



Universitat Autònoma de Barcelona

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOMEDICINA

**ESTUDIO DEL PAPEL DE IR/IGF-1R y GLP-1R EN EL
DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.
ESTRATEGIAS DE TERAPIA GÉNICA PARA REDUCIR LA
SINTOMATOLOGÍA DEL MODELO 3xTgAD**

TESIS DOCTORAL

Ángela Sánchez Osuna

En Bellaterra, a mayo de 2015



Universitat Autònoma de Barcelona

**ESTUDIO DEL PAPEL DE IR/IGF-1R y GLP-1R EN EL
DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.
ESTRATEGIAS DE TERAPIA GÉNICA PARA REDUCIR LA
SINTOMATOLOGÍA DEL MODELO 3xTgAD**

Memoria presentada por

Ángela Sánchez Osuna

Para optar al grado de

Doctor en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina

Trabajo realizado bajo la supervisión del Dr. Miguel Chillón Rodríguez, en el Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica de la Universitat Autònoma de Barcelona.

El director

La doctoranda

Miguel Chillón Rodríguez

Ángela Sánchez Osuna

En Bellaterra, a mayo de 2015

A mi familia, a mis amigos
y a todos los que han contribuido de alguna manera a hacer posible esta tesis.

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	9
I. INTRODUCCIÓN	13
1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	15
1.1 <i>DEMENCIA</i>	15
1.2 <i>ENFERMEDAD DE ALZHEIMER</i>	15
1.2.1 <i>DESCUBRIMIENTO E HISTORIA</i>	15
1.2.2 <i>FACTORES GENÉTICOS Y RIESGOS AMBIENTALES</i>	17
1.2.3 <i>TEORÍAS ETIOLÓGICAS</i>	18
1.2.4 <i>DIAGNÓSTICO</i>	26
1.2.5 <i>TRATAMIENTO ACTUAL Y NUEVAS TERAPIAS PROPUESTAS</i>	28
2. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y DIABETES	31
2.1. <i>ALZHEIMER Y DIABETES</i>	31
2.1.1. <i>DIABETES Y FUNCIÓN COGNITIVA</i>	31
2.1.2. <i>ALZHEIMER Y DIABETES A NIVEL MOLECULAR Y PATOLÓGICO</i>	32
2.2. <i>GLUCOSA Y FUNCIÓN COGNITIVA</i>	33
2.3. <i>VÍA DE LA INSULINA EN EL CEREBRO</i>	34
2.3.1. <i>INSULINA EN EL CEREBRO</i>	34
2.3.2. <i>IR EN EL CEREBRO</i>	35
2.3.3. <i>PAPEL DE LA SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA EN EL CNS</i>	36
2.4. <i>IGF Y SU RECEPTOR EN CEREBRO</i>	40
2.4.1. <i>RECEPTORES DE IGF. SIMILITUDES Y DIFERENCIAS CON IR</i>	41
2.4.2. <i>FUNCIONES DE IGF-1 EN EL CNS</i>	42
2.5. <i>RESISTENCIA A LA INSULINA/IGF-1 EN CNS</i>	43
2.5.1. <i>RESISTENCIA A LA INSULINA/IGF-1 Y AD. DIABETES TIPO 3</i>	44
2.6. <i>GLP-1 Y SU RECEPTOR EN CEREBRO</i>	48
2.6.1. <i>FUNCIÓN DE GLP-1 EN EL CNS</i>	51
3. TERAPIA GÉNICA	53
3.1. <i>ASPECTOS GENERALES</i>	53
3.1.1. <i>DEFINICIÓN Y APLICACIONES</i>	53
3.1.2. <i>EVOLUCIÓN DE LA TERAPIA GÉNICA. ÉXITOS Y FRACASOS</i>	54
3.1.3. <i>VECTORES PARA LA TRANSFERENCIA GÉNICA</i>	56
3.2. <i>VECTORES ADENOASOCIADOS</i>	58
3.2.1. <i>INMUNIDAD Y AAVs</i>	60
3.2.2. <i>SEROTIPOS DE AAVs Y TROPISMO</i>	60
3.2.3. <i>USO DE AAVs PARA TERAPIA GÉNICA EN CNS</i>	61
4. MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LA AD	63
4.1. <i>MODELOS NATURALES</i>	63
4.2. <i>MODELOS TRANSGÉNICOS</i>	64
4.2.1. <i>MODELO 3xTgAD</i>	64

II. OBJETIVOS	67
III. RESULTADOS	71
1. CARACTERIZACIÓN A NIVEL MOLECULAR DE LA VÍA DE LA INSULINA EN EL MODELO 3xTgAD	73
1.1. <i>Estudio de los niveles de IR, IGF1R, GLP1R e IRS2 en el modelo 3xTgAD y animales WT de 6 meses.</i>	73
1.2. <i>Estudio de los niveles de expresión de los receptores a nivel de mRNA en animales 3xTgAD y WT a 6, 9 y 12 meses.</i>	75
1.3. <i>Estudio de los niveles de IGF-1R total y activado (fosforilado) a 9 y 12 meses de animales 3xTgAD y WT.</i>	80
1.4. <i>Caracterización histológica de los cerebros de los animales 3xTgAD.</i>	83
2. GENERACIÓN DE VECTORES DE TERAPIA GÉNICA	86
2.1. <i>Diseño y clonaje de shRNAs</i>	86
2.1.1. <i>Estudio de la eficiencia de los shRNAs in vitro</i>	88
2.2. <i>Generación de shRNA-AAVs</i>	89
2.3. <i>Clonaje de los cDNAs de IGF1R y GLP1R en cassette AAV</i>	89
2.4. <i>Generación y caracterización de cDNA-AAVs</i>	91
3. ADMINISTRACIÓN DE VECTORES IN VIVO	92
3.1. <i>Efecto de la administración de vectores portadores de shRNAs para el silenciamiento de la vía de la insulina.</i>	92
3.2. <i>Administración de vectores portadores del cDNA de IGF-1R y GLP-1R. Efectos sobre los síntomas psicológicos y conductuales asociados a la demencia (BPSD).</i>	94
3.2.1. <i>Inyección intracraneal de AAV2/rh10-IGF1R y AAV2/rh10-GLP1R</i>	94
3.2.2. <i>Capacidades físicas y reflejo visual</i>	95
3.2.3. <i>Neofobia y ansiedad</i>	97
3.2.4. <i>Capacidad de aprendizaje y memoria de los animales inyectados</i>	103
3.3. <i>Análisis de la expresión vírica por PCR cuantitativa.</i>	115
3.4. <i>Efecto sobre la histopatología del cerebro de la AD.</i>	117
IV. DISCUSIÓN	123
1. Enfermedad de Alzheimer y Resistencia a la Insulina en CNS	125
2 Desarrollo de herramientas de Terapia Génica	130
3 Efecto del IGF-1R y el GLP-1R en animales 3xTgAD	132
3.1. <i>Efecto de la sobreexpresión de IGF-1R y GLP-1R en los BPSD de los animales 3xTgAD.</i>	133
3.1.1. <i>Efecto de la sobreexpresión de IGF-1R y GLP-1R en machos 3xTgAD.</i>	133
3.1.2. <i>Efecto de la sobreexpresión de IGF-1R y GLP-1R en hembras 3xTgAD.</i>	135
3.2. <i>Efecto de la sobreexpresión de IGF-1R y GLP-1R en las habilidades cognitivas de los animales 3xTgAD.</i>	137
3.2.1. <i>Efectos sobre la memoria de trabajo (T-maze) de los machos 3xTgAD.</i>	137
3.2.2. <i>Efectos sobre la memoria de trabajo (T-maze) de las hembras 3xTgAD.</i>	138
3.2.3. <i>Efectos sobre la capacidad de aprendizaje y memoria espacial (Morris Water Maze) de los machos 3xTgAD.</i>	139
3.2.4. <i>Efectos sobre la capacidad de aprendizaje y memoria espacial (Morris Water Maze) de las hembras 3xTgAD.</i>	141

4	Análisis de la expresión de los transgenes virales.	143
5	Efecto de la sobreexpresión de IGF-1R y GLP-1R en la histopatología asociada a la AD de los animales 3xTgAD	144
V.	CONCLUSIONES	149
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	153
1.	MATERIALES	155
1.1.	<i>Ratones Triple Transgénicos Alzheimer's Disease (3xTgAD)</i>	155
1.2.	<i>Vectores plasmídicos</i>	155
1.3.	<i>Cultivos bacterianos</i>	155
1.3.1.	Medio de crecimiento	155
1.3.2.	Placas de cultivo	155
1.3.3.	Tampones para la preparación de bacterias quimiocompetentes	156
1.3.4.	Tampones para minipreparaciones de DNA	156
1.4.	<i>Cloning</i>	156
1.4.1.	Enzimas	156
1.4.2.	Reactivos para la preparación de geles de agarosa	157
1.5.	<i>Cultivos celulares</i>	157
1.5.1.	Líneas celulares	157
1.5.2.	Medios de cultivo y suplementos	158
1.5.3.	Tampones y reactivos empleados en cultivos celulares y producción de vectores virales	158
1.6.	<i>Tampones de proteínas</i>	159
1.6.1.	Tampón RIPA	159
1.6.2.	Reactivos para la preparación de los geles	159
1.6.3.	Tampón de electroforesis	159
1.6.4.	Tampón de transferencia	159
1.6.5.	TBS-T	160
1.7.	<i>Anticuerpos</i>	160
1.7.1.	Para western-blot	160
1.7.2.	Para inmunohistoquímica	161
1.8.	<i>Oligonucleótidos para la amplificación génica por PCR</i>	161
2.	MÉTODOS	163
2.1.	<i>Técnicas de extracción y manipulación del DNA</i>	163
2.1.1.	Preparación de bacterias quimiocompetentes	163
2.1.2.	Transformación de bacterias quimiocompetentes por choque térmico	163
2.1.3.	Minipreparaciones de DNA plasmídico	164
2.1.4.	Maxipreparaciones de DNA plasmídico	164
2.1.5.	Digestión de DNA por enzimas de restricción	164
2.1.6.	Electroforesis de fragmentos de DNA en geles de agarosa	165
2.1.7.	Purificación de fragmentos de DNA	165
2.1.8.	Ligación	165
2.2.	<i>Técnicas de extracción y manipulación del RNA</i>	166
2.2.1.	Extracción de RNA: Método del QIAzol	166

2.2.2. Cuantificación de RNA: Nanodrop	166
2.2.3. Experion	166
2.2.4. Retrotranscripción	167
2.3. <i>Amplificación de DNA por PCR</i>	167
2.4. <i>Análisis de la expresión por PCR cuantitativa</i>	168
2.5. <i>Técnicas de extracción y análisis de proteínas</i>	168
2.5.1. Extracción de proteínas: Método RIPA	168
2.5.2. Cuantificación de proteínas: Método BCA	168
2.5.3. Western-Blot	169
2.6. <i>Técnicas de cultivos celulares</i>	170
2.6.1. Mantenimiento y pases de cultivos en monocapa	170
2.6.2. Congelación y descongelación de viales	171
2.6.3. Introducción de DNA plasmídico por transfección	171
2.6.4. Infección con vectores adenoasociados	172
2.7. <i>Producción y purificación de vectores adenoasociados</i>	172
2.7.1. Producción de AAV2/10	172
2.7.2. Purificación por gradiente de iodixanol	173
2.7.3. Determinación del título de la producción por picogreen	174
2.8. <i>Experimento in vivo</i>	175
2.8.1. Genotipado de los animales	175
2.8.2. Inyección intracraneal de vectores AAV.	176
2.9. <i>Pruebas de comportamiento</i>	177
2.9.1. Pruebas sensoriomotoras	177
2.9.2. <i>Corner Test</i>	178
2.9.3. <i>Open Field</i>	178
2.9.4. Black and White Box Test	178
2.9.5. <i>T-maze</i>	179
2.9.6. <i>Morris Water Maze</i>	179
2.10. <i>Eutanasia y toma de muestras</i>	180
2.11. <i>Inmunohistoquímica y tinciones de cortes histológicos</i>	180
2.11.1. Fijación e inclusión en bloques de OCT	180
2.11.2. Realización de cortes y montaje	181
2.11.3. Inmunohistoquímica	181
2.12. <i>Análisis estadístico</i>	181
VII. BIBLIOGRAFÍA	183

ABREVIATURAS

α 2M: α 2-Macroglobulina

AAV: Virus adenoasociado

A β : Péptido β -amiloide

AChE: Acetilcolinesterasa

AD: Enfermedad de Alzheimer (Alzheimer's Disease)

ADA: Adenosina desaminasa

AgRP: Péptido asociado al agutí

AIF: Factor Inductor de la Apoptosis

AMPA: Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico

AMPK: Quinasa de Adenosín monofosfato

ANOVA: Análisis de varianza

ApoE: Apolipoproteína E

APP: Proteína precursora del péptido amiloide

APS: Persulfato de amonio

BBB: Barrera hematoencefálica (Blood Brain Barrier)

BACE: β -secretasa de APP 1 (β -site APP cleaving enzyme 1)

BPSD: Síntomas neuropsiquiátricos asociados a la demencia (Behavioral and Psychiatric Psymtoms of Dementia)

$^{\circ}$ C: Grados centígrados

CAA: Angiopatía amiloide cerebral

cDNA: Ácido desoxirribonucleico copia

ChAT: Colina-acetil transferasa

CFS: Líquido cefalorraquídeo

CFTR: Fibrosis quística

CMV: Citomegalovirus (y su promotor)

CNS: Sistema nervioso central

COX: ciclooxigenasa

CRE: Elemento de regulación en cis

CREB: Proteína de unión a CRE

CVO: Órganos circunventriculares

DM: Diabetes Mellitus

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DPP-4: Dipeptidil peptidasa-4

EDTA: Ácido Etilen-diamino-tetraacético

FAD: Enfermedad de Alzheimer Familiar

FBS: Suero Fetal Bovino

FIRKO: Knock-out para el receptor de insulina en el tejido adiposo

g: Unidad de gravedad

GABA: Ácido γ -aminobutírico

GAD: Descarboxilasa del Ácido Glutámico

GLP-1: Péptido similar al Glucagón-1 (Glucagon-like peptide-1)

GLP-1R: Receptor del GLP-1

GPCR: Receptor acoplado a proteína G

GSK3: Quinasa de la sintasa de glucógeno (Glycogen synthase kinase-3)

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

HSV: Herpes virus

IAPP: Polipéptido amiloide del islote

icv: Intracerebroventricular

IGF-1/2: Factor de crecimiento similar a la insulina-1 (Insulin-like Growth Factor-1/2)

IGF1-R: Receptor de IGF-1/2

Ip: intraperitoneal

IR: Receptor de insulina

IRS-1/2: Sustrato del receptor de insulina 1/2

ITR: Repeticiones terminales invertidas

Kb: Kilobases

KPI: Dominio Inhibidor de la Proteasa Kunitz

L: Litro

LB: Luria's Broth

LDL: Lipoproteína de baja densidad

LOD: Diabetes de inicio tardío

LRP: Proteína asociada al receptor de LDL

LTD: Depresión a largo plazo (Long-Term Depression)

LTP: Potenciación a largo plazo (Long-Term Potentiation)

M: Molar

MAPK: Quinasas de Proteínas Activadas por Mitógeno

MCI: Deterioro cognitivo leve

µg: Microgramos

mM: Milimolar

µM: Micromolar

µm: Micrómetros

mL: Mililitros

µL: Microlitros

MRI: Imagen por Resonancia Magnética

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

MWM: *Morris Water Maze*

NE: Norepinefrina

NFKB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NFT: Ovillos Neurofibrilares (Neurofibrillar tangles)

ng: Nanogramos

NIRKO: Knock-out del receptor de insulina neuronal

NMDA: N-metil-D-aspartato

NPY: Neuropeptido Y

NSAIDs: Antiinflamatorios no esteroideos

pb: Pares de bases

PBS: Solución salina con fosfato

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PEG: Polietilenglicol

PEI: Polietilenimina

PET: Tomografía por Emisión de Positrones

PFA: Paraformaldehído

PHF: Filamentos en doble hélice (Paired Helical Filaments)

PI3K: Quinasa del inositol-3-fosfato

PKA: Proteína quinasa A

PKB: Proteína quinasa B

PKC: Proteína quinasa C

PNS: Sistema Nervioso Periférico

POMC: Proopiomelanocortina

poliA: Secuencia de poliadeninas

ppm: Partes por millón

P/S: Penicilina/Estreptomicina

PT: *Place Task*

PVN: Núcleo paraventricular

rpm: Revoluciones por minuto

SAD: Enfermedad de Alzheimer Esporádica

SCID-X1: Inmunodeficiencia Combinada Severa ligada al cromosoma X

SDS: Dodecil-sulfato de sodio

shRNA: Ácido ribonucleico en horquilla (short hairpin RNA)

STZ: Estreptozotocina

T1D: Diabetes tipo 1

T2D: Diabetes tipo 2

T3D: Diabetes tipo 3

TEMED: Tetrametiletilendiamina

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

vg: Genomas virales

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad

WT: Wild-type

RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer (AD) es una enfermedad neurodegenerativa cuyos síntomas no incluyen sólo la pérdida de memoria, sino también problemas en la función ejecutiva, cambios de personalidad, etc. Se trata de una enfermedad compleja, en la que intervienen numerosos factores de riesgo y en la que se observan alteraciones a distintos niveles, histológico, metabólico, genético, etc. A nivel histológico, los cerebros de pacientes de AD se caracterizan por la existencia de una importante neurodegeneración, especialmente de las neuronas colinérgicas, así como por la acumulación de los dos principales marcadores de la AD: las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares de proteína tau hiperfosforilada.

La AD es la principal causa de demencia en el adulto y, probablemente debido al aumento de la esperanza de vida y el envejecimiento de la población, su incidencia es cada vez mayor y constituye un importante problema económico-sanitario. No obstante, a pesar de los numerosos trabajos de investigación que se centran en estudiar las causas que pueden provocar la AD y en encontrar un posible tratamiento, los tratamientos actuales sólo presentan un efecto moderado en algunos de los síntomas de las etapas más iniciales de la enfermedad siendo ineficientes en las etapas más avanzadas.

Uno de los factores de riesgo en el desarrollo de la AD que ha generado un gran interés en los últimos años es la diabetes y la resistencia a la insulina a nivel del sistema nervioso central (CNS), llegando a hablarse de diabetes de tipo 3. Son numerosos los estudios que prueban que la administración de insulina es capaz de mejorar la memoria tanto en personas sanas como en pacientes de AD y se ha demostrado también que factores como el IGF-1 y el GLP-1, cuyos mecanismos se encuentran estrechamente relacionados con los de la insulina, pueden actuar como factores de crecimiento y neuroprotección en el CNS. Asimismo, en pacientes de AD, se ha descrito un déficit en la señalización de insulina/IGF-1 y GLP-1.

De manera que estudiamos los niveles de los receptores de insulina, IGF-1 y GLP-1, así como los niveles de IRS-2 en el modelo 3xTgAD, ampliamente utilizado para el estudio de la AD. Se analizaron tanto los niveles de RNA como los de proteínas en diferentes etapas de la enfermedad. Así, descubrimos que, si bien no se observa una alteración en los niveles de las proteínas estudiadas durante la etapa prodromal, los niveles de IGF-1R a nivel de mRNA se encuentran significativamente elevados en los animales 3xTgAD en comparación con los animales WT a los 9 meses de edad. Este aumento a nivel de mRNA podría ser un mecanismo de compensación ante la reducción de los niveles de IGF-1R en la superficie de las neuronas provocada por la acción del A β extraneuronal a 9 y 12 meses.

A la vista de estos resultados, nuestra hipótesis fue que la señalización de la insulina/IGF-1 a través de sus receptores es necesaria para el buen funcionamiento neuronal y, para comprobarlo, diseñamos dos estrategias en sentidos contrarios, uno para el silenciamiento de IR/IGF-1R, y otro para la sobreexpresión de IGF-1R y GLP-1R. Para ello, empleamos vectores adenoasociados del pseudotipo AAV2/rh10, que permiten una transducción eficiente de neuronas y la expresión a largo plazo del transgén.

En primer lugar, clonamos las secuencias de tres shRNAs diferentes de IGF-1R en un plásmido adecuado para la generación de vectores adenoasociados y probamos su eficiencia *in vitro* para seleccionar el más eficiente y producir con él el vector con el que llevar a cabo un experimento de silenciamiento del IR/IGF-1R. Para ello, administramos este vector en el hipocampo de hembras 3xTgAD de dos meses de edad y comprobamos que, en estas condiciones, la acumulación intraneuronal a 4 meses de edad es más agresiva que en hembras inyectadas con un vector que expresaba un shRNA-scrambled.

Por otra parte, también llevamos a cabo la producción de vectores adenoasociados para la sobreexpresión a largo plazo de IGF-1R y de GLP-1R. Se inyectaron machos y hembras 3xTgAD de 5 meses y a los 12 meses de edad se analizaron los efectos de la sobreexpresión en comparación con animales WT y 3xTgAD inyectados con un virus control. En primer lugar, se comprobó que los animales 3xTgAD presentan altos niveles de ansiedad en comparación con los animales WT y la sobreexpresión de GLP-1R es capaz de revertir este comportamiento tanto en machos como en hembras, mientras que la sobreexpresión de IGF-1R sólo es efectiva en hembras.

A continuación, se analizaron las habilidades cognitivas de los animales, y se observó que los machos 3xTgAD no presentan graves problemas de aprendizaje ni de memoria en comparación con los animales WT, y el tratamiento con el vector AAV2/rh10-GLP1R aumenta su flexibilidad cognitiva, tanto respecto a los animales 3xTgAD-Null como respecto a los animales WT-Null. En cuanto a la histopatología de los machos 3xTgAD, las únicas diferencias significativas encontradas son en cuanto a la neurodegeneración del córtex cerebral. Ambos tratamientos consiguen revertir este problema.

A diferencia de los machos, en las hembras 3xTgAD sí se observan déficits en la capacidad de aprendizaje y la memoria en comparación con las WT, que se normalizan con la administración del vector AAV2/rh10-IGF1R. En correlación con estos déficits cognitivos, se observa en ellas una mayor acumulación de A β y tau, así como una mayor neuroinflamación y una mayor pérdida neuronal al compararlas con las hembras WT y con los machos 3xTgAD. La sobreexpresión de IGF-1R y GLP-1R no consigue reducir la acumulación de A β y, aunque ambos tratamientos son eficientes para la reducción de la neuroinflamación y la pérdida neuronal, sólo el vector AAV2/rh-IGF1R consigue reducir los niveles de tau, lo que indicaría que es la reducción en la acumulación de tau lo que provoca una mejora en el aprendizaje espacial y la memoria de las hembras 3xTgAD.

I.INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

1.1 DEMENCIA

Se define como demencia a la **pérdida progresiva de la función cognitiva** independientemente del estado de atención y que afecta a las funciones sociales y personales del individuo. Debe distinguirse de la pérdida de memoria debido a la edad, en la que, a pesar de la degradación gradual de la memoria, el funcionamiento intelectual de la persona es correcto en general y no se observan cambios en el comportamiento y la personalidad del paciente, ni desorientación espacial, aspectos que sí aparecen en el caso de la demencia. Por tanto, la demencia no forma parte del proceso normal de envejecimiento, sino que se trata de una **patología** (Lalana).

Las demencias se pueden clasificar como demencias corticales y subcorticales. De las primeras, la más importante es la **enfermedad de Alzheimer** (AD de sus siglas en inglés, Alzheimer's Disease), también conocida como demencia temporoparietal. Otros tipos de demencia son la demencia frontotemporal o complejo PICK, la demencia vascular, la demencia con cuerpos de Lewy, la enfermedad de Creutzfeld-Jakob, la neurosífilis, la Corea de Huntington, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Wilson.

1.2 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

1.2.1 DESCUBRIMIENTO E HISTORIA

Es la causa más común de demencia en el adulto. Fue descrita por primera vez por el psiquiatra alemán **Alois Alzheimer** en una mujer de 55 años llamada Auguste Deter. La paciente había sido admitida en un centro psiquiátrico cuatro años antes, cuando empezó a desarrollar unos fuertes celos hacia su marido y un comportamiento errático, confuso y alucinatorio. Al morir la paciente en 1906, A. Alzheimer reportó el caso públicamente, donde detallaba los síntomas psiquiátricos, así como el estado de **confusión y desorientación espacial y temporal** en que se encontraba la paciente y que hoy en día constituyen uno de los criterios para el diagnóstico de la AD (Strassnig and Ganguli, 2005).

Cuando Alois Alzheimer examinó histológicamente el cerebro de la paciente, observó una **pérdida neuronal importante**, así como unas **neurofibrillas** y unas **placas miliares** de una sustancia que no supieron identificar y que hoy día se consideran los principales marcadores histopatológicos de la enfermedad de Alzheimer: los **ovillos neurofibrilares** y las **placas amiloides** (Strassnig and Ganguli, 2005), (Dahm, 2006)

(Figura 1.1). Según A. Alzheimer, la patología de Auguste D. no se parecía a ninguna enfermedad psiquiátrica conocida hasta ese momento.

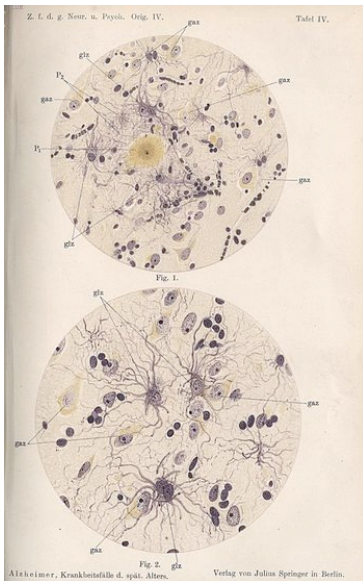


Figura 1.1. Dibujos realizados por A. Alzheimer a partir de la observación de las muestras de A. Deter.

Inicialmente, los estudios y conclusiones de A. Alzheimer fueron recibidos con escepticismo por sus colegas, que no creían que las características histológicas observadas pudieran estar relacionadas con los síntomas psiquiátricos de la paciente, que ellos consideraban asociados a una demencia vascular (Lage). Fue **Emil Kraepelin**, mentor de A. Alzheimer, quien dio el nombre de “Alzheimer’s disease” a este tipo de demencia, que clasificó como **presenil** (<65 años), para diferenciarla de la demencia senil. El término apareció por primera vez en un libro publicado por Kraepelin en 1910 titulado “Dementia at the Degenerative Age” (Lage, 2006) y ha perdurado hasta hoy. Por otra parte, en 1997 se descartó la presencia de isquemia u otro tipo de lesiones a partir de cortes de tejido de August que se conservaban en el Instituto de Neuropatología de la Universidad de Munchen (Lage).

Actualmente, desde el punto de vista neuropatológico, la enfermedad de Alzheimer se considera un proceso patológico caracterizado por la presencia de **placas A β** (especialmente placas neuríticas) y **ovillos neurofibrilares**, así como la subsecuente pérdida neuronal y sináptica, atrofia, gliosis, y, a menudo, angiopatía amiloide (Hyman et al., 2012). Estos marcadores neuropatológicos pueden, o no, provocar una **sintomatología clínica** específica (Knopman et al., 2003), (Bennett et al.).

Es por esto último que últimamente se ha propuesto el término “**patología de Alzheimer**” para referirse a los signos neuropatológicos de la enfermedad, a fin de evitar la confusión con el término “**enfermedad de Alzheimer**”, que se restringe a designar la enfermedad clínica con síntomas que abarcan desde la fase de predemencia a la demencia más o menos severa (Dubois et al.)

En 2014, casi 36 millones de personas en todo el mundo sufrían demencia, siendo la principal causa de incapacidad a partir de los 65 años de edad. Esto supone un coste de 605 mil millones de dólares en todo el mundo, lo que supone un 1% del PIB mundial. Esto convierte a la demencia y, en particular, la AD, en una enfermedad de gran importancia en todo el planeta.

Los criterios clínicos y neuropatológicos para el diagnóstico de la enfermedad, las distintas fases en que se divide la evolución de la misma y las técnicas usadas para llevar a cabo dicho diagnóstico, serán discutidos más adelante.

1.2.2 FACTORES GENÉTICOS Y RIESGOS AMBIENTALES

En un estudio de población realizado en 2006 por Gatz et al. entre gemelos mono- y dicigóticos, los autores confirman que la AD tiene un alto factor de heredabilidad que no varía con el sexo. También demuestran un papel de los factores genéticos en cuanto a la edad de inicio de la enfermedad (Gatz et al., 2006).

Según el grado de heredabilidad, se puede clasificar la AD en dos variedades de la enfermedad: el **Alzheimer familiar (FAD)** por sus siglas en inglés), enfermedad autosómica dominante que generalmente aparece antes de los 65 años; y el **Alzheimer esporádico (SAD)**, enfermedad no mendeliana y cuya sintomatología se hace evidente a partir de los 65 años del paciente.

En 1984, Glenner et al. demostraron que las fibrillas amiloides presentes en muestras de pacientes de AD y en muestras de pacientes de Síndrome de Down eran casi idénticas, lo que les llevó a sugerir que la AD estaba genéticamente ligada al cromosoma 21 (Glenner and Wong, 1984a).

El FAD se relaciona con diferentes mutaciones en tres genes distintos:

- El gen de la proteína precursora amiloide (APP), codificada en el cromosoma 21 (Goate et al.), pero responsable sólo de unos pocos casos de FAD (Kamino et al., 1992).
- El gen de la Presenilina-1, responsable del procesamiento de la APP, codificado en el cromosoma 14 (Schellenberg et al., 1992) por el gen S182 (Sherrington et al., 1995).
- El gen de la Presenilina-2, homóloga a la anterior y codificada en el cromosoma 1 (Levy-Lahad et al., 1995b), (Levy-Lahad et al., 1995a).

Aunque éstos son los genes más estudiados con un papel confirmado en el FAD, no se descarta que existan más, como sugiere el estudio de Bertram et al. sobre un locus del cromosoma 10 (Bertram et al., 2000).

En cuanto al SAD, los factores genéticos no son tan determinantes, y existe también una gran influencia del estilo de vida y factores ambientales. El gen que más se ha relacionado históricamente con el SAD es el **alelo ε4 de la apolipoproteína E (apoEε4)** (Saunders et al., 1993), localizado en el cromosoma 19. Son numerosos los estudios que relacionan el cromosoma 19 y el alelo APOE ε4, no sólo con el SAD sino también con la variedad de inicio tardío del FAD (Saunders et al., 1993) (Pericak-Vance et al., 1991), (Saunders et al., 1993), (Corder et al., 1993), (Strittmatter et al., 1993a). Más recientemente, también se ha encontrado una relación entre el riesgo de padecer AD y los cambios que puedan ocurrir de forma genética o condicionados por factores ambientales sobre la expresión o funcionalidad de SORL1, un receptor relacionado con la sortilina (Rogaeva et al., 2007).

Aunque puede existir una predisposición genética para padecer SAD, existen numerosos **factores de riesgo** para el desarrollo de la enfermedad. Éstos pueden ser factores relacionados con el estado de salud

de la persona, como son la hipertensión, diabetes, hipercolesterolemia, hiperlipidemia, hiperhomocisteinemia, hipotiroidismo, niveles hormonales, depresión, o haber sufrido un infarto cerebral.

El estilo de vida del paciente también afecta al riesgo de padecer SAD. Tener una dieta equilibrada, realizar ejercicio, no fumar o tomar una copa de vino una vez a la semana son factores que pueden reducir el riesgo de desarrollar AD. También existen algunos estudios que indican que tomar antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs) reduce el riesgo de AD, mientras que las benzodiazepinas lo aumentan. También se han realizado estudios que relacionan un mayor nivel educativo, con menor riesgo de padecer AD (Patterson et al., 2007), puesto que afecta a lo que se conoce como la **reserva cognitiva** del paciente.

El papel de todos estos factores en la etiología de la AD se discute a continuación.

1.2.3 TEORÍAS ETIOLÓGICAS

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad multifactorial y existen numerosas teorías acerca de las principales causas de su desarrollo. Como se verá, ninguna aporta una respuesta clara y definitiva a las causas que llevan al desarrollo de la patología de AD, y todas se relacionan entre sí. De hecho, es posible que la AD no pueda entenderse como una enfermedad única, sino como un conjunto de procesos que llevan a la alteración de la homeostasis del cerebro y la subsecuente patología neurodegenerativa.

1.2.3.1 Hipótesis de la Cascada Amiloide

La teoría de la cascada amiloide defiende que el principal responsable para el desarrollo de la AD y sus síntomas es el continuo depósito de la proteína β -amiloide, y considera que los ovillos neurofibrilares, la pérdida neuronal, el daño vascular y la demencia son la consecuencia directa de dicha acumulación de β -amiloide (Hardy and Higgins, 1992), (Selkoe, 2000). El concepto de que el estudio de los niveles en la concentración de $A\beta$ en suero podrían estar relacionados con la demencia ya había sido comentado por Glenner en 1984 (Glenner and Wong, 1984b), y bautizado con el nombre de “Hipótesis de la Cascada Amiloide” por Hardy en 1992.

La proteína o péptido amiloide puede acumularse tanto en el interior de las neuronas como en el espacio extracelular, formando las **placas neuríticas** o seniles y **placas amiloides** y en las paredes de los vasos sanguíneos intracorticales y meníngeos. Las placas son lesiones esféricas, con un núcleo formado de fibras amiloides y rodeado por terminales nerviosas en degeneración (Muller-Hill and Beyreuther, 1989).

El péptido amiloide se genera a partir de la proteólisis de la **proteína precursora amiloide** (APP) (Glenner et al., 1984) por la acción de **secretasas** entre los residuos 16 y 17 (Sisodia et al., 1990). La APP es una proteína de membrana cuyo mRNA sufre splicing alternativo dando lugar a tres especies. Una de ellas se diferencia de las otras dos en la ausencia de un dominio denominado **Kunitz Protease Inhibitor** (KPI) y es la forma predominante en neuronas (Rohan de Silva et al., 1997), (Kang and Muller-Hill, 1990). Una elevada

expresión de las otras isoformas ha sido observada en cerebros de pacientes de AD (Menendez-Gonzalez et al., 2005) y puede venir provocada por una elevada activación de los receptores NMDA (Bordji et al., 2010).

La función fisiológica de la APP no está del todo clara, aunque parece que está implicada en diversos procesos, como la elongación de neuritas, sinaptogénesis, el tráfico axonal de proteínas neuronales (Liu et al., 2009b), (Satpute-Krishnan et al., 2003), transducción de señales transmembrana (Lorenzo et al., 2000), (Ho and Sudhof), o adhesión celular (Yamazaki et al., 1997). La APP es naturalmente procesada por γ -secretasas (**presenilinas 1 y 2**) en el dominio transmembrana y presenta otros dos dominios de proteólisis. En función del tipo de secretasas que actúen sobre éstos, llevará o no a la producción de A β . Así, la acción de las α -secretasas (principalmente **ADAM10**) inhibe la producción de A β , pues su sitio de acción se encuentra dentro del dominio A β , y, en su lugar, produce un péptido soluble denominado sAPP α (Sisodia, 1992), del cual se ha propuesto un papel neuroprotector (Furukawa et al., 1996). En cambio, si actúan las β -secretasas (**BACE1**), el péptido A β es secretado al exterior celular o, en algunos casos, también puede ser producido en el interior de compartimentos intracelulares, como el Retículo Endoplásmico (ER), el Golgi, o la red de lisosomas y endosomas (Zhang et al., 2011b) (Figura 1.2).

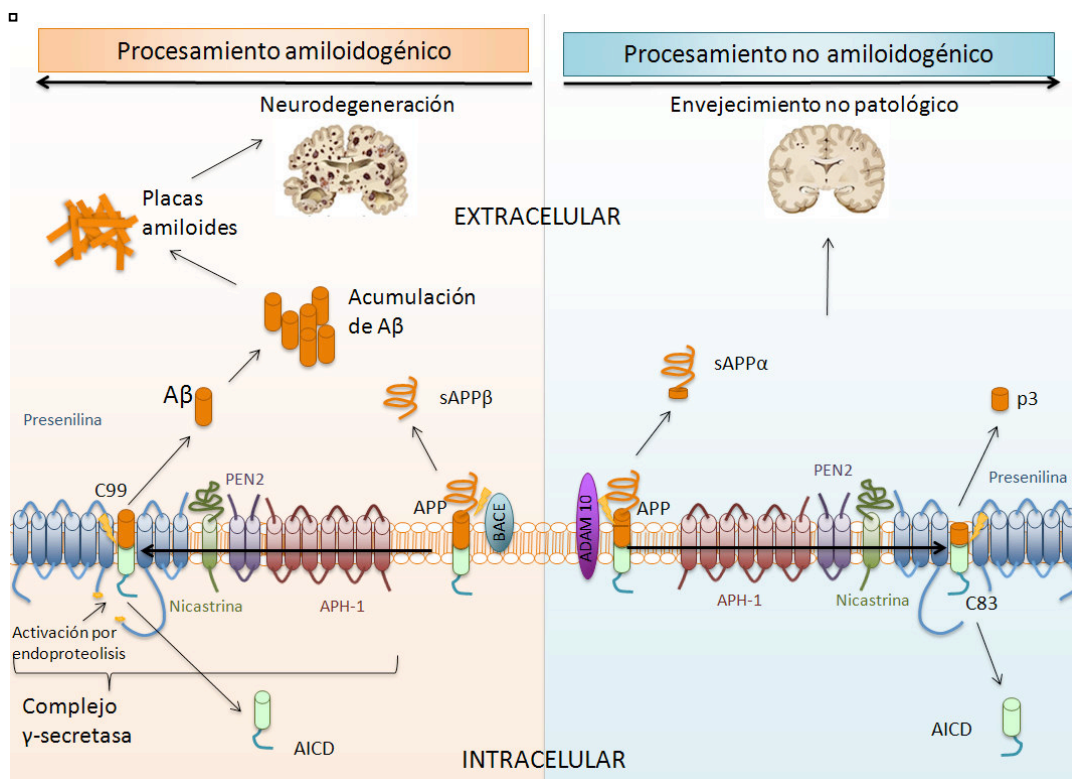


Figura 1.2. Procesamiento amiloidogénico y no amiloidogénico de la APP. La APP puede ser procesada por α (ADAM10) o β -secretasas (BACE) dando lugar a los fragmentos C83 y C99 respectivamente, que quedan anclados en la membrana. El C83 sólo contiene parte de la secuencia amiloidogénica y, al ser procesado por la γ -secretasa, da lugar al p3 que se libera al espacio extracelular y no provoca la formación de placas. En cambio, el fragmento C99 contiene la secuencia amiloidogénica completa y al ser procesado por la γ -secretasa provoca la liberación del péptido A β al espacio extracelular, donde se acumula y polimeriza dando lugar a los depósitos amiloides y provocando la neurodegeneración del cerebro.

El sitio de acción exacto de las γ -secretasas puede variar en dos aminoácidos, dando así lugar a la producción de dos posibles especies de $A\beta$ diferentes: $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$. La primera se produce mayoritariamente de forma natural en todos los individuos, mientras que la segunda es más amiloidogénica y en los pacientes de Alzheimer se observa un aumento del ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$.

Por otra parte, además de un aumento en la producción de $A\beta$, una reducción en los mecanismos de difusión de estos péptidos desde el cerebro hacia la periferia o de degradación de los mismos también pueden influir en su acumulación (Tanzi et al., 2004). La principal responsable para la difusión de $A\beta$ hacia la periferia a través de la Barrera Hematoencefálica (BBB) es la **proteína relacionada con el receptor de la lipoproteína de baja densidad** (LRP) (Shibata et al., 2000) (Zlokovic et al.), que puede unirse al $A\beta$ a través del complejo formado entre éste y la apolipoproteína E (apoE), o el ligando α 2-macroglobulina (α 2M), o bien directamente (Deane et al., 2004). El transporte en sentido contrario de $A\beta$ hacia el cerebro a través de la BBB viene mediado por los Receptores de Productos Finales de Glicación Avanzada (RAGE) (Deane et al., 2003) (Figura 1.3).

En cuanto a la degradación de $A\beta$, puede venir mediada por diferentes enzimas, entre las que se encuentran, principalmente, la **neprilisina** (Iwata et al., 2001), (Hama et al., 2001) y la **enzima degradadora de insulina** (IDE) (Leissring et al., 2003).

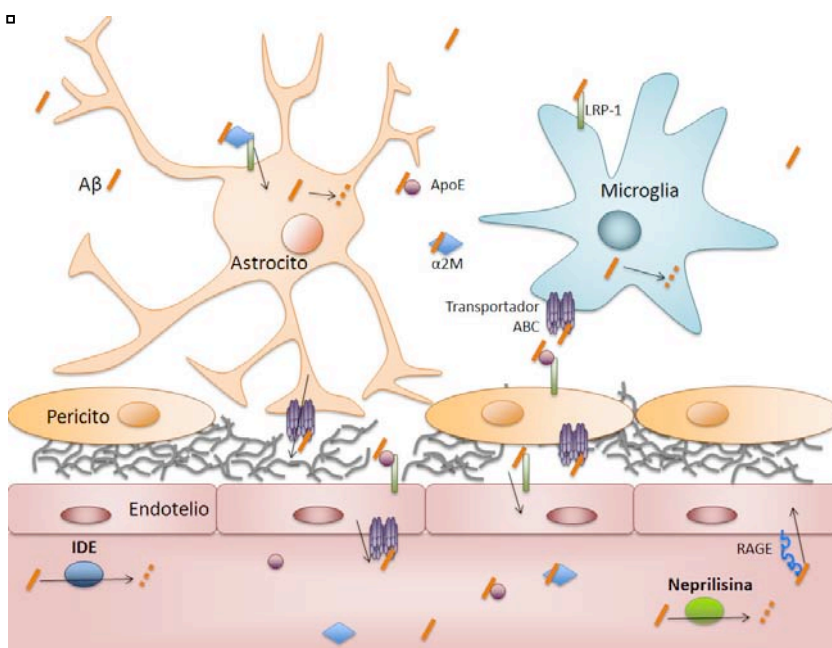


Figura 1.3. Mecanismos de degradación y transporte del $A\beta$ fuera del CNS. Los péptidos $A\beta$ pueden ser transportados fuera del cerebro a través de la barrera hematoencefálica. Para ello, el $A\beta$ se puede unir al LRP-1 para ser transportado al interior de astrocitos y microglía. La unión del $A\beta$ al LRP-1 puede tener lugar directamente, o empleando la ApoE y la α 2M como chaperonas. Una vez en el interior de las células de microglía, el $A\beta$ puede ser degradado, o bien puede ser transportado al exterior a través de los transportadores ABC. A continuación, el $A\beta$ puede ser captado por los pericitos, y transportado hasta la membrana basal y de allí a la circulación sanguínea atravesando las células del endotelio de los vasos sanguíneos por el mismo mecanismo. Una vez en la circulación, el $A\beta$ puede ser degradado por enzimas como la neprilisina y la IDE. Los péptidos $A\beta$ también pueden ser transportados hasta órganos capaces de degradarlos como el hígado y el riñón.

La acumulación de los péptidos $A\beta$ lleva a su polimerización, primero en oligómeros, y posteriormente en fibrillas que se depositan en el espacio extracelular formando las placas amiloides. Existen numerosos estudios que indican que los principales responsables de neurotoxicidad en AD son, más que las placas, los **oligómeros $A\beta$** (Li et al., 2009), (Lambert et al., 1998) (Figura 1.4).

1.2.3.2 AD como Tauopatía

Cuando Alois Alzheimer describió la enfermedad en 1906, ya observó la acumulación de fibrillas intraneuronales (ovillos neurofibrilares). En 1963, la microscopía electrónica permitió por primera vez el estudio de la estructura de estas fibras por M. Kidd, quien las describió como una doble hélice de 10 nm (PHF del inglés paired helical filaments) que rodean todo el núcleo de la neurona, dejando en ocasiones una pequeña área de citoplasma normal comprimido contra la membrana neuronal, donde se acumulan los ribosomas en una densa masa (Kidd, 1963).

Estas estructuras no están formadas por la proteína amiloide, como se pensó inicialmente (Masters et al., 1985), (Guioy et al., 1987), sino que se trata de la **proteína tau** (Grundke-Iqbal et al., 1986), en un estado hiperfosforilado (Kosik et al., 1986). Tau es uno de los tres tipos de proteína asociada a microtúbulos (junto con MAP1 y MAP2) y se caracteriza por presentar splicing alternativo, generando 6 isoformas que difieren entre ellas por tener 3 ó 4 dominios de unión a la tubulina y por tener dos, uno o ningún inserto de 29 aminoácidos en la zona N-terminal de la molécula, a saber: τ 3L, τ 3S, τ 3, τ 4L, τ 4S, τ 4 (Goedert et al., 1989) (Figura 1.5).

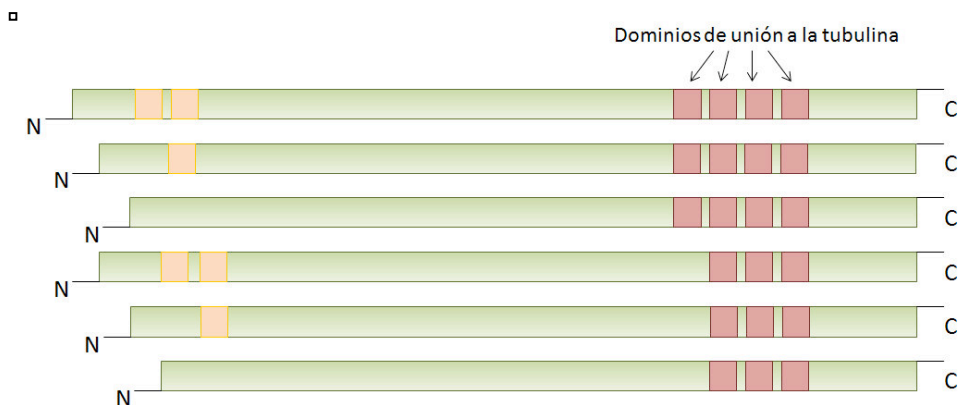


Figura 1.4. Isoformas de la proteína tau. Existen 6 isoformas de la proteína tau que difieren entre sí en las secuencias de los extremos N y C-terminal.

La función fisiológica de la proteína tau es la nucleación de la tubulina y la posterior **estabilización de los microtúbulos**. La unión de tau a los microtúbulos se realiza a través de un dominio de unión específico (Lee et al., 1989) y puede tener lugar por la superficie externa del microtúbulo si éste ya está ensamblado (Al-Bassam et al., 2002), o bien puede ser incorporada en la estructura si los microtúbulos están en elongación en el momento de la unión (Kar et al., 2003).

Tau presenta 80 dominios posibles de fosforilación y su capacidad de unirse a los microtúbulos se reduce al ser fosforilada (Sergeant et al., 2005). En cerebros de pacientes de AD, tau está **hiperfosforilada** o **anormalmente fosforilada**, y puede encontrarse formando los **ovillos neurofibrilares** (NFT) o bien en depósitos aislados en el citosol. Estos depósitos son los que, tras su ubiquitinación, formarán posteriormente los NFT (Mori et al., 1987), (Perry et al., 1987).

Los NFT son, junto con las placas amiloides, uno de los marcadores neuropatológicos del AD, pero se encuentran también en otras enfermedades neurodegenerativas como el Síndrome de Down en pacientes adultos, la enfermedad de Pick, las demencias frontotemporales, la demencia pugilística, etc.

Frente a los investigadores que defienden la hipótesis de la cascada amiloide como el hecho central para el desarrollo de la AD, otros defienden la importancia de la hiperfosforilación y agregación de tau basándose en los datos que indican una buena correlación entre el **estado cognitivo** del paciente y el número de ovillos que presenta su cerebro (Nagy et al., 1995), debido a que éstos comienzan a aparecer en áreas críticas para la memoria (Braak and Del Tredici, 2004), (Braak and Braak, 1991a).

Algunos estudios indican que podría haber una relación directa entre los dos fenómenos, pues ratones doblemente mutantes con el gen de APP y de tau presentan más placas y más tau que sus progenitores con una única mutación para APP o tau (Lewis et al., 2001). Asimismo, también se ha observado que la inyección de péptido amiloide en un ratón transgénico para tau, aumenta el número de ovillos en una zona del cerebro que no está inervada con el punto de inyección (Gotz et al., 2001). Sin embargo, no está claro cuál es el mecanismo que relaciona ambas teorías.

