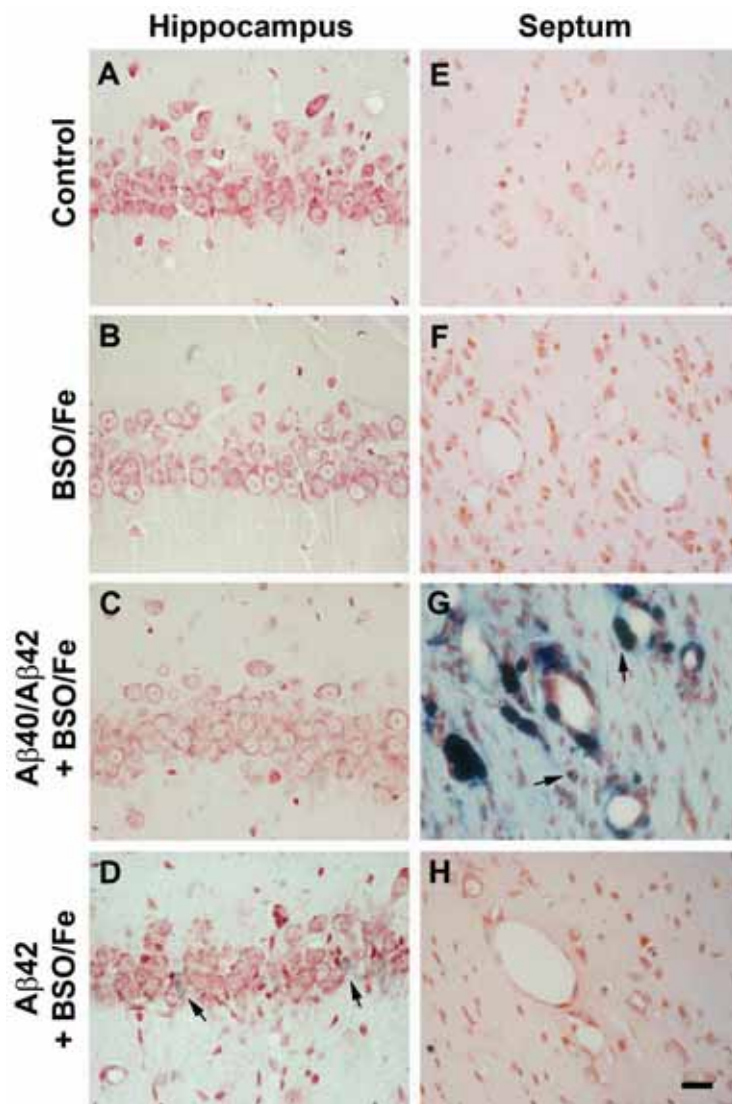


Figure 6

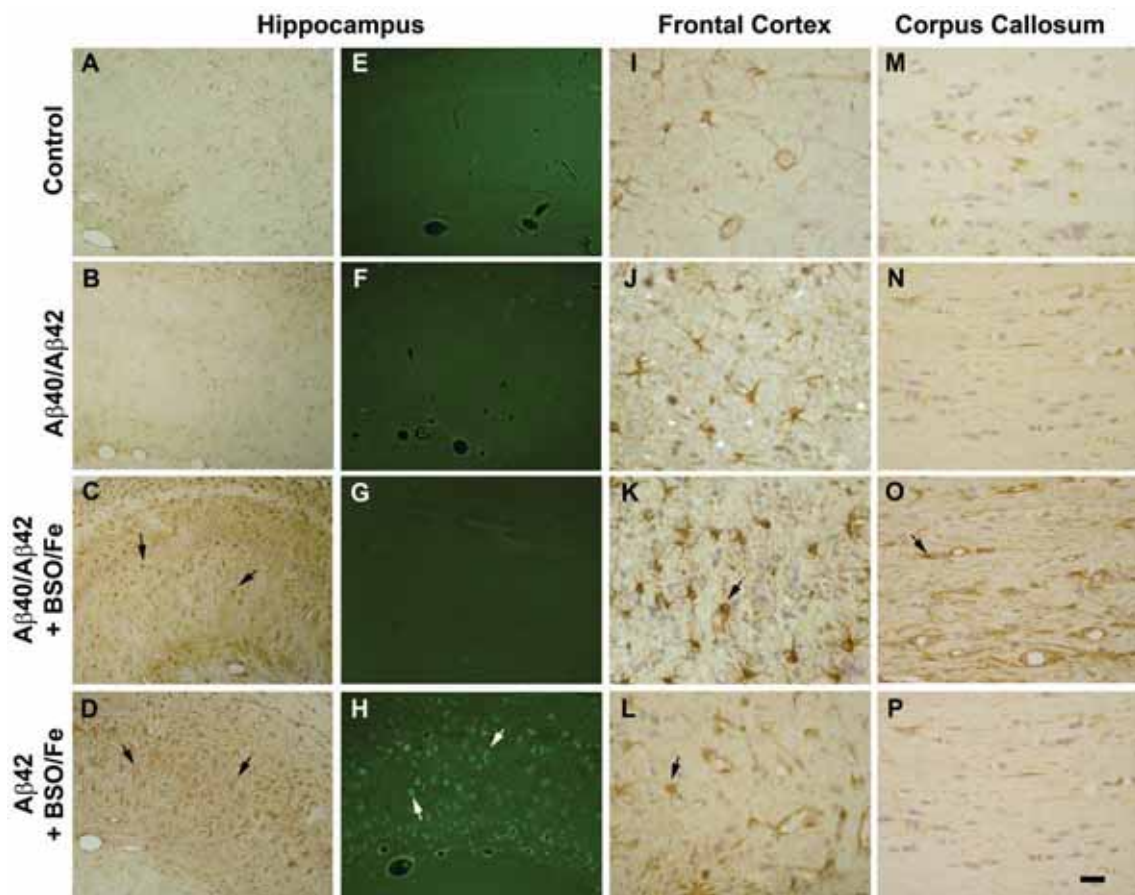


Figure 7

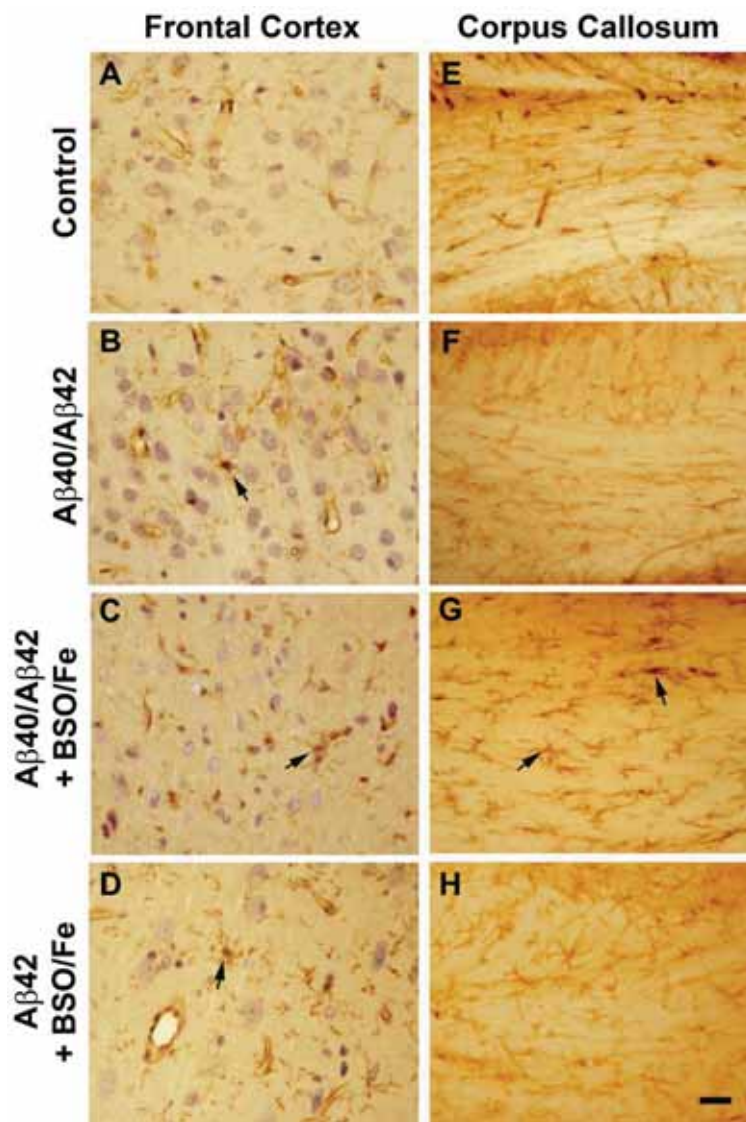


Figure 8

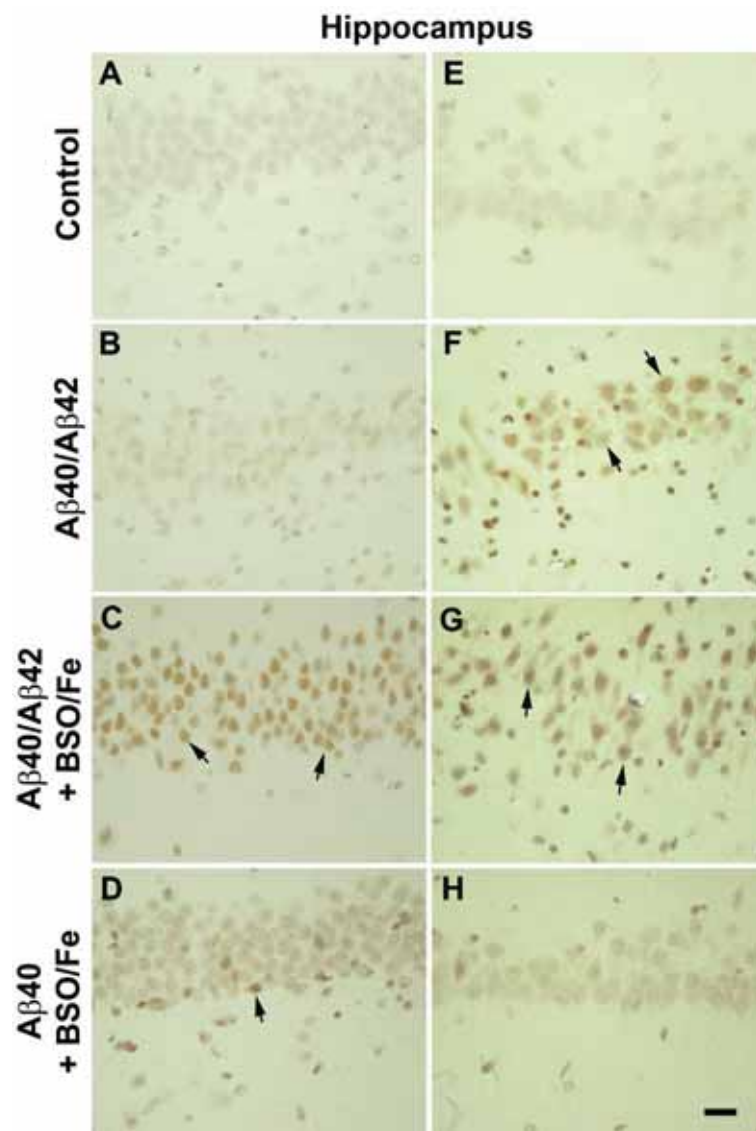


Figure 9

# DISCUSIÓN



## DISCUSIÓN

---

En nuestro objetivo de caracterizar modelos *in vitro* para el estudio del papel de los astrocitos en el envejecimiento hemos establecido dos modelos que nos han permitido estudiar la capacidad neuroprotectora de los astrocitos.

En el primer modelo en el que los astrocitos se han cultivado durante 90 días (90 DIV) hemos encontrado un aumento de GFAP y S100 $\beta$ , tinción positiva a la  $\beta$ -galactosidasa, un aumento de ROS, una disminución de la actividad mitocondrial y un aumento de expresión de nitrotirosina, SOD-1, HO-1 y iNOS en relación a los astrocitos cultivados durante 10 días (10 DIV). Además hemos observado que los astrocitos cultivados durante 90 días presentan respecto a los astrocitos de 10 DIV un aumento de la captación de glutamato y de los transportadores de glutamato GLAST. Como ya hemos discutido en el artículo, la mayor parte de estos cambios correlacionan con los observados en otros estudios *in vitro* e *in vivo*, concretamente el aumento de GFAP, S100 $\beta$  y SOD1 en el cerebro de ratones SAMP8 con envejecimiento acelerado (Kawamata et al., 1998). La observación más remarcable de este estudio ha sido la menor capacidad de neuroprotección de los astrocitos 90DIV en cocultivo con neuronas, parcialmente recuperada con el tratamiento de antioxidantes como el trolox y la curcumina. La curcumina es un polifenol procedente del rizoma de la planta *Curcuma longa* que posee actividad antitumoral, antioxidante, antiinflamatoria y se estudia su aplicación clínica para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Cashman et al., 2008; Strimpakos & Sharma, 2008). De su función antioxidante se conoce que la curcumina es un scavenger de radicales libres como los radicales superóxido e hidroxilo (Ak & Gülçin, 2008). Además este antioxidante puede promover o inhibir la inducción de HO-1 y iNOS respectivamente. El trolox es el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxílico, un tocoferol antioxidante derivado de la vitamina E (Usuki et al., 2001). De su función antioxidante se sabe que es un scavenger de radicales libres como el radical hidroxilo (Aruoma et al., 1990). Este antioxidante previene la formación de ROS y mejora la viabilidad de los astrocitos tras la exposición a peróxido de hidrógeno y FeSO<sub>4</sub> (Gorina et al., 2007). Además puede prevenir el efecto del estrés oxidativo *in vitro* en los procesos biológicos relevantes como la síntesis de proteínas (Argüelles et al., 2007). Las funciones del trolox están actualmente en estudio. Se conoce su efecto neuroprotector tras la isquemia cerebral (Gupta & Sharma, 2006), también mejora la funcionalidad neuronal en la neuropatía diabética (Sharma SS & Sayyed SG., 2006) y se está estudiando su posible uso en la enfermedad de Alzheimer (Quintanilla et al., 2005). La mejora de la viabilidad de las neuronas en cocultivo por estos antioxidantes nos sugiere que el estrés oxidativo es importante en la pérdida de la función neuroprotectora de los astrocitos durante el envejecimiento, aunque el efecto preventivo parcial de los antioxidantes sugiere que puede haber otros factores implicados como una deficiencia de los factores neurotróficos (se comenta más adelante).



En este estudio hemos observado como por una parte los astrocitos envejecidos *in vitro* generan ROS y por otra parte sobreexpresan enzimas antioxidantes como defensa, aunque no son suficientes para protegerse del estrés oxidativo padeciendo daños como la nitrosilación de sus proteínas, la disminución de la actividad mitocondrial y una disminución en su capacidad neuroprotectora. La generación de ROS puede inducir una sobreexpresión de enzimas antioxidantes como SOD y HO-1 para proteger en un principio del daño oxidativo, pero mantener sus niveles elevados durante un largo periodo de tiempo puede alterar la función astrocitaria. Es decir el aumento de los niveles de SOD sin estar aumentados de manera equilibrada los niveles de catalasa y GPX pueden provocar el aumento de peróxido de hidrógeno aumentando así el estrés oxidativo (Kowald et al., 2006). De hecho, se ha descrito en cerebro de ratones viejos un aumento de actividad del enzima SOD respecto a la actividad de GPX (Leutner et al., 2001). En células transfectadas donde se desequilibra la ratio de actividad SOD/GPX se observa un aumento de peróxido de hidrógeno y presentan características de senescencia (Haan et al., 1996). Por otra parte se ha observado que la sobreexpresión de HO-1 en astrocitos de rata promueve el acúmulo del hierro mitocondrial (Schipper et al., 1999), la sobreexpresión de Mn-SOD inducida por radicales libres (Frankel et al. 2000) y el daño oxidativo de los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos mitocondriales (Song et al., 2006). En experimentos *in vitro* las células PC12 en cocultivo con astrocitos de rata que sobreexpresan HO-1 son más susceptibles al daño oxidativo (Song et al., 2007). Así el aumento de expresión de HO-1 a lo largo del tiempo también puede contribuir al estrés oxidativo y alterar la actividad mitocondrial afectando a la funcionalidad glial.

La captación de glutamato es nuestro dato más controvertido ya que en estudios con sinaptosomas de ratas viejas se ha visto un descenso de la captación (Segovia et al., 2001) mientras que en experimentos con cortes de corteza de ratas viejas no se han visto cambios (Dawson, 1989). Sin embargo en otros estudios con astrocitos envejecidos *in vitro* durante 40 días también se observó un aumento de la captación de glutamato (Gottfried et al., 2002). Por otra parte, se ha visto en astrocitos *in vitro* que un aumento de glutamato extracelular produce un aumento de expresión del transportador GLAST y un incremento de la captación de glutamato (Duan et al., 1999). Estos datos se pueden explicar si asumimos que los astrocitos y las neuronas tienen diferentes patrones en la captación de glutamato. Se ha observado que la concentración de glutamato extracelular en el cerebro se presenta invariable durante el envejecimiento (Segovia et al., 2001). Esto podría ser debido a una reducción en la captación de glutamato en las neuronas lo cual produciría un aumento de la concentración de glutamato extracelular que ocasionaría un aumento de la captación en los astrocitos manteniendo así la concentración de glutamato inalterado en la sinapsis.

Nuestro segundo modelo de estudio del envejecimiento de los astrocitos es el cultivo de astrocitos de ratones SAMP8 de envejecimiento acelerado. Estos ratones han demostrado ser un buen modelo de envejecimiento in vivo y lo hemos escogido por sus características neurodegenerativas y neuropatológicas (Takeda 2009). En estos cultivos de astrocitos hemos detectado una hiperfosforilación de tau, y un aumento de la actividad de las kinasas Gsk3 $\beta$  y Cdk5 que fosforilan tau. Además hemos observado que su inhibición reduce la hiperfosforilación de tau. Por otra parte, hemos encontrado un aumento de ROS acompañado con un incremento de lipoperoxidación y oxidación proteica, un descenso del potencial de membrana mitocondrial y un descenso de su captación de glutamato. Por último, hemos visto que tienen una menor capacidad neuroprotectora.

Los resultados de este trabajo coinciden con los estudios neuropatológicos en los ratones SAMP8 (Tomobe, 2009). Así, estudios in vivo en ratones SAMP8 han relacionado la producción de ROS con la anormal hiperfosforilación de tau, y han sugerido que esto contribuye al proceso neurodegenerativo que se produce en el cerebro de estos animales (Alvarez-García et al., 2006). En los cerebros de estos ratones se han encontrado aumentados los niveles de peroxidación lipídica y enlaces carbonilo en sus proteínas (Butterfield et al., 1997; Yasui et al., 2003). En los ratones SAMP8 de 5 meses se ha observado hiperfosforilación de tau en la corteza, el estriado y el hipocampo donde la actividad de Gsk3 $\beta$  no variaba pero sí se veía aumentada la expresión y la actividad de Cdk5 (Canudas et al., 2005). Las diferencias encontradas en la actividad de Gsk3 $\beta$  entre los estudios in vivo y nuestro modelo in vitro puede deberse a que nuestros datos se observan en los astrocitos y que las neuronas pueden tener otro patrón de actividad de esta quinasa. Además, otro estudio establece que la fosforilación previa de tau por Cdk5 aumenta la actividad de Gsk3 y sugiere que tau, Cdk5 y Gsk3 $\beta$  formarían un complejo de 450 kDa en el cerebro (Li et al., 2006).

