



Trabajo Fin de Máster

---

# ***Caracterización de neuronas hiperploides. Implicación en la enfermedad de Alzheimer***

Autora: Bérénice Fontana Pujol

Director: José María Frade López

Afiliación: Instituto Cajal,  
Avda Doctor Arce 37, Madrid.

Madrid, 1 de junio de 2019

---



José María Frade López

Instituto Cajal (CSIC)

Avda Doctor Arce 37, Madrid

Como Director del Trabajo Fin de Master titulado “Caracterización morfológica de neuronas hiperploides y sus implicaciones en la Enfermedad de Alzheimer” que ha realizado bajo nuestra supervisión Dña. Bérénice Fontana Pujol como parte de sus trabajos para la obtención del Título de Máster en Neurociencia por la Universidad Autónoma de Madrid,

DECLARO:

- Que reúne los méritos suficientes para poder ser presentado y defendido públicamente.
- Que el uso de animales utilizados en este TFM, está amparado por la autorización del Comité de Ética del CSIC.

Madrid, 1 de septiembre de 2019

Fdo.: José María Frade

## ABREVIATURAS

<b>A<math>\beta</math></b>	$\beta$ -amiloide ( <i>Amyloid Beta</i> )
<b>APP</b>	Proteína Precursora del Amiloide ( <i>Amyloid Precursor Protein</i> )
<b>BrdU</b>	Bromodeoxiuridina
<b>CDKs</b>	Kinasas Dependientes de Ciclinas ( <i>Cycline-dependent Kinase</i> )
<b>EA</b>	Enfermedad de Alzheimer
<b>LTA<sub>g</sub></b>	Antígeno T de SV40 ( <i>SV40 Large T Antigen</i> )
<b>MAP</b>	Proteína asociada a microtúbulos ( <i>Microtubule-Associated Protein</i> )
<b>MT</b>	Microtúbulos
<b>ON</b>	Ovillos neurofibrilares
<b>Rb</b>	Retinoblastoma
<b>ROS</b>	Especies Reactivas de Oxígeno ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central

## TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN .....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	2
1.1. Enfermedad de Alzheimer .....	2
1.2. Aspectos clínicos .....	2
1.3. Aspectos neuropatológicos .....	3
1.3.1. Ovillos neurofibrilares.....	3
1.3.2. Placas amiloides .....	4
1.4. Progresión de la EA .....	5
1.5. Diagnóstico .....	7
1.6. Genética de la EA .....	8
1.7. Hipótesis .....	8
1.7.1. Hipótesis colinérgica .....	8
1.7.2. Hipótesis amiloide.....	9
1.7.3. Hipótesis tau.....	10
1.7.4. Otras hipótesis .....	11
1.8. Enfermedad de Alzheimer y el ciclo celular .....	12
1.8.1. Regulación del ciclo celular .....	12
1.8.2. Hipótesis del ciclo celular .....	13
1.8.3. Estudio de reactivación del ciclo en neuronas .....	15
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	16
3.1. Modelo de estudio.....	16
3.2. Cultivos celulares y material de cultivo .....	16
3.3. Lipofección .....	17
3.4. Infección con lentivirus.....	17
3.5. Transformación y minipreparaciones de plásmidos .....	18
3.6. Inmunofluorescencia indirecta .....	19
3.7. Análisis Sholl .....	19
3.8. Procesamiento de imágenes y análisis estadístico.....	19
4. RESULTADOS .....	20
4.1. Incorporación de BrdU .....	20
4.2. Área nuclear .....	21
4.3. Tamaño del soma .....	22
4.4. Longitud del árbol dendrítico.....	22
4.5. Grado de ramificación.....	24
4.6. Caracterización lentivirus .....	24
4.7. Supervivencia neuronal.....	25

4.8.	Incorporación de BrdU .....	26
5.	DISCUSIÓN .....	27
5.1.	Reactivación del ciclo celular y síntesis de ADN .....	28
5.2.	Caracterización morfológica .....	29
5.3.	Caracterización lentiviral .....	30
6.	CONCLUSIONES .....	31
7.	BIBLIOGRAFÍA .....	32

## RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es uno de los tipos de demencia más comunes, ya que representa alrededor de un 70% de los casos diagnosticados. Se caracteriza principalmente por una pérdida progresiva de memoria, así como por alteraciones en funciones esenciales para la autonomía de las personas afectadas. A nivel histopatológico, la EA se caracteriza por la acumulación en el cerebro de agregados de amiloide y de la proteína tau hiperfosforilada, en base a lo cual se han planteado varias hipótesis acerca del posible origen de la EA, siendo las principales la hipótesis tau y la hipótesis amiloide. Sin embargo, estas últimas no logran explicar todos los aspectos de la enfermedad, y las terapias basadas en ellas no han tenido el efecto esperado, lo que hace necesario el planteamiento de nuevas hipótesis. Una de ellas es la hipótesis del ciclo celular, según la cual la presencia de neuronas tetraploides en el cerebro de los pacientes de Alzheimer con una frecuencia superior a la habitual podría estar relacionada con la degeneración neuronal propia de la enfermedad. En este estudio, nos planteamos la hipótesis de que la reactivación del ciclo en neuronas postmitóticas puede inducir cambios morfológicos y funcionales, implicados en último término en la alteración sináptica y degeneración neuronal. Para demostrarlo, inducimos la reactivación del ciclo mediante la expresión de LTA<sub>g</sub> en neuronas corticales y llevamos a cabo diferentes análisis a nivel morfológico. Para demostrar que los resultados se deben a la reactivación del ciclo celular y no a efectos indirectos de LTA<sub>g</sub>, empleamos como control una forma mutante de LTA<sub>g</sub>, denominada K1, que es incapaz de interactuar con Rb. Como resultado, en este estudio confirmamos que LTA<sub>g</sub> es capaz de inducir la síntesis de ADN en neuronas maduras, medida mediante la incorporación de BrdU, y demostramos que el aumento en la ploidía se ve acompañado por un incremento en el tamaño del núcleo y del soma neuronal. Además, observamos que las neuronas hiperploides tratadas con LTA<sub>g</sub> presentan un árbol dendrítico menos ramificado y de menor longitud. Junto con estudios llevados a cabo con anterioridad en nuestro laboratorio, en los que se ha visto que las neuronas hiperploides también presentan alteraciones en la densidad de PSD-95 y un acortamiento del segmento inicial del axón, nuestros resultados podrían explicar algunas de las alteraciones a nivel cognitivo y sináptico observadas en la EA. Por otra parte, nos propusimos caracterizar la expresión de una construcción lentiviral de LTA<sub>g</sub> para su uso en experimentos *in vivo*. En este sentido, comprobamos que la construcción lentiviral también permite inducir síntesis de ADN en neuronas *in vitro*, pero a una frecuencia inferior a la observada en los experimentos de lipofección, probablemente debido a la muerte de las neuronas infectadas antes de los tiempos analizados.

**Palabras clave:** Enfermedad de Alzheimer, Ciclo celular, Tetraploidización neuronal, Neurodegeneración.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una de las enfermedades neurodegenerativas más comunes, ya que representa más del 60% de casos de demencia diagnosticados en los países occidentales (Rizzi *et al.*, 2014). Se caracteriza por la aparición de fallos cognitivos, funcionales y comportamentales que progresivamente se vuelven más severos e incapacitantes, resultando en la dependencia total de la persona afectada. En Europa, la prevalencia de la EA es del 4,4% en personas con más de 65 años, y en Estados Unidos del 9.7% (Qiu *et al.*, 2009). Sin embargo, se estima que la prevalencia siga subiendo, llegando a ser hasta cuatro veces superior en 2050. Esto tiene grandes repercusiones económicas, ya que el coste de la demencia a nivel global es de unos 600 billones de euros al año (Wimo *et al.*, 2013), siendo a veces superior al de enfermedades como el cáncer o problemas cardiovasculares.

En la enfermedad se pueden distinguir dos etapas antes de la aparición de la demencia: una etapa preclínica larga, en la que se producen una serie de cambios neuropatológicos; y una etapa sintomática o prodrómica, caracterizada por el declive cognitivo que precede a la demencia (Dubois *et al.*, 2016). Se estima que las alteraciones neuropatológicas empiezan a producirse hasta 10 o 20 años antes de la aparición de síntomas clínicos, lo que dificulta el tratamiento de la enfermedad una vez diagnosticada. Aproximadamente el 95% de casos son de aparición tardía (> 60-65 años) y el 5% de aparición temprana (< 65 años), de los cuales el 60% son de origen familiar (Bekris *et al.*, 2010).

### 1.2. Aspectos clínicos

Los problemas clínicos observados en los pacientes con la EA son muy variables de unos sujetos a otros. Sin embargo, una de las características más comunes de la enfermedad es la aparición de problemas de memoria que pueden pasar desapercibidos durante largos periodos de tiempo, siendo atribuidos al propio envejecimiento normal de la persona o disimulados por el paciente. En consecuencia, suele producirse un retraso entre la aparición de los primeros síntomas y el momento del diagnóstico, estimado en una media de 3 años (Knopman *et al.*, 2000).

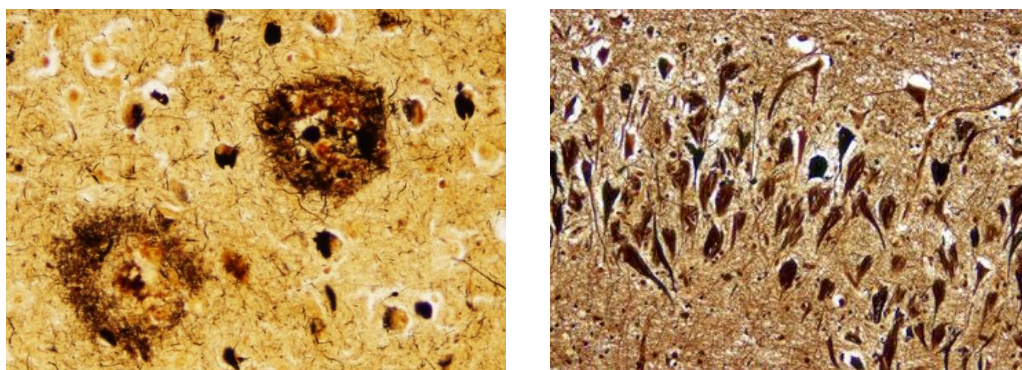
En los primeros estadios de la enfermedad se ve afectada principalmente la memoria episódica, produciéndose una pérdida de recuerdos acerca de eventos de la vida cotidiana, con olvidos repetidos inhabituales y dificultades en el aprendizaje de nueva información. También son comunes los defectos en la memoria espacial, haciendo que los pacientes se pierden con facilidad; y pueden aparecer problemas de lenguaje, como dificultades a la hora de nombrar objetos o elegir la palabra adecuada, aunque estos últimos tienden a aparecer en etapas más avanzadas de la enfermedad (Bianchetti y Trabucchi, 2001). Además de problemas de lenguaje, la evolución de la EA va acompañada por la aparición de otros problemas cognitivos, como problemas de percepción (agnosia), habilidades gestuales (apraxia), cálculo y atención; además de alteraciones en funciones más complejas, como las funciones ejecutivas, que permiten a los pacientes tener iniciativa y llevar a cabo tareas de manera sucesiva y

organizada. La evolución de la enfermedad también está marcada por problemas de razonamiento que resultan en las alteraciones de comportamiento propias de la enfermedad (Soto *et al.*, 2007). Todos estos síntomas se encuentran recogidos entre los criterios de diagnóstico de la enfermedad (McKhann *et al.*, 1984).

Por otra parte, la EA también se caracteriza por la aparición de síntomas no cognitivos, que se hacen evidentes en etapas tardías de la enfermedad y dificultan el cuidado de los pacientes. En este sentido, es común que las personas afectadas por la EA sufran cambios repentinos de humor, con síntomas depresivos y ansiosos además de alternancia entre periodos de agitación y apatía. También es común la aparición de alucinaciones o ideas delirantes, los problemas de sueño y problemas de apetito (Cummings *et al.*, 1994).

### 1.3. Aspectos neuropatológicos

Los principales cambios neuropatológicos que ocurren en la EA son la aparición de placas extracelulares de  $\beta$ -amiloide y la acumulación de ovillos neurofibrilares (ON) intracelulares de proteína tau hiperfosforilada (Figura 1). Como se describirá más adelante, estos cambios afectan de diferente manera a zonas corticales y subcorticales implicadas en la memoria y el aprendizaje, como la corteza entorrinal, el hipocampo, la amígdala y determinadas capas del neocórtex, avanzando a medida que progresa la enfermedad (Braak y Braak, 1991; Thal *et al.*, 2002).



**Figura 1. Alteraciones neuropatológicas propias de la EA.** Placas seniles de  $\beta$ -amiloide (izquierda) y ON (derecha). Tinción de Bielschowsky. Fuente: *Neuropathology.web.org*.

#### 1.3.1. Ovillos neurofibrilares

Los ON están constituidos por la proteína tau, una proteína asociada a microtúbulos (MAP, del inglés: *Microtubule Associated Protein*) codificada por el gen MAPT. En condiciones normales, la proteína se encuentra localizada principalmente en el axón de las neuronas maduras, aunque también puede encontrarse en menor medida en las dendritas. Interacciona con varias proteínas, llevando a cabo



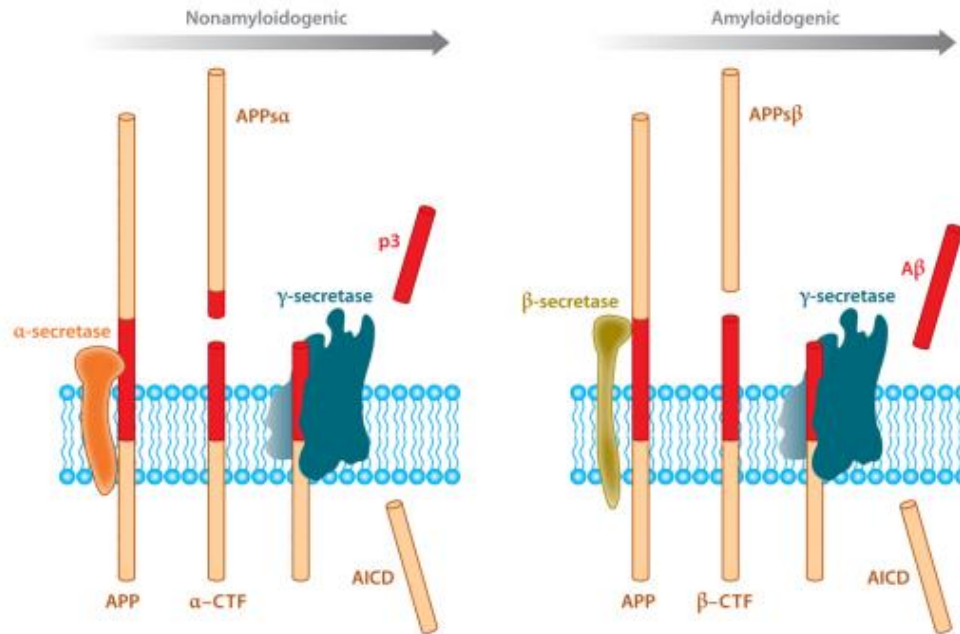
funciones importantes de estabilización de microtúbulos (MT) y transporte a través de los mismos (Brandt y Leschik, 2004).

El principal factor que diferencia la proteína tau normal de la observada en los pacientes de Alzheimer es su hiperfosforilación. La isoforma más larga de la proteína tau humana contiene 80 residuos de serina y treonina y 5 residuos de tirosina, pudiendo ser todos ellos potencialmente fosforilados. En condiciones normales, tau contiene entre dos y tres grupos fosfato (Lippens *et al.*, 2007), pero en la EA se encuentra hasta tres veces más fosforilada. Se piensa que la fosforilación de tau en residuos específicos, como la Tyr18, la Ser231 o la Ser199 puede influir en la progresión de la enfermedad (Neddens *et al.*, 2018). De cualquier manera, la hiperfosforilación de tau aumenta la capacidad de la proteína de interaccionar consigo misma, formándose una serie de agregados que van desde oligómeros a fibrillas y finalmente ON. Esto regula negativamente la interacción de tau con los MT, comprometiendo la estabilidad de los mismos y el transporte axonal. Además, la proteína tau hiperfosforilada interfiere con la función neuronal normal, alterando la respiración y dinámica mitocondrial (DuBoff *et al.*, 2013).

### 1.3.2. Placas amiloides

Las placas amiloides están constituidas por  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ , del inglés: *Amyloid Beta*), un péptido de 38-42 aminoácidos, muy resistente a la degradación proteolítica, generado a partir de un precursor de mayor tamaño, la proteína precursora del amiloide (APP, del inglés: *Amyloid Precursor Protein*). El gen APP se encuentra en el cromosoma 21 y puede ser procesado mediante splicing alternativo, dando lugar a diferentes isoformas (Octave, 1995). La isoforma predominante en el cerebro es una proteína transmembrana de tipo I que contiene 695 aminoácidos: APP695 (Kang *et al.*, 1987).