1.2.3.3 Hipótesis Colinérgica

En 1976, P. Davies y A.J.F. Maloney propusieron la AD como un fallo del sistema colinérgico tras observar una reducción importante en la actividad de la **colin-acetiltransferasa** (ChAT, enzima responsable de la síntesis del neurotransmisor acetilcolina), así como de la **acetil-colinesterasa** (AChE, encargada de la degradación de la acetilcolina) en diferentes áreas cerebrales de pacientes de Alzheimer en comparación con un grupo control (Davies and Maloney, 1976).

La actividad enzimática de la ChAT se reduce con la edad en diferentes áreas cerebrales, con la excepción del núcleo caudado y esta reducción es más acusada en el hipocampo. Esta reducción, así como la de la actividad de la ácido glutámico descarboxilasa (GAD, responsable de la síntesis del ácido gamma-aminobutírico) es aún mayor en pacientes con problemas cognitivos. La actividad de la GAD también depende del tiempo que pasa desde la muerte del paciente hasta la congelación de la muestra, de si el paciente estaba hospitalizado y de su estado previo a la muerte (coma, hipoxia...) o incluso en pacientes con depresión, pero esto no ocurre con la actividad de la ChAT, cuya menor actividad es específica de la demencia (Perry et al., 1977).

La reducción de la actividad de la ChAT y la AChE se relaciona directamente con la cantidad de placas amiloides y con los problemas cognitivos determinados con la realización de tests de memoria a los pacientes durante los 6 últimos meses de vida (Perry et al., 1978).

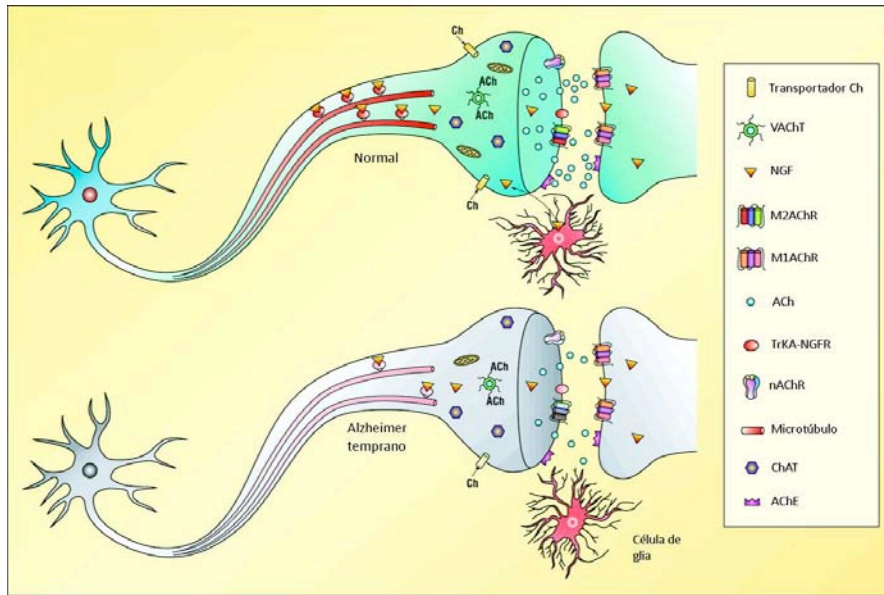


Figura 1.5. Hipótesis Colinérgica. En las etapas iniciales de la AD, las neuronas colinérgicas sufren diversas alteraciones, que incluyen una reducción tanto en la captación de colina, como en la liberación de acetilcolina, así como en la expresión de receptores nicotínicos y muscarínicos. También se observan alteraciones en la funcionalidad de los receptores de NGF y el transporte axonal de la neurotrofina. Todo ello provoca una reducción en la funcionalidad de las neuronas, afectando a su mantenimiento y provocando, finalmente, la muerte neuronal.

Figura adaptada de (Terry and Buccafusco, 2003).

Estos datos hicieron pensar en la importancia de la alteración de la vía de la acetilcolina en casos de demencia senil y AD (Whitehouse et al.), (Richter et al.), (Sims et al.), lo que llevó a establecer lo que se conoce como “**Hipótesis colinérgica**”. Ésta propone que la degeneración de las neuronas colinérgicas y, por ende, la pérdida de neurotransmisión colinérgica en la corteza cerebral son el principal factor en el deterioro de la función cognitiva de los pacientes de AD (Figura 1.5).

Así, se apostó durante un tiempo por la potenciación de la señalización colinérgica en los pacientes de Alzheimer para tratar sus síntomas y se desarrolló un inhibidor de la AChE, la **tacrina**, con el objetivo de reducir la degradación de la ACh y prolongar así su presencia en el espacio presináptico, con lo que se permitiría una mayor unión a los receptores muscarínicos de la neurona postsináptica. Posteriormente, se desarrollaron tres fármacos inhibidores de la AChE de segunda generación: el **donezepilo**, la **rivastigmina** y la **galantamina**. Actualmente, aún se emplean estos fármacos para el tratamiento de los síntomas de la enfermedad de Alzheimer, como se comentará más adelante.

1.2.3.4 Paradigma de la ApoE

La apoE es una glicoproteína de 300 aminoácidos, que forma parte de varias lipoproteínas, participando en el mantenimiento de su estructura y la regulación de su metabolismo. Concretamente, la apoE forma parte de las **lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)**, responsables del transporte de triglicéridos del hígado a los tejidos, así como de una subclase de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), encargadas de la distribución del colesterol entre las células. ApoE también se encuentra en los **quilomicrones** sintetizados en el intestino para el transporte de los triglicéridos y el colesterol de la dieta (Mahley, 1988).

Como ya se ha comentado, el gen de la apolipoproteína E, concretamente el alelo $\epsilon 4$, está relacionado con un elevado riesgo de padecer AD; tanto en la variedad familiar como la variedad esporádica de la

enfermedad (Saunders et al., 1993), (Strittmatter et al., 1993a), (Corder et al., 1993). Este gen presenta tres alelos diferentes: ApoEε2 (con una distribución del 8% en caucásicos), ApoEε3 (78%) y el mencionado ApoEε4 (14%). En pacientes de Alzheimer, el 40% presenta al menos un alelo ApoEε4 y el 86% de las personas con ambos alelos ApoEε4 son diagnosticadas con AD (Corder et al., 1993).

De manera que la apoE se convirtió en un posible **marcador** para predecir el riesgo de padecer AD y para descubrir definitivamente los procesos clave que llevan al desarrollo de la misma. Sin embargo, el papel de la apoE en la patología de la AD aún no está claro. Se sabe que ApoEε4 se une al péptido Aβ (Strittmatter et al., 1993b) y que la isoforma ApoEε4 lo hace con mayor afinidad que ApoEε3 (Strittmatter et al., 1993a). Como ya se ha comentado, esta unión puede favorecer la difusión de los péptidos Aβ fuera del CNS a través de su unión a LRP, que los transporta a través de la BBB.

También se ha visto que tanto las placas como los NFT presentan inmunoreactividad a la ApoE (Namba et al., 1991), (Wisniewski and Frangione, 1992), y que esta inmunoreactividad se observa incluso en las placas difusas (Namba et al., 1991), y el proceso de fibrilización de Aβ es acelerado en presencia de ApoE in vitro (Wisniewski et al., 1994), por lo que se piensa que la ApoE podría estar implicada en el proceso de **polimerización amiloide**.

Por otra parte, ratones knock-out para la apoE presentan alteraciones sinápticas y neuríticas a los 4 meses de edad cuando se comparan con controles Wild-Type (WT) o heterocigotos y, a los 12 meses de edad, presentan alteraciones del citoesqueleto en neuronas del neocórtex e hipocampo y cambios neurodegenerativos, aunque no se observan placas ni NFT (Masliah et al., 1995).

1.2.3.5 Inflamación y Respuesta Inmune en AD

En regiones patológicamente vulnerables de AD, puede detectarse una respuesta inflamatoria periférica local, como la **activación de la microglía**. Los mecanismos inflamatorios son un factor que, una vez iniciada la patología, pueden contribuir a la progresión de la enfermedad. Incluso, un fuerte estímulo inflamatorio local como el traumatismo craneal, supone un factor de riesgo para el desarrollo de AD (Pellicano et al., 2010). Además, Aβ y APP son potentes activadores de la microglía (Barger and Harmon, 1997) y en ratones knock-out para APP se observa un descenso de la activación de la microglía y un aumento de la supervivencia neuronal (DeGiorgio et al., 2002).

Sin embargo, aunque algunos de estos mecanismos promueven procesos neurodegenerativos, también se encuentran algunas respuesta inflamatorias relacionadas con la AD que presentan un efecto beneficioso, como es el caso de la **activación de los astrocitos**, los cuales pueden eliminar y degradar los péptidos Aβ, aportar efectos tróficos a las neuronas y actuar de barrera entre las neuronas y los depósitos β-amiloides (Matsunaga et al., 2003).

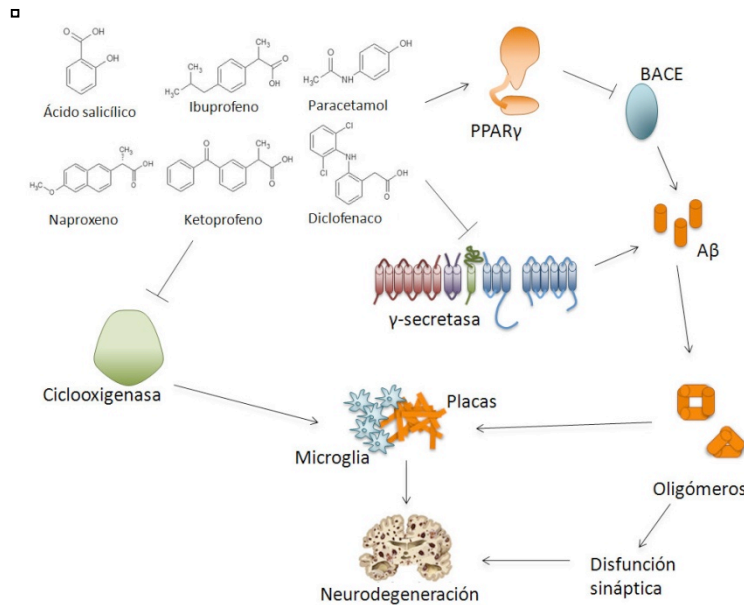


Figura 1.6. Papel de los antiinflamatorios no esteroideos en la patología de la AD. Los NSAIDs son capaces de reducir la producción de A β , debido a que inducen la inactivación de las presenilinas. Además, gracias a que la activación de los receptores PPAR γ provoca la inactivación de BACE, la síntesis de A β también es menor.

Por otra parte, los NSAIDs también controla la activación de la microglia al inhibir la función de la ciclooxigenasa.

Figura modificada de (Weeggen et al.).

Los **antiinflamatorios no esteroideos** (NSAIDs) han demostrado, en numerosos estudios epidemiológicos, un papel beneficioso en reducir el riesgo de padecer AD (Stewart et al., 1997). Este papel protector podría explicarse por la implicación de los NSAIDs en inhibir la agregación de A β , y en reducir la generación de A β 42, o por su función sobre la ciclooxigenasas (COX) y receptores PPAR γ (Heneka and O'Banion, 2007), inhibiendo las primeras y activando los segundos (Figura 1.6).

1.2.3.6 Estrés Oxidativo

Desde las fases más iniciales de los cambios patológicos que tienen lugar en la AD, existen evidencias de daño oxidativo. Una de las manifestaciones de este daño oxidativo es la **peroxidación de lípidos** (LPO), que, en el modelo murino Tg2576, tiene lugar antes de la aparición de depósitos (Pratico et al., 2001). Esta LPO puede provocar daños en las membranas celulares de las neuronas que se encuentran en contacto con las placas y depósitos difusos de A β (Praprotnik et al., 1996). A nivel de RNA, el daño oxidativo tiene lugar al comienzo de la patología y se va reduciendo con la progresión de ésta (Nunomura et al.), (Nunomura et al., 2001).

La expresión de enzimas antioxidantes y de enzimas mitocondriales relacionadas con la cadena respiratoria, se encuentra alterada en AD. Algunos ejemplos son la inducción en la expresión de la Hemo oxigenasa 1 (Premkumar et al., 1995), la reducción de la Citocromo Oxidasa (Chandrasekaran et al., 1994) y el aumento de la Glucosa-6-fostato Deshidrogenasa (Martins et al., 1986). Este estrés oxidativo mitocondrial está implicado, a su vez, en la hiperfosforilación de tau (Melov et al., 2007).

También se ha sugerido que el efecto apoptótico de A β puede venir dado por la liberación a la mitocondria del factor **inductor de la apoptosis** (AIF), el cual causa la fragmentación del DNA y la condensación de la cromatina (Loo et al., 1993).

1.2.3.7 Factores Vasculares

Aunque la demencia vascular y la AD son dos tipos de demencia distintos, en la AD también existen alteraciones vasculares, como fragmentación de los vasos, cambios en el diámetro de los mismos e irregularidades en su superficie (Zlokovic, 2005).

Los depósitos de A β en el interior y alrededor de los capilares cerebrales aumentan el riesgo de que el paciente sufra una **angiopatía amiloide cerebral** (CAA). Así, el 80% de los pacientes de AD pueden presentar CAA, observándose, en los casos más severos, una mayor frecuencia de hemorragias y lesiones isquémicas, así como una correlación con la presencia de arterioesclerosis cerebral y la edad de inicio de la demencia (Ellis et al., 1996).

A su vez, la **unidad neurovascular**, formada por los principales componentes celulares del cerebro (neuronas, astrocitos, endotelio, pericitos VSMC, microglia y macrófagos perivasculares) regula la permeabilidad de la BBB (Altman and Rutledge, 2010), por lo que una alteración de alguno de los componentes de la misma podría interferir en la difusión de los péptidos A β a través de la BBB.

1.2.3.8 Resistencia a la Insulina y Síndrome Metabólico

El Síndrome Metabólico se define como un conjunto de alteraciones que aumentan el riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular y/o diabetes mellitus. Entre las alteraciones que incluye el Síndrome Metabólico se encuentran la resistencia a la insulina, la hiperinsulinemia y la intolerancia a la glucosa, así como hipertensión, y un aumento de triglicéridos en las VLDL y un descenso de colesterol tipo HDL. Todas ellas se han relacionado con un elevado riesgo de padecer demencia, alteraciones de las habilidades cognitivas y ejecutivas e, incluso, AD.

Más adelante se explicará extensamente y en detalle la relación que existe entre la diabetes mellitus y el AD, así como las implicaciones a nivel molecular de la resistencia a la insulina en el desarrollo de la AD.

1.2.4 DIAGNÓSTICO

Actualmente, el único diagnóstico **definitivo** sobre la AD se realiza por autopsia, o, en los casos en que sea posible, por biopsia cerebral, con pruebas histopatológicas que confirmen el diagnóstico clínico (McKhann et al., 1984). Cuando se realiza el diagnóstico clínico, se habla de "**probable AD**".

Como ya se ha mencionado, se debe distinguir entre enfermedad de Alzheimer, para cuyo diagnóstico se tienen en cuenta síntomas clínicos sobre la función cognitiva y el comportamiento del paciente, y la patología de Alzheimer o cambios neuropatológicos de la enfermedad de Alzheimer observados en la autopsia. Aquí se debe añadir también el concepto de **AD en etapa preclínica**, es decir, cuando los cambios neuropatológicos están presentes, pero aún no ha aparecido la sintomatología clínica.

1.2.4.1 Diagnóstico en la fase preclínica

Debido a la ausencia de síntomas clínicos, la detección de la AD en esta etapa es muy difícil. La detección de biomarcadores específicos de AD y técnicas como la neuroimagen, la tomografía por emisión de positrones (PET) o la imagen por resonancia magnética (MRI) pueden ayudar a diagnosticar la fase preclínica de la AD.

En una revisión de 2011, Sperling et al. proponen la subdivisión de los pacientes en fase preclínica en función de los marcadores que pueden encontrarse en ellos, aunque insisten en que no pueden usarse como criterios de diagnóstico, ya que, en muchos casos, el paciente no llega a desarrollar AD a lo largo de su vida. Así, proponen tres etapas dentro de la fase preclínica (Sperling et al., 2011):

- Etapa 1: Amiloidosis asintomática.
- Etapa 2: Amiloidosis y neurodegeneración.
- Etapa 3: Amiloidosis, neurodegeneración y déficit cognitivo leve.

1.2.4.2 Diagnóstico clínico

Dentro de la fase clínica de la AD; también cabe hacer una clasificación de las diferentes fases en que puede encontrarse el paciente en función de los criterios que sean aplicables a su diagnóstico. Así, según Dubois et al., se puede distinguir entre:

- **Déficit cognitivo leve** o **MCI**: Incluye síntomas subjetivos de pérdida de memoria o cognitivos, o ambos, comparados con el propio nivel del paciente y teniendo en cuenta su edad y nivel educativo. No se afectan las actividades diarias del paciente, que mantiene su independencia a nivel funcional y social. Dentro del MCI se pueden diferenciar dos fases:
 - o **MCI amnésico**: la pérdida de memoria es evidente, no sólo se trata de cambios subjetivos, pero siguen sin afectarse las actividades diarias del paciente (Dubois et al., 2010).
 - o **AD prodromal**: es la fase de predemencia sintomática del AD, caracterizada por unos síntomas demasiado leves como para incluir a los pacientes dentro de un diagnóstico de AD (Dubois et al., 2010).
- **Probable AD**: Se detectan síntomas severos no sólo de pérdida de memoria, sino también de las funciones diarias.

El NIH establece una serie de recomendaciones específicas para el diagnóstico de una demencia, entre las cuales se tiene en cuenta el grado de afectación de las capacidades del paciente, tanto en relación a sus capacidades previas, como en función de los ámbitos afectados. Estos síntomas deben detectarse tanto a través del historial del paciente como por una prueba objetiva como el Mini-Mental (McKhann et al., 2011).

Para llevar a cabo un diagnóstico de “**probable AD**”, el paciente debe presentar todos los criterios para cumplir un diagnóstico de demencia y, además, la aparición de los síntomas debe ser **progresiva y lenta** y la pérdida de la función cognitiva se debe detectar a través de la observación del paciente o a partir de la información suministrada por terceros.

En cuanto a la progresión de la enfermedad, se pueden distinguir tres etapas, a lo largo de las cuales se observa un agravamiento de los problemas de memoria y funciones básicas del paciente: **AD leve, AD moderado y AD severo**.

1.2.4.3 Diagnóstico neuropatológico

Los cambios neuropatológicos asociados a la AD son las placas A β , los ovillos neurofibrilares y las placas neuríticas. Los criterios para establecer las distintas etapas de la enfermedad en función de estos parámetros fueron establecidos por Thal et al. (Thal et al., 2002), Braak (Braak and Braak, 1991b) y CERAD (Mirra et al., 1991) respectivamente, lo que ha llevado a la denominación “**ABC score**” (Hyman et al., 2012):

- A. Placas A β : Fases 1-5
- B. Ovillos neurofibrilares: Etapas I-VI
- C. Placas neuríticas: Dispersas, moderadas o frecuentes.

1.2.5 TRATAMIENTO ACTUAL Y NUEVAS TERAPIAS PROPUESTAS

Actualmente, no existe un tratamiento efectivo para la AD y los fármacos aprobados a día de hoy sólo consiguen ralentizar en cierto grado la progresión de la sintomatología de la enfermedad en las etapas más iniciales de la misma, siendo poco o nada eficaces en las fases más avanzadas.

1.2.5.1 Inhibidores de la acetilcolinesterasa

De los cuatro fármacos aprobados en América y Europa para el tratamiento de los síntomas del Alzheimer, tres son inhibidores de la acetilcolinesterasa: el donepezilo, la rivastigmina y la galantamina.

Ya se han discutido anteriormente los aspectos de la hipótesis colinérgica, y en cuanto al papel de la propia acetilcolinesterasa (AChE) en la AD, cabe señalar su papel en la formación de las placas A β (Rees et al., 2003). También se ha demostrado que el A β , por su parte, reduce la degradación enzimática de la AChE (Hu et al., 2003).

El **donepezilo** es un inhibidor específico de la AChE y está aprobado para el tratamiento de las fases leve y moderada de la AD. Ha mostrado su eficacia en diversos estudios clínicos (Courtney et al., 2004), (Molinuevo et al., 2011) y su efecto es mayor en los casos más leves (Molinuevo et al., 2011), (Winblad et al., 2006). La **rivastigmina** inhibe no sólo la AChE, sino también la butirilcolinesterasa (Darreh-Shori et al., 2002), que también degrada la acetilcolina (Mesulam et al., 2002). Su eficacia es similar a la del donepezilo

(Bullock et al., 2005). En cuanto a la **galantamina**, no sólo es un inhibidor de la AChE, sino que también modula alostéricamente los receptores nicotínicos (Maelicke et al., 2001). Su efecto es estable en estudios clínicos realizados a largo plazo (hasta 3 años) (Raskind et al., 2004).

1.2.5.2 Memantina

La **memantina** es el cuarto fármaco aprobado actualmente para el tratamiento de los síntomas de la AD. Se trata de un antagonista de baja afinidad de los receptores de NMDA, por lo que corrige la excitotoxicidad provocada por los receptores de NMDA en la AD (Cacabelos et al., 1999), sin bloquear por completo su actividad, necesaria para procesos básicos de aprendizaje, memoria y comportamiento (Hebb, 1949).

La memantina se aplica para los casos de AD moderadamente severo o severo, cuando los inhibidores de AChE ya no son efectivos. Su principal efecto se observa en una reducción de los cambios que sufren los pacientes a nivel de **comportamiento** (agitación, agresividad, irritabilidad, comportamiento nocturno) (Gauthier et al., 2008). Cuando se administra la memantina en pacientes que ya estaban siendo tratados con donepezilo, se observa una mejora respecto a pacientes tratados con placebo no sólo a nivel de comportamiento, también la función cognitiva, la realización de actividades cotidianas y el estado clínico global fue mejor en el caso de los pacientes tratados (Tariot et al., 2004).

1.2.5.3 Antipsicóticos

Para el tratamiento de las alteraciones del comportamiento en pacientes de AD se han probado diferentes antipsicóticos típicos y atípicos, como la olanzapina (Street et al., 2000), han mostrado algunos beneficios en los síntomas neuropsiquiátricos de los pacientes, pero los numerosos **efectos secundarios** (sedación, parkinsonismo, e incluso un elevado riesgo de isquemia y muerte) han hecho que la FDA los desaconseje para su uso en pacientes con AD.

1.2.5.4 Nuevas terapias

Debido a que el tratamiento actual no está dando buenos resultados, la investigación para el desarrollo de nuevas terapias juega un papel fundamental en nuestros días.

Las nuevas estrategias que se están investigando para el tratamiento de la AD se basan en la modificación del progreso de la enfermedad, para lo cual se estudia la **modulación de las secretasas**, ya que estudios con ratones deficientes en BACE1 muestran una reducción en la producción de A β (Luo et al., 2001). La **inmunización activa con A β** (Schenk et al., 1999), o pasiva con anticuerpos anti-A β tanto periféricamente (Bard et al., 2000), como por inyección intracerebroventricular (Thakker et al., 2009), también han demostrado ser efectivas en ratones. Los inhibidores de la formación de fibras A β y los fármacos anti-tau son otras de las propuestas que se están investigando actualmente.

También se estudian otras estrategias que tienen en cuenta los factores de riesgo descritos para el desarrollo de la AD. Así, las investigaciones giran en torno a los efectos de los **fármacos antiinflamatorios** no esteroideos, los fármacos para el **tratamiento del colesterol**, la **insulina** y los fármacos para el **tratamiento de la diabetes**, los **estrógenos** y compuestos antioxidantes como la **vitamina E**.

2. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y DIABETES

2.1. ALZHEIMER Y DIABETES

Entre los factores de riesgo que se han comentado en la sección anterior para el desarrollo de la AD, la diabetes juega un papel fundamental y cada vez más estudiado en los últimos años.

La diabetes es una enfermedad sistémica que se caracteriza por una elevada concentración de glucosa en sangre ($>110\text{mg/dl}$) y, en función de su etiología, se pueden distinguir dos tipos de diabetes: **Diabetes Mellitus Tipo 1** (T1D) y **Diabetes Mellitus Tipo 2** (T2D). La primera viene provocada, generalmente, por un proceso **autoinmune** en el cual las células β del páncreas son destruidas y, por tanto, el paciente es incapaz de producir insulina. Es diagnosticada principalmente durante la infancia y la adolescencia (aunque también puede darse en adultos) y los pacientes necesitan inyectarse insulina periódicamente de forma hipodérmica.

La T2D se caracteriza por una **resistencia a la insulina** a nivel periférico y por una reducción en la secreción de insulina por parte de las células β pancreáticas. Suele ser diagnosticada en la edad adulta y los pacientes no requieren un tratamiento de insulina, al menos inicialmente, aunque en algunos casos, con el avance de la enfermedad, pueden necesitarlo. Ambos tipos de diabetes se han relacionado con alteraciones a nivel del Sistema Nervioso, tanto Central (CNS) como Periférico (PNS), y con problemas sobre la función cognitiva del paciente.

Existen numerosos estudios que indican una **mayor prevalencia de AD** en pacientes con T2D comparados con pacientes no diabéticos, siendo el riesgo relativo de 1,5-2 (Kloppenborg et al., 2008) (Profenno et al., 2010). (Kloppenborg et al., 2008), (Profenno et al., 2010). A su vez, la **prevalencia de T2D** en pacientes de AD también es más elevada que en pacientes sin AD (81% frente al 42%) (Janson et al., 2004).

En cuanto a la T1D, debido a que se observa principalmente en niños, no se relaciona tanto con la AD, pero sí con **alteraciones a nivel del CNS** y de las habilidades cognitivas del paciente, como una menor velocidad y flexibilidad mental. La memoria y capacidad de aprendizaje no muestran alteraciones en pacientes T1D (Brands et al., 2005), (Gaudieri et al., 2008).

2.1.1. DIABETES Y FUNCIÓN COGNITIVA

La influencia de la T1D sobre la función cognitiva, depende de la edad de inicio de la enfermedad. Se considera un inicio temprano de la T1D (EOD) cuando se da antes de los 7 años de edad. En estos casos, se observa una reducción en la **memoria visual y espacial** más acentuada que en niños que tuvieron un inicio de la diabetes más tardío (LOD), comparados con niños no diabéticos. También existe una reducción de la

memoria verbal y un menor rendimiento académico, aspectos que no se observan en los casos de LOD (Gaudieri et al., 2008). Incluso, a nivel anatómico, se puede observar una atrofia ventricular leve-moderada y un aumento en un 37% del volumen ventricular en niños con EOD (Ferguson et al., 2005).

Sin embargo, adultos (<45 años de edad) en los que la T1D fue diagnosticada durante su infancia o adolescencia, no presentan cambios en la función cognitiva ni en la estructura cerebral (Ferguson et al., 2003), (Lobnig et al., 2006), aunque sí presentan algunos problemas de **velocidad psicomotora** y **capacidad de atención** (Lobnig et al., 2006).

Por su parte, la T2D parece afectar a la **memoria verbal** y a la **capacidad de procesamiento** (Awad et al., 2004). La posibilidad de presentar un déficit cognitivo según el Mini-Mental aumenta en 1,2 veces, y en 1,8 veces según el test DSS (Digit Symbol Substitution) (Cukierman et al., 2005). Además, pacientes con T2D presentan un **menor volumen de materia gris en el lóbulo prefrontal** (Kumar et al., 2008), **menor volumen del hipocampo y la amígdala** (den Heijer et al., 2003) y un **mayor volumen de los ventrículos laterales** (de Bresser et al., 2010) (Figura 1.7).

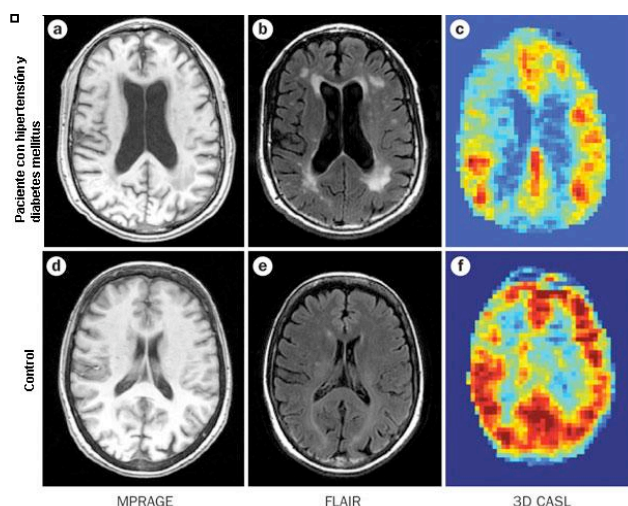


Figura 1.7. Alteraciones observadas en el cerebro de un paciente con hipertensión y diabetes mellitus. EN un paciente de diabetes e hipertensión se encuentran diferentes alteraciones cerebrales cuando se compara con un paciente sano, entre las que destacan: *a, d*, Pérdida de volumen cerebral en observada mediante la técnica MP-RAGE en comparación con un paciente sano. *b, e*, Hiperintensidad de la materia blanca periventricular. *c, f*, Menor perfusión de las regiones frontal y temporal.

Figura adaptada de (Novak and Hajjar).

2.1.2. ALZHEIMER Y DIABETES A NIVEL MOLECULAR Y PATOLÓGICO

En modelos experimentales de T1D, como el STZ (inducido por estreptozotocina) o el NOD (espontáneo, no obeso), se observa una **menor neurogénesis** en el hipocampo (Beauquis et al., 2008), en el giro dentado y la zona subgranular (Guo et al., 2010). También presentan reactividad astrocitaria (Saravia et al., 2002), (Coleman et al., 2010) y los astrocitos y neuronas no funcionan correctamente (Revsin et al., 2005). Todo ello se correlaciona con una **alteración de la función cognitiva** (Alvarez et al., 2009).

Como ya se ha dicho, la AD se caracteriza por la pérdida neuronal y el depósito de placas amiloides. Análogamente, en la T2D, **los islotes de Langerhans** también sufren una pérdida celular y **depósitos amiloides** (Westermarck and Wilander, 1978) del polipéptido amiloide del islote (IAPP), proteína que se expresa y

secreta junto con la insulina en las células β (Cooper et al., 1987), (Westermarck and Wilander, 1978), (Johnson et al., 1988). Al igual que el A β neuronal, el IAPP agrega formando fibrillas (Glenner et al., 1988), y, como las fibrillas de A β , también son citotóxicas (Lorenzo et al., 1994), provocando alteraciones en la membrana de las células (Janson et al., 1999) (Mirzabekov et al., 1996).

Por otra parte, se han descrito depósitos A β y de P-tau unida a ubiquitina en secciones de páncreas de pacientes de T2D (Miklossy et al., 2010). Y en los cerebros de pacientes de T2D, si bien no aparecen placas ni NFT mientras la T2D no coincida con un diagnóstico de AD, cuando esto si ocurre, ambos marcadores son más numerosos (Valente et al., 2010).

La asociación entre T2D y AD puede explicarse por la relación que existe entre la DM y el riesgo de padecer enfermedad cerebrovascular, que se ve aún más incrementado si, además de la diabetes, concurren otros factores como la obesidad, hipertensión, hipercolesterolemia y dislipidemia, lo que se conoce como **síndrome metabólico**. Pero los dos aspectos característicos de la T2D (la alteración del metabolismo de la glucosa y en la producción y sensibilidad a la insulina) también pueden tener un efecto tóxico en el cerebro y explicar así la conexión entre T2D y AD (Biessels and Kappelle, 2005).

2.2. GLUCOSA Y FUNCIÓN COGNITIVA

Existen numerosos estudios que demuestran que la ingestión de glucosa favorece la **memoria verbal** episódica tanto en personas mayores sanas (Hall et al., 1989), (Manning et al., 1992), (Parsons and Gold, 1992), como en personas jóvenes (Benton, 1990), (Foster et al., 1998).

El cerebro es un órgano muy sensible a la concentración de glucosa en sangre y el efecto de la T2D sobre la función cognitiva de los pacientes puede deberse a la desregulación del metabolismo de la glucosa (Messier et al., 1997), (Kaplan et al., 2000), (Awad et al., 2004). La **hiperglucemia** presente en los pacientes de T2D no es la única responsable de los problemas cognitivos de dichos pacientes (Vincent et al., 2005). Los episodios de **hipoglucemia severa** que se dan en pacientes de T1D también producen daño cerebral y un **déficit cognitivo permanente** (Singh et al., 2004). En cambio, una **hipoglucemia recurrente moderada** puede reducir estos efectos (Puente et al., 2010).

En pacientes de AD, se observa una elevada frecuencia de alteraciones de la glucosa a nivel periférico (T2D), y, gracias a técnicas como la Tomografía por Emisión de Positrones (PET) se puede detectar que también el metabolismo de la glucosa se encuentra reducido a nivel neuronal (de Leon et al., 1983), (Minoshima et al., 1997), (De Santi et al., 2001). Estas alteraciones son especialmente significativas en las etapas más tempranas de la enfermedad (Mielke et al., 1992) y se correlacionan con los problemas a nivel cognitivo de los pacientes (Mielke et al., 1994).

Al igual que en el caso de personas sanas, la ingestión de glucosa provoca una mejora en la realización de test de memoria en pacientes de AD (Manning et al., 1993).

2.3. VÍA DE LA INSULINA EN EL CEREBRO

2.3.1. INSULINA EN EL CEREBRO

Durante años, se consideró que la insulina era incapaz de cruzar la barrera hematoencefálica (BBB) (Elgee et al., 1954). Sin embargo, el empleo de técnicas más sensibles permitió detectar la presencia de insulina en el CSF tras su infusión intravenosa en perros en ayuno (Margolis and Altszuler, 1967). La concentración en CSF es menor que en plasma, y, si ésta aumenta, aquélla también lo hace, pero no de forma proporcional ni inmediata (Margolis and Altszuler, 1967). La cinética que presenta el proceso de transporte de insulina desde el plasma hasta el CSF indica que éste se realiza a través de la **BBB**, o bien a través del **epitelio del plexo coroideo** (Schwartz et al., 1991), (Baura et al., 1993). Se trata de un **transporte saturable** (Baura et al., 1993), (Banks et al., 1997), por lo que debe tener lugar a través de algún transportador aún desconocido. Algunos autores apuntan a que puede tratarse del propio **receptor de insulina (IR)** presente en la BBB (Frank et al., 1985), ya que la KM del proceso de transporte es similar a la KD del IR en la microvasculatura del cerebro (Figura 1.8).

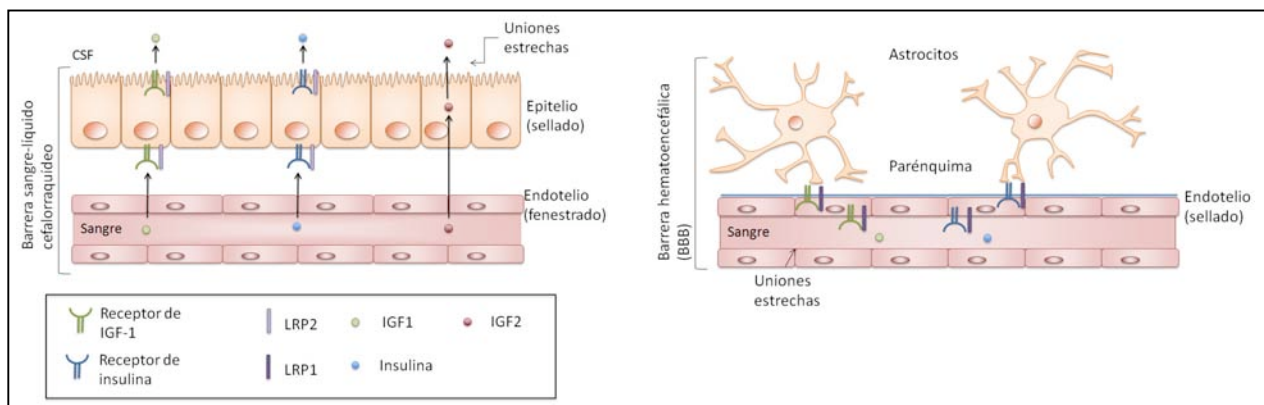


Figura 1.8. Transporte de la insulina y el IGF-1 desde la circulación sanguínea hasta el cerebro. La insulina, el IGF-1 y el IGF-2 pueden llegar desde la periferia hasta el cerebro a través del epitelio del plexo coroideo y a través de la BBB. El IGF-2 es capaz de atravesar el epitelio del plexo coroideo por difusión simple, pero la insulina y el IGF-1 requieren de un transportador. En ambos casos el transporte está facilitado por sus propios receptores (IR, IGF-1R) y el LRP-1 para el transporte a través de la barrera hematoencefálica, y el LRP-2 en el transporte a través del epitelio del plexo coroideo.

Figura modificada de (Fernandez and Torres-Aleman)

Por otra parte, aunque la principal fuente de insulina en el organismo son las células β del páncreas y, a través de la BBB, puede llegar hasta el CNS, también **se sintetiza en diferentes áreas del cerebro**. En cultivos primarios de células de la glándula pituitaria anterior de roedores se detecta mRNA de preproinsulina 1 y 2 (Budd et al., 1986), y en células inmortalizadas de hipocampo de rata, la expresión del gen de la insulina 2 aumenta al diferenciarse las **neuronas**. Por inmunohistoquímica sobre cortes de cerebro también

se encuentra expresión de mRNA de preproinsulina II en el núcleo periventricular del hipotálamo de rata (Young, 1986), y en la mucosa olfatoria (Lacroix et al., 2008). También se produce mRNA de proinsulina en diferentes áreas de cerebro de conejo: hipocampo, córtex prefrontal medial, córtex entorrino, perirrino, hipotálamo, capa granular del bulbo olfatorio y, en menor medida, en el giro dentado (Devaskar et al., 1994).

La síntesis de insulina endógena en cerebro hace que su concentración en el CNS sea relativamente independiente de la encontrada en plasma (Agardh et al., 1986), (Havrankova et al., 1979). Así, la concentración de insulina en cerebro es, de media, 25 veces superior a la que se encuentra en plasma de rata, con una variación entre distintas regiones del cerebro que van entre las 10 y 100 veces a la concentración de insulina en plasma (Havrankova et al., 1978b). En conejo también se detecta una mayor concentración de insulina en cerebro que en plasma y varía con la edad. Se encuentra una mayor concentración en las **etapas fetales** y, especialmente en neonatos de 2 días, pero esto no se correlaciona con la concentración de insulina en páncreas a la misma edad (Schechter et al., 1992). Estos resultados parecen indicar un papel de la insulina en el **desarrollo del cerebro**.

2.3.2. IR EN EL CEREBRO

Las distintas funciones de la insulina en el cerebro se deben a su actuación sobre su receptor (IR), ampliamente distribuido por todo el cerebro de rata, especialmente en **bulbo olfatorio**. También se encuentra en córtex, hipocampo, amígdala, hipotálamo, cerebelo, estriado y otras áreas del cerebro (Havrankova et al., 1978a), (Zahniser et al., 1984), pero la expresión de IR no correlaciona con el contenido de insulina en una misma área (Havrankova et al., 1978b). Se encuentra IR tanto en **neuronas** como en **células gliales** (Raizada et al., 1980), especialmente en las **sinapsis** (Abbott et al., 1999).

El IR que se expresa en el CNS es casi idéntico al IR que expresan tejidos periféricos, con algunas diferencias. Así, la subunidad α es más pequeña que en tejidos periféricos (Yip et al., 1980), (Heidenreich et al., 1983), (Gammeltoft et al., 1984a), (Gammeltoft et al., 1985a), y, además, el IR neuronal no es afectado (aunque sí lo hace el IR de células gliales) (Raizada et al.) por la exposición prolongada a altas concentraciones de insulina (Zahniser et al., 1984), y tampoco presenta cooperatividad negativa (Gammeltoft et al., 1984b). Se trata de un heterotetrámero formado por dos subunidades α y dos β , ambas procedentes de un mismo precursor o **proreceptor**. Las **subunidades α** son extracelulares y presentan los dos dominios responsables de la **unión a la insulina**, flanqueando un **dominio rico en cisteínas** (Schumacher et al., 1991). Éstas se unen por **puentes disulfuro** a las dos **subunidades β** , que contienen un dominio transmembrana y un dominio intracelular que se fosforila tras la unión de la insulina a las subunidades α (Kasuga et al., 1982a). Esta fosforilación tiene lugar en un residuo de **tirosina** (Kasuga et al., 1982b) y es la que desencadena toda la cascada de señalización desde el IR. Al igual que las proteínas tirosin-quinazas de la familia src, la subuni-

dad β presenta un **dominio de unión a ATP**, y al unirse la insulina a la subunidad α , aquélla se **autofosforila** (Ullrich et al., 1985).

A continuación, la propia subunidad β fosforila a las proteínas **sustrato del receptor de insulina** (IRS), principalmente IRS1 e IRS2 y éstas, a su vez, activan la vía de señalización de la quinasa del **fosfatidilinositol 3-fosfato** (PI3K) (Niswender et al., 2003), provocando la fosforilación de la **proteína quinasa B** (PKB) o **Akt**, la cual inhibe GSK3, promoviendo la proliferación celular (Cross et al., 1995). La vía de la PI3K también interacciona con la vía de la **proteína quinasa C** (PKC)-NF κ B (Liu et al., 2009a), implicada en procesos de apoptosis.

La subunidad β del IR también puede unirse, en lugar de a IRS1/2, a **Shc**, que a su vez activa a **Grb2** y la vía de las quinasas de las **proteínas activadas por mitógeno** (MAPK) (Figura 1.9).

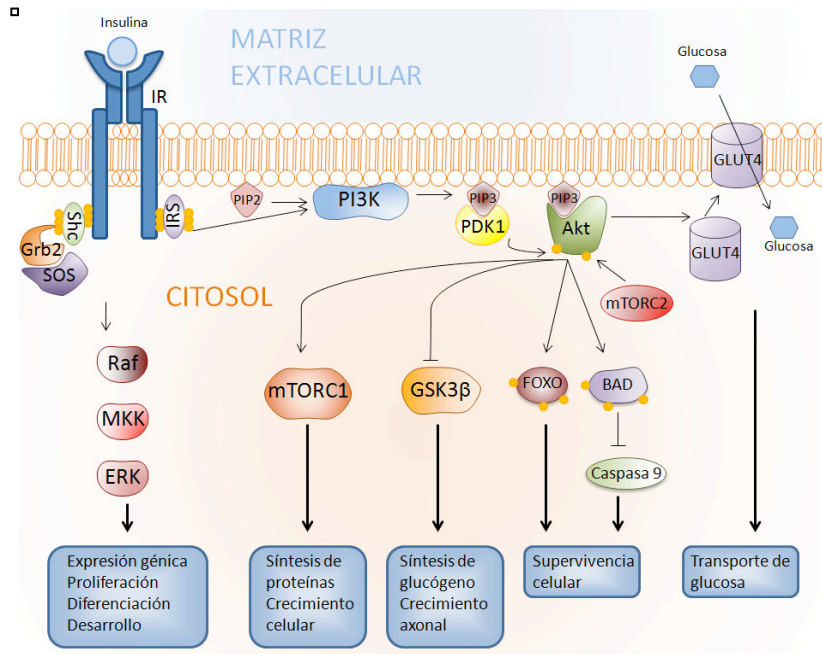


Figura 1.9. Vía de señalización del IR. La unión de la insulina a su receptor estimula la autofosforilación del mismo y su unión a proteínas como Shc e IRS. La fosforilación de IRS provoca la activación de la PI3K y a continuación la de Akt. Esta vía está implicada básicamente en procesos de síntesis de proteínas y glucógeno y de crecimiento celular. Por otra parte, la fosforilación de Shc, mediante la acción del complejo GRB2(SOS), provoca la activación de la vía de las MAP quinasas, implicada en procesos de regulación de expresión génica, diferenciación, desarrollo y proliferación celular.

Figura modificada de (Kim and Feldman).

2.3.3. PAPEL DE LA SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA EN EL CNS

Aunque durante mucho tiempo se consideró que el cerebro era un órgano insensible a la insulina y que la captación de glucosa no dependía de ésta como ocurre en los tejidos periféricos, el descubrimiento de la presencia tanto de insulina como de su receptor en casi todas las áreas del cerebro y de forma diferencial en distintas etapas del desarrollo del CNS en mamíferos, hizo pensar que la insulina podría tener un papel importante en el **crecimiento y mantenimiento neuronal y del cerebro**. También se pensaba que en cerebro sólo existían transportadores de glucosa independientes de la insulina como GLUT 1 (plexos corioideos y endotelio), GLUT2 (glia), GLUT3 (neuronas) y GLUT 5 (endotelio y microglia). Sin embargo, diversos estudios demostraron un cambio en la utilización de la glucosa en el hipotálamo en función de los niveles

de insulina (Lucignani et al., 1987), (Marfaing et al., 1990). El descubrimiento de la presencia, en diferentes áreas del cerebro, de **GLUT 4** (Brant et al., 1993), (El Messari et al., 1998) y **GLUT 8** (Sankar et al., 2002), sensibles a la insulina, indicaba que la captación de glucosa en cerebro no es del todo independiente de la presencia de insulina, y ésta influye en el metabolismo de la glucosa en el cerebro, como se ha demostrado con el uso de la PET (Seaquist et al., 2001), (Bingham et al., 2002). Además, la insulina, a su vez, también aumenta la **expresión y translocación a la membrana de GLUT4** (Piroli et al., 2007) (Figura 1.9). No obstante, la regulación del metabolismo de la glucosa no es la principal función de la insulina en el cerebro y a continuación se describen todas las funciones que se le atribuyen actualmente.

2.3.3.1. Control de la Ingesta y del Peso Corporal

La insulina actúa directamente sobre el **centro de saciedad** del hipotálamo, inhibiendo la ingesta (Debons et al., 1970), (Hatfield et al., 1974), (Strubbe and Mein, 1977) y reduciendo, consecuentemente, el peso corporal en ratas (Brief and Davis, 1984). Así, la interferencia en la expresión de IR en hipotálamo (Obici et al., 2002) o la eliminación selectiva del mismo en CNS (ratones NIRKO) provoca un aumento de la ingesta y del peso corporal (Bruning et al., 2000).

El papel de la insulina en la regulación del peso corporal comienza con un mayor transporte de la misma hacia el CSF (Owen et al., 1974). En perros, una mayor capacidad para aumentar la concentración de insulina circulante y/o su transporte hacia el CSF reduce la susceptibilidad del individuo para aumentar de peso (Kaiyala et al., 2000). La pérdida de peso asociada a la insulina, no obstante, no depende sólo de la reducción en el consumo calórico, sino que para la misma cantidad de calorías ingeridas, la pérdida de peso aumenta con la dosis de insulina administrada (Brief and Davis, 1984). Esto podría explicarse por un papel de la insulina a otros niveles del **metabolismo**, cambiando los niveles de expresión del **neuropéptido Y (NPY)** o del **péptido relacionado con el agouti (AgRP)** (Chang et al., 2005).

2.3.3.2. Crecimiento de Neuritas y Neuroprotección

La insulina también puede actuar como **factor neurotrófico** y provoca el **crecimiento de neuritas** en cultivos de células de neuroblastoma (Recio-Pinto et al., 1984), células simpáticas y en células sensoriales de los ganglios de la raíz dorsal, aumentando también la **supervivencia** de las mismas (Recio-Pinto et al., 1986). El crecimiento de las neuritas se debe al papel de la insulina en la distribución de los neurofilamentos dentro de la célula, a través de la señalización de las MAPK (Schechter et al., 1998), (Govind et al., 2001) (Figura 1.10). A través de la otra vía de señalización que parte desde el IR, la vía de la PI3K y la Akt, la insulina interviene en la regulación de la supervivencia neuronal (Dudek et al., 1997).

En cultivos celulares, la insulina **inhibe la apoptosis** de neuronas de la capa granular externa del cerebelo y aumenta la supervivencia neuronal, reduciendo los procesos de necrosis a través de la activación de la proteína quinasa C (PKC), en neuronas corticales cultivadas en medio sin suero (Hamabe et al., 2003).

También protege a cultivos primarios de neuronas corticales frente al daño causado por estrés oxidativo, inhibiendo la oxidación de proteínas y lípidos y estimulando la producción de **defensas antioxidantes** endógenas (Duarte et al., 2005). Por otra parte, a nivel del Sistema Nervioso Periférico (PNS), la insulina también presenta un papel beneficioso, ya que revierte la neuropatía diabética al prevenir la atrofia axonal (Brussee et al., 2004).