La hiperfosforilación y agregación de tau puede ser un proceso normal durante el envejecimiento, o según su intensidad y las áreas del cerebro afectado considerarse un proceso patológico que se da en enfermedades como las taupatías. En algunos modelos animales como los roedores, los perros y los monos viejos se ha observado que no padecen patología de tau. En cambio todos los cerebros de personas mayores de 75 años sanos no dementes presentan sistemáticamente agregados de tau en la corteza entorrinal y puede llegar a afectar al hipocampo (Bueé et al., 2000). En los ancianos dementes la taupatía afecta a todas las áreas de la corteza cerebral y del hipocampo. Así la taupatía según el grado de afectación cerebral puede ser un proceso normal dentro del envejecimiento o convertirse en patológico (Delacourte et al., 2002). En

los ratones SAMP8 de edades tempranas se ha descrito un aumento de hiperfosforilación de tau en diferentes áreas cerebrales como la corteza, el estriado y el hipocampo respecto a los ratones SAMR1 relacionando la patología de tau con la senescencia en estos ratones (Canudas et al., 2005).

Ambos modelos tanto el del cultivo a largo plazo de astrocitos de rata como el cultivo de astrocitos de ratones SAMP8 son válidos para estudiar los procesos de envejecimiento. En nuestro estudio con astrocitos de ratones SAM hemos comprobado que estas células tienen características que reproducen el envejecimiento in vivo que sufren estos ratones de senescencia acelerada en edades relativamente tempranas. Es importante señalar que en ambos modelos encontramos que las alteraciones que padecen los astrocitos disminuyen su capacidad neuroprotectora y esta disfunción glial probablemente aumente la fragilidad neuronal a padecer trastornos neurodegenerativos. Es por esto que el envejecimiento es un importante factor de riesgo de padecer este tipo de enfermedades y el principal factor que induce a padecer EA (Barranco-Quintana et al., 2005). Comparando ambos modelos concluimos que el cultivo de astrocitos SAMP8 in vitro es el modelo más adecuado para estudiar los cambios que padecen los astrocitos durante el envejecimiento, ya que reproduce mejor las alteraciones observadas en los cerebros de los ratones SAMP8. La presencia de cambios patológicos en los astrocitos SAMP8 in vitro la hemos corroborado con estudios de proteómica comparativa entre cultivos de astrocitos SAMR1 y SAMP8 (Díez-Vives et al., 2009). El cultivo de astrocitos in vitro durante un largo periodo de tiempo tiene el inconveniente de que puede producir alteraciones extrínsecas a las propias del envejecimiento.

Hemos observado que la función anticitotóxica de los astrocitos que protege a las neuronas está disminuida probablemente debida a cambios en la captación de glutamato y en los niveles de enzimas antioxidantes que conducen al aumento del estrés oxidativo. Esta alteración funcional podría ser un factor que contribuyera al desencadenamiento del envejecimiento. Así, el aumento de estrés oxidativo generado por los astrocitos puede ser un factor importante en el envejecimiento. De acuerdo con la teoría de los radicales libres, que es la más aceptada para explicar el envejecimiento, éste se produce por un fallo del mantenimiento de la homeostasis probablemente debido al estrés oxidativo (Valko et al., 2007; Poon et al., 2004a). El cerebro es particularmente susceptible al daño oxidativo y los astrocitos son los principales responsables de la defensa antioxidante. Los astrocitos envejecidos son más sensibles al estrés oxidativo y menos capaces de detoxificar las ROS, lo que también afectaría al aumento de toxicidad de estos radicales libres en el cerebro (Lin et al., 2007; Lü et al., 2008a, Lü et al., 2008b). Nuestros trabajos con astrocitos en

cultivo sugieren que estas células gliales del cerebro pueden padecer alteraciones que con el tiempo contribuyan a la generación de ROS y a la disminución de la viabilidad neuronal.

Es difícil separar un modelo de envejecimiento de un modelo de Alzheimer esporádico ya que la patología amiloidea y la taupatía están muy ligadas al envejecimiento. Esto está claro en los ratones SAMP8, considerados un modelo constatado de envejecimiento, ya que sus alteraciones cognitivas, el incremento de estrés oxidativo cerebral, la gliosis, la hiperfosforilación de tau y sus depósitos de A $\beta$  coinciden además con el desarrollo de la EA (Pallás et al., 2009). Así los estudios en ratones SAM pueden ser claves en el paso desconocido entre el envejecimiento y la EA.

Como ya se ha comentado anteriormente, algunas de las alteraciones observadas en los cultivos de astrocitos envejecidos o de astrocitos SAMP8 podrían ser debidas a una deficiencia neurotrófica. El GDNF es un conocido factor neurotrófico que se expresa tanto en astrocitos como en neuronas (Scharr et al., 1993). Un aumento de la síntesis y expresión proteica de GDNF por parte de los astrocitos se cree que incrementa la supervivencia neuronal y la plasticidad sináptica después de la isquemia (Miyazaki et al., 2001; Tokumine et al., 2003) y del daño excitotóxico (Marco et al., 2002). La función del GDNF está poco estudiada en el envejecimiento y en la EA. En estudios previos se ha observado que la expresión de GDNF disminuye durante el envejecimiento (Matsunaga et al., 2006). Además, se ha visto que el GDNF disminuye la apoptosis generada por el péptido betamieloide aunque no previene la hiperfosforilación de tau (Ghribi et al., 2004). En nuestro estudio realizado con ratas envejecidas hemos observado que un aumento de la producción de GDNF por parte de los astrocitos a través de la inyección de un vector lentiviral en el área CA1 del hipocampo mejora su estado cognitivo y aumenta los niveles de los neurotransmisores acetilcolina, dopamina y serotonina en el hipocampo. En este trabajo comprobamos como los astrocitos son el tipo de células apropiadas para sobreexpresar GDNF en terapias génicas. Las deficiencias cognitivas de las ratas viejas no han sido totalmente restablecidas, lo cual podría indicar que la región CA1 del hipocampo donde se realiza la acción paracrina del GDNF es una área cerebral demasiado pequeña para obtener una recuperación funcional del aprendizaje. En estos experimentos, los lentivirus muestran ser de gran eficacia, y un tratamiento a más largo plazo podría producir mejores resultados.

Cabe destacar que la expresión de GDNF en el hipocampo de ratones SAMP8 está ya disminuida en relación con los controles SAMR1 a los dos meses de edad (Miyazaki et al., 2003). Esto podría influir en las deficiencias cognitivas que presentan los ratones SAMP8. En nuestro

grupo pensamos que sería interesante sobreexpresar GDNF en el hipocampo de estos ratones. También se han publicado estudios en los que la restricción calórica y el ejercicio aumentan los niveles de GDNF en el cerebro (Saavedra et al., 2008). El uso de estas estrategias tiene un gran interés debido a que no son tratamientos invasivos.

En nuestro estudio *in vitro* con astrocitos humanos hemos observado que el péptido betamiloide produce un cambio de morfología de estas células que adoptan una forma filamentosa comparable al que hemos visto con la aplicación de citoquinas. En el tratamiento con A $\beta$ 42, BSO y hierro, además del cambio en la morfología mayor de los astrocitos hemos visto su inflamación, observación que coincide con los resultados publicados en el tejido de ratas inyectadas con este tratamiento (Lecanu et al., 2006). Además, el ambiente prooxidante (BSO y hierro) junto con A $\beta$ 42 es la única condición que produce la condensación de los núcleos de los astrocitos *in vitro*. Este tratamiento produce mayor formación de ROS que el ambiente prooxidante solo. Así concluimos que los astrocitos responden poco al péptido betamiloide pero en una situación prooxidante tienen una respuesta inflamatoria y de estrés oxidativo. Esto podría significar que los astrocitos envejecidos que tienen un nivel basal más alto de estrés oxidativo fueran más sensibles a los daños causados por el péptido betamiloide. La mayor sensibilidad al péptido betamiloide originaría una cascada que conllevaría a una menor neuroprotección con un aumento en la neurotoxicidad, contribuyendo así a los cambios patológicos característicos de la enfermedad de Alzheimer.

En nuestro modelo *in vivo* de la EA hemos visto deterioro cognitivo en todas las ratas tratadas con el péptido betamiloide, y esta deficiencia cognitiva es aún mayor cuando el animal es tratado con el péptido betamiloide en un ambiente prooxidante. Así el efecto del péptido betamiloide en presencia de agentes prooxidantes actúa de manera más tóxica sobre la transmisión sináptica cosa que se refleja en el comportamiento de estos animales. Nuestro grupo, al igual que otros investigadores (Malm et al., 2006), sugiere que el péptido betamiloide junto al estrés oxidativo y la disfunción astrocitaria pueden dar como resultado un deterioro cognitivo a través de una disfunción sináptica en el hipocampo y la corteza cerebral.

En este estudio de la EA no observamos placas neuríticas maduras pero sí observamos deterioro cognitivo. Esto puede ser debido al efecto tóxico del péptido betamiloide soluble que detectamos y al que vemos en forma de depósitos difusos sobretodo en las ratas tratadas con agentes prooxidantes junto al A $\beta$ . En modelos murinos se ha observado que el péptido betamiloide soluble puede producir deterioro cognitivo dañando la plasticidad sináptica e interfiriendo con la LTP (Ferreira et al., 2007). La presencia de placas neuríticas tampoco garantiza

el desarrollo de la enfermedad porque se han encontrado placas en el cerebro de ancianos sanos. Hay una relación entre el péptido betamiloide extracelular fibrilar que formaría las placas neuríticas y el péptido intraneuronal. En modelos murinos como el triple transgénico (3xTgAD) se ha descrito que primero aparece el péptido intraneuronal con presencia de deterioro cognitivo, y que a medida que envejece el animal el péptido intraneuronal disminuye mientras que aumenta el péptido betamiloide extracelular y los daños cognitivos se agravan. Diversos estudios señalan que estas dos formas del péptido betamiloide están relacionadas, y que la disminución del A $\beta$  intraneuronal no parece deberse a la disminución del número de neuronas, ni a una desigual sensibilidad de los anticuerpos por el betamiloide intracelular, sino a un aumento del péptido betamiloide total del cerebro (Oddo et al., 2006). Este aumento de betamiloide puede ser debido a un cambio en la relación entre la producción del péptido y su degradación, ya que se ha confirmado una disminución de los enzimas que degradan el A $\beta$ , como la enzima de degradación de la insulina (IDE de *insulin degrading enzyme*) y la neprilisina (Oddo et al., 2006).

En nuestro modelo de la EA no hemos observado muerte neuronal ni astrocitaria, lo que ya esperábamos porque se ha descrito que el péptido betamiloide sólo causa muerte neuronal si es intraneuronal, y en los astrocitos no causa muerte *in vitro* ni aplicado intracelular ni extracelularmente (Zhang et al., 2002; Li et al., 2007).

En nuestros estudios histopatológicos en este modelo de EA hemos visto precipitados de hierro, activación glial, daño oxidativo del DNA y proteínas ubiquitinadas en neuronas de la corteza y del hipocampo de los grupos tratados con A $\beta$  en condiciones prooxidantes, sobretudo en el grupo tratado con A $\beta$ 40 +A $\beta$ 42. Esto nos sugiere que el A $\beta$  altera de manera más tóxica a las células cerebrales, tanto neuronas, astrocitos como microglía, bajo condiciones prooxidantes que en condiciones normales. Además concluimos que el daño de estas células es importante afectando a su metabolismo y actividad funcional actuando a nivel del núcleo y la degradación proteica.

Todos estos datos nos indican junto a otros datos de la literatura que las terapias que nos permitan disminuir el estrés oxidativo en la EA, como es el tratamiento con antioxidantes y quelantes de metales como el hierro (Cole et al., 2005; Reddy et al., 2009), pueden contribuir a una menor toxicidad del péptido betamiloide y llevar a una mejoría cognitiva en los pacientes con EA.

Los astrocitos son esenciales para mantener el cerebro sano y funcional, y cuando se activan lo ayudan a recuperarse frente a daños patológicos producidos durante enfermedades neurodegenerativas como la EA. Las células gliales son importantes para eliminar el péptido betamiloide y ayudar al correcto funcionamiento cerebral. Recientemente se ha sugerido en la literatura que cambios en los procesos de división glial durante el envejecimiento pueden participar en la patogénesis de la EA (Farfara et al., 2008). Debido a que los astrocitos son unas

células muy abundantes en el cerebro y a su continua regeneración durante la vida del hombre hacen de estas células una diana terapéutica ideal para las enfermedades neurodegenerativas. La base para una terapia con éxito contra estas enfermedades depende de entender la interacción neurona-glía (Farfara et al., 2008).

Actualmente la búsqueda de estrategias terapéuticas para favorecer un envejecimiento saludable es de gran interés para las autoridades Europeas. No es cuestión de curar el envejecimiento sino de evitar que se haga patológico. Desde hace tiempo nuestro grupo está interesado en buscar estrategias preventivas del envejecimiento patológico y de la EA. A partir de los resultados descritos en esta tesis se han iniciado en nuestro laboratorio estudios de terapias preventivas con idea de reducir/evitar el estrés oxidativo y mejorar la generación de factores neurotróficos. Hemos iniciado estudios de restricción calórica in vitro que disminuyen la actividad mitocondrial haciéndola más eficiente disminuyendo el consumo de oxígeno y por tanto la producción de ROS. Además, se están realizando estudios de ejercicio voluntario en animales triple transgénicos 3xTgAD con el fin de aumentar los niveles de factores neurotróficos, reducir los niveles de péptido betamieloide y mejorar el estado oxidativo cerebral.

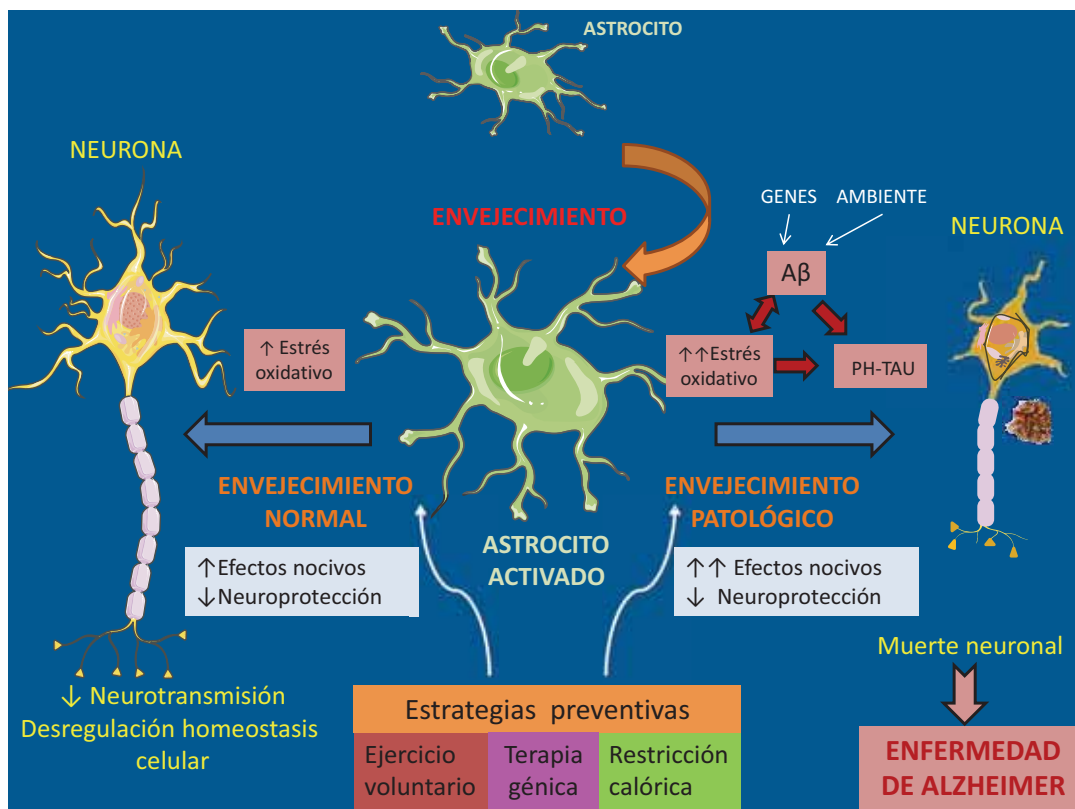


Figura 56. Alteraciones de los astrocitos en el envejecimiento y en la enfermedad de Alzheimer. S García-Matas.

En la figura 56 se resume lo más destacado que hemos mostrado en esta tesis. Los astrocitos con la edad experimentan una serie de alteraciones como son la astrogliosis, el aumento de generación de ROS, y la desregulación de las defensas antioxidantes y anticitotóxicas que conllevan una menor neuroprotección y un efecto nocivo sobre las neuronas. En condiciones normales, las neuronas durante el envejecimiento padecen una menor capacidad de neurotransmisión y desregulación de la homeostasis celular pero continúan siendo funcionales. En el envejecimiento cuando hay un gran nivel de estrés oxidativo este puede llegar a ser patológico. En el caso de la enfermedad de Alzheimer, ya sea por causas genéticas o ambientales, la mayor generación de péptido betamiloide en condiciones de estrés oxidativo incrementa el efecto nocivo del A $\beta$  generando más ROS e incrementando la patología de TAU. Todo ello conduce a una alteración de la funcionalidad astrocitaria y neuronal llevando incluso a la muerte neuronal y a dañar irreversiblemente el cerebro del enfermo. En nuestro grupo estamos estudiando terapias preventivas para combatir el envejecimiento patológico como son la restricción calórica, el ejercicio voluntario y la terapia génica.



# CONCLUSIONES

---

---

## CONCLUSIONES

---

---

1. Los astrocitos de rata cultivados 90 DIV adquieren características de senescencia y activación similares a las observadas en los astrocitos de animales viejos. Además presentan un incremento de la generación de ROS y alteración de las defensas antioxidantes, lo cual aumenta el estrés oxidativo celular y disminuye la funcionalidad mitocondrial.
2. Los astrocitos de los ratones SAMP8 generan una mayor cantidad de ROS que los de SAMR1. Esto conduce a la oxidación de los lípidos y de las proteínas ocasionando a su vez cambios que se traducen en una menor actividad mitocondrial y una mayor fosforilación de tau. Las alteraciones observadas en cultivo son similares a las detectadas en los cerebros de estos ratones a los 5 meses de edad.
3. Los astrocitos de rata cultivados 90 DIV y los de ratones SAMP8 sufren cambios en la captación de glutamato que pueden potenciar la excitotoxicidad neuronal en los procesos neurodegenerativos. Ambos tipos de astrocitos pierden parcialmente su capacidad neuroprotectora. Así, la senescencia astrocitaria in vivo podría contribuir a aumentar el daño neuronal en los procesos neurodegenerativos asociados con la edad.
4. La expresión de GDNF en los astrocitos de la zona CA1 del hipocampo aumenta la capacidad cognitiva de las ratas viejas deficientes hasta niveles cercanos a las no deficientes. El GDNF incrementa los niveles locales de neurotransmisores serotonina, dopamina y acetilcolina, posiblemente responsables de la mejora cognitiva observada en las ratas viejas.
5. El GDNF podría ser un buen candidato para la terapia génica en enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento como la enfermedad de Alzheimer. En nuestro estudio, el vector lentiviral utilizado para sobreexpresar GDNF ha resultado de gran eficacia y bien tolerado.
6. Los astrocitos humanos en cultivo tratados con el péptido betamieloide presentan una mayor activación en condiciones prooxidantes con hierro reactivo e inhibición de la síntesis de glutatión. El tratamiento combinado produce una marcada respuesta inflamatoria y de estrés oxidativo.
7. En nuestro modelo de rata inyectada con betamieloide icv, el tratamiento prooxidante potencia el efecto del péptido sobre la activación glial y la disfunción neuronal. Como consecuencia aumenta el deterioro cognitivo a largo plazo. Las alteraciones crónicas de inflamación y estrés oxidativo en los astrocitos en el envejecimiento pueden contribuir al proceso neurodegenerativo de la enfermedad de Alzheimer.