La proteína APP puede ser procesada través de dos rutas (Figura 2). La primera ruta es la no amiloidogénica, en la que APP es procesada en primer lugar por la  $\alpha$ -secretasa, que corta el péptido APP dentro de la secuencia  $A\beta$  e impidiendo por lo tanto la liberación del mismo. Como resultado, se generan una forma soluble de APP ( $sAPP\alpha$ ) y un fragmento C-terminal ( $CTF\alpha$ ). La ruptura de  $CTF\alpha$  por la  $\gamma$ -secretasa produce la liberación de un péptido, conocido como péptido p3, y del dominio c-terminal intracelular de APP (AICD). La segunda es la ruta amiloidogénica, en la que APP es procesado de manera secuencial por la  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasa. La  $\beta$ -secretasa actúa en primer lugar, liberando una forma soluble de APP ( $sAPP\beta$ ) y  $CTF\beta$ . Este último es cortado a continuación por la  $\gamma$ -secretasa para producir  $A\beta$  (Pierrot *et al.*, 2008). La isoforma de  $A\beta$  presente en las placas amiloides asociadas a la enfermedad es  $A\beta_{42}$ , y constituye entre el 5 y el 10% del total del  $A\beta$  que se produce (Gouras *et al.*, 2000). La naturaleza hidrofóbica de los péptidos, en particular de  $A\beta_{42}$ , permite que agreguen consigo mismos y formen una gran cantidad de especies, como dímeros, oligómeros de bajo peso molecular, protofibrillas y placas de amiloide.

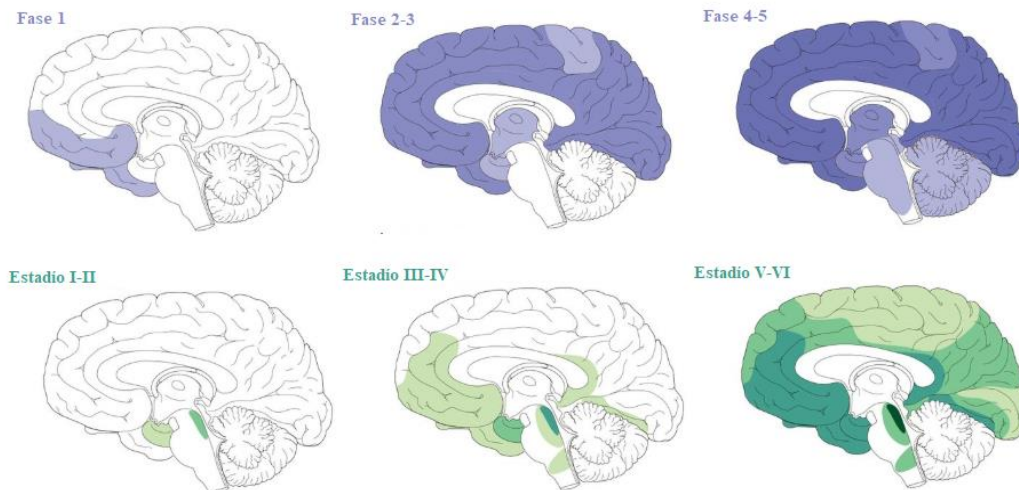


**Figura 2. Procesamiento de APP.** En la ruta no amiloidogénica participa la  $\alpha$ -secretasa seguida por la  $\gamma$ -secretasa. En la ruta amiloidogénica, el procesamiento de APP es llevado a cabo por la  $\beta$ -secretasa y la  $\gamma$ -secretasa. En ambos casos se generan dominios extracelulares solubles y dominios intracelulares C-terminal. Fuente: *O'Brien and Wong, 2011*.

#### 1.4. Progresión de la EA

Como se mencionó anteriormente, las alteraciones neuropatológicas propias de la EA van progresando a través de diferentes áreas del cerebro siguiendo diferentes patrones. Los depósitos de amiloide se describen mediante los estadios Thal, y avanzan desde las cortezas de asociación (Thal 1) hasta regiones allocorticales (Thal 2-5) (Thal *et al.*, 2002). Por otra parte, para describir el avance los ON se emplean los estadios Braak. En etapas tempranas de la enfermedad, estos últimos están presentes en las neuronas de la capa II de la corteza entorrinal, progresando a continuación hacia regiones anatómicas relacionadas, como el hipocampo y la amígdala, y finalmente a capas más profundas (III, V y VI) del neocórtex (Braak y Braak, 1991; Braak y Braak, 1995; Morrison y Hof, 1997) (Figura 3).

En el caso de los depósitos de amiloide, se han descrito cinco fases diferentes (Thal *et al.*, 2002). La primera fase se caracteriza por la presencia de depósitos de A $\beta$  exclusivamente en el neocórtex. A continuación, en la segunda fase los depósitos avanzan hacia regiones allocorticales, y en la fase tres aparecen también en los núcleos de diencefalo, el estriado y los núcleos colinérgicos del prosencéfalo basal. En la fase cuatro se ven afectados varios núcleos del tronco cerebral, y finalmente la fase cinco se caracteriza por la aparición de depósitos de amiloide en el cerebelo.



**Figura 3. Progresión de la EA.** En morado se muestra la progresión de los depósitos de amiloide medida mediante las fases Thal. En verde se muestra la progresión de las alteraciones de tau, descrita mediante los estadios Braak. *Fuente: Goedert, 2015.*

Sin embargo, la distribución y densidad del amiloide muestran una gran variabilidad intra e interindividual, por lo que presenta una menor relevancia a la hora de diferenciar los estadios neuropatológicos. En su lugar, se han establecido una serie de estadios, conocidos como estadios Braak (Braak y Braak, 1985), basados en la progresión de las alteraciones neurofibrilares, ya que muestran una menor variabilidad entre individuos.

En el estadio Braak I se ve afectada la región transentorrinal de la corteza en la capa superficial, conocida como capa Pre- $\alpha$ , en la que las neuronas de proyección empiezan a desarrollar ON. Estas alteraciones se agravan en el estadio Braak II, en el que también aparecen algunas alteraciones en la región CA1 del hipocampo. Como en Braak I y II se ve afectada principalmente la región transentorrinal de la corteza, habiendo pequeñas alteraciones en el hipocampo y ausencia de las mismas en el isocórtex, estos estadios se conocen como los estadios transentorrinales.

En Braak III, la capa Pre- $\alpha$  de la región transentorrinal y entorrinal se encuentra afectada en mayor medida, y pueden observarse los llamados “ovillos fantasma” (ON extracelulares debido a la muerte de las neuronas que los contenían). Los ovillos también se pueden observar en las capas Pri- $\alpha$  y Pre- $\beta$ . El hipocampo se encuentra levemente afectado, pero el isocórtex permanece libre de alteraciones. En Braak IV, las alteraciones se acentúan en la región CA1 del hipocampo y empiezan a verse afectadas las neuronas de CA4 cercanas a la fascia dentada. También se observan ciertas alteraciones en la amígdala, el tálamo, el claustró, el putamen y el núcleo accumbens. En consecuencia, Braak III y IV se conocen como los estadios límbicos. Estas alteraciones correlacionan con la aparición de los primeros síntomas cognitivos a nivel clínico.

En Braak V, las capas Pre- $\alpha$  y Pri- $\alpha$ , junto con las capas Pre- $\beta$  y Pre- $\gamma$ , están severamente afectadas; y se observan alteraciones en todas las regiones de la formación parahipocampal. Sin embargo, la característica principal de Braak V es la aparición de alteraciones neurofibrilares en todas las áreas isocorticales de asociación. Las áreas sensoriales primarias y el campo motor primario permanecen relativamente libres, mostrando leves alteraciones en las capas III y V. Llegados a este punto, los pacientes empiezan a sufrir déficits en funciones instrumentales, como el lenguaje o la capacidad visuoespacial. Por último, Braak VI se caracteriza por el agravamiento de todos los cambios anteriores, con la implicación de las áreas sensoriales y motoras primarias y el sistema extrapiramidal, con alteraciones en el estriado y sustancia nigra. Como en Braak V y VI el isocórtex se encuentra gravemente afectado, los dos últimos estadios se conocen como estadios isocorticales.

### 1.5. Diagnóstico

El diagnóstico clínico inicial de la EA se lleva a cabo cuando los pacientes presentan un declive cognitivo progresivo durante un mínimo de 6 meses. Sin embargo, muchas otras enfermedades también muestran alteraciones en la memoria, por lo que es esencial descartar otras posibles causas de declive cognitivo, en particular otras demencias. Para ello, la evaluación del estado cognitivo se lleva a cabo mediante diferentes test que tienen en cuenta la memoria, el lenguaje y la orientación visuoespacial; así como la información aportada por los familiares y cuidadores. Otros aspectos importantes para el diagnóstico incluyen déficits en dos o más áreas cognitivas, atrofia hipocampal (por tomografía computarizada (CT) o resonancia magnética (MRI)) y ausencia de otras enfermedades sistémicas o metabólicas (Dubois *et al.*, 2009).

Sin embargo, a nivel clínico y durante la vida de los pacientes sólo se puede diagnosticar un “Alzheimer probable”, ya que el diagnóstico definitivo sólo puede hacerse *post mortem* mediante la identificación de las alteraciones neuropatológicas propias de la enfermedad. Técnicas más recientes basadas en la tomografía de emisión de positrones (PET) o (SPECT) permiten identificar marcadores de la enfermedad, como el amiloide o tau, y mejorar la precisión del diagnóstico (Pietrzak *et al.*, 2018).

Como se mencionó anteriormente, los pacientes de Alzheimer empiezan a experimentar alteraciones neuropatológicas en el cerebro hasta 20 años antes de la aparición de los primeros síntomas cognitivos. En consecuencia, cuando se diagnostica la enfermedad suele ser demasiado tarde para detener su progresión, y los tratamientos sólo tienen efecto a nivel sintomático. Por ello, es fundamental desarrollar técnicas y marcadores que permitan diagnosticar la enfermedad en sus etapas iniciales, así como terapias preventivas destinadas a frenar la enfermedad desde la aparición de las primeras alteraciones. Para ello, es fundamental seguir profundizando en el conocimiento de la enfermedad y en sus posibles causas de aparición.

## 1.6. Genética de la EA

Conocer los genes implicados en el Alzheimer es fundamental a la hora de desarrollar hipótesis y modelos animales para el estudio de la enfermedad.

Las principales mutaciones identificadas son las que se producen en los casos familiares de la EA, que tienen lugar en los genes autosómicos dominantes que codifican para APP y la preselinina (PSEN 1 y PSEN 2) y por lo tanto alteran la producción del péptido A $\beta$ . Se han identificado diferentes mutaciones en el gen APP (Hall y Roberson, 2012), siendo una de las más comunes la mutación Swedish, que tiene lugar en el sitio de corte de la  $\beta$ -secretasa y resulta en una mayor producción de A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42. También pueden producirse mutaciones en el lugar de corte de la  $\gamma$ -secretasa o dentro de la propia secuencia del A $\beta$ ; además de duplicaciones del gen que producen Alzheimer de aparición temprana. En cuanto a PSEN 1 y PSEN 2, las mutaciones producen un aumento en la producción de A $\beta$ 42 con respecto a A $\beta$ 40, además de alteraciones en otras funciones no relacionadas con el procesamiento del amiloide (Duff *et al.*, 1996).

Además de las mutaciones autosómicas dominantes, se producen mutaciones en genes como APOE, BIN1, CLU o PICALM (Giri *et al.*, 2016). Las mutaciones en estos genes se consideran factores de riesgo de la enfermedad. El más común es el gen APOE, que codifica para la apolipoproteína E y presenta diferentes alelos. El alelo APOE4 aumenta el riesgo de desarrollar Alzheimer, ya que aumenta la producción de A $\beta$ , mientras que el alelo APOE2 presenta un papel protector (Liu *et al.*, 2017).

## 1.7. Hipótesis

Actualmente existen diferentes hipótesis acerca del origen de la EA. Las principales son la hipótesis colinérgica, la hipótesis amiloide y la hipótesis que hace referencia a la patología tau; pero se han descrito otros procesos que pueden estar relacionados con la enfermedad, como fallos mitocondriales, estrés oxidativo, procesos de inflamación, apoptosis y alteraciones en el ciclo celular (Alves *et al.*, 2012).

### 1.7.1. Hipótesis colinérgica

La hipótesis colinérgica fue la primera aproximación que se empleó para describir la patofisiología de la EA. Según esta hipótesis, la pérdida selectiva de fibras de neuronas colinérgicas en el hipocampo, córtex frontal, amígdala, núcleos basales y septum medio que se observa en cerebros de pacientes con la EA explica las alteraciones en la conciencia, atención, memoria y otros procesos mnemónicos propios de la enfermedad (Francis *et al.*, 1999). Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que antagonistas muscarínicos no selectivos, como la escopolamina, inducen alteraciones cognitivas, favorecen la producción de A $\beta$  y disminuyen la actividad de la  $\alpha$ -secretasa (Lee *et al.*, 2018); mientras que agonistas muscarínicos selectivos y no selectivos mejoran el aprendizaje y la memoria (Bubser *et al.*, 2011; Terry y Buccafusco, 2003). Por otra parte, la excitotoxicidad causada por anomalías en la neurotransmisión de glutamato que se observa en la EA también puede explicarse mediante esta

hipótesis, debido a la estrecha relación existente entre el sistema colinérgico y glutamatérgico (Sanabria-Castro *et al.*, 2017).

Algunas de las alteraciones que afectan a las neuronas colinérgicas son problemas en la liberación y captación de acetilcolina, déficits en la expresión de receptores nicotínicos y muscarínicos y déficits en el transporte axonal (Shen y Wu, 2015). En base a ello, una gran parte de las estrategias terapéuticas que se emplean actualmente en el tratamiento de la enfermedad tienen como diana el sistema colinérgico. Entre ellos, los inhibidores de la colinesterasa permiten incrementar los niveles de acetilcolina en la hendidura sináptica y mejorar los síntomas cognitivos parcialmente, pero sólo muestran efectos positivos durante un periodo de tiempo corto y no alteran la progresión de la enfermedad. Por otra parte, los agonistas de receptores muscarínicos parecen presentar efectos importantes a nivel cognitivo, psiquiátrico y sobre la patología tau y amiloide (Ferreira-Vieira *et al.*, 2016). Sin embargo, estas estrategias terapéuticas sólo presentan un efecto a nivel sintomático, y la hipótesis colinérgica no explica de por sí cuál puede ser la causa que se encuentra detrás de la degeneración neuronal en la EA.

### **1.7.2. Hipótesis amiloide**

La hipótesis amiloide establece que la causa principal de la EA es una alteración en la secreción del péptido A $\beta$ , produciéndose un desequilibrio entre su producción y eliminación que conlleva la acumulación del péptido en el cerebro. Según esta hipótesis, la mayor parte de las alteraciones observadas en la EA estarían causadas por el péptido A $\beta$ .

En relación a la toxicidad del amiloide, en los últimos años se ha visto que son los oligómeros de bajo peso molecular y no las placas los que mejor correlacionan con la enfermedad (Naslund *et al.*, 2000; Walsh y Selkoe, 2004). Se ha demostrado que los oligómeros de A $\beta$  y las protofibrillas ejercen su toxicidad a través de las sinapsis, mediante su interacción con la superficie celular y los receptores presentes en la misma. En concreto, se ha visto que A $\beta$  regula negativamente el número de receptores NMDA en la postsinapsis (Parsons y Raymond, 2014), ya que la exposición de neuronas a oligómeros de A $\beta$  aumenta la internalización de los receptores NMDA, disminuyendo su expresión en la superficie. Esto resulta en una disminución del flujo de Ca<sup>2+</sup> hacia las espinas dendríticas, causando la retracción de las mismas (Shankar *et al.*, 2007). También se ha visto recientemente que los oligómeros pueden inducir apoptosis mediante la activación del factor de transcripción 4 (ATF4) (Baleriola *et al.*, 2014).

Con respecto a las causas de acumulación de A $\beta$ , se ha visto que mutaciones en los genes que codifican para APP y los componentes de la  $\gamma$ -secretasa, PSEN1 y PSEN2, resultan en un incremento en la producción de péptido, principalmente de A $\beta$ 42, estando relacionados principalmente con el Alzheimer de aparición temprana (Lanoiselée *et al.*, 2017). Sin embargo, el mecanismo por el que ocurre la acumulación excesiva de A $\beta$  en la forma esporádica de la enfermedad no está claro, pero podría



explicarse por fallos en la eliminación del A $\beta$  o pequeños aumentos en su producción a lo largo de un periodo de tiempo prolongado (Mawuenyega *et al.*, 2010).