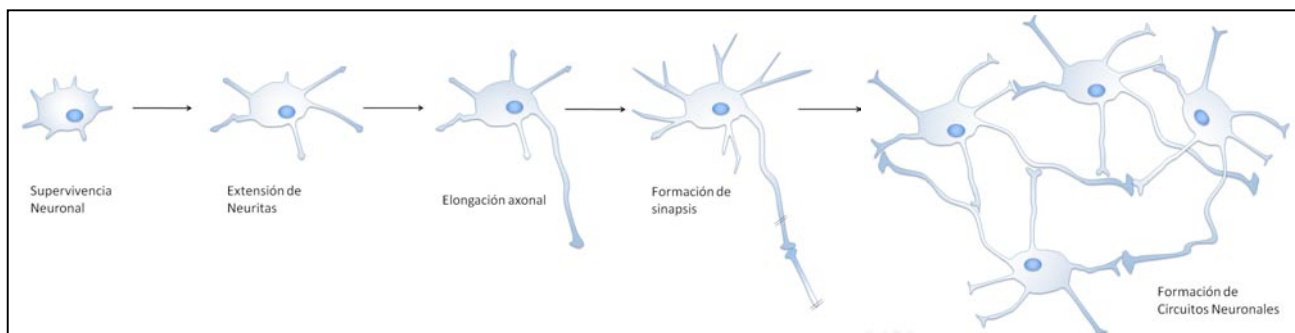


Figura 1.10. Papel de la insulina/IGF-1 en la maduración neuronal. La señalización con IGF-1 es el inicio de la cadena de señales que promueven la supervivencia de neuronas en desarrollo, así como de las subsecuentes etapas en su maduración, incluyendo la extensión de neuritas, la formación del axón y el establecimiento de sinapsis para la formación de circuitos neuronales.

Figura adaptada de (Fernandez and Torres-Aleman).

2.3.3.3. Regulación de la Plasticidad Sináptica

La insulina puede actuar como modulador de la transmisión sináptica controlando, tanto la **liberación** de algunos **neurotransmisores**, como la expresión de sus **receptores** en las membranas de las neuronas postsinápticas. Así, aumenta la liberación de catecolaminas (Sauter et al., 1983) y reduce la captación de Norepinefrina (NE) (Boyd et al., 1985) al bloquear la expresión de su transportador en el locus cerúleo de rata (Figlewicz et al., 1993). Por otra parte, también induce la internalización de los receptores β_2 -adrenérgicos al fosforilarlos a través de la vía de la PI3K (Karooor et al., 1998) (Figura 1.11).

Las sinapsis glutamatérgicas también son reguladas por la insulina por distintas vías. Por un lado, provoca una **internalización de los receptores AMPA** que contienen una subunidad de GluR2 a través de una vía de endocitosis mediada por clatrina (Man et al., 2000), lo que induce la expresión de **LTD** (Long-Term Depression) cerebelar, implicado en procesos de **aprendizaje motor** (Wang and Linden, 2000). El bloqueo de los receptores $GABA_A$, así como la activación de los receptores NMDA (Beattie et al., 2000) también provocan una mayor internalización de los receptores AMPA (Lin et al., 2000), pero la acción de la insulina a través de la vía de la PI3K y la PKC, así como la liberación de Ca^{2+} es suficiente para inducir LTD en la CA1 de hipocampo (Huang et al., 2004). El otro tipo de receptores glutamatérgicos, los receptores **NMDA**, también son modulados por la insulina, que aumenta el número de estos receptores en la membrana celular por **exocitosis** (Skeberdis et al., 2001). También reduce el umbral de activación de los mismos, facilitando así la inducción tanto de LTP como de LTD en la CA1 de **hipocampo** (Pietrzak et al., 2015).

En cuanto a las sinapsis inhibitorias, también se produce un incremento en la expresión de receptores $GABA_A$ en respuesta a la insulina y puede ser uno de los mecanismos implicados en la **reducción de la ingesta** que provoca la insulina (Wan et al., 1997) (Figura 1.11).

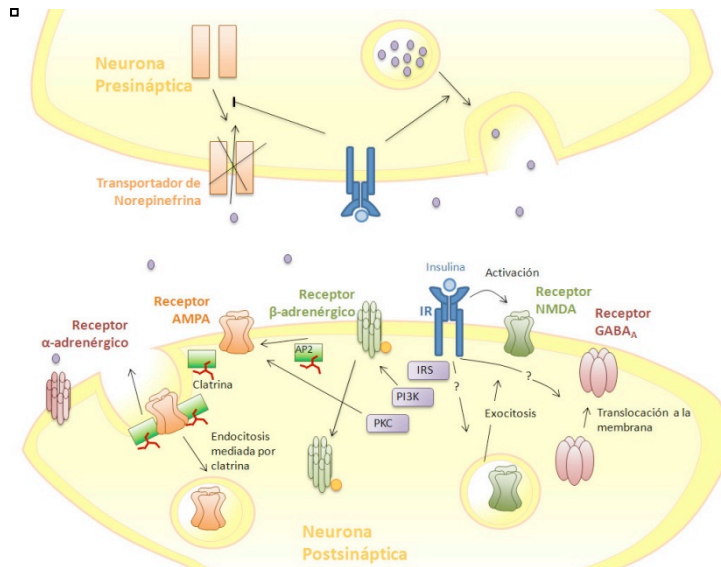


Figura 1.11. Papel de la insulina en la plasticidad sináptica. Mediante su unión al IR de las neuronas presinápticas, la insulina es capaz de modificar la transmisión sináptica estimulando la liberación de catecolaminas a la vez que reduce la captación de NE.

Por otra parte, la insulina también puede actuar sobre la neurona postsináptica, modificando el tipo y el número de receptores de neurotransmisores en la membrana de la misma, así como el umbral de activación de los mismos. Todo ello hace que la acción de la insulina participe en la generación de LTP y LTD, implicados en procesos de aprendizaje y memoria.

2.3.3.4. Insulina y Memoria

Algunas de las modificaciones que produce la insulina en la plasticidad sináptica están estrechamente relacionadas con procesos de aprendizaje y memoria, como es la inducción de **LTP y LTD en hipocampo**. De hecho, la administración de insulina en hipocampo de rata inmediatamente después de la fase de “training”, aumenta la retención en un Passive Avoidance Task, comparado con ratas control o vehículo (Babri et al., 2007). La **memoria espacial** también mejora tras la inyección de insulina en hipocampo de rata y lo hace de una forma dosis-dependiente (Moosavi et al., 2006), (Moosavi et al., 2007). A su vez, procesos de aprendizaje como el entrenamiento en el *Morris Water Maze* afectan a los niveles de **expresión de IR** y moléculas intermedias de su cascada de señalización, como Akt (Dou et al., 2005). También aumenta la actividad tirosina quinasa asociada al IR y la interacción de éste con Shc, así como la actividad de las MAPK (Zhao et al., 1999).

En cuanto al efecto de la insulina sobre la memoria en humanos, se ha visto que la administración de insulina por vía intravenosa **mejora la memoria** en personas sanas, pero afecta a los niveles de glucosa en sangre (Kern et al., 2001). La administración de insulina por **vía intranasal**, en cambio, no produce hipoglucemia y mejora también la memoria declarativa en personas sanas (Benedict et al., 2004). Además, aunque los pacientes de T2D no necesitan inyecciones de insulina, los efectos negativos de la T2D sobre la memoria y función cognitiva de los pacientes presentan una recuperación tras la administración de la misma (Naor et al., 1997). Finalmente, en **pacientes de AD**, la administración de insulina intranasal también mejora la **memoria verbal**, especialmente en los pacientes que no presentan el alelo ApoEε4 (Reger et al., 2006).

2.3.3.5. Longevidad

A pesar de todos los aspectos beneficiosos de la señalización de la insulina a nivel de CNS, existen numerosos estudios que indican que una **reducción** de esta vía se asocia con una mayor **longevidad**. Así, en un análisis genético poblacional se observa, en el caso de las mujeres, que los polimorfismos genéticos asociados con una reducción en la señalización de la insulina están ligados a un menor peso corporal y una mayor esperanza de vida (van Heemst et al., 2005). Asimismo, en ratones, la supresión de IR en el tejido adiposo (ratones FIRKO) conlleva una menor acumulación de grasa corporal y una longevidad mayor (Blüher et al., 2003). La supresión de IRS2 en cerebro, a pesar de provocar resistencia a la insulina e hiperinsulinemia, también aumenta la esperanza de vida de los ratones (Taguchi et al., 2007).

2.3.3.6. Hiperinsulinemia y Toxicidad

Debido a que la insulina induce el transporte de glucosa al interior celular, con la subsecuente bajada de la concentración de glucosa en sangre, una hiperinsulinemia a nivel periférico hace que llegue menos glucosa al cerebro. Esto afecta a diversas funciones neuronales, como la **síntesis de Acetilcolina** a partir de Acetil-Coenzima A, reduciendo así la neurotransmisión colinérgica, y provocando problemas de memoria en el ratón adulto al inyectarle insulina por vía intraperitoneal (Kopf and Baratti, 1999). Además, una hiperinsulinemia aguda a nivel periférico provoca también una **hiperinsulinemia a nivel del CNS**, pues aumenta el transporte de la insulina hacia el CSF (Margolis and Altszuler, 1967), (Wallum et al., 1987). Niveles altos de insulina tienen un efecto tóxico en el cerebro e incrementan la vulnerabilidad neuronal a los **efectos tóxicos inducidos por glutamato** (Schafer and Erdo, 1991).

En cambio, una hiperinsulinemia periférica prolongada **reduce la expresión de IR en la BBB** y un menor transporte de insulina al CNS (Schwartz et al., 1990), contribuyendo a los déficits cognitivos que se observan en pacientes de T2D, como los **problemas en la memoria verbal** que se observan en personas con hiperinsulinemia crónica en ausencia de hiperglicemia (Convit et al., 2003), (Vanhanen et al., 1998).

2.4. IGF Y SU RECEPTOR EN CEREBRO

La insulina pertenece a la superfamilia de péptidos relacionados con la insulina, y entre los que se encuentra el IGF (*Insulin-like Growth Factor*), con el que comparte un gen ancestral común (McRory and Sherwood, 1997). Insulina e IGF presentan una gran homología y una conservación de la secuencia del dominio funcional.

Existen dos tipos de IGF (IGF-1 e IGF-2) y, al igual que la insulina, ambos actúan a nivel periférico como **péptidos endocrinos**, pero también se expresan en el CNS, donde actúan a nivel **autocrino y paracrino** (D'Ercole et al., 1984), (Schechter et al., 1995), (Haselbacher et al., 1985). Aunque la principal fuente de IGF-1 es el hígado, se expresa en casi todas las células del organismo, principalmente en las células de la

musculatura vascular. Asimismo, también se expresa en **neuronas y astroglia** de rata, especialmente en las **etapas fetales** y, en el CNS de adulto, la mayor expresión de IGF-1 se da en el bulbo olfatorio y en la médula espinal (Rotwein et al., 1988). En humanos, se expresa IGF-1 en la **microglia y macrófagos** (Suh et al., 2013), aunque la concentración total es muy baja (Han et al., 1987).

En cuanto al IGF-2, no está tan estudiado y caracterizado, pero su expresión parece estar más repartida en las etapas fetales de rata entre diferentes tejidos del organismo (Brown et al., 1986). En el CNS de adulto se mantiene su expresión, aunque en el resto de tejidos, al igual que ocurre con IGF-1, baja en comparación con la existente en etapas fetales (Kitraki et al., 1993). Además, la concentración de IGF-2 en CNS es mayor que la de IGF-1 y más uniforme por todo el CNS (Rotwein et al., 1988). En humanos, la concentración de IGF-2 en cerebro también es mayor que la de IGF-1 y la zona de mayor expresión es la pituitaria anterior (Haselbacher et al., 1985).

También es posible que el IGF-1 circulante llegue hasta el CNS a través del endotelio del plexo coroides, pues se encuentra una elevada concentración de IGF-1 en los **órganos circunventriculares (CVO)** (Bohannon et al., 1988). Por otra parte, tanto el IGF-1 como el IGF-2, son capaces de atravesar la BBB por dos mecanismos: uno **saturoable**, a través de sus receptores, presentes en los vasos de la BBB; y uno no saturable, por endocitosis a través de las células del endotelio (Duffy et al., 1988). (Figura 1.10).

2.4.1. RECEPTORES DE IGF. SIMILITUDES Y DIFERENCIAS CON IR

El receptor de IGF-1 (IGF-1R) tiene una estructura muy similar al IR, con dos subunidades α y dos β procedentes de un mismo prorreceptor y unidas entre ellas por puentes disulfuro (Chernausek et al., 1981), (Massague and Czech, 1982), (Morgan et al., 1986), (Ullrich et al., 1986). Las subunidades α son extracelulares y presentan sendos dominios de cisteínas que, en este caso, son los responsables de la unión a IGF-1 (Kjeldsen et al., 1991). Las dos subunidades β tienen un dominio transmembrana y un largo fragmento citoplasmático con actividad tirosina-quinasa (Ullrich et al., 1986).

A nivel de secuencia, IGF-1R e IR también presentan una alta homología en la región citoplasmática de la subunidad β con el dominio tirosina-quinasa, así como en la subunidad α rodeando los dominios ricos en cisteína (Ullrich et al., 1986). Esto hace que tanto la insulina como IGF-1 puedan unirse a **cualquiera de los dos receptores**, aunque la afinidad por el propio receptor es mayor que por el ajeno (Massague and Czech, 1982), (Gammeltoft et al., 1985b). Por otra parte, IGF-1R es capaz de unir IGF-2, pero no ocurre lo mismo con IR (Massague and Czech, 1982), (Gammeltoft et al., 1985b) (Figura 1.12).

Asimismo, la cascada de señalización del IGF-1R coincide en muchos puntos con la del IR, activando la vía de la PI3K a través de IRS-1 y la de las MAPK a través de Shc-Grb2-Sos. Sin embargo, existen ciertas diferencias que determinan la especificidad de la función de cada molécula, por ejemplo, la fosforilación de

Shc es **mayor** en la vía de IGF-1R que en la de IR, promoviendo una mayor síntesis de DNA y, por tanto, un mayor efecto **mitogénico** (Sasaoka et al., 1996). Por su parte, la insulina tiene un mayor efecto en la estimulación del metabolismo de la glucosa. Debido a la elevada homología entre IR e IGF-1R, se pueden encontrar también **receptores híbridos** con una subunidad α y una β de cada tipo (Soos et al., 1990). Estos receptores unen preferentemente IGF-1, aunque también son capaces de unir IGF-2 e insulina con una afinidad menor (Soos et al., 1993). La cascada de señalización coincide con la del IR e IGF-1R.

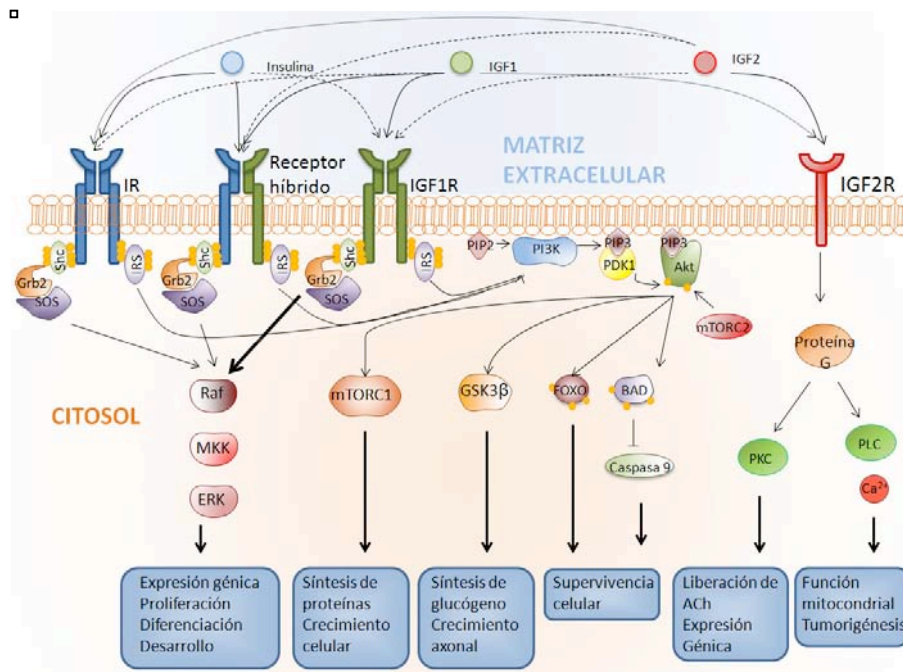


Figura 1.12. Similitudes y diferencias entre los receptores IR, IGF-1R y receptores híbridos. IR e IGF-1R son muy similares tanto en secuencia y estructura como en su cascada de señalización. Las similitudes estructurales hacen que se puedan formar heterodímeros entre mitades $\alpha\beta$ diferentes. Además, insulina e IGF-1 pueden unirse tanto al receptor propio como al ajeno, y a los receptores híbridos, aunque con afinidades distintas. Esto no ocurre con IGF-2. En cuanto a la cascada de señalización, el IGF-1R promueve una mayor activación de las MAP-quinasas y por tanto tiene una mayor implicación que la insulina en procesos de desarrollo. Ésta, por su parte, tiene una mayor implicación en el metabolismo de la glucosa.

Figura modificada de (Fernandez and Torres-Aleman).

En cambio, el receptor de IGF-2 (IGF-2R) es un monómero, con una estructura similar al receptor de la manosa-6-fosfato. Presenta un largo dominio extracelular compuesto básicamente por repeticiones de 15 cisteínas, y un pequeño dominio citoplasmático muy hidrofílico que no presenta actividad quinasa, aunque puede ser fosforilado en un residuo de tirosina por una quinasa asociada a la membrana de los adipocitos (Morgan et al., 1987), (Corvera et al., 1986). Es capaz de unir IGF-1R con una afinidad menor que IGF-2, pero no une insulina (Massague and Czech, 1982), (Gammeltoft et al., 1985b) (Figura 1.12).

2.4.2. FUNCIONES DE IGF-1 EN EL CNS

Como la insulina, el IGF-1 tiene también un papel **neuroprotector** y promueve la regeneración neuronal. Así, en cultivos de neuronas del hipocampo y del septum con restricción de glucosa, el tratamiento con IGF-1 o IGF-2 reduce el daño neuronal al controlar la **homeostasis del calcio**, impidiendo su entrada a la célula al reducir la expresión de los receptores NMDA (Cheng and Mattson, 1992). El tratamiento con IGF-1 también promueve la proliferación de células progenitoras de hipocampo al activar la vía de las MAPK (Aberg et al., 2003). Tanto en cultivos de células de hipocampo como de células de retina, se observa un

aumento en la expresión y activación de IGF1-R, con la subsecuente activación de PI3K, como hechos desencadenantes del desarrollo del axón (Sosa et al., 2006), (Dupraz et al., 2013).

En cuanto al efecto *in vivo* de IGF-1, se ha observado una **reducción en la apoptosis** neuronal durante la última etapa del desarrollo prenatal y el inicio del desarrollo postnatal en ratones transgénicos que sobreexpresan IGF-1 (Hodge et al., 2007). Además, la administración de IGF-1 por vía intracerebroventricular aumenta la **neurogénesis** y **diferenciación** en el giro dentado de ratones viejos (18 y 24 meses) (Lichtenwalner et al., 2001) y mejora la realización del “*Object Recognition Task*” y del “*Morris Water Maze*” en comparación con ratones no tratados de la misma edad (Markowska et al., 1998) (Figura 1.13).

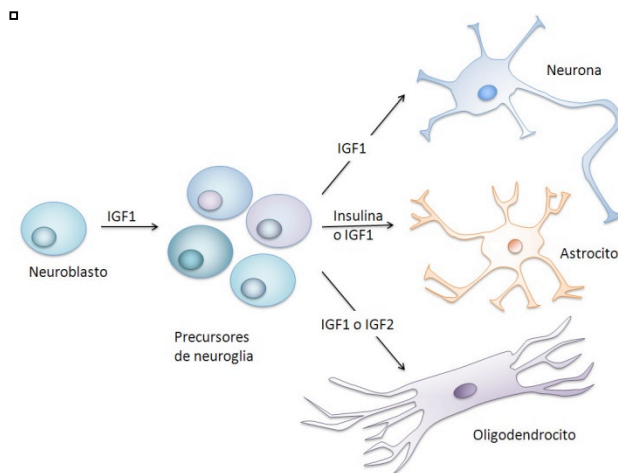


Figura 1.13. Papel de la insulina/IGF-1 en la neurogénesis y diferenciación. El IGF-1 es capaz de promover la proliferación de las células neurales precursoras, y la diferenciación de éstas en neuronas, astrocitos u oligodendrocitos depende de la acción del IGF-1, la insulina o el IGF-2 sobre ellas.

Figura adaptada de (Fernandez and Torres-Aleman).

2.5. RESISTENCIA A LA INSULINA/IGF-1 EN CNS

La resistencia a la insulina es una de las características de la T2D y puede deberse a una menor expresión de las moléculas intermedias en la señalización de IR en las células del organismo, por lo que se hace necesaria una mayor expresión y liberación de insulina para conseguir el efecto deseado. A su vez, esta hiperinsulinemia, si se hace crónica, puede provocar una reducción en la expresión de IR, aumentando aún más la resistencia a la insulina. Debido al papel de la insulina, que ya hemos comentado, en el desarrollo neuronal, plasticidad sináptica y memoria, la **resistencia a la insulina** en el CNS está estrechamente relacionada con el desarrollo de **problemas cognitivos y neurodegenerativos**.

Aunque la delección de IRS2 específicamente en cerebro de ratón aumenta la esperanza de vida del individuo, cuando la delección se hace a nivel sistémico, los ratones presentan un **menor tamaño del cerebro**, probablemente por un aumento en la apoptosis y una **proliferación neuronal reducida** (Schubert et al., 2003); también desarrollan una resistencia a la insulina que provoca una diabetes fatal a los 3 meses de edad (Taguchi et al., 2007), (Withers et al., 1998) y una acumulación de tau hiperfosforilada (Schubert et al., 2003). Por otra parte, ratones con una delección de IR específica en neuronas (NIRKO), a pesar de no tener problemas cognitivos, probablemente debido a la intervención de otros sistemas redundantes, sí que pre-

sentan una resistencia a la insulina severa en neuronas y un aumento en la **fosforilación de Tau** (Schubert et al., 2004).

2.5.1. RESISTENCIA A LA INSULINA/IGF-1 Y AD. DIABETES TIPO 3

Como ya se ha comentado, la Diabetes Mellitus y la Resistencia a la Insulina son un **factor de riesgo** para el desarrollo de AD y, aunque la hiperglicemia crónica y los episodios de hipoglicemia pueden tener un efecto sobre el CNS, estudios como el de Hisayama (Matsuzaki et al., 2010) o el de Rotterdam (Schrijvers et al., 2010) muestran que la hiperinsulinemia y la resistencia a la insulina son los principales factores de la DM que presentan una clara relación con un mayor riesgo de padecer AD. De hecho, los estudios de Craft et al. demuestran que los pacientes de AD no homocigotos para el alelo ApoE ϵ 4 presentan una mayor resistencia a la insulina que personas sanas y que los pacientes de AD homocigotos para el alelo ApoE ϵ 4 (Craft et al., 2003).

Por otra parte, aunque existe controversia sobre si los niveles de insulina y su receptor suben, bajan o se mantienen en pacientes de AD en comparación con personas sanas de la misma edad, en el caso del IGF-1, Sáiz et al proponen la **reducción de IGF-1 en sangre** como un marcador para AD (Trueba-Saiz et al., 2013). Lo que sí parece claro es que la vía de señalización de la insulina/IGF-1 se encuentra reducida en pacientes de AD. Así, Frölich et al. observan que en pacientes de AD existe una reducción en la concentración de insulina en cerebro asociada a la edad pero que no se acentúa con la AD (Frolich et al., 1998). En cambio, a nivel de expresión de **mRNA**, Steen et al. sí que encuentran una **reducción significativa** de los niveles de **insulina, IGF-1 e IGF-2** en pacientes de AD comparados con personas sanas de la misma edad (Steen et al., 2005). Además, esta reducción es mayor a medida que avanza la progresión de la enfermedad (Rivera et al., 2005).

Algo similar ocurre en el caso de IR. Mientras Frölich et al detectan en personas sanas un descenso en la cantidad de IR con la edad, en personas de AD esto no ocurre, según ellos por un **efecto de compensación** en respuesta a una menor respuesta en la señalización. Moloney et al encuentran no sólo un aumento en la cantidad de IGF-1R, sino también un **cambio en su distribución**, pasando de encontrarse principalmente en neuronas piramidales a concentrarse en células de la glia (Moloney et al., 2010). Por su parte, Steen et al y Rivera et al reportan una **bajada en la expresión del mRNA de los receptores** de insulina e IGF-1 y 2, que avanza con la progresión de la enfermedad (Steen et al.), (Rivera et al.).

En cuanto a la vía de señalización, en pacientes de AD se encuentra afectada a todos los niveles, desde una **menor unión** de insulina, IGF-1 e IGF-2 a sus receptores (Rivera et al., 2005), que lleva a una **menor fosforilación** de la subunidad β de IR/IGF-1R (Frolich et al., 1998), (Talbot et al., 2012), a una menor expresión y fosforilación de las proteínas intermedias de la vía, especialmente IRS-1/2 (Liu et al., 2011), (Steen et al., 2005), (Moloney et al., 2010), (Talbot et al., 2012), una menor unión de IRS-1 a IR e IRS-2 a IGF-

1R (Talbot et al., 2012) y una mayor cantidad de IRS-1/2 inactivos (fosforilados en un residuo de serina) (Talbot et al., 2012).

Algunos de estos cambios se observan también en pacientes con T2D y, cuando concurren ambas patologías, la variación es aún más acusada (Liu et al., 2011). Además, la resistencia a la insulina/IGF-1 se relaciona con los problemas del **sistema colinérgico** que tienen lugar en la AD, puesto que la estimulación con insulina o IGF-1 reduce la expresión de la AChE y aumenta la de la ChAT (Rivera et al., 2005). También se ha visto que en cultivos de fibroblastos embrionarios, cuando se eliminan los genes del a presenilina 1 y 2, aumenta la expresión del IR y la activación de Akt (Maesako et al., 2011).

Por otra parte, al igual que la inyección de estreptozotocina por vía intraperitoneal en roedores da lugar a la destrucción de las células β del páncreas y se trata, por tanto, de un modelo de T1D, la inyección intracerebral de STZ provoca neurodegeneración, un menor tamaño del cerebro y una resistencia a la señalización de la insulina e IGF-1 en cerebro. La neurodegeneración que presenta este modelo es muy similar a la observada en modelos de AD, con una pérdida de neuronas y oligodendrocitos y un aumento de los astrocitos y microglía. En el modelo de STZ intracerebral también se observa una **mayor expresión de Tau, APP, y AChE**, mientras que la expresión de ChAT se encuentra reducida. También es mayor la actividad de GSK3 β y la **fosforilación de la proteína tau**. Todas estas razones llevan a los autores de este trabajo a designar este modelo como un modelo de **Diabetes Mellitus en el cerebro o T3D** (Lester-Coll et al., 2006).

2.5.1.1. Insulina/IGF-1 y A β

El metabolismo de la insulina y del péptido A β se interrelacionan entre sí a varios niveles. En primer lugar, la subida en la concentración de insulina en sangre tras la ingesta viene asociada a una bajada en la concentración de APP en plasma en personas jóvenes sanas (Boyt et al., 2000). Además, a nivel intraneuronal, la insulina **previene el procesamiento de APP por BACE** (Devi et al., 2012), promueve el **tráfico del A β** y su secreción hacia el medio extracelular (Gasparini et al., 2001) evitando su acumulación en el interior de la neurona. Una vez en plasma, la insulina facilita la eliminación del A β al inducir la **translocación del LPR-1** a la membrana de los hepatocitos (Tamaki et al., 2007).

En cultivos neuronales tratados con A β , aumenta la supervivencia neuronal al añadir IGF-1 al medio (Dore et al., 1997). En animales, elevados niveles de IGF-1 en sangre aumentan la permeabilidad de la BBB a la albúmina y la transtirretina, que pasan al CSF y se unen a los péptidos A β , solubilizándolos en el CSF y el plasma, donde pueden ser degradados y evitan su acumulación en el cerebro (Carro et al., 2002). Además, el bloqueo del IGF-1R en el plexo coroideo provoca la **acumulación de A β** en el cerebro y el depósito de placas amiloides (Carro et al., 2006b). Y en el modelo APP/PS2, la administración subcutánea de IGF-1 reduce la acumulación de A β en el cerebro (Carro et al., 2006a).

Por su parte, **A β reduce la síntesis de la proinsulina** en cultivos de neuronas corticales y de hipocampo a través de la activación de GSK3 β (Nemoto et al., 2014). También, los oligómeros de A β o ADDLs (A β -derived difusible ligands) e insulina **compiten por la unión a IR** (Xie et al., 2002), por lo que una elevada concentración de ADDLs en plasma pueden inhibir la cascada de señalización de IR al impedir la unión de la insulina (Townsend et al., 2007), (Zhao et al., 2008), (Pearson-Leary and McNay, 2012). Además, IR puede internalizar los ADDLs en la célula, provocando su acumulación intraneuronal pero la insulina reduce la unión de éstos a la neurona, así como su internalización (Zhao et al., 2009). Además, la unión de los ADDLs a las sinapsis provoca a su vez la **internalización** de varios receptores, entre ellos el IR y los receptores NMDA, provocando toxicidad neuronal y afectando a la plasticidad sináptica (De Felice et al., 2009). Pero la adición de insulina a cultivos de neuronas de hipocampo tratados con ADDLs reduce la internalización de IR (De Felice et al., 2009) y los efectos tóxicos de aquéllos, no sólo por efecto de competencia por la unión a IR, sino que la propia cascada de señalización de la insulina también es necesaria para este efecto protector (De Felice et al., 2009) (Figura 1.14).

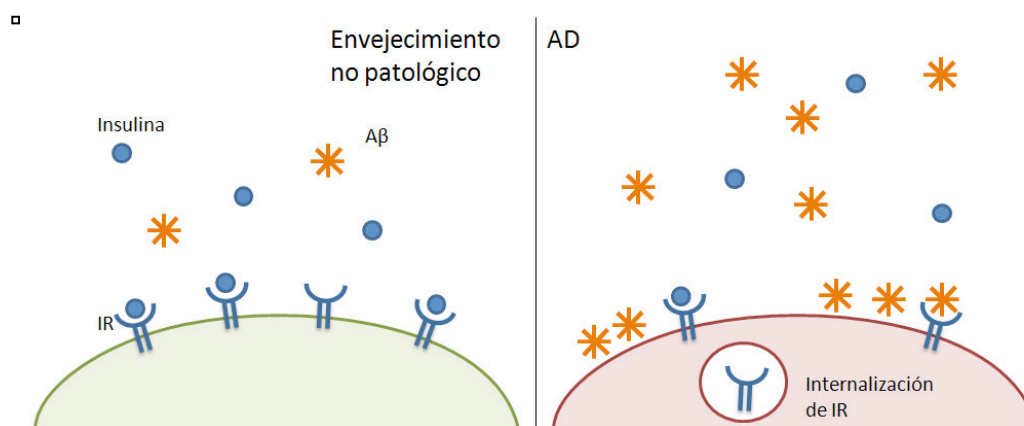


Figura 1.14. Los ADDLs interfieren en la señalización de la insulina. Los ADDLs compiten con la insulina por su unión al IR, provocando que la señalización de la insulina en las neuronas sea mucho menor en los cerebros de AD. Además, la acumulación de ADDL en las sinapsis provoca la internalización de IR, reduciendo aún más su señalización.

Figura modificada de (De Felice).

La insulina también induce la degradación de los ADDLs al activar la **enzima degradadora de la insulina** (IDE) (Zhao et al., 2009). IDE es una metaloproteasa cuya principal función es la degradación de la insulina (Kirschner and Goldberg, 1983). Sin embargo, aunque con una afinidad mucho menor (McDermott and Gibson, 1997), (Perez et al., 2000), también es capaz de degradar el péptido A β (Kurochkin and Goto, 1994), (Qiu et al., 1997), por lo que, si la insulina se encuentra en concentraciones excesivas, inhibirá la degradación de A β . Así, existe una correlación inversa entre los niveles de expresión o de actividad de IDE y la concentración de A β . Así, existe una correlación inversa entre los niveles de expresión o de actividad de IDE y la concentración de A β (Miller et al., 2003), (Zhao et al., 2007). Tanto en ratones transgénicos que sobreexpresan la IDE humana, como en los que se obtienen al cruzar éstos con ratones transgénicos APP, se observa una reducción en la cantidad de A β_{40} y A β_{42} solubles e insolubles y un menor depósito de placas A β al compararlos con ratones no transgénicos o sólo APP respectivamente (Leissring et al., 2003). IDE también es capaz de

eliminar el dominio intracelular de APP (AICD) (Edbauer et al., 2002), (Farris et al., 2003). En pacientes de AD, se ha observado una relación entre la presencia del alelo ApoE ϵ 4 y un descenso en la cantidad de IDE en hipocampo (Cook et al., 2003) y ciertas variantes genéticas de IDE se relacionan con un menor riesgo de padecer AD sólo si dicho paciente no presenta tampoco el alelo ApoE ϵ 4 (Edland et al., 2003).

Por otra parte, fármacos antidiabéticos como la rosiglitazona y la metformina también tienen un efecto sobre la generación y eliminación de A β . La **rosiglitazona** parece aumentar la **expresión de LRP1** y, por tanto, facilita la eliminación de A β (Moon et al., 2012), mientras que la **metformina**, por su parte, aumenta la **expresión de BACE1**, incrementando la generación de A β (Chen et al., 2009).

En concordancia con todo lo expuesto, también se ha observado en el modelo transgénico APP/PS1 un **aumento en la expresión de IGF-1R** pero un **descenso en la sensibilidad** del mismo, debido a una reducción en la fosforilación de los intermediarios de la cascada de señalización (Zhang et al., 2013). También se da un incremento de la amiloidosis y de los problemas cognitivos al provocar una deficiencia de insulina por STZ en este modelo (Wang et al., 2010).

Sin embargo, la deficiencia en IRS-2 (ratones IRS-2^{-/-}) parece **reducir la acumulación de A β** y la mortalidad en el modelo transgénico APP (Freude et al., 2009). Además, una reducción en la señalización de IGF-1 en el modelo transgénico APP (APP;IGF-1R^{+/-}) **reduce la presencia de ADDLS**, hace que las placas amiloides sean más pequeñas y condensadas, reduce la pérdida neuronal y la neuroinflamación y mejora la función cognitiva en comparación con animales APP (Cohen et al., 2009).

2.5.1.2. Insulina/IGF-1 y Tau

La acción de la insulina e IGF-1 también afecta directamente a la fosforilación de tau, pues a través de la vía de la PI3K, provoca la inhibición de GSK3 β , una de las enzimas responsables de la fosforilación de tau (Hong and Lee, 1997), (Soutar et al., 2010). Así, el tratamiento de células en cultivo con insulina o IGF-1 provoca la **desfosforilación de tau** y su unión a los microtúbulos (Hong and Lee, 1997).

En animales, una dieta rica en calorías y colesterol provoca un descenso en la cantidad de IRS-1 y de p-Akt, con una mayor activación de GSK3 β y, por tanto, una mayor fosforilación de tau (Bhat and Thirumangalakudi, 2013). Lo mismo se observa en el modelo IRS-2^{-/-} (Schubert et al., 2003), el db/db, y, aunque en menor medida, en el modelo STZ (Kim et al., 2009). No obstante, la hiperinsulinemia a nivel periférico provoca una activación de la vía de la insulina prolongada en el tiempo y también induce la fosforilación de tau (Freude et al., 2005).

2.5.1.3. Insulina y Memoria en AD

Ya se han comentado los efectos beneficiosos de la administración de insulina sobre la memoria declarativa en personas jóvenes sanas. Lo mismo ocurre cuando se administra insulina a pacientes de AD (Craft

et al., 1996), y se considera que es la verdadera responsable de los efectos observados de la glucosa sobre la memoria (Craft et al., 1999a). Según los estudios de Craft et al., este efecto de la insulina sobre la memoria depende de la dosis utilizada y de la presencia del alelo ApoEε4. Así, en pacientes homocigotos para el alelo ApoEε4, la respuesta se da a dosis más bajas que en pacientes no homocigotos, debido a que los primeros presentan una menor resistencia a la insulina y ésta atraviesa más fácilmente la BBB en dichos pacientes (Craft et al., 1998), (Craft et al., 1999b), (Craft et al., 2003). En cambio, otro estudio realizado dentro del mismo grupo demuestra que, cuando la insulina se administra por vía intranasal, el efecto también depende de la dosis pero sólo se observa en pacientes sin el alelo ApoEε4 (Reger et al., 2008), posiblemente debido a que las dosis empleadas en el estudio son demasiado altas y podrían provocar una hipoglucemia, algún efecto inflamatorio o afectar al metabolismo energético del CNS en los pacientes de AD que son homocigotos para el alelo ApoEε4 y cuya resistencia a la insulina es menor.

2.6. GLP-1 Y SU RECEPTOR EN CEREBRO

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) (7-36 amida) es una **incretina** (hormona sintetizada en el intestino), derivada a partir del procesamiento del proglucagón y secretada por las células L del endotelio del intestino en respuesta a la ingesta. También puede ser sintetizado en el páncreas, por un procesamiento ligeramente distinto del que tiene lugar en el intestino (Figura 1.15).

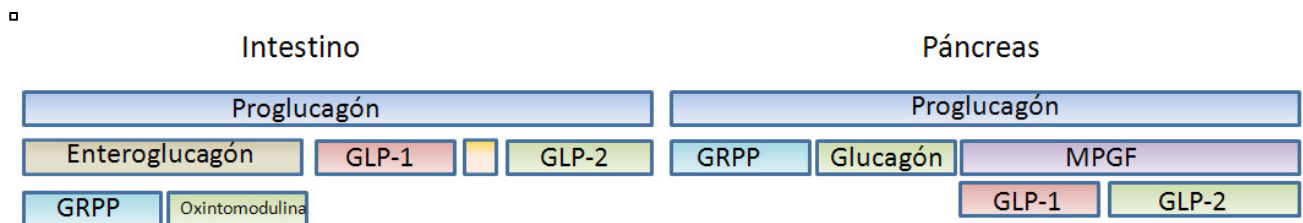


Figura 1.15. Procesamiento proteolítico del proglucagón para la síntesis de GLP-1 en intestino y páncreas. En el páncreas, los principales productos sintetizados a partir del proglucagón son el glucagón, el GRPP y el MPGF. En cambio, en el intestino delgado, los principales productos son el GLP-1 y GLP-2.

Figura modificada de (Orskov et al.).

Su función es provocar una mayor estimulación de la síntesis de insulina en las células β del páncreas en respuesta a un incremento en la concentración de glucosa (McIntyre et al., 1965), (Mojsov et al., 1987), (Drucker et al., 1987), provocando, por tanto, una bajada de la misma (Gutniak et al., 1992), (Rachman et al., 1997). Además, GLP-1 protege a las células β de la **apoptosis** tanto en animales normales (Li et al., 2003) como diabéticos (Li et al., 2003), (Farilla et al., 2002), y en pacientes de T2D, ha demostrado aumentar la masa de células β (Tourrel et al., 2002) y mejorar su función (Rachman et al., 1997), (Zander et al., 2002). Por otra parte, GLP-1 también reduce la síntesis de glucosa en el hígado en mujeres no diabéticas (Larsson et al., 1997).

Así pues, GLP-1 es útil en el **tratamiento de la T2D**, con el inconveniente de que es rápidamente degradado por la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4) (Deacon et al., 1995). De manera que para el estudio de los beneficios de GLP-1, se utilizan, principalmente, dos análogos del mismo: la **exendina-4** o **exenatida** (exendina-4 sintética) y la **liraglutida**, ambos fármacos empleados en el tratamiento de la T2D (Figura 1.16).

La exenatida ha mostrado una capacidad similar a la insulina en controlar la glicemia de pacientes de T2D (Nauck et al., 2007), los cuales, además, presentan pérdida de peso (Nauck et al., 2007), (Klonoff et al., 2008), reducción del riesgo cardiovascular y descenso de los marcadores de daño hepático (Klonoff et al., 2008). Además, presentan una mayor neogénesis, replicación (Xu et al., 1999), (Stoffers et al., 2000) y mejora en la función de las células β (Nauck et al., 2007). El tratamiento con liraglutida también consigue un control de la glicemia y una pérdida de peso de los pacientes (Nauck et al., 2006), (Vilsboll et al., 2007), así como una reducción de los marcadores de riesgo cardiovascular (Courreges et al., 2008). Asimismo, reduce los procesos inflamatorios asociados a la T2D al inducir la producción de óxido nítrico en las células del endotelio (Hattori et al., 2010). Ambos fármacos pueden ser utilizados como coadyuvantes en el tratamiento con metformina, consiguiendo mejores resultados en el tratamiento (Bunck et al., 2009), (Bergenstal et al., 2010), (Nauck et al., 2009).

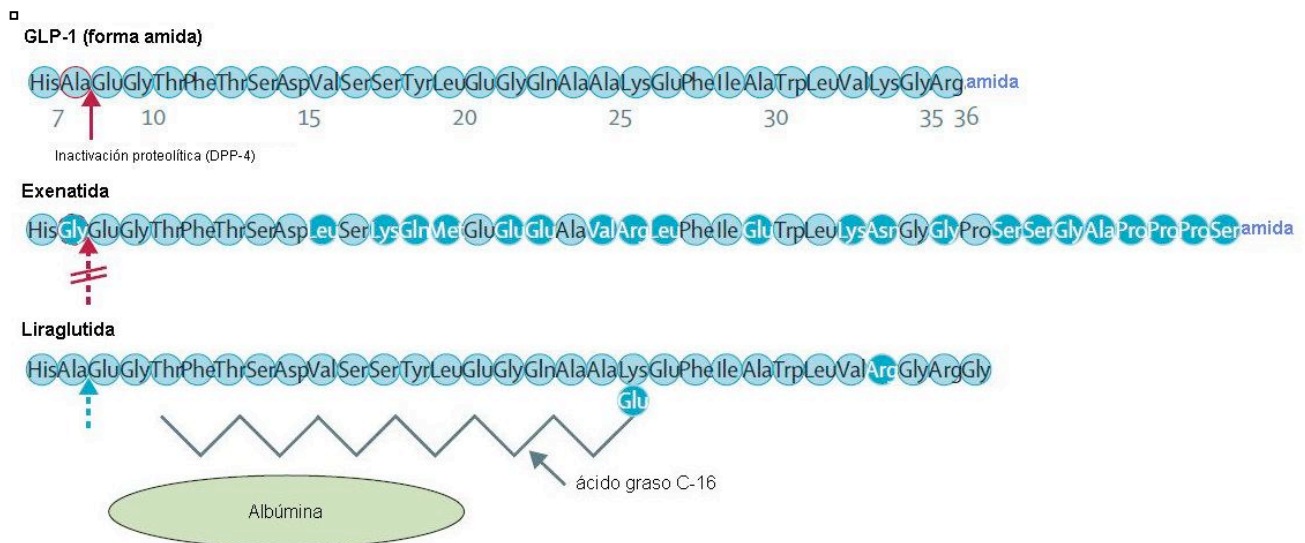


Figura 1.16. Estructura del GLP-1 y de sus análogos, exenatida y liraglutida. La exenatida es un análogo a GLP-1, con una secuencia similar a éste que le permite unirse al GLP-1R, pero con ciertas diferencias que la hacen resistente a la acción de la DPP-4. Las diferencias en la secuencia aminoacídica de la liraglutida en relación al GLP-1 son menores, pero contiene la adición de un ácido graso C16 en la Lys26 que puede unirse a su vez a la albúmina. Esto la hace parcialmente resistente a la degradación por parte de la DPP-4.

Figura adaptada de (Drucker and Nauck).

GLP-1, exendina-4 y liraglutida ejercen su acción al unirse al receptor de GLP-1 (GLP-1R). Éste es un receptor de 7 dominios transmembrana acoplado a **proteína G** (GPCR). La unión del ligando provoca la activación de la subunidad α, que, a su vez, activa la adenil ciclasa A y la producción de AMP cíclico (cAMP). Éste promueve la activación de la **proteína quinasa A** (PKA) y ésta la de la vía de las **MAPK**. El GPCR también puede conectar directamente con la vía de la PI3K-Akt. Como puede verse, la vía del GLP-1 conecta con dife-

rentes puntos de la vía de la insulina/IGF-1R, por lo que todas ellas se encuentran interrelacionadas (Figura 1.17). De hecho, **GLP-1 incrementa la expresión de IGF-1R** a través de la activación de la PKA (Cornu et al., 2010).

La vía de la PKA activa la transcripción de diversos genes mediante la unión de **CREB** (cAMP Response Element-Binding protein) a la región CRE de los mismos. En el caso de la estimulación de la síntesis de insulina por parte de GLP-1, interviene un factor de transcripción muy similar en estructura a CREB (de cremallera de leucina), pero cuya actividad es independiente de la acción de PKA (Skoglund et al., 2000). Sin embargo, la PKA sí que está implicada en los mecanismos de exocitosis para la **secreción de la insulina** a través de la movilización del calcio intracelular (Gromada et al., 1995) (Figura 1.17).

Por su parte, la vía de la PI3K, mediante la activación de la PKC, es la responsable de la estimulación de la síntesis de DNA en las células β y la replicación de las mismas (Buteau et al., 1999), (Buteau et al., 2001). Además a través de la acción de Akt, la activación de la PI3K a partir de GLP-1R protege a las células β de la apoptosis y necrosis (Li et al., 2003) (Figura 1.17).

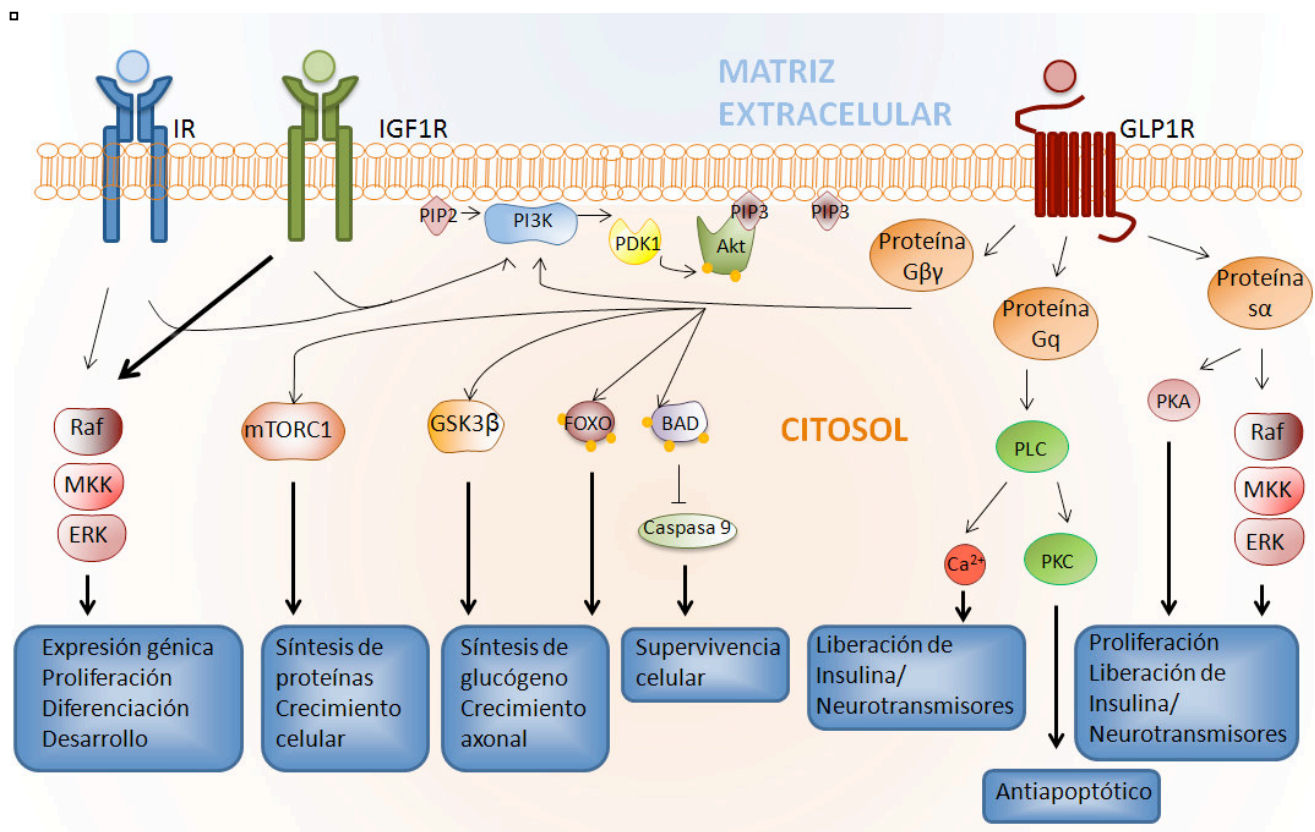


Figura 1.17. Vía de señalización del GLP-1R. El GLP-1R es un receptor con 7 dominios transmembrana acoplado a proteína G. En función del tipo de proteína G que se une al receptor, las respuestas son diferentes. Así, la unión de una proteína G $\beta\gamma$ puede activar la vía de la PI3K, conectándose así con la señalización del IR/IGF-1R y promoviendo el crecimiento y la supervivencia celular. También es capaz de activar la vía de las MAPK si se une una proteína G α al GLP-1R. En este caso, también se activa la vía de la PKA, contribuyendo a los mecanismos de proliferación e implicada en el proceso de liberación de insulina en las células del páncreas. Este mismo mecanismo es capaz de estimular la liberación de neurotransmisores cuando la señalización ocurre en una neurona presináptica. Finalmente, si el GLP-1R se une a una proteína Gq, se activa la PLC, que da lugar a la liberación de calcio desde el Retículo Endoplasmático, contribuyendo a los procesos de fusión de endosomas a la membrana para la liberación de insulina o neurotransmisores. Asimismo, la PLC activa la vía de la PKC, que inhibe los procesos de apoptosis.