# BIBLIOGRAFÍA

---

---

## BIBLIOGRAFÍA

---

### A

- Abad MA, Enguita M, DeGregorio-Rocasolano N, Ferrer I, Trullas R.(2006) Neuronal pentraxin 1 contributes to the neuronal damage evoked by amyloid-beta and is overexpressed in dystrophic neurites in Alzheimer's brain.. *J Neurosci.* **26** (49), 12735-12747
- Abbas AK, Murphy KM, Sher A. (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383** (6603), 787-793.
- Abbott NJ, Ronback L, Hansson E. (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* **7**, 41-53.
- Abraha, A., Ghoshal, N., Gamblin, T. C., Cryns, V., Berry, R. W., Kuret, J. & Binder, L. I. (2000) C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease. *J Cell Sci.* **113** Pt 21, 3737-3745.
- Abramov AY, Canevari L, Duchen MR.(2004) Calcium signals induced by amyloid beta peptide and their consequences in neurons and astrocytes in culture. *Biochim Biophys Acta.* **1742** (1-3), 81-87.
- Ahmed OJ, McFarland J, Kumar A. (2008) Reactivation in ventral striatum during hippocampal ripples, evidence for the binding of reward and spatial memories? *J Neurosci.* **28** (40), 9895-9897.
- Aksenova MV, Aksenov MY, Carney JM, Butterfield DA.(1998) Protein oxidation and enzyme activity decline in old brown Norway rats are reduced by dietary restriction. *Mech Ageing Dev.* **100** (2),157-68.
- Alberca R, López-Pousa S. Enfermedad de Alzheimer y otras demencias. 2006. 3ªedición. Editorial médica Panamericana. Madrid.
- Alcaraz Romero VM. Estructura y función del sistema nerviosorecepción sensoral y estados del organismo. México, Editorial El Manual Moderno, 2000 p. 57-58.
- Ak T, Gülçin I. (2008). Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem Biol Interact.* **174** (1), 27-37.
- Allen S, Dawbarn D. (2006). Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors. *Clin Sci* **110**, 175-191.
- Aloisi F. Cytokine production In, Kettenmann, H, Ramsom,B, eds Neuroglia. Oxford, Oxford university Press; 2005 pp. 285-301.
- Aloisi F, Ria F, Adorini L. (2000). Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells, different roles for microglia and astrocytes *Immunol Today* **21**(3),141-147.

- Alvarez, G., Munoz-Montano, J. R., Satrustegui, J., Avila, J., Bogonez, E. & Diaz-Nido, J. (1999). Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Lett* **453**, 260-264.
- 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**(1), 43-52.
- Alzheimer C, Werner S. (2002) Fibroblast growth factors and neuroprotection. *Adv Exp Med Biol*. **513**, 335-351.
- Amaral D & Witter M. Hippocampal formation. In, Paxinos G, ed. The rat nervous system. San Diego, Academic Press, 1995, pp. 443-492.
- Ames A. 3d, Li YY, Heher Ec, Kimble CR.(1992). Energy metabolism of rabbit retina as related to function, high cost of Na<sup>+</sup> transport. *J Neurosci*. **12**, 840-853.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM.(1995) Mitochondrial decay in aging. *Biochim Biophys Acta*.**1271** (1), 165-170.
- Anderton BHD. Changes in the ageing brain in health and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1997; **352**, 1781-92.
- Anderson JM, Hubbard BM, Coghill GR, Slidders W.(1983) The effect of advanced old age on the neurone content of the cerebral cortex. Observations with an automatic image analyser point counting method. *J Neurol Sci*. **58**, 235-246.
- Anderson CM, Swanson RA. (2000) Astrocyte glutamate transport, review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* **32**(1), 1-14.
- Antier, D., Carswell, H.V., Brosnan, M.J., Hamilton, C.A., Macrae, I.M., Groves, S., Jardine, E., Reid, J.L. and Dominiczak, A.E. 2004. Increased levels of superoxide in brains from old female rats. *Free Radic. Res*. **38**, 177–183.
- Argüelles S, Machado A, Ayala A.(2007). 'In vitro' protective effect of a hydrophilic vitamin E analogue on the decrease in levels of elongation factor 2 in conditions of oxidative stress. *Gerontology* **53**(5),282-288.
- Arranz Santamaría , LC. 2000. [.//www.saludalia.com/Saludalia/web\\_saludalia/tu\\_salud/doc/anciano/doc/que\\_es\\_envejecer.htm](http://www.saludalia.com/Saludalia/web_saludalia/tu_salud/doc/anciano/doc/que_es_envejecer.htm) .
- Arrasate, M., Perez, M. & Avila, J. (2000). Tau dephosphorylation at tau-1 site correlates with its association to cell membrane. *Neurochem Res*. **25**, 43-50.
- Arriagada, P. V., Growdon, J. H., Hedley-Whyte, E. T. & Hyman, B. T. (1992). Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* **42**, 631-639.
- Aruoma OI, Evans PJ, Kaur H, Sutcliffe L, Halliwell B. 1990. An evaluation of the antioxidant and potential pro-oxidant properties of food additives and of trolox C, vitamin E, probucol. *Free Radic Res Commun*. **10**, 143–157.

- Astur, R.S., Taylor, L. B., Mamelak, A.N., Philpott, L., Sutherland, R.J. (2002). Humans with hippocampus damage display severe spatial memory impairments in a virtual Morris water task. *Behav Brain Res.* **132**, 77-84.
- Atzori, C., Ghetti, B., Piva, R., Srinivasan, A. N., Zolo, P., Delisle, M. B., Mirra, S. S. & Migheli, A.(2001). Activation of the JNK/p38 pathway occurs in diseases characterized by tau protein pathology and is related to tau phosphorylation but not to apoptosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* **60**, 1190-1197.
- Aubert G, Lansdorp PM. (2008). Telomeres and aging. *Physiol Rev.* **88**(2), 557-579.
- Auer RN. (1991) Excitotoxic mechanisms, and age-related susceptibility to brain damage in ischemia, hypoglycemia and toxic mussel poisoning. *Neurotoxicology* **12**, 541-546.
- Avila J, Hernández F. (2007) GSK-3 inhibitors for Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother.* **7**(11),1527-1533

## B

- Balleza-Tapia H, Peña F. (2009) Pharmacology of the intracellular pathways activated by amyloid beta protein. *Mini Rev Med Chem.* **9** (6):724-40.
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. (2005). Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell.* **120**, 483–495.
- Bannerman DM, Yee BK, Lemaire M, Wilbrecht L, Jarrard L, Iversen SD, Rawlins JN, Goog MA. (2001) The role of the entorhinal cortex in two forms of spatial learning and memory. *Exp Brain Res.* **141**, 281-303.
- Bannister LH, Berry MM, Collins P, Dyson M, Dussek JE, Ferguson MWJ. Anatomía de Gray. 38<sup>th</sup> edition. Harcourt Brace. 1998.
- Barja, G, Cadenas S, Rojas C, Pérez-Campo R, LopezTorres M. (1994) Low mitochondrial free radical production per unit O2 consumption can explain the simultaneous presence of highlongevity and high aerobic metabolic rate in birds. *Free Rad. Res.* **21**,317 – 328.
- Barnes CA. (1998) Memory changes during normal aging, neurobiological correlates. En, Martínez, Jr. JL, Kesner P. Neurobiology of learning and memory. Academic Press, California, pp. 247-287.
- Barranco-Quintana JL, Allam MF, Del Castillo AS, Navajas RF.(2005). Risk factors for Alzheimer's disease. *Rev Neurol.* **40**(10), 613-618.
- Bartolini M, Bertucci C, Cavrini V, Andrisano V. (2003) b-amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase, inhibition studies. *Biochem Pharmacol.* **65**, 407–416
- Bartus RT. (2000) On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies, lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp Neurol.* **163**, 495-529.

- Bartus RT, Dean RL, Beer B, Lippa AS. (1982) The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* **217**, 408-14.
- Baudier J, Lee SH, Cole RD. (1987). Separation of the different microtubule-associated tau protein species from bovine brain and their mode II phosphorylation by Ca<sup>2+</sup>/phospholipiddependent protein kinase C. *J Biol Chem* **262**, 17584-17590.
- Beckman, J.S. (1994) Peroxynitrite versus hydroxyl radical, the role of nitric oxide in superoxide-dependent cerebral injury. *Ann N.Y. Acad Sci.* **738**, 69-75.
- Behrstock S, Svendsen CN. (2004) Combining growth factors, stem cells, and gene therapy for the aging brain. *Ann N Y Acad Sci.* **1019**, 5-14.
- Benarroch EE. (2005) Neuron-astrocyte interactions, partnership for normal function and disease in the central nervous system. *Mayo Clin Proc.* **80** (10), 1326-1338.
- Benhamou S. (1997). Path integration by swimming rats. *Animal Behav.* **54**, 321-327.
- Benzi, G. and Moretti A. (1995). "Age and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system." *Free Rad Biol Med.* **19** (1), 77-101.
- Bernal MC, Vicens P, Carrasco MC, Redolat R. (1999) Effects of nicotine on spatial learning in C57BL mice. *Behav Pharmacol.* **10**, 333-336.
- Biesalski HK. (2002) Free radical theory of aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* **5** (1), 1-3.
- Biessels GJ, Kappelle LJ; Utrecht Diabetic Encephalopathy Study Group.(2005). Increased risk of Alzheimer's disease in Type II diabetes, insulin resistance of the brain or insulin-induced amyloid pathology? *Biochem Soc Trans.* **33**(Pt 5), 1041-1044.
- Bindokas VP, Jordan J, Lee CC, Miller RJ. (1996) Superoxide production in rat hippocampal neurons, selective iaging with hydroethidine. *J Neurosci.* **16**, 1324-1336.
- Bird TD. (2008). Genetic aspects of Alzheimer disease. *Genet Med.* **10** (4), 231-239.
- Blasko I, Stampfer-Kountchev M, Robatscher P, Veerhuis R, Eikelenboom P, Grubeck Loebenstein B.(2004) How chronic inflammation affectsthe brain and supports the development of Alzheimer's disease in old age, the role of microglia and astrocytes. *Aging Cell* **3**, 169-176.
- Bodaness,R.S.(1982) The potential role of NADPH and cytoplasmic NADP-linked dehydrogenases in protection against single oxygen-mediated cellular toxicity. *Biochem biophys Res Commun.* **108**, 1709-1715.
- Bokov A, Chaudhuri A, Richardson A. (2004) The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech Ageing Dev.* **125** (10-11), 811-826.
- Boonman Z, Isacson O. (1999) Apoptosis in neuronal development and transplantation, role of caspases and trophic factors. *Exp Neurol.* **156**, 1-15.

- Boveris A, Navarro A. (2008) Brain mitochondrial dysfunction in aging. *IUBMB Life*. **60** (5), 308-314.
- Bowman CC, Rasley A, Tranguch SL, Marriott I. (2003). Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. *Glia* **43**(3), 281-291.
- Bozner P, Grishko V, LeDoux SP, Wilson GL, Chyan YC, Pappolla MA. (1997) The amyloid beta protein induces oxidative damage of mitochondrial DNA. *J Neuropathol Exp Neurol*. **56**, 1356-1362.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- 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.
- Braugher JM, Hall ED. (1989) Central nervous system trauma and stroke. I. Biochemical considerations for oxygen radical formation and lipid peroxidation. *Free Rad Biol Med*. **6**, 289-301.
- Breen AP, Murphy JA. (1995) Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Rad Biol Med*. **18**, 1033-1077.
- Brunk UT, Terman A. (2002) The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging. Accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur J Biochem*. **269**, 1996–2002.
- Buee-Scherrer V, Goedert M. (2002). Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases in intact cells. *FEBS Lett*. **515**, 151-154.
- Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, Greenberg ME.(2004) Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science*. **303** (5666), 2011-2015.
- Brunk, UT, Terman A. (2002) Lipofuscin, mechanism of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic Biol Med*. **33**, 611-619.
- Buchholz J N, Behringer E J, Pottorf WJ, Pearce W J, Vanterpool CK. (2007) Age-dependent changes in Ca<sup>2+</sup> homeostasis in peripheral neurones, implications for changes in function. *Aging Cell* **6**, 285–296.
- Bueé, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A. & Hof, P. R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev*. **33**, 95-130.
- Burgess N. (2008) Spatial cognition and the brain. *Ann N Y Acad Sci*. **1124**, 77-97.
- Burnet FM. (1970) “An immunological approach to ageing”. *Lancet*. **2** (7668), 358-360.
- Bustamante J, Czerniczyniec A, Cymeryng C, Lores-Arnaiz S.(2008) Age related changes from youth to adulthood in rat brain cortex, nitric oxide synthase and mitochondrial respiratory function. *Neurochem Res*. **33**(7),1216-1223.



Butterfield D. A., Abdul, H. M., Opii, W., Newman, S. F., Joshi, G., Ansari, M. A. & Sultana, R. (2006). Pin1 in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **98**, 1697-1706.

Butterfield DA, Howard BJ, Yatin S, Allen KL, Carney JM. (1997) Free radical oxidation of brain proteins in accelerated senescence and its modulation by N-tert-butyl-alpha-phenylnitron. *Proc Natl Acad Sci USA* **94** (2), 674–678.

Butterfield DA, Stadtman ER. (1997) Protein oxidation processes in aging brain. *Adv Cell Aging Gerontol.* **2**, 161 – 191.

## C

Cacabelos R, Alvarez XA, Fernandez-Novoa L, Franco A, Manges R, Pellicer A. (1994) Brain interleukin-1 beta in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* **16** (2), 141-151.

Cafe C, Torri C, Bertorelli L, Angeretti N, Lucca E, Forloni G. (1996) Oxidative stress after acute and chronic application of beta-amyloid fragment 25-35 in cortical cultures. *Neurosci Lett.* **203**, 61-65.

Cain, D.P. (1998). Testing the NMDA, long-term potentiation, and cholinergic hypotheses of spatial learning. *Neurosci Biobehav Rev.* **22**, 181-193.

Cakatay U, Telci A, Kayali R, Tekeli F, Akçay T, Sivas A.(2001) Relation of oxidative protein damage and nitrotyrosine levels in the aging rat brain. *Exp Gerontol.* **36**(2), 221-229.

Calabrese V, Scapagnini G, Ravagna A, Colombrita C, Spadaro F, Butterfield DA, Giuffrida Stella AM. (2004). Increased expression of heat shock proteins in rat brain during aging, relationship with mitochondrial function and glutathione redox state. *Mech Ageing Develop.* **125**, 325–335.

Calton JL, Taube JS. (2009). Where am I and how will I get there from here? A role for posterior parietal cortex in the integration of spatial information and route planning. *Neurobiol Learn Mem.* **91** (2), 186-196.

Canevari L, Abramov AY, Duchon MR. (2004) Toxicity of amyloid beta peptide, tales of calcium, mitochondria, and oxidative stress. *Neurochem Res.* **29** (3), 637-650.

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** (12),1300-4.

Canzoniero LM, Snider BJ. (2005). Calcium in Alzheimer's disease pathogenesis, too much, too little or in the wrong place? *J Alzheimers Dis.* **8** (2), 147-154

Caramanos Z, Shapiro ML. (1994) Spatial memory and N-Methyl-D-Aspartate receptor antagonists APV and MK-801, memory impairments depend on familiarity with the environment, drug dose, and training duration. *Behav Neurosci.* **108**, 30-43.

Caruso C, Candore G, Romano GC, Lio D, Bonafè M, Valensin S, Franceschi C. (2001) Immunogenetics of longevity. Is major histocompatibility complex polymorphism relevant to the control of human longevity? A review of literature data. *Mech Ageing Dev.* **122**, 445 – 462.

- Casanova-Sotolongo P, Casanova-Carrillo P, Casanova-Carrillo C. (2004). La memoria. Introducción al estudio de los trastornos cognitivos en el envejecimiento normal y patológico. *Rev Neurol.* **38** (5), 469-472.
- Cashman JR, Ghirmai S, Abel KJ, Fiala M.(2008). Immune defects in Alzheimer's disease, new medications development. *BMC Neurosci.* **9** Suppl 2, S13.
- Carney JM, Smith CD, Carney AM, Butterfield DA. (1994). Aging and oxygen-induced modifications in brain biochemistry and behavior. *AnnNY Acad Sci.* **738**, 44-53.
- Cassarino DS, Bennett JP Jr. (1999) An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases, mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. *Brain Res Rev.* **29**, 1-25.
- Chae HZ, Kim HJ, Kang SW, Rhee SG. (1999) Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes Res Clin Pract.* **45** (2-3), 101-112.
- Chakraborti T, Das S, Mondal M, Roychoudhury S, Chakraborti S. (1999) Oxidant, mitochondria and calcium. *Cell signal* **11**,77-85.
- Chamizo VD, Manteiga RD, Rodrigo T, Mackintosh NJ. (2006) Competition between landmarks in spatial learning, the role of proximity to the goal. *Behav Process.* **71** (1), 59–65.
- Chan, A.C.(1993) Partners in defense, vitamin E and vitamin C. *Can J Physiol Pharmac.* **71**, 725-731.
- Chen LW, Zhang JP, Kwok-Yan Shum D, Chan YS. (2006) Localization of nerve growth factor, neurotrophin-3, and glial cell line-derived neurotrophic factor in nestin-expressing reactive astrocytes in the caudate-putamen of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated C57/Bl mice. *J Comp Neurol.* **497** (6), 898-909.
- Chen Y, Swanson RA. (2003) Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* **23**, 137-149.
- Chesler M, Kaila K. (1992) Modulation of pH by neuronal activity. *Trends Neurosci.* **15** (10), 396-402.
- Cho Y, Giese KP, Tanila FP, Silva AJ, Eichembaum J. (1998). Unstable hippocampal spatial representations in aCaMKII $\alpha$ 286A point mutant and CREB knockout mice. *Science* **279**, 867-870.
- Cho J H, Johnson G V. (2003) Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  phosphorylates tau at both primed and unprimed sites. Differential impact on microtubule binding. *J Biol Chem.* **278**, 187-193.
- Cho J, Sharp PE. (2001) Head direction, place, and movement correlates for cells in the rat retrosplenial cortex. *Behav Neurosci.* **115**, 3-25.
- Choi-Lundberg DL, Lin Q, Chang YN, Chiang YL, Hay CM, Mohajeri H, Davidson BL, Bohn MC.(1997) Dopaminergic neurons protected from degeneration by GDNF gene therapy. *Science* **277** (5324), 389-390.

- Cini M, Moretti A. (1995) Studies on lipid peroxidation and protein oxidation in the aging brain. *Neurobiol Aging* **16** (1), 53–57.
- Citron M. (2004) Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* **5** (9), 677-685.
- Clarris, H. J., Cappai, R., Heffernan, D., Beyreuther, K., Masters, C. L. & Small, D. H. (1997). Identification of heparin-binding domains in the amyloid precursor protein of Alzheimer's disease by deletion mutagenesis and peptide mapping. *J Neurochem* **68**, 1164-1172.
- Cohen P, Cohen P T. (1989) Protein phosphatases come of age. *J Biol Chem.* **264**, 21435-21438.
- Cohen NJ, Eichenbaum H. Memory, Amnesia, and the Hippocampal System. Cambridge, MA, MIT Press, 1993.
- Cohen NJ, Squire LR. (1980). Preserved learning and retention of pattern analyzing skill in amnesia, dissociation of knowing how and knowing that. *Science* **210**, 207-210.
- Cole GM, Lim GP, Yang F, Teter B, Begum A, Ma Q, Harris-White ME, Frautschy SA. (2005) Prevention of Alzheimer's disease, Omega-3 fatty acid and phenolic anti-oxidant interventions. *Neurobiol Aging.* **26** Suppl 1,133-136.
- Conway,E.L. (1998) Brain lesions and delayed water maze learning déficits after intracerebroventricular spermine. *Brain Research.* **800**, 10-20.
- Corbisier, P. and Remacle, J. (1990). "Involvement of mitochondria in cell degeneration." *European J Cell Biol.* **51**, 173-182.
- Correas I, Diaz-Nido J, Avila J. (1992). Microtubule-associated protein tau is phosphorylated by protein kinase C on its tubulin binding domain. *J Biol Chem.* **267**, 15721-15728.
- Cotzias GC, Miller ST, Tang LC, Papavasiliou PS. (1977) Levodopa, fertility, and longevity. *Science* **196**, 549 – 551.
- Craft S. (2007) Insulin resistance and Alzheimer's disease pathogenesis, potential mechanisms and implications for treatment. *Curr Alzheimer Res.* **4** (2),147-152.
- Craufurd D, Neary D, Owen F, Oostra BA, Hardy J, Goate A, van Swieten J, Mann D, Lynch T, Heutink P. (1998) Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature.* **393** (6686), 702-705.
- Cressant A, Muller RU, Poucet B. (1997). Failure of centrally placed objects to control the firing fields of hippocampal place cells. *J Neurosci.* **17**, 2531-2542.
- Cummings J L. (2004) Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* **351**, 56-67.
- Cruz J C, Tseng HC, Goldman J A, Shih H, Tsai LH. (2003) Aberrant Cdk5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles. *Neuron* **40**, 471-483. ,
- Connor B, Dragunow M. (1998). The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Res Brain Res Rev.* **27** (1), 1-39.
- Cummings JL (2004). Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* **351** (1), 56-67.