La eliminación del A $\beta$  presente en el cerebro se lleva a cabo de varias maneras, siendo una de ellas su transporte a través de la barrera hematoencefálica. Este transporte se lleva a cabo principalmente mediante la interacción de A $\beta$  con receptores LRP-1 (*lipoprotein receptor protein 1*) y la acción de glicoproteínas, por lo que incrementos en la producción de A $\beta$  y disminuciones en la expresión de los receptores LRP-1 debidas a la edad pueden resultar en la acumulación del péptido A $\beta$  en el sistema nervioso central (SNC). El transporte también ocurre a través de otros receptores, conocidos como RAGE (receptores para compuestos de glicosilación avanzada), cuya expresión depende de los niveles de expresión de su ligando, de modo que aumenta al acumularse A $\beta$  en el cerebro (Deane, 2004). La interacción del péptido A $\beta$  con RAGE causa respuestas inflamatorias en el endotelio, apoptosis de las células endoteliales, reducción del flujo cerebral, por lo que podría explicar las alteraciones neurovasculares observadas en la EA.

Por otra parte, la degradación proteolítica del péptido A $\beta$  es llevada a cabo por la neprilisina (NEP) y la enzima degradadora de insulina (IDE) (Barranello *et al.*, 2015), cuya expresión también disminuye con la edad y contribuye a la acumulación de A $\beta$  en el cerebro. En concreto, en pacientes con la EA se ha visto que la expresión de estas dos enzimas es menor en la corteza y el hipocampo con respecto a los controles (Miners *et al.*, 2009). El péptido APP también puede ser eliminado mediante autofagia, por lo que fallos en el proceso de autofagia neuronal también podrían estar relacionados con la acumulación de A $\beta$  y con la enfermedad (Ntsapi *et al.*, 2018).

En base a esta teoría se han desarrollado diferentes tratamientos que se centran en la reducción del A $\beta$ . Se han desarrollado fármacos que actúan a nivel de la producción del amiloide (mediante inhibidores de la  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasa o mediante la sobre activación de la  $\alpha$ -secretasa), tratamientos que tienen como objetivo su eliminación una vez depositado (inmunoterapia) (Aisen, 2005) o fármacos que tienen por objetivo impedir su oligomerización (Kozin *et al.*, 2018).

Sin embargo, actualmente esta hipótesis presenta una gran controversia, ya que no puede explicar la existencia de personas sin demencia que presentan acumulación de A $\beta$  y de personas con alteraciones cognitivas que presentan EA, pero no muestran alteraciones en la producción de A $\beta$  (Nelson *et al.*, 2012). Además, los ensayos clínicos destinados a reducir la producción de A $\beta$  llevados a cabo hasta el momento no han dado resultado.

### **1.7.3. Hipótesis tau**

Según esta hipótesis, es la proteína tau patogénica y no el amiloide la causa final de la degeneración neuronal, ya que la presencia y concentración de tau correlaciona mejor con los síntomas clínicos y cognitivos observados en la EA (Kametani y Hasegawa, 2018). Además, la existencia de otras enfermedades neurodegenerativas, conocidas como taupatías, en las que también hay se encuentran ON

(Arendt *et al.*, 2016), sugiere que las anomalías en tau y su acumulación pueden ser las causantes de la degeneración neuronal. Como se mencionó anteriormente, el principal mecanismo mediante el cual tau causa degeneración es mediante la alteración del tráfico y transporte axonal. Además, tau causa la inhibición de diferentes proteasas, alterando el funcionamiento celular y favoreciendo en mayor medida su propia agregación (Wang *et al.*, 2013).

Sin embargo, la alteración de tau surge como consecuencia de un daño previo que induce su fosforilación y agregación. En este sentido, se piensa que algunos de los factores que podrían estar relacionados con la fosforilación de tau son la presencia de A $\beta$  (Zheng *et al.*, 2002), el estrés oxidativo (Lui *et al.*, 2015) o la presencia de la microglía y procesos inflamatorios. En un intento de explicar cómo estos factores podrían influir en la fosforilación de tau, se ha propuesto una hipótesis según la cual la presencia de A $\beta$ , el estrés oxidativo (Melov *et al.*, 2007), alteraciones en el metabolismo lipídico, infecciones crónicas y traumatismos craneales, pueden contribuir a la activación de los astrocitos y la microglía. En consecuencia, esta última liberaría citoquinas proinflamatorias (como IL-6) que producen la inflamación del cerebro y alteraciones en la interacción entre las neuronas y la glía. Además, la IL-6 sería capaz de activar las MAP-quinasas y provocar en último término la hiperfosforilación de tau, que sería responsable de los procesos neurodegenerativos. Finalmente, la muerte neuronal provocaría la liberación de los agregados de tau al medio extracelular, reactivando a la microglía y perpetuando el ciclo degenerativo (Maccioni *et al.*, 2010). Sin embargo, aún no está claro cuáles son los mecanismos concretos que conducen a la fosforilación de tau.

Con respecto a las estrategias terapéuticas, se basan en reducir la expresión de tau; impedir las modificaciones de la proteína que alteran su interacción con los microtúbulos, mediante modificadores de fosfatasas e inhibidores de quinasas (Gong y Iqbal, 2008); o emplear estabilizadores de microtúbulos. También se han desarrollado terapias que tienen como objetivo la degradación de tau o su eliminación mediante inmunoterapia (Congdon y Sigurdson, 2018).

Sin embargo, al igual que con la hipótesis amiloide esta hipótesis no puede explicar la existencia de pacientes con demencia que no presentan alteraciones en la proteína tau, ni el hecho de que las terapias llevadas a cabo hasta el momento no hayan tenido éxito. Por otra parte, diferentes teorías sugieren que la presencia de placas de amiloide o de ON puede presentar un efecto neuroprotector en lugar de tóxico (Nelson *et al.*, 2012).

#### **1.7.4. Otras hipótesis**

Las principales hipótesis mencionadas anteriormente no logran explicar todos los aspectos de la EA, y las terapias desarrolladas hasta el momento no han dado el resultado esperado. Esto ha llevado a buscar nuevos factores que puedan estar influyendo en la enfermedad.

Uno de los factores que también parece presentar un papel importante es el estrés oxidativo. El estrés oxidativo es una condición en la que se produce un desbalance entre los niveles de especies



reactivas de oxígeno (ROS, del inglés: *Reactive Oxygen Species*) y de antioxidantes, produciéndose daño celular a diferentes niveles (oxidación de lípidos, proteínas y DNA). Debido a su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados, el cerebro es particularmente sensible a las ROS, por lo que se ha relacionado con varias enfermedades neurodegenerativas (Shukla *et al.*, 2011), entre ellas el Alzheimer. En este sentido, se ha visto que la edad y acumulación de A $\beta$  pueden ser algunos de los factores que contribuyen al estrés oxidativo, y que este puede estar a su vez relacionado con la hiperfosforilación de la proteína tau y una mayor acumulación de A $\beta$  (Huang *et al.*, 2016). En base a ello, se han desarrollado diferentes terapias para la EA basadas en el uso de antioxidantes, aunque hasta ahora tampoco han mostrado el éxito esperado (Persson *et al.*, 2014).

También existen hipótesis acerca del papel de las alteraciones en el metabolismo de la glucosa (Du *et al.*, 2018), metabolismo lipídico, fallos en la homeostasis del calcio (Sanabria-Castro *et al.*, 2017) y problemas en la regulación del ciclo celular. La hipótesis en la que se centra este trabajo es la hipótesis del ciclo celular, que se discutirá a continuación.

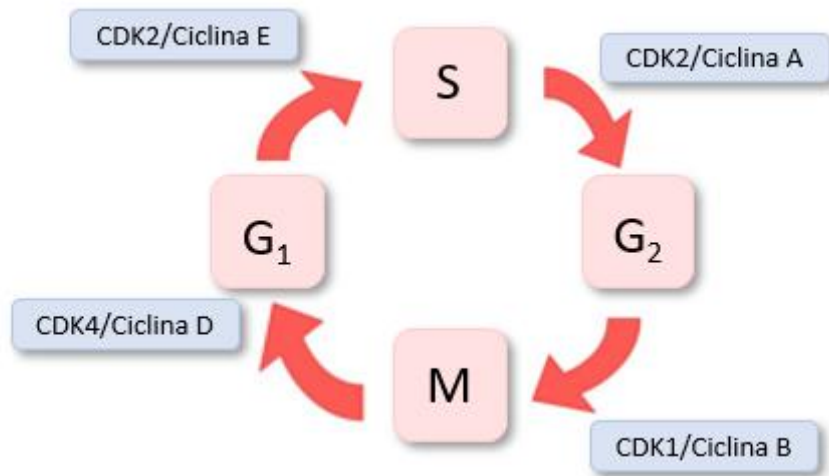
## **1.8. Enfermedad de Alzheimer y el ciclo celular**

### **1.8.1. Regulación del ciclo celular**

El ciclo celular de las células eucariotas se divide en cuatro fases: las fases G1, S y G2, que forman parte de la interfase; y la fase de mitosis o fase M. Una vez diferenciadas, las células entran en una fase de quiescencia conocida como G0. La progresión entre las distintas fases está regulada por la expresión de un grupo de kinasas, conocidas como kinasas dependientes de ciclinas (CDKs, del inglés: *Cycline-dependent Kinase*), que actúan mediante la interacción con sus ciclinas correspondientes (Barnum y O'Connell, 2014). Los niveles de ciclinas fluctúan a lo largo de ciclo celular, produciéndose la transición de unas fases a otras. Además, la actividad de las CDKs está regulada por una serie de inhibidores, conocidos como CKIs, dentro de los cuales se pueden diferenciar dos familias: INK4 y Cip/Kip. La primera está constituida por p16, p15, p18 y p19, que controlan a las CDKs específicas de la fase G1 impidiendo su interacción con las ciclinas. La segunda está constituida por p21, p27 y p57, que pueden controlar la actividad de las CDKs dependientes de ciclina D, ciclina A o ciclina E (Prize, 1999).

En la fase G1 se sintetizan las proteínas necesarias para la síntesis de ADN. Durante esta fase, diferentes señales mitogénicas provocan la activación de las ciclinas de tipo D, que actúan junto con CDK4 o CDK6. Estas proteínas fosforilan a retinoblastoma (Rb), impidiendo su interacción con el factor E2F1. Esto permite la liberación de E2F1 y la transcripción de genes implicados en la síntesis de ADN en la siguiente fase del ciclo celular. Al final de la fase G1 aumentan los niveles de CDK2-ciclina E, produciéndose la transición de G1/S. A lo largo de la fase S, o fase de síntesis, actúa el complejo CDK2-ciclina A, que fosforila sustratos necesarios para la replicación del DNA. Al finalizar la síntesis de ADN, las células entran en la fase G2, en la que se sintetizan proteínas necesarias para la división

celular. En esta fase, el complejo CDK1-ciclina A fosforila diferentes sustratos, entre ellos a CDK1-ciclina B, permitiendo la transición G<sub>2</sub>/M. Tras la fase M, la ciclina A es degradada y vuelve a comenzar el ciclo de división (Figura 4) (Murray, 2004).



**Figura 4. Regulación del ciclo celular.** Se representan los complejos de CDKs y ciclinas implicados en las diferentes fases del ciclo celular.

### 1.8.2. Hipótesis del ciclo celular

Según esta hipótesis, un factor importante para explicar la neurodegeneración y alteraciones propias de la EA es la reentrada en ciclo de neuronas postmitóticas debida a fallos en la regulación del ciclo celular.

A pesar de la idea tradicional de que todas las neuronas son postmitóticas, en condiciones normales se pueden detectar neuronas tetraploides en diferentes áreas del sistema nervioso de los vertebrados, como la corteza cerebral (donde se ha detectado hasta un 1% de neuronas tetraploides), el cerebelo (las células de Purkinje) (Lapham, 1968) o la retina (Morillo *et al.*, 2010). Estas neuronas tetraploides se generan durante el desarrollo a través de un proceso de endoreduplicación mediado por la neurotrofina NGF y el receptor de neurotrofinas p75 (p75NTR) (Frade y López-Sánchez, 2010), y forman parte del funcionamiento fisiológico del cerebro. En concreto, debido a su mayor tamaño estas neuronas suelen actuar como neuronas de proyección.

Sin embargo, en el cerebro de pacientes con Alzheimer se ha observado que estas neuronas que presentan una cantidad de DNA superior a la diploide se encuentran con una frecuencia hasta dos veces superior a la observada en los controles. Teniendo en cuenta que las neuronas que reactivan el ciclo celular también activan procesos de muerte, realmente la cantidad de estas neuronas en el cerebro podría ser superior a la observada. Este incremento es detectable en la corteza a partir del estadio Braak

III-IV, cuando aún no se han formado ON (López-Sánchez *et al.*, 2017), y también ocurre durante el envejecimiento normal en la corteza entorrinal (Frade y López-Sánchez, 2017). Estas neuronas son positivas para ciclina B1 (Arendt, 2012), y en cerebros de pacientes con Alzheimer ha detectado la expresión de otros factores de proliferación, como PCNA, Ki-67, ciclina D y ciclina E, lo que indica que la maquinaria de replicación es funcional en las neuronas postmitóticas y les confiere la capacidad de completar la fase S (Currais *et al.*, 2009). Sin embargo, la presencia de marcadores de ciclo celular en el cerebro adulto sigue siendo un debate. En este sentido, se han descrito nuevas funciones para PCNA, CDKs y ciclinas relacionadas con la respuesta a daño en el DNA, por lo que la expresión de estas proteínas de ciclo celular en las neuronas en degeneración también podría reflejar un intento por reparar del ADN y una respuesta de mantenimiento (Westra *et al.*, 2009). Por otra parte, no se ha detectado la progresión de estas neuronas a fase M, por lo que se piensa que quedan detenidas en la transición G2/M antes de morir. Esto puede deberse a la gran especialización del citoesqueleto neuronal, ya que impide llevar a cabo la segregación cromosómica y citocinesis (Currais *et al.*, 2009), o debido a factores como la presencia de Cdk1/ciclina B fuera del núcleo, entre otros (Frade y Ovejero-Benito, 2015), aunque sigue habiendo una gran controversia al respecto. Por otra parte, se ha visto que no todas las neuronas que alcanzan la fase G2/M mueren, sino que algunas sobreviven en esta fase durante años, lo que correlaciona con la lentitud con la que progresa la enfermedad (Frade y Ovejero-Benito, 2015).

Con respecto a los factores que provocan la reentrada en ciclo, se piensa que estas neuronas tetraploides se generan mediante una replicación del ADN que tiene lugar en el cerebro adulto en respuesta a daño celular. Se ha visto que la exposición de neuronas postmitóticas a diferentes tipos de estrés, como el estrés oxidativo o daños en el ADN, induce la expresión de proteínas de ciclo celular que a su vez reactivan el ciclo, resultando en último término en la muerte neuronal (Currais *et al.*, 2009). También se ha visto que mutaciones en los genes de la preselinina provocan inestabilidad cromosómica (Mosch *et al.*, 2007), y hay estudios que demuestran que una alteración en el procesamiento de APP potencia la tetraploidización de neuronas situadas en las capas superficiales de la corteza entorrinal (López-Sánchez *et al.*, 2017). Esto también se sustenta por el hecho de que ratones transgénicos para APP o PSN1 presentan neuronas que reactivan el ciclo (Zhang *et al.*, 2012). Sin embargo, a pesar de que el estrés oxidativo o alteraciones en la regulación del ciclo celular pueden actuar como iniciadores, ambos son necesarios para la propagación de las alteraciones propias de la EA (Frade y López-Sánchez, 2010).

A nivel de ciclo celular, se ha visto que los miembros de la familia E2F son esenciales para la tetraploidización neuronal. En concreto, E2F1 presenta un papel fundamental, ya que en su ausencia se detectan una menor cantidad de neuronas tetraploides y una mejora en la capacidad de aprendizaje y consolidación de la memoria (López-Sánchez *et al.*, 2017). Además, se han detectado neuronas inmunorreactivas para E2F1 y Rb hiperfosforilado alrededor de placas de amiloide, (Frade y López-Sánchez, 2010).

Con respecto a los efectos de la tetraploidización neuronal en la EA, se piensa que este proceso puede tener una serie de consecuencias no sólo en el tamaño sino también en el funcionamiento de las neuronas (Frade y López-Sánchez, 2010). Aparte de los cambios en la expresión génica y actividad metabólica resultantes del doble contenido de ADN, es posible que se produzcan alteraciones morfológicas y un crecimiento aberrante de neuritas, con la consecuente alteración de los procesos de transmisión sináptica (Barrio-Alonso *et al.*, 2018) y un declive en la capacidad cognitiva. Como el aumento en el tamaño neuronal implica la biosíntesis de membrana y el transporte de lípidos a la neurona, esta hipótesis también podría explicar el papel de ApoE4 en la susceptibilidad a la enfermedad al encontrarse alterada la capacidad de transporte lipídico (Frade y López-Sánchez, 2017).