GLP-1R se expresa en diferentes tejidos, siendo el cerebro junto con el pulmón, donde se encuentra una mayor expresión, incluso más que en hígado y páncreas (Kanse et al., 1988). Concretamente, en el cerebro de rata, GLP-1R se expresa en diversas áreas, entre las que se encuentra el hipocampo, hipotálamo, tálamo, bulbo olfatorio y tronco del encéfalo (Goke et al., 1995), (Merchenthaler et al., 1999). La expresión de GLP1R se da principalmente en **neuronas**, y sólo se encuentra GLP-1 y GLP-1R en glia como un **mecanismo de defensa** en respuesta a una lesión en el cerebro (Chowen et al., 1999).

2.6.1. FUNCIÓN DE GLP-1 EN EL CNS

Tanto el GLP-1 como la exendina-4 y la liraglutida son capaces de cruzar la BBB por **difusión simple** (Kastin et al., 2002), (Kastin and Akerstrom, 2003), (Hunter and Holscher, 2012), donde llevan a cabo varias funciones. También se sintetiza GLP-1 en neuronas no catecolaminérgicas del tronco del encéfalo caudal, concretamente neuronas del núcleo del tracto solitario que inervan con el núcleo paraventricular hipotalámico (PVN) (Larsen et al., 1997), (Sarkar et al., 2003).

La expresión de GLP-1R en el hipotálamo y el tronco del encéfalo colocaliza con la expresión de GLUT-2 y glucoquinasa y la activación de aquél se relaciona con la estimulación del metabolismo de la glucosa en estas áreas (Alvarez et al., 2005). Además, la activación de GLP-1R en hipotálamo y romboencéfalo da lugar a la **inhibición de la ingesta** a través de la activación de la PKA y la vía de las MAPK y la inhibición de la quinasa dependiente de AMP (AMPK) en estas áreas (Hayes et al., 2011). También induce la expresión de la **Neurotensina** (péptido anorexigénico) e inhibe la de la **grhelina** (orexigénico) en PNV, pero no afecta a la expresión de NPY o POMC (Dalvi et al., 2012).

Al igual que la insulina e IGF-1, GLP-1 también tiene un papel **neurotrófico y neuroprotector**. Así, tanto a través de la vía de la PI3K como de las MAPK, GLP-1 y exendina-4 inducen el **crecimiento de neuritas** y la **diferenciación** de células PC12 (Perry et al., 2002b). GLP-1 y exendina-4 también protegen del efecto citotóxico del glutamato en cultivos de neuronas hipocampales, así como de la **pérdida de neuronas colinérgicas** (con expresión de ChAT) provocada por el daño neurológico in vivo (Perry et al., 2002a). Además, tanto GLP-1 como exendina-4 y liraglutida induce la proliferación neuronal en cultivo (Li et al., 2010b) y en el giro dentado de ratones db/db y alimentados con dieta alta en grasa, mostrando un **efecto positivo contra la neurodegeneración asociada a la diabetes** (Hamilton et al., 2011).

Por otra parte, GLP-1 también influye en la **plasticidad sináptica** y la **memoria**. Igual que en las células β del páncreas GLP-1 estimula la liberación de insulina mediante la acción de PKA, cuando GLP-1 actúa sobre neuronas, éste es capaz, a través del mismo mecanismo, de estimular la **liberación de neurotransmisores** (Mora et al., 1992). Además, induce la recaptación de glutamato e inhibe la expresión de LTD en hipocampo (Kobayashi et al., 2013). También se ha demostrado la capacidad de GLP-1, exendina-4 y liraglutida para inducir la expresión de LTP (McClean et al., 2010), (Abbas et al., 2009).

Todo ello hace que la administración en ratas de GLP-1 o exendina-4 provoque una mejora en el **aprendizaje** y la **memoria** de las mismas al compararlas con ratas no tratadas (During et al., 2003), (Isacson et al., 2011). Lo mismo ocurre al administrar liraglutida en ratones alimentados con una dieta alta en grasas (Porter et al., 2010). Además, ratones KO para GLP-1R muestran problemas de memoria que no mejoran con la administración de exendina-4 pero sí se restauran al ser inyectados con un AAV que expresa el gen del GLP-1R. La administración de este AAV en ratones WT también mejora el aprendizaje por parte de los animales (During et al., 2003).

2.6.1.1. Papel de GLP-1 y sus análogos en AD

Debido al papel de GLP-1 en procesos de neuroprotección, plasticidad sináptica y memoria, al igual que la insulina e IGF-1, su acción en el CNS proporciona protección frente a los problemas cognitivos causados por la neurodegeneración y acumulación de A β en la AD. Así, la inhibición de la DPP-4 provoca un aumento del GLP-1 endógeno y una **mejora de la memoria** en ratones transgénicos APP/PS1, acompañada de una **reducción de los depósitos amiloides** en el cerebro de los mismos (D'Amico et al., 2010). Además, la acción de GLP-1 sobre la expresión de LTP contrarresta su inhibición por la acción del A β (Gault and Holscher, 2008). GLP-1 también reduce la producción de A β in vivo (Perry et al., 2003) y protege a las neuronas de la apoptosis inducida por el mismo (Qin et al., 2008).

Los análogos de GLP-1 han mostrado los mismos efectos beneficiosos en AD. La administración de liraglutida en ratones normales no afecta a la memoria, pero sí previene los **problemas cognitivos** y la reducción del **LTP hipocampal** asociados a la acumulación de A β (Han et al., 2013). En ratones APP/PS1 mejora la memoria, reduce la acumulación de A β y la inflamación, aumenta el número de sinapsis y la expresión de IDE (McClellan et al., 2011), (McClellan and Holscher, 2014).

El tratamiento con exendina-4 reduce la diabetes en ratones 3xTgAD inyectados con STZ e inhibe los efectos amiloidogénicos de la misma (Li et al., 2010a). Finalmente, en animales inyectados con STZ por vía icv, la exendina-4 **previene la pérdida de neuronas piramidales en la CA1** del hipocampo, **revierte la fosforilación de tau**, reduce la expresión y activación de GSK3 β y previene los problemas de memoria que presentan estos animales (Chen et al., 2012).

3. TERAPIA GÉNICA

3.1. ASPECTOS GENERALES

3.1.1. DEFINICIÓN Y APLICACIONES

La terapia génica es una herramienta de la medicina que se basa en la transferencia de un gen, a través del vector adecuado, en las células o tejido diana para el tratamiento de una enfermedad. Inicialmente, se probó su aplicación en enfermedades monogénicas (Figura 1.18) de manera que los primeros ensayos clínicos de terapia génica que se llevaron a cabo buscaban el tratamiento de enfermedades como la deficiencia de la adenosina desaminasa (ADA) (Blaese et al., 1995), la deficiencia de la ornitina transcarbalimasa (Raper et al., 2002) o la SCID-X1 (Cavazzana-Calvo et al., 2000). Más recientemente, también se ha investigado el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne (Poplewell et al., 2013) y el de la deficiencia de la descarboxilasa del aminoácido L-aromático, que lleva a la deficiencia de los neurotransmisores serotonina y dopamina (Lee et al., 2014).

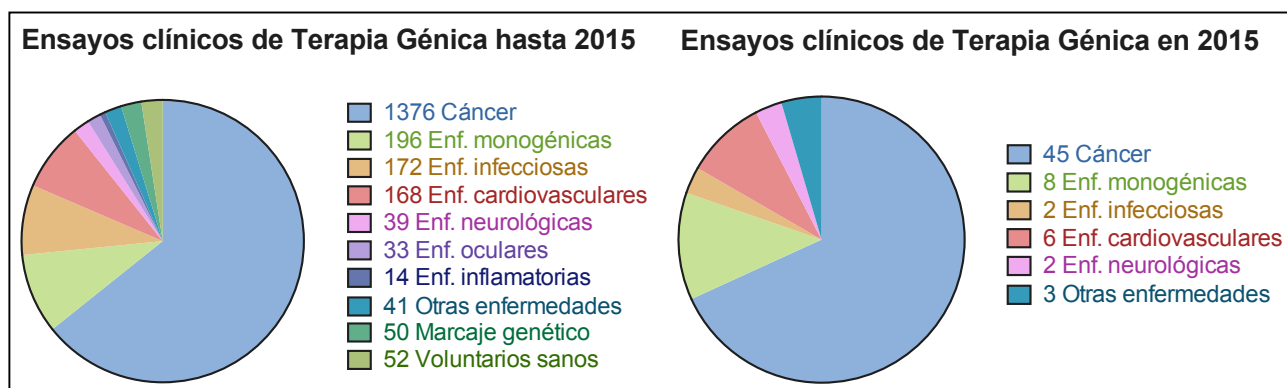


Figura 1.18. Enfermedades tratadas en ensayos clínicos de terapia génica. En los gráficos se muestra el número de ensayos clínicos llevados a cabo para el tratamiento de las principales enfermedades investigadas desde sus inicios hasta lo que llevamos de 2015 (a) y durante el año 2015 (b). Inicialmente, la mayoría de los ensayos de terapia génica se destinaban al tratamiento de enfermedades monogénicas y actualmente sigue siendo la segunda causa de estudio en los mismos. No obstante, el gran impulso que ha tenido la investigación de proyectos para el tratamiento del cáncer, éste se encuentra a la cabeza, y con diferencia en cuanto a la aplicación de ensayos clínicos de terapia génica para su tratamiento. Datos extraídos de Wiley Online Lybrary.

La aplicación de la terapia génica puede ser útil para el tratamiento de enfermedades de muy diferentes etiologías. Así, pronto se amplió su uso para el tratamiento del SIDA (Ugen et al., 1998) o, incluso, de enfermedades cardiovasculares (Esakof et al., 1999), (von der Leyen et al., 1999). Actualmente, la mayoría de proyectos de investigación de terapia génica se aplican al tratamiento del cáncer, (Zhu et al., 2014), (Prabhakar et al., 2013), (Alemany et al., 1999), (Grossardt et al., 2013).

También se investigan protocolos de terapia génica el tratamiento de enfermedades neurológicas como la Enfermedad de Parkinson (Imaoka et al., 1998), (Lu-Nguyen et al., 2014), la Enfermedad de Alzhei-

mer (Tuszynski et al., 2005) o la Enfermedad de Huntington (Stanek et al., 2014); enfermedades autoinmunes (Lu et al., 1999), (Gallichan et al., 1998), alergias y enfermedades infecciosas; o incluso enfermedades metabólicas como la diabetes (Phillips and Kay, 2014), (Gallichan et al., 1998) o las enfermedades lisosomales (Ariza et al., 2014), (Ferla et al., 2014), (Tardieu et al., 2014). Asimismo, se ha probado el desarrollo de vacunas por terapia génica (Raz et al., 1994), (Tascon et al., 1996), (Diniz et al., 2013), y la aplicación a procesos de regeneración de tejidos (Alden et al., 1999), (Homs et al., 2011) y trasplantes celulares o de tejidos alogénicos (Poston et al., 1999), (Parker et al., 2014).

3.1.2. EVOLUCIÓN DE LA TERAPIA GÉNICA. ÉXITOS Y FRACASOS

El concepto de terapia génica nació gracias al descubrimiento por parte de Avery, Macleod y McCarty de que una secuencia de DNA procedente de una cepa de Neumococo tenía la capacidad de **transformar** otra especie de Neumococo y hacerle expresar sus genes (Avery et al., 1944). Más tarde, se vio que las células de mamíferos podían también ser transformadas por un DNA exógeno (Borenfreund and Bendich, 1961), (Kay, 1961), (Szybalska and Szybalski, 1962). Además, el descubrimiento de que el papovavirus SV40 era capaz de integrar su genoma en el genoma de la célula infectada (Sambrook et al., 1968), hizo pensar que los virus podrían usarse como **vectores** para la transferencia de material genético. Así, en base a la observación de que tras la infección con el virus del papiloma de Shope se produce un aumento en la actividad arginasa (Rogers et al., 1973), Rogers et al inocularon dicho virus a tres hermanos con hiperarginemia, pero este primer y rudimentario ensayo de terapia génica falló debido a que la asunción inicial era errónea (Terheggen et al., 1975).

Con el desarrollo de las técnicas del **DNA recombinante** se abrió la posibilidad de aislar y clonar una determinada secuencia de DNA para su uso terapéutico (Maniatis et al., 1976). Además, con el desarrollo de nuevos métodos de transfección basados en buffers de calcio y fosfato (Graham and van der Eb, 1973), (Wigler et al., 1978), el grupo de Martin J. Cline consiguió transformar con éxito células de la médula espinal de ratones (Cline et al., 1980), (Mercola et al., 1980). Más tarde, Cline realizó un ensayo clínico en el que transformó células de la médula espinal de pacientes de β -talasemina con el gen de la β -globina y el de la timidina quinasa. Sin embargo, los comités responsables de aprobar y supervisar el experimento no fueron informados de que se usaría DNA recombinante y Cline fue sancionado (Wade, 1981).

Por otra parte, en aquella época ya se conocían las características de los retrovirus y pronto se convirtieron en objeto de estudio para su desarrollo como vectores eficientes para la terapia génica insertando en su genoma el gen terapéutico (Wei et al., 1981), (Tabin et al., 1982). De esta manera, el grupo de R. Michael Blaese consiguió corregir la deficiencia de la adenosina desaminasa (ADA) en células T y B en cultivo y en el primer ensayo clínico aprobado para la terapia génica en humanos. Las pacientes mostraron una cierta mejoría, sobre todo una de ellas, pero ambas continuaron necesitando la administración farmacológica de

la enzima (Blaese et al., 1995). Similares resultados se obtuvieron de un estudio muy parecido (Bordignon et al., 1995).

En 1999, los adenovirus habían ganado terreno en el campo de la terapia génica y se aprobó un ensayo clínico con un adenovirus para el tratamiento de la deficiencia de la ornitina transcarbamilasa (Raper et al., 2002). Éste fue el primer ensayo clínico de terapia génica en el que el paciente, Jesse Gelsinger, murió a causa de la terapia al provocarle una respuesta inflamatoria severa (Raper et al., 2003).

El primer ensayo clínico que consiguió tratar con éxito a los pacientes utilizó un retrovirus para restaurar la expresión del receptor de citoquina γc en pacientes con SCID-X1 (Cavazzana-Calvo et al., 2000), (Hacein-Bey-Abina et al., 2002). Sin embargo, al cabo de 3 años, dos de los pacientes desarrollaron leucemia debido a la inserción del genoma del retrovirus cerca de un oncogén, provocando su sobreexpresión (Kohn et al., 2003). Uno de los pacientes murió a causa de esta leucemia.

3.1.2.1. Terapia Génica en la actualidad

Actualmente, la mayoría (el 68,2% en lo que llevamos de 2015) de ensayos clínicos en fase I y II de terapia génica tienen como objetivo el tratamiento del cáncer, seguido por las enfermedades monogénicas (12,3%). Los ensayos clínicos para enfermedades neurológicas suponen sólo un 1% del total según los datos de la Wiley Online Lybrary. En cuanto a los vectores, los más empleados históricamente son los adenovirus (22,5%) seguidos de los retrovirus (18,8%) y las técnicas de transferencia de DNA plasmídico (17,5%). El 5,8% de ellos emplean AAVs. Sin embargo, en lo que llevamos de año de 2015, el uso de lentivirus y virus adenoasociados tiene un mayor peso en los ensayos clínicos que los años anteriores, por delante de los adenovirus y retrovirus (Figura 1.19).

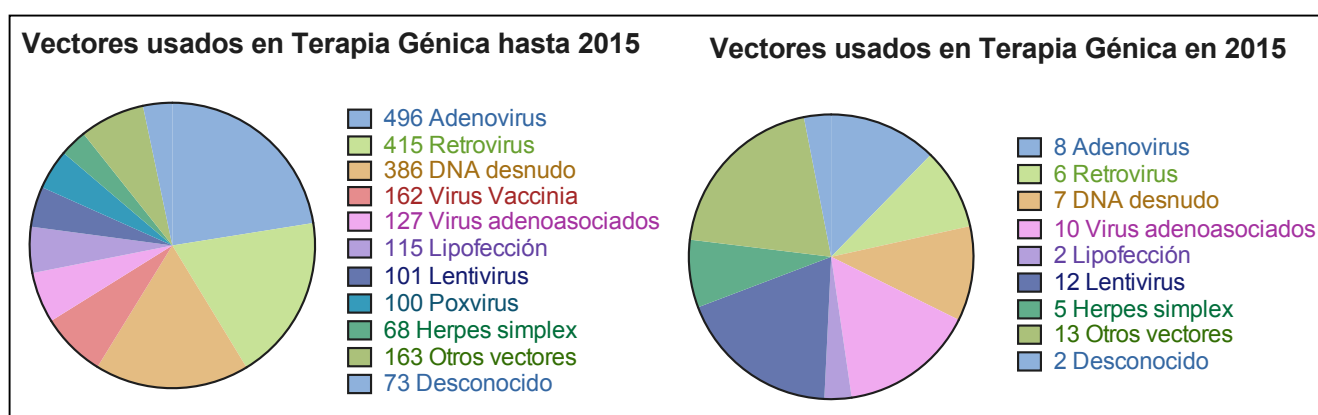


Figura 1.19. Vectores empleados en los ensayos clínicos de terapia génica. En los gráficos se representa el número de ensayos clínicos que usan cada uno de los distintos vectores disponibles para la transferencia génica desde sus inicios hasta lo que llevamos de 2015 (a) y durante el año 2015 (b). En lo que llevamos de año puede observarse un cambio de tendencia según el cual los adenovirus ya no son los más utilizados, y han cogido mucha fuerza los lentivirus y vectores adenoasociados, mientras que hasta el año pasado los adenovirus seguían siendo los vectores más utilizados en ensayos clínicos de terapia génica seguidos por los retrovirus, en el 2014 continuaban siendo el segundo tipo de vector más empleado. Datos extraídos de la Wiley Online Lybrary.

3.1.3. VECTORES PARA LA TRANSFERENCIA GÉNICA

A la hora de escoger y diseñar un vector para terapia génica se deben tener en cuenta diversos aspectos. En primer lugar, se debe buscar una transducción lo más **eficiente** posible y elegir el vector con el **tropismo** adecuado. Además, la expresión del transgén debe **mantenerse en el tiempo** para evitar la necesidad de continuas administraciones. De manera que, si las células que se desea transducir son células quiescentes, se puede optar por un vector no integrativo, pero, si por el contrario, son células que se dividen activamente, se deberá escoger un vector integrativo (con la capacidad de insertarse en el genoma de la célula diana). Por otra parte, es necesario evaluar la posible **toxicidad** tanto del vector como del transgén, y la respuesta inmune que pueden provocar. También es posible que interese tener la posibilidad de regular la expresión del transgén, por lo que se debe escoger el promotor adecuado para ello.

Actualmente, en terapia génica se emplean diferentes tipos de vectores, que se pueden clasificar en **virales y no virales**.

3.1.3.1. Vectores Virales

Existen diferentes virus que pueden actuar como vectores para la transducción génica. Entre los más usados, se encuentran los adenovirus, retrovirus y virus adenoasociados.

Los **adenovirus** (*Adenoviridae*), son una familia de virus de DNA bicatenario, sin envoltura y con una cápside formada por hexones y pentones (Figura 1.20). El primer ensayo clínico en el que se usó un adenovirus fue para el tratamiento de la fibrosis quística (Zabner et al., 1993). El serotipo más estudiado y utilizado en terapia génica es el 5, y con los avances en el diseño de estos vectores y la aparición de los adenovirus de tercera generación, su uso aumentó considerablemente entre 1994 y 1999.

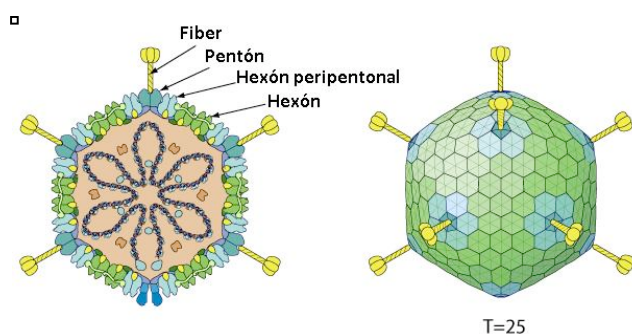


Figura 1.20. Estructura de un adenovirus. Los adenovirus no presentan envoltura y disponen de una cápside de simetría pseudo-icosaédrica (T=25), compuesta por 720 hexones y 12 pentones en los vértices, a los que se une una proteína *fiber*. Su genoma consiste en una única molécula de DNA de doble cadena que presenta unas repeticiones invertidas (ITRs) en sus extremos.

Figura adaptada de la web VlrZone (Bioinformatics Resource Portal).

El uso de adenovirus en terapia génica presenta diversas ventajas, debido a su **amplio tropismo** tanto en células en división como células quiescentes, su elevada capacidad de empaquetamiento y la facilidad para producirlos a títulos elevados. Los adenovirus de tercera generación se caracterizan por no tener ningún gen viral, por lo que toda la capacidad de empaquetamiento (36Kb) puede ser destinada al transgén. Sin embargo, para su producción es necesaria la utilización de un adenovirus helper, que puede contaminar las

preparaciones. Además, debido a que el genoma de los adenovirus no se inserta en el genoma de la célula huésped, la expresión del vector se pierde con el paso del tiempo. Otro de los problemas de los adenovirus es que son muy **inmunogénicos**.

No obstante, en la actualidad son los vectores más utilizados, pues son muy útiles en el tratamiento contra el cáncer por su capacidad de transducir células en división, en las que se puede transferir desde un gen (timidina quinasa) que aporte al tumor sensibilidad hacia un determinado fármaco (ganciclovir) (Sterman et al., 1998), hasta inmunomoduladores (Schreiber et al., 1999) o genes supresores de tumores como el p53 (Swisher et al., 1999). También se usan actualmente como **virus oncolíticos** (Alemany et al., 1999).

Por su parte, los **retrovirus** pertenecen a la familia *Retroviridae*, dentro de la cual encontramos los **lentivirus** (HIV, SIV, FIV), y se caracterizan por presentar un genoma de RNA de cadena simple. Los retrovirus sólo son capaces de transducir células en división (Miller et al., 1990), aunque los lentivirus también pueden transducir células quiescentes (Johnston et al., 1999), (Naldini et al., 1996).

Los retrovirus, junto con los adenovirus, fueron los primeros vectores utilizados en ensayos clínicos de terapia génica y, debido a su especificidad por células en división, son muy útiles en el **tratamiento del cáncer**. La sencillez de su genoma hace fácil la manipulación del mismo para generar vectores no replicativos. Los retrovirus tienen una capacidad de empaquetamiento de hasta 10kb y presentan un tropismo muy amplio. Sin embargo, el principal inconveniente es su inserción aleatoria en el genoma, pudiendo provocar la sobreexpresión de oncogenes (Hacein-Bey-Abina et al., 2002). Además, aunque son poco inmunogénicos, son rápidamente degradados por el sistema del complemento.

Las características de los virus adenoasociados se comentarán más adelante en mayor detalle.

3.1.3.2. Vectores No Virales

El uso de la transferencia génica no viral en estrategias *in vivo* no está tan extendida como el uso de los vectores virales, pero, debido a la ventaja de presentar una **baja toxicidad**, se trata de una buena alternativa dentro de la terapia génica y se han investigado diferentes estrategias para poder llevarla a cabo. No obstante, aún es necesario seguir investigando y mejorando las técnicas existentes para aumentar su eficiencia y especificidad. Además, otro de los problemas que presenta la administración génica no viral es la **alta inmunogenicidad** de las islas CpG de los plásmidos bacterianos (Krieg et al., 1995). Para evitar este problema, se ha probado el uso de plásmidos sintéticos sin secuencias CpG, que aumenta la eficiencia en la transfección al no provocar una respuesta inflamatoria severa (Hyde et al., 2008).

Principalmente, las estrategias de transferencia génica no viral se basan en **métodos mecánicos** para la administración de DNA desnudo, la utilización de complejos del DNA con **polímeros catiónicos** o la formación de **liposomas catiónicos**.

En algunos casos, es posible administrar DNA plasmídico mediante una simple inyección intramuscular (Wolff et al., 1990), cutánea (Choate and Khavari, 1997) o, incluso, por inyección hepática (Hickman et al., 1994), (Budker et al., 1996), (Zhang et al., 1997). También es posible la administración de DNA en el pulmón a través de las vías respiratorias (Meyer et al., 1995). Otras técnicas son la pistola génica, la electroporación, los ultrasonidos y la administración hidrodinámica. El problema que presenta la **pistola génica** es la poca cantidad de DNA que se puede depositar sobre las partículas de oro que utiliza la pistola y la dificultad para controlar de forma precisa la administración en un tejido concreto. En cuanto a la **electroporación**, se puede usar en piel y músculos (Magin-Lachmann et al., 2004), que son fácilmente accesibles para la colocación de los electrodos, o en órganos internos, con el inconveniente de que es necesaria una intervención quirúrgica y que la aplicación de alto voltaje provoca un daño irreversible en el tejido (Durieux et al., 2004), (Gissel and Clausen, 2001). La transferencia génica por **ultrasonidos** no es tan invasiva, pues el DNA entra en la célula por difusión simple a través de los poros creados en la membrana por los ultrasonidos (Kim et al., 1996), (Koch et al., 2000), pero su eficiencia es muy baja. En cambio, la administración **hidrodinámica** es altamente eficiente para la transfección de órganos altamente perfundidos como el hígado (Liu et al., 1999), (Zhang et al., 2004).

También se pueden usar **poliplexos** para la condensación del DNA en pequeñas partículas que facilitar la endocitosis del mismo por parte de las células, interaccionando la carga positiva de la partícula con los sitios aniónicos de la superficie celular. El polímero catiónico más estudiado y utilizado es la polietilimina (PEI), que puede presentarse en forma ramificada o lineal y con diferentes pesos moleculares. El principal problema de los polímeros catiónicos es su citotoxicidad (Fischer et al., 2003).

Por otra parte, se han desarrollado numerosos **lípidos catiónicos** capaces de unirse al DNA e introducirlo en las células (Imaoka et al., 1998). A menudo, se usa colesterol o un fosfolípido no cargado que actúe como lípido helper para la formación de los liposomas. Al mezclar el DNA con estos liposomas se forman lo **lipoplexos**, que facilitan la entrada del DNA a la célula protegiéndolo de la acción de las nucleasas (Paxinos and B.J.). Sin embargo, al igual que ocurre con los poliplexos, los lipoplexos también son tóxicos y provocan una respuesta inflamatoria en los animales tratados con ellos. En parte, esta respuesta se debe a la inmunogenicidad de las islas CpG, que se ve aumentada con el uso de lípidos catiónicos (Yew et al., 1999).

3.2. VECTORES ADENOASOCIADOS

Los virus adenoasociados (AAVs) pertenecen al género *Dependovirus* dentro de la familia *Parvoviridae*. Son virus sin envoltura y con un genoma muy simple de 4,7kb, constituido por una secuencia de **DNA monocatenario** (Mayor et al., 1969), (Rose et al., 1971), (Berns and Rose, 1970) con dos únicos marcos de lectura (Srivastava et al., 1983): **rep**, que codifica las proteínas responsables de la replicación y la integración (Hermonat et al., 1984); y **cap**, que codifica las proteínas que forman la cápside (Rose et al., 1971),

(Srivastava et al., 1983) (Figura 1.21). Además, el genoma de los AAVs se caracteriza por tener, en cada extremo, una repetición terminal invertida (ITR) de 145 nucleótidos (Koczot et al., 1973), (Fife et al., 1977), (Lusby et al., 1981), (Srivastava et al., 1983) que contiene varias secuencias palíndromicas, lo que le permite adoptar una estructura de horquilla (Lusby et al., 1980). Esta estructura está implicada en el inicio de la **replicación del DNA** (Straus et al., 1976), (Hauswirth and Berns, 1977), (Lusby et al.) y en su **integración** en el genoma de la célula (Cheung et al., 1980).

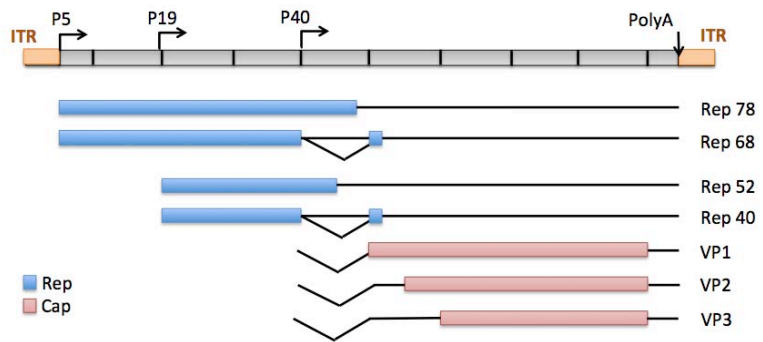


Figura 1.21. Estructura del genoma del AAV2. El genoma del AAV2 consiste en una molécula de DNA monocatenario con una ITRs en cada extremo. El gen Rep codifica las proteínas necesarias para la replicación del virus, sintetizadas a partir de marcos de lectura diferentes y por splicing alternativo. El gen Cap codifica las proteínas de la cápside.

Los AAVs no provocan enfermedades en sus huéspedes y necesitan un virus helper, que puede ser un adenovirus o un herpes virus, para poder replicarse (Casto et al., 1967), (Parks et al., 1967), (Lipps and Mayor, 1980), (Buller et al., 1981). En ausencia de un helper, el genoma del AAV se integra en el de la célula huésped y persiste como una infección latente hasta que la célula es superinfectada con un helper (Berns et al., 1975), (Cheung et al., 1980).

La sencillez de su genoma, su amplio tropismo, la capacidad de infectar tanto células en división como células quiescentes y su baja inmunogenicidad en estudios preclínicos, hacen que sean una herramienta muy útil para la transferencia génica. Así, en 1996 se realizó el primer ensayo clínico con AAVs, en el que se trató a un grupo de pacientes de fibrosis quística con un AAV2 que expresaba el gen del CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) (Flotte et al., 1996).

El principal problema de los AAVs para su uso en terapia génica es que su producción a gran escala no es fácil, ya que actualmente se producen realizando una triple transfección con: el transgén en el vector con las ITRs, un segundo plásmido que exprese los genes rep y cap, y un tercero con los genes del adenovirus para que actúen como helper (Xiao et al., 1998). Algunas de las estrategias que se han probado para el escalado de la producción de AAVs son la coinfección de un adenovirus que exprese los genes rep/cap junto con otro que exprese el transgén entre las ITRs del AAV (Zhang et al., 2001), o bien la infección de líneas celulares que expresen de forma estable los genes rep/cap, con un adenovirus que exprese el transgén entre las ITRs (Chadeuf et al., 2000), (Liu et al., 2000), (Gao et al., 2002). El inconveniente de estas estrategias es la presencia de cápsides de adenovirus en las preparaciones. También se ha probado la infección de células de insecto con baculovirus (Urabe et al., 2002), (Kohlbrenner et al., 2005), (Meghrou et al., 2005).

3.2.1. INMUNIDAD Y AAVs

En el primer ensayo clínico con AAVs en 1996 descubrieron que, en individuos que presentaban anticuerpos contra el AAV2 previamente a la administración del vector, se producía un aumento en la cantidad de estos anticuerpos de hasta 4 veces (Flotte et al., 2003). Asimismo, en otro estudio en el que utilizaban un AAV2 con el gen del factor IX en hígado para tratar la hemofilia B, también se observaba un aumento en los anticuerpos anti-AAV2 y una activación de las células T que provocaba la destrucción de los hepatocitos transducidos (Manno et al., 2006) Esto se debe a que infecciones previas con AAVs provocan la generación de células T de memoria que reconocen la cápside del AAV y que se activan frente a una **nueva exposición**, elevando la producción de anticuerpos contra el mismo por parte de las células B (Mingozzi et al., 2007). En humanos, se ha demostrado una inmunidad preexistente para la mayoría de serotipos empleados en terapia génica, especialmente AAV2 (72%) y AAV1 (67%) (Boutin et al., 2010)

Una solución es el uso de inmunosupresores, para bloquear bien la función de las células T (Adriouch et al., 2011), las células B (Sack et al., 2012) o bien la del proteasoma (Finn et al., 2010), (Karman et al., 2012). También se pueden modificar los epítopos inmunogénicos de la cápside del vector (Moskalenko et al., 2000), (Huttner et al., 2003), (Zhong et al., 2008), por mutagénesis dirigida (Wobus et al., 2000), (Lochrie et al., 2006), (Maheshri et al., 2006), (Koerber et al., 2009), (Gabriel et al., 2013), (Sen et al., 2013), mediante la inserción de péptidos o bien mediante la conjugación con PEG (Lee et al., 2005), (Le et al., 2005).

3.2.2. SEROTIPOS DE AAVS Y TROPISMO

Se define como un nuevo serotipo aquél virus que no reacciona en presencia de suero neutralizante específico para cualquiera de los otros serotipos (Wu et al., 2006). Los diferentes serotipos de AAVs conocidos hasta ahora presentan diferencias en su comportamiento, como su tropismo, capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y su inmunogenicidad.

El primer serotipo en ser clonado fue el AAV2 (Samulski et al., 1982) y, por tanto, es el más estudiado, pero cada vez se dispone de más información acerca del resto de serotipos de AAVs, que han demostrado ser más eficaces que el AAV2 para la transferencia génica en determinados tejidos (Zincarelli et al., 2008), (Boutin et al., 2010). De manera que, en investigación, a menudo se emplean vectores con el genoma de AAV2 pero pseudotipados con las cápsides de otros serotipos (Craig et al., 2009).

Para la transferencia génica en hígado, tanto en modelos caninos (Wang et al., 2005a), (Sarkar et al., 2006) como en primates (Nathwani et al., 2006), (Gao et al., 2006), (Nathwani et al.) el serotipo AAV8 ha demostrado una buena eficiencia. Una de las ventajas que presenta el uso de AAV8 es que es uno de los serotipos con una menor prevalencia de anticuerpos neutralizantes en humanos (Calcedo et al., 2009),

(Boutin et al., 2010), (Li et al., 2012). Este serotipo también se ha empleado para la transferencia génica por administración subretinal en modelos caninos (Stieger et al., 2008) y ha demostrado ser más eficiente que el AAV2 (Vandenberghe et al., 2011), con el que en 2009 se realizó un importante estudio clínico en pacientes con la amaurosis congénita de Leber. Los pacientes conseguían una notable mejora de la función de la retina, recuperando parte de su capacidad visual (Maguire et al., 2009). Los serotipos AAV1, AAV5 y AAV4 presentan una eficiencia similar a las del AAV2 para la transferencia subretinal (Acland et al., 2005), (Le Meur et al., 2007).

Por otra parte, para transducir músculo cardíaco o esquelético se ha demostrado una mayor eficiencia de AAV1 (Kawase et al., 2008), (Hadri et al., 2010), (Hajjar et al., 2008), (Qiao et al., 2009), (Toromanoff et al., 2008), (Toromanoff et al., 2010) y AAV6 (Raake et al., 2008), (Bish et al., 2011), (White et al., 2011), (Kota et al., 2009), (Wang et al., 2007), así como AAV9 (Pacak et al., 2006), (Pleger et al., 2011), aunque en menor medida (Gao et al., 2011). AAV1 y AAV6 también transducen eficientemente el pulmón (Flotte et al., 2010), (Halbert et al., 2010).

En cuanto a la transferencia génica en **CNS**, los serotipos con una mayor eficiencia son AAV5 (Dodiya et al., 2010), (Colle et al., 2010), (Markakis et al., 2010), AAV9 (Foust et al., 2009), (Gray et al., 2011), (Bevan et al., 2011) y AAVrh10 (Sondhi et al., 2007), (Zhang et al., 2011a).

3.2.3. USO DE AAVS PARA TERAPIA GÉNICA EN CNS

La transferencia génica en CNS se puede llevar a cabo a través de dos estrategias diferentes. La primera consiste en la administración directa a un área específica del CNS, útil en los casos en los que la enfermedad diana provoque una afectación bien localizada en dicha área. Sin embargo, en algunos casos son numerosas las zonas del CNS que se encuentran afectadas, para lo cual es necesaria una estrategia más general, como es la administración al líquido cefalorraquídeo (CSF) o incluso la administración sistémica por vía intravenosa. En este caso, es necesario que el vector sea **capaz de atravesar la BBB**, y algunos serotipos de AAVs como el AAV9 y el AAVrh10 han demostrado esta capacidad (Zhang et al., 2011a). Otros serotipos como el AAV1, AAV6 y AAV7 también son capaces de transducir algunas áreas cerebrales tras una inyección sistémica, pero ésta se observa principalmente en los plexos coroideos y los órganos circunventriculares, lo que parece indicar que la entrada de estos vectores al CNS se realiza a través de estas estructuras más que a través de la BBB (Zhang et al., 2011a).

En cuanto a la eficiencia de los diferentes serotipos para **transducir neuronas**, se han probado diferentes promotores y cassettes de expresión en AAV2 para conseguir una expresión eficiente del transgén en neuronas (Kugler et al., 2003), incluso se han empleado combinaciones de mutaciones de la cápside para aumentar su tropismo neuronal (Xu et al., 2005), pero el AAV2 ha demostrado una baja eficiencia de transducción de neuronas in vitro en comparación con otros serotipos, como el AAV1, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 y

AAV9 (Howard et al., 2008), (Royo et al., 2008). En ensayos *in vivo*, los serotipos más eficientes son el **AAV9** y **AAVrh10** (Cearley and Wolfe, 2006), (Klein et al., 2008).

4. MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LA AD

4.1. MODELOS NATURALES

En estudios bioquímicos como el análisis de expresión y procesamiento de APP, es frecuente el uso de roedores no transgénicos, principalmente rata y ratón (Sola et al., 1993), (Sarasa et al., 2000). Este tipo de estudios ha permitido el descubrimiento de algunas de las funciones fisiológicas de APP (Wang et al., 2005b), (Anliker and Muller, 2006), (Koo, 2002), su papel en el desarrollo embrionario (Sarasa et al., 2000) y los efectos de la acumulación de A β (Gonzalo-Ruiz et al., 2003) o de la inyección intracerebral del mismo (Gonzalo-Ruiz et al., 2005). Sin embargo, la principal limitación de los modelos de ratón y rata es que la secuencia del péptido A β en estos modelos es muy diferente al humano (Du et al., 2007) y, en este sentido, es preferible el uso de cobayas o conejos, donde el procesamiento de APP y la secuencia de A β son idénticos a los humanos (Beck et al., 2003), (Johnstone et al., 1991). Sin embargo, de forma natural ninguno de estos modelos desarrolla una neuropatología similar a la presente en la AD, excepto en el caso de los conejos alimentados con una dieta rica en colesterol y cobre (Sparks and Schreurs, 2003).

Son pocas las especies animales que presentan, de forma natural, una patología neuronal asociada a la edad como la descrita en los pacientes de AD. Algunas de estas especies son los perros (Cummings et al., 1996b), (Head et al., 2002), (Opii et al., 2008), los primates (Gearing et al., 1997), (Schultz et al., 2000), (Lemere et al., 2008), y los cetáceos (Sarasa, 2006).

El uso de perros está muy extendido en estudios neurológicos y de comportamiento, así como en estudios preclínicos de diferentes fármacos para la mejora de los déficits cognitivos asociados a la edad (Siwak et al., 2000), (Milgram et al., 2002), (Siwak et al., 2005), (Landsberg, 2005), (Araujo et al., 2005), (Head, 2007). Los perros desarrollan, con la edad, problemas de aprendizaje y memoria (Head et al., 1995), (Siwak et al., 2001), (Tapp et al., 2003) relacionados con la acumulación de A β en cerebro (Cummings et al., 1996a), (Head et al., 1998), (Head et al., 2000), (Pugliese et al., 2006), (Rofina et al., 2006). Además, como ocurre en humanos, la patología amiloide no es una consecuencia del envejecimiento normal, sino que se desarrolla en determinados individuos y no en otros en función de ciertos factores genéticos y/o exógenos que determi-

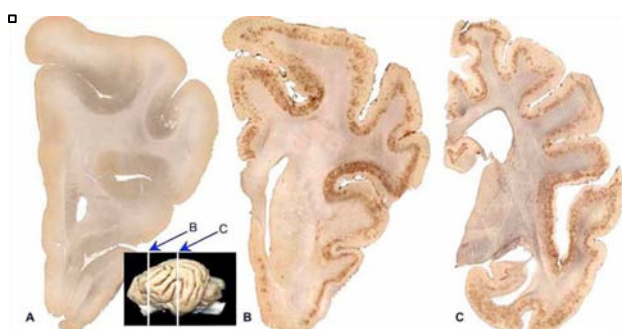


Figura 1.22. Patología amiloide en perros. Con la edad, los perros pueden desarrollar una patología amiloide similar a la observada en pacientes de AD. Así, un perro pequinés de 13 años (A) no presenta depósitos A β , pero otro individuo de la misma raza sí presenta extensos depósitos de A β a los 20 años (B, C).

Figura adaptada de (Sarasa and Pesini).

nan la susceptibilidad del individuo a sufrir la enfermedad (Russell et al., 1992), (Wegiel et al., 1996). Sin embargo, a pesar de presentar acumulación de A β y placas difusas, así como la hiperfosforilación de tau (Papaioannou et al., 2001), no se ha observado la formación de placas neuríticas ni de ovillos neurofibrilares en perros (Wisniewski et al., 1996), (Wegiel et al., 1998), (Pugliese et al., 2006) (Figura 1.22).

Algunos primates, en cambio, sí que presentan una patología de la proteína tau similar a la de la AD (Gearing et al., 1997), (Schultz et al.) pero su alto coste, sus requerimientos nutricionales y espaciales, así como los problemas éticos relacionados con la investigación con primates hacen que los roedores sigan siendo la opción más frecuente en los laboratorios, y en el caso de la investigación de la AD se hace necesaria la creación de modelos transgénicos.

4.2. MODELOS TRANSGÉNICOS

Existen numerosos modelos transgénicos que intentan reproducir las características de la AD, pero ninguno consigue mimetizar todas las anormalidades cognitivas, de comportamiento, bioquímicas e histopatológicas observadas en los pacientes de AD. Algunos de ellos se basan en la sobreexpresión del gen de la APP, otros sobreexpresan la proteína Tau humana WT o la mutada, otros, diferentes secretasas, especialmente la presenilina humana mutada. Dentro de los modelos APP, algunos sobreexpresan la APP endógena, mientras que otros expresan la APP humana, bien la forma WT o la mutada. La mutación más habitual para la APP es la “Swedish”, presente en familias suecas con FAD, pero también existen modelos con diferentes mutaciones sintéticas de la APP (Figura 1.23).

Por otra parte, algunos modelos combinan dos o más de estas mutaciones, aumentando las neuropatologías asociadas. Uno de estos modelos es el triple transgénico, que expresa los transgenes humanos PS1_{M146V}, APP_{Swe} y Tau P_{301L}. Se trata de un modelo que reproduce de forma muy cercana la patología humana asociada a la AD. A continuación se describirán las características que presenta este modelo.

4.2.1. MODELO 3xTgAD

Este modelo fue generado por Oddo et al. en 2003 en el laboratorio de Frank M. LaFerla mediante la microinyección de los transgenes APP_{Swe} y Tau P_{301L} en un embrión unicelular de un ratón knockin de PS1_{M146V} (Oddo et al., 2003b).

4.2.1.1. Marcadores Neuropatológicos

La caracterización neuropatológica que realiza el grupo de LaFerla del modelo 3xTgAD indica que se trata del primer modelo transgénico que desarrolla tanto placas como ovillos neurofibrilares en zonas cerebrales con relevancia en el desarrollo de la AD. El primer signo neuropatológico que se puede observar en

este modelo es la acumulación intraneuronal de A β , inicialmente en regiones neocorticales alrededor de los 3 y 4 meses de edad y posteriormente en neuronas piramidales de la CA1, a los 6 meses de edad.

Los depósitos extracelulares de A β también se producen en las etapas iniciales, previamente a la aparición de ovillos neurofibrilares. Así, a los 6 meses de edad ya se puede observar placa difusa en el córtex y a los 12 son ya evidentes los depósitos de placas amiloides tanto en córtex como en hipocampo (Oddo et al., 2003b), (Oddo et al., 2003a). En cuanto a la aparición de los ovillos neurofibrilares, no comienza hasta los 12 meses de edad del animal (Oddo et al., 2003b), (Oddo et al., 2003a).

Por otra parte, a los 6 meses de edad, los ratones 3xTgAD presentan disfunción sináptica y un LTP hipocampal reducido, y, debido a que a esa edad el único marcador neuropatológico presente es la acumulación A β intraneuronal, Oddo et al. atribuyeron a dicha acumulación las alteraciones sinápticas y del LTP de este modelo. Consiguieron demostrar esta idea al observar que en un modelo 2xTgAD en el que no se introduce el gen APPSwe, como era de esperar no existe acumulación intraneuronal de A β , y tampoco se observa una alteración en el LTP hipocampal (Oddo et al., 2003a).

4.2.1.2. Características Conductuales

Como ocurre en pacientes de AD, los ratones 3xTgAD no sólo sufren problemas de memoria, sino que también presentan alteraciones de la conducta en otros aspectos, como cambios en los ritmos circadianos. Así, los pacientes de AD tienden a presentar problemas de sueño durante la noche y son propensos a dormir durante el día (Ancoli-Israel et al., 1989). En el caso de los ratones, que son animales nocturnos, se observa una situación análoga, reduciéndose el ratio de actividad nocturna/diurna en ratones 3xTgAD en comparación con animales WT (Sterniczuk et al., 2010a).

También es habitual en pacientes de AD síntomas neuropsiquiátricos como la ansiedad y la depresión. En los ratones 3xTgAD, se observa, asimismo, una mayor emocionalidad (agresividad, ansiedad) (Gimenez-Llort et al., 2007) y se ha determinado, a través de pruebas como el *Open Field*, el *Elevated Plus Maze* y el *Passive Avoidance Tasks*, que estos ratones presentan un mayor nivel de ansiedad, un umbral de miedo menor y neofobia (Gimenez-Llort et al., 2007), (Sterniczuk et al., 2010b). Así, en la prueba del *Open Field* suelen pasar más tiempo en el centro que los WT debido a un mayor periodo de “freezing” inicial, durante el cual no presentan un comportamiento exploratorio (Sterniczuk et al., 2010b). Además, de forma natural, los animales no transgénicos reducen su actividad horizontal en el *Open Field* con la edad. Esta reducción es aún más acusada en los ratones 3xTgAD (Gimenez-Llort et al., 2007), especialmente entre los 2,5 y los 6 meses, cuando tiene lugar el inicio de los primeros cambios neuropatológicos, como la acumulación intraneuronal de A β .