- Cummings BJ, Pike CJ, Shankle R, Cotman CW. (1996). Beta-amyloid deposition and other measures of neuropathology predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **17**, 921–933.
- Cutler RG. (1975) Evolution of human longevity and the genetic complexity governing aging rate. *Proc Natl Acad Sci.* **72**, 4664-4668
- Cutler RG. (1991) Recent progress in testing the longevity determinant and dysdifferentiation hypotheses of aging. *Arch Gerontol Geriatr* **12**, 75-98. .
- Czech C, Tremp G, Pradier L. (2000) Presenilins and Alzheimer's disease, biological functions and pathogenic mechanisms. *Prog Neurobiol.* **60** (4), 363-384.

## D

- Dabir DV, Robinson MB, Swanson E, Zhang B, Trojanowski JQ, Lee VM, Forman MS. (2006) Impaired glutamate transport in a mouse model of tau pathology in astrocytes. *J Neurosci.* **26** (2), 644-654.
- Damjanac M, Rioux Bilan A, Barrier L, Pontcharraud R, Anne C, Hugon J, Page G. (2007) Fluoro-Jade B staining as useful tool to identify activated microglia and astrocytes in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *Brain Res.* **21128** (1), 40-49.
- Danbolt NC. (2001). Glutamate uptake. *Prog Neurobiol.* 65,1-105.
- Dani SU, Horia A, Walter GF. (1997) Principles of neural aging. Elsevier. Amsterdam.
- Davies KLA. (1987) Protein damage and degeneration by oxygen radicals. *J Biol Chem.* **262**, 9895-9901.
- Dawson TM, Snyder SH. (1994) Gases as biological messengers, nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci.* **14**, 5147-5159.
- Dawson R Jr, Wallace D R, Meldrum MJ. (1989) Endogenous glutamate release from frontal cortex of adult and aged rats. *Neurobiol Aging* **10**, 665–668.
- Dean RT, Gieseg S, Davies MJ. (1993) Reactive oxygen species and their accumulation on radical-damage proteins. *Trends Biochem Sci.* **18**, 437-441.
- Deby C, Goutier R. (1990) New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases. *Biochem Pharmac.* **39**, 399-405.
- Dei R, Takeda A, Niwa H, Li M, Nakagomi Y, Watanabe M, Inagaki T, Washimi Y, Yasuda Y, Horie K, Miyata T, Sobue G.(2002). Lipid peroxidation and advanced glycation end products in the brain in normal aging and in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **104** (2), 113-122.
- Deisseroth K, Mermelstein P, Xia H, Tsien RW. (2003). Signaling from synapse to nucleus, the logic behind the mechanisms. *Curr Opin in Neurobiol.* **13** (3), 354-365.
- Deitmer JW. (2001) Strategies for metabolic exchange between glial cells and neurons. *Respir Physiol.* **129**, 71-81.

- Delacourte A, Sergeant N, Wattez A, Maurage CA, Lebert F, Pasquier F, David JP. (2002 ) Tau aggregation in the hippocampal formation, an ageing or a pathological process? *Exp Gerontol.* **37**, 1291–1296.
- Delacourte A. (2005) Tauopathies, recent insights into old diseases. *Folia Neuropathol.* **43** (4), 244-257
- De la Vega R, Zambrano A. (2007) La circunvalación del hipocampo. <http://www.hipocampo.org/memoria.asp>.
- Desagher S, Glowinski J, Premont J. (1996) Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *J Neurosci.* **16**, 2553-2562.
- Devan BD, Goad EH, Petri HL. (1996) Dissociation of hippocampal and striatal contributions to spatial navigation in the water maze. *Neurobiol Learn Mem.* **66**, 305-323.
- Devany KO, Jhonson HA. (1980) Neuron loss in the aging visual cortex of man. *J Gerontol.* **35**, 836-841.
- Devi SA, Kiran TR. (2004) Regional responses in antioxidant system to exercise training and dietary Vitamin E in aging rat brain. *Neurobiol Aging* **25**, 501–508.
- DeWitt DA, Perry G, Cohen M, Doller C, Silver J. (1998). Astrocytes regulate microglial phagocytosis of senile plaque cores of Alzheimer’s disease. *Exp Neurol.* **149**, 329–40.
- D’Hooge R, de Deyn PP. (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Rev.* **36**, 60-90.
- DiClerio Miranda M, De Bruin VM, Vale MR, Viana GS. (2000) Lipid peroxidation and nitrite plus nitrate levels in brain tissue from patients with Alzheimer’s disease. *Gerontology* **46**, 179-84.
- Dice JF. (1985) Cellular theories of aging as related to the liver. *Hepatology* **5**, 508-513.
- Díez-Vives C., Gay M., García-Matas S., Comellas F., Carrascal M., Abian J., Ortega A., Cristòfol R., Sanfeliu C. (2009) Proteomic study of neuron and astrocyte cultures from senescence-accelerated mouse SAMP8 reveals degenerative changes. *J Neurochem.* **111**, 945-955.
- Dilla CJ, Tappel AL. (1984) “Fluorescent damage products of lipid peroxidation”. *Methods Enzymol.* **105**, 337-341.
- Dimascio P. Bechara, E.J.H. (1989) Dynamic morphological responses of mouse astrocytes in primary cultures following médium changes. *Glia* **2**, 266-272.
- Dong Y, Benveniste EN. (2001). Immune function of astrocytes. *Glia* **36** (2), 180-90.
- 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.
- Drewes, G., Ebneith, A., Preuss, U., Mandelkow, E. M. & Mandelkow, E. (1997). MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* **89**, 297-308.
- Dringen R. (2000) Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol.* **62**, 649-671

- Drubin DG, Kirschner MW (1986) Tau protein function in living cells. *J Cell Biol.* **103**, 2739-2746.
- Duan S, Anderson CM, Stein B A, Swanson RA. (1999) Glutamate induces rapid upregulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST. *J Neurosci.* **23**, 10 193–200.
- Dumont M, Lalonde R, Ghersi-Egea JF, Fukuchi K, Strazielle C.(2006). Regional acetylcholinesterase activity and its correlation with behavioral performances in 15-month old transgenic mice expressing the human C99 fragment of APP. *J Neural Transm.* **113** (9), 1225-41.
- Duyckaerts, C., Dickson, DW. Neuropathology of Alzheimer's disease. En, Dickson DW (Ed.) Neurodegeneration, The molecular pathology of dementia and movement disorders. Basel, ISN Neuropath Press 2003; 47-65.

## E

- Edwards MM, Robinson SR. (2006) TNF alpha affects the expression of GFAP and S100B, implications for Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* **113**, 1709–1715.
- Ehrenbrink G, Hakenhaar FS, Salomon TB, Petrucci AP, Sandri MR, Benfato MS.(2006) Antioxidant enzymes activities and protein damage in rat brain of both sexes. *Exp Gerontol.* **41** (4), 368-371
- Eichenbaum H. (2001) The hippocampus and declarative memory, cognitive mechanisms and neural codes. *Behav Brain Res.* **127**,199-207.
- Eichenbaum H. (1999) The hippocampus and mechanisms of declarative memory. *Behav Brain Res.* **103**, 123-133.
- Eichenbaum H, Dudchenko P, Wood E, Shapiro M, Tanila H. (1999) The hippocampus, memory and place cells, is it spatial memory or memory space? *Neuron* **23**, 209-226.
- Eichenbaum H, Otto T, Cohen NJ. (1992) The hippocampus- What does it do? *Behav Neural Biol.* **57** (1), 2-36.
- Ejarque-Ortiz A, Medina MG, Tusell JM, Pérez-González AP, Serratos J, Saura J. (2007) Upregulation of CCAAT/enhancer binding protein beta in activated astrocytes and microglia. *Glia* **55** (2), 178-188.
- Eng L, Ghirnikar R, Lee Y. (2000) Glial fibrillary acidic protein, GFAP-thirty-one years (1969-2000) *Neurochem Res.* **25**, 1439-1451.
- Eng L, Ling LeeY. Cytoskeletal proteins in astroglia. In: Kettenmann,H., Ramsom, B, eds Neuroglia. Oxford, Oxford University Press, 2005. 240-250.
- Engel T, Lucas J J, Gomez-Ramos P, Moran MA, Avila J, Hernandez F. (2006). Coexpression of FTDP-17 tau and GSK-3beta in transgenic mice induce tau polymerization and neurodegeneration. *Neurobiol Aging* **27**, 1258-1268.

Ericson C, Georgievska B, Lundberg C. (2005) Ex vivo gene delivery of GDNF using primary astrocytes transduced with a lentiviral vector provides neuroprotection in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci.* **22** (11), 2755-2764.

Esiri .(2007) Ageing and the brain. *J Pathol.* **211**, 181-187.

## F

Farfara D, Lifshitz V, Frenkel D. (2008) Neuroprotective and neurotoxic properties of glial cells in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med.* **12** (3), 762-780.

Farina C, Aloisi F, Meinl E. (2007). Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immuno.* **28** (3), 138-145.

Farooqui AA, Horrocks LA. (1991) Excitatory amino acid receptors, neural membrane phospholipid metabolism and neurological disorders. *Brain Res Brain Res Rev.* **16**, 171-191.

Farooqui AA, Ong WY, Lu XR, Halliwell B, Horrocks LA. (2001) Neurochemical consequences of kainate-induced toxicity in brain, involvement of arachidonic acid release and prevention of toxicity by phospholipase A(2) inhibitors. *Brain Res Brain Res Rev.* **38**, 61-78.

Fauconneau B., Petegnief V., Sanfeliu C., Piriou A. and Planas A. M. (2002) Induction of heat shock proteins (HSPs) by sodium arsenite in cultured astrocytes and reduction of hydrogen peroxide-induced cell death. *J Neurochem.* **83**, 1338–1348.

Fedele E, Raiteri M. (1999) In vivo studies of the cerebral glutamate receptor/NO/cGMP pathway. *Prog Neurobiol.* **58**, 89-120.

Ferbeyre G, Lowe SW. (2002) The price of tumour suppression? *Nature* **415**, 26 – 27.

Ferreira ST, Vieira MN, De Felice FG. (2007) Soluble protein oligomers as emerging toxins in Alzheimer's and other amyloid diseases. *IUBMB Life.* **59** (4-5), 332-345.

Ferrari A, Hoernkli F, Baechi T, Nitsch RM, Gotz J. (2003). beta-Amyloid induces paired helical filament-like tau filaments in tissue culture. *J Biol Chem.* **278**, 40162-40168.

Ferrer- Abizanda, I. Neuropatología de la enfermedad de Alzheimer. En , Alberca, R y López-Pousa, S (ed); Enfermedad de Alzheimer y otras demencias; editorial Panamericana , 3ªed. Madrid. 2006; 189-202.

Finch CE, Tanzi RE. (1997) Genetics of aging. *Science* **278**, 407 – 411.

Fillit HM, Kemeny E, Luine V, Weksler ME, Zabriskie JB. (1987) Antivascular antibodies in the sera of patients with senile dementia of the Alzheimer's type. *J Gerontol.* **42** (2), 180-184.

Fleming JE, Miquel J, Cottrell SF, Yengoyan LS, Economos AC. (1982) Is cell aging caused by respiration dependent injury to the mitochondrial genome? *Gerontology* **28**, 44-53.

Flurkey K, Papaconstantinou J, Harrison DE. (2002) The Snell dwarf mutation Pit1(dw) can increase life span in mice. *Mech Ageing Dev.* **123**(2-3), 121-130.

- Forloni, G. (1993). beta-Amyloid neurotoxicity. *Funct Neurol.* **8**, 211-225.
- Forster MJ, Dubey A, Dawson KM, Stutts WA, Lal H, Sohal RS. (1996) Age-related losses of cognitive function and motor skills in mice are associated with oxidative protein damage in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**(10), 4765-4769.
- Foster TC, Kumar A. (2002) Calcium dysregulation in the aging brain. *Neuroscientist.* **8** (4), 297-301.
- Foster TC. (2007) Calcium homeostasis and modulation of synaptic plasticity in the aged brain. *Aging Cell* **6**, 319-325
- Frankel D., Mehindate H. and Schipper H. M. (2000) Role of heme oxygenase-1 in the regulation of manganese superoxide dismutase gene expression in oxidatively-challenged astroglia. *J Cell Physiol.* **185**, 80-86.
- Frey, U., Schroeder, H., Matthies, H. (1990) Dopaminergic antagonists prevent long-term maintenance of posttetanic LTP in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Brain Res.* **522**, 69-75.
- Fridovich, I (1986) Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys.* **247**, 1-11.
- Frohman EM, van den Noort S, Gupta S. (1989) Astrocytes and intracerebral immune responses. *J Clin Immunol* **9**, 1-9.
- Fukutani, Y., Kobayashi, K., Nakamura, I., Watanabe, K., Isaki, K. & Cairns, N. J. (1995). Neurons, intracellular and extracellular neurofibrillary tangles in subdivisions of the hippocampal cortex in normal ageing and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* **200**, 57-60.
- Fulga, T. A., Elson-Schwab, I., Khurana, V., Steinhilb, M. L., Spires, T. L., Hyman, B. T. & Feany, M. B. (2007). Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo. *Nat Cell Biol.* **9**, 139-148.

## G

- Gabbitta SP, Lovell MA, Markesbery WR. (1998) Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* **71**, 2034-2040.
- Gallagher M, Burwell R, Burchinal M. (1993). Severity of spatial learning impairment in aging, development of a learning index for performance in the Morris water maze. *Behav Brain Res.* **125**, 269-277.
- Gamblin, T. C., Berry, R. W. & Binder, L. I. (2003). Modeling tau polymerization in vitro, a review and synthesis. *Biochemistry* **42**, 15009-15017.
- García AG. (2002). Teoría colinérgica del Alzheimer. *JANO.* **62**, 1104.
- García de la Asunción, J., Millán, A. (1996). "Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA." *Faseb J.* **10**(2), 333-338.
- Gash DM, Zhang Z, Gerhardt G. (1998). Neuroprotective and neurorestorative properties of GDNF. *Ann Neurol.* **44**(3 Suppl 1), S121-S125.



- Gavrilov LA, Gavrilova NS. (2002) Evolutionary theories of aging and longevity. *Scientific World Journal* **2**, 339-356.
- Ghirnikar RS, Yu AC, Eng LF. (1994) Astrogliosis in culture, III. Effect of recombinant retrovirus expressing antisense glial fibrillary acidic protein RNA. *J Neurosci Res.* **38** (4), 376-385.
- Ghribi O, Herman MM, Pramoonjago P, Spaulding NK, Savory J.(2004) GDNF regulates the A beta-induced endoplasmic reticulum stress response in rabbit hippocampus by inhibiting the activation of gadd 153 and the JNK and ERK kinases. *Neurobiol Dis.* **16** (2) ,417-427.
- Gibson GE, Huang, HM. (2005) Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* **26**, 575-578.
- Giménez-Llort L, Blázquez G, Cañete T, Johansson B, Oddo S, Tobeña A, LaFerla FM, Fernández-Teruel A. (2007) Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer's disease in mice, a role for intraneuronal amyloid. *Neurosci Biobehav Rev.* **31**(1), 125-147.
- Giovannini, M. G., Scali, C., Prosperi, C., Bellucci, A., Vannucchi, M. G., Rosi, S., Pepeu, G. & Casamenti, F. (2002) Beta-amyloid-induced inflammation and cholinergic hypofunction in the rat brain in vivo, involvement of the p38MAPK pathway. *Neurobiol Dis.* **11**, 257-274.
- Gluckman P, Klempt N, Guan J, Mallard C, Sirimanne E, Dragunow M, Klempt M, Singh K, Williams C, Nikolics K.(1992) A role for IGF-1 in the rescue of CNS neurons following hypoxic-ischemic injury. *Biochem Biophys Res Commun.* **182** (2), 593-599.
- Goldbaum O, Richter-Landsberg C. (2001) Stress proteins in oligodendrocytes, differential effects of heat shock and oxidative stress. *J Neurochem.* **78** (6), 1233-1242.
- Gómez-Ramos A, Smith MA Perry G, Avila J. (2004) Tau phosphorylation and assembly. *Acta Neurobiol Exp.* **64**, 33-39.
- Gong, C. X., Lidsky, T., Wegiel, J., Zuck, L., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. (2000). Phosphorylation of microtubule-associated protein tau is regulated by protein phosphatase 2A in mammalian brain. Implications for neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* **275**, 5535-5544.
- Good PF, Perl DP, Bierer LM, Schmeidler J. (1992) Selective accumulation of aluminum and iron in the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease, a laser microprobe (LAMMA) study. *Ann Neurol.* **31**, 286-292.
- Gorina R, Sanfeliu C, Galitó A, Messeguer A, Planas AM.(2007). Exposure of glia to pro-oxidant agents revealed selective Stat1 activation by H2O2 and Jak2-independent antioxidant features of the Jak2 inhibitor AG490. *Glia.* **55** (13), 1313-1324.
- Gottfried C, Tramontina F, Gonçalves D, Gonçalves C A, Moriguchi E, Dias R D, Wofchuck S T, Souza DO. (2002) Glutamate uptake in cultured astrocytes depends on age, a study about de effect of guanosine and the sensitivity to oxidative stress induced by H2O2. *Mech. Ageing Dev.* **123**, 1333-1340.
- Granon, S, Poucet B. (1995) Medial prefrontal lesions in the rat and spatial navigation, evidence for impaired planning. *Behav Neurosci.* **109**, 474-484.