Además, hay estudios que relacionan la reactivación del ciclo con la hiperfosforilación de tau y acumulación de A $\beta$  y placas seniles (McShea *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2007). La hiperfosforilación de tau podría deberse al intento fallido de modular la arquitectura de las neuronas en fase G2 para llevar a cabo la mitosis, resultando en la muerte celular (Currais *et al.*, 2009); o a la presencia del complejo Cdk1/ciclina B fuera del núcleo, facilitándose la fosforilación aberrante de proteínas como tau u otras proteínas del citoesqueleto (Frade y Ovejero-Benito, 2015).

La hiperploidía es un evento temprano detectable antes de la muerte celular que ocurre en los estados preclínicos de la enfermedad (Arendt *et al.*, 2010), por lo que esta hipótesis abre la posibilidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento del Alzheimer, además de ser útil en el diagnóstico temprano de la misma (Frade y Ovejero-Benito, 2015). En este sentido, sería interesante desarrollar tratamiento basados en la modulación del ciclo celular o de la transición G2/M para evitar la apoptosis de las neuronas tetraploides en los pacientes de la EA.

### **1.8.3. Estudio de reactivación del ciclo en neuronas**

Una de las maneras de estudiar el efecto que presenta la reentrada en ciclo en neuronas postmitóticas es mediante el uso *in vitro* del antígeno T grande (LTA $\alpha$ , del inglés: *Large T Antigen*) del virus SV40, un poliomavirus descubierto por su alta capacidad carcinogénica en animales. Desde su descubrimiento, la proteína LTA $\alpha$  se ha empleado para la creación de modelos tumorales debido a su alta capacidad transformante (Colvin *et al.*, 2014) (Figura 5). LTA $\alpha$  funciona mediante la interacción con p53 y Rb, dos supresores tumorales. Por una parte, LTA $\alpha$  se une a Rb, liberándolo de su interacción con los factores E2F y permitiendo la entrada en fase S y replicación del ADN. Por otra parte, interacciona y estabiliza a la proteína p53, aumentando su vida media e impidiendo su degradación. Esto interfiere con el funcionamiento normal de la proteína en relación con la detección de daño en el ADN y activación de procesos de reparación o apoptosis. Como consecuencia, las células infectadas con LTA $\alpha$  son incapaces de activar el proceso de apoptosis y proliferan de manera descontrolada (Manfredi y Prives, 1994). Hay diferentes estudios que muestran la capacidad de LTA $\alpha$  de inducir síntesis de ADN en neuronas maduras *in vitro* (Park *et al.*, 2007; Barrio-Alonso *et al.*, 2018).



**Figura 5. Estructura de LTA g.** LTA g presenta un dominio OBD (replicación de ADN), un dominio helicasa (activación de la transcripción) que contiene un sitio de interacción con p53, un dominio de interacción con Hsc70 y un dominio de unión a Rb para el control del ciclo celular.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Actualmente, las hipótesis más relevantes en relación con el origen y progresión de la EA se basan en la aparición de alteraciones en el metabolismo de tau y del amiloide. Sin embargo, estas hipótesis no logran explicar determinados aspectos de la enfermedad, y las terapias que tienen como diana estas alteraciones no han dado el resultado esperado. Por ello, es importante estudiar en mayor profundidad otros de los factores que pueden estar relacionados con la EA.

En este trabajo nos centramos en la hipótesis del ciclo celular, según la cual una de las principales causas de la neurodegeneración puede ser la reentrada en ciclo de neuronas postmitóticas. Por ello, el objetivo principal de este estudio consiste en caracterizar las alteraciones morfológicas y funcionales que sufren las neuronas al reactivar el ciclo y volverse tetraploides, con el fin de entender en mayor medida su papel en la degeneración neuronal. Para ello, se lipofectaron neuronas corticales *in vitro* con LTA g, tal y como hizo Barrio-Alonso *et al* (2018). Por otra parte, también hemos intentado desarrollar un modelo *in vivo* de Alzheimer, basado en la hipótesis del ciclo celular, transduciendo LTA g con lentivirus en la corteza entorrinal, analizando su capacidad de reactivación del ciclo celular en cultivos corticales. Para alcanzar dichos objetivos, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Comprobación de la reactivación del ciclo y síntesis de ADN mediante la incorporación de BrdU tras el tratamiento con LTA g
- Caracterización morfológica de neuronas positivas para BrdU.
- Caracterización de neuronas tratadas con una construcción lentiviral de LTA g para su posterior uso *in vivo*.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Modelo de estudio

Durante el estudio se emplearon hembras gestantes de la cepa CD1 (16 días embrionarios) criadas en el animalario del Instituto Cajal.

### 3.2. Cultivos celulares y material de cultivo

Para llevar a cabo los experimentos se emplearon cultivos primarios de neuronas corticales preparados a partir de ratones de día embrionario E16. Los cultivos se realizaron en placas de 4 pocillos (Cellstar) sobre cubreobjetos de 10 mm de diámetro (Menzel Gläser), tratados previamente con ácido

nítrico al 65% durante 24 h a temperatura ambiente, lavados repetidamente con agua MiliQ estéril, e incubados posteriormente durante 24 con Poli-L-Lisina (PLL) 1 mg/ml (Sigma-Aldrich), preparada en tampón borato 150 Mm pH=8.4. Los cristales se lavaron 3 veces con agua MiliQ estéril y se dejaron en el incubador con medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, del inglés: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (ThermoFisher Scientific) suplementado con D-glucosa, L-glutamina y piruvato, 1% de antibióticos (penicilina-estreptomicina, 25 U/ml) (Gibco) y 10% de suero de caballo inactivado (iHS, del inglés: *inactivated Horse Serum*) (Fisher) hasta la realización del cultivo. A continuación, se procedió a la disección y extracción de las cortezas en solución salina balanceada de Hanks (HBSS, del inglés: *Hanks' Balanced Salt Solution*) (Gibco) 1%, suplementado con HEPES (Gibco) al 0,5%, seguida por el tratamiento del tejido con tripsina (Gibco), preparada a 2,5 mg/ml en HBSS. Se empleó DNAsa 1mg/ml (Roche) para degradar el exceso de ADN en los casos necesarios. Posteriormente, se llevó a cabo la disociación mecánica del tejido en medio DMEM, para lo que se emplearon pipetas Pasteur de diámetro decreciente pulidas a la llama. Finalmente, las células se centrifugaron durante 5 min a 1,050 rpm, se resuspendieron en medio DMEM y se plaquearon a una densidad de 80.000 células/cm<sup>2</sup>. Transcurridas 2 h, se añadieron 2 ml de medio Neurobasal (NB) sin L-glutamina (ThermoFischer Scientific) suplementado con 2% de B27 (ThermoFischer Scientific), 1% de GlutaMax (Gibco) y 1% de penicilina-estreptomicina (25 U/ml). El medio se cambió cada 3 días con medio NB completo sin antibióticos, para su posterior lipofección. Los cultivos se mantuvieron a lo largo de toda la experimentación en un incubador HeraCell (Heraeus), en condiciones constantes de temperatura (37°C), humedad (95%) y CO<sub>2</sub> (5%).

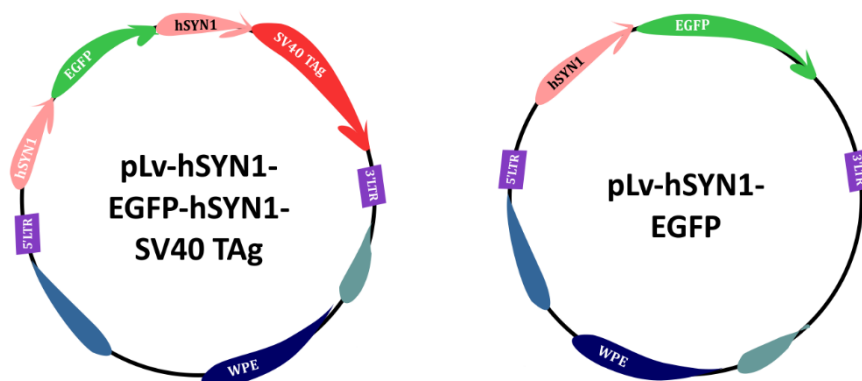
### 3.3. Lipofección

Las neuronas se lipofectaron a los 8 días de cultivo con los plásmidos indicados en la Tabla 1. Para cada placa de 4 pocillos se emplearon 12,24 µg de ADN total en 300 µl de medio NB sin L-glutamina (ThermoFischer Scientific); y la lipofectamina (Lipofectamina 2000, Invitrogen) se preparó a una proporción de 1 µl por cada µg de ADN. Para llevar a cabo la lipofección, se guardó la mitad del medio condicionado de cada placa (1 ml) y se añadieron 0,5 ml de medio NB sin L-glutamina. A continuación, se preparó la mezcla de ADN en NB y se dejó reposar 5 min antes de incubarse con la lipofectamina durante 20 min a temperatura ambiente. Una vez transcurridos, la preparación se añadió a los cultivos, que se lipofectaron durante 90 min. Finalmente, las placas se lavaron con medio NB suplementado con B27 2% y GlutaMax 1% y se añadió el medio condicionado separado inicialmente junto con 1 ml de medio NB sin condicionar y BrdU 5 µg/ml, donde permanecieron las células hasta su fijación a los tiempos establecidos.

### 3.4. Infección con lentivirus

En este caso, las neuronas se sembraron en placas de 24 pocillos (ThermoFischer Scientific) a las que posteriormente se añadieron las cantidades establecidas (1µl, 2µl, 3µl o 5 µl) de lentivirus, preparado en NB, al día siguiente de haber llevado a cabo el cultivo. El BrdU se añadió desde 1 día *in*

*vitro* (div) o 7 div a una concentración de 5 µg/ml, volviéndose a añadir cada tres días hasta la fijación de las células a los 10, 11 y 14 div. Se emplearon dos lentivirus diferentes: un lentivirus bicistrónico que expresa LTag y GFP por separado (lenti-TAg) y un lentivirus control que expresa únicamente GFP (lenti-control), en ambos casos bajo el promotor de la sinapsina hSyn1 (Figura 6). Las construcciones lentivirales se obtuvieron mediante la coinfección de las secuencias correspondientes con plásmidos empaquetadores en células 293Ta, y la posterior concentración, purificación y recolección de las partículas.



**Figura 6. Construcciones lentivirales empleadas.** Lenti-Tag (izquierda) expresa LTag y GFP por separado bajo el promotor hSyn1. Lenti-control (derecha) solamente expresa GFP, también bajo el promotor hSyn1.

### 3.5. Transformación y minipreparaciones de plásmidos

Los plásmidos se amplificaron a partir de los stocks utilizando bacterias competentes. Para ello, las bacterias se incubaron en hielo durante 30 min con 0,5 µl de solución de plásmido, después de lo cual se sometieron a un choque térmico durante 45 s a 42°C. A continuación, se añadieron 800 µl de medio LB a las bacterias y se dejaron incuban 1 h a 37°C. Transcurrido el tiempo, las bacterias se sembraron en placas de LB con ampicilina y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Al día siguiente, se seleccionó una colonia y se incubó en medio LB con ampicilina durante 8 horas a 37°C, después de lo cual se sembraron 50 µl de medio con bacterias en un matraz Erlenmeyer con medio LB con ampicilina. Las bacterias se incubaron a 37°C hasta la mañana siguiente y, por último, se purificaron los plásmidos utilizando el *Plasmid Midi Kit* de Quiagen. Los plásmidos empleados en los diferentes experimentos se recogen en la Tabla 1.

Nombre del plásmido	Origen
pSG5 Large T	Addgene #9053
pSG5 Large T K1	Addgene #9055
pcDNA5/V5-His/LacZ	Invitrogen
pRFPRNAiC	Stuart Wilson (Universidad de Sheffield)

**Tabla 1.** Plásmidos empleados.

### 3.6. Inmunofluorescencia indirecta

Una vez lipofectadas, las células se fijaron a las 24 o 48 h en formaldehído al 3,7% y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,5% en PBS (PBS-T 0,5%) durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, el ADN se desnaturalizó durante 30 min con HCl 50 mM en PBS, después de lo cual se neutralizó durante 30 min con tampón borato 0,1 M pH = 8,9, se lavaron las células con PBS-T 0,5% y se bloquearon durante 30 min con FCS al 10% en PBST-T 0,5%. Después, las células se incubaron con el anticuerpo primario a las diluciones indicadas en la Tabla 2 durante 1 h a temperatura ambiente, se lavaron con PBS-T 0,5% y se incubaron con el anticuerpo secundario 45 min a temperatura ambiente a las diluciones indicadas por los fabricantes. Finalmente, las preparaciones se incubaron con DAPI (Sigma-Aldrich) 100 ng/ml en PBS y se montaron en PSB-glicerol (1:1). Los anticuerpos se diluyeron en PBS-T 0,5% con FBS 1% y se mantuvieron a 4°C hasta su uso. Las características de los anticuerpos empleados se encuentran recogidas en la Tabla 2

Anticuerpo	Origen	Casa comercial	Dilución
NeuN	Ratón	Millipore	1:1000
NeuN	Rata	Millipore	1:1000
BrdU	Rata	Abcam	1:400
SV40 TAg	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	1:200
GFP	Rata	Nacalai Inc	1:700

**Tabla 2.** Anticuerpos utilizados.

### 3.7. Análisis Sholl

El Sholl es un tipo de análisis que permite estimar el grado de ramificación de una neurona basándose en el número de intersecciones que se producen entre las neuritas y una serie de anillos concéntricos dibujados desde el centro de emisión de las mismas (Binley *et al.*, 2014). Para llevarlo a cabo, se obtuvieron fotos de neuronas co-transfectadas con RFP (30 por condición) y se generaron los trazados digitales utilizando el plugin NeuronJ, disponible en Fiji, siendo posteriormente evaluados mediante el análisis Sholl (Fiji). En el análisis se establecieron los siguientes parámetros: radio inicial (1  $\mu$ m), radio final (NaN) y tamaño de los anillos (10  $\mu$ m). A partir de los resultados obtenidos se generaron los perfiles promedios de las neuronas analizadas en cada condición, representándose el número medio de intersecciones con respecto al radio.

### 3.8. Procesamiento de imágenes y análisis estadístico

Las imágenes microscópicas fueron obtenidas mediante microscopía confocal. Para el tratamiento y procesamiento de las imágenes captadas, se utilizó el programa Photoshop CS5 Extended, versión 12.0 (Adobe Systems Inc.). Para el análisis cuantitativo de las imágenes se empleó el programa

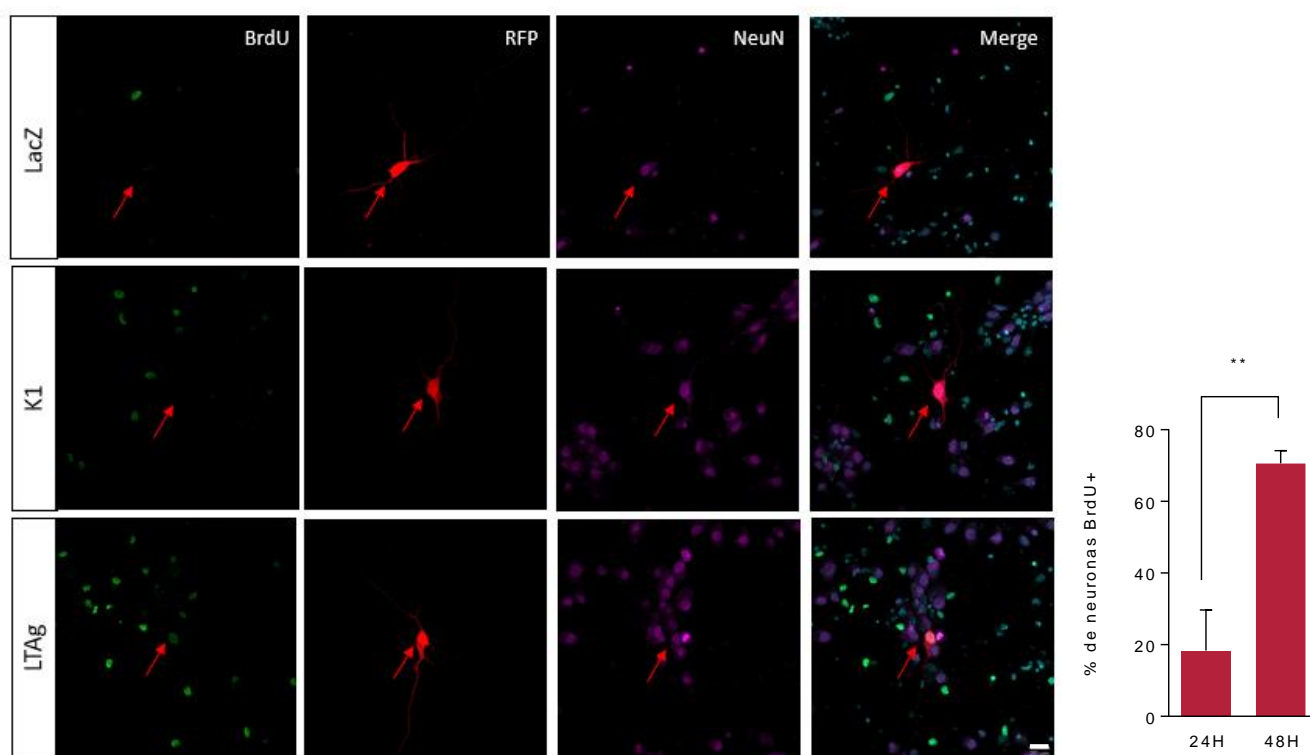


ImageJ, versión 1.52i, de libre acceso (Wayne Rasband National Institutes of Health). Para el análisis estadístico se empleó GraphPad Prism, versión 6.01. Los test empleados fueron el análisis de la varianza (ANOVA) y el análisis post-hoc de Tukey. En todos los casos se consideró un nivel de significación  $P < 0,05$ . Los resultados de las diferentes condiciones se normalizaron con respecto al control LacZ. La bibliografía se ordenó utilizando el gestor bibliográfico RefWorks.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Incorporación de BrdU

En primer lugar, se estudió la incorporación de BrdU en neuronas co-transfectadas con RFP y LacZ, K1 o LTA<sub>g</sub>, con el fin de confirmar los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio (Barrio-Alonso *et al.*, 2018). Como se esperaba, se observó que las neuronas lipofectadas con LacZ o K1 no incorporan BrdU, mientras que las lipofectadas con LTA<sub>g</sub> sí (Figura 7). Estos resultados confirman que LTA<sub>g</sub> es capaz de inducir replicación de DNA en neuronas en cultivo.