La prueba por antonomasia para analizar los déficits de memoria en roedores es el *Morris Water Maze*, en el que los animales 3xTgAD muestran una alteración en la capacidad de aprendizaje y de retención

que empeora con la edad de manera más pronunciada que en la que lo hacen animales no transgénicos (Gimenez-Llort et al., 2007).

4.2.1.3. Características Neuroendocrinas

Giménez-Llort et al. también han analizado las diferencias que presentan los animales 3xTgAD en comparación a los animales WT en lo que respecta a su estado inmunoendocrino. Así, encuentran que los animales 3xTgAD, especialmente las hembras, presentan una menor tolerancia a la glucosa que las hembras WT (Gimenez-Llort et al.), lo que se relaciona con los resultados de los estudios que demuestran que los pacientes de AD presentan una mayor resistencia a la insulina.

II. OBJETIVOS

La enfermedad de Alzheimer (AD) es la principal causa de demencia y se caracteriza por un deterioro progresivo de la memoria y de las capacidades cognitivas del paciente. Se trata de una enfermedad multifactorial y actualmente no existe un tratamiento satisfactorio de la misma.

Actualmente, muchos estudios apuntan a la relación entre diabetes y AD, debido a la alta proporción de pacientes que presentan ambas enfermedades de forma simultánea y se ha demostrado la eficacia de la insulina en mejorar la memoria tanto en personas sanas como en pacientes de AD, así como el papel neurotrófico de la insulina, IGF1 y GLP1.

Así pues, nos planteamos estudiar esta relación entre ambas enfermedades en el modelo 3xTgAD. Para ello, diseñamos los siguientes objetivos:

1. Analizar en nuestro modelo los niveles de expresión de diferentes elementos de la vía de señalización de la insulina, como los receptores de Insulina, IGF1 y GLP1, así como el sustrato del receptor de la insulina (IRS-2) y relacionarlos con el estado histopatológico del animal en diferentes momentos de la enfermedad.
2. Diseñar un shRNA eficiente para el silenciamiento de la vía de la insulina y probar su efecto en el desarrollo de la histopatología de la AD en el modelo murino 3xTgAD.
3. Generar vectores virales con los genes terapéuticos y analizar los efectos de la sobreexpresión de los genes diana sobre la memoria y otros síntomas neuropsiquiátricos y neurológicos de la demencia en el modelo 3xTgAD.

III.RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN A NIVEL MOLECULAR DE LA VÍA DE LA INSULINA EN EL MODELO 3xTgAD

1.1. Estudio de los niveles de IR, IGF1R, GLP1R e IRS2 en el modelo 3xTgAD y animales WT de 6 meses.

Diferentes estudios han demostrado una alteración en la cantidad y distribución de IR e IGF-1R en cerebros de pacientes de AD (Frolich et al.), (Moloney et al.), al compararlos con pacientes sanos. Esta alteración correlaciona con el grado de afectación del paciente, pero no se sabe si es una de las causas del avance de la enfermedad, o se trata de una consecuencia de todo el proceso neurodegenerativo.

De manera que, para comenzar el estudio de caracterización del modelo 3xTgAD, se analizaron los niveles de IR, IGF-1R, GLP-1R e IRS-2 a 6 meses. A esta edad, los animales 3xTgAD aún no presentan depósitos de placas amiloides, por lo que se correspondería con la etapa de AD prodromal, en la que aún no existen síntomas significativos. Así se buscaba evitar el efecto de los procesos neurodegenerativos sobre la expresión de los receptores analizados.

Debido a que los estudios realizados en pacientes indican no sólo una alteración en la cantidad de IR e IGF1R, sino también un cambio en su distribución entre las distintas áreas cerebrales, para nuestro análisis diseccionamos el cerebro de los ratones en 7 áreas diferentes: bulbo olfatorio, córtex prefrontal, córtex motor, córtex entorrino, cerebelo, hipocampo e hipotálamo, utilizando la parte correspondiente a uno de los hemisferios y guardando la otra para estudios posteriores.

De las cuatro proteínas analizadas, IR es la que mantiene unos niveles más estables entre las diferentes áreas, y no se observan diferencias significativas al comparar muestras de animales 3xTgAD con muestras de animales WT (Figura 3.1). En cambio, los niveles de IGF-1R en muestras de animales 3xTgAD se reducen significativamente en cerebelo, mientras que parecen tener una tendencia a aumentar en hipotálamo, aunque sin significación estadística. Esta reducción de IGF-1R en cerebelo se correlaciona una bajada similar de los niveles de IRS-2 en la misma zona en los animales 3xTgAD en comparación con animales WT. En cuanto a los niveles de GLP-1R, bajan en hipocampo e hipotálamo de animales 3xTgAD, pero, debido a la alta variabilidad entre individuos, estas diferencias no son estadísticamente significativas.

Por tanto, de estos resultados se puede extraer que en la etapa prodromal del modelo 3xTgAD no se observa una alteración importante en los niveles de IR, IGF-1R, GLP-1R e IRS-2 que pueda actuar como detonante en el desarrollo de los síntomas de la AD. No obstante, sí que se puede observar una incipiente alteración de los niveles de algunos receptores, que comienza especialmente en cerebelo.

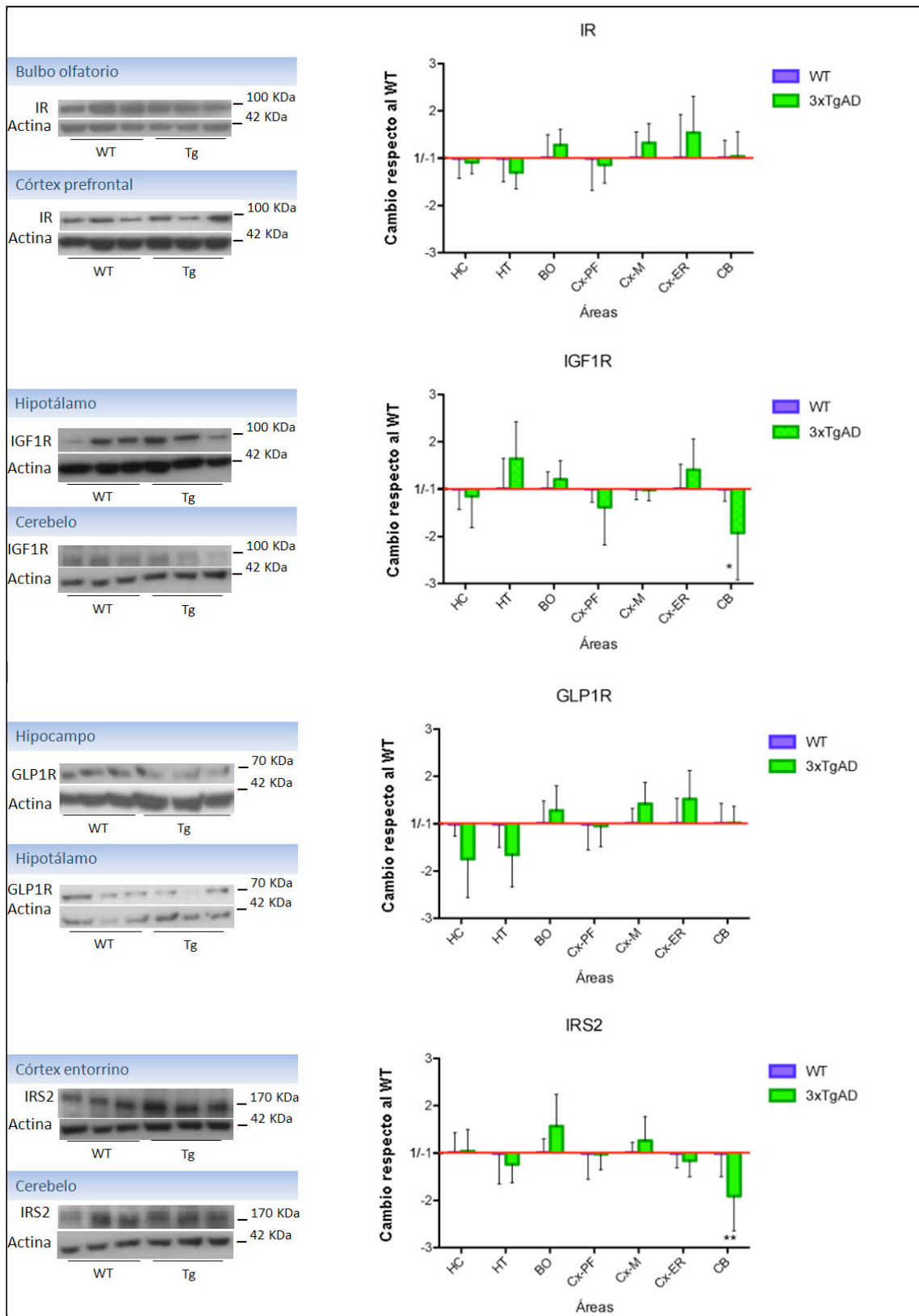


Figura 3.23. Reducción en los niveles de IGF-1R e IRS-2 en el cerebelo de animales 3xTgAD de 6 meses. Western-blot de IR, IGF-1R, GLP-1R, IRS-2 y Actina como proteína de referencia, de diferentes áreas de cerebro de animales 3xTgAD (n=11) y WT (n=10) de 6 meses de edad. En los gráficos se representa la proporción entre los niveles de las diferentes proteínas analizadas, normalizados respecto a los niveles de la actina, encontrados en los animales 3xTgAD y los de los animales WT (representados como una proporción de 1). Las únicas diferencias significativas se encuentran en cerebelo (T-student, * p<0,05, ** p<0,01). A modo de ejemplo, se muestran algunos de los westerns realizados.

Así pues, el siguiente paso era analizar los niveles de estos receptores a edades más avanzadas. Ya que los datos más concluyentes de estudios similares realizados en pacientes de AD se obtienen al analizar los niveles de expresión a nivel de mRNA, se analizaron los niveles de mRNA de IR, IGF-1R, GLP-1R e IRS-2 por PCR cuantitativa.

1.2. Estudio de los niveles de expresión de los receptores a nivel de mRNA en animales

3xTgAD y WT a 6, 9 y 12 meses.

Se utilizaron muestras de los mismos animales WT y 3xTgAD de 6 meses empleados en el apartado anterior, recuperando la sección del otro hemisferio que habíamos reservado. Además, para determinar si existe una correlación entre los niveles de expresión y el avance de la enfermedad, se emplearon animales 3xTgAD de 9 y 12 meses, y sus correspondientes controles WT de la misma edad. A los 12 meses de edad, el modelo 3xTgAD ya presenta depósitos amiloides en córtex e hipocampo (Oddo et al., 2003b), (Oddo et al., 2003a) y los déficits cognitivos son también evidentes, por lo que es un punto representativo de un estado en el que tanto la patología neurohistológica como sintomatológica ya está bien establecida. Las muestras de animales de 9 meses se toman como un punto intermedio entre la etapa prodromal y la etapa patológica, y es un momento en el que puede haber placa difusa y algunos síntomas de déficits cognitivos.

Con los animales de 9 y 12 meses, procedimos de igual forma que con los de 6 meses, diseccionamos el cerebro en las mismas 7 áreas y utilizamos la parte de uno de los hemisferios de cada una, conservando la sección del otro hemisferio para futuros análisis.

Así pues, llevamos a cabo la extracción de mRNA de las distintas muestras, seguida de una retro-transcripción para sintetizar el DNA copia (cDNA) que nos sirvió de molde para realizar una PCR cuantitativa. Cada gen se analizó en PCRs independientes, incluyendo una PCR adicional para analizar la expresión de la actina como referencia. Esto nos permitió observar que, para un determinado gen, el valor de Cq, normalizados respecto a la Cq de la actina, varía con la edad del animal (Figura 3.2). Esto ocurre tanto en animales 3xTgAD como en animales WT. Para analizar la evolución temporal en cada grupo de muestras, tomamos como referencia el punto de 6 meses y calculamos la proporción del cambio en la expresión a 9 y 12 meses respecto a este valor. Estos valores se representan en los gráficos de la figura 3.2.

Las diferencias más significativas indican que la expresión de los genes estudiados tiende a aumentar con la edad en algunas de las áreas, y este aumento es ligeramente mayor en los animales 3xTgAD que en los animales WT. La excepción en este perfil general la encontramos en hipotálamo, donde la expresión de IR, IGF-1R y GLP-1R desciende en los animales WT con la edad, mientras que en los animales 3xTgAD se mantiene constante.

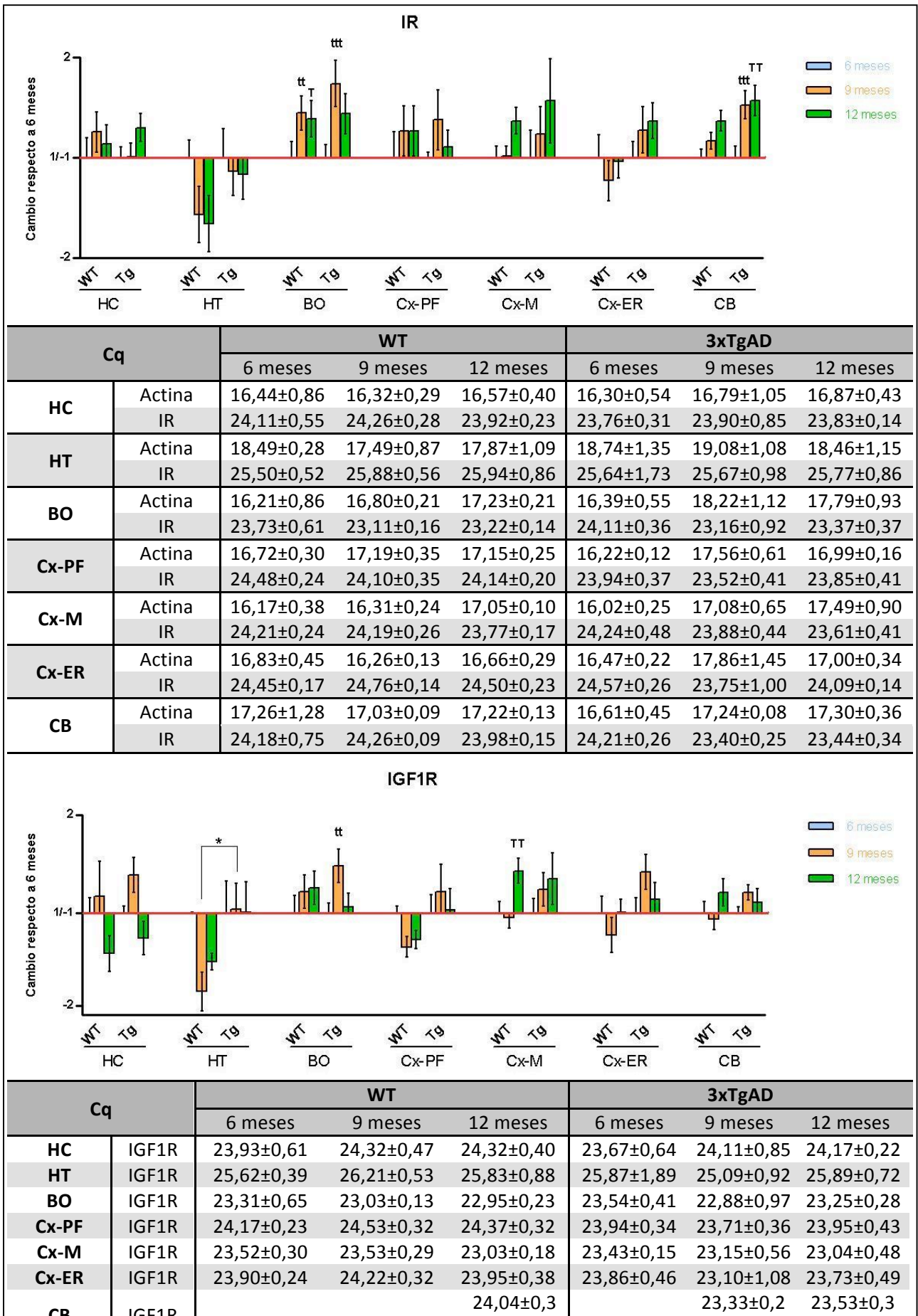


Figura 3.2, continúa en la siguiente página

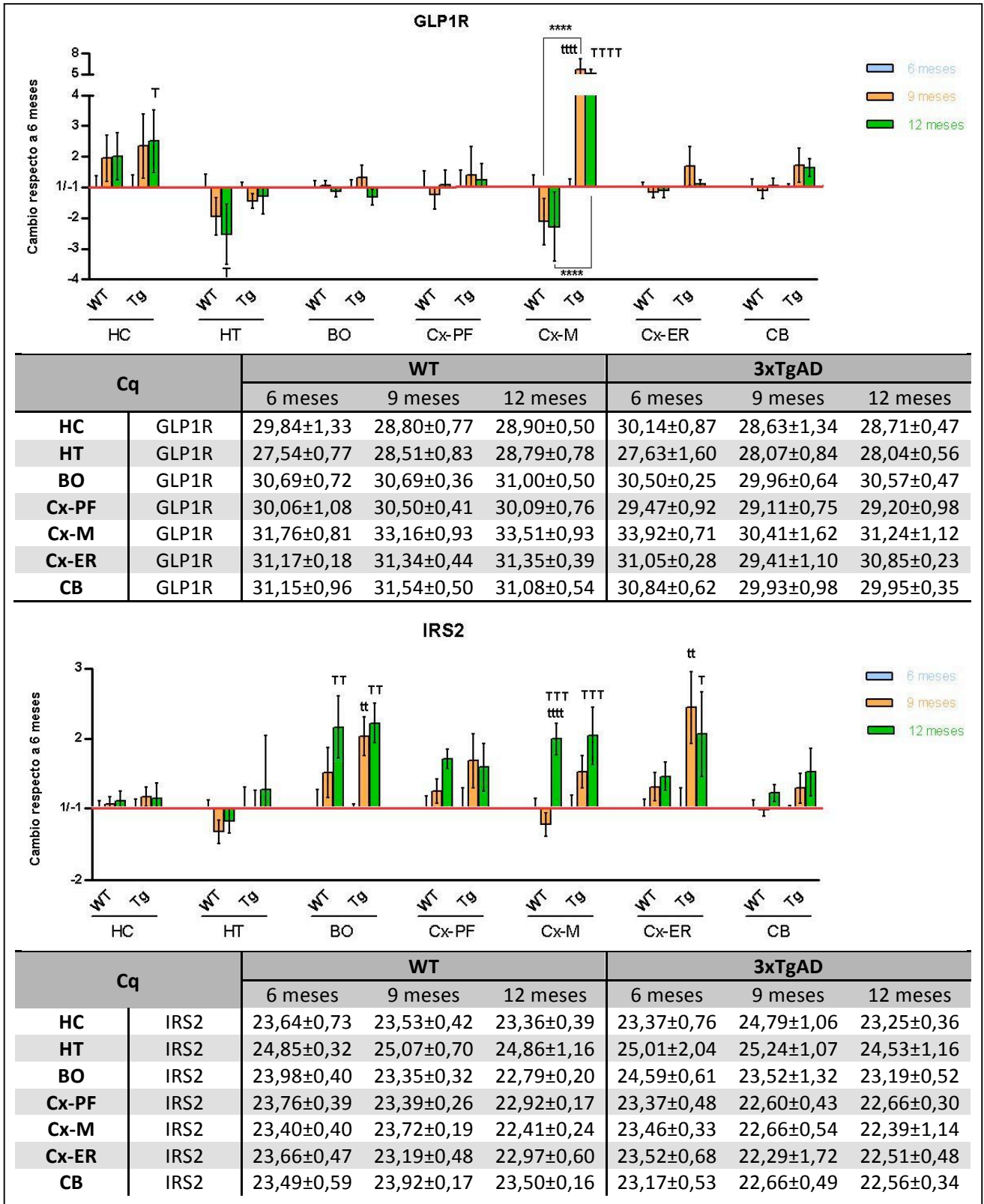


Figura 3.2. La expresión de IR, IGF-1R, GLP-1R e IRS-2 cambia con la edad en diferentes áreas cerebrales en animales 3xTgAD y WT. PCR cuantitativa de IR, IGF-1R, GLP-1R e IRS-2 de diferentes áreas de cerebro de animales WT de 6 (n=4), 9 (n=6) y 12 meses (n=7), y 3xTgAD de las mismas edades (n=4, n=7 y n=7 respectivamente). En los gráficos se representa la ratio entre la expresión del gen diana a 9 y 12 meses y la expresión encontrada a 6 meses de edad (representada como una ratio de 1), Existen diferencias significativas en diferentes áreas (ANOVA de una vía, t, T: p<0,05 respecto a la edad inmediatamente anterior o respecto a 6 meses respectivamente, tt, TT: p<0,01, ttt, TTT: p<0,001, tttt, TTTT: p<0,0001). Todos los valores están normalizados respecto a la expresión de la actina en la misma área. En las tablas se anotan los valores normalizados de Cq en cada caso, expresados como el valor de la media ± la desviación estándar.

También se puede observar que el cambio en la expresión se produce entre los 6 y los 9 meses, ya que las diferencias entre los niveles encontrados a 9 y a 12 no son tan significativas y el incremento en los niveles de expresión es más acusado en el caso del IRS-2. Además, curiosamente, en las áreas implicadas en el procesamiento de la memoria y el comportamiento (hipocampo y córtex prefrontal) la expresión no experimenta el incremento que se observa en el resto de áreas analizadas.

Por otra parte, al comparar para cada edad la expresión de cada gen de los animales 3xTgAD con la de los animales WT, las diferencias son menores que por el efecto de la edad, pero el patrón es similar (Figura 3.3). Así, por ejemplo, en el caso del hipotálamo, donde se observa un descenso en la expresión de IGF-1R entre los 6 y los 9 meses de edad en los animales WT, en los 3xTgAD, no se produce este cambio. En cambio, al comparar la expresión entre animales 3xTgAD y WT para cada edad, se comprueba que a 6 meses no existen diferencias significativas para la expresión de IGF-1R, y a 9 meses la expresión es mayor en los animales 3xTgAD en comparación con la de los WT. Asimismo, todas las diferencias estadísticamente significativas que encontramos entre los niveles de expresión de 3xTgAD y WT corresponden a la edad de 9 meses.

Un caso particular es el de GLP-1R, cuyos niveles de expresión se encuentran en nuestro límite de detección y, por tanto, es difícil calcular los cambios con exactitud, pero sí que se observa que el hipotálamo es la zona donde más se expresa y que existe una tendencia, que se mantiene en las otras áreas analizadas, a aumentar su expresión en animales 3xTgAD de 9 meses.

Todo ello nos hizo pensar que quizá la expresión de estos genes se incrementa como un mecanismo de compensación y que éste se desencadena entre los 6 y los 9 meses de los animales 3xTgAD. Ahora bien, las causas que pueden desencadenar este mecanismo de compensación pueden ser muy diversas. Así, DeFelice et al. publicaron en 2009 un estudio en el que demostraban que los ADDLs inducen la internalización de los IRs desde la superficie de la membrana neuronal. Además, Xie et al. habían demostrado en 2002 que los ADDLs compiten con la insulina por su unión al IR. Es decir, la acumulación de ADDLs a 9 meses podría provocar tanto una reducción en la cantidad de receptores disponibles en las membranas de las neuronas como una reducción en la activación de los receptores que quedan, al impedir la unión de la insulina. Para comprobar esto, nos propusimos estudiar los niveles de IGF-1R a nivel proteico y su fosforilación (activación) en las muestras de animales de 9 y 12 meses.

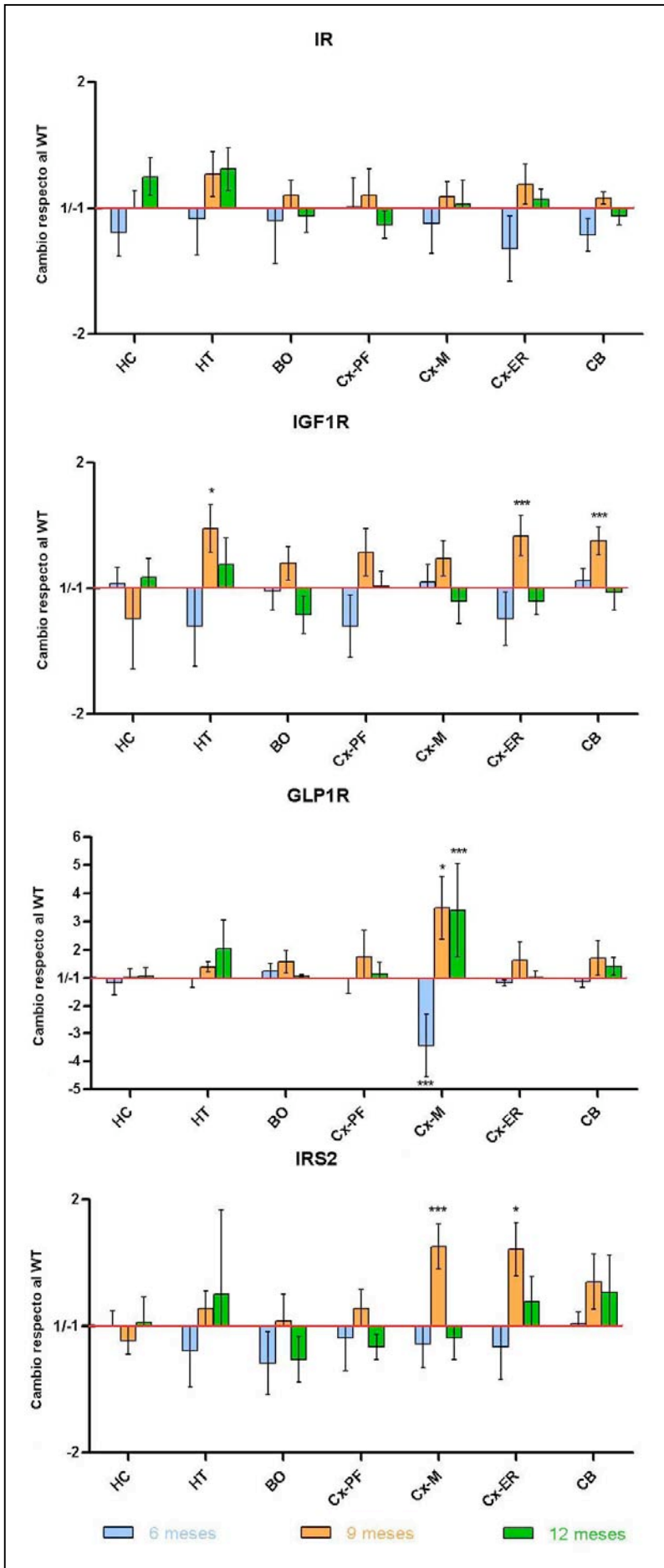


Figura 3.3. Análisis de la expresión de IR, IGF-1R, GLP-1R e IRS-2 en diferentes áreas cerebrales de animales 3xTgAD de 6, 9 y 12 meses de edad. Resultados de la PCR cuantitativa al calcular, para cada edad, la proporción entre la expresión de los animales 3xTgAD y la de los animales WT. Las principales diferencias se observan a 9 meses (T-student, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001),

1.3. Estudio de los niveles de IGF-1R total y activado (fosforilado) a 9 y 12 meses de animales 3xTgAD y WT.

Con el objetivo de comprobar nuestra hipótesis de que el aumento en la expresión de IGF-1R a nivel de mRNA es una respuesta compensatoria a una reducción del IGF-1R a nivel proteico, o bien a una reducción en su activación, o a una suma de las dos causas, se analizaron los niveles de IGF-1R total y fosforilado (activado) en las muestras de 9 y 12 meses de animales 3xTgAD y WT. En este caso se descarta analizar las muestras a 6 meses, puesto que en el primer experimento ya no observamos cambios significativos en los niveles de IGF-1R total excepto en el cerebelo.

Así, observamos que los niveles de IGF-1R fosforilado (normalizado respecto a la actina), se encuentran reducidos en casi todas las áreas de cerebro de los animales 3xTgAD al compararlas con los niveles en animales WT, excepto en córtex entorrino, donde los niveles aumentan en animales 3xTgAD (Figura 3.4). La reducción en IGF-1R fosforilado es especialmente significativa en cerebelo, mientras que en el resto de áreas la elevada variabilidad hace que los resultados no sean estadísticamente significativos.

A continuación, para determinar si esta reducción en los niveles de IGF-1R fosforilado se debe a una reducción general en los niveles de IGF-1R total, o a una reducción específica de su activación, se llevó a cabo un *stripping* para deshibridar el anticuerpo y se realizó la inmunodetección del IGF-1R total. Esto nos permitió comprobar que, a 9 y 12 meses de edad, los niveles de IGF-1R total se reducen significativamente en los animales 3xTgAD en comparación con los niveles del mismo en los animales WT, especialmente en hipocampo, hipotálamo y córtex motor. Además, también existen diferencias en función de la edad en estas zonas, de manera que en hipocampo y córtex motor la afectación es mayor a 12 meses, mientras que en hipotálamo, las mayores diferencias se encuentran a 9 meses. Por otra parte, al igual que a nivel de mRNA encontrábamos que en córtex entorrino y cerebelo los animales 3xTgAD presentan un aumento en la expresión de IGF-1R, ocurre lo mismo a nivel de proteína.

Es decir, en animales 3xTgAD de 12 meses de edad, la expresión de IGF-1R a nivel de mRNA en hipocampo es similar a la de animales WT (Figura 3.3), pero los niveles de IGF-1R total se encuentran significativamente reducidos (Figura 3.4. a). Además, a pesar de que la proporción de IGF-1R que se encuentra fosforilada, dentro de los niveles totales, aumenta en los animales 3xTgAD (Figura 3.4. b), esto no es suficiente como para normalizar la cantidad global de IGF-1R fosforilado respecto a los niveles de los animales WT. Así, en hipocampo y córtex prefrontal se observa una reducción de casi el 50% en los niveles de IGF1R fosforilado en los animales 3xTgAD de nueve meses en comparación con los WT que se mantiene a 12 meses. Aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas, a nivel fisiológico, una reducción de entre el 30 y el 50% puede tener consecuencias en el funcionamiento general del cerebro (Figura 3.4. c).

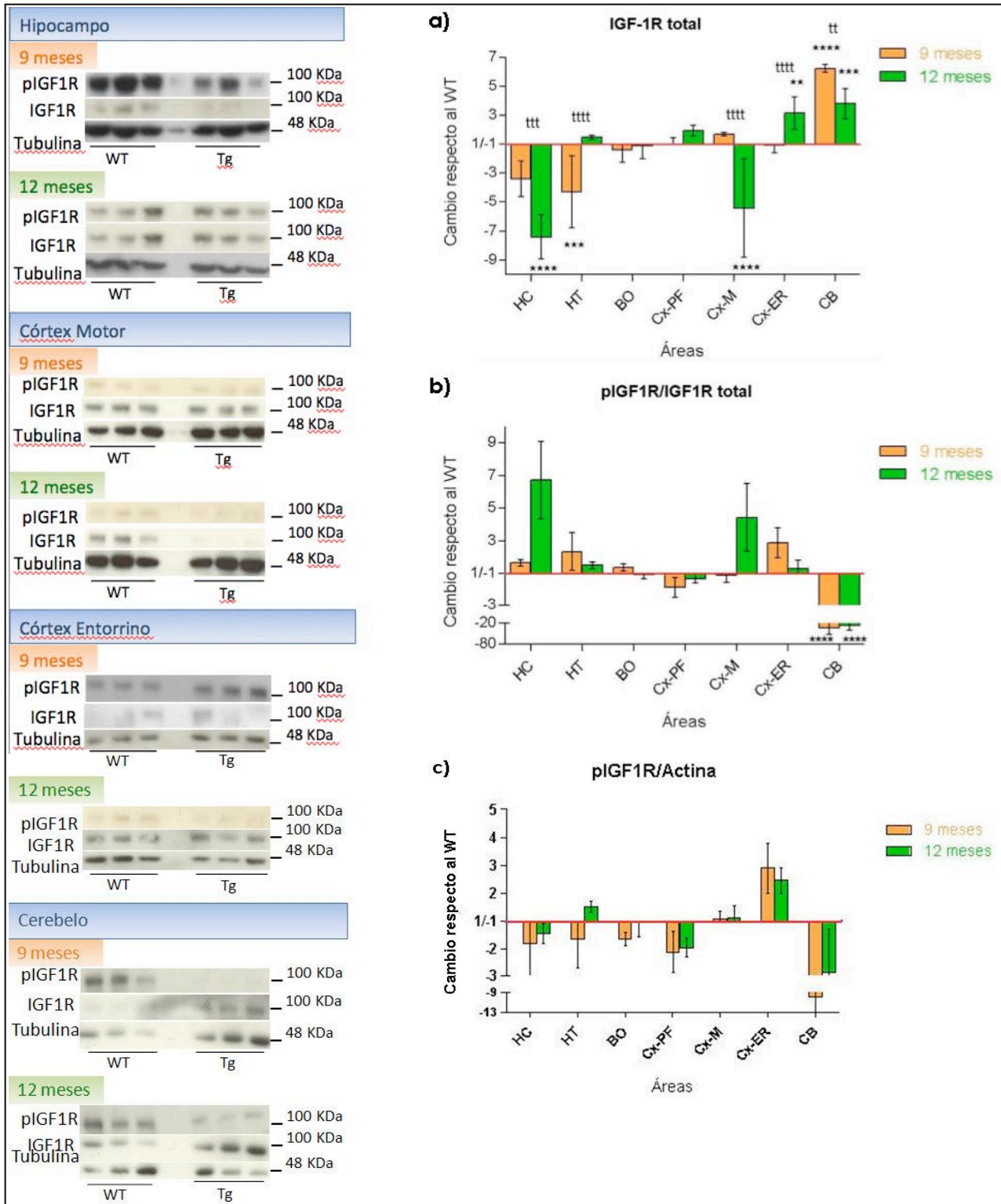


Figura 3.24. Los niveles de IGF-1R descienden a nivel proteico, y su fosforilación (activación) aumenta en distintas áreas cerebrales, excepto en cerebelo. Westerns-blot de pIGF-1R, IGF-1R y la Actina como proteína de referencia de diferentes áreas de cerebro de animales 3xTgAD de 9 (n=5) y 12 meses (n=5) y animales WT de la misma edad (n= 6 y n=7 respectivamente). *a*, Ratio entre los valores obtenidos para los animales 3xTgAD a cada edad respecto a los de los animales WT para los niveles (normalizados respecto a la actina) de IGF1R. *b*, Ratio entre los valores de los animales 3xTgAD y los de los animales WT para la proporción de IGF-1R fosforilado respecto al total. *c*, Ratio entre los valores de los animales 3xTgAD y los de los animales WT para los niveles (normalizados respecto a la actina) de pIGF-1R. Se observan diferencias significativas especialmente en los niveles de IGF-1R total, tanto debidas al genotipo (T-student, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001) como debidas a la edad (T-student, tt: p<0,01 ttt: p<0,001, tttt: p<0,0001). A la izquierda de los gráficos se muestran, a modo de ejemplo, algunos de los westerns.

A la vista de estos resultados, nos planteamos estudiar el efecto de modificar de forma exógena la expresión de IGF-1R en el hipocampo de los animales 3xTgAD. Por una parte, nos interesaba comprobar el efecto sobre el inicio de la enfermedad cuando se silencia la expresión de IGF-1R e IR mediante el uso de RNA de interferencia, para determinar si un defecto en la señalización de la vía Insulina/IGF-1 puede estar implicada en el desarrollo de la patología de la AD. Por otra parte, nos planteamos si sería posible, sobreexpresando IGF-1R en hipocampo mediante el uso de vectores de terapia génica, restaurar los niveles del mismo a nivel proteico con el fin de potenciar la vía y generar un efecto beneficioso en el funcionamiento del hipocampo que consiga luchar contra los procesos degenerativos asociados a la patología de la AD.

Es necesario señalar que, si bien todos los estudios preliminares para la caracterización molecular del modelo 3xTgAD se han llevado a cabo en muestras de animales machos para descartar la posible influencia del ciclo hormonal en los cambios de expresión génica, la AD es una enfermedad que presenta una mayor incidencia en mujeres que en hombres y por tanto creemos que es importante incluir las hembras en los estudios de desarrollo de fármacos para la AD. Así pues, desarrollamos una estrategia en la que se condujeron dos estudios idénticos en paralelo, uno con machos, y otro con hembras. Además, debido a la importancia del córtex prefrontal en el control del comportamiento, y que la activación del IGF-1R también se encuentra reducida en los animales 3xTgAD, decidimos que también sería interesante actuar sobre esta zona.

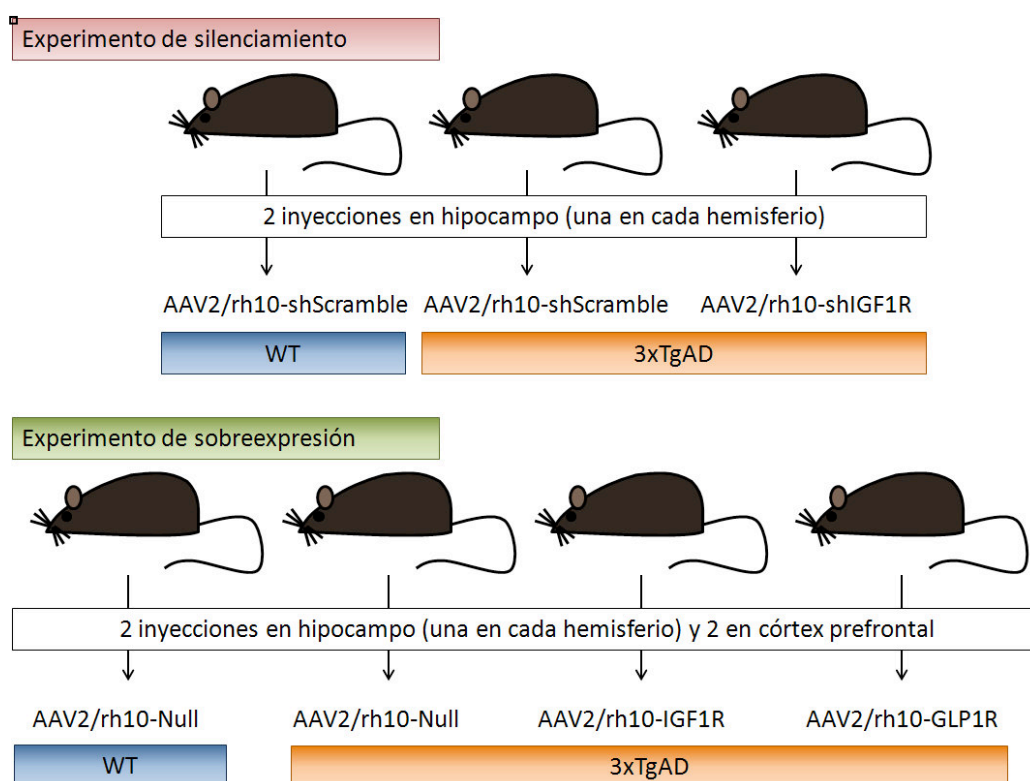


Figura 3.5. Estrategias de las intervenciones in vivo llevadas a cabo en esta tesis.

Finalmente, para completar la estrategia de nuestro estudio, decidimos añadir un vector que sobreexpresara GLP-1R. Como hemos podido comprobar, los niveles de expresión de GLP-1R son muy bajos en

nuestro modelo, lo que hace que el efecto de la sobreexpresión sea, a priori, más fácil de detectar, sin la interferencia del GLP-1R endógeno, y es posible que el efecto sea más claro. Se ilustra un resumen de las dos estrategias en la figura 3.5.

1.4. Caracterización histológica de los cerebros de los animales 3xTgAD.

Por último, y para ayudarnos a establecer cuál era la etapa, dentro de la patología de la AD, más apropiada para intervenir en los animales 3xTgAD, nos interesaba comprobar si existía alguna correlación entre los cambios en los niveles de IGF-1R y la histopatología del cerebro para cada edad. Para ello, empleamos animales (machos y hembras) WT y 3xTgAD de 4, 6, 9 y 12 meses. Los animales fueron sacrificados por decapitación y los cerebros se fijaron en paraformaldehído 4% durante un mínimo de 5 días. A continuación, los cerebros se incluyeron en bloques de OCT y se realizaron cortes en criotomo de 20 μ m de espesor y se llevó a cabo la inmunohistoquímica con el anticuerpo 6E10 para la detección del péptido A β (Figura 3.6).

Así, pudimos observar que los animales WT presentan, a partir de los 6 meses de edad, cierta acumulación intraneuronal de A β que aumenta hasta los 12 meses, pero no se observan depósitos extracelulares. En cambio, los animales 3xTgAD ya presentan acumulación significativa de A β intraneuronal a los 4 meses de edad, que aumenta a los 6. Entre los 6 y los 9 meses de edad, esta señal parece disminuir ligeramente y a los 12 meses la acumulación del A β cambia de una localización intraneuronal a una localización extracelular, apareciendo depósitos de placas amiloides. Por otra parte, los depósitos son mucho más abundantes y de mayor tamaño en las hembras que en los machos. Es decir, la máxima acumulación de A β intraneuronal tiene lugar a los 6 meses de edad de los animales 3xTgAD, por lo que podría ser una de las causas que provocan los cambios en la expresión génica que se observan entre los 6 y los 9 meses.

Por otra parte, también analizamos la histopatología de los animales relativa a la proteína tau (Figura 3.7). Para ello, empleamos el anticuerpo AT180, que reconoce la proteína Tau hiperfosforilada en su epítipo Thr231-fosforilado, así como los ovillos neurofibrilares. Lo que observamos fue que sólo se observa una acumulación importante de tau fosforilada a los 12 meses de edad de los machos y hembras 3xTgAD. En los animales WT, aunque se detecta cierta acumulación de tau fosforilada a los 12 meses, es mucho menos evidente que en los animales 3xTgAD.

A la vista de estos resultados, decidimos que, para el experimento del silenciamiento, la edad más apropiada para ver un efecto son los 4 meses de edad, por lo que se deberían inyectar los vectores virales a los 2 meses. En cuanto al experimento de sobreexpresión, se debería comenzar a los 4-5 meses, antes del aumento en la acumulación de la A β intraneuronal y decidimos esperar hasta los 12 meses, para comprobar si el tratamiento tiene un efecto en la deposición de placas amiloides.

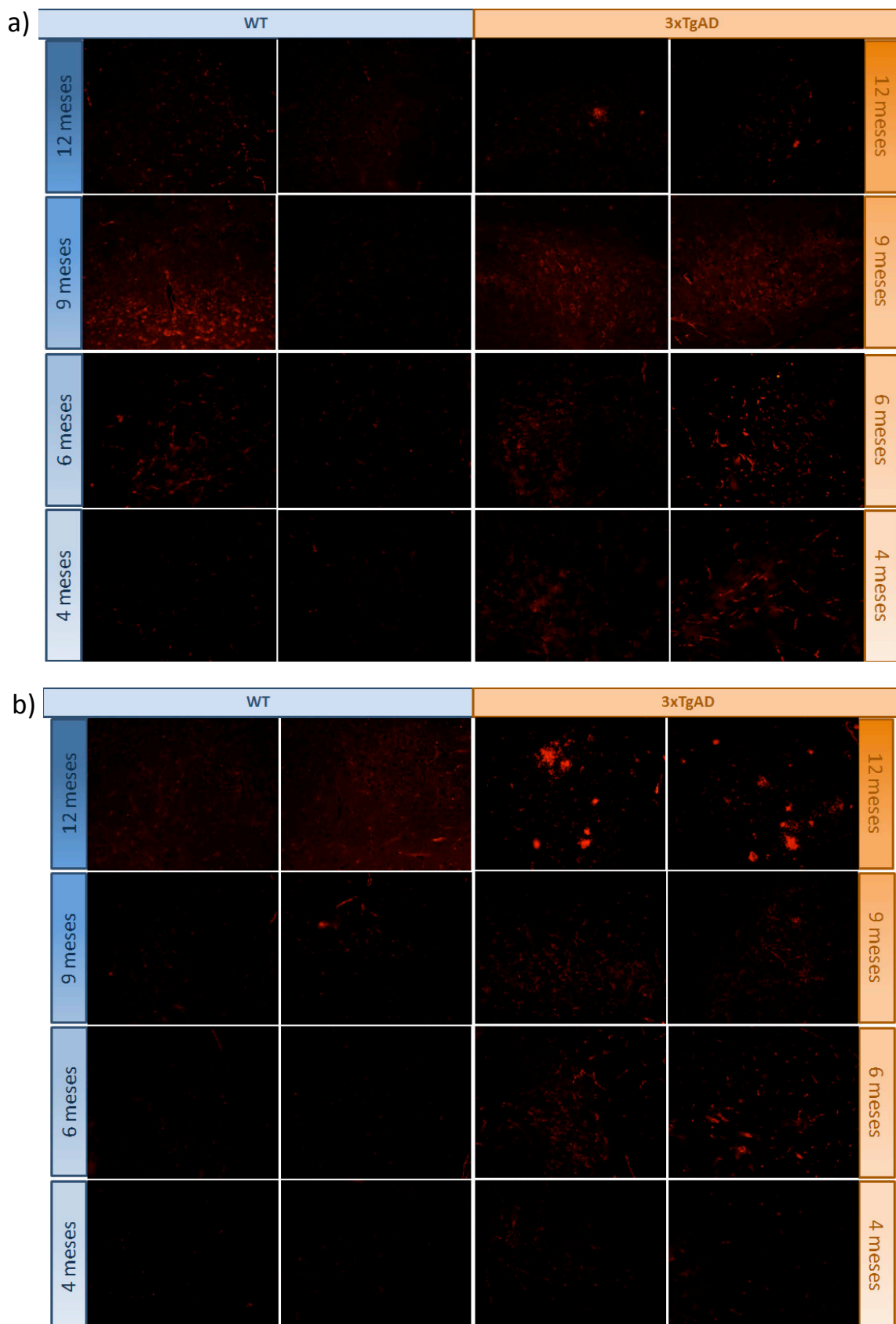


Figura 3.625. Acumulación progresiva de A β con la edad en el modelo 3xTgAD. Cortes sagitales de cerebro de machos WT y 3xTgAD (a) y hembras WT y 3xTgAD (b), de 12, 9, 6 y 4 meses de edad, hibridados con un anticuerpo anti-A β (6E10) y un anticuerpo secundario anti-mouse Alexa-Fluor (rojo). Fotografías de la CA1 de hipocampo, objetivo 20x.