- Greenwood J A, Scott C W, Spreen RC, Caputo CB, Johnson GV. (1994). Casein kinase II preferentially phosphorylates human tau isoforms containing an amino-terminal insert. Identification of threonine 39 as the primary phosphate acceptor. *J Biol Chem.* **269**, 4373-4380.
- Griffin WS, Sheng JG, Mrak RE. (1998) Senescence-accelerated overexpression of S100beta in brain of SAMP6 mice. *Neurobiol Aging* **19** (1), 71-76.
- Gross SS, Wolin MS. (1995) Nitric oxide, pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol.* **57**, 737-769.
- Gupta A, Hasan M, Chander R, Kapoor NK. (1991) Age-related elevation of lipid peroxidation products and diminution of superoxide dismutase activity in the central nervous system of rats. *Gerontology* **37**, 305-309.
- Gupta S, Sharma SS. (2006). Neuroprotective effects of trolox in global cerebral ischemia in gerbils. *Biol Pharm Bull.* **29** (5), 957-61

## H

- de Haan J B, Cristiano F, Iannello R, Kelner M J, Kola I. (1996) Elevation in the ratio of Cu/Zn-superoxide dismutase to glutathione peroxidase leads to cellular senescence and this effect is mediated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Hum Mol Genet.* **5**, 283-292.
- Hafting T, Fyhn M, Molden S, Moser MB, Moser EI. (2005). Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature.* **436** (7052), 801-806.
- Hall T, Miller K, Corsellis JA. (1975) Variations in the human Purkinje cell population according to age and sex. *Neuropathol Appl Neurobiol.* **1**, 267-292.
- Halliwell, B, Gutteridge JMC. (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, Clarendon Press; 1989. Pp. 543
- Halliwell B. (1999) Antioxidant defence mechanisms, from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res.* **31**(4), 261-272.
- Hamilton ML, Van Remmen, H, Drake JA, Yang H, Guo ZM, Kewitt K, Walter CA, Richardson A, (2001). Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 10469-10474.
- Hansen M. B., Nielsen S. E., Berg K. (1989) Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* **119**, 203-210
- Hardy JA, Selkoe DJ. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease, Progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**, 353-356.
- Hartley DM, Walsh DM, Ye CP, Diehl T, Vasquez S, Vassilev PM, Teplow D B, Selkoe D J. (1999) Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J Neurosci.* **19**, 8876-8884

- Harleyn CB, Futcher AB, Greider CM. (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458-60
- Harman D. (1981) "The aging process". *Proc Natl Acad Sci USA*. **78** (11), 7124-7128.
- Harman D. (2003) The free radical theory of aging. *Antioxid Redox Signal*. **5** (5), 557-561.
- Harris, R., Fahrenholz, F. 2005 Alzheimer disease, cellular and molecular aspects of  $\beta$ -amyloid. Subcellular biochemistry . Volume 38 . Springer. New York.
- Hayflick L, Moorhead PS. (1961).The serial cultivation of human strains. *Exp Cell Res*. **25**, 585-621.
- Hayflick L. (1997) Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry (Mosc)*. **62** (11), 1180-90.
- Head E, Liu J, Hagen TM, Muggenburg BA, Milgram NW, Ames BN, Cotman CW. (2002) Oxidative damage increases with age in a canine model of human brain aging. *J Neurochem*. **82** (2), 375-381.
- Henderson G, Tomlinson BE, Gibson GH. (1980) Cell count in human cerebral cortex in normal adults throughout life using and image analyzing computer. *J Neurol Sci*. **46**, 113-116.
- Heneka MT, O'Banion MK (2007). Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol*. **184** (1-2), 69-91.
- Hennekam RC. (2006) Hutchinson-Gilford progeria syndrome, review of the phenotype. *Am J Med Genet A*. **140** (23), 2603-2624.
- Hensley K, Hall N, Suramanian R, Cole P, Harris M, Aksenov M. (1995) Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *J Neurochem*. **65**, 2146-2156.
- Hensley K, Floyd RA, Zheng N Y, Nael R, Robinson KA, Nguyen X, Pye Q N, Stewart CA, Geddes J, Markesbery WR, Patel E, Johnson GV, Bing G. (1999). p38 kinase is activated in the Alzheimer's disease brain. *J Neurochem*. **72**, 2053-2058.
- Hiona, A. and Leeuwenburgh,C. (2008) .The role of mitochondrial DNA mutations in aging and sarcopenia, Implications for the mitochondrial vicious cycle theory of aging. *Exp Gerontol*. **43**(1), 24-33.
- Hirano, A. (1994). Hirano bodies and related neuronal inclusions. *Neuropathol Appl Neurobiol*. **20**, 3-11.
- Hodges, H., Sowinski P, Sinden JD, Netto CA, Fletcher A, (1995). The selective 5-HT3 receptor antagonist WAY100289, enhances spatial memory in rats with ibotenate lesions of the forebrain cholinergic projection system. *Psychopharmacology* **117**, 318-332.
- Holf PR., Bouras C., Morrison JH. Cortical neuropathology in aging and dementing disorders, neuronal typology, connectivity, and selective vulnerability. En, Peters A., Morrison JH. (eds) Cerebral cortex, vol 14. Neurodegenerative and age-related changes in structure and function of cerebral cortex New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, Kluwer Academic/ Plenum Publishers 1999; 175-311.

- Holf PR, Morrison JH. (2004) The aging brain, morphomolecular senescence of cortical circuits. *Trends Neurosci.* **27**, 607-613.
- Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Géloën A, Even PC, Cervera P, Le Bouc Y.(2003) GF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* **421** (6919), 182-187.
- Hooper C, Killick R, Lovestone S. (2008) The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* **104**(6), 1433-1439.
- Hösli E, Hösli L. (1993). Receptors for neurotransmitters on astrocytes in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol.* **40**, 477-506.
- Hoshi M, Sato M, Matsumoto S, Noguchi A, Yasutake K, Yoshida N, Sato K. (2003). Spherical aggregates of beta-amyloid (amylospheroid) show high neurotoxicity and activate tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 6370-6375.
- Howland DS, Trusko SP, Savage MJ, Reaume AG, Lang DM, Hirsch JD, Maeda N, Siman R, Greenberg BD, Scott RW, Flood DG.(1998). Modulation of secreted beta-amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide in brain by cholesterol. *J Biol Chem.* **273**(26),16576-16582.
- Hsu HK, Peng MT. (1978) Hypothalamic neuron number of old female rats. *Gerontology* **24**, 434-440.
- Huang X, Atwood CS, Hartshorn MA, Multhaup G, Goldstein LE, Scarpa RC, Cuajungco MP, Gray DN, Lim J, Moir RD, Tanzi RE, Bush AI. (1999). The A $\beta$  peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. *Biochemistry* **38**, 7609-7616.
- Hussain S, Slikker Jr. W, Ali SF, (1995). Age-related changes in antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione in different regions of mouse brain. *Int. J Develop Neurosci.* **13**, 811-817.
- Hwang IK, Yoon YS, Yoo KY, Li H, Choi JH, Kim DW, Yi SS, Seong JK, Lee IS, Won MH.(2008) Differences in lipid peroxidation and Cu,Zn-superoxide dismutase in the hippocampal CA1 region between adult and aged dogs. *J Vet Med Sci.* **70**(3), 273-277.

## I

- Ihrle RA, Alvarez-Buylla A. (2008) Cells in the astroglial lineage are neural stem cells. *Cell Tissue Res.* **331** (1):179-191.
- Iida T, Furuta A, Nishioka K, Nakabeppu Y, Iwaki T. (2002) Expression of 8-oxoguanine DNA glucosylase is reduced and associated with neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol (Berl)* **103**, 20-25.
- Iijima N, Tamada Y, Hayashi S., Tanaka M., Ishihara A., Hasegawa M. and Iyata Y. (1999) Expanded expression of heme oxygenase-1 (HO-1) in the hypothalamic median eminence of aged as compared with young rats, an immunocytochemical study. *Neurosci Lett.* **20**, 113-116.

Iqbal, K., Winblad, B., Nishimura, T., Takeda, M., Wisniewski, H. Alzheimer's disease, biology, diagnosis and therapeutics. 1997. Wiley editorial. England.

Ishiguro, K., Shiratsuchi, A., Sato, S., Omori, A., Arioka, M., Kobayashi, S., Uchida, T. & Imahori, K. (1993). Glycogen synthase kinase 3 beta is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. *FEBS Lett.* **325**, 167-172.

Itoh T, Satou T, Nishida S, Hashimoto S, Ito H. (2006) Cultured rat astrocytes give rise to neural stem cells. *Neurochem Res.* **31**, 1381-1387.

## J

Jacobs B, Driscoll L, Schall M. (1997) Life-span dendritic and spine changes in areas 10 and 18 of human cortex, a quantitative Golgi study. *J Comp Neurol.* **386**, 661-680.

Jarrard, L.E. (1983) Selective hippocampal lesions and behavior, Effects of kainic acid lesions on performance of place and cue tasks. *Behav Neurosci.* **97**, 873-889.

Jaszai J, Farkas L, Galter D, Reuss B, Strelau J, Unsicker K, Kriegstein K. (1998). GDNF-related factor persephin is widely distributed throughout the nervous system. *J Neurosci Res.* **53**(4), 494-501.

Jazwinski SM. (1996) Longevity, genes, and aging. *Science* **273**, 54 – 59.

Jean YY, Lercher LD, Dreyfus CF. (2008) Glutamate elicits release of BDNF from basal forebrain astrocytes in a process dependent on metabotropic receptors and the PLC pathway. *Neuron Glia Biol.* **4** (1), 35-42.

Jellinger K, Paulus W, Grundke-Iqbal I, Riederer P, Youdim MB. (1990) Brain iron and ferritin in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect.* **2**, 327-40.

Jenkins SM, Zimmerman M, Garner C, Johnson, GV. (2000). Modulation of tau phosphorylation and intracellular localization by cellular stress. *Biochem J.* **345** Pt 2, 263-270.

Jiang H, Ju Z, Rudolph KL. (2007) Telomere shortening and ageing. *Z Gerontol Geriatr.* **40** (5), 314-24.

Johns DR. (1995) Mitochondrial DNA and disease. *N Engl J Med.* **333**, 638-644.

Johnstone M, Gearing AJ, Miller KM. (1999). A central role for astrocytes in the inflammatory response to beta-amyloid; chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced. *J Neuroimmunol.* **93**(1-2), 182-93.

Jones DC. (1983) Development, maturation and aging of synapses. *Advances in Cellular Neurobiology* **4**, 163-221.

Juurlink, BH. (1997) Response of glial cells to ischemia, Roles of reactive oxygen species and glutathione. *Neurosc Bio Rev.* **21**, 151-166.

## K

- Kacem K, Lacombe P, Seylaz J, Bonvento G. (1998) Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter, a confocal microscopy study. *Glia* **23**,1-10.
- Kafifi, A., Bergman, R.A. Neuroanatomía funcional, texto y atlas. 2ª edición Mexico, Mc Graw Hill. 2006.
- Kanai Y, Chen J, Hirokawa N (1992) Microtubule bundling by tau proteins in vivo, analysis of functional domains. *EMBO J.* **11**, 3953-3961.
- Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M. (1998). Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci.* **1**(8), 683-692.
- Kanski J, Alterman MA, Schöneich C. (2003) Proteomic identification of age-dependent protein nitration in rat skeletal muscle. *Free Radic Biol Med.* **35** (10), 1229-1239.
- Kato K, Suzuki F, Morishita R, Asano T, Sato T. (1990). Selective increase in S-100 beta protein by aging in rat cerebral cortex. *J Neurochem.* **54**(4), 1269-1274.
- Kawamata T, Akiguchi I, Maeda K, Tanaka C, Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T.(1998) Age-related changes in the brains of senescence-accelerated mice (SAM), association with glial and endothelial reactions. *Microsc Res Tech.* **43** (1), 59-67.
- Kowald A, Lehrach H, Klipp E. (2006). Alternative pathways as mechanism for the negative effects associated with overexpression of superoxide dismutase. *J Theor Biol.* **238** (4), 828-840.
- Keller, JN.,Dimayuga, E., Chen, Q., Thorpe,J., Gee, J.,Ding, Q. (2004) Autophagy, proteosomes, lipofuscin, and oxidative stress in the aging brain. *Int J Biochem Cell Biol.* **36**, 2376-2391.
- Keller JN, Gee J, Ding Q.(2002). The proteasome in brain aging. *Ageing Res Rev.* **1**(2),279 – 293.
- Kelly DM, Gibson BM. (2007) Spatial Navigation, Spatial Learning in Real and Virtual Environments. *Comp Gogn Behav Rev.* **2**, 111-124.
- Kerschensteiner M, Stadelmann C, Dechant G, Wekerle H, Hohlfeld R. (2003) Neurotrophic Cross-talk between the Nervous and Immune Systems, Implications for Neurological Diseases. *Ann Neurol.* **53**(3), 292-304.
- Kesner RP. (2009). The posterior parietal cortex and long-term memory representation of spatial information. *Neurobiol Learn Mem.* **91**(2), 197-206.
- Kessels RPC, de Haan EHF, Kappele LJ, Postma A. (2001) Varieties of human spatial memory, a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. *Brain Res Rev.* **35**, 295-303.
- Kyng KJ, Bohr VA. (2005) Gene expression and DNA repair in progeroid syndromes and human aging. *Ageing Res Rev.* **4** (4), 579-602.
- Kirkwood TB. (2002) Evolution of ageing. *Mech Ageing Dev.* **123**(7), 737-745.
- Kirkwood TB, Austad SN. ( 2000) Why do we age? . *Nature* **408** (6809), 233-38.

- Kirkwood TBL, Holliday R.(1979) The evolution of ageing and longevity. *Proc R Soc London B.* **205**, 531-546.
- Kirkwood TBL, Rose MR.(1991). Evolution of senescence, late survival sacrificed for reproduction. *Phil Trans R Soc London B.* **332** (1262), 15-24.
- Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, Hanninen 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**, 1447–1451
- Klamt F, Gottfried C, Tramontina F, Dal-Pizzol F, Conte da Frota ML, Fonseca Moreira JC, Dias RD, Moriguchi E, Wofchuck S Souza DO. (2002) Time-related increase in mitochondrial superoxide production, biomolecule damage and antioxidant enzyme activities in cortical astrocyte cultures. *Neuroreport* **13**, 1515–1518.
- Knight JA. (1995) The process and theories of aging. *Ann Clin Lab Sci.* **25**(1), 1-12.
- Knowles RG, Moncada S. (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* **298**, 249-258.
- Knowlton BJ, Mangels JA, Squire LR. (1996) A neostriatal habit learning system in humans. *Science* **273**, 1399–1402.
- Kohama SG, Goss JR, Finch C E, McNeill TH. (1995) Increases of glial fibrillary acidic protein in the aging female mouse brain. *Neurobiol Aging* **16**, 59–67.
- Koistinaho M, Lin S, Wu X, Esterman M, Koger D, Hanson J, Higgs R, Liu F, Malkani S, Bales KR, Paul SM. (2004). Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-beta peptides. *Nat Med.* **10**, 719–726.
- Kops GJ, Dansen TB, Polderman PE, Saarloos I, Wirtz KW, Coffey PJ, Huang TT, Bos JL, Medema RH, Burgering BM. (2002) Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* **419** (6904), 316-321.
- Kofuji P, Newman EA. (2004) Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience* **129**, 1045-1056.
- Kontos HA, Wei EP, Ellis EF, Jenkins LW, Povlishock JT, Rowe GT, Hess ML. (1985) Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cats. *Circ Res.* **57** (1), 142-151.
- Kovacic P, Pozos RS, Somanathan R, Shangari N, O'Brien PJ. (2005) Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins, Focus on electron transfer, free radicals, and structure-activity relationships. *Curr Med Chem.* **12**, 2601-2623.
- Kristal BS, Yu BP. (1992) An emerging hypothesis synergistic induction of aging by free radicals and maillard reactions. *J Gerontol* **47** (4), B107-14.
- Kuo YM, Emmerling MR, Vigo-Pelfrey C, Kasunic TC, Kirkpatrick JB, Murdoch GH. (1996) Water-soluble A $\beta$  (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains. *J Biol Chem* **27**, 4077–4081.
- Kuppusamy P, Zweier JL. ( 1989) Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *J Biol Chem.* **264** (17), 9880–9884.

Kuro-o M. (2001) Disease model, human aging. *Trends Mol Med.* **7**, 179 – 181.

Kurt MA, Davies DC, Kidd M. (1999)  $\beta$ -amyloid immunoreactivity in astrocytes in Alzheimer's disease brain biopsies, An electron microscope study. *Exp Neurol.* **158**, 221-228.

Kusakawa GI, Saito T, Onuki R, Ishiguro K, Kishimoto T, Hisanaga S. (2000) Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin dependent kinase 5 activator to p25. *J Biol Chem.* **275**, 17166-17172.

## L

Lachyankar M, Condon P, Quesenberry P, Litofsky NS, Recht LD, Ross AH. (1997) Embryonic precursor cells that express Trk receptors, induction of different cell fates by NGF, BDNF, NT-3 and CNTF. *Exp Neurol.* **144** (2), 350-360.

LaFerla FM, Green KN, Oddo S. (2007). Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* **8** (7),499-509.

LaFontaine MA, Mattson MP, Butterfield DA.(2002). Oxidative stress in synaptosomal proteins from mutant presenilin-1 knock-in mice, implications for familial Alzheimer's disease. *Neurochem Res.* **27**, 417-421.

Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A $\beta$ 1 to 42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 6448–6453.

Lamberty Y, Gower AJ. (1991) Cholinergic modulation of spatial learning in mice in a Morris-type water maze. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 309, 5-19.

Landis GN, Tower J. (2005) Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech Ageing Dev.* **126**, 365-379.

LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC (1992). Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol.* **5**, 227-231.

Lecanu L, Greeson J, Papadopoulos V. (2006) Beta-amyloid and oxidative stress jointly induce neuronal death, amyloid deposits, gliosis, and memory impairment in the rat brain. *Pharmacology.* **76** (1), 19-33.

Ledesma MD, Correas I, Avila J, Diaz-Nido J. (1992). Implication of brain cdc2 and MAP2 kinases in the phosphorylation of tau protein in Alzheimer's disease. *FEBS Lett.* **308**, 218-224.

Lee MS, Kwon Y, Li M, Peng J, Friedlander RM, Tsai LH. (2000) Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* **405**, 360-364.

Leutner S, Eckert,A, Müller,WE. (2001) ROS generation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the aging brain *J Neural Transm.* 108, 955–967.



- Lin SJ, Guarente L. (2003) Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease. *Curr Opin Cell Biol.* **15**, 241–246.
- Lin DT, Wu J, Holstein D, Upadhyay G, Rourk W, Muller E, Lechleiter JD.(2007). Ca<sup>2+</sup> signaling, mitochondria and sensitivity to oxidative stress in aging astrocytes. *Neurobiol Aging.* **28**(1), 99-111.
- Linder N, Rapola J, Raivio KO. (1999) Cellular expression of xanthine oxidoreductasa protein in normal human tissues. *Lab Invest.* **79**, 967-974.
- Liochev,S.I., Fridovich I. (2002) The Haber-Weiss cycle- 70 years later, An alternative view. *Redox Rep.* **7**, 55-57.
- Lipton P, Kalil R. (1995) Neurotrophic factors, their role in the development, trauma and disease. *Neural Notes* **1**, 3-7.
- Lithgow GJ, Andersen JK. (2000) The real Dorian Gray mouse. *Bioessays* **22**, 410 – 413.
- Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX. (2005) Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur J Neurosci.* **22**(8), 1942-1950.
- Lledías FP, Rangel W, Hansberg. (1998) Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J Biol Chem.* **273**, 10630-10637
- Lovestone S, Hartley C L, Pearce J, Anderton B H. (1996). Phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase-3 beta in intact mammalian cells, the effects on the organization and stability of microtubules. *Neuroscience* **73**, 1145-1157.
- Lovestone S, McLoughlin DM. (2002) Protein aggregates and dementia, is there a common toxicity? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **72**, 152–161.
- Lü L, Li J, Yew DT, Rudd JA, Mak YT. (2008a) Oxidative stress on the astrocytes in culture derived from a senescence accelerated mouse strain. *Neurochem Int.* **52** (1-2) , 282-289.
- Lü L, Li J, Zhu Y, Mak YT, Yew DT. (2008b). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced changes in astrocytic cultures from control and rapidly aging strains of mouse. *Int J Neurosci.* **118** (9), 1239-1250.
- Luchsinger JA. (2008) Adiposity, hyperinsulinemia, diabetes and Alzheimer's disease, an epidemiological perspective. *Eur J Pharmacol.* **585**(1), 119-129.
- 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**(3), 853-862.
- Lushchak VI. (2007) Free radical oxidation of proteins and its relationship with functional state of organisms. *Biochemistry (Mosc).* **72** (8), 809-827.
- Luth HJ, Munch G, Arendt T. (2002). Aberrant expression of NOS isoforms in Alzheimer's disease is structurally related to nitrotyrosine formation. *Brain Res.* **953**, 135-143.