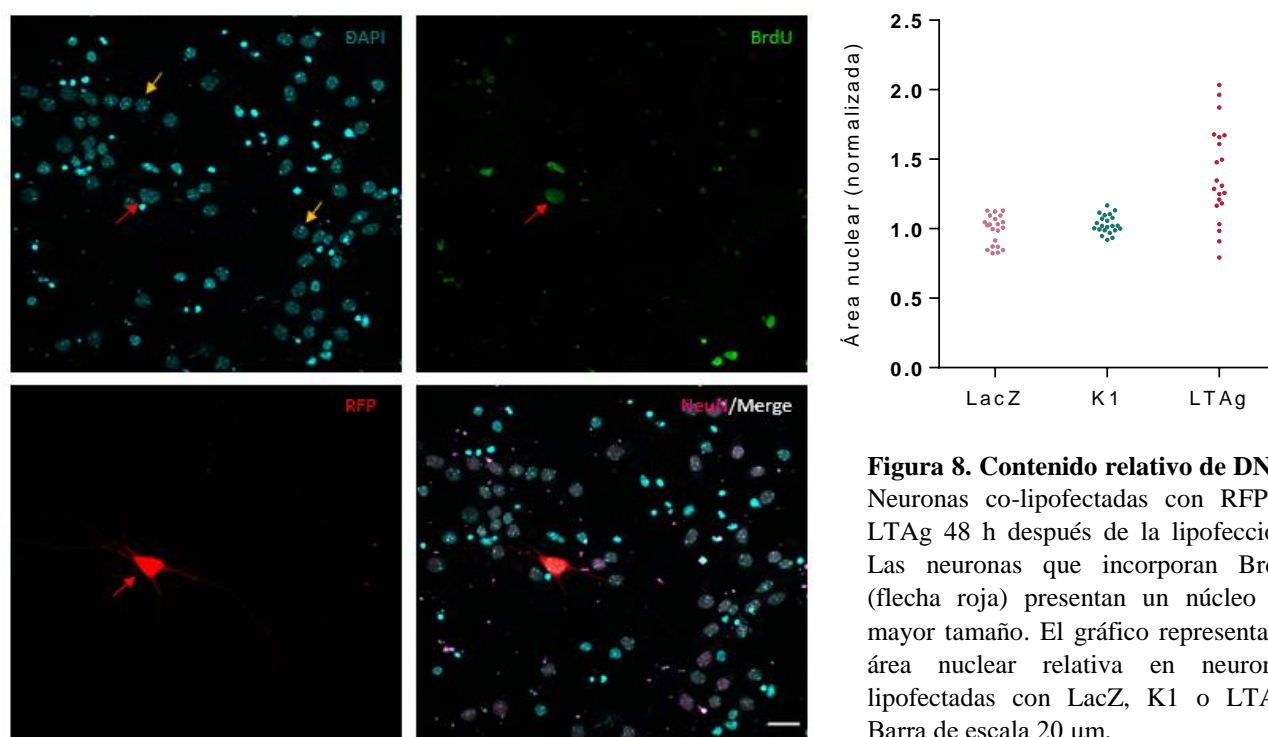


**Figura 7. Incorporación de BrdU.** Incorporación de BrdU en neuronas co-lipofectadas con RFP (rojo) y LTA<sub>g</sub>, LacZ o K1. Sólo incorporan BrdU las neuronas lipofectadas con LTA<sub>g</sub>. El gráfico muestra el porcentaje de neuronas lipofectadas con LTA<sub>g</sub> que incorporan BrdU a los tiempos indicados después de la transfección. \*\* $p < 0,05$  (test *t* de Student). Barra de escala: 20  $\mu\text{m}$ .

Por otra parte, se estudió cómo varía la incorporación de BrdU a lo largo del tiempo en los cultivos lipofectados con LTA<sub>g</sub>, y se observó un incremento significativo ( $p=0,0016$ ) con el paso de los días: a las 24 h alrededor de un 18% de neuronas habían incorporado BrdU, mientras que a las 48 h ya lo habían incorporado el 70% (Figura 7). Además, en nuestro laboratorio se había observado previamente que la incorporación de BrdU es máxima a las 48 h, ya que al cabo de 72 h se inicia un proceso de muerte en las neuronas lipofectadas (Barrio-Alonso *et al.*, 2018). Por ello, el resto de experimentos se llevaron a cabo 48 h después de la lipofección.

#### 4.2. Área nuclear

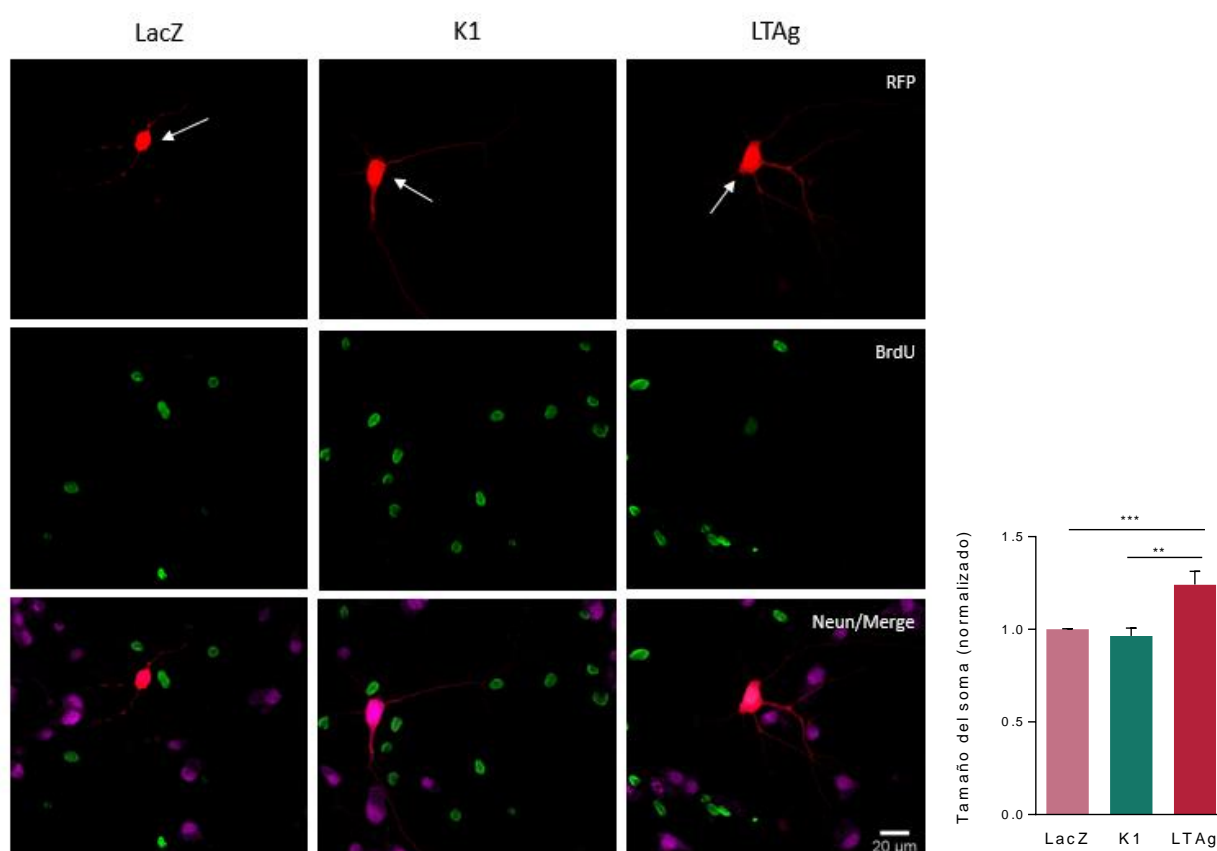
A continuación, se estudió el efecto del tratamiento con LTA<sub>g</sub> durante 48 h sobre el área nuclear en las neuronas lipofectadas. Ya que la incorporación de BrdU en estas células indica que está teniendo lugar un proceso de replicación, se espera por lo tanto un incremento en el tamaño del núcleo. Para ello, se normalizó el área nuclear de las neuronas transfectadas con respecto a otros núcleos del mismo campo y se detectaron varias poblaciones neuronales (Figura 8). Con respecto a las neuronas lipofectadas con LacZ y K1, y que por lo tanto no incorporan BrdU, se observó que la mayoría presentan un área nuclear relativa en torno a 1, pero no se observaron diferencias entre ambos grupos. Sin embargo, las neuronas lipofectadas con LTA<sub>g</sub> y que incorporan BrdU presentan un área nuclear relativa mayor, llegando a ser hasta más de dos veces superior. Estos resultados son consistentes con los resultados obtenidos previamente en el laboratorio, en los que se observó que las neuronas tratadas con LTA<sub>g</sub> no sólo presentan un núcleo de mayor tamaño, sino también un mayor contenido de DNA (Barrio-Alonso *et al.*, 2018).



**Figura 8. Contenido relativo de DNA.** Neuronas co-lipofectadas con RFP y LTA<sub>g</sub> 48 h después de la lipofección. Las neuronas que incorporan BrdU (flecha roja) presentan un núcleo de mayor tamaño. El gráfico representa el área nuclear relativa en neuronas lipofectadas con LacZ, K1 o LTA<sub>g</sub>. Barra de escala 20  $\mu$ m.

### 4.3. Tamaño del soma

Lo siguiente que se estudió fue la variación del tamaño del soma en neuronas que habían incorporado BrdU, esperándose un aumento del tamaño del mismo en correlación con el mayor tamaño del núcleo. Efectivamente, se observó que las neuronas lipofectadas con LTA<sub>g</sub> que habían incorporado BrdU presentaban un soma significativamente más grande ( $p=0,0023$  para LTA<sub>g</sub> con respecto a LacZ;  $p=0,01$  para LTA<sub>g</sub> con respecto a K1) que las neuronas que no habían incorporado BrdU, siendo el tamaño alrededor de un 24% superior al de las neuronas control (Figura 9). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas entre las neuronas lipofectadas con LacZ o K1, lo que demuestra que el aumento del tamaño depende de la entrada en ciclo y no de un efecto indirecto de LTA<sub>g</sub>, pues K1 también debería inducirlo.

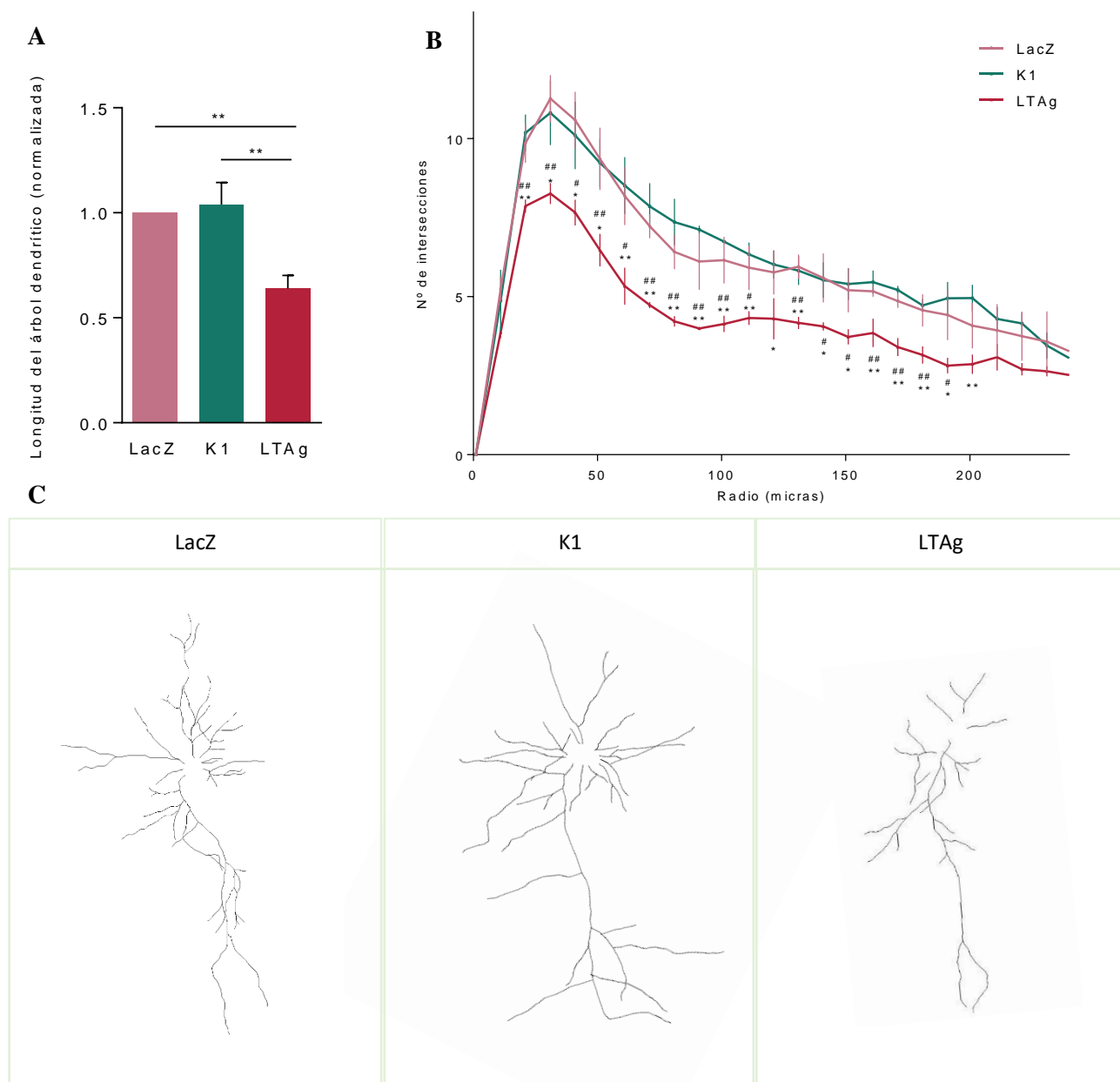


**Figura 9. Efecto de la entrada en ciclo celular sobre el tamaño del soma.** Las neuronas que incorporan BrdU al ser transfectadas con LTA<sub>g</sub> presentan un soma más grande que las neuronas control (se muestran ejemplos representativos) ( $n=30$  por condición y por réplica). \*\*\* $p<0,001$ , \*\* $p<0,01$  (ANOVA seguido del test post-hoc de Tukey). Barra de escala 20  $\mu\text{m}$ .

### 4.4. Longitud del árbol dendrítico

Otro de los aspectos que se estudió fue el efecto de la reactivación del ciclo celular sobre las prolongaciones neuronales, a nivel de longitud y de ramificación, 48 h después de la lipofección. Para estudiar las prolongaciones neuronales, estas se trazaron utilizando el programa NeuroJ (Fiji) y se

calculó la longitud total de las mismas para cada neurona (ver Métodos). Como se muestra en la figura 10A, pudimos comprobar que las neuronas lipofectadas con LTA<sub>g</sub> y que habían incorporado BrdU presentan una longitud relativa hasta un 36% inferior a la de las neuronas lipofectadas con LacZ y K1 ( $p=0,0008$ ). El análisis post-hoc sobre los datos sin normalizar también mostró diferencias significativas entre dichos grupos ( $p=0,0018$  y  $p=0,0011$ , respectivamente). Además, en este caso tampoco se observaron, mediante el análisis post-hoc, diferencias entre las neuronas lipofectadas con LacZ y con K1.