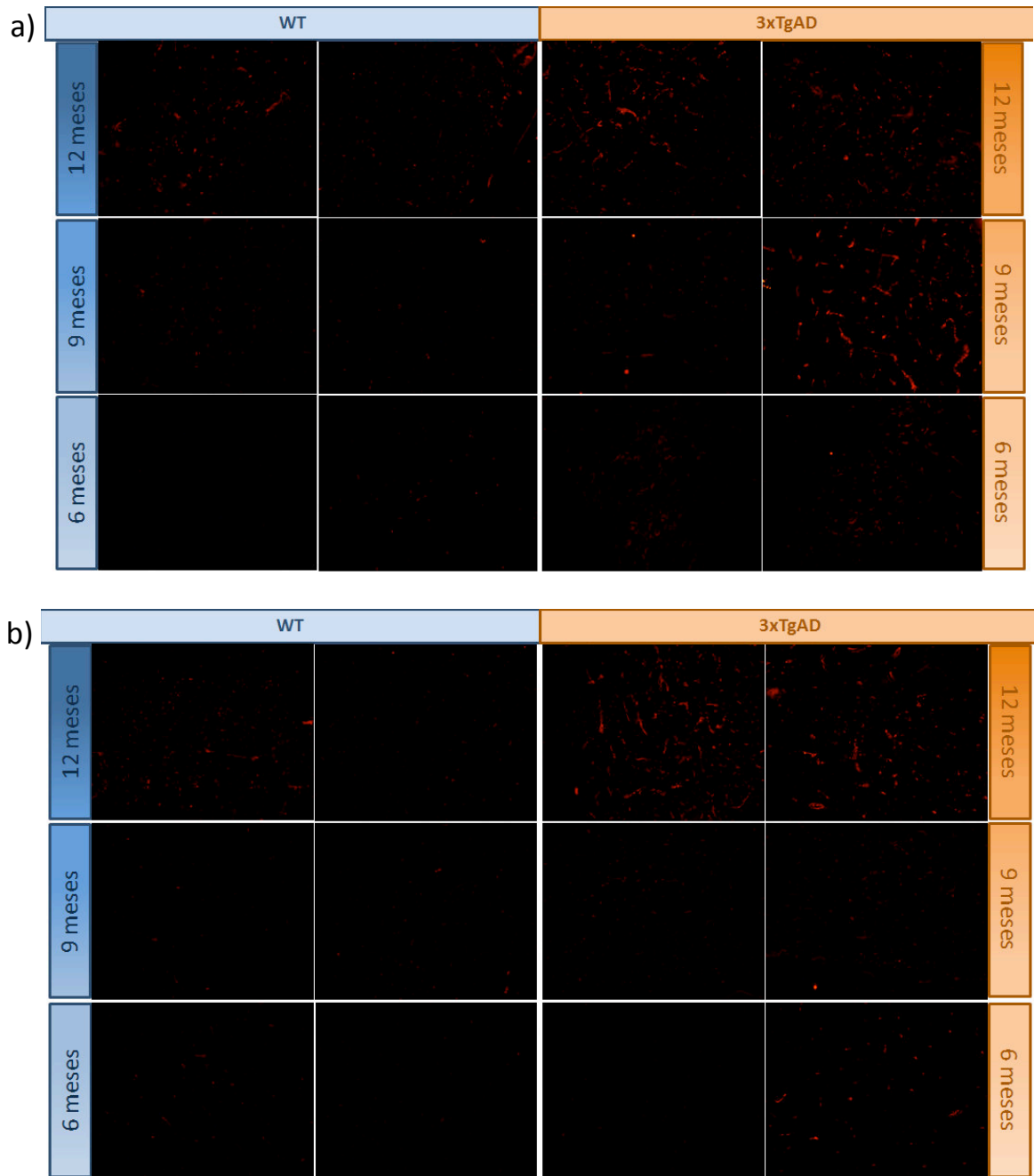


Figura 3.726. Acumulación de proteína tau fosforilada en los animales 3xTgAD a los 12 meses de edad. Cortes sagitales de cerebro de machos WT y 3xTgAD (a) y hembras WT y 3xTgAD (b), de 12, 9 y 6 de edad, hibridados con un anticuerpo anti-Tau humana fosforilada (AT180) y un anticuerpo secundario anti-mouse Alexa-Fluor (rojo). Fotografías del córtex, objetivo 20x.

2. GENERACIÓN DE VECTORES DE TERAPIA GÉNICA

2.1. Diseño y clonaje de shRNAs

Diseñamos 3 posibles shRNAs para silenciar la expresión del IGF-1R (Figura 3.8). La secuencia general de los mismos se basa siempre en una estructura básica, compuesta por una diana BamHI en el extremo 5', seguida de una Guanina y dos nucleótidos aleatorios más; a continuación va una secuencia de unos 20 nucleótidos, complementaria a una zona de la secuencia del IGF-1R, susceptible de ser procesada por el complejo RISC (antisentido); le sigue una estructura de lazo o *loop*, una secuencia igual a la del gen del IGF-1R (sentido), que hibridará con la antisentido para formar la horquilla; y finalmente la estructura acaba con una adición de dos nucleótidos aleatorios, una secuencia de cinco Timidinas y dos Guaninas, y una diana AgeI.



Figura 3.8. Secuencias de los shRNAs empleados en esta tesis.

Siguiendo este esquema, diseñamos tres shRNAs, cambiando únicamente la secuencia sentido y antisentido en cada uno. Las secuencias de los shIGF1R-1 y 2 se extrajeron de las publicaciones de (Shu et al.) y

(Wang et al.) respectivamente. Por otra parte, debido a que los trabajos de Wang et al. se basan en células humanas y los nuestros en ratón, para el diseño del shIGF1R-2 se extrajo de la secuencia de ratón homóloga a la secuencia humana empleada por ellos. El tercero se diseñó empleando las herramientas disponibles en la web para el diseño de siRNA. El funcionamiento de estas página se basa en diferentes algoritmos que evalúan la secuencia génica en búsqueda de secuencias susceptibles de ser procesadas por los mecanismo de silenciamiento por RNA de interferencia.

Debemos mencionar también que, puesto que el shRNA se clonará en un plásmido de expresión, se debe diseñar, asimismo, la cadena complementaria a la anterior (Up y Down, respectivamente). Por otra parte, para facilitar el clonaje, las dianas de los extremos se diseñan con la estructura cohesiva propia del enzima de restricción con el que cortará el vector (BamHI y Agel en este caso).

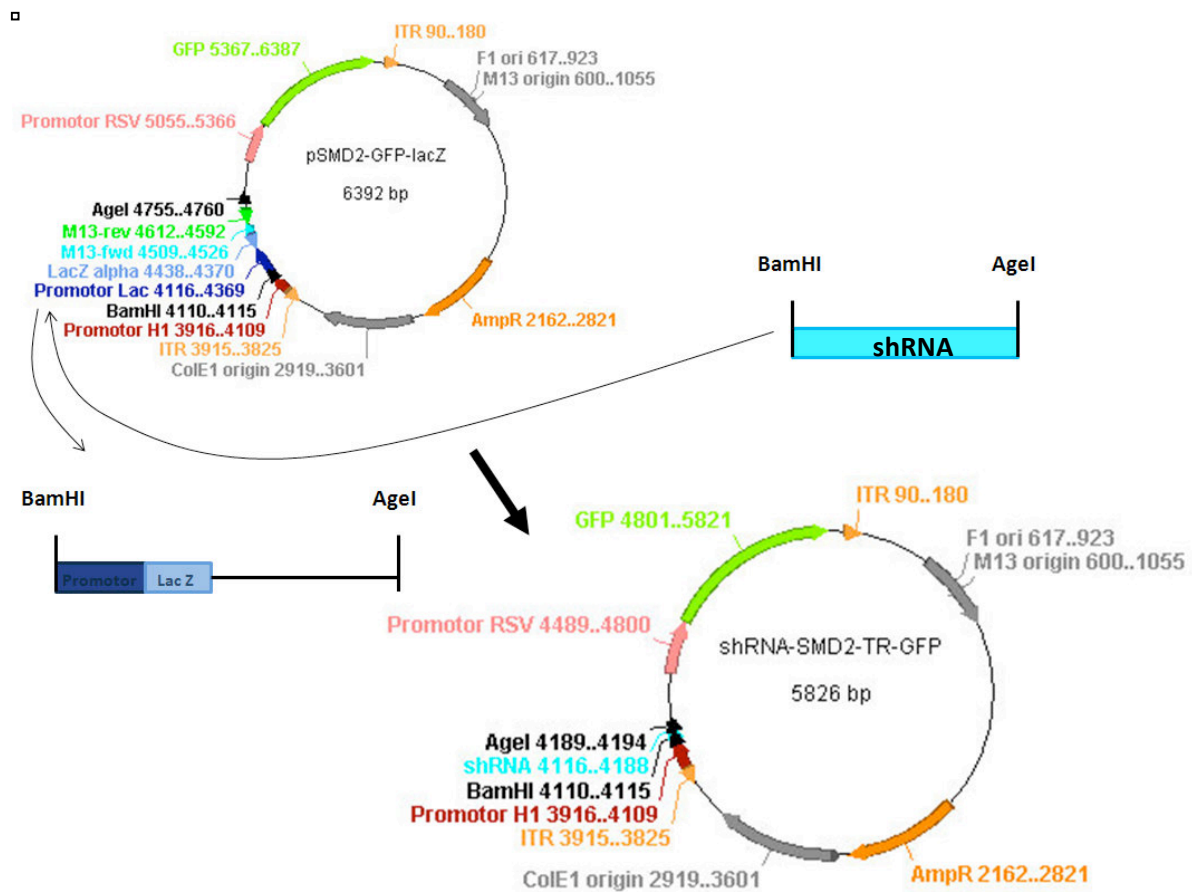


Figura 3.9. Esquema de la estrategia de clonaje de los shRNAs en el cassette de expresión con las ITRs necesarias para la producción de AAVs. Los shRNAs se diseñaron con una diana BamHI en su extremo 5' y una diana Agel En el extremo 3' para introducirlo en el vector de expresión en el sitio donde se codifica el promotor y gen del LacZ. Esto permite diferencias las colonias positivas (blancas) de las negativas (azules).

Estas seis secuencias fueron sintetizadas por Invitrogen™ (Life Technologies), las parejas complementarias se hibridaron y a continuación se ligaron con el vector de expresión pSMD2-GFP-LacZ (Figura 3.9). Este plásmido ha sido diseñado en nuestro laboratorio específicamente para el clonaje de shRNAs y la posterior producción de AAV que expresen dicho shRNA. El pSMD2-GFP-LacZ contiene las ITRs del AAV2 y un cas-

sette de expresión que incluye un promotor H1, bajo cuyo control se clonará el shRNA a través de las dianas BamHI y AgeI. Entre estas dos dianas, el plásmido incluía un lacZ con un promotor propio, de manera que las bacterias donde se exprese este plásmido mostrarán un color azul en un cultivo de LB-Agar. En cambio, cuando el plásmido se digiera con BamHI y AgeI y se haga ligar con el shRNA, las bacterias que contengan dicho constructo serán blancas. El pSMD2-GFP-LacZ también contiene el gen de la proteína GFP, controlado por el promotor RSV.

2.1.1. Estudio de la eficiencia de los shRNAs in vitro

Tras el clonaje de los tres shRNAs, se seleccionó el más eficiente en el silenciamiento del gen diana. Para ello, realizamos una transfección en células 293QB con cada uno de los constructos clonados junto con un vector que exprese el cDNA del gen diana (IGF-1R), en una proporción 1:100 (cDNA:shRNA). Pasadas 72 horas tras la transfección, se recogieron las células y se llevó a cabo una extracción de RNA, el cual se retro-transcribió para realizar una PCR cuantitativa en la que comprobamos que los shRNA-1 y 2 no afectaban significativamente a la expresión del IGF-1R. En cambio, el shRNA-3 conseguía un silenciamiento de hasta el 60% (Figura 3.10).

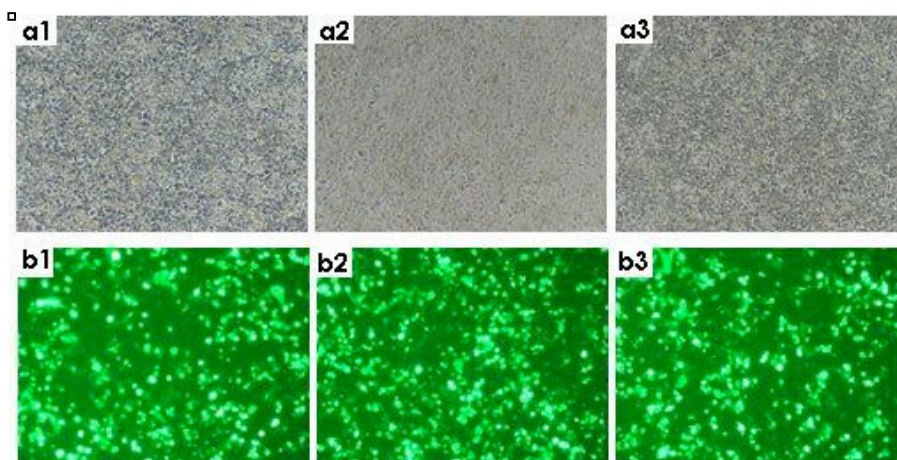
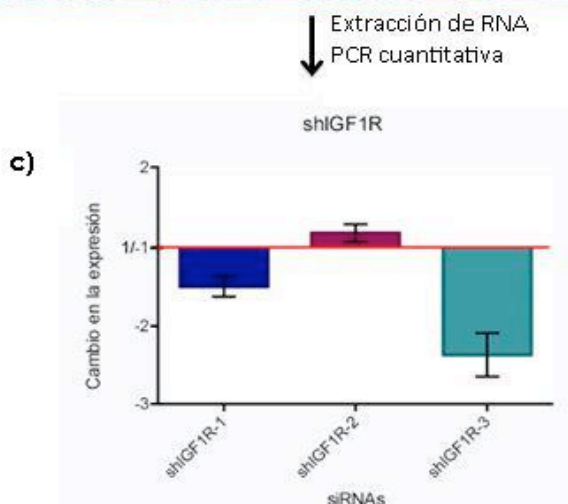


Figura 3.1027. El shIGF1R-3 consigue un silenciamiento génico del 60%. *a, b*, Transfección de células 293QB con los plásmidos shIGF1R-1/pSMD2-GFP (1), shIGF1R-2/pSMD2-GFP (2) y shIGF1R-3/pSMD2-GFP (3) junto con el plásmido pGV-IGF1R en una proporción 1:100 (cDNA:shRNA). Fotografías de las células transfectadas en campo claro (*a*) y con fluorescencia (*b*). El grado de transfección es del 50% aproximadamente. *c*, Resultado de la PCR cuantitativa de las células transfectadas expresada como la ratio entre los niveles de expresión de IGF-1R de las células transfectadas y los de células sin transfectar, normalizados respecto al gen 36b4.



2.2. Generación de shRNA-AAVs

Una vez seleccionamos el shIGF1R-3 como el shRNA más eficiente, se llevó a cabo la producción de un AAV2/rh10 con dicho shRNA. Para ello, se realizó una triple transfección en células 293AAV con el plásmido shIGF1-3/SMD2-GFP juntamente con los plásmidos rep2cap10 y pXX6 (Figura 3.11). A continuación se purificó el virus en gradiente de iodixanol y se obtuvo un título de $1,25 \times 10^{12}$ vg/mL.

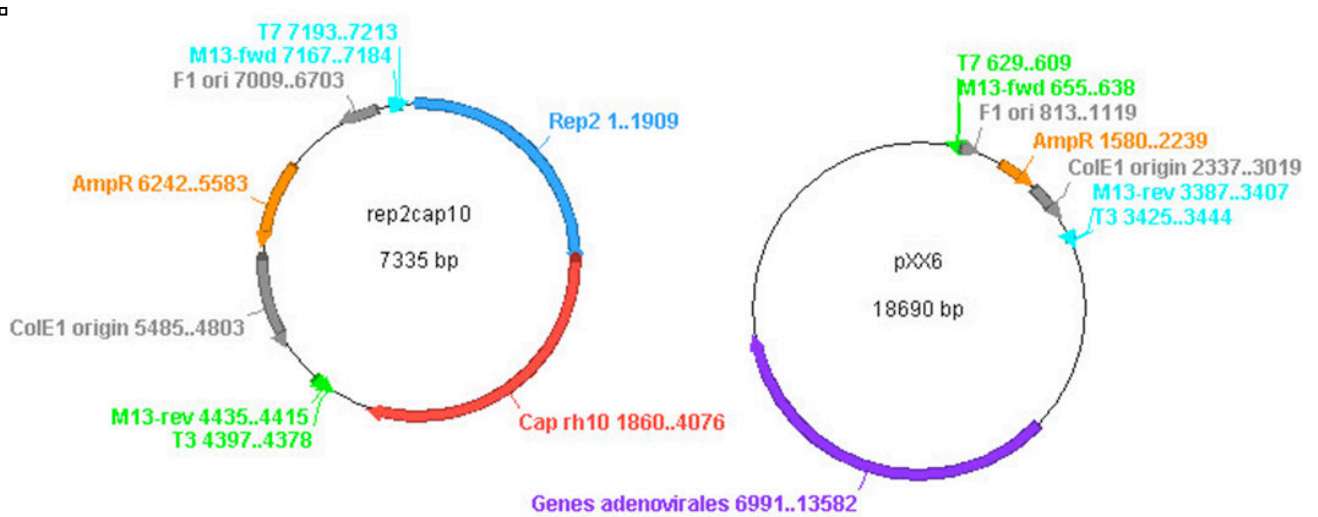


Figura 3.1128. Plásmidos rep2cap10 y pxx6. El plásmido rep2cap10 contiene los genes necesarios para la replicación del AAV2 y la formación de la cápside del AAVrh10, y el plásmido pXX6, los genes del adenovirus helper. Estos dos plásmidos se emplean, junto con el vector de expresión portador del transgén o el shRNA en este caso, para realizar la triple transfección que dará lugar a la producción de vectores AAV2/rh10 con el shRNA.

2.3. Clonaje de los cDNAs de IGF1R y GLP1R en cassette AAV

Para el desarrollo de los vectores de terapia génica empleados en esta tesis doctoral, comenzamos pidiendo las secuencias de los genes del IGF-1R y del GLP-1R a ImaGenes GmbH. Los genes nos llegaron clonados en los vectores pCR-XL-TOPO y pBlueScript, respectivamente. A continuación, clonamos el gen del GLP-1R en el plásmido pCAG-WPRE, que contiene el promotor, el primer exón y el primer intrón del gen de la beta-actina de pollo (CAG, de chicken beta-actin) y las ITRs necesarias para el empaquetamiento del genoma en las cápsides del AAV2 (Figura 3.12 a). En cambio, el IGF-1R, se clonó dentro del plásmido pGV, que contiene el promotor del citomegalovirus (CMV). Este promotor no es tan potente como el CAG, que permite una sobreexpresión mayor del transgén y, además, diversos estudios han demostrado un silenciamiento a largo plazo del promotor CMV debido a la metilación de sus secuencias reguladoras. Sin embargo, debido a que el cDNA de IGF-1R es muy grande y el constructo CAG-IGF1R excedería con mucho las 4,7 Kb del genoma del AAV2, se sacrificó potencia en la expresión del transgén del segundo constructo para permitir que fuera posible la generación del vector viral.

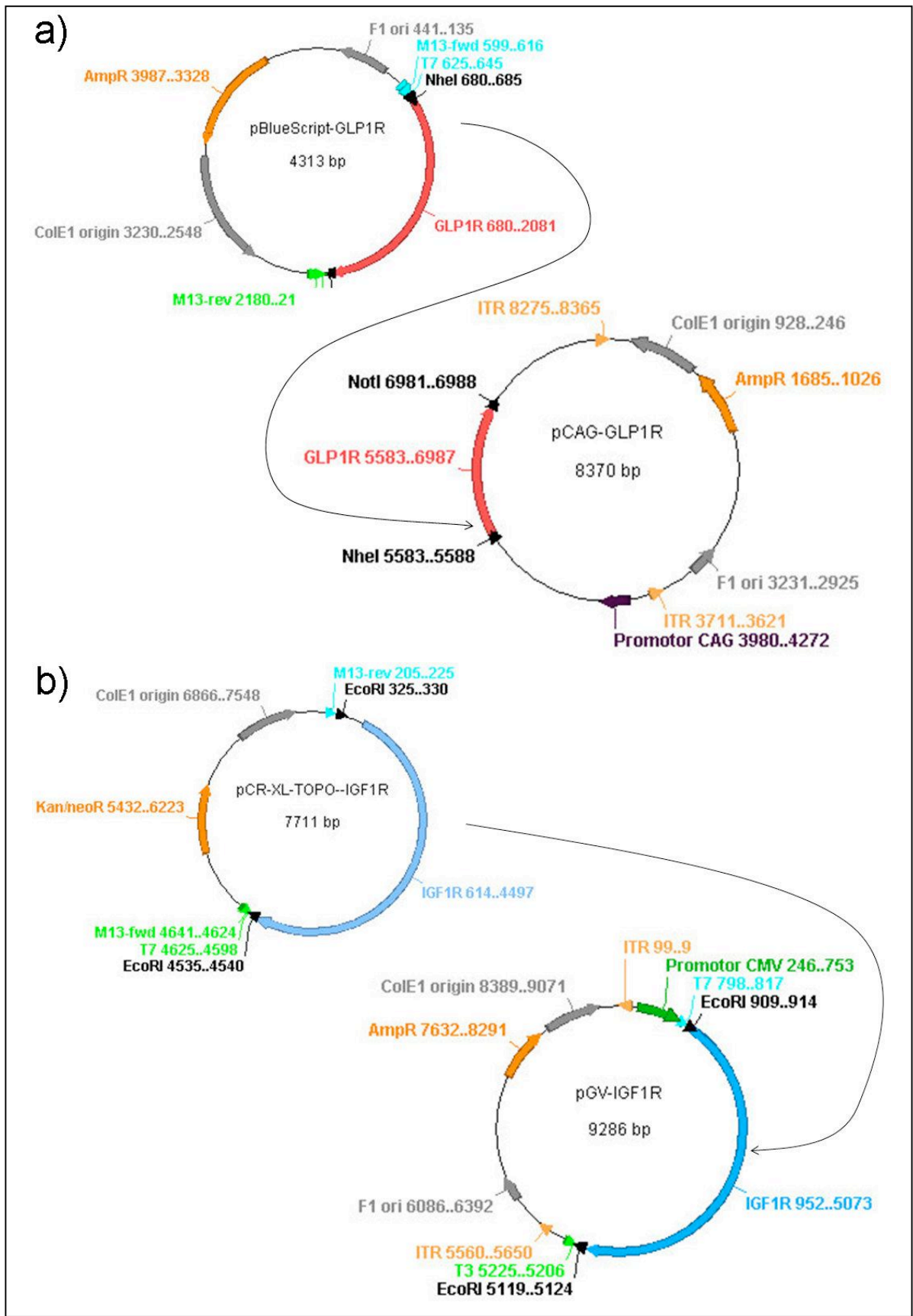


Figura 3.29. *a*, Cloning del gen GLP-1R desde el vector comercial al plásmido de expresión con el promotor CAG y las ITRs del AAV2. *b*, Cloning del gen IGF-1R desde el vector comercial al vector con el promotor CMV y las ITRs para la producción del virus adenoasociado

2.4. Generación y caracterización de cDNA-AAVs

A continuación, generamos sendos vectores AAV2/rh10 con los plásmidos pCAG-GLP1R y pGV-IGF1R, procediendo de la misma forma que lo hicimos para la generación del vector AAV2/rh10-shIGF1R-3, con la triple transfección y el gradiente de iodixanol. En este caso, obtuvimos un título de $7,9 \times 10^{11}$ vg/mL para el AAV2/rh10-IGF1R y de $2,56 \times 10^{12}$ vg/mL en el caso del pCAG-GLP1R. Junto con estos dos vectores, también se produjo un tercer vector control, portador de una secuencia no codificante, el vector AAV2/rh10-Null, del que obtuvimos un título de $3,4 \times 10^{13}$ vg/mL.

En el caso del pGV-IGF1R, la eficiencia de la producción es mucho menor debido a que el tamaño del genoma del vector es de 5,7kb, 1kb mayor del tamaño óptimo. Esto puede hacer que el empaquetamiento no sea tan eficiente y, por tanto, la producción es menor.

Para asegurarnos de que, a pesar de estos problemas, los viriones producidos son efectivos en la transducción génica, realizamos una prueba in vitro de la eficiencia de ambos vectores para la sobreexpresión del transgén. Para ello, se llevaron a cabo dos condiciones de infección (1X y 10X) de células 293QB para cada producción. Como control, añadimos una condición en la que infectamos células 293QB con un virus AAV2/rh10-GFP. Transcurridas 72 horas, llevamos a cabo una extracción de mRNA de las células infectadas, seguida de una PCR cuantitativa con primers específicos para la amplificación de IGF-1R y GLP-1R. Así, pudimos observar que, si bien con la condición 1X del pGV-IGF1R apenas conseguíamos ver una sobreexpresión significativa, pero en la condición de 10X se consigue un aumento de hasta 12 veces en los niveles de expresión del IGF-1R (Figura 3.13). En el caso de la infección con el pCAG-GLP1R, los niveles de sobreexpresión conseguidos son mucho mayores, en parte debido a que el título es mayor y hemos ajustado los volúmenes, no la MOI, en parte porque la expresión endógena del GLP-1R es mucho más baja que la del IGF-1R y por tanto resulta más fácil aumentarla. También puede deberse a una mayor proporción de cápsides vacías del pGV-IGF1R debido al gran tamaño del transgén.

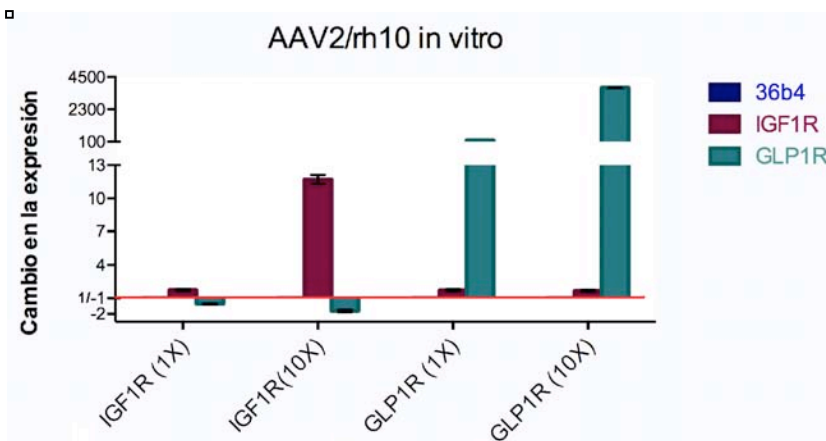


Figura 3.30. Sobreexpresión in vitro con los vectores AAV2/rh10-IGF1R y AAV2/rh10-GLP1R. Resultados de la PCR cuantitativa, expresados como la ratio entre la expresión de IGF-1R en las células infectadas con los vectores AAV2/rh10-IGF1R y AAV2/rh10-GLP1R y la expresión de células infectadas con el vector AAV2/rh10-GFP, normalizados respecto a la expresión del gen de referencia 36b4. En el caso del AAV2/rh10-IGF1R, la condición 1X equivale a $3,6 \times 10^3$ vg/célula, y, en el caso del AAV2/rh10-GLP1R, corresponde a $1,2 \times 10^4$ vg/célula.

3. ADMINISTRACIÓN DE VECTORES IN VIVO

3.1. Efecto de la administración de vectores portadores de shRNAs para el silenciamiento de la vía de la insulina.

En primer lugar, a modo de estudio preliminar, nos planteamos si el silenciamiento de la vía de la insulina podría afectar a la patología del AD. Concretamente, quisimos centrarnos en cómo se afecta el inicio de la enfermedad, y en si éste tiene lugar antes o de forma más agresiva en el modelo 3xTgAD cuando se silencia la vía de señalización de la insulina. En este modelo, el primer síntoma que se observa es la acumulación intraneuronal de A β (Oddo et al.) y los resultados de nuestro estudio histológico inicial (Figura 3. 5) indican que la acumulación intraneuronal de A β es más pronunciada en las hembras, evidente desde los 4 meses de edad, y a los 6 meses se alcanza un máximo.

A la vista de estos resultados, nos propusimos estudiar el efecto del silenciamiento de la vía de insulina en hembras de 4 meses. Para ello, se inyectaron $3,5 \times 10^9$ vg del vector AAV2/rh10-shIGF1R y $3,5 \times 10^9$ vg del vector AAV2/rh10-shIR (éste último producido por Anna Massó en nuestro laboratorio) en el hipocampo de 5 hembras 3xTgAD de 2 meses de edad, con la previsión de que el virus y el shRNA que codifica tuvieran tiempo suficiente de expresarse y tener un efecto cuando el animal tuviera 4 meses de edad. A modo de control, también se inyectaron 5 hembras 3xTgAD y 5 WT de la misma edad con un AAV2/rh10 portador de un shRNA scrambled, que no provoca el silenciamiento de ningún gen conocido.

La administración se realizó por inyección estereotáxica siguiendo el protocolo descrito en el apartado "II. Materiales y Métodos". Brevemente, una vez el animal está anestesiado, en primer lugar se abre la piel del cráneo con un bisturí y se busca el punto Bregma. Con el uso de los ejes del aparato estereotáxico, se localizan las coordenadas del hipocampo (-2,46mm AP, +2,7mm/-2,7mm L, -2,5mm V según el atlas estereotáxico de G. Paxinos (Paxinos and B.J.)). Se realiza en este punto una pequeña perforación se procede a la inyección del virus con una aguja Hamilton conectada a una bomba de microinyección. Se inyectan 1,5 μ L en cada hemisferio a razón de 0,5 μ L/min. Cuando los animales despiertan de la anestesia, se devuelven a su jaula y se mantienen en racks ventilados de Seguridad Biológica de Nivel 2.

Cuando los animales cumplieron 4 meses, fueron sacrificados por decapitación y se extrajo el cerebro. Éste fue fijado en paraformaldehído al 4% durante un mínimo de 4 días y a continuación fue incluido en un bloque de OCT. Se realizaron cortes en criotomo de 20 μ m de espesor y a continuación se llevó a cabo una inmunohistoquímica contra el péptido A β (Figura 3.14). Lo que pudimos observar fue que el silenciamiento de la vía de la insulina en hipocampo mediante el uso de RNA de interferencia contra el IR y el IGF-1R, provoca que la acumulación intraneuronal de A β en el hipocampo de hembras 3xTgAD de 4 meses

sea mucho mayor que la encontrada en hembras 3xTgAD de la misma edad en las que no se altera la expresión de ninguna proteína.

Estos resultados indican una relación directa entre una señalización deficiente de la insulina y un aumento en la histopatología de la AD. Debido a ello, el siguiente experimento consistió comprobar si la sobreexpresión de las proteínas relacionadas con la vía de la insulina podía reducir o retardar la aparición y progresión de algunos de los síntomas de la enfermedad.

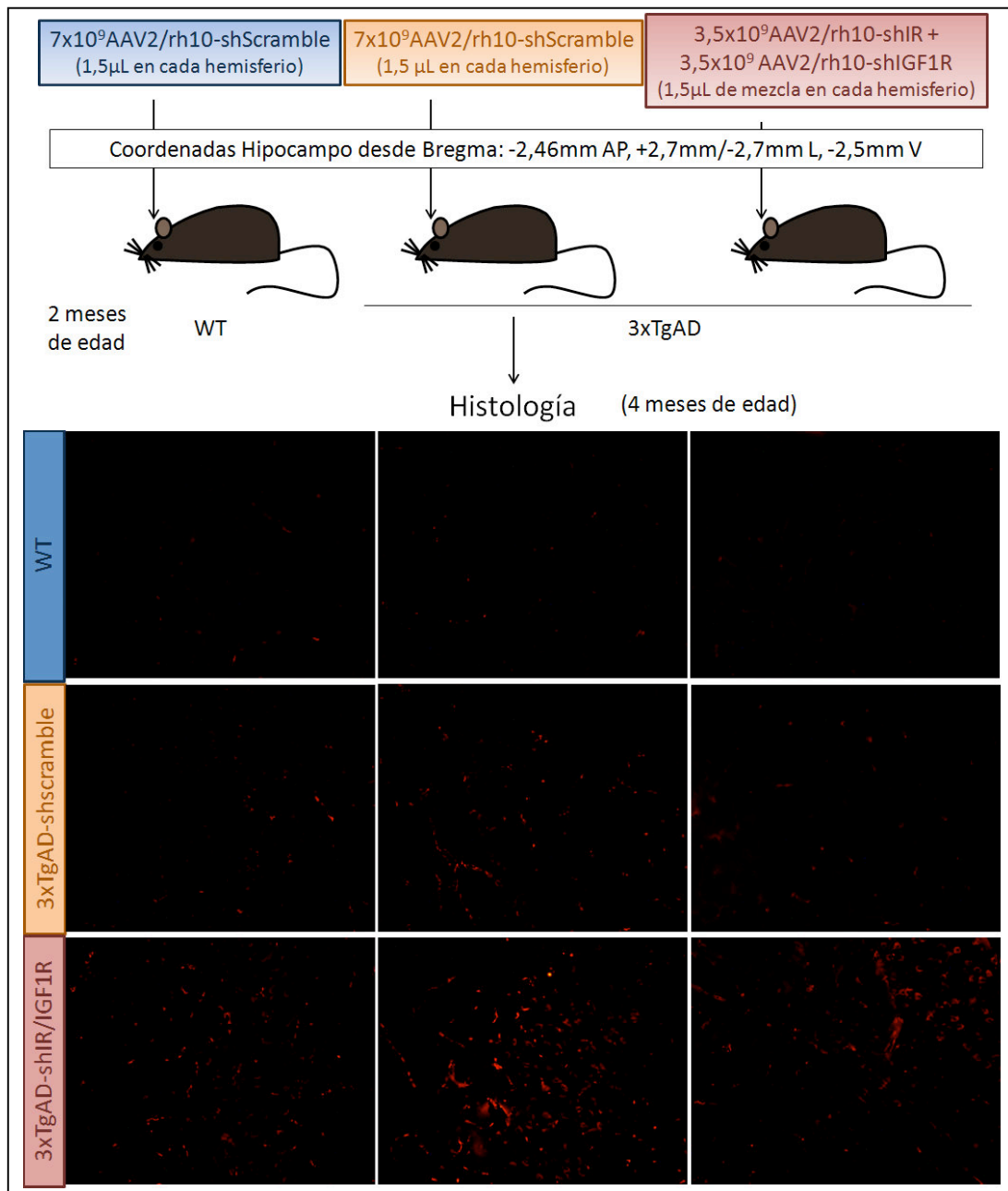


Figura 3.1431. Aumento de la acumulación de A β intraneuronal en hembras 3xTgAD de 4 meses de edad tras la inyección intrahipocámpica de cantidades iguales de un AAV2/rh10-shIR y un AAV2/rh10-shIGF1R. Cortes sagitales de cerebro de hembras WT, 3xTgAD inyectadas con AAV2/rh10-shScramble y 3xTgAD inyectadas con una mezcla equimolar de AAV2/rh10-shIR y AAV2/rh10-shIGF1R, hibridados con el anticuerpo anti-A β (6E10) y con un anticuerpo secundario anti-mouse Alexa Fluor (fluorescencia roja). Fotografías de la zona CA1 de hipocampo, objetivo de 20x.

3.2. Administración de vectores portadores del cDNA de IGF-1R y GLP-1R. Efectos sobre los síntomas psicológicos y conductuales asociados a la demencia (BPSD).

3.2.1. Inyección intracraneal de AAV2/rh10-IGF1R y AAV2/rh10-GLP1R

En vista de que una reducción de la vía de señalización de la insulina mediante el silenciamiento tanto de IR como de IGF-1R, tiene un importante efecto en los procesos histopatológicos al inicio de la AD, llevamos a cabo un experimento con el que pretendíamos analizar el papel de la vía IR/IGF-R/GLP-1R en los déficits de memoria y otros síntomas asociados a la AD utilizando vectores de terapia génica. Para ello, se inyectaron $2,4 \times 10^9$ vg del vector AAV2/rh10-IGF1R en córtex prefrontal e hipocampo de ambos hemisferios (4 puntos de inyección) de 9 machos y 11 hembras 3xTgAD de 5 meses de edad. El AAV2/rh10-GLP1R se diluyó hasta la misma concentración del AAV2/rh10-IGF1R realizamos la inyección de la misma manera en 8 machos y 8 hembras 3xTgAD de la misma edad. Como control positivo de la enfermedad y negativo para el tratamiento, se inyectaron también $2,4 \times 10^9$ vg del vector AAV2/rh10-Null en 9 machos y 8 hembras 3xTgAD de la misma edad. Asimismo, como control negativo de la enfermedad, se inyectaron 12 hembras y 12 machos WT de 5 meses de edad con el AAV2/rh10-Null. En la figura 3.15 se muestra un esquema del diseño experimental.

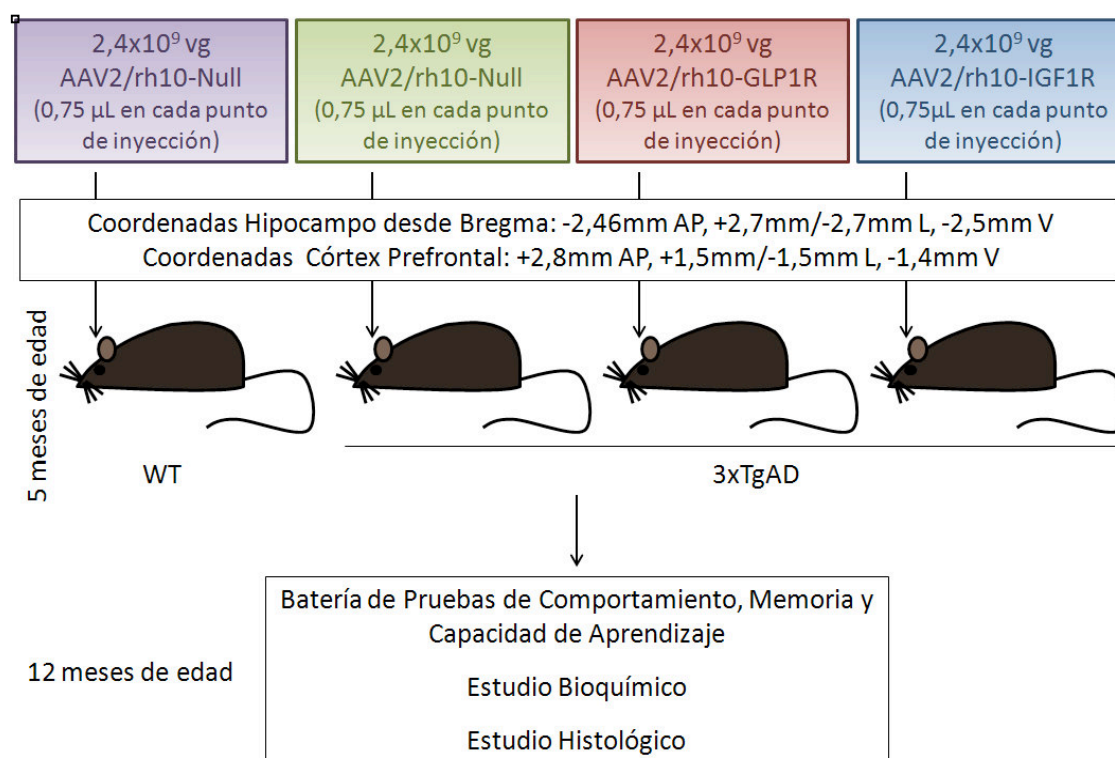


Figura 3.32. Diseño experimental para la sobreexpresión de IGF-1R y GLP-1R en ratones 3xTgAD.

La inyección se realizó con un aparato estereotáxico de la manera que ya se ha explicado. Algunos animales murieron durante los primeros días tras la intervención, posiblemente a causa del proceso de inyección de los vectores.

Tras el tratamiento, los animales se mantuvieron en jaulas ventiladas durante los dos primeros meses y a continuación se pasaron a jaulas de estabulación estándar durante 5 meses más. A lo largo de los 7 meses que duró el experimento, entre un 12,5 y un 15% de los animales 3xTgAD inyectados con el vector AAV2/rh10-GLP1R y AAV2/rh10-Null murieron, como se muestra en la tabla 3.1, mientras que todos los animales WT y los 3xTgAD inyectados con el vector AAV2/rh10-IGF1R sobrevivieron hasta el inicio de las pruebas de comportamiento, cuando cumplieron 12 meses de edad.

Supervivencia de los animales inyectados		
Grupo	Machos	Hembras
WT AAV2/rh10-Null	10/10	12/12
3xTgAD AAV2/rh10-Null (##)	6/8	5/7
3xTgAD AAV2/rh10-GLP1R (#)	6/7	7/8
3xTgAD AAV2/rh10-IGF1R(*)	7/7	8/8

Tabla 3.1. Supervivencia de los animales inyectados. Los datos se muestran como el cociente entre los animales vivos cuando comienzan las pruebas de comportamiento y el número de animales que sobrevivieron a la intervención quirúrgica. Se observan diferencias significativas en la supervivencia entre los diferentes grupos (Test de Bernouilli, * $p < 0,05$ respecto a los animales 3xTgAD-Null, # $p < 0,05$ respecto a los animales WT-Null, ## $p < 0,01$).

3.2.2. Capacidades físicas y reflejo visual

En primer lugar, para comprobar que los diferentes grupos de animales no presentan diferencias a nivel físico se llevaron a cabo diferentes pruebas, como la barra de madera, la marra metálica y la prueba de la percha para medir la fuerza física y el equilibrio de los animales. También se comprobó su capacidad visual con el uso de una superficie negra, sobre la que se acercaba lentamente el animal para comprobar el reflejo visual (extensión de las patas delanteras para impedir chocar con el morro).

De esta manera, se comprobó que el reflejo visual era correcto en todos los grupos experimentales (resultados no mostrados). El resto de pruebas sensoriomotoras, se muestran en la tabla 3.2 (machos) y la tabla 3.3 (hembras) y se observa que los machos 3xTgAD no presentan ningún tipo de déficit en relación a sus capacidades sensoriomotoras en comparación con los animales WT. De hecho, en todo caso, se observa una leve tendencia de los animales 3xTgAD a aumentar la latencia de caída en la barra de madera, que llega a ser significativa en los animales 3xTgAD-GLP1R. En cuanto al tratamiento con los vectores AAV2/rh10-GLP1R y AAV2/rh10-IGF1R, los animales muestran mayor resistencia física que los animales 3xTgAD-Null y que los animales WT en la prueba de 60 segundos de la percha, aumentando significativamente la latencia de caída.

Machos	WT-Null	3xTgAD-Null	3xTgAD-GLP1R	3xTgAD-IGF1R
Peso de los animales				
5 meses	28,8±2,2	28,6±2,0	30,8±5,9	27,6±2,1
12 meses	30,9±4,2	32,2±5,0	35,8±9,6	30,8±2,7
Barra de madera				
Latencia de caída (segundos)	9,75±2,30	12,58±3,32	16,75±2,13 ^{###}	11,88±3,06
Distancia (Nº de segmentos)	0,05±0,07	0,08±0,12	0,17±0,16	0,00±0,00
Barra metálica				
Latencia de caída (segundos)	6,35±1,99	3,67±2,24	5,92±2,95	4,56±1,75
Distancia (Nº de segmentos)	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Percha 5s				
Latencia de caída (segundos)	4,25±0,40	3,58±0,61	4,42±0,37	4,13±0,50
Distancia (Nº de segmentos)	0,20±0,19	0,00±0,00	0,17±0,23	0,06±0,09
Nº Extremidades utilizadas	2,55±0,89	2,50±0,90	2,17±0,58	2,75±1,00
Percha 60s				
Latencia de caída (segundos)	26,30±10,92	27,33±15,49	48,83±10,98 ^{****}	43,88±11,56 ^{****}
Distancia (Nº de segmentos)	1,60±0,82	2,67±1,19	3,00±0,97	2,75±1,19
Nº Extremidades utilizadas	3,20±1,55	3,50±1,38	3,00±1,26	4,13±1,13

Tabla 3.2. Resultados de las pruebas sensoriomotoras de los machos. Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar. Se observan pocas diferencias significativas en las capacidades sensoriomotoras de los diferentes grupos experimentales (t-student ****p<0,0001 respecto a los animales 3xTgAD-Null, ### p<0,001, ##### p<0,0001 respecto a los animales WT).

Por su parte, las hembras 3xTgAD tampoco presentan déficits importantes en sus capacidades sensoriomotoras, excepto por una menor latencia de caída en la barra metálica, pero en la prueba de la percha durante 60 segundos, la latencia de caída es mayor que la de las hembras WT, como también lo es la de las hembras 3xTgAD-GLP1R y 3xTgAD-IGF1R.

Hembras	WT-Null	3xTgAD-Null	3xTgAD-GLP1R	3xTgAD-IGF1R
Peso de los animales				
5 meses	23,8±3,5	23,6±3,0	22,8±1,4	23,4±2,4
12 meses	25,6±6,2	27,7±6,1	25,0±0,6	27,6±1,9
Barra de madera				
Latencia de caída (segundos)	17,21±1,62	18,50±1,44	18,86±1,32	18,41±2,24
Distancia (Nº de segmentos)	0,08±0,12	0,10±0,14	0,21±0,16	0,17±0,16
Barra metálica				
Latencia de caída (segundos)	14,63±1,95	7,30±3,13 ^{##}	12,07±2,40	11,00±3,75
Distancia (Nº de segmentos)	0,13±0,18	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Percha 5s				
Latencia de caída (segundos)	4,50±0,27	5,00±0,00	4,71±0,31	5,00±0,00
Distancia (Nº de segmentos)	0,25±0,15	0,30±0,30	0,50±0,41	0,33±0,36
Nº Extremidades utilizadas	2,96±1,04	3,00±1,15	3,29±1,27	2,92±1,16
Percha 60s				
Latencia de caída (segundos)	21,17±8,30	47,20±13,19 ^{****}	32,43±14,21 ^{****}	60,00±0,00 ^{****}
Distancia (Nº de segmentos)	1,67±0,91	1,60±1,39	3,43±1,48	3,33±1,74
Nº Extremidades utilizadas	3,83±1,27	4,00±1,22	3,71±1,25	4,33±0,82

Tabla 3.3. Resultados de las pruebas sensoriomotoras de las hembras. Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar. Se observan pocas diferencias significativas en las capacidades sensoriomotoras de los diferentes grupos experimentales (t-student ^{****}p<0,0001 respecto a los animales 3xTgAD-Null, ^{##} p<0,01, ^{####} p<0,0001 respecto a los animales WT.

3.2.3. Neofobia y ansiedad

Diferencias en la neofobia y la ansiedad que experimentan los animales al someterlos a las diferentes pruebas de memoria pueden afectar a su conducta y, por tanto, es necesario evaluarlas y tenerlas en cuenta al valorar los resultados de las mismas. La neofobia experimentada por los diferentes grupos experimentales se mide con la prueba del *Corner Test*. Para ello, se van depositando los animales suavemente y de forma individual en una nueva jaula, igual a la usada para su estabulación, con viruta limpia, y se contabiliza el número de esquinas visitadas (*corners*) y exploraciones verticales (*rearings*) realizadas por el animal durante los 30 segundos que dura la prueba. Esta prueba se realiza, a modo de seguimiento, a los 9 meses de edad de los animales, así como a los 12 meses de edad (Figura 3.16), junto con el resto de pruebas realizadas.

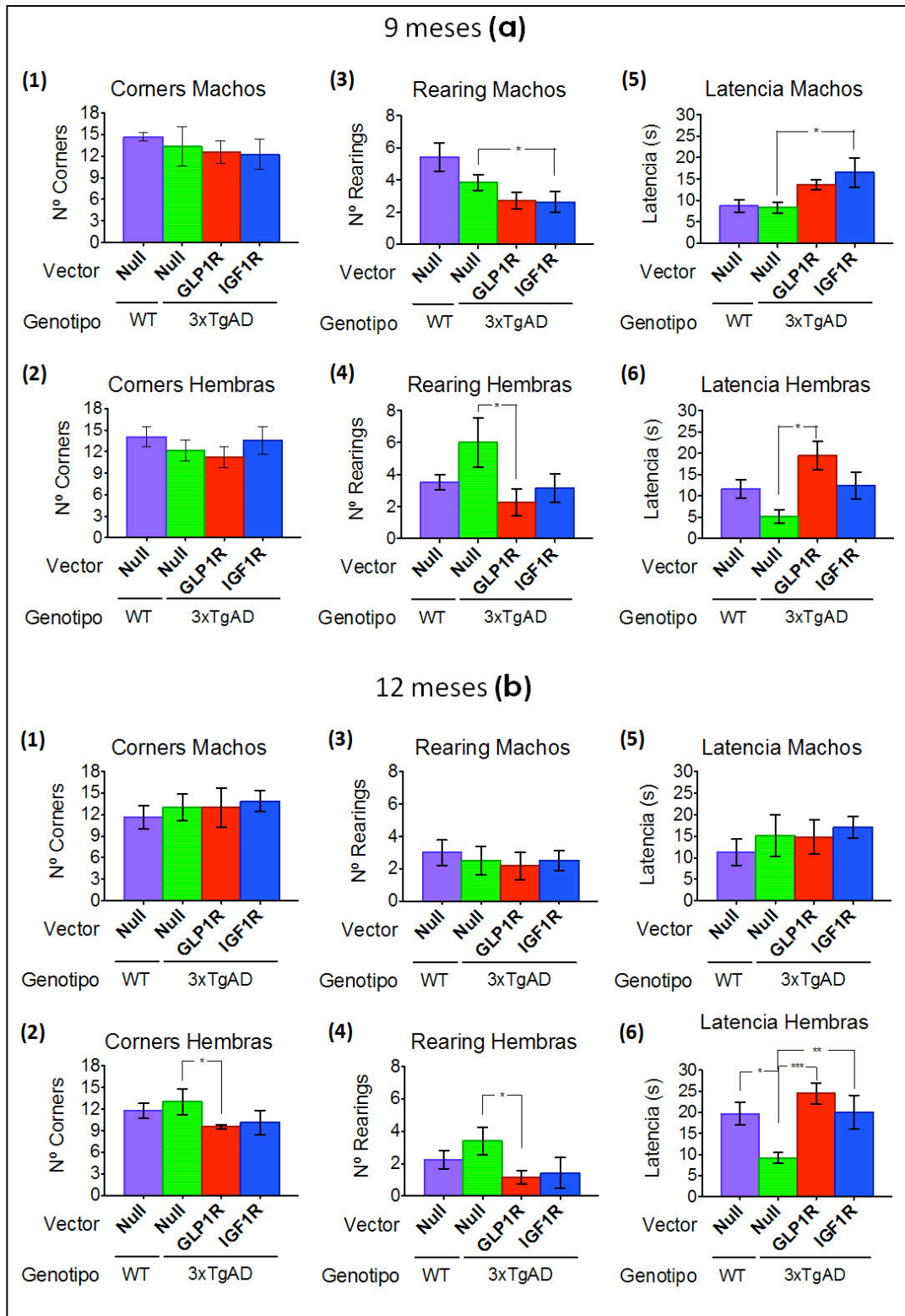


Figura 3.33. Reducción de la neofobia en las hembras inyectadas con AAV2/rh10-IGF1R y AAV2/rh10-GLP1R. Los gráficos muestran los resultados del *Corner Test* (expresados como la media±SEM) realizado sobre los animales inyectados a 9 (a) y 12 meses de edad (b). a/b,1/2, Número de esquinas visitadas por machos y hembras, respectivamente, a/b,3/4, Número de rearings realizados por machos y hembras, respectivamente, a/b,5/6, Latencia en realizar el primer rearing de machos y hembras, respectivamente. Se observan diferencias en la latencia del primer rearing y el número total de rearings realizados por las hembras a 9 y 12 meses (Test t-Student, *p<0,05, **p<0,01).