## 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.
- Maccioni R B, Munoz J P, Barbeito L. (2001) The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res.* **32**, 367-381.
- Maciver, S. K. & Harrington, C. R. (1995). Two actin binding proteins, actin depolymerizing factor and cofilin, are associated with Hirano bodies. *Neuroreport* **6**, 1985-1988.
- Maguire, E.A., Frith, C.D., Burgess, N., Donnett, J.G. O'Keefe, J. (1998) Knowing where things are, parahippocampal involvement in encoding object locations in virtual large-scale space. *J Cog Neurosci.* **10**, 61-76.
- Maguire EA, Gadian DG, Johnsrude IS, Good CD, Ashburner J, Frackowiak RS, Frith CD. (2000) Navigation-related structural change in the hippocampi of taxi drivers. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97**, 4398-4403.
- Malm T, Ort M, Tähtivaara L, Jukarainen N, Goldsteins G, Puoliväli J, Nurmi A, Pussinen R, Ahtoniemi T, Miettinen TK, Kanninen K, Leskinen S, Vartiainen N, Yrjänheikki J, Laatikainen R, Harris-White ME, Koistinaho M, Frautschy SA, Bures J, Koistinaho J. (2006) Beta-Amyloid infusion results in delayed and age-dependent learning deficits without role of inflammation or beta-amyloid deposits. *Proc Natl Acad Sci USA.* **103** (23), 8852-8857.
- Maragakis NJ, Rothstein JD. (2006) Mechanisms of Disease, astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol* **2** (12), 679-89.
- Marco S, Canudas AM, Canals JM, Gavaldà N, Pérez-Navarro E, Alberch J. (2002) Excitatory amino acids differentially regulate the expression of GDNF, neurturin, and their receptors in the adult rat striatum. *Exp Neurol.* **174** (2), 243-252.
- Marcus DL, Thomas C, Rodríguez C, Simberkoff K, Tsai JS, Strafaci JA, Freedman ML. (1998) Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* **150**, 40-44.
- Markiewicz I, Lukomska B. (2006). The role of astrocytes in the physiology and pathology of the central nervous system. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **66** (4), 343-358.
- Martin S.J., Clark R.E. (2007) The rodent hippocampus and spatial memory, from synapses to systems. *Cell Mol Life Sci.* **64** (4), 401-431.
- Masliah E., Salmon, DP. Neuropathological correlates of dementia in Alzheimer's disease. En, Peters A, Morrison JH (eds) *Cerebral cortex*, vol 14. Neurodegenerative and age-related changes in structure and function of cerebral cortex New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, Kluwer Academic/ Plenum Publishers 1999; 513-552.
- Markesbery WR, Lovel MA. (1998) Four-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, is increased in the brain in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **19**, 33-36.
- Markiewicz I, Lukomska B. (2006) The role of astrocytes in the physiology and pathology of the central nervous system. *Acta Neurobiol Exp.* **66**, 343-358.

- Matés J, Sánchez-Jiménez F. (1999) Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosc.* **4**, 339-345.
- Matsunaga W, Isobe K, Shirokawa T. (2006) Involvement of neurotrophic factors in aging of noradrenergic innervations in hippocampus and frontal cortex. *Neurosci Res.* **54** (4), 313-318.
- Matsuoka Y, Picciano M, La Francois J, Duff K. (2001) Fibrillar beta-amyloid evokes oxidative damage in a transgenic Mice model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* **104**, 609-613.
- Matthews DB, Best PJ. (1997) Evidence for the flexible use of spatial knowledge in the rat. *Psychobiology* **25**, 294-302.
- Matthies H, Becker A, Schroeder H, Kraus J, Hollt V, Krug M. (1997) Dopamine D1- deficient mutant mice do not express the late phase of hippocampal long-term potentiation. *NeuroReport* **8**, 3533-3535.
- Mattson MP. (2003) Excitotoxic and excitoprotective mechanisms, abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Med.* **3** (2), 65-94.
- Mariani E, Polidori MC, Cherubini A, Mecocci P. (2005) Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases, An overview. *J Chromatogr B* **827**, 65-75.
- Mark RE, Griffin ST, Graham DI.(1997). Aging-associated changes in human brain. *J Neurospathol Exp Neurol.* **56**, 1269-1275.
- MA, Martínez M, Pedrosa JA, Quesada A, Peinado JM. (1993) Quantitative morphological changes in neurons and glia in the frontal lobe of the aging rat. *Anat Rec.* **237**, 104-8.
- Matos M, Augusto E, Oliveira CR, Agostinho P. (2008) Amyloid-beta peptide decreases glutamate uptake in cultured astrocytes, involvement of oxidative stress and mitogen-activated protein kinase cascades. *Neuroscience* **156** (4), 898-910.
- Mattson MP, Engle MG, Rychlik B. (1991) Effects of elevated intracellular calcium levels on the cytoskeleton and tau in cultured human cortical neurons. *Mol Chem Neuropathol.* **15**, 117-142
- McCann SM, Mastronardi C, de Laurentiis A, Rettori V.(2005) The nitric oxide theory of aging revisited. *Ann N Y Acad Sci.* **1057**, 64-84.
- McClelland JL, McNaughton BL, O'Reilly RC.(1995) Why there are complementary learning systems in the hippocampus and neocortex, insights from the successes and failures of connectionist models of learning and memory. *Psychol Rev.* **102**, 419-457.
- McDonald N, Chao M. (1995). Structural Determinant of neurotrophin action. *J Biol Chem.* **270** (34),19669-19672.
- McGahon, B.M., Martin, D.S., Horrobin, D.F., Lynch, M.A., 1999. Age-related changes in LTP and antioxidant defenses are reversed by an alpha-lipoic acid-enriched diet. *Neurobiol Aging* **20**, 655-664.
- McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF. (1999) Endothelial function in hypertension, the role of superoxide anion. *Hypertension* **34** (Pt 1), 539- 545.

- McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K. (1999) Soluble pool of A $\beta$  amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* **46**, 860–866.
- McMorris FA, Mozell RL, Carson MJ, Shinar Y, Meyer RD, Marchetti N. (1993) Regulation of oligodendrocyte development and central nervous system myelination by insulin-like growth factors. *Ann N Y Acad Sci.* **692**, 321-334.
- McNamara RK, Skelton RW. (1993) The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris water maze. *Brain Res Rev.* **18**, 33-49.
- McNaughton BL, Barnes CA, Gerrard JL, Gothard K, Jung MW, Knierim JJ, Kudrimoti H, Qin Y, Skaggs WE, Suster M, Weaver L. (1996) Deciphering the hippocampal polyglot, The hippocampus as a path integration system. *J Exp Biol.* **199**, 173-186.
- Mecocci P, Beal MF, Cecchetti R, Polidori MC, Cherubini A, Chionne F, Avellini L, Romano G, Senin U. (1997) Mitochondrial membrane fluidity and oxidative damage to mitochondrial DNA in aged and AD human brain. *Mol Chem Neuropathol.* **31**, 53-64.
- Mecocci P, MacGarvey U, Beal MF. (1994) Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* **36**, 747-751.
- Meeuwssen S, Persoon-Deen C, Bsibsi M, Ravid R, van Noort JM. (2003) Cytokine, chemokine and growth factor gene profiling of cultured human astrocytes after exposure to proinflammatory stimuli. *Glia* **43** (3),243-253
- Miquel J. (1991) An integrated theory of aging as the result of mitochondrial DNA mutation in differentiated cells. *Arch Gerontol Geriatr.* **12**, 99-117.
- Miquel J.(1998) An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging, genetic and evolutionary implications. *Exp Gerontol.* **33** (1-2), 113-126.
- Miquel J, Economos AC, FlemingJ, Johnson JR Jr. (1980) Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol.* **15**, 575-591.
- Miquel J, Fleming JE.(1984) A two steps hypothesis on the mechanism of in vitro cell aging cell differentiation followed by intrinsic mitochondrial mutagenesis. *Exp Gerontol.* **19**, 31-36.
- Mills LR. (1996) The sodium-calcium exchanger and glutamate-induced calcium loads in aged hippocampal neurons in vitro. *Ann N Y Acad Sci.* **15**, 379-390.
- Miyazaki H, Nagashima, K, Okuma, Y, Nomura, Y, (2001). Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor induced by transient forebrain ischemia in rats. *Brain Res.* **922** (2), 165–172.
- Miyazaki H, Okuma Y, Nomura J, Nagashima K, Nomura Y. (2003) Age-related alterations in the expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the senescence-accelerated mouse brain. *J Pharmacol Sci.* **92**, 28–34.
- Miyazawa M, Ishii T, Yasuda K, Noda S, Onouchi H, Hartman PS, Ishii N. (2009) The role of mitochondrial superoxide anion (O $_2^{\cdot -}$ ) on physiological aging in C57BL/6J mice. *J Radiat Res (Tokyo).* **50** (1), 73-83.

- Mizumori SJ, Ragozzino KE, Cooper BG, Leutgeb S. (1999) Hippocampal representational organization and spatial context. *Hippocampus* **9** (4), 444-51.
- Mobbs CV. Neuroendocrinology of aging. In, Schneider EL, Rowe JW, editors. Handbook of the biology of aging. San Diego (CA), Academic Press, 1996. pp. 234 – 282.
- Motta MC, Divecha N, Lemieux M, Kamel C, Chen D, Gu W, Bultsma Y, McBurney M, Guarente L.(2004) Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell* **116** (4), 551-63.
- Morris, R.G.M., 1981. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn Motiv.* **12**, 239–260.
- Morris RGM, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. (1986) Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* **319**, 774-776.
- Morris RGM, Garrud P, Rawlins JNP, O'Keefe J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* **297**, 681–683.
- Moser EI, Kropff E, Moser MB. (2008). Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. *Annu Rev Neurosci.* **31**, 69-89.
- Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55-63.
- Mrak RE, Sheng JG, Griffin WS. (1996) Correlation of astrocytic S100 beta expression with dystrophic neurites in amyloid plaques of Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* **55**(3), 273-279.
- Mrak RE, Sheng JG, Griffin WS. (1995). Glial cytokines in Alzheimer's disease, review and pathogenic implications. *Hum Pathol.* **26**, 816–823.
- Mudher A, Lovestone S. (2002) Alzheimer's disease – do tauists and baptists finally shake hands? *Trends Neurosc.* **25** (1) 22-26.
- Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y, Richardson A, Van Remmen H. (2007) Trends in oxidative aging theories. *Free Radic Biol Med.* **2043** (4), 477-503.
- Multhaup G, Scheuermann S, Schlicksupp A, Simons A, Strauss M, Kemmling A, Oehler C, Cappai R, Pipkorn R, Bayer TA. (2002). Possible mechanisms of APP-mediated oxidative stress in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* **33**(1), 45-51.
- Murakami S, Johnson TE. (1996) A genetic pathway conferring lifeextension and resistance to UV stress in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **143**, 1207 – 1218.
- Murphy CT, McCarroll SA, Bargmann CI, Fraser A, Kamath RS, Ahringer J, Li H, Kenyon C. (2003 ) Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* **17** ( 424), 277-283.
- Myhrer, T. (2003). Neurotransmitter system involved in learning and memory in the rat, a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Res Rev.* **41**, 268-287.

## N

- Nacmias B, Bagnoli S, Tedde A, Cellini E, Guarnieri BM, Bartoli A (2006). Cystatin C and apoe polymorphisms in Italian Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* **392** (1-2),110-113.
- Nadel L. Multiple memory systems, what and why, an update. In, Schacter DL, Tulving E, editors. *Memory Systems* 1994. Cambridge, MA, MIT Press, 1994, 39–64.
- Nadel L. (1991). The hippocampus and space revisited. *Hippocampus* **1**, 221-229.
- Nagele RG, Wegiel J, Venkataraman V, Imaki H, Wang KC, Wegiel J.(2004). Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **25**(5), 663-74.
- Navarro A, Boveris A. (2007) The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol.* **292**(2), C670-C686.
- Navarro A, Sánchez Del Pino MJ, Gómez C, Peralta JL, Boveris A. (2002) Behavioral dysfunction, brain oxidative stress, and impaired mitochondrial electron transfer in aging mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **282**(4), R985-R992.
- Nemoto S, Finkel T. (2002) Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. *Science* **295**, 2450–2452.
- Neuropathology Group of the Medical Research Council Cognitive Function and Ageing Study (MRC CFAS). (2001) Pathological correlates of late-onset dementia in a multicentre, community-based population in England and Wales. *Lancet* **357**, 169–175.
- Newman EA. (2003) New roles for astrocytes, regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci.* **26** (10), 536-542.
- Newman EA. (2001). Propagation of intercellular calcium waves in retinal astrocytes and Müller cells. *J Neurosci.* **21**(7),2215-2223.
- Nichols NR. (1999) Glial responses to steroids as markers of brain aging. *J Neurobiol.* **40**, 585–601.
- Nicolle MM, Gonzalez J, Sugaya K, Baskerville KA, Bryan D, Lund K, Gallagher M, McKinney M. (2001) Signatures of hippocampal oxidative stress in aged spatial learning-impaired rodents. *Neurosci.* **107** (3), 415-431.
- Noda Y, Yamada K, Nabeshima T. (1997) Role of nitric oxide in the effect of aging on spatial memory in rats. *Behav Brain Res.* **83**, 153-158.
- Noll E, Medina M, Hartley D, Zhou J, Perrimon N, Kosik KS. (2000) Presenilin affects Arm/beta-catenin localization and function in Drosophila. *Dev Biol.* **227**, 450-464.
- Nordberg J, Arner ES. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* **31** (11), 1287–1312.

Noronha-Dutra AA, Epperlein MM, Woolf N.(1993) Reaction of nitric oxide with hydrogen peroxide to produce potentially cytotoxic singlet oxygen as a model for nitric oxide-mediated killing. *FEBS Lett.* **321**, 59-62.

Notkola IL, Sulkava R, Pekkanen J, Erkinjuntti T, Ehnholm C, Kivinen P, Tuomilehto J, Nissinen A, (1998). Serum total cholesterol, apolipoprotein E epsilon 4 allele, and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology* **17**, 14–20.

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**, 759-767.

## O

O'Carroll, C.M., Morris, R.G.M. (2004) Heterosynaptic co-activation of glutamatergic and dopaminergic afferents is required to induce persistent long-term potentiation. *Neuropharmacology* **47**, 324-332.

Oddo S, Caccamo A, Smith IF, Green KN, LaFerla FM. (2006). A dynamic relationship between intracellular and extracellular pools of Abeta. *Am J Pathol.* **168** (1), 184-194.

O'Donnell, E., Vereker, E., Lynch, M.A., 2000. Age-related impairment in LTP is accompanied by enhanced activity of stress-activated protein kinases, analysis of underlying mechanisms. *Eur J Neurosci.* **12**, 345–352.

O'Keefe J, Nadel L. (1978). The hippocampus as a cognitive map. Oxford; Clarendon Press; 1978.

O'Reilly RC, Rudy JW. (2001) Coconjunctive representations in learning and memory, principles of cortical and hippocampal function. *Psychol Rev.* **108**, 311-345.

Olney JW. (1994) New mechanisms of excitatory transmitter neurotoxicity. *J Neural Transm.* **43** Suppl, 47-51.

Olovnikov AM. (1996) Telomeres, telomerase, and aging, origin of the theory. *Exp Gerontol.* **31** (4), 443-448.

Olster EL, Wallis CV, Sheerin AN, Faragher RGA. (2002) A model for the phenotypic presentation of Werner's syndrome. *Exp Geront.* **37**, 285-292.

Ono T, Uehara Y, Saito Y, Ikehata H. (2002) Mutation theory of aging, assessed in transgenic mice and knockout mice. *Mech Ageing Dev.* **123** (12), 1543-1552.

Orgel LE. (1970). The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing. *Proc Natl Acad Sci USA.* **76**, 1476.

Orr, W. C., and Sohal, R. (1994) Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* **263**, 1128 – 1130.

Ozawa T. (1997) Genetic and functional changes in mitochondria associated with aging. *Physiol Rev.* **77**, 425 – 464.

## P

- Packard MG, McGaugh JL. (1996) Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. *Neurobiol Learn Mem.* **65**, 65–72.
- Pallas M, Camins A, Smith MA, Perry G, Lee HG, Casadesus G.(2009). From aging to Alzheimer's disease, unveiling "the switch" with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8). *J Alzheimers Dis.* **15**(4), 615-24.
- Papadopoulos M. C., Koumenis I. L., Yuan T. Y. and Giffard R. G. (1998) Increasing vulnerability of astrocytes to oxidative injury with age despite constant antioxidant defenses. *Neuroscience* **82**, 915–25.
- Pappolla MA, Chyan YJ, Omar RA, Hsiao K, Perry G, Smith MA, Bozner P. (1998) Evidence of oxidative stress and in vivo neurotoxicity of beta-amyloid in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease, a chronic oxidative paradigm for testing antioxidant therapies in vivo. *Am J Pathol.* **152**, 871-7.
- Pappolla MA, Omar RA, Kim KS, Robakis NK. (1992). Immunohistochemical evidence of antioxidant stress in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* **140**, 621-628.
- Pappolla MA, Smith MA, Bryant-Thomas T, Bazan N, Petanceska S, Perry G, Thal LJ, Sano M, Refolo LM. (2002) Cholesterol, oxidative stress, and Alzheimer's disease, expanding the horizons of pathogenesis. *Free Radic Biol Med.* **33** (2), 173-181.
- Paschem W, Doutheil J. (1999) Disturbance of endoplasmic reticulum functions, a key mechanism underlying cell damage? *Acta Neurochir Suppl.* **73**, 1-5.
- Pastor N, Weinstein H, Jamison E, Brenowitz M. (2000). A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *J Mol Biol.* **304**, 55-68.
- Pardo Andreu, G. (2003). Consideraciones generales sobre algunas de las teorías del envejecimiento. *Rev Cubana Invest Biomed.* **22** (1), 58-67.
- Pearce JM, Roberts AD, Good M. (1998) Hippocampal lesions disrupt navigation base don cognitive maps but not heading vectors. *Nature* **396**, 75-77.
- Peinado MA, del Moral ML, Esteban FJ, Martínez-Lara E, Siles E, Jiménez A, Hernández-Cobo R, Blanco S, Rodrigo J, Pedrosa JA. (2000) Aging and neurodegeneration, molecular and cellular bases. *Rev Neurol.* **31** (11), 1054-65.
- Peinado MA, Quesada A, Pedrosa J, Torres MI, Martinez M, Esteban F, del Moral ML, Hernandez R, Rodrigo J, Peinado JM. (1998). Quantitative and ultrastructural changes in glia and pericytes in the parietal cortex of the aging rat. *Microsc Res Techn.* **43**, 34–42.
- Pekny, M., Nilsson, M. (2005) Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* **50** (4), 427-434.
- Pelech SL. (1995) Networking with proline-directed protein kinases implicated in tau phosphorylation. *Neurobiol of Aging* **16** ( 3), 247-261.