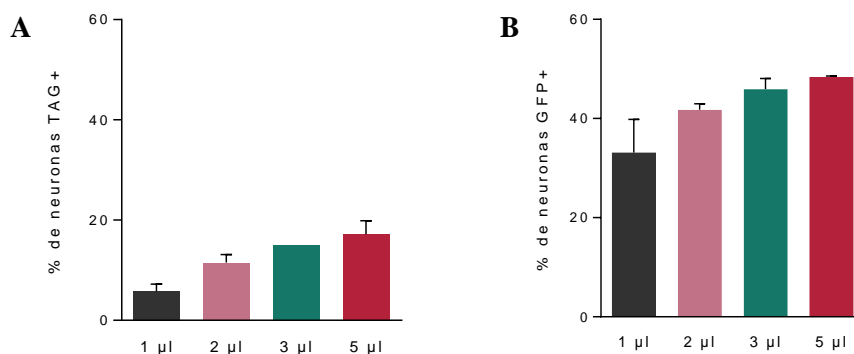
**Figura 10. Análisis Sholl.** A. Longitud normalizada del árbol dendrítico en neuronas transfectadas con LacZ, K1 y LTA<sub>g</sub>. \*\* $p<0,01$  (ANOVA seguido del test post-hoc de Tukey). B. Número medio de intersecciones para cada distancia desde el soma en neuronas lipofectadas con LacZ, LTA<sub>g</sub> y K1 ( $n=30$  por condición,  $n=3$  réplicas por condición). Almohadillas: grado de significación estadística entre LacZ y LTA<sub>g</sub>; asteriscos\*: significación estadística entre K1 y LTA<sub>g</sub> (ANOVA de doble vía seguido del test post-hoc de Tukey). C. Esquema representativo del árbol dendrítico de neuronas de cada condición.

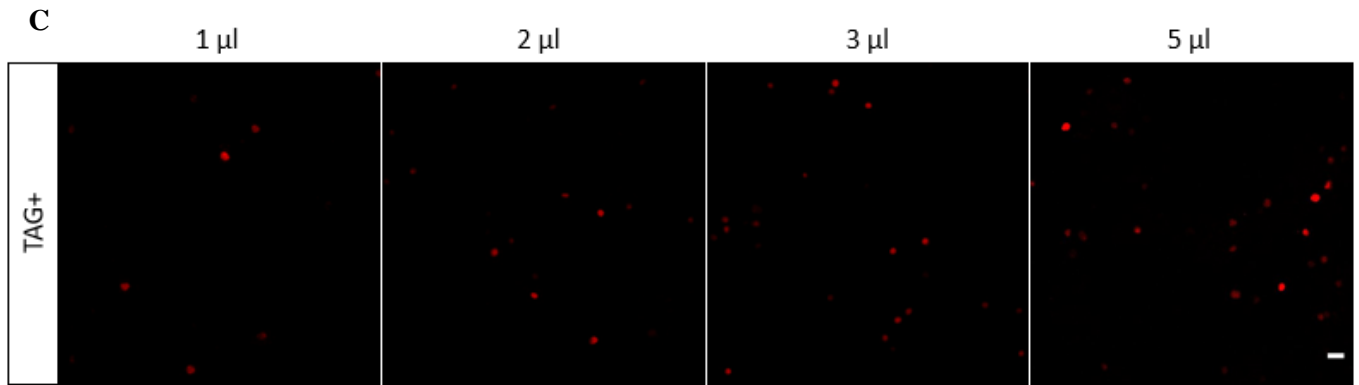
#### 4.5. Grado de ramificación

Para estudiar el grado de ramificación se llevó a cabo un análisis Sholl sobre los trazados neuronales generados anteriormente. A pesar de la gran variabilidad morfológica existente entre las neuronas corticales, para los tres casos se obtuvieron perfiles medios de ramificación similares: un mayor grado de ramificación cerca del soma que se va reduciendo al alejarse del mismo (Figura 10B, C). De nuevo, no se observaron diferencias significativas entre las neuronas tratadas con LacZ y K1. Sin embargo, sí se observaron diferencias significativas ( $p=0,0246$ ) entre estas dos últimas y las neuronas lipofectadas con LTA<sub>g</sub> que habían incorporado BrdU, mostrando las primeras un mayor grado de ramificación alrededor del soma en comparación con las positivas para BrdU.

#### 4.6. Caracterización lentivirus

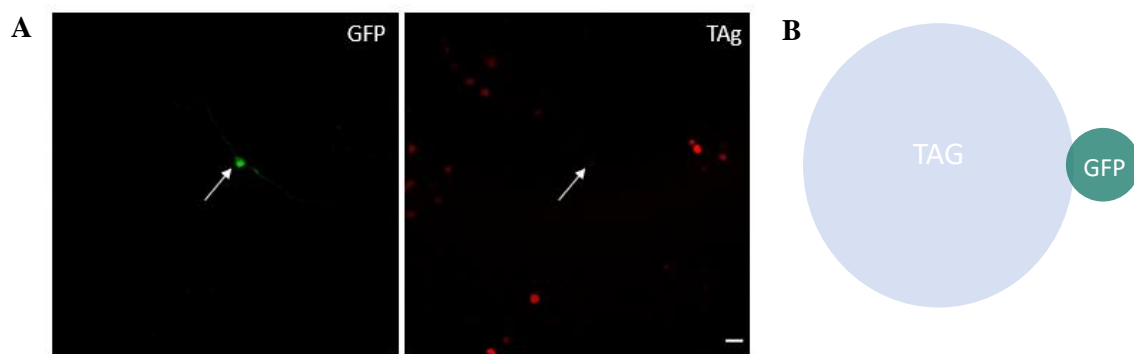
A continuación, nos propusimos verificar si los resultados obtenidos por Barrio-Alonso *et al* (2018) sobre incorporación de BrdU y supervivencia neuronal se replican cuando se expresa LTA<sub>g</sub> en un porcentaje alto de neuronas. Para ello, se generaron vectores lentivirales que co-expresan dicho oncogén con GFP (lenti-TA<sub>g</sub>) y otros vectores lentivirales control que expresan solamente GFP (lenti-control). Para garantizar la expresión de los transgenes en neuronas se empleó el promotor neuronal hSyn1 (Hioki *et al.*, 2007). En primer lugar, estudiamos la eficiencia de transfección empleando diferentes dosis de virus (1  $\mu$ l, 2  $\mu$ l, 3  $\mu$ l y 5  $\mu$ l) con el fin de establecer la dosis óptima para el resto de experimentos. Los lentivirus se añadieron 1 día después de realizar los cultivos y los resultados se analizaron a los 10 div, tiempo equivalente a las 48 h de los experimentos previos. En el caso de las neuronas transducidas con lenti-TA<sub>g</sub>, se observó un 5, 11, 15 y 17% de neuronas LTA<sub>g</sub> positivas para las diferentes concentraciones, respectivamente (Figura 11). Del mismo modo, en el caso de las neuronas transducidas con lenti-control se observó una mayor eficiencia de infección con el incremento de concentración, encontrándose un 33, 41, 45 y 48% de neuronas GFP positivas, respectivamente. Por ello, y a falta de material suficiente para emplear concentraciones superiores, decidimos utilizar la dosis de 5  $\mu$ l en el resto de experimentos.





**Figura 11. Neuronas tratadas con diferentes concentraciones de lentivirus.** A y C. Neuronas tratadas con lenti-TAG. B. Neuronas tratadas con lenti-control. Barra de escala 20 µm.

Al mismo tiempo, observamos la ausencia de co-localización de LTAG y GFP en la mayor parte de neuronas tratadas con lenti-TAG, siendo muy superior la expresión de LTAG ( $17 \pm 2,7\%$  de neuronas LTAG positivas frente a  $1,8 \pm 0,39\%$  de neuronas GFP positivas). Únicamente el  $0,9 \pm 0,11\%$  de neuronas expresan ambas proteínas (Figura 12). Esta observación se explica porque cada transgén se expresa bajo el control de su propio promotor hSyn1. Por ello, los análisis realizados en los cultivos transducidos con lenti-TAG se llevaron a cabo siempre en neuronas LTAG-positivas

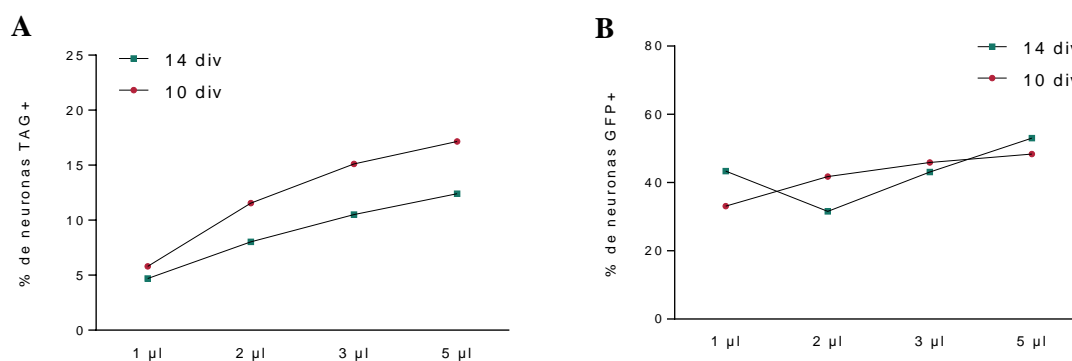


**Figura 12. Diferencias en la expresión de LTAG y GFP en neuronas tratadas con lenti-TAG.** A. No todas las neuronas que expresan LTAG expresan GFP, y viceversa. La expresión de LTAG es muy superior a la expresión de GFP. B. Esquema representativo de los porcentajes de expresión de LTAG y GFP. Barra de escala 20 µm.

#### 4.7. Supervivencia neuronal

A continuación, se estudió si el virus presenta un efecto sobre la supervivencia neuronal similar al observado en los experimentos *in vitro* llevados a cabo anteriormente (Barrio-Alonso *et al.*, 2018). Para ello, las neuronas se transdujeron con lenti-TAG y lenti-control y se comparó la expresión de LTAG y GFP a los 10 y 14 div, equivalente a los 2 y 6 div de Barrio-Alonso *et al.* (2018). Los resultados sugieren que las neuronas tratadas con lenti-TAG muestran una menor expresión de LTAG a los 14 div en comparación con los 10 div para todas las concentraciones estudiadas (Figura 13A), encontrándose a los 14 div un porcentaje de neuronas LTAG positivas de 4, 8, 10 y 12%, respectivamente, en comparación con los mencionados en la Figura 5 para los 10 div. Sin embargo, en

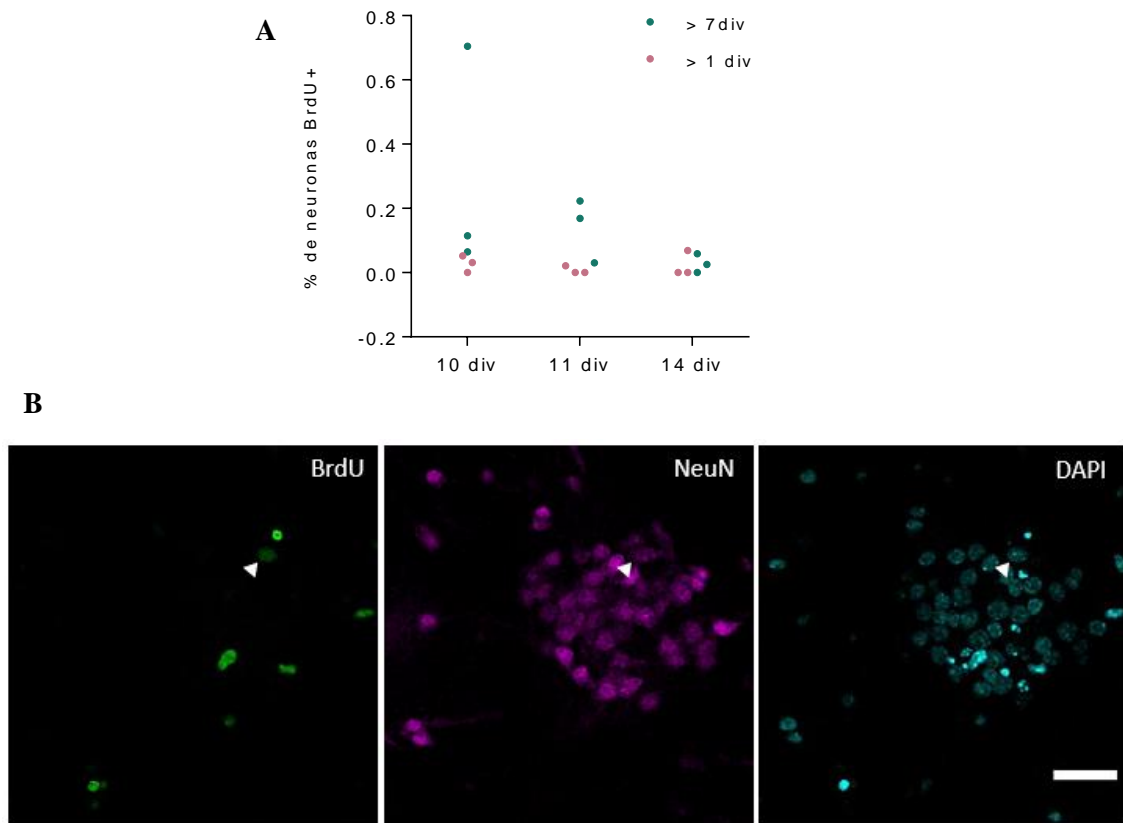
el caso de las neuronas tratadas con el lenti-control no se observaron diferencias claras en la expresión de GFP, siendo en algunos casos mayor a los 14 div que a los 10 div (se contó un 43, 31, 43, 53% de neuronas GFP positivas a los 14 div, respectivamente, en relación con el 33, 41, 45 y 48% mencionado anteriormente para los 10 div) (Figura 13B). Estos resultados concuerdan con los observados anteriormente (Barrio-Alonso *et al.*, 2018), y sugieren que el tratamiento con LTA<sub>g</sub> presenta un efecto sobre la supervivencia neuronal.



**Figura 13. Supervivencia neuronal.** A. Expresión de LTA<sub>g</sub> en neuronas tratadas con lenti-TAg para diferentes dosis a 10 y 14 div. B. Expresión de GFP en neuronas tratadas con lenti-control para diferentes dosis a 10 y 14 div.

#### 4.8. Incorporación de BrdU

Por último, se analizó la incorporación de BrdU en tres puntos temporales (10, 11 y 14 div), añadiendo BrdU desde 1 y 7 div, esto último para descartar la posible incorporación del mismo por parte de precursores neuronales que puedan estar presentes durante las etapas iniciales del cultivo. Como se esperaba, se observó incorporación de BrdU en las neuronas tratadas con lenti-TAg, pero no en las tratadas con lenti-control. Además, no se observó una mayor expresión de BrdU en los cultivos en los que se añadió BrdU desde 1 div en comparación con 7 div, lo que descarta la posibilidad de su incorporación por parte de los precursores neuronales (Figura 14). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en cuanto a la incorporación de BrdU para los diferentes puntos temporales, siendo esta además mucho más baja que la observada en las lipofecciones (de media, en los cultivos en los que se añadió BrdU desde los 7 div presentaban BrdU el 0,29%, 0,14% y 0,02% de las neuronas a los 10, 11 y 14 div, respectivamente).



**Figura 14. Expresión de BrdU.** A. Expresión de BrdU en neuronas tratadas con lenti-Tag durante 10, 11 y 14 div en cultivos en los que se añadió BrdU desde 1 div (>1div) o desde los 7 div (>7div). Cada punto representa una réplica independiente. B. Neurona BrdU positiva en cultivo tratado con lenti-TAg. Barra de escala 20  $\mu$ m.

## 5. DISCUSIÓN

La EA es un tipo de demencia caracterizada principalmente por una pérdida progresiva de memoria y de otras capacidades implicadas en la autonomía de las personas afectadas. Representa el 70% de los casos de demencia diagnosticados, y se estima que alrededor de 24 millones de personas padecen Alzheimer a nivel global (Mayeux y Stern, 2012). A nivel histopatológico, las principales alteraciones que caracterizan a la EA son la acumulación de placas y oligómeros de amiloide y la presencia de ON constituidos por la proteína tau hiperfosforilada (Perl, 2010). En un intento de explicar el origen de la enfermedad, se han desarrollado diferentes hipótesis, siendo las principales la hipótesis amiloide (Selkoe y Hardy, 2016) y la hipótesis tau (Wu *et al.*, 2017). En base a ello, se han diseñado terapias para evitar, detener o eliminar el avance de estas alteraciones, pero ninguna hasta el momento tenido el éxito esperado. Además, hay pacientes de Alzheimer que no muestran placas de amiloide o alteraciones de tau; y por el contrario hay personas que sí las muestran, pero no presentan problemas cognitivos (Nelson *et al.*, 2009). Por ello, es importante estudiar otros factores que puedan estar implicados en la aparición y progreso de la enfermedad. Uno de estos factores es la presencia de



neuronas tetraploides en el cerebro de pacientes de Alzheimer con una frecuencia superior a la normal. Esto ha llevado a plantear la hipótesis del ciclo celular, según la cual la neurodegeneración propia de la EA podría explicarse por alteraciones en la regulación del ciclo celular (Frade y López-Sánchez, 2017).