No se observan cambios en la actividad horizontal, ni debidos al sexo, ni al genotipo. Sólo existe una pequeña tendencia a la baja desde los 9 a los 12 meses de edad.

En cambio, el perfil mostrado por machos y hembras en lo que respecta a la actividad vertical sí es muy diferente. Mientras que en los machos no se observan diferencias significativas debido al genotipo ni en el número de rearings ni en la latencia en realizar el primer rearing, en las hembras 3xTgAD se observa una latencia menor que las hembras WT en el primer rearing, acompañada de mayor actividad vertical mantenida durante toda la prueba. Esta hiperactividad puede deberse a una mayor ansiedad, que se mantiene a 9 y 12 meses, y es corregido por ambos tratamientos. Como ocurría con la actividad horizontal, también se observa un leve descenso, uniforme en todos los grupos, en la actividad vertical debido a la edad.

Este comportamiento hiperactivo de las hembras 3xTgAD se convierte en un completo freezing cuando se las somete a la prueba del *Open Field* (Figura 3.17), durante el cual no consiguen salir del centro, confirmando un elevado nivel de ansiedad. En cambio, en los machos este efecto no es tan acusado, y aunque el freezing inicial es mayor que en los animales WT, debido a la alta variabilidad no alcanzan la significación estadística, y algunos de ellos llegan incluso a la periferia. Lo que sí es significativo es que, tanto en

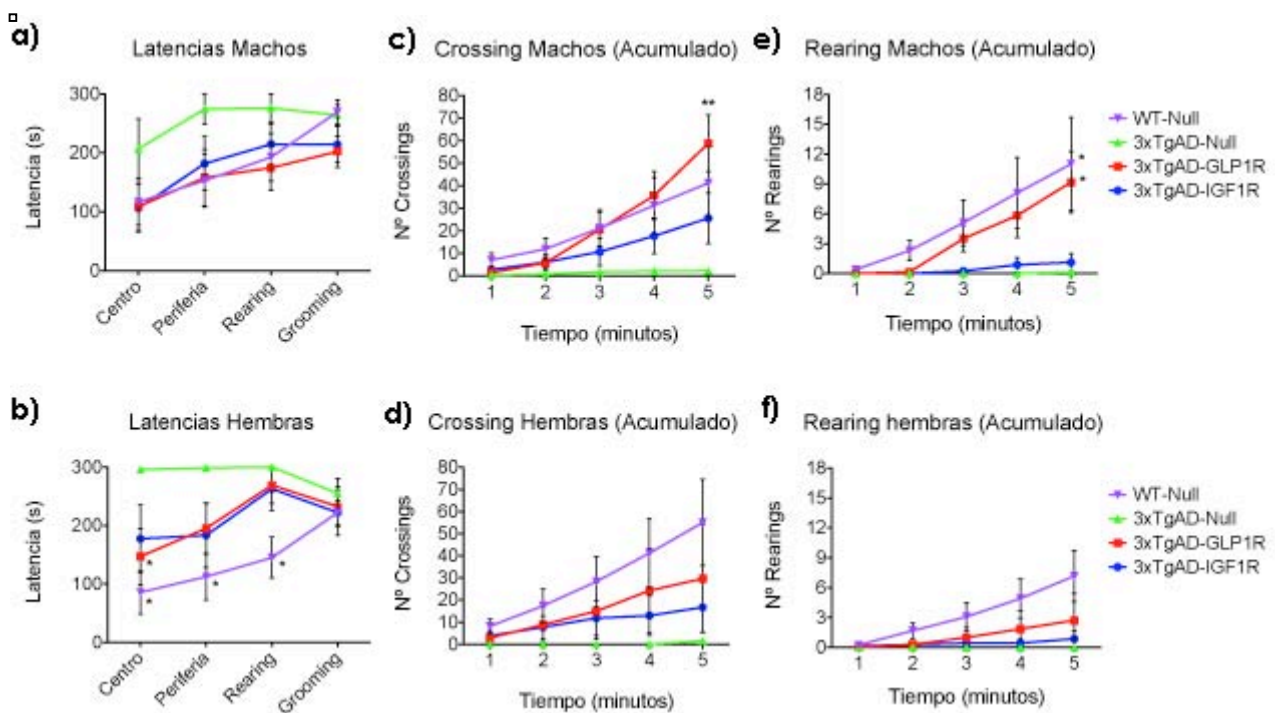


Figura 3.34. Aumento moderado de la actividad horizontal y vertical en los animales 3xTgAD inyectados con los vectores AAV2/rh10-IGF1R y AAV2/rh10-GLP1R. En los gráficos se representan los datos obtenidos (expresados con la media \pm SEM) de la prueba del *Open Field* llevada a cabo por los animales inyectados. *a, b*, Latencias de machos y hembras, respectivamente, en su actividad exploratoria, con diferencias significativas éntrelas hembras WT y las 3xTgAD, que se corrigen ligeramente en ambos tratamientos (ANOVA de una vía, * $p < 0,05$). *c, d*, actividad horizontal de machos y hembras, respectivamente, cuantificada como el número de líneas horizontales cruzadas en su recorrido a lo largo de los 5 minutos de la prueba. *e, f*, actividad vertical de machos y hembras, respectivamente, cuantificada como el número de rearings realizados a lo largo de los 5 minutos. Se observan diferencias significativas entre los machos WT y los 3xTgAD, que se corrigen con la inyección del vector AAV2/rh10-GLP1R (Test t-Student, * $p < 0,05$, ** $p < 0,05$).

hembras como en machos 3xTgAD, se observa una tigmotaxis (tendencia a permanecer junto a las paredes) alterada, y mientras que entre el 60 y 70% de los animales WT tienden a ir hacia la periferia y mantenerse junto a las paredes del aparato, esto sólo ocurre en el 0-20% de los casos en los animales 3xTgAD sin tratar.

Ambos tratamientos consiguen recuperar este comportamiento tanto en machos como en hembras hasta un 50-70%.

Por otra parte, dentro de los animales WT se pueden observar pequeñas diferencias asociadas al sexo. Así, las hembras presentan una leve tendencia a una mayor actividad horizontal, aunque no llega a ser estadísticamente significativa al compararlas con los machos. Esto hace que mientras que en los machos ambos tratamientos hacen que los animales lleguen a niveles similares a los de los WT, en las hembras estos valores se encuentran a medio camino entre los de las hembras 3xTgAD sin tratar y las hembras WT.

En cambio, en el caso de la actividad vertical, los efectos de ambos tratamientos son mucho más modestos, dando valores mucho más cercanos a los de los animales 3xTgAD sin tratar para ambos tratamientos en el caso de las hembras, y en el caso de los machos el único tratamiento que consigue recuperar la actividad vertical de los animales hasta niveles de los de los animales WT es el del AAV10-GLP1R.

Así, si bien en la prueba del *Corner Test* las hembras mostraban una clara hiperactividad provocada, probablemente, por la ansiedad y la neofobia que experimentan en la prueba, en este caso observamos que la ansiedad/temor de las hembras en el *Open Field* provoca una ausencia casi total de actividad locomotora. En el caso de los machos, esta ansiedad es algo menor que en las hembras y no se debe tanto a la novedad (no se observa neofobia en el *Corner Test*), sino a la exposición a un espacio abierto e iluminado, que provoca temor. En este caso, la explicación también podría encontrarse en la existencia de un comportamiento de apatía, de forma similar a lo que ocurre en los pacientes de AD (Chung and Cummings, 2000).

En la prueba de la caja *Black-and-White*, las hembras 3xTgAD vuelven a mostrar un comportamiento de cierta hiperactividad y desinhibición conductual como ocurría en el *Corner Test*, mientras que en los machos, por el contrario, volvemos a observar un comportamiento de temor por los espacios iluminados. Así, la latencia en salir del compartimento negro al blanco aumenta de forma significativa en el caso de los machos 3xTgAD en comparación con los machos WT, pero, en cambio, las hembras 3xTgAD, tienden a salir antes que las hembras WT, aunque sin significación estadística. En concordancia con esto, el número de veces que los machos 3xTgAD salen al compartimento blanco y el tiempo que pasan en el mismo es significativamente menor que las veces que lo hacen los machos WT, y en las hembras ocurre al contrario (Figura 3.18). La desinhibición conductual de las hembras en esta prueba no coincide con los resultados del *Open Field*, lo que puede deberse a que el carácter ansiogénico del mismo es mayor.

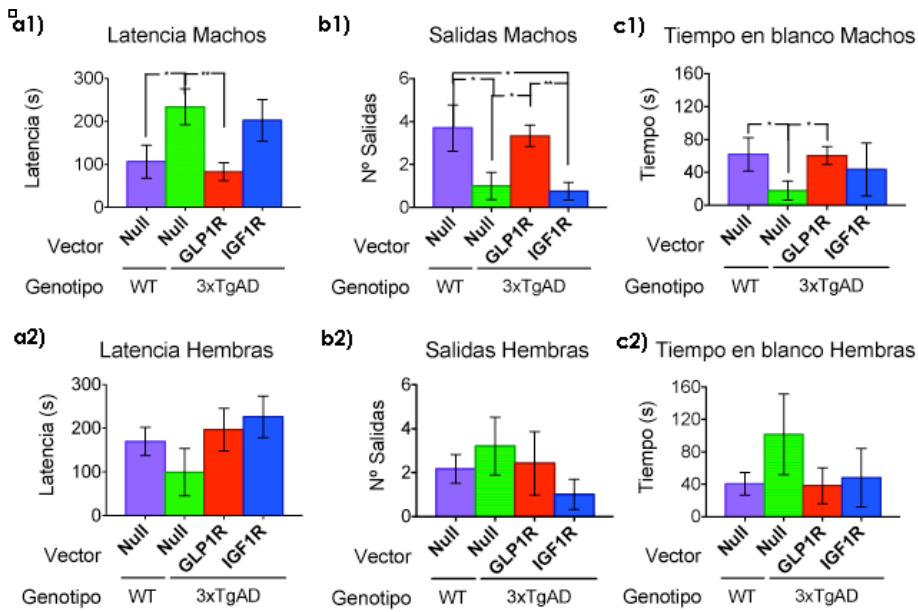


Figura 3.35. Diferencias en la latencia en salir del compartimento negro al blanco y en el número de veces y el tiempo que los animales pasan en el compartimento blanco. *a1, a2*, latencia de los machos y hembras, respectivamente, en salir del compartimento negro al blanco. *b1, b2*, Número de veces que los animales salen del compartimento negro. *c1, c2*, Tiempo que los animales pasan en el compartimento blanco. Se observan diferencias significativas entre los machos WT y los 3xTgAD, revertidas por el tratamiento con el vector AAV/rh10-GLP1R (Test t-Student, * $p < 0,05$).

También se ha analizado la actividad exploratoria horizontal y vertical de los animales en cada uno de los dos compartimentos del aparato. En concordancia con los resultados anteriores, los animales WT realizan su actividad exploratoria preferentemente en el compartimento negro, siendo ésta del doble que la actividad del compartimento blanco, tanto para los machos como para las hembras. En cambio, los machos 3xTgAD aumentan la proporción de actividad en el negro respecto al blanco y en las hembras ocurre al

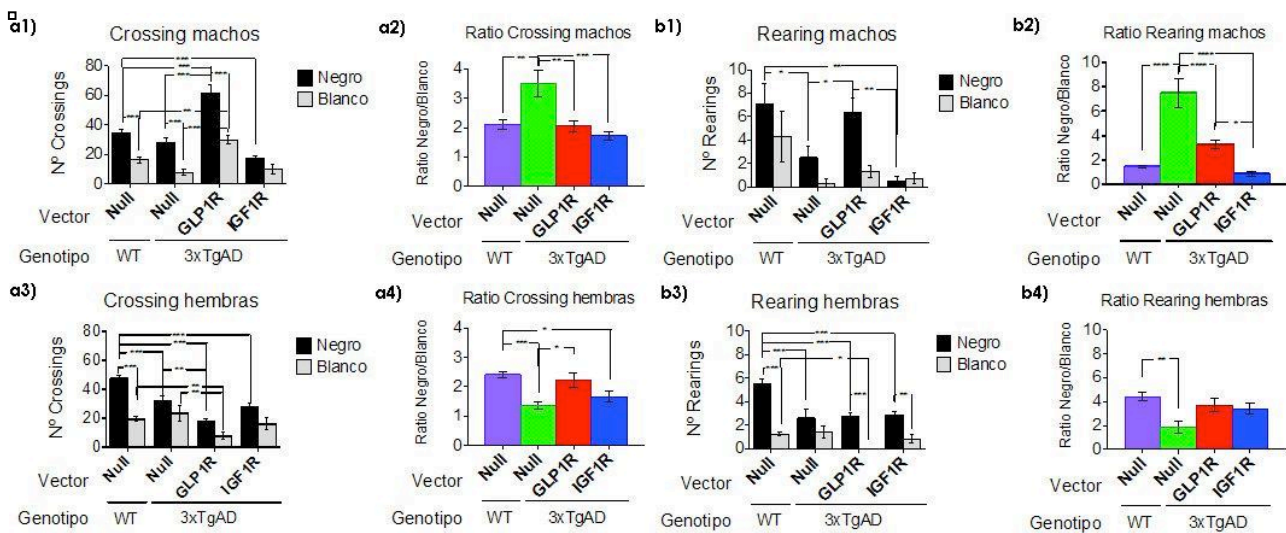


Figura 3.36. Diferencias en la actividad exploratoria en el compartimento blanco y en el negro. Los gráficos representan la actividad horizontal (*a*) y vertical (*b*) de los animales inyectados. *a1*, Número de cruces de los machos en los compartimentos blanco y negro. *a2*, Ratio entre el número de cruces de los machos en el compartimento negro y el blanco. *a3*, Número de cruces de las hembras en los compartimentos blanco y negro. *a4*, Ratio entre el número de cruces de las hembras en el compartimento negro y el blanco. *b1*, Número de levantamientos de los machos en los compartimentos blanco y negro. *a2*, Ratio entre el número de crulevantamientos de los machos en el compartimento negro y el blanco. *a3*, Número de levantamientos de las hembras en los compartimentos blanco y negro. *a4*, Ratio entre el número de levantamientos de las hembras en el compartimento negro y el blanco. Los gráficos representan las medias de los valores, y las barras de error \pm el error estándar. Se observan diferencias significativas entre los machos 3xTgAD y el resto de grupos, así como entre las hembras 3xTgAD y el resto (ANOVA de dos vías, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). También se observan diferencias entre las hembras 3xTgAD y los machos 3xTgAD.

contrario, siendo aproximadamente equivalente la actividad en ambos compartimentos (Figura 3.19). Así pues, los machos continúan mostrando un patrón de inhibición conductual asociado a la ansiedad, mientras que en las hembras se observa una desinhibición similar a la encontrada en el *Corner Test*.

En lo que respecta a los animales 3xTgAD tratados, puede observarse que la sobreexpresión de GLP-1R permite normalizar el comportamiento de los animales 3xTgAD tanto en machos como en hembras, mientras que la sobreexpresión de IGF-1R sólo es efectiva en las hembras. De hecho, en los machos 3xTgAD-IGF1R, la inhibición conductual puede observarse incluso en el compartimento negro.

Por otra parte, otra forma de evaluar el nivel de ansiedad de los animales es contando las defecaciones que realizan a lo largo de la prueba. Así, observamos que, si bien no observamos diferencias estadísticamente significativas, en el caso de las hembras 3xTgAD-Null se observa una tendencia a realizar un mayor número de defecaciones que el resto de grupos (Tabla 3.4), lo que indica que la desinhibición conductual presentada se debe a un aumento moderado en la ansiedad experimentada por las hembras 3xTgAD en comparación con los otros grupos de hembras.

	WT-Null	3xTgAD-Null	3xTgAD-GLP1R	3xTgAD-IGF1R
Machos	2,1±1,4	3,3±1,5	3,5±1,4	3,1±1,9
Hembras	3,9±3,0	6,0±1,6	4,1±1,9	4,9±2,1

Tabla 3.4. Diferencias en las defecaciones de los animales en la caja Black-and-White.

Así pues, el conjunto de todas las pruebas realizadas para analizar los BPSD de los animales 3xTgAD indican que éstos experimentan una ansiedad (o temor) más elevada que los animales WT y que existe un dimorfismo sexual en cuanto a la forma en que los animales reaccionan ante esta ansiedad. Así, los machos 3xTgAD tienen a presentar una mayor inhibición conductual que los machos WT, mientras que la conducta de las hembras depende del grado de ansiogenicidad de la prueba. Concretamente, el comportamiento de las hembras 3xTgAD es de desinhibición en situaciones de ansiedad leve o moderada y de inhibición en condiciones de ansiedad elevada. La sobreexpresión de GLP-1R en machos 3xTgAD consigue corregir su comportamiento hasta valores similares a los de los machos WT, mientras que la sobreexpresión de IGF-1R no consigue provocar cambios en el comportamiento de los machos 3xTgAD. En cambio, en las hembras, ambos tratamientos consiguen efectos moderados y similares.

3.2.4. Capacidad de aprendizaje y memoria de los animales inyectados

3.2.4.1. Memoria de trabajo espacial (Spatial working memory)

Para medir la memoria de trabajo de los animales en este estudio se ha empleado la prueba del *T-maze*, durante el cual los machos 3xTgAD presentan un mayor freezing inicial, así como una mayor latencia en girarse hacia el brazo abierto de la T. También tardan más los machos 3xTgAD en llegar hasta la intersección en comparación con los machos WT (Figura 3.20 a). Esta reducción en la actividad locomotora de los machos 3xTgAD, en este caso, no puede explicarse por la existencia de un comportamiento ansioso, pues la estructura es negra y cerrada y los animales no experimentan miedo ni ansiedad. Así pues, en este caso podemos concluir que, además de la ansiedad observada en la prueba del *Open Field* y la caja *Black-and-White*, los machos 3xTgAD también presentan cierto comportamiento de apatía. En el caso de los machos 3xTgAD tratados, se observa una normalización de este comportamiento hasta valores similares a los de los machos WT. En cambio, la actividad de las hembras 3xTgAD no es distinta de la de las hembras WT (Figura 3.20 b). Podemos así concluir que las hembras 3xTgAD presentan un comportamiento diferente al de las hembras WT sólo cuando la prueba tiene un componente ansiogénico.

En cuanto a las diferencias en la memoria de trabajo entre los diferentes grupos, las observamos en el porcentaje de alternancia espontánea. Al dejar al animal explorar libremente el laberinto, se considera que realiza correctamente la alternancia si pasa de un brazo a otro sin repetir el anterior. Según este criterio, observamos que las hembras 3xTgAD realizan una alternancia significativamente menor que las hembras WT y que el tratamiento con el vector AAV2/rh10-GLP1R recupera ligeramente este comportamiento, pero esto no ocurre en el caso de las hembras 3xTgAD tratadas con el AAV2/rh10-IGF1R. Por otra parte, casi la tercera parte de los machos 3xTgAD-Null no realizan la prueba debido a la apatía que presentan, pero los animales que sí la realizan no muestran un déficit en la memoria de trabajo.

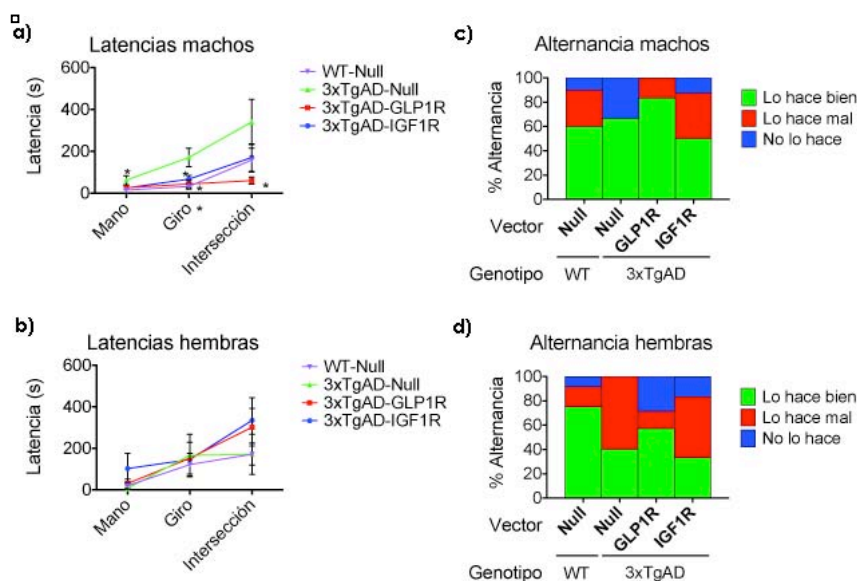


Figura 3.20. Diferencias en el comportamiento y en el grado de alternancia de los animales inyectados en el T-maze. *a, b*, representación de las latencias de machos y hembras, respectivamente de su actividad dentro del T-maze. *c, d*, porcentaje en la alternancia de machos y hembras, respectivamente, y de los animales que no llevan a cabo el test (azul). Se observan diferencias significativas en el tiempo que tardan en llegar a la intersección entre los machos 3xTgAD inyectados con el vector AAV2/rh10-GLP1R y los inyectados con el AAV2/rh10-Null (ANOVA de una vía, * $p < 0,05$)

3.2.4.2. Aprendizaje espacial y memoria de referencia

Para acabar el análisis sobre el comportamiento y la capacidad de aprendizaje de los animales inyectados, la última de nuestra batería de pruebas de comportamiento es el *Morris Water Maze*. Para ello, empleamos una piscina de 1 metro de diámetro y una estrategia de 1 día con la plataforma visible y marcada con una bandera (*Cue*), seguido de 4 días de entrenamiento con la plataforma oculta (*Place Task, PT*). Se realizaron 4 trials por día de 60 segundos cada uno. Al final del entrenamiento, se llevó a cabo una prueba de memoria 2 horas después del último trial, y durante la cual se eliminó la plataforma (*Removal*) para medir la memoria a corto plazo. Esta prueba se repitió a las 24 horas del último trial del último día (PT4.4) para medir la memoria a largo plazo. Todos los trials fueron grabados en vídeo y posteriormente analizados con la ayuda del software *Smart 3.0* de *Panlab*. De esta manera, en cada trial se midió el tiempo que cada animal tarda en encontrar la plataforma y tocarla (sin necesidad de que el animal se suba a la misma), la distancia que nada para ello y la velocidad a la que lo hace.

Lo primero que observamos fue que los machos WT tenían una elevada tendencia a flotar en la superficie del agua sin nadar, con una actitud pasiva (Tabla 3.5). La incidencia de este comportamiento es menor en los animales 3xTgAD, aunque aumenta notablemente en los animales inyectados con los vectores AAV2/rh10-GLP1R y AAV2/rh10-IGF1R.

Flotación (continúa)												
	Cue1	Cue2	Cue3	Cue4	PT1.1	PT1.2	PT1.3	PT1.4	PT2.1	PT2.2	PT2.3	PT2.4
WT-Null (n=10)	3	8	6	5	5	9	9	5	6	6	8	6
3xTgAD-Null (n=6)	0	3	2	4	0	2	3	5	0	2	1	1
3xTgAD-GLP1R (n=7)	0	2	2	3	2	0	3	2	3	5	3	6
3xTgAD-IGF1R (n=7)	1	4	4	7	1	2	1	3	1	3	5	3

Flotación (continuación)										
	PT3.1	PT3.2	PT3.3	PT3.4	PT4.1	PT4.2	PT4.3	PT4.4	Removal 2h	Removal 24h
WT-Null (n=10)	6	4	7	8	7	7	7	7	8	3
3xTgAD-Null (n=6)	0	0	2	4	0	2	2	3	1	0
3xTgAD-GLP1R (n=7)	2	3	5	5	2	3	5	5	5	0
3xTgAD-IGF1R (n=7)	2	2	1	5	1	4	5	6	5	1

Tabla 3.5. Número de machos que flotan pasivamente en cada trial para los diferentes grupos experimentales.

Además, el análisis de los datos muestra que en el caso de los animales 3xTgAD-Null, ningún animal flota pasivamente en el primer trial de cada día, y este comportamiento aparece a lo largo del día y va aumentando en los trials sucesivos. Debido a que en el resto de grupos esto sólo ocurre el primer día, descartamos que pudiera deberse a agotamiento físico.

Todo ello nos hizo pensar que posiblemente la flotación pasiva se deba a una falta de motivación, que aparece como consecuencia del recuerdo de la experiencia previa. Según esta teoría, los animales 3xTgAD-Null no serían capaces de recordar la experiencia del día anterior, mientras que los animales WT y los 3xTgAD tratados con ambos vectores, sí lo son.

□

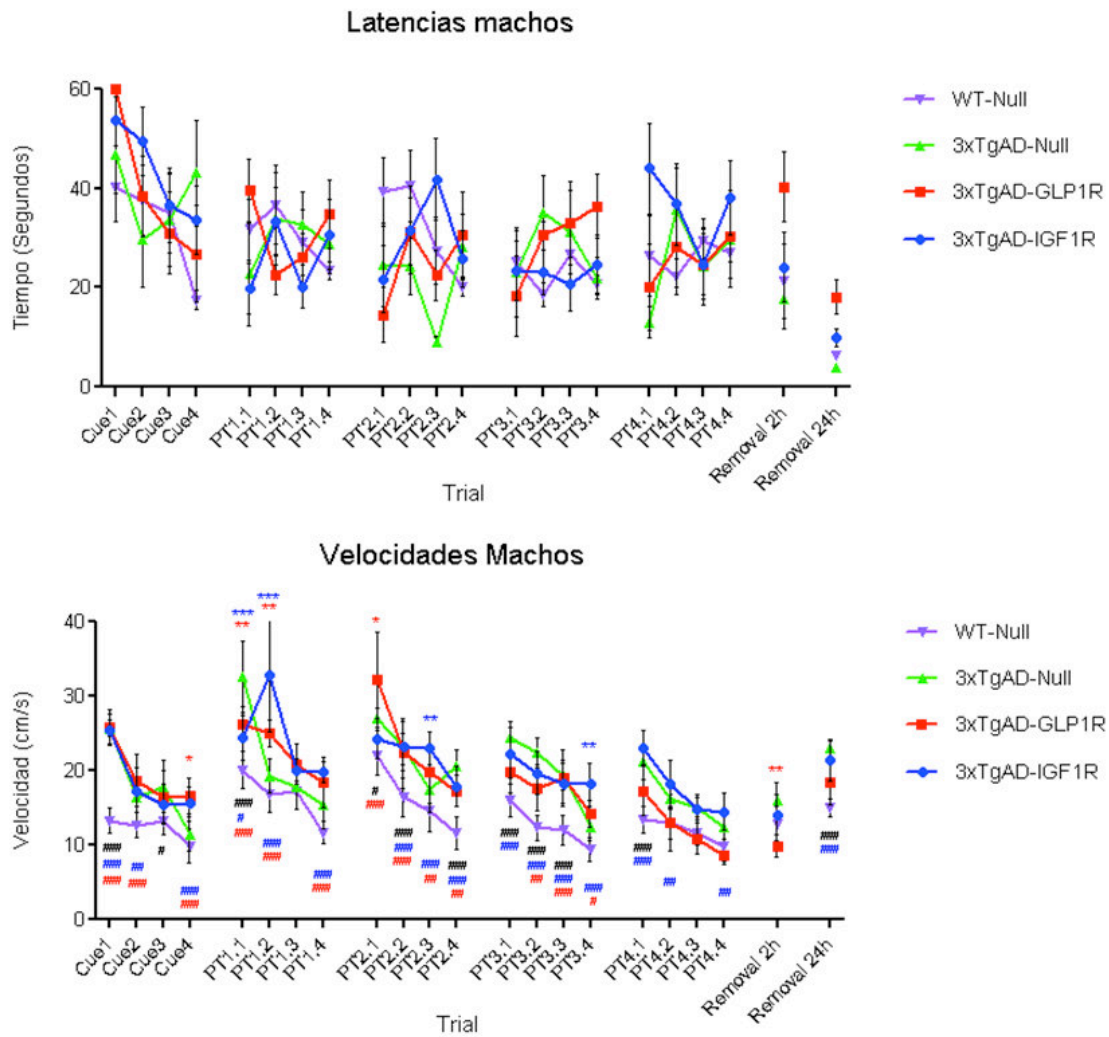


Figura 3.21. Diferencias en la velocidad de natación entre los machos 3xTgAD y los WT. Los gráficos representan los resultados de las latencias y las velocidades de los machos WT (n=10, morado), 3xTgAD-Null (n=6, verde), 3xTgAD-GLP1R (n=6, rojo) y 3xTgAD-IGF1R (n=7, azul) en el *Morris Water Maze*. Existen diferencias significativas en las velocidades de los animales 3xTgAD-Null, 3xTgAD-GLP1R y 3xTgAD-IGF1R respecto a los animales WT (ANOVA de dos vías, # negro, rojo y azul, respectivamente, $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$). También existen diferencias significativas de los animales 3xTgAD-GLP1R y 3xTgAD-IGF1R respecto a los 3xTgAD-Null (* rojo y azul respectivamente, $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Debido a este comportamiento, el tiempo que tardan los animales en encontrar la plataforma se ve afectado y, por tanto, cuando analizamos los datos sobre las latencias de cada animal encontramos que no existían diferencias entre grupos, ni mostraban una evolución temporal lógica de aprendizaje. Más bien al contrario, los valores subían y bajaban de un día a otro y dentro del mismo día (Figura 3.21 a). Sin embargo, cuando analizamos las velocidades de natación, sí encontramos diferencias claras entre los diferentes grupos (Figura 3.21 b).

Por tanto, decidimos analizar los datos de la distancia que nadan los animales hasta encontrar la plataforma, para poder medir su capacidad de aprendizaje y su memoria espacial. Para una mayor claridad, se han desglosado los datos en tres gráficos, un primer gráfico en el que se comparan sólo los animales WT con los 3xTgAD-Null (Figura 3.22 a) y otros dos en los que se añaden, respectivamente, los datos de los animales 3xTgAD-GLP1R (Figura 3.22 b) y 3xTgAD-IGF1R (Figura 3.22 c).

Así, en el primer día de entrenamiento, con la bandera (*Cue*), la distancia nadada por los animales WT hasta llegar a la plataforma es significativamente menor que la de los otros tres grupos, especialmente en el primer trial. Esto puede deberse a una mayor capacidad de los animales WT para detectar la bandera y asociarla con la localización de la plataforma. También se observan diferencias en la *Cue4*, lo que indica una mayor capacidad de aprendizaje de los animales WT en comparación con los 3xTgAD, y ninguno de los dos tratamientos son capaces de recuperar los déficits de los animales 3xTgAD en el aprendizaje.

Para valorar la capacidad de aprendizaje de los animales calculamos las diferencias en las distancias recorridas por los animales entre los diferentes *trials* de un mismo día. Así, observamos que los machos WT presentan un perfil de aprendizaje progresivo durante los 4 primeros días, dentro de los cuales se observan diferencias desde los resultados del primer trial a los del último y su máxima capacidad de aprendizaje, alcanzada en la *Cue4*, la vuelven a conseguir en la *PT3.4*. En cambio, los machos 3xTgAD sólo son capaces de aprender el día de la bandera y el cuarto día de entrenamiento. Además, es también en el cuarto día de entrenamiento cuando los machos WT muestran capacidad de retención entre el último trial del día anterior (*PT2*) y el primero de ese día. En cambio, aunque los machos 3xTgAD son capaces de aprender el día de la bandera, y retener lo aprendido al día siguiente (*PT1*), la dificultad es mucho menor, puesto que las distancias recorridas hasta la plataforma en la *Cue4* de los 3xTgAD son significativamente mayores que las de los machos WT y no es hasta el cuarto día de entrenamiento cuando son capaces de llegar a la plataforma con la mínima distancia observada para los animales 3xTgAD al final del día y repetir estos resultados.

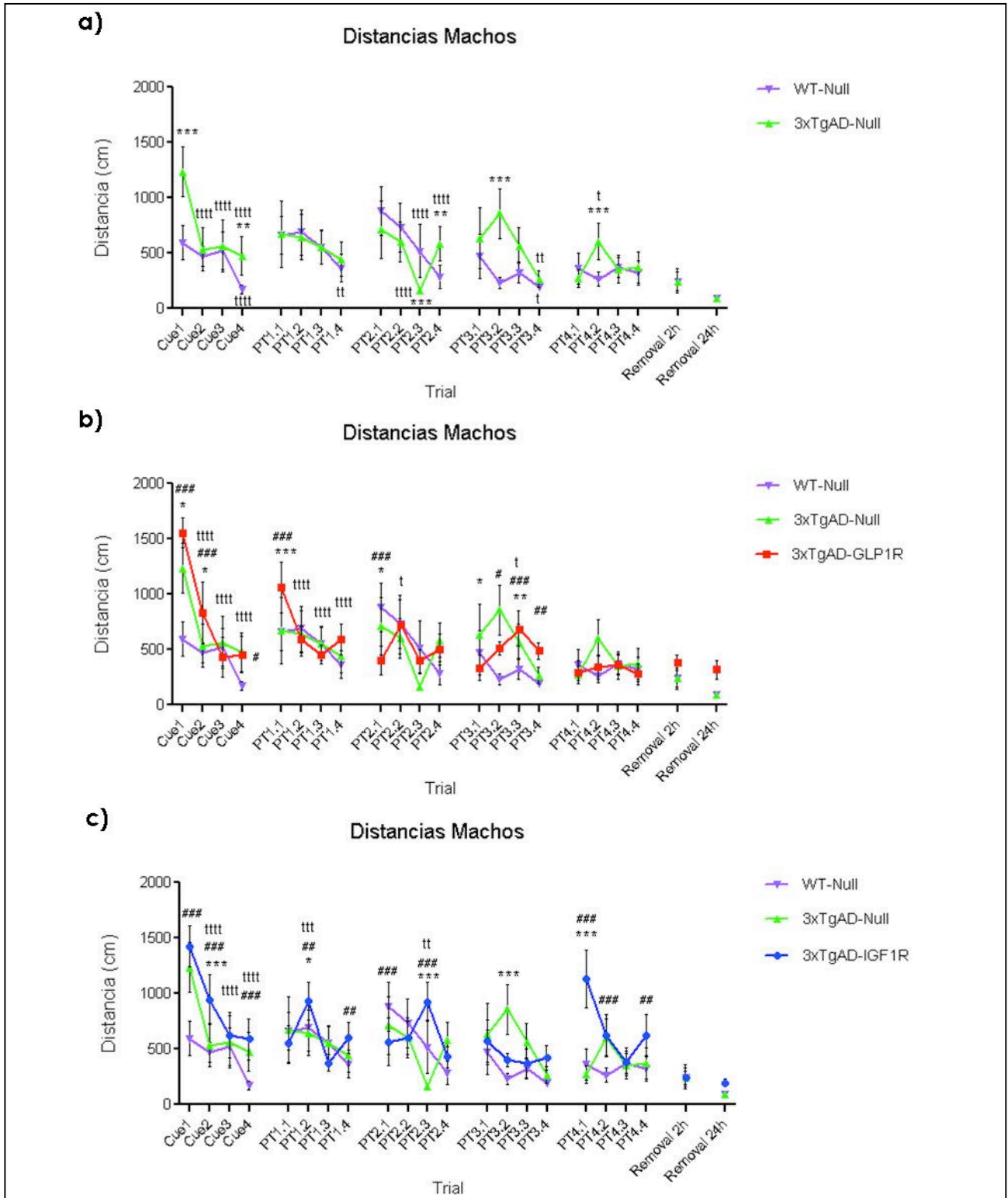


Figura 3.22. Diferencias en el aprendizaje y retención de los machos 3xTgAD. Los gráficos representan los resultados de las distancias nadadas por los machos WT (n=10, morado), 3xTgAD-Null (n=6, verde), 3xTgAD-GLP1R (n=6, rojo) y 3xTgAD-IGF1R (n=7, azul) en el *Morris Water Maze*. Existen diferencias significativas en las velocidades de los animales 3xTgAD-Null, respecto a los animales WT (ANOVA de dos vías, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). También existen diferencias significativas de los animales 3xTgAD-GLP1R y 3xTgAD-IGF1R respecto a los 3xTgAD-Null (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) y WT (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$). a, La evolución temporal de los machos 3xTgAD es clara durante el día de la bandera y durante la PT2 y PT3 (ANOVA de dos vías, t, $p < 0,05$ respecto al primer trial de cada día, tt, $p < 0,01$, ttt, $p < 0,001$, tttt, $p < 0,0001$). b, Los machos 3xTgAD sólo son capaces de aprender el día de la bandera y el siguiente. c, Los machos 3xTgAd-IGF1R sólo son capaces de aprender en el día de la bandera.

En cuanto a los animales tratados, se observa que ambos grupos, al igual que los 3xTgAD sin tratar, no son capaces de asociar la bandera con la localización de la plataforma en la *Cue1* como lo hacen los animales WT. Su aprendizaje durante este día es similar al de los animales 3xTgAD sin tratar y tampoco son capaces de aprender durante los días siguientes. Es decir, el tratamiento con los vectores AAV2/rh10-GLP1R y AAV2/rh10-IGF1R no mejora los déficits de los machos 3xTgAD en su capacidad de aprendizaje.

Por otra parte, para evaluar la memoria espacial a corto y largo plazo de los animales, analizamos las distancias nadadas por los animales durante la prueba del *removal* hasta llegar por primera vez a la zona donde se encontraba la plataforma, así como el número de veces que pasan por la misma (Figura 3.23). Así, para los machos observamos que no existen diferencias significativas en la memoria entre animales WT y 3xTgAD ni a corto ni a largo plazo, puesto que las distancias recorridas en ambos *removals* son similares entre animales 3xTgAD y WT. Tampoco se observan diferencias en el número de veces que pasan por la zona donde se encontraba la plataforma. En cambio, para los animales 3xTgAD tratados, si bien no existen diferencias en cuanto a las distancias, sí que las hay en el número de cruces por la zona de la plataforma. Así, el tratamiento con el AAV2/rh10-GLP1R hace que los animales pasen con menos frecuencia por la zona de la plataforma. En cambio, ya que la distancia que recorren hasta llegar por primera vez a dicha zona es similar a la del resto de grupos, pero su velocidad sí es significativamente menor que la de los animales 3xTgAD-Null debido a un mayor número de flotaciones, nos aventuramos a hipotetizar que los animales 3xTgAD-GLP1R son capaces de cambiar de una estrategia de búsqueda a una estrategia en la que no buscan la plataforma tras comprobar que ésta no está donde debería. En el *removal* realizado a las 24 horas, aunque todos los animales realizan más cruces por la zona de la plataforma que el día anterior, este número sigue siendo menor en el caso de los animales 3xTgAD tratados que en los animales WT y los 3xTgAD-Null, lo que podría implicar en una reducción del comportamiento perseverante en los 3xTgAD-IGF1R y 3xTgAD-GLP1R.

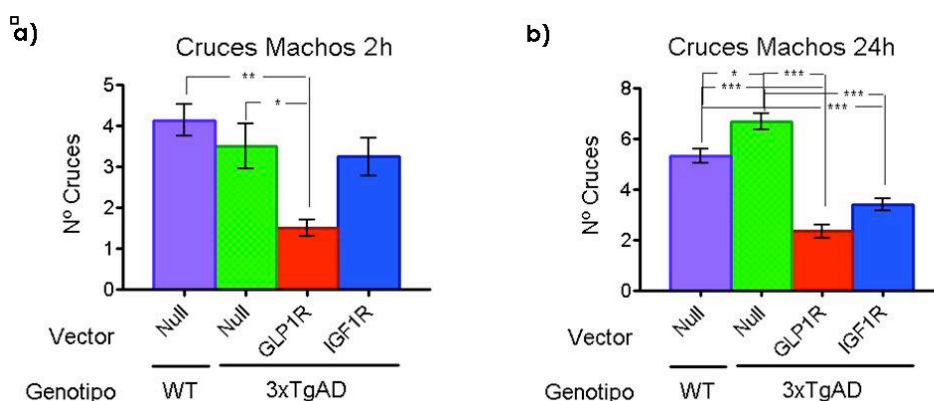


Figura 3.23. Diferencias en el número de veces que los animales pasan por la zona donde se encontraba la plataforma durante los removals. a, Cruces de los machos por la zona de la plataforma en el removal de las 2h, existen diferencias significativas con los animales 3xTgAD-GLP1R (ANOVA de una vía, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). b, Cruces de los machos por la zona de la plataforma durante el removal de las 24 horas, se observan diferencias significativas de los animales 3xTgAD tratados con los animales WT y los 3xTgAD sin tratar (ANOVA de una vía, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

Para comprobar esta hipótesis, analizamos las trayectorias de los machos durante las dos pruebas del *removal*. Concretamente, analizamos la trayectoria hasta el momento de encontrar la plataforma, así como la trayectoria total recorrida por el animal durante los 60 segundos que dura la prueba. La figura 3.24 muestra un ejemplo representativo para cada uno de los grupos experimentales, y descubrimos que en el removal de las 2 h, todos los animales van directos hacia la zona donde se encontraba plataforma, independientemente del genotipo y el tratamiento, y todos continúan su búsqueda dentro del mismo cuadrante, a excepción de los machos 3xTgAD-GLP1R, que abren más su trayectoria en busca de la plataforma. A

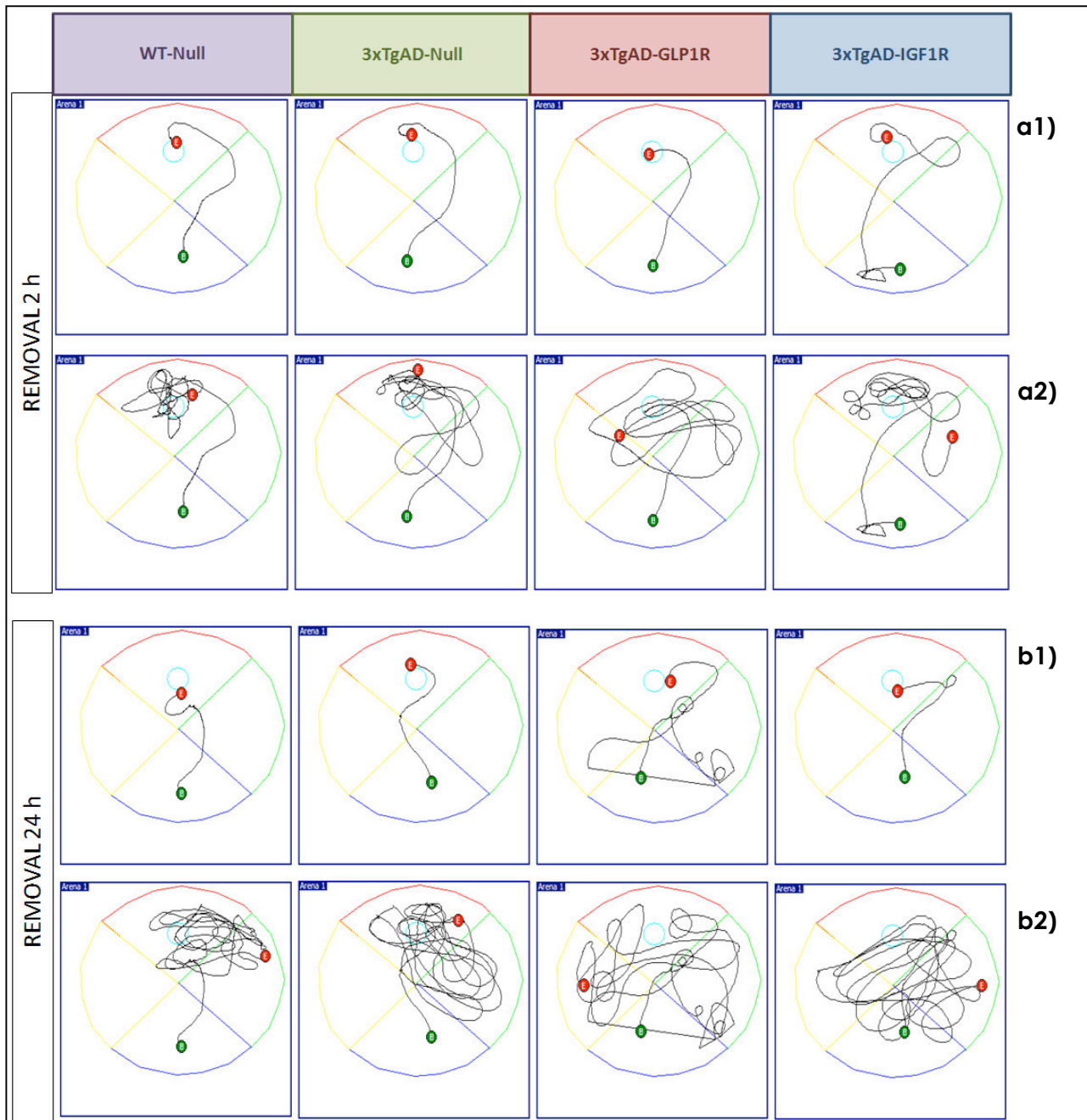


Figura 3.37. Estrategias de búsqueda de la plataforma de los machos durante las pruebas del *removal*. *a*, Trayectorias representativas de los machos durante el removal de las 2h hasta el momento en que pasa por primera vez por la zona donde se encontraba la plataforma (*a1*) y al final de los 60 segundos que dura la prueba (*a2*). *b*, Trayectorias representativas de los machos durante el removal de las 24h hasta el momento en que pasa por primera vez por la zona donde se encontraba la plataforma (*b1*) y al final de los 60 segundos que dura la prueba (*b2*).

las 24h, no sólo se observa que los machos 3xTgAD abren su trayectoria de búsqueda, sino que tampoco se dirigen de forma tan directa hacia la plataforma desde el inicio. En este caso, los machos 3xTgAD-IGF1R también amplían la zona de búsqueda tras no encontrar la plataforma en su localización habitual.

En resumen, los machos 3xTgAD muestran pequeños déficits en la capacidad de aprendizaje, aunque no en la memoria, en comparación con los animales WT. El tratamiento con los vectores generados en esta tesis no mejora estos déficits de aprendizaje, pero sí parece mejorar la flexibilidad de los animales en su búsqueda de la plataforma.

El mismo análisis se ha realizado para el comportamiento de las hembras en el *Morris Water Maze*. Así, en cuanto a la flotación pasiva, como ocurría en los machos, es muy frecuente entre las hembras WT, pero no en las 3xTgAD. En cambio, a diferencia de los machos, ninguno de los dos tratamientos cambia este comportamiento (Tabla 3.6).