- Pellerin L, Magistretti P. The central role of astrocyte in neuroenergetics. In , Kettenmann, H, Ramsom,B, eds Neuroglia. Oxford, Oxford university Press; 2005. 367-376.
- Peña LA, Brecher CW, Marshak DR. (1995) Beta-Amyloid regulates gene expression of glial trophic substance S100 beta in C6 glioma and primary astrocyte cultures. *Brain Res Mol Brain Res.* **34** (1), 118-26.
- Pérez Velázquez JL, Frantseva MV, Carlen PL. (1997) In vitro ischemia promotes glutamate-mediated free radical generation intracelular calcium accumulation in hippocampal piramidal neurons. *J Neurosci.* **17**, 9085-9094.
- Perls T, Levenson R, Regan M, Puca A. (2002) What does it take to live to 100? *Mech Ageing Dev.* **123**, 231 – 242.
- Peter A, Leuha D, Moss MB, MCNally KJ. (1994) The effects of aging on area 46 of the frontal cortex of the Rhesus monkey. *Cereb Cortex* **6**, 621-635.
- Petrosillo G, Matera M, Casanova G, Ruggiero FM, Paradies G.(2008) Mitochondrial dysfunction in rat brain with aging Involvement of complex I, reactive oxygen species and cardiolipin. *Neurochem Int.* **53**(5), 126-31.
- Peuchen S, Clark JB, Duchen MR. (1996) Mechanisms of intracelular calcium regulation in adult astrocytes. *Neuroscience* **3**, 871–883.
- Pfriefer FW. (2002) Role of glia in synapse development. *Curr Opin Neurobiol.* **12**, 486-490.
- Pignolo RJ, Masoro EJ, Nichols WW, **Bradt CI**, **Cristofalo VJ**.(1992) Skin fibroblasts from aged Fischer 344 rats undergo similar changes in replicative life span but not immortalization with caloric restriction of donors. *Exp Cell Res.* **201**, 16 – 22.
- Ploeger GE, Spruijt BM, Cools AR. (1994) Spatial localisation in the Morris water maze in rats, Acquisition is affected by intra-accumbens injections of the dopaminergic antagonist haloperidol. *Behav Neuros.* **108**, 927-934.
- Poon HF, Calabrese V, Scapagnini G, Butterfield DA. (2004a) Free radicals and brain aging. *Clin Geriatr Med.* **20** (2), 329-359.
- Poon HF, Calabrese V, Scapagnini G, Butterfield DA. (2004b) Free radicals, key to brain aging and heme oxygenase as a cellular response to oxidative stress. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* **59** (5), 478-493.
- Porter JT, McCarthy KD. (1996) Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J Neurosci.* **16** (16), 5073-5081.
- Possel H, Noack H, Augustin W, Keilhoff G., Wolf G. (1997) 2,7 Dihydrochlorofluorescein diacetate as a fluorescent marker for peroxynitrite formation. *FEBS Lett.* **416**, 175-178.
- Poucet, B. (1993). Spatial cognitive maps in animals, new hypotheses on their structure and neural mechanisms. *Psychol Rev.* **100**, 163-182.
- Pratico D, MY Lee V, Trojanowski JQ, Rokach J, Fitzgerald GA. (1998) Increased F2-isoprostanes in Alzheimer's disease, evidence for enhanced lipid peroxidation in vivo. *FASEB J.* **12**, 1777-1783.

Pratico D, Urdu K, Leight S, Trojanowski JQ, Lee VM. (2001). Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. *J Neurosci.* **21**, 4183-4187.

## Q

Quinlan RA, Brenner M, Goldman JE, Messing A. (2007). GFAP and its role in Alexander disease. *Exp Cell Res.* **313** (10), 2077-2087.

Quintanilla RA, Muñoz FJ, Metcalfe MJ, Hitschfeld M, Olivares G, Godoy JA, Inestrosa NC. (2005) Trolox and 17beta-estradiol protect against amyloid beta-peptide neurotoxicity by a mechanism that involves modulation of the Wnt signaling pathway. *J Biol Chem.* **280** (12), 11615-11625.

## R

Rabchevsky AG, Weinitz JM, Coulpier M, Fages C, Tinel M, Junier MP.(1998) A role for transforming growth factor alpha as an inducer of astrogliosis. *J Neurosci.* **18** (24), 10541-10552.

Rajput AH. (2001) Levodopa prolongs life expectancy and is non-toxic to substantia nigra. *Parkinsonism Relat Disord.* **8** (2), 95-100.

Ramírez-Expósito, M<sup>a</sup>J., Martínez-Martos, JM. ( 1999) *Rev Neurol.* **29** (9), 824-833.

Ramos JM. (2002). Is the hippocampus necessary for spatial learning? *Rev Neurol.* **34** (12), 1142-1151.

Ranck, JB. (1984). Head direction cells in the deep layers of dorsal presubiculum in freely moving rats. *Soc Neurosci Abstr.* **10**, 599.

Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, Vitek M P, Ferreira A. (2002). Tau is essential to beta - amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 6364-6369

Rawlins JNP, Olton DS. (1982) The septohippocampal system and cognitive mapping. *Behav Brain Res.* **5**, 331-358.

Raz N, Rodrigue K. (2006) Differential aging of the brain, Patterns,cognitive correlates and modifiers. *Neurosc Biobeh Rev.* **30**,730-748.

Reaume AJL, Elliot EK, Hoffman NW, Kowall RJ, Ferrante DF, Siwek HM, Wilcox DG, Flood MF, Beal RH, Brown Jr. RW, Snider WD. (1996) Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nature Genet* **13**, 43-47.

Reddy VP, Zhu X, Perry G, Smith MA. (2009). Oxidative stress in diabetes and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* **16** (4), 763-774.

- Redish AD. Beyond the Cognitive Map, From Place Cells to Episodic Memory. Cambridge, MA, MIT Press, 1999.
- Redish AD. (2001). The hippocampal debate, are we asking the right questions? *Behav Brain Res.* **127**, 81-98.
- Redish AD, Touretzky DS. (1997). Cognitive maps beyond the hippocampus. *Hippocampus.* **7** (1), 15-35.
- Refolo LM, Malester B, LaFrancois J, Bryant-Thomas T, Wang R, Tint GS, Sambamurti K, Duff K, Pappolla MA. (2000) Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis.* **7** (4), 321-331
- Reichenbach A, Wolburg H. Astrocytes and ependymal glia. In , Kettenmann,H., Ramsom, B, eds Neuroglia. Oxford, Oxford University Press, 2005, 19-36.
- Reynolds, C. H., Nebreda, A. R., Gibb, G. M., Utton, M. A. & Anderton, B. H. (1997). Reactivating kinase/p38 phosphorylates tau protein in vitro. *J Neurochem.* **69**, 191-198.
- Richardson PM. (1994). Ciliary neurotrophic factor, a review. *Pharmacol Ther.* **63**(2), 187-198.
- Richter C, Park JW, Ames B. (1988) "Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive". *Proc Natl Acad Sci USA.* **85**, 6465-6467.
- Riekkinen M, Riekkinen P. (1997). Nicotine and D-cycloserine enhance acquisition of water maze spatial navigation in aged rats. *NeuroReport.* **8**, 699-703.
- Rison RA, Stanton PK. (1995). Long-term potentiation and N-methyl-D- aspartate receptors, foundations of memory and neurological of disease? *Neurosci Biobehav Rev.* **19**, 533-552.
- Riva MA, Mochetti I. (1991) Developmental expression of basic fibroblast growth factor gene in rat brain. *Brain Res Dev Brain Res.* **28**, 231-238.
- Roberts ADL, Pearce JM. (1999) Control of spatial behavior b an unstable landmark. *J Exp Psychol Anim Behav Process* **25**, 225-235.
- Robert PH, Verhey FR, Byrne EJ, Hurt C, De Deyn PP, Nobili F. (2005) Grouping for behavioral and psychological symptoms in dementia, clinical and biological aspects. Consensus paper of the European Alzheimer disease consortium. *Eur Psychiatry* **20** (7), 490-496.
- Rodrigo T, Chamizo VD, McLaren IPL, Macintosh NJ. (1997) Blocking in the spatial domain. *J Exp Psychol Anim Behav Process* **23**, 110-118.
- Rogers J.(2008). The inflammatory response in Alzheimer's disease. *J Periodontol.* **79** (8 Suppl), 1535-1543.
- Rohme D. (1981) Evidence for a relationship between longevity of mammalian species and life spans of normal fibroblasts in vitro and erythrocytes in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* **78**, 5009 - 5013.

- Romagnani S, Parronchi P, D'Elia MM, Romagnani P, Annunziato F, Piccinni MP, Manetti R, Sampognaro S, Mavilia C, De Carli M, Maggi E, Del Prete GF. (1997) An update on human Th1 and Th2 cells. *Int Arch Allergy Immunol.* **113** (1-3), 153-156.
- Rosenzweig, ES, Barnes CA. (2003) Impact of aging on hippocampal function, plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog Neurobiol.* **69**, 143-179.
- Ross D, Moldeus P. Antioxidant defense systems and oxidant stress. In, Vigo-Pelfrey, C., ed. Membrane Lipid Oxidation. Volume II. Boca Raton, CRC Press; 1991, 151-170.
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl, RW., Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF. (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* **16**, 675-686.
- Rothermundt M, Peters M, Prehn JH, Arolt V. (2003). S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech.* **60** (6), 614-632.
- Rothstein, M. (1983). Enzymes, enzyme alteration, and protein turnover. *Rev Biol Res Aging* **1**, 305-314.
- Rolls ET. (1999) Spatial view cells and the representation of place in the primate hippocampus. *Hippocampus.* **9** (4), 467-80. Review.
- Rozovsky I, Finch CE, Morgan TE. (1998) Age-related activation of microglia and astrocytes, in vitro studies show persistent phenotypes of aging, increased proliferation, and resistance to down-regulation. *Neurobiol Aging* **19**, 97-103.
- Rustin P, von Kleist-Retzow J, Vajo Z, Rotig A, Munnich A. (2000) For debate ,defective mitochondria, free radicals, cell death, aging-reality or mitochondria? *Mech Aging Dev.* **114**, 201-206.

## S

- Saarma M, Sariola H. (1999). Other neurotrophic factors, glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). *Microsc Res Tech* **45**(4-5), 292-302.
- Saavedra A, Baltazar G, Duarte EP. (2008) Driving GDNF expression, the green and the red traffic lights. *Prog Neurobiol.* **86** (3), 186-215.
- Schaar DG, Sieber BA, Dreyfus CF, Black IB, (1993). Regional and cell-specific expression of GDNF in rat brain. *Exp Neurol.* **124** (2), 368-371.
- Sagot Y, Tan SA, Hammang JP, Aebischer P, Kato AC. (1996). GDNF slows loss of motoneurons but not axonal degeneration or premature death of pmn/pmn mice. *J Neurosci.* **16** (7), 2335-2341.
- Saito T, Ishiguro K, Uchida T, Miyamoto E, Kishimoto T, Hisanaga S. (1995). In situ dephosphorylation of tau by protein phosphatase 2A and 2B in fetal rat primary cultured neurons. *FEBS Lett.* **376**, 238-242.

- Sampayo JN, Gill MS, Lithgow GJ. (2003). Oxidative stress and aging—the use of superoxide dismutase/catalase mimetics to extend lifespan. *Biochem Soc Trans.* **31**, 1305–1307.
- Sangram S, Sisodia Peter H, St George-Hyslop. (2002)  $\gamma$ -Secretase, notch, A $\beta$  and alzheimer's disease, Where do the presenilins fit in? *Nat Rev Neurosci.* **3**, 281-290.
- Santín LJ, Rubio S, Begega A, Miranda R, Ariasa JL . (2000) Aprendizaje espacial e hipocampo. *Rev Neurol.* **31** (5), 455-462.
- Sastre J, Pallardó FV, García de la Asunción J, Viña J. (1999) Mitochondria, oxidative stress and aging. *Free Rad Res.* **32**, 189-198.
- Sato E, Kurokawa T, Oda N, Ishibashi S. (1996) Early appearance of abnormality of microperoxisomal enzymes in the cerebral cortex of senescence-accelerated mouse. *Mech Ageing Dev.* **92** (2-3), 175-84.
- Sapolsky RM. Stress, the aging brain, and the mechanisms of neurons death. A Bradford Book. 1 ed. Massachusetts, London, The MIT Press Cambridge;1992; 74, 139-161.
- Save E, Poucet B. (2009). Role of the parietal cortex in long-term representation of spatial information in the rat. *Neurobiol Learn Mem.* **91** (2), 172-178.
- Schächter F, Faure-Delanef L, Guénot F, Rouger H, Froguel P, Lesueur-Ginot L, Cohen D.(1994) Genetic associations with human longevity at the APOE and ACE loci. *Nat Genet.* **6** (1), 29-32.
- Schell MJ, Molliver ME, Snyder SH. (1995). D-serine, an endogenous synaptic modulator, localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc Natl Acad Sci USA* **92** (9), 3948-3952.
- Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T. (1999) Immunization with amyloidbeta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* **400**, 173-177.
- Schipper H. M., Bernier L., Mehindate K. and Frankel D. (1999) Mitochondrial iron sequestration in dopamine-challenged astroglia, role of heme oxygenase-1 and the permeability transition pore. *J Neurochem.* **72**, 1802–1811.
- Schipper HM. (2004) Heme oxygenase expression in human central nervous system disorders. *Free Radic Biol Med.* **37**, 1995–2011.
- Schipper H. M., Bennett D. A., Liberman A., Bienias J. L., Schneider J.A., Kelly J. and Arvanitakis Z. (2006) Glial heme oxygenase-1 expression in Alzheimer and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* **27**, 252–261.
- Schoneich C. (1999). Reactive oxygen species and biological aging,a mechanistic approach. *Exp Gerontol.* **34**, 19-34.
- Schmitt HP. (2006)  $\epsilon$ -Glycation, APP and A $\beta$  in ageing and Alzheimer disease, a hypothesis. *Med Hypotheses* **66**, 898-906.
- Schmued LC, Hopkins KJ. (2000). Fluoro-Jade B, a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res.* **874** (2), 123-130.

- Schraufstatter IU, Browne K, Harris A, Hyslop PA, Jackson JH, Quehenberger O, Cochrane CG (1990). Mechanism of hypochlorite injury of target cells. *J Clin Invest.* **85**, 554-562.
- Schultz C, Dehghani F, Hubbard GB, Thal DR, Struckhoff G, Braak E, Braak H. (2000). Filamentous tau pathology in nerve cells, astrocytes, and oligodendrocytes of aged baboons. *J Neuropathol Exp Neurol.* **59**, 39–52.
- Scorziello A, Pellegrini C, Secondo A, Sirabella R, Formisano L, Sibaud L, Amoroso S, Canzoniero LM, Annunziato L, Di Renzo GF. (2004) Neuronal NOS activation during oxygen and glucose deprivation triggers cerebellar granule cell death in the later reoxygenation phase. *J Neurosci Res.* **76** (6), 812-821.
- Segovia G, Porras A, Del Arco A, Mora F. (2001) Glutamatergic neurotransmission in aging, a critical perspective. *Mech Ageing Dev.* **122** (1), 1-29.
- Selkoe DJ. (2001). Alzheimer's disease, genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* **81** (2), 741-766.
- Selkoe DJ. (2004). Cell biology of protein misfolding, the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat Cell Biol.* **6** (11), 1054-1061.
- Selkoe DJ. (2008). Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav Brain Res.* **192** (1), 106-113.
- Semsei I, Rao G, Richardson, A, 1991. Expression of superoxide dismutase and catalase in rat brain as a function of age. *Mech Ageing Develop.* **58**, 13–19.
- Sen J, Belli A. (2007) S100B in neuropathologic states, the CRP of the brain? *J Neurosci Res.* **85**(7), 1373-1380.
- Serrano F, Klann (2004). Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. *Ageing Res Rev.* **3**, 431-443.
- Shank RP, Campbell GL. (1983) Ornithine as a precursor of glutamate and GABA, uptake and metabolism by neuronal and glial enriched cellular material. *J Neurosci Res.* **9**, 47-57.
- Shao Y, Gearing M, Mirra SS. (1997). Astrocyte-apolipoprotein E associations in senile plaques in Alzheimer disease and vascular lesions, a regional immunohistochemical study. *J Neuropathol Exp Neurol.* **56**, 376–381.
- Shapiro M. (2001). Plasticity, hippocampal place cells, and cognitive maps. *Arch Neurol.* **58**, 874-881.
- Sharma SS, Sayyed SG. (2006) Effects of trolox on nerve dysfunction, thermal hyperalgesia and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **33** (11), 1022-1028.
- Sharp, PE, Blair HT, Etkin D, Tzanetos DB. (1995) Influences of vestibular and visual motion information on the spatial firing patterns of hippocampal place cells. *J Neurosci.* **15**, 173-189.
- Sharp PE, Koester K. (2008) Lesions of the mammillary body region severely disrupt the cortical head direction, but not place cell signal. *Hippocampus* **18** (8), 766-784.
- Sheldrake AR. (1974) The ageing, growth, and death of cells. *Nature* **250**, 381-385.

- Sheng JG, Mrak RE, Rovnaghi CR, Kozłowska E, Van Eldik LJ, Griffin WST. (1996) Human brain S100 and S100 mRNA expression increases with age, pathogenic implications for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **17**, 359–363.
- Shigenaga, MK, Hagen TM. (1994). "Oxidative damage and mitochondrial decay in aging." *Proc. Natl Acad Sci USA*. **91**, 10771-10778.
- Shiurba, R. A., Ishiguro, K., Takahashi, M., Sato, K., Spooner, E. T., Mercken, M., Yoshida, R., Wheelock, T. R., Yanagawa, H., Imahori, K. & Nixon, R. A. (1996). Immunocytochemistry of tau phosphoserine 413 and tau protein kinase I in Alzheimer pathology. *Brain Res* **737**, 119-132.
- Shore D. 2000. The Sir2 protein family, a novel deacetylase for gene silencing and more. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 14030–14032
- Shin CM, Chung YH, Kim MJ, Lee EY, Kim EG, Cha CI. (2002) Age-related changes in the distribution of nitrotyrosine in the cerebral cortex and hippocampus of rats. *Brain Res*. **931** (2), 194-199.
- Siesjö BK, Hu B, Kristian T. (1999). Is the cell death pathway triggered by the mitochondrion or the endoplasmic reticulum? *J Cereb Blood Flow Metab*. **19**, 19-26.
- Simar M, Nedergaard M. (2004) The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience* **129**, 877-896.
- Simic G, Lucassen PJ, Krsnik Z, Kruslin B, Kostovic I, Winblad B, Bogdanovi.(2000) nNOS expression in reactive astrocytes correlates with increased cell death related DNA damage in the hippocampus and entorhinal cortex in Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. **165** (1), 12-26.
- Sironi, J. J., Yen, S. H., Gondal, J. A., Wu, Q., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. (1998). Ser-262 in human recombinant tau protein is a markedly more favorable site for phosphorylation by CaMKII than PKA or PhK. *FEBS Lett*. **436**, 471-475.
- Sjögren M, Mielke M, Gustafson D, Zandi P, Skoog I. (2006) Cholesterol and Alzheimer's disease- is there a relation? *Mech Ageing Dev*. **127** (2), 138-47.
- Slagboom PE, Vug J. (1989). Genetic instability and aging, theories, facts, and future perspectives. *Genome* **31**, 373-385.
- Sloane JA, Hollander W, Moss MB, Rosene DL, Abraham CR. (1999) Increased microglial activation and protein nitration in white matter of the aging monkey. *Neurobiol Aging*. **20** (4), 395-405.
- Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Stadtman ER, Floyd RA, Markesbery WR.(1991) Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. **88** (23), 10540-10543.
- Smith MA, Hirai K, Hsiao K, Pappolla MA, Harris PL, Siedlak SL, Tabaton M, Perry G.(1998) Amyloid-beta deposition in Alzheimer transgenic mice is associated with oxidative stress. *J Neurochem*. **70**, 2212-2215.
- Smith MA, Perry G, Richey PL.(1996) Oxidative damage in Alzheimer disease. *Nature* **382**, 120-121.

- Smith MA, Richey Haris PL, Sayre LM, Beckman JS, Perry G. (1997) Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* **17**, 2653-2657.
- Sofroniew, M.V. (2001). Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci.* **24**, 1217-281.
- Sohal R.S. Agarwal, S. Dubey, A. Orr, W.C. ( 1993) Protein oxidative damage is associated with life expectancy of houseflies. *Proc Natl Acad Sci USA.* **90** (15), 7255-7259.
- Sohal RS, Dubey A. (1994) Mitochondrial oxidative damage, hydrogen peroxide release, and aging. *Free Radic Biol Med.* **16** (5), 621-626.
- Sohal RS, Ku HH, Agarwal S, Forster MJ, Lal H. (1994) Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech Ageing Develop.* **74**, 121-133.
- Sohal RS, Sohal BH. (1990). "Relationship between antioxidant defenses and longevity in different mammalian species." *Mech Ageing Dev.* **53**(3), 217-227
- Sohal RS, Sohal BH. (1991). "Hydrogen peroxide release by mitochondria increases during aging." *Mech Ageing Dev.* **57** (2), 187-202.
- Sohal RS, Svensson I, Sohal BH, Brunk UT. ( 1989) Superoxide anion radical production in different animal species. *Mech Ageing Dev.* **49**, 129 – 135.
- Sohal RS, Weindruch R. (1996) Oxidative stress, caloric restriction and aging. *Science* **273** (5271), 59-63.
- Sohrabji F, Lewis DK. (2006) Estrogen-BDNF interactions, implications for neurodegenerative diseases. *Front Neuroendocrinol.* **27**(4), 404-414.
- Solstad T, Boccara CN, Kropff E, Moser MB, Moser EI. (2008). Representation of geometric borders in the entorhinal cortex. *Science* **322** (5909), 1865-1868.
- Song L, Song W, Schipper HM. (2007). Astroglia overexpressing heme oxygenase-1 predispose co-cultured PC12 cells to oxidative injury. *J Neurosci Res.* **85** (10), 2186-2195.
- Song H, Stevens CF, Gage FH. (2002). Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* **417** (6884), 29-32.
- Song W., Su H., Song S., Paudel H. K. and Schipper H. M. (2006) Over expression of heme oxygenase-1 promotes oxidative mitochondrial damage in rat astroglia. *J Cell Physiol.* **206**, 655-663.
- Sontag E, Nunbhakdi-Craig V, Lee G, Brandt R, Kamibayashi C, Kuret J, White CL, Mumby M C, Bloom GS. (1999). Molecular interactions among protein phosphatase 2A, tau, and microtubules. Implications for the regulation of tau phosphorylation and the development of tauopathies. *J Biol Chem.* **274**, 25490-25498.
- Soos JM, Morrow J, Ashley TA, Szente BE, Bikoff EK, Zamvil SS. (1998) Astrocytes express elements of the class II endocytic pathway and process central nervous system autoantigen for presentation to encephalitogenic T cells. *J Immunol.* **161**(11), 5959-5966.