En este trabajo, nos planteamos la hipótesis de que la reactivación del ciclo de neuronas postmitóticas puede presentar efectos a nivel morfológico, pudiendo ser responsables de las alteraciones en la transmisión sináptica y degeneración neuronal propias de la EA. Con el fin de demostrarlo, lipofectamos cultivos de neuronas maduras con LTA<sub>g</sub> para inducir la reactivación del ciclo y la síntesis de ADN. Para comprobar que los efectos se deben a la reactivación del ciclo celular y no a otros aspectos de la expresión de LTA<sub>g</sub>, utilizamos como control el plásmido K1, que expresa una forma mutante de LTA<sub>g</sub> que no interacciona con Rb.

### 5.1. Reactivación del ciclo celular y síntesis de ADN

En primer lugar, estudiamos la eficacia de transfección de LTA<sub>g</sub> y la capacidad de inducir síntesis de ADN mediante la incorporación de BrdU. El BrdU (Bromodeoxiuridina) es un análogo de la timidina que se incorpora al material genético durante la síntesis de ADN, pudiendo ser identificado posteriormente mediante inmunofluorescencia. Por ello, frecuentemente se emplea para estudiar la dinámica del ciclo celular e identificar precursores neuronales durante el desarrollo del sistema nervioso, además de procesos de neurogénesis en el cerebro adulto (Taupin, 2007). En nuestro estudio, lipofectamos cultivos de neuronas corticales maduras con LTA<sub>g</sub> y estudiamos la incorporación de BrdU a las 24 y 48 horas después de la lipofección. Como resultado, pudimos comprobar que el porcentaje de expresión de BrdU aumenta con el tiempo, alcanzando un máximo de expresión a las 48 horas, momento en el que el 70% de las neuronas transfectadas son positivas para BrdU. A partir de las 48 horas, la expresión de BrdU disminuye debido a la muerte neuronal, independiente de apoptosis, inducida por la reactivación del ciclo celular (Barrio-Alonso *et al.*, 2018).

En este sentido, nos parece importante remarcar el uso de NeuN como marcador neuronal. Otros estudios llevados a cabo hasta el momento muestran la reactivación del ciclo en neuronas postmitóticas, pero la mayor parte emplea Map2 como marcador neuronal, a pesar de que su expresión puede detectarse también en precursores gliales (Blümcke *et al.*, 2001) y astrocitos reactivos (Geisert *et al.*, 1990). Como consecuencia, estos estudios muestran niveles basales de incorporación de BrdU en los controles (algo que en nuestras manos nunca ocurre), haciendo dudosos los resultados. Por ello, consideramos importante el uso de NeuN para demostrar la reactivación del ciclo en neuronas maduras.

Por otra parte, se sabe que las neuronas tratadas con LTA<sub>g</sub> presentan un contenido de ADN superior al diploide (Barrio-Alonso *et al.*, 2018), y parece evidente a simple vista que presentan un tamaño nuclear superior al habitual. A pesar de que no está claro qué factores determinan el tamaño nuclear, parece haber una relación entre este y el nivel de ploidía (Goo *et al.*, 2015; Puah *et al.*, 2017), y se ha visto que durante la progresión del ciclo celular se producen cambios en el tamaño del núcleo

(Maeshima *et al.*, 2011). En concreto, durante el ciclo celular se produce una descondensación de la cromatina que la hace más accesible a la maquinaria de replicación, hecho que se ve acompañado por un aumento en el tamaño nuclear (Roca-Cusachs *et al.*, 2008). Por ello, nos pareció interesante comprobar si las neuronas que han sido infectadas con LTA<sub>g</sub> y muestran incorporación de BrdU presentan un núcleo de mayor tamaño en relación con la síntesis de ADN. Como se esperaba, observamos que las neuronas que habían incorporado BrdU presentan un tamaño nuclear hasta dos veces superior al de las neuronas control. Además, tampoco se vieron cambios en las neuronas lipofectadas con K1, indicando que existe una correlación entre la síntesis de ADN y el aumento del tamaño nuclear.

## 5.2. Caracterización morfológica

Una vez comprobada la presencia de neuronas con un contenido de ADN superior al diploide, nos propusimos estudiar los cambios morfológicos a nivel de soma, longitud y ramificación del árbol dendrítico, ya que es de esperar que las alteraciones morfológicas tengan consecuencias a nivel funcional (Frade y López-Sánchez, 2010; Sisková *et al.*, 2014).

En primer lugar se analizó el tamaño del soma de las neuronas hiperploides, ya que es de esperar que haya aumentado junto con el tamaño del núcleo. En este sentido, se ha visto que existe una relación constante entre el tamaño nuclear y la cantidad de citoplasma de una célula, y que su mantenimiento es importante para el funcionamiento de la misma (Webster *et al.*, 2009). Por ello, alteraciones en el tamaño del núcleo pueden estar relacionados con enfermedades como el cáncer (Chow *et al.*, 2012) o con el envejecimiento y la senescencia celular (Nakajima *et al.*, 2010). En consecuencia, es interesante estudiar si el aumento en el tamaño nuclear se ve acompañado por un crecimiento del soma en las neuronas positivas para BrdU. Como se esperaba, en nuestro estudio observamos que las neuronas que expresan BrdU 48 h después del tratamiento con LTA<sub>g</sub> presentan un soma hasta un 25% más grande que el de los controles. Además, no se vieron diferencias entre LacZ y K1, lo que confirma que los efectos se deben a reactivación del ciclo y síntesis de DNA y no a la infección con LTA<sub>g</sub>. Por otra parte, se sabe que la expansión del soma depende del crecimiento de la membrana plasmática (McCusker y Kellogg, 2012), lo que concuerda con la idea mencionada anteriormente de que una alteración en el metabolismo lipídico debida a la presencia del alelo ApoE4 podría estar relacionada con la degeneración de estas neuronas en los pacientes de Alzheimer (Frade y López-Sánchez, 2010).

Por otra parte, se observó que las neuronas BrdU positivas presentan un árbol dendrítico de un tamaño hasta un 36% inferior al de las neuronas control. Del mismo modo, el análisis Sholl, que estudia el grado de ramificación del árbol dendrítico, también mostró un menor grado de ramificación inferior en las neuronas positivas para BrdU. Al igual que en el caso anterior, tampoco se observaron diferencias entre las neuronas lipofectadas con LacZ y K1, lo que sugiere que los efectos se deben a la reactivación del ciclo mediada por LTA<sub>g</sub>. En conjunto, estos resultados sugieren que la reentrada en ciclo de las neuronas provoca una retracción de las neuritas. Esto va en contra de lo que ocurre en

condiciones fisiológicas, donde se sabe que las neuronas con un soma de mayor tamaño presentan un árbol dendrítico más grande (Kaas, 2018), y de estudios en los que se ha visto que las neuronas tetraploides que se generan durante el desarrollo tienen los árboles dendríticos de mayor tamaño (Morrillo *et al.*, 2010). Sin embargo, concuerda con estudios llevados a cabo con modelos transgénicos de Alzheimer en los que se ha detectado la presencia de neuritas distróficas, así como una reducción en el área dendrítica total (Moolman *et al.*, 2004). Además, las alteraciones en el árbol dendrítico observadas en nuestros experimentos podrían verse acompañadas por cambios en las espinas dendríticas, también observados en pacientes con Alzheimer (Boros *et al.*, 2019; Dorostkar *et al.*, 2015). Por ello, concuerda con la idea de que la reactivación anormal del ciclo celular en neuronas postmitóticas que tiene lugar en la EA presenta un efecto patológico. Por otra parte, en estudios previos del laboratorio se vio que estas neuronas también presentan alteraciones a nivel postsináptico, ya que tienen una menor expresión de PSD-95; y a nivel presináptico, debido a un acortamiento del segmento inicial del axón (Barrio-Alonso *et al.*, 2018). Todo ello supone una serie de consecuencias a nivel funcional, alterando principalmente la transmisión sináptica; por lo que estos resultados concuerdan con estudios en los que se ha visto que la tetraploidización neuronal influye negativamente en la capacidad cognitiva de modelos murinos de Alzheimer (López-Sánchez *et al.*, 2017). En conjunto, esto demuestra que la hipótesis del ciclo celular puede explicar algunos de los aspectos cognitivos observados en la EA.

### 5.3. Caracterización lentiviral

Como se mencionó anteriormente, previamente en nuestro laboratorio se intentó crear un modelo de Alzheimer basado en la tetraploidización neuronal. Para ello, se inyectó una construcción lentiviral de LTA<sub>g</sub> en la corteza entorrinal de ratones control, esperando detectar la aparición de neuronas tetraploides, cuyas alteraciones podrían inducir algún tipo de estrés en las neuronas inervadas y la reactivación del ciclo en las mismas. Los cerebros se fijaron y analizaron 1, 2 y 3 semanas después de la inyección, pero en ninguno de los casos analizados se detectaron neuronas positivas para BrdU ni GFP. Por ello, nos propusimos caracterizar el funcionamiento del lentivirus *in vitro* y comprobar si el fallo se encontraba en la expresión de LTA<sub>g</sub>.

Para los experimentos se empleó un lentivirus bicistrónico que expresa LTA<sub>g</sub> y GFP por separado bajo el promotor de la sinapsina. Las neuronas se analizaron a los 10 y 14 div, equivalentes a los 2 y 6 div de los experimentos de lipofección llevados a cabo con anterioridad, respectivamente (Barrio-Alonso *et al.*, 2018); ya que la lipofección se lleva a cabo a los 8 div de cultivo, mientras que el lentivirus se añade desde 1 div, pero la hSyn1 empieza a expresarse mayoritariamente a los 8 div (Di Liegro *et al.*, 1995). En cuanto a la expresión de LTA<sub>g</sub>, se observó un patrón similar al observado en los experimentos previos, con una mayor cantidad de neuronas positivas a los 10 div y una caída a los 14 div. Las comparaciones con el control, en las que se observó un número de neuronas GFP positivas constante a lo largo del cultivo, permitieron comprobar que en los cultivos tratados con lenti-TA<sub>g</sub> ocurre un proceso de muerte neuronal a partir de los 10 div, como se había visto anteriormente (Barrio-Alonso

*et al.*, 2018). Por otra parte, pudimos comprobar que el porcentaje de expresión de LTA<sub>g</sub> es muy superior a la de GFP en las neuronas tratadas con lenti-TA<sub>g</sub>, siendo únicamente un 0,9% de neuronas doblemente positivas. Esto podría explicar la ausencia de neuronas GFP positivas en los cerebros en los que se había administrado lenti-TA<sub>g</sub> (Anexo 1), aunque sigue sin poder explicar la ausencia de neuronas positivas para BrdU. Por último, comprobamos que muy pocas de las neuronas tratadas *in vitro* con el lentivirus durante 10, 11 y 14 días expresan BrdU, habiéndose detectado un máximo de un 0,29% de neuronas positivas a los 10 div. Estos resultados no concuerdan con lo observado en los experimentos de lipofección, lo que podría deberse a la expresión más temprana de LTA<sub>g</sub> al usar el lentivirus. Como los experimentos de lipofección se llevan a cabo a los 8 div, mientras que los lentivirus se añaden en el cultivo desde el día 1, es posible que su expresión se inicie antes, a partir del momento en el que empiece a expresarse el gen de la hSyn1. A pesar de que la expresión máxima de la hSyn1 ocurre entre los 8 y 14 div, en estudios de neuronas corticales de rata se ha detectado expresión de hSyn1 desde los 2 div (DiLiegro *et al.*, 1995); y otros estudios también muestran la expresión de hSyn1 desde las fases iniciales de diferenciación de los cultivos (Fletcher *et al.*, 1991). Esto concuerda con la idea de que el lenti-TA<sub>g</sub> podría empezar a actuar antes de lo esperado, provocando la muerte de las neuronas infectadas con LTA<sub>g</sub> e impidiendo por lo tanto su identificación posterior; y sugiere que lo mismo podría estar ocurriendo en los experimentos *in vivo*. En base a ello, sería interesante estudiar la expresión de BrdU antes de los 10 div, y en el caso de los experimentos *in vivo* antes de una semana, ya que las neuronas podrían morir antes de lo esperado, siendo eliminadas por la microglía e impidiendo su identificación. Una explicación por la que las neuronas podrían morir tan deprisa en los experimentos *in vitro* es que la actividad eléctrica favorecería la supervivencia de las neuronas hiperploides (Barrio-Alonso *et al.*, 2018), de manera que, al lipofectar, la mayor parte de neuronas seguirían funcionando normalmente, sirviendo de soporte a las neuronas hiperploides; mientras que el lentivirus afectaría a un mayor porcentaje de neuronas, impidiendo que se sustentasen entre sí. Por otra parte, otra explicación por la que la mayor parte de neuronas LTA<sub>g</sub> positivas observadas en la Figura 13A no exprese BrdU es que se trate de la población neuronal observada en los experimentos de Barrio-Alonso *et al.* (2018), según los cuales una parte de las neuronas transfectadas con LTA<sub>g</sub> nunca llega a incorporar BrdU.

En conjunto, nuestros resultados concuerdan con la hipótesis del ciclo celular, según la cual la reactivación del ciclo en neuronas postmitóticas conlleva cambios morfológicos y funcionales que conducen en último término a la degeneración neuronal.

## 6. CONCLUSIONES

- La lipofección con LTA<sub>g</sub> es capaz de inducir la reactivación del ciclo y síntesis de ADN en neuronas corticales *in vitro*.

- La expresión de LTA<sub>g</sub> y reactivación del ciclo en neuronas *in vitro* afecta a la supervivencia de las mismas.
- Las neuronas que han sido infectadas con LTA<sub>g</sub> y presentan incorporación de ADN muestran un núcleo de mayor tamaño que las neuronas control, que correlaciona con un aumento en el tamaño del soma.
- La reactivación del ciclo celular en neuronas postmitóticas provoca una reducción en la longitud y ramificación de las dendritas en las neuronas infectadas con LTA<sub>g</sub>, lo que podría explicar algunas de las alteraciones a nivel sináptico que ocurren en la EA.
- El uso de construcciones lentivirales de LTA<sub>g</sub> bajo el promotor del hSyn1 permite inducir síntesis de ADN en neuronas *in vitro*, pero a una frecuencia inferior a la observada en los experimentos de lipofección, probablemente debido a la muerte de las neuronas infectadas antes de los tiempos establecidos.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Aisen P. The Development of Anti-Amyloid Therapy for Alzheimer's Disease. From Secretase Modulators to Polymerisation Inhibitors. CNS Drugs. 2005;19:989-996.

Alves L, Correia AS, Miguel R, Alegria P, Bugalho P. Alzheimer's disease: a clinical practice-oriented review. Front Neurol. 2012;3:63.

Arendt T, Brückner M, Mosch B, Lösche A. Selective Cell Death of Hyperploid Neurons in Alzheimer's Disease. Am J Pathol. 2010;177:15-20.

Arendt T. Cell Cycle Activation and Aneuploid Neurons in Alzheimer's Disease. Mol Neurobiol. 2012;46:125-135.

Arendt T, Stieler J, Holzer M. Tau and taupathies. Brain Res Bull. 2016;126(Pt 3):238-292.

Baleriola J, Walker CA, Jean YY, Crary JF, Troy CM, Nagy PL et al. Axonally synthesized ATF4 transmits a neurodegenerative signal across brain regions. Cell. 2014;158(5):1159– 1172.

Barnum KJ, O'Connell MJ. Cell Cycle Regulation by Checkpoints. Methods Mol Biol. 2014;1170:29-40.

Barrio-Alonso E, Hernández-Vivanco A, Walton CC, Perea G, Frade JM. Cell cycle reentry triggers hyperploidy and synaptic dysfunction followed by delayed cell death in differentiated cortical neurons. Sci Rep. 2018;8(1):14316.

Barranello RJ, Bharani KL, Padmaraju V, Chopra N, Lahiri D, Greig NH et al. Amyloid-Beta Protein Clearance and Degradation (ABCD) Pathways and their Role in Alzheimer's Disease. Curr Alzheimers Res. 2015;12(1):32-46.

Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang D. Genetics of Alzheimer Disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 2010;23(4):213-227.