- Sousa N, Paula-Barbosa MM, Almeida OF. (1999) Ligand and subfield specificity of corticoid-induced neuronal loss in the rat hippocampal formation. *Neuroscience* **89**, 1079-1987.
- Squadrito, G.L., Pryor, W.A. (1995) The formation of peroxynitrite in vivo from nitric oxide and superoxide. *Chem-Biol Interactions* **96**, 203-206.
- Squire LS, Kandel ER. Memory, From Mind to Molecules. Scientific American Library, Nueva York 2000.
- Stackman RW, Clark AS, Taube JS. (2002) Hippocampal spatial representations require vestibular input. *Hippocampus* **12** (3), 291-303.
- Stadtman ER. (1992) Protein oxidation and aging. *Science* **257** (5074), 1220 – 1224.
- Steiner B, Mandelkow EM, Biernat J, Gustke N, Meyer HE, Schmidt B, Mieskes G, Soling HD, Drechsel D, Kirschner M W. (1990). Phosphorylation of microtubule-associated protein tau, identification of the site for Ca<sup>2+</sup>-calmodulin dependent kinase and relationship with tau phosphorylation in Alzheimer tangles. *Embo J* **9**, 3539-3544.
- Stetman ER. (1995) Molecular Aspects of Aging ( Esser, K. and Martin, G.;ed) John Wiley & Sons, Ltd. pp129-143.
- Steward, O. Functional Neuroscience. Springer 2000. New York.
- Strimpakos AS, Sharma RA. (2008) Curcumin, preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials. *Antioxid Redox Signal.* **10** (3), 511-45.
- Strolin Benedetti M, Dostert P, Marrari P, Cini M. (1993). Effect of ageing on tissue levels of amino acids involved in the nitric oxide pathway in rat brain. *J Neural Transm Gen Sect.* **94**, 21-30.
- Stvolinskii SL, Fedorova TN, Yuneva MO, Boldyrev AA. (2003) Protective effect of carnosine on Cu, Zn-superoxide dismutase during impaired oxidative metabolism in the brain in vivo. *Bull Exp Biol Med.* **135**, 130–132.
- Sugrue M.M, Wang Y, Rideout HJ, Chalmers-Redman RM, Tatton WG. (1999) Reduced mitochondrial membranes potential and altered responsiveness of a mitochondrial membrane megachannel in p-53-induced senescence. *Biochem Biophys Commun.* **261**, 123-130.
- Sultana R, Perluigi M, Butterfield DA. (2006). Redox proteomics identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain and in vivo and in vitro models of AD centered around Abeta (1-42). *J Chromatogr.* **833**, 3-11.
- Sun, A., Liu, M., Nguyen, X. V. & Bing, G. (2003). P38 MAP kinase is activated at early stages in Alzheimer's disease brain. *Exp Neurol.* **183**, 394-405.
- 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**(4), 360-367.
- Sutherland RJ, Rudy JW. (1989) Configural association theory, The role of the hippocampal formation in learning, memory and amnesia. *Psychobiology* **17**, 129-144.

Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A. (1997) Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med.* **22**, 269 – 285.

## T

Tabatabaie T, Floyd RA. (1994) Susceptibility of glutathione peroxidase and glutathione reductase to oxidative damage and the protective effect of spin trapping agents. *Arch Biochem Biophys.* **314**, 112-119

Takeda, T. (2009). Senescence-Accelerated Mouse (SAM) with Special References to Neurodegeneration Models, SAMP8 and SAMP10 Mice. *Neurochem Res.* **34**, 639–659.

Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kituchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K. (1997) Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT1. *Science* **276**, 1699-1702.

Tanila H, Shapiro M, Gallagher M, Eichenbaum H. (1997) Brain aging, changes in the nature of information coding by the hippocampus. *The Journal of Neuroscience* **17**, 5155-5166.

Tateishi N, Shimoda T, Yada N, Shinagawa R, Kagamiishi Y. (2006). S100B, astrocyte specific protein. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* **26**(1), 11-6.

Taube, J.S. (1998) Head direction cells and the neurophysiological basis for a sense of direction. *Prog Neurobiol.* **55**, 225-256.

Taube JS., Muller RV., Ranck JB. (1990). Head direction cells recorded from the postsubiculum in freely moving rats. II. Effects of environmental manipulations. *J Neurosci.* **10**, 436-447.

Terry RD, DeTeresa R, Hansen LA. (1987) Neocortical cell counts in normal human adult aging. *Ann Neurol.* **21**, 530-539.

Thibault, O. and Landfield, P.W. (1996) Increase in single L-type calcium channels in hippocampal neurons during aging. *Science* **272**, 1017–1020

Thinus-Blanc C, Save E, Rossi-Arnaud C, Tozzi A, Ammassari-Teule M, (1996). The differences shown by C57BL/6 and DBA/2 inbred mice in detecting spatial novelty are subserved by a different hippocampal and parietal cortex interplay. *Behav Brain Res.* **80**, 33-40.

Timiras, P.S. 1997. Bases fisiológicas del envejecimiento y Geriatria. Ed. Elsevier. España.

Tissenbaum HA, Guarente L. (2001) Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **410**, 227–230.

Toescu EC, Verkhratsky A, Landfield PW. (2004) Ca<sup>2+</sup> regulation and gene expression in normal brain aging. *Trends Neurosci.* **27**(10), 614-620.

Toescu EC.; (2005) Normal brain ageing, models and mechanisms. *Phil Trans Soc B.* **360**, 2347-2354.

- Tohgi H, Abe T, Yamazaki K, Murata T, Ishizaki E, Isobe C.(1999) Alterations of 3 nitrotyrosine concentration in the cerebrospinal fluid during aging and in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* **269**(1), 52-54.
- Tokumine J, Kakinohana O, Cizkova D, Smith DW, Marsala M. (2003) Changes in spinal GDNF, BDNF, and NT-3 expression after transient spinal cord ischemia in the rat. *J Neurosci Res.* **74** (4), 552–561.
- Toledo, M. (2006). Inflamación y enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol.* **42** (7), 433-438.
- Tomobe K, Nomura Y. (2009) Neurochemistry, neuropathology, and heredity in SAMP8, a mouse model of senescence. *Neurochem Res.* **34** (4), 660-669.
- Tonchev AB, Boneva NB, Kaplamadzhiev DB, Kikuchi M, Mori Y, Sahara S, Yamashima T.(2008) Expression of neurotrophin receptors by proliferating glia in postischemic hippocampal CA1 sector of adult monkeys. *J Neuroimmunol.* **205** (1-2), 20-24.
- Tran H, Brunet A, Grenier JM, Datta SR, Fornace AJ Jr, DiStefano PS, Chiang LW, Greenberg ME.(2002) DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science.* **296** (5567), 530-534.
- Trinei M, Giorgio M, Cicalese A, Barozzi S, Ventura A, Migliaccio E, Milia E, Padura IM, Raker VA, Maccarana M, Petronilli V, Minucci S, Bernardi P, Lanfrancone L, Pelicci PG.(2002) A p53-p66Shc signalling pathway controls intracellular redox status, levels of oxidation-damaged DNA and oxidative stress-induced apoptosis. *Oncogene.* **21**(24), 3872-3878.
- Troen BR. (2003) The biology of aging. *Mt Sinai J Med.* **70**(1), 3-22.
- Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, Bohlooly YM, Gidlof S, Oldfors S, Wibom R, Tornell J, Jacobs HT, Larsson NG.( (2004) Premature ageing in mice expressing defectivemitochondrial DNA polymerase, *Nature* **429** 417–423.
- Tuppo EE, Arias HR. (2005). The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol.* **37**(2), 289-305.
- Turker MS (2000). Somatic cell mutations, can they provide a link between aging and cancer? *Mech Ageing Dev.* **117** (1-3), 1-19.

## U

- Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA. (2001) Control of synapse number by glia. *Science* **291**(5504), 569-570.
- Usuki F, Yasutake A, Umehara F, Tokunaga H, Matsumoto M, Eto K, Ishiura S, Higuchi I. (2001) In vivo protection of a water-soluble derivative of vitamin E, Trolox, against methylmercury-intoxication in the rat. *Neurosci Lett.* **304** (3),199-203.

## V

- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. (2004) Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem.* **266**, 37-56.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telšiser J. (2007) Free radical and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Bioch Cell Bio.* **39**, 44-84.
- van Dam PS, Aleman A. (2004) Insulin-like growth factor-I, cognition and brain aging. *Eur J Pharmacol.* **490** (1-3), 87-95.
- Vargas MR, Peñar M, Cassina P, Estévez AG, Beckman JS, Barbeito L.(2004). Stimulation of nerve growth factor expression in astrocytes by peroxynitrite. *In Vivo.* **18** (3), 269-274.
- Vargha-Khadem F, Gadian DG, Watkins KE, Connolly A, Van Paesschen W, Mishkin M. (1997). Differential effects of early hippocampal pathology on episodic and semantic memory. *Science* **277**, 376-380.
- Vélez-Pardo C, Ospina GG, Jiménez del Río M. (2002). Abeta(25-35) peptide and iron promote apoptosis in lymphocytes by an oxidative stress mechanism, involvement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, caspase-3, NF-kappaB, p53 and c-Jun. *Neurotoxicology* **23**, 351-365.
- 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** (4), 397-409.
- Verkhatsky A, Steinhäuser C. (2000) Ion channels in glial cells. *Brain Res Brain Res Rev.* **32**, 380-412.
- Verkhatsky A, Toescu EC. (2006) Neuronal-glial networks as substrate for CNS integration. *J Cell Mol Med.* **10**, 826-836.
- Vershinin M, Carter BC, Razafsky DS, King SJ, Gross SP. (2007) Multiple-motor based transport and its regulation by Tau. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 87-92.
- Vicens P, Redolat R, Carrasco MC. (2003) Aprendizaje espacial y laberinto de agua, metodología y aplicaciones. *Psicothema* **15** (4), 539-544.
- Vickers JC, Riederer BM, Marugg RA, Buée-Scherrer V, Buée L, Delacourte A, Morrison JH. (1994) Alterations in neurofilament protein immunoreactivity in human hippocampal neurons related to normal aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience* **62**, 1-13.
- Victor M, Agamanolis D. (1990) Amnesia due to lesions confined to the hippocampus , a clinical pathologic study. *J Cogn Neurosci.* **2**, 246-257.
- Vijg, J. (2000). Somatic mutations and aging, a re-evaluation. *Mutation Res.* **447**, 117-135.
- Vijg J, Busuttill RA, Bahar R, Dollé ME. (2005) Aging and genome maintenance. *Ann N Y Acad Sci.* **1055**, 35-47.
- Viña J, Borrás C, Miquel J. ( 2007 ) Theories of ageing. *Life* **59** (4-5), 249-254.

- Vivien D, Ali C. (2006). Transforming growth factor-beta signalling in brain disorders. *Cytokine Growth Factor Rev.* **17** (1-2), 121-128.
- Volicer L, Smith S, Volicer BJ.(1995) Effect of seizures on progression of dementia of the Alzheimer type. *Dementia.* **6** (5), 258-63.
- Volterra A, Meldolesi J. (2005). Astrocytes, from brain glue to communication elements, the revolution continues. *Nat Rev Neurosci.* **6**, 626-640.

## W

- Walsh DM, Hartley DM, Kusumoto Y, Fezoui Y, Condron MM, Lomakin A, Benedek GB, Selkoe DJ, Teplow DB. (1999). Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J Biol Chem.* **274**, 25945–25952.
- Walsh DM, Lomakin A, Benedek GB, Maggio JE, Condron MM, Teplow DB. (1997) Amyloid b-protein fibrillogenesis, Detection of a protofibrillar intermediate. *J Biol Chem.* **272**, 22364–22374.
- Walsh DM, Selkoe DJ. (2007). A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem.* **101** (5), 1172-1184.
- Walsh DM, Selkoe DJ. (2004). Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* **44** (1), 181-193.
- Watake K, Hashimoto K, Kano M, Yamada K, Watanabe M, Inoue Y, Okuyama S, Sakagawa T, Ogawa S, Kawashima N, Hori S, Taki moto M, Wada K, Tanaka K. (1998). Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. *Eur J Neurosci.* **10**, 976–988.
- Wei G, Wu G, Cao X. (2000). Dynamic expression of glial cell line-derived neurotrophic factor after cerebral ischemia. *Neuroreport* **11**(6), 1177-1183.
- Weiner SI., Paul CA., Eichenbaum H. (1989) Spatial and behavioral correlates of hippocampal neuronal activity. *J Neurosci.* **9**, 2737-2763.
- Weiss, S.J. (1989) Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med.* **320**, 365-376.
- West MJ, Coleman PD, Flood DG, Troncoso JC. (1994) Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer disease. *Lancet* **344**,769-772.
- Wevers A, Burghaus L, Moser N, Witter B, Steinlein OK, Schütz U, Achtnitz B, Krempel U, Nowacki S, Pilz K, Stoodt J, Lindstrom J, De Vos RAI, Jansen Steur ENH, Schröder H (2000) Expression of nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease, postmortem investigations and experimental approaches. *Behav Brain Res.* **113**, 207–215
- Whishaw IQ, Gorny B. (1999) Path integration absent in scent-tracking fimbria-fornix rats, Evidence for hippocampal involvement in sense of direction and sense of distance using self-movement cues. *J Neurosci.* **19**, 4662-4673

- Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG. (1982). Alzheimer's disease and senile dementia, loss of neurons in the basal forebrain. *Science* **215**,1237-1239.
- Widmer, R. ,Ziaja I, Grune T. (2006) Protein oxidation and degradation during aging, Role in skin aging and neurodegeneration. *Free Rad Res.* **40**(12), 1259-1268.
- Wilson CC, Faber KM, Haring JH. (1998) Serotonin regulates synaptic connections in the dentate molecular layer of adult rats via 5-HT1a receptors, evidence for a glial mechanism. *Brain Res.* **782** (1-2), 235-9.
- Wilson JX (1997) Antioxidant defense of the brain, a role for astrocytes. *Can J Physiol Pharmacol.* **75**, 1149-63.
- Wimo A, Winblad B, Agüero-Torres H, von Strauss. (2003). The magnitude of dementia occurrence in the world. *Alz Diss Assoc Disord.* **17**, 63-67.
- Winocur G, Moscovitch M, Rosenbaum RS, Sekeres M. (2008). A study of remote spatial memory in aged rats. *Neurobiol Aging.* 2008 May 1. [Epub ahead of print]
- Winterbourn CC, Vissers MC, Kettle AJ. (2000) Myeloperoxidase. *Curr Opin Hematol.* **7** (1), 53–8.
- Wischik, C. M., Lai, R. Y. K. & Harrington, C. R. (1997). Modelling prion-like processing of tau protein in Alzheimer's disease for pharmaceutical development. In *Brain Microtubule Associated Proteins* (eds. J. Avila, R. Brandt and K. S. Kosik), pp. 185-241. Switzerland, Harwood
- Wise PM, Krajnak KM, Kashon ML.(1996) Menopause, the aging of multiple pacemakers. *Science* **273**, 67 – 70.
- Wishaw, I.Q., Maaswinkel, H. 1998. Rats with fimbria-fornix lesions are impaired in path integration, a role of the hippocampus in sense of direction. *J Neurosci.* **18**, 3050-3058.
- Wojda U, Salinska E, Kuznicki J. (2008) Calcium ions in neuronal degeneration. *IUBMB Life.* **60** (9), 575-90.
- Wong YT, Ruan R, Tay FE. (2006) Relationship between levels of oxidative DNA damage, lipid peroxidation and mitochondrial membrane potential in young and old F344 rats. *Free Radic Res.* **40** (4), 393-402.
- Wood ER, Dudchenko PA. (2003). Aging, spatial behavior and the cognitive map. *Nat Neurosci.* **6** (6), 546-548.
- Worsley CL, Recce M, Spiers HJ, Marley J, Polkey CE, Morris RG. (2001) Path integration following temporal lobectomy in humans. *Neuropsychologica.* **39**, 452-464.

## X

- Xie L, Helmerhorst E, Taddei K, Plewright B, Van Bronswijk W, Martins R. (2002). Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. *J Neurosci.* **22**, RC221
- Xu W, Qiu C, Winblad B, Fratiglioni L. (2007). The effect of borderline diabetes on the risk of dementia and Alzheimer's disease. *Diabetes.* **56** (1), 211-216.

## Y

- Yan SD, Stern DM. (2005) Mitochondrial dysfunction and Alzheimer's disease, role of amyloid- $\beta$  peptide alcohol dehydrogenase (ABAD). *Int J Exp Pathol.* **86**, 161-71.
- Yan SD, Yan SF, Chen X, Fu J, Chen M, Kuppusamy P. (1995) Nonenzymatically glycosylated tau in Alzheimer's disease induces neuronal oxidant stress resulting in cytokine gene expression and release of amyloid  $\beta$ -peptide. *Nat Med.* **1**, 693-699.
- Yasui F, Ishibashi M, Matsugo S, Kojo S, Oomura Y, Sasaki K. (2003). Brain lipid hydroperoxide level increases in senescence-accelerated mice at an early age. *Neurosci Lett.* **350** (1), 66-68.
- Yoneda M, Katsumata K, Hayakawa M. (1995) Oxygen stress induces an apoptotic cell death associated with fragmentation of mitochondrial genome. *Biochem Biophys Res Commun.* **209**, 723 – 729.
- Yunis EJ, Salazar M. (1993) Genetics of life span in mice. *Genetica* **91**, 211 – 223.

## Z

- Zakzanis KK, Quintin G, Graham SJ, Mraz R. (2009). Age and dementia related differences in spatial navigation within an immersive virtual environment. *Med Sci Monit.* **15** (4), CR140-CR150.
- Zecca L, Youdim MB, Riederer P, Connor JR, Crichton RR. (2004) Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci.* **5**, 863-873.
- Zhang J, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH. (1994). Nitric oxide activation of poly (ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science* **263**, 687-689.
- Zhang Y, McLaughlin R, Goodyer C, LeBlanc A. (2002) Selective cytotoxicity of intracellular amyloid  $\beta$  peptide 1-42 through p53 and Bax in cultured primary human neurons. *J Cell Biol.* **156** (3), 519-529.
- Zhu X, Rottkamp C A, Boux H, Takeda A, Perry G, Smith MA. (2000) Activation of p38 kinase links tau phosphorylation, oxidative stress, and cell cycle-related events in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* **59**, 880-888.
- Zilka N, Ferencik M, Hulin, I. (2006) Neuroinflammation in Alzheimer's disease, protector or promoter? *Bratisl Lek Listy* **107** (9-10), 374-383.