Bianchetti A, Trabucchi M. Clinical aspects of Alzheimer's disease. *Aging Clin. Exp. Res.* 2001;13:221-230.

Binley KE, Ng WS, Tribble JR, Song B, Morgan JE. Sholl análisis: A quantitative comparison of semi-automated methods. *J Neurosci Methods.* 2014;225:65-70.

Blumcke I, Becker AJ, Normann S, Hans V, Reiderer BM, Krajewski S et al. Distinct Expression Pattern of Microtubule-Associated Protein-2 in Human Oligodendrogliomas and Glial Precursor Cells. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001;60(10):984-93.

Boros BD, Greathouse KM, Gearing M, Herskowitz JH. Dendritic spine remodeling accompanies Alzheimer's disease pathology and genetic susceptibility in cognitive normal aging. *Neurobiol Aging.* 2019;79:92-103.

Braak H, Braak E. On áreas of transition between entorhinal allocortex and temporal isocórtex in the human brain. Normal morphology and lamina-specific in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 1985;68(4):325-32.

Braak H, Braak E. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991;82:239-259.

Braak H, Braak E. Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol Aging.* 1995;16(3):271-278.

Brandt R, Leschik J. Functional interactions of tau and their relevance for Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 2004;1(4):255-269.

Bubser M, Byun N, Wood MR, Jones CK. Muscarinic receptor pharmacology and circuitry for the modulation of cognition. *Handb Exp Pharmacol.* 2011;208:121-166.

Colvin EK, Weir C, IkinRJ, Hudson AL. SV40 Tag mouse models of cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 2014;27:61-73.

Congdon EE, Sigurdsson EM. Tau-targeting therapies for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* 2018;14(7):339-415.

Cummings JL, Mega M, Gray K, Roseng-Thompson S, Carusi DA, Gombein J. The Neuropsychiatric Inventory: comprehensive assesment of psychopathology in dementia. *Neurology.* 1994;44(12):2308-14.

Currais A, Hortobágyi T, Soriano S. The neuronal cell cyce as a mechanism of pathogenesis in Alzheimer's disease. *Aging (Albany NY).* 2009;1(4):363-371.

Deane R, Wu Z, Zlokovic BV. RAGE (Yin) Versus LRP (Yang) Balance Regulates Alzheimer Amyloid  $\beta$ -Peptide Clearance Through Tranport Across the Blood-Brain Barrier. *Stroke.* 2004;35(11 Suppl 1):2628-31.

- Di Liegro I, Savettieri G, Coppolino M, Scaturro M, Monte M, Nastasi T et al. Expression of synapsin I gene in primary cultures of differentiating rat cortical neurons. *Neurochem Res.* 1995;20:239-43.
- Dorostkar MM, Zou C, Blazquez-Llorca L, Herms J. Analyzing dendritic spine pathology in Alzheimer's disease: problems and opportunities. *Acta Neuropathol.* 2015;130:1-19.
- Du X, Wang X, Geng M. Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. *Transl Neurodegener.* 2018;7:2.
- DuBoff B, Feany M, Götz J. Why size matters—balancing mitochondrial dynamics in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 2013;36(6):325–335.
- Dubois B, Picard G, Sarazin M. Early detection of Alzheimer's disease: new diagnostic criteria. *Dialogues Clin Neurosci.* 2009;11(2):135-9.
- Dubois B, Hampel H, Feldman H, Scheltens P, Aisen P, Andrieu S et al. Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. *Alzheimers Dement.* 2016;12(3):292-323.
- Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-tur J et al. Increased amyloid- $\beta$ 42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature.* 1996;383(6602):710-3.
- Ferreira.Vieira T, Guimaraes I, Silva F, Ribeiro F. Alzheimer's Disease: Tareting the Cholinergic System. *Curr Neuropharmacol.* 2016;14:101-115.
- Fletcher TL, Cameron P, De Camilli P, Banker G. The distribution of synapsin I and synaptophysin in hippocampal neurons developing in culture. *J Neurosci.* 1991;11(6):1617-26.
- Frade JM, López-Sánchez N. A novel hypothesis for Alzheimer disease based on neuronal tetraploidy induced by p75NTR. *Cell Cycle.* 2010;9:1934-1941.
- Frade JM, Ovejero-Benito M. Neuronal cell cycle: the neuron itself and its circumstances. *Cell Cycle.* 2015;14:712-720.
- Frade JM, López-Sánchez N. Neuronal tetraploidy in Alzheimer and aging. *AGING.* 2017;9:2014-2015.
- Francis P, Palmer A, Snape M, Wilcock G. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1999;66:137-147.
- Geisert EE, Johnson HG, Binder LI. Expression of microtubule-associated protein 2 by reactive astrocytes. *Proc Natl Acad Sci.* 1990;89:3967-3971.
- Chow KH, Factor RE, Ullman KS. The nuclear envelope environment and its cancer connections. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(3):196-209.
- Giri M, Zang M, Lü Y. Genes associated with Alzheimer's disease: an overview and current status. *Clin Interv Aging.* 2016;11:665-81.

- Goedert M. Alzheimer's and Parkinson's disease: The prion concept in relation to assembled A $\beta$ , tau and  $\alpha$ -synuclein. *Science*. 2015;349(6248):1255555.
- Gong CX, Iqbal K. Hyperphosphorylation of Microtubule-Associated Protein Tau: A Promising Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Curr Med Chem*. 2008;15:2321-2328.
- Goo IB, Im JH, Gil HW, Lim SG, Park IS. Comparison of Cell and Nuclear Size Difference between Diploid and Induced Triploid in Marine Medaka, *Oryzias dancena*. *Dev Reprod*. 2015;19(3):127-134.
- Gouras GK, Tsai J, Naslund J, Vincent B, Edgar M, Checler F et al. Intraneuronal Ab42 accumulation in human brain. *Am J Pathol* 2000;156:15–20.
- Hall A, Roberson ED. Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Brain Res Bull*. 2012;88(1):3-12.
- Huang WJ, Zhang X, Chen WW. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease (Review). *Biomed rep*. 2016;4(5):519-522.
- Kaas JH. The Skinny on Brains: Size Matters. *Cerebrum*. 2018;cer-06-18.
- Kametani F, Hasegawa M. Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Front. Neurosci*. 2018;12:25.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*. 1987;325: 733-736.
- Knopman DS, Peterson RC. Mild Cognitive Impairment and Mild Dementia: A Clinical Perspective. *Mayo Clin Proc*. 2014;89(10):1452-1459.
- Kozin S, Barykin E, Mitkevich V, Makarov A. Anti-amyloid Therapy of Alzheimer's Disease: Current State and Prospects. *Biochemistry (Mosc)*. 2018;83(9):1057-1067.
- Lanoiselée HM, Nicolas G, Wallon D, Rovelet-Lecrux A, Lacour M, Rousseaus S. APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. *PLoS Med*. 2017;14(3):e1002270.
- Lapham LW. Tetraploid DNA content of Purkinje neurons of human cerebellar cortex. *Science*. 1968;159(3812):310-2.
- Lee J, Park J, Ahn J, Park J, Kim I, Cho J, et al. Effects of chronic scopolamine treatment on cognitive impairment and neurofilament expresión in the mouse hippocampus. *Mol Med Rep*. 2018;17:1625-1632.
- Lippens G, Sillen A, Landrieu I, Amniai L, Sibille N, Barbier P et al. Tau aggregation in Alzheimer's disease: what role for phosphorylation? *Prion*. 2007;1(1):21-5.
- López-Sánchez N, Fontán-Lozano A, Pallé A, González-Álvarez V, Rábano A, Trejo JL, Frade JM. Neuronal tetraploidization in the cerebral cortex correlates with reduced cognition in mice and precedes and recapitulates Alzheimer's-associated neuropathology. *Neurobiol Aging*. 2017;56:50-66.



Liu CC, Zhao N, Fu Y, Wang N, Linares C, Bu G. ApoE accelerates early seeding of amyloid pathology. *Neuron*. 2017;96(5):1024-1032.

Lui Z, Li T, Wei N, Zhao Z, Liang H, Ji X et al. The Ambiguous Relationship of Oxidative Stress, Tau Hyperphosphorylation, and Autophagy Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2015:352723.

Maccioni RB, Farías G, Morales I, Navarrete L. The Revitalized Tau Hypothesis on Alzheimer's Disease. *Arch Med Res*. 2010;41:226-231.

Maeshima K, Lino H, Hihara S, Imamoto N. Nuclear size, nuclear pore numbers and cell cycle. *Nucleus*. 2011;2(2):113-8.

Manfredi JJ, Prives C. The transforming activity of simian virus 40 large tumor antigen. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1198(1):65-83.

Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris JC et al. Decreased clearance of CNS betaamyloid in Alzheimer's disease. *Science*. 2010;330:1774–1777.

Mayeux R, Stern Y. Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(8).

McCusker D, Kellogg DR. Plasma membrane growth during the cell cycle: unsolved mysteries and recent progress. *Curr Opin Cell Biol*. 2012;24(6):845-851.

McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease : report of the NINCDS-ADRDA : National Institute of Neurologic and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association. *Neurology*. 1984; 34: 939-44.

McShea A, Lee HG, Peersen RB, Casadesus G, Vincent I, Linford NJ et al. Neuronal cell cycle re-entry mediates Alzheimer disease-type changes. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1772(4):467-472.

Melov S, Adlard P, Morten K, Johnson F, Golden T, Hinerfeld D et al. Mitochondrial Oxidative Stress Causes Hyperphosphorylation of Tau. *PLoS ONE*. 2007;6:e536.

Miners JS, Baig S, Tayler H, Kehoe PG, Love S. Neprilysin and Insulin-Degrading Enzyme Levels Are Increased in Alzheimer Disease in Relation to Disease Severity. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2009;68(8):902-914.

Moolman DL, Vitolo OV, Vonsattel JP, Shelanski ML. Dendrite and dendritic spine alterations in Alzheimer models. *J Neurocytol*. 2004;33(3):377-87.

Morrillo SM, Escoll P, de la Hera A, Frade JM. Somatic tetraploidy in specific chick retinal ganglion cells induced by nerve growth factor. *PNAS*. 2010;107(1):109-114.

Morrison JH, Hof PR. Life and death of neurons in the aging brain. *Science*. 1997; 278:412–419.

Mosch B, Morawski M, Mittag A, Lenz D, Tarnok A, Arendt T. Aneuploidy and DNA Replication in the Normal Human Brain and Alzheimer's Disease. *J Neurosci*. 2007;27(26):6859-67.

- Murray AW. Recycling the Cell Cycle: Cyclins Revisited. *Cell*. 2004;116:221-234.
- Nakajima T, Nakashima T, Okada Y, Jo M, Nishikawa T, Mitsumoto Y et al. Nuclear size measurement is a simple method for the assessment of hepatocellular aging in non-alcoholic fatty liver disease: Comparison with telomere-specific quantitative FISH and p21 immunohistochemistry. *Pathol Int*. 2010;60(3):175-83.
- Naslund J, Haroutunian V, Mohs R, Davis KL, Davies P, Greengard P et al. Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA J Am Med Assoc*. 2000;283(12):1571–1577.
- Neddens J, Temmel M, Flunkert S, Kerschbaumer B, Hoeller C, Loeffler T et al. Phosphorylation of different tau sites during progression of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun*. 2018;6(1):52.
- Nelson PT, Braak H, Markesbery W. Neuropathology and Cognitive Impairment in Alzheimer Disease: A Complex but Coherent Relationship. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2009;68(1):1-14.
- Nelson P, Alafuzoff I, Bigio E, Bouras C, Braak H, Cairns N et al. Correlation of Alzheimer Disease Neuropathologic Changes With Cognitive Status: A Review of the Literature. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2012;71:362-381.
- Ntsapi C, Lumkwana D, Swart C, du Toit A, Loos B. New Insights Into Autophagy Dysfunction Related to Amyloid Beta Toxicity and Neuropathology in Alzheimer's Disease. *Int Rev Mol Bio*. 2018;336:321-361.
- O'Brien RJ, Wong PC. Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annu Rev Neurosci*. 2011;34:185-204.
- Octave JN. The amyloid peptide and its precursor in Alzheimer's disease. *Rev Neurosci* 1995;6:287-316.
- Park KH, Hallows JL, Chakrabarty P, Davies P, Vincent I. Conditional neuronal simian virus 40 T antigen expression induces Alzheimer-like tau and amyloid pathology in mice. *J Neurosci*. 2007; 27(11):2969-2978.
- Parsons MP, Raymond LA. Extrasynaptic NMDA receptor involvement in central nervous system disorders. *Neuron*. 2014;82(2):279–293.
- Perl DP. Neuropathology of Alzheimer's Disease. *Mt Sinai J Med*. 2010;77(1):32-42.
- Persson T, Popescus B, Cedazo-Minguez A. Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: Why Did Antioxidant Therapy Fail? *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:427318.
- Pierrot N, Octave JN. Processing of Amyloid Precursor Protein and Amyloid Peptide Neurotoxicity. *Curr Alzheimer Res*. 2008;5:92-99.
- Pietrzak K, Czarnecka K, Mikiciuk-Olasik E, Symanski P. New Perspectives of Alzheimer Disease Diagnosis – the Most Popular and Future Methods. *Med Chem*. 2018;14(1):34-43.

Prize NP. Mechanisms of Cyclin-dependent Kinase Regulation: Structures of Cdks, their Cyclin Activators, and Cip and INK4 Inhibitors. *J Mol Biol.* 1999;287:821-828.

Puah WC, Chinta R, Wasser M. Quantitative microscopy uncovers ploidy changes during mitosis in live *Drosophila* embryos and their effect on nuclear size. *Biol Open.* 2017;15(3):390-401.

Qiu C, Kivipelto M, von Strauss E. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin Neurosci.* 2009;11(2):111-28.

Rizzi L, Rosset I, Roriz-Cruz M. Global Epidemiology of Dementia: Alzheimer' and Vascular Types. *Biomed Res Int.* 2014;2014:908915.

Roca-Cusachs P, Alcaraz J, Sunyer R, Samitier J, Farre R, Navajas D. Micropatterning of single endothelial cell shape reveals a tight coupling between nuclear volume in G1 and proliferation. *Biophys J.* 2008;94(12):4984-4995.

Sanabria-Castro A, Alvarado-Echeverría I, Monge-Bonilla C. Molecular Pathogenesis of Alzheimer's Disease: An Update. *Ann Neurosci.* 2017;24:46-54.

Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years, *EMBO Mol Med.* 2016;8(6):595-608.

Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2007;27(11):2866-2875.

Shen J, Wu J. Nicotinic Cholinergic Mechanisms in Alzheimer's Disease. *Int Rev Neurobiol.* 2015;124:275-92.

Shukla V, Mishra S, Pant H. Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Adv Pharmacol Sci.* 2011;572634.

Sisková Z, Justus D, Kaneko H, Friedrichs D, Henneberg N, Beutel T, Pitsch et al. Dendritic structural degeneration is functionally linked to cellular hyperexcitability in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron.* 2014;84(5):1023-33.

Soto M, Reynish E, Nourhashémi F, Vellas B. Aspects cliniques de la maladie d'Alzheimer. *Presse Med.* 2007;36:1491-9.

Taupin, P. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: Paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Res Rev.* 2007;53(1):198-214.

Terry A, Buccafusco J. 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.* 2003;306:821-827.

Thal D, Rüb U, Orantes M, Braak H. Phases of A $\beta$ -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology.* 2002;58(12):1791-800.

Walsh DM, Selkoe DJ. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* 2004;44, 181–193.

Wang JZ, Xia YY, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Abnormal Hyperphosphorylation of Tau: Sites, Regulation, and Molecular Mechanisms of Neurofibrillary Degeneration. *J of Alzheimers Dis.* 2013;33:S123-A139.

Webster M, Witkin KL, Cohen-Fix O. Sizing up the nucleus: nuclear shape, size and nuclear-envelope assembly. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 10):1477-86.

Westra J, Barral S, Chun J. A Reevaluation of Tetraploidy in the Alzheimer's Disease Brain. *Neurodegenerative Dis.* 2009;6:221-229.

Wimo A, Jönsson L, Bond J, Princ M, Winblad B. The worldwide economic impact of dementia 2010. *Alzheimers Dement.* 2013;9(1)1-11.

Wu XL, Piña-Crespo J, Zhang YX, Chen XC, Xu HX. Tau-mediated Neurodegeneration and Potential Implications in Diagnosis and Treatment of Alzheimer's Disease. *Chin Med J (Engl).* 2017;130(24):2978-2990.

Zhang W, Bai M, Xi Y, Hao J, Zhang Z, Su C et al. Multiple inflammatory pathways are involved in the development and progression of cognitive deficits in APPswe/PS1dE9 mice. *Neurobiol Aging.* 2012;33:2661e2677.

Zheng WH, Bastianetto S, Mennicken F, Ma W, Kar S. Amyloid beta peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. *Neuroscience.* 2002;115(1):201-11.