Flotación (continúa)												
	Cue1	Cue2	Cue3	Cue4	PT1.1	PT1.2	PT1.3	PT1.4	PT2.1	PT2.2	PT2.3	PT2.4
WT-Null (n=12)	7	7	6	8	1	3	4	10	3	6	2	4
3xTgAD-Null (n=5)	0	0	2	2	1	0	0	0	0	1	1	1
3xTgAD-GLP1R (n=7)	0	2	2	3	0	1	0	1	1	2	0	3
3xTgAD-IGF1R (n=6)	2	4	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1

Flotación (continuación)										
	PT3.1	PT3.2	PT3.3	PT3.4	PT4.1	PT4.2	PT4.3	PT4.4	Removal 2h	Removal 24h
WT-Null (n=12)	2	3	3	4	4	5	4	5	7	6
3xTgAD-Null (n=5)	0	0	2	3	0	1	2	2	4	2
3xTgAD-GLP1R (n=7)	1	3	2	1	2	1	4	2	5	1
3xTgAD-IGF1R (n=6)	0	1	1	2	0	0	2	1	4	0

Tabla 3.6. Número de hembras que flotan pasivamente en cada trial para los diferentes grupos experimentales.

De manera que, al analizar los resultados de las latencias, observamos que, como ocurría en los machos, no son significativos debido a las diferencias en la incidencia de la flotación y, por tanto, en la velocidad (Figura 3.25). Los resultados relativos a las distancias indican que existen diferencias significativas entre la capacidad de aprendizaje de las hembras WT y la de las hembras 3xTgAD (Figura 3.26 a). Así, como ocurría con los machos, las hembras WT recorren una distancia mucho menor que las 3xTgAD durante la *Cue1*, gracias a su mayor capacidad para asociar la presencia de la bandera con la de la plataforma. Sin embargo, la máxima capacidad de aprendizaje alcanzada en la *Cue4* es la misma para ambos grupos. En el caso

de las hembras WT, el primer día de entrenamiento (*PT1*) ya consiguen llegar al mismo nivel de aprendizaje que en la *Cue4* y retienen lo aprendido para el día siguiente (*PT2*). En cambio, las 3xTgAD no consiguen el mismo nivel de aprendizaje ni de retener los resultados del día anterior hasta la *PT3*. Por otra parte, las hembras WT continúan aprendiendo hasta el último día, mientras que las 3xTgAD ya no son capaces de aprender más a partir de la *PT2*.

□

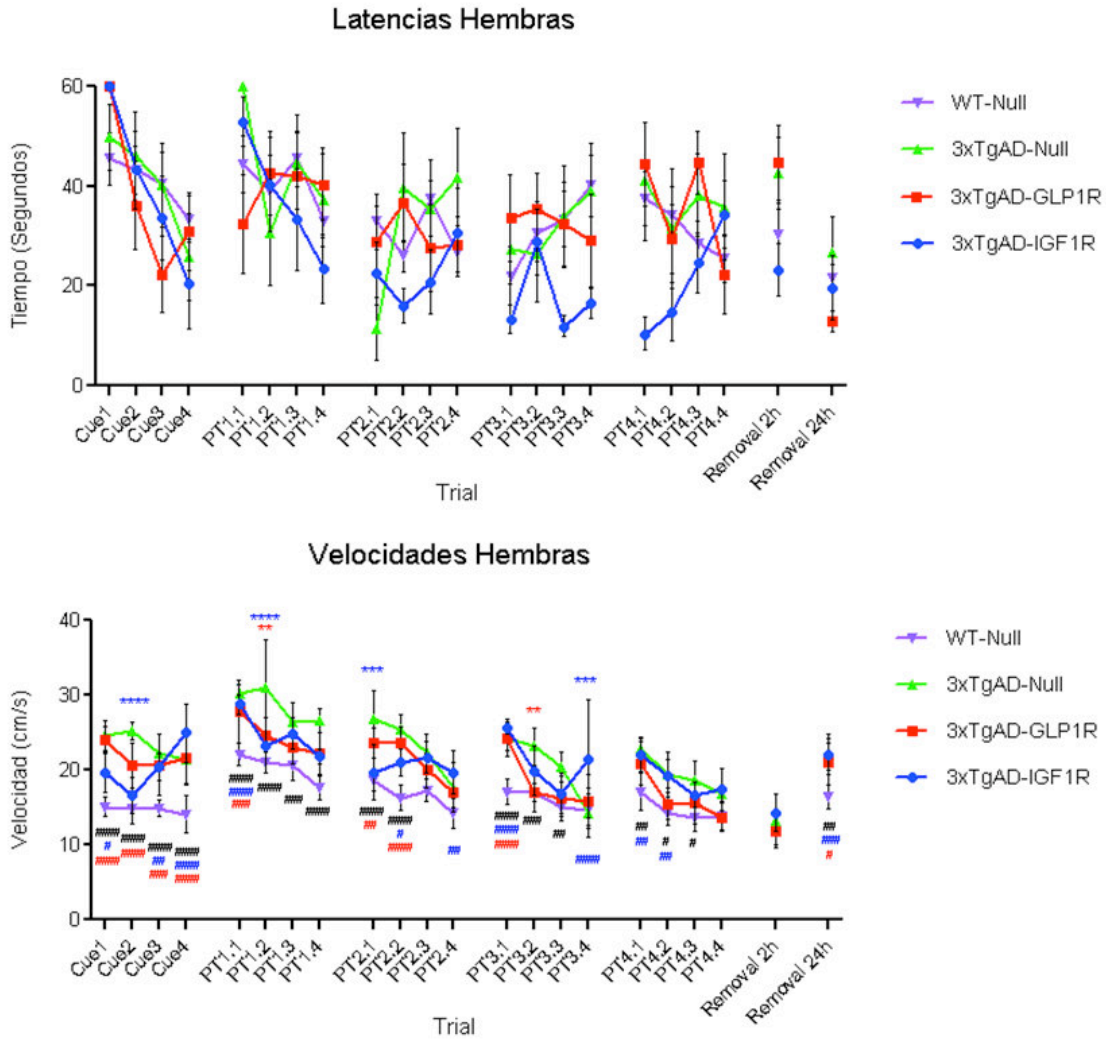


Figura 3.25. Diferencias en las velocidades de natación de las hembras. Los gráficos representan los resultados de las latencias y las velocidades de las hembras WT (n=12, morado), 3xTgAD-Null (n=5, verde), 3xTgAD-GLP1R (n=7, rojo) y 3xTgAD-IGF1R (n=8, azul) en el *Morris Water Maze*. Existen diferencias significativas en las velocidades de los animales 3xTgAD-Null, 3xTgAD-GLP1R y 3xTgAD-IGF1R respecto a los animales WT (ANOVA de dos vías, # negro, rojo y azul, respectivamente, $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$). También existen diferencias significativas de los animales 3xTgAD-GLP1R y 3xTgAD-IGF1R respecto a los 3xTgAD-Null (* rojo y azul respectivamente, $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

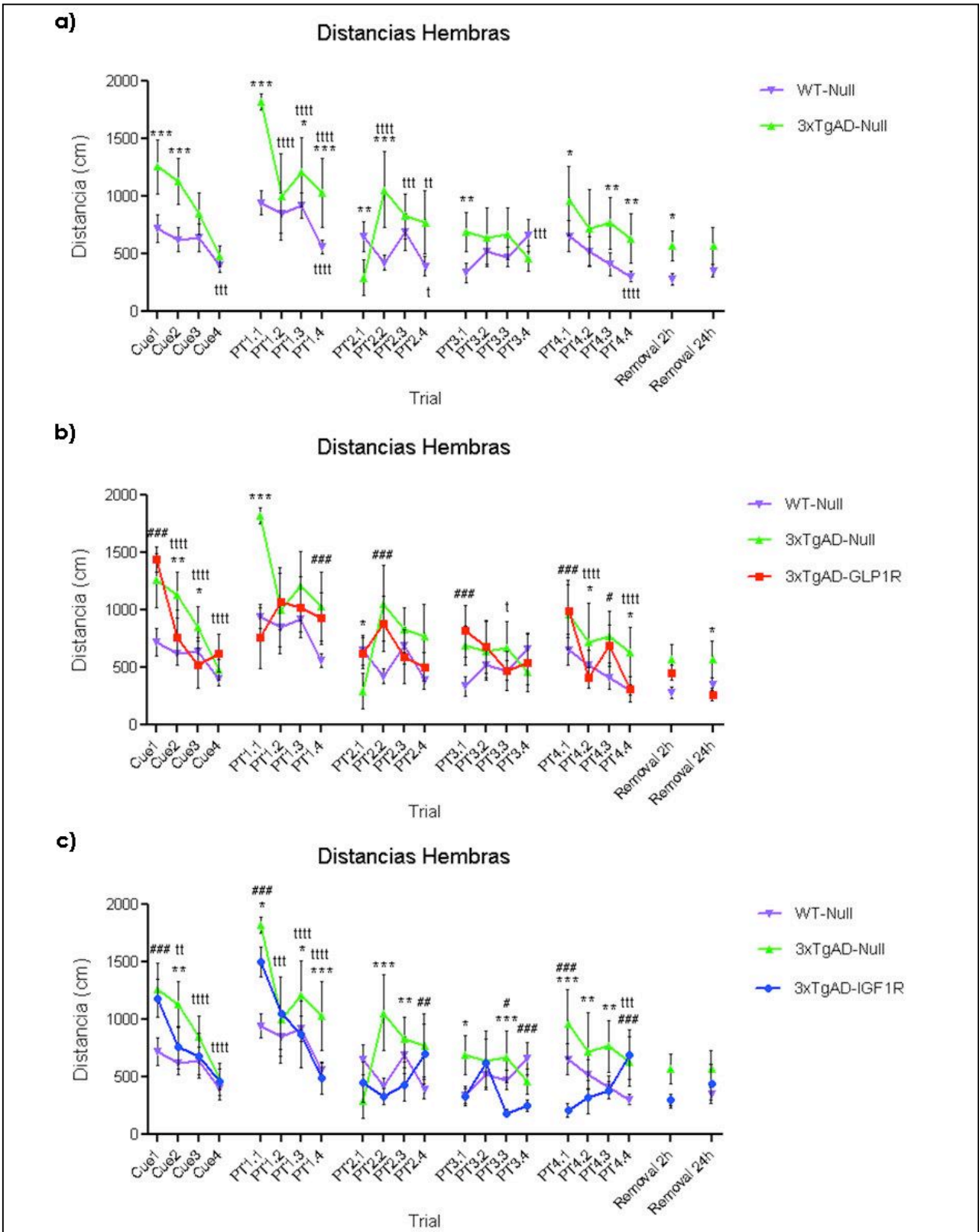


Figura 3.38. Diferencias en el aprendizaje y retención de las hembras 3xTgAD. Los gráficos representan los resultados de las distancias nadadas por las hembras WT (n=12, morado), 3xTgAD-Null (n=5, verde), 3xTgAD-GLP1R (n=7, rojo) y 3xTgAD-IGF1R (n=8, azul) en el Morris Water Maze. Existen diferencias significativas en las velocidades de los animales 3xTgAD-Null, respecto a los animales WT (ANOVA de dos vías, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001). También existen diferencias significativas de los animales 3xTgAD-GLP1R y 3xTgAD-IGF1R respecto a los 3xTgAD-Null (* p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001) y WT (#p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001). a, La evolución temporal de las hembras 3xTgAD es clara durante los dos primeros días y el último, manteniéndose estable durante la PT2 y PT3 (ANOVA de dos vías, t, p<0,05 respecto al primer trial de cada día, tt, p<0,01, ttt, p<0,001, tttt, p<0,0001). b, Las hembras 3xTgAD sólo son capaces de aprender el día de la bandera y el último día de entrenamiento. c, Las hembras 3xTgAd-IGF1R son capaces de aprender en la PT2 hasta el mismo nivel de las hembras WT.

Por lo que respecta al efecto de los tratamientos, el perfil de aprendizaje de las mismas es similar al de las 3xTgAD-Null durante el primer día, pero durante los días siguientes, el perfil es muy diferente. Así, las tratadas con el vector AAV2/rh10-GLP1R (Figura 3.26 b) son capaces de retener lo aprendido desde el primer día, pero luego no son capaces de aprender día a día, excepto en la PT4. En cambio, las hembras 3xTgAD-IGF1R (Figura 3.26 c) son capaces de retener desde la PT2 y presentan un perfil de aprendizaje hasta la PT3.

En el análisis de la memoria espacial de las hembras, observamos que las hembras 3xTgAD-Null y 3xTgAD-GLP1R recorren una distancia mayor que las WT y las 3xTgAD-IGF1R durante el *removal* de las 2 horas hasta alcanzar la zona donde se encontraba la plataforma. Es decir, las hembras 3xTgAD presentan déficits de memoria en comparación con las WT, que se recuperan con el tratamiento con el vector AAV2/rh10-IGF1R. Lo mismo ocurre con las hembras 3xTgAD-GLP1R en el *removal* de las 24 horas. Además, también existen diferencias entre el número de cruces que las hembras 3xTgAD realizan sobre la zona en la que se encontraba la plataforma durante el *removal* de las 2 horas y los de las hembras WT (Figura 3.27 a). Con el vector AAV2/rh10-IGF1R se revierten en parte estos niveles, mientras que con el vector AAV2/rh10-GLP1R las diferencias no son significativas respecto a los valores de las hembras 3xTgAD-Null. En el *removal* a las 24 horas no existen diferencias entre los diferentes grupos de hembras inyectadas en lo que respecta a los cruces por la zona de la plataforma. Esto podría deberse a que, debido a la experiencia del *removal* previo, los animales cambian de una estrategia de búsqueda focalizada al cuadrante donde se encontraba la plataforma a una estrategia de natación más general (Figura 3.27 b).

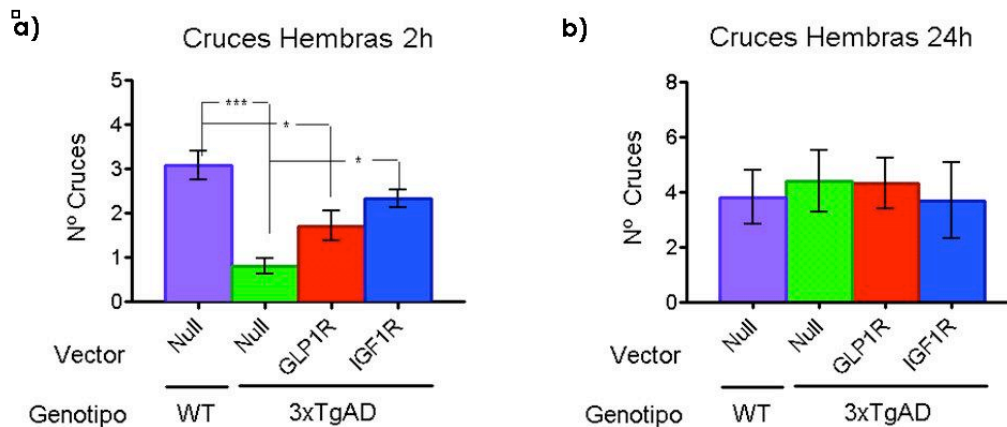


Figura 3.27. Número de cruces que realizan las hembras sobre la zona en la que se encontraba la plataforma. a, Cruces de las hembras sobre la zona de la plataforma durante el *removal* de las 2 horas, se observan diferencias significativas de los animales 3xTgAD-Null y 3xTgAD-GLP1R con los animales WT, y de las hembras 3xTgAD-IGF1R con las hembras 3xTgAD-Null (ANOVA de una vía, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$). b, Cruces de las hembras por la zona de la plataforma durante el *removal* de las 24 horas, no se observan diferencias significativas entre los diferentes grupos de hembras.

Para comprobar este cambio de estrategia, analizamos, al igual que lo hicimos con los machos, las trayectorias seguidas por las hembras en ambos *removals* hasta llegar por primera vez a la plataforma, y durante los 60 segundos que dura la prueba en total. En este caso, descubrimos, en primer lugar, que las hembras, en general, con independencia del genotipo y el tratamiento, no van tan directas hacia la zona donde debería encontrarse la plataforma como lo hacen los machos, como ya se refleja en una mayor dis-

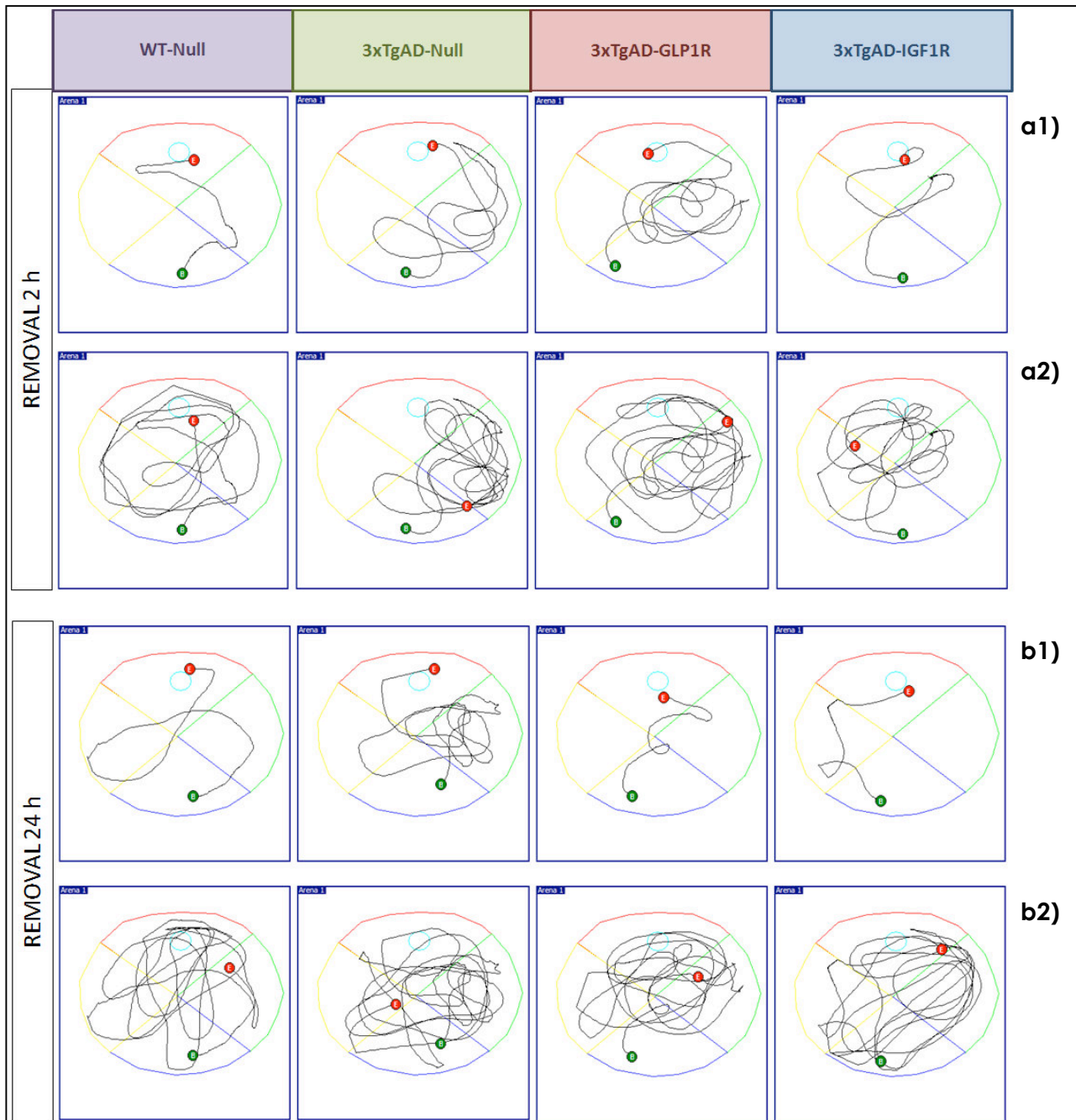


Figura 3.39. Estrategias de búsqueda de la plataforma de las hembras durante las dos pruebas del *removal*. *a*, Trayectorias representativas de las hembras durante el *removal* de las 2h hasta el momento en que pasa por primera vez por la zona donde se encontraba la plataforma (*a1*) y al final de los 60 segundos que dura la prueba (*a2*). *b*, Trayectorias representativas de las hembras durante el *removal* de las 24h hasta el momento en que pasa por primera vez por la zona donde se encontraba la plataforma (*b1*) y al final de los 60 segundos que dura la prueba (*b2*).

tancia recorrida durante la prueba. Además, para las hembras, a diferencia de los machos, sí se observan diferencias de genotipo en la trayectoria que describen hasta pasar por primera vez por la zona de la plata-

forma, pues no van directas y posteriormente la búsqueda la centran en un cuadrante erróneo, lo que indica los problemas de memoria espacial de las hembras 3xTgAD en comparación con las hembras WT, así como con los machos 3xTgAD. Por otra parte, tras no encontrar la plataforma donde debería estar, su búsqueda no es tan focalizada como la de los machos y se observa una tendencia a ampliar la búsqueda por otras zonas desde el *removal* de las 2 h, especialmente en las hembras WT y las 3xTgAD-IGF1R. En el *removal* de las 24h, en cambio, aunque las trayectorias iniciales hasta llegar por primera vez a la zona de la plataforma son similares a las del día anterior, la búsqueda posterior abarca toda la piscina en todos los grupos.

Lo que podemos concluir de todo esto es que las hembras 3xTgAD presentan déficits cognitivos (relativos tanto a la capacidad de aprendizaje, como a la memoria espacial y la flexibilidad cognitiva) cuando se comparan con hembras WT, y el tratamiento con el vector AAV2/rh10-IGF1R hace que se reviertan estos déficits, pero el efecto no es tan claro con el vector AAV2/rh10-GLP1R.

3.3. Análisis de la expresión vírica por PCR cuantitativa.

Al finalizar el análisis sobre el comportamiento y capacidades cognitivas de los animales inyectados, éstos fueron sacrificados por decapitación, y la mitad del cerebro de cuatro animales de cada grupo fue fijada en paraformaldehído 4% para realizar cortes histológicos. La otra mitad de estos cerebros y los del resto de animales de cada grupo se utilizaron para diseccionar el córtex prefrontal y el hipocampo. Con estas secciones se llevó a cabo una extracción de RNA para realizar fue una PCR cuantitativa y conocer hasta qué punto habíamos conseguido aumentar la expresión de IGF-1R y GLP-1R en los animales inyectados (Figura 3.29).

Lo que pudimos observar fue que, en el caso de los machos, se consigue una mayor sobreexpresión de ambos genes en el córtex prefrontal, y no en hipocampo. Teniendo en cuenta que las alteraciones en el comportamiento como la ansiedad y la apatía se relacionan con la funcionalidad del córtex prefrontal y sus conexiones con la amígdala, ésta podría ser la razón por la que los machos 3xTgAD tratados presentan poco efecto del tratamiento a nivel de memoria y capacidad de aprendizaje, pero sí que revierten los BPSD.

En cambio, en las hembras pasa al contrario, sí que se consigue elevar los niveles de expresión de IGF-1R y GLP-1R en hipocampo pero no en el córtex prefrontal, y en el caso de las hembras 3xTgAD-IGF1R sí que se consigue mejorar las habilidades cognitivas (asociadas a la funcionalidad del hipocampo) en comparación con las hembras 3xTgAD-Null.

Se desconocen las causas que podrían provocar estas diferencias en la efectividad de sobreexpresión de los transgenes en las diferentes áreas inyectadas en función del género del animal, puesto que la metodología fue siempre la misma y no se esperan, a priori, problemas para la expresión de los transgenes. No obstante, algunos estudios demuestran que la biodistribución y la eficiencia en la transducción de los vectores adenoasociados puede depender del género del animal cuando se administran por vía sistémica

(Paneda et al.), por lo que no es descartable que a nivel del CNS también existan diferencias para la transducción de neuronas de diferentes áreas cerebrales.

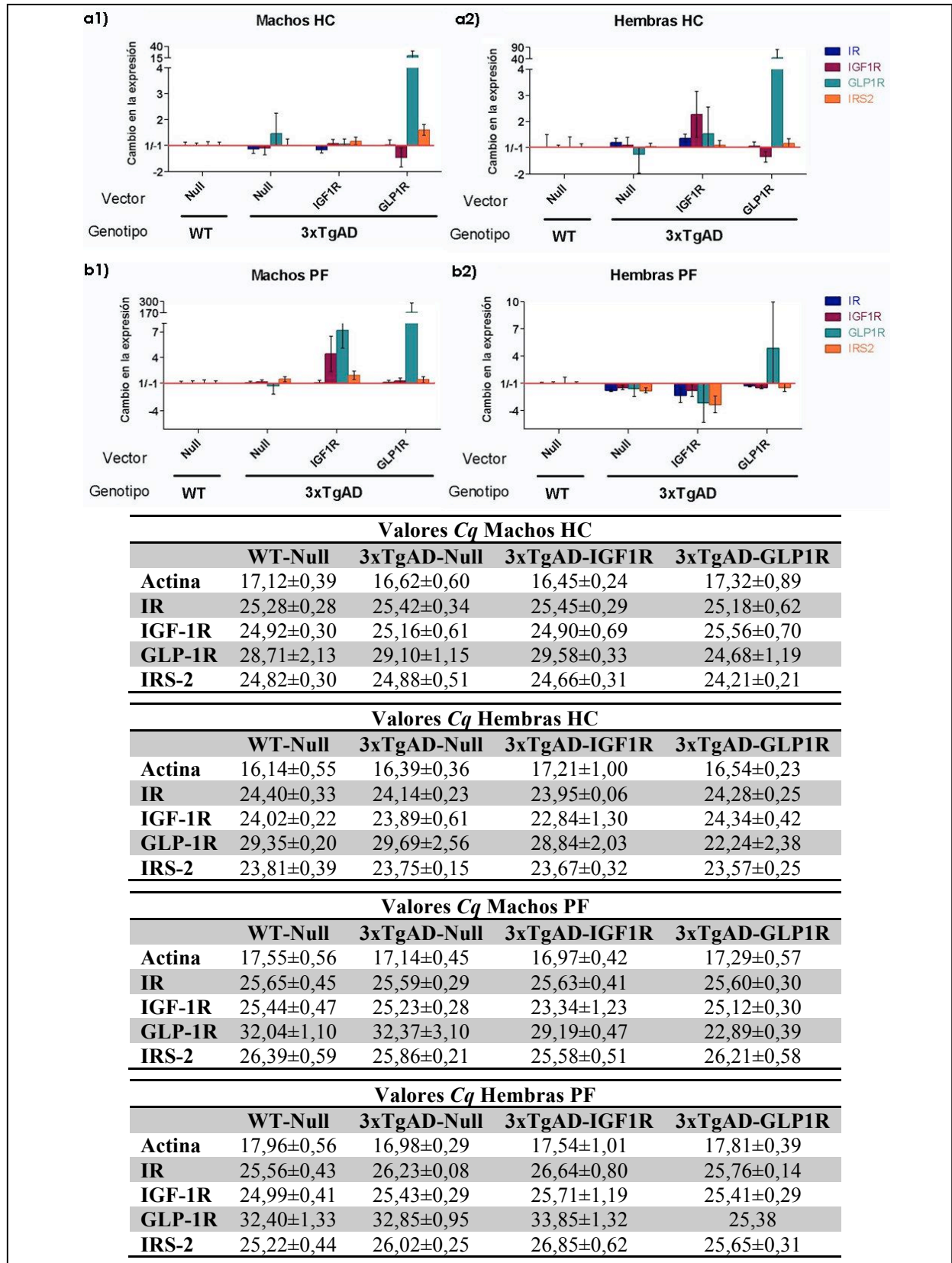


Figura 3.29. Sobreexpresión de IGF-1R y GLP-1R mediante la inyección de vectores de terapia génica en hipocampo y córtex prefrontal de animales 3xTgAD. Se analizó la sobreexpresión de GLP-1R e IGF-1R en el hipocampo (a) y córtex prefrontal (b) de los machos(1) y hembras (2) inyectados. Los gráficos representan la media ± la desviación estándar del cambio en la expresión respecto al WT-Null para cada gen. En las tablas se representan las medias ± desviación estándar de las Cqs.

En cualquier caso, podríamos concluir que la sobreexpresión de IGF-1R en hipocampo consigue mejorar los déficits de memoria en hembras 3xTgAD, al mismo tiempo que la sobreexpresión de GLP-1R en córtex prefrontal previene la aparición de algunos BPSD.

3.4. Efecto sobre la histopatología del cerebro de la AD.

Para el estudio histológico de los cerebros de los animales inyectados, se realizaron diferentes inmunohistoquímicas. Los anticuerpos que se utilizaron para ello fueron el anti-A β 6E10, anti-tau humana fosforilada AT180, anti-Iba1 y anti-NeuN. Así comprobamos que en los machos 3xTgAD, cuya afectación por los depósitos amiloides es menor que en el caso de las hembras, se consigue más fácilmente una reducción de la patología amiloide, especialmente en el grupo 3xTgAD-GLP1R (Figura 3.30 a). En cambio, en las hembras es más difícil de ver este efecto, y aunque en ambos grupos tratados existen animales con menos placas, esto también ocurre en el grupo sin tratar, por lo que no lo consideramos significativo (Figura 3.30 b). En cambio, en relación a la patología por la acumulación de tau fosforilada, los efectos más claros los observamos en las hembras 3xTgAD-IGF1R, y en los machos no observamos diferencias (Figura 3.31). Es decir, los efectos positivos de la sobreexpresión de GLP-1R en el córtex prefrontal de los machos podría tener un efecto en la reducción de la patología amiloide del cerebro y reducir, por tanto, la deposición de placas amiloides en hipocampo. En cambio, la sobreexpresión de IGF-1R en el hipocampo de las hembras, parece estar más relacionada con la reducción de la acumulación de la proteína tau fosforilada.

Por otra parte, con el análisis de la microglía activada mediante el uso del anticuerpo anti-Iba1, descubrimos que la neuroinflamación del hipocampo de los animales 3xTgAD se reduce en los machos 3xTgAD-GLP1R, coincidiendo con la reducción de la acumulación de placas amiloides (Figura 3.33 a). También se reduce la neuroinflamación del hipocampo (Figura 3.33 b), así como la de la amígdala (Figura 3.34 b), en las hembras 3xTgAD-IGF1R y en las 3xTgAD-GLP1R.

Finalmente, con el anticuerpo anti-NeuN pudimos observar una pérdida de densidad neuronal tanto en machos como en hembras 3xTgAD al compararlos con los animales WT. El tratamiento con los vectores AAV2/rh10-GLP1R y AAV2/rh10-IGF1R consiguen revertir parte de esta pérdida de densidad neuronal (Figura 3.35).

Es decir, se puede concluir que los efectos observados en el comportamiento y memoria de los machos 3xTgAD-GLP1R y las hembras 3xTgAD-IGF1R, se debe a una reducción de la histopatología del cerebro asociada a la AD, reduciéndose la neuroinflamación, la acumulación de los dos marcadores propios de la AD, la proteína amiloide y la proteína tau fosforilada, y todo ello evita la pérdida neuronal asociada a esta patología.

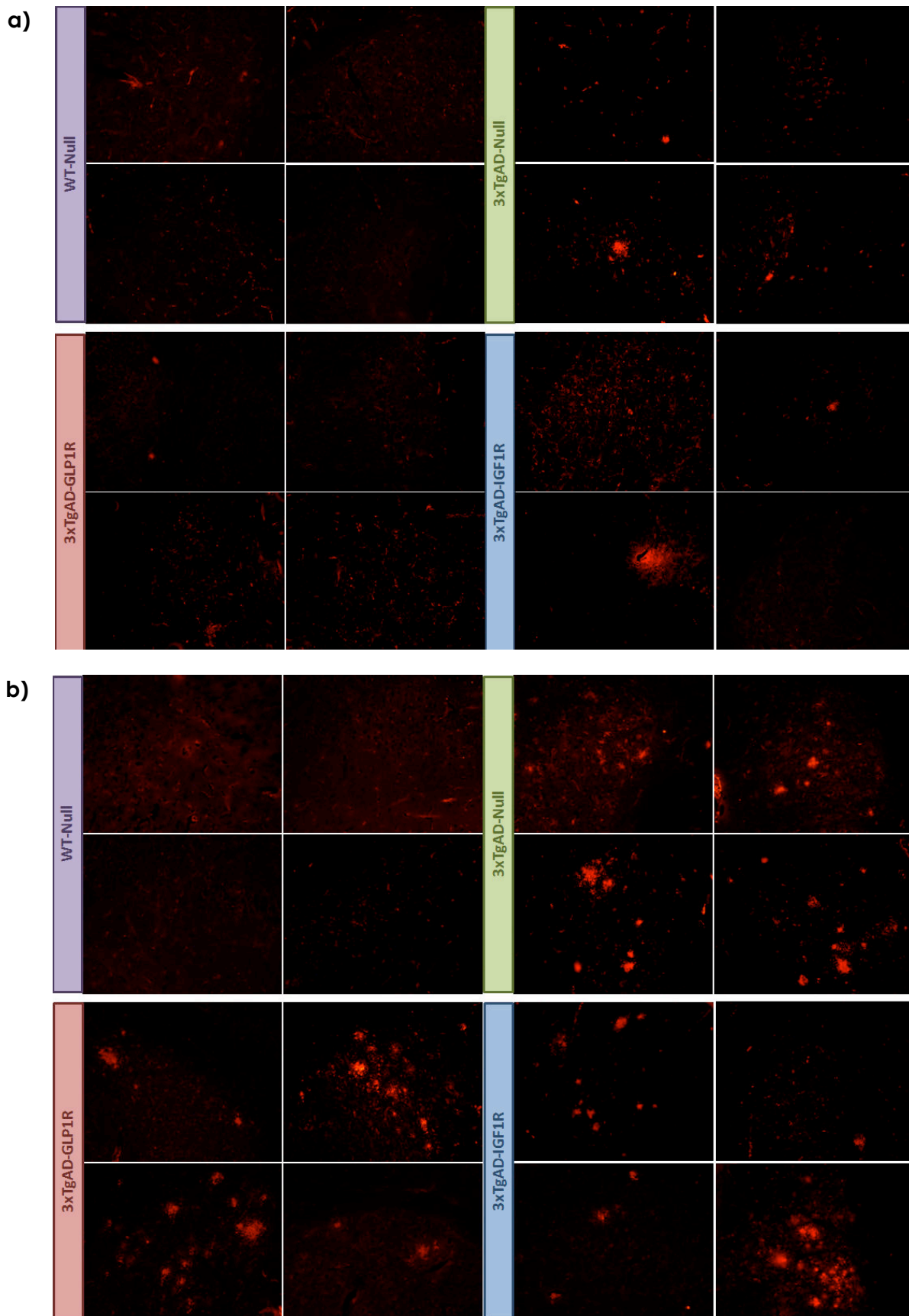


Figura 3.30. Reducción moderada de la patología amiloide en animales 3xTgAD inyectados con AAV2/rh10-IGF1R. Cortes sagitales de cerebro de machos WT, 3xTgAD-Null, 3xTgAD-GLP1R, 3xTgAD-GLP1R (a) y hembras WT, 3xTgAD-Null, 3xTgAD, y 3xTgAD-GLP1R (b), hibridados con un anticuerpo anti-A β (6E10) y un anticuerpo secundario anti-mouse Alexa Fluor (rojo). Fotografías del hipocampo, objetivo 20x.

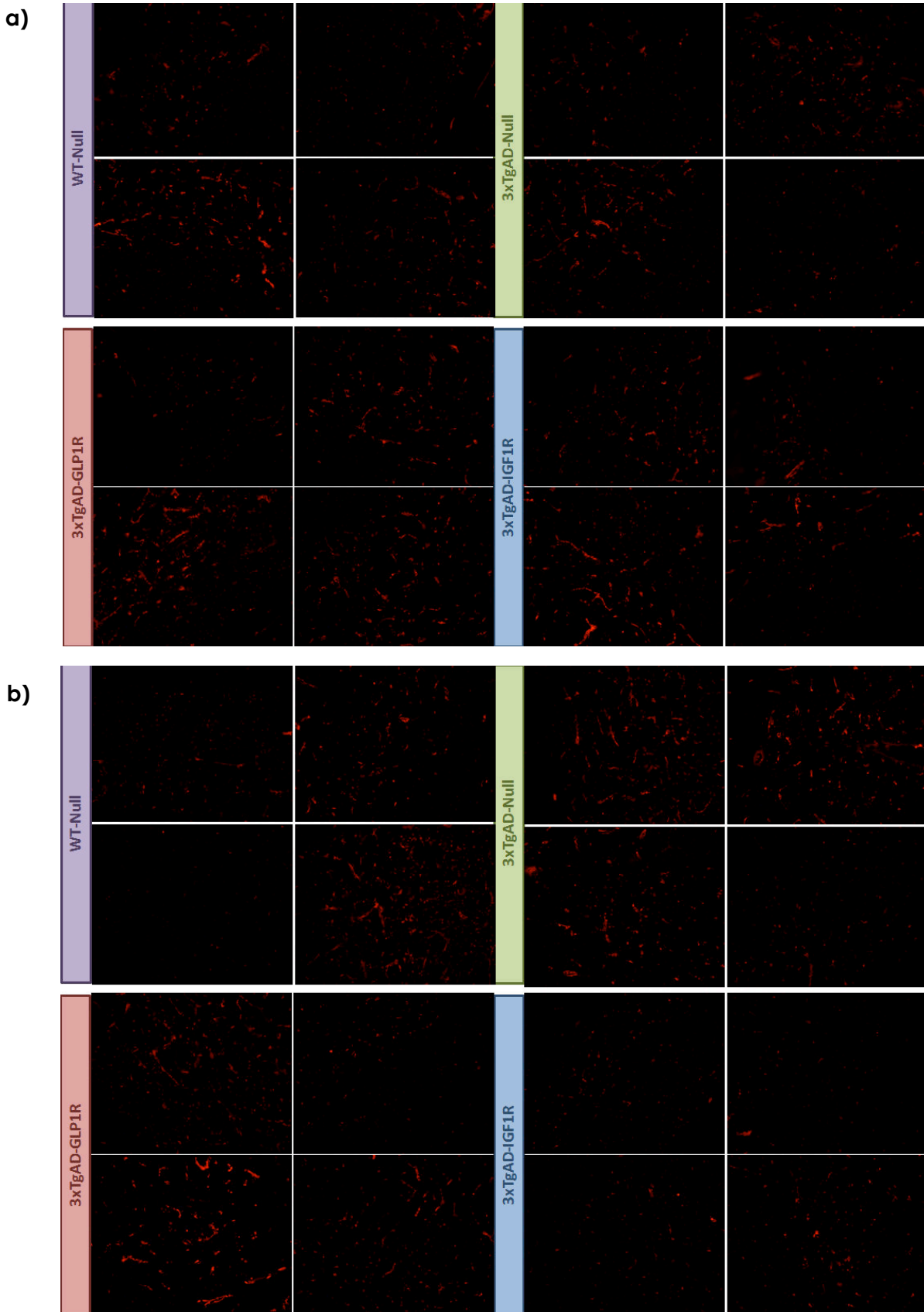


Figura 3.31. Reducción de la acumulación de proteína tau fosforilada en las hembras 3xTgAD inyectadas con el vector AAV2/rh10-IGF1R. Cortes sagitales de cerebro de machos WT, 3xTgAD-Null, 3xTgAD-GLP1R, 3xTgAD-GLP1R (a) y hembras WT, 3xTgAD-Null, 3xTgAD, y 3xTgAD-GLP1R (b), hibridados con un anticuerpo anti-Tau (AT180) y un anticuerpo secundario anti-mouse Alexa Fluor (rojo). Fotografías del córtex, objetivo 20x.

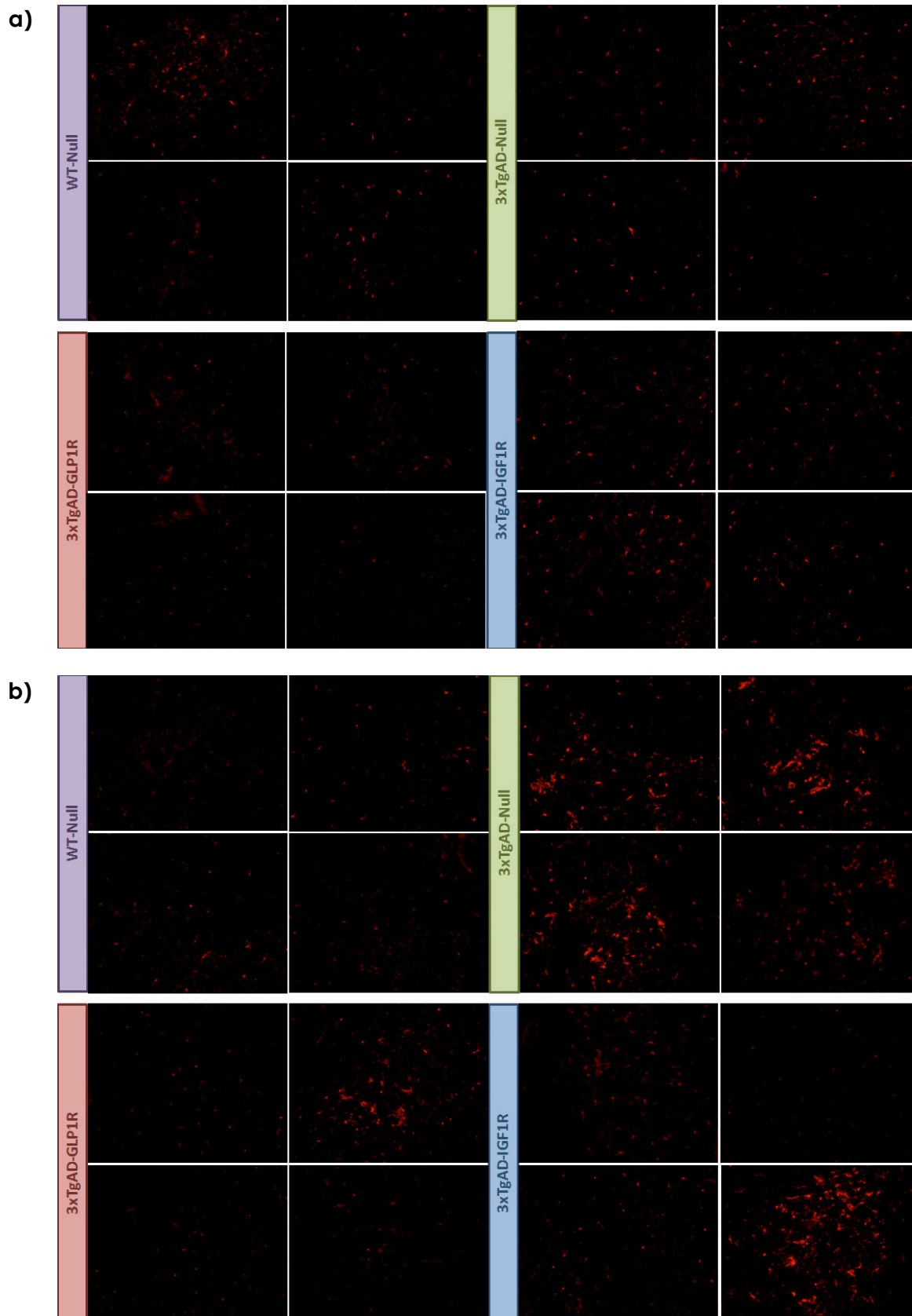


Figura 3.32. Reducción de la neuroinflamación en hipocampo en animales 3xTgAD inyectados con AAV2/rh10-IGF1R y AAV2/rh10-GLP1R. Cortes sagitales de cerebro de machos WT (a1), 3xTgAD-Null (a2), 3xTgAD-GLP1R (a3), 3xTgAD-IGF1R (a4) y hembras WT (b1), 3xTgAD-Null (b2), 3xTgAD (b3), y 3xTgAD-GLP1R (b4), hibridados con un anticuerpo anti-Iba1 y un anticuerpo secundario anti-rabbit Alexa Fluor (rojo). Fotografías del hipocampo, objetivo 20x.

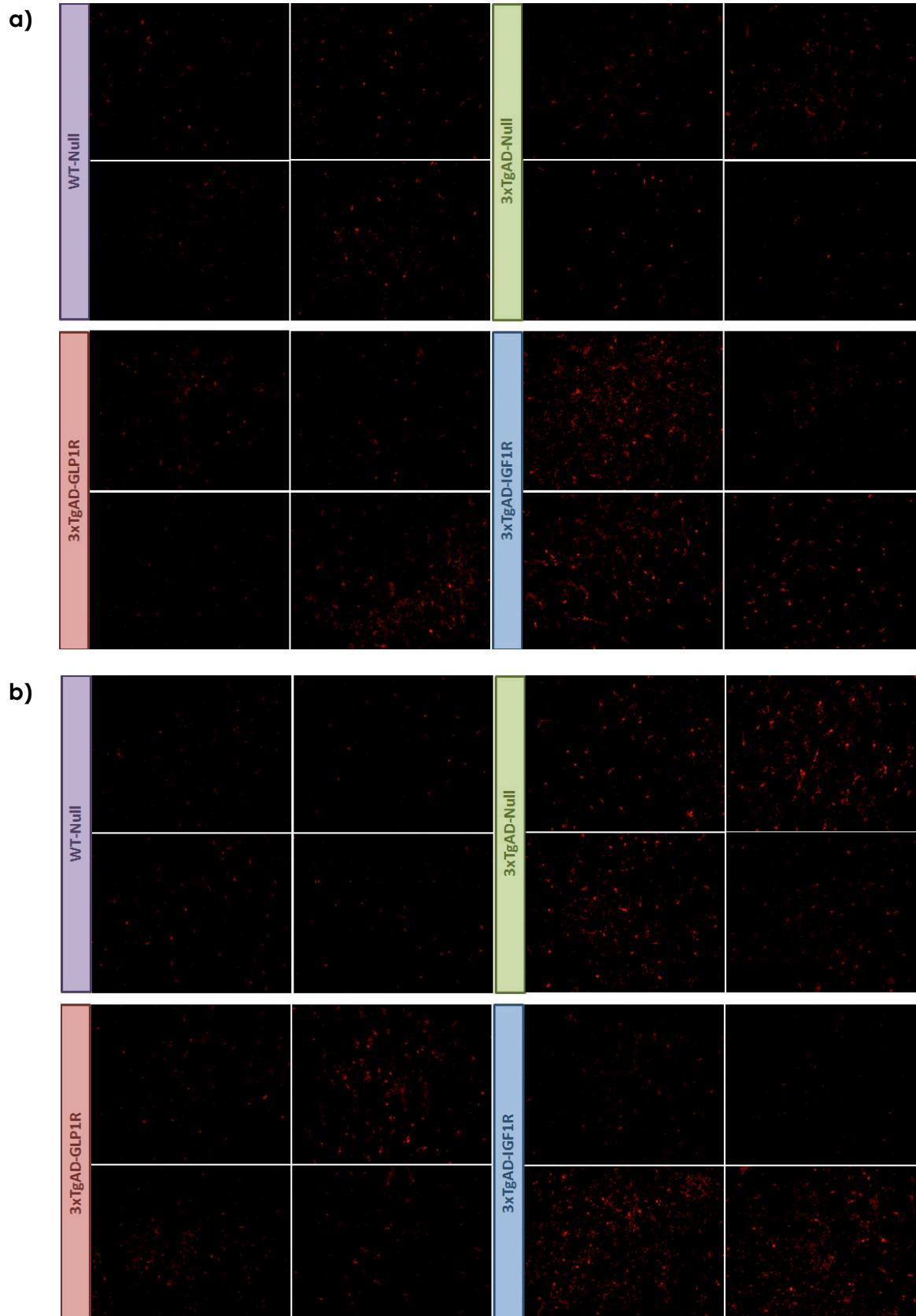


Figura 3.3340. Reducción de la neuroinflamación en la amígdala de los animales 3xTgAD tratados. Cortes sagitales de cerebro de machos WT (a1), 3xTgAD-Null (a2), 3xTgAD-GLP1R (a3), 3xTgAD-GLP1R (a4) y hembras WT (b1), 3xTgAD-Null (b2), 3xTgAD (b3), y 3xTgAD-GLP1R (b4), hibridados con un anticuerpo anti-Iba1 y un anticuerpo secundario anti-rabbit Alexa Fluor (rojo). Fotografías de la amígdala, objetivo 20x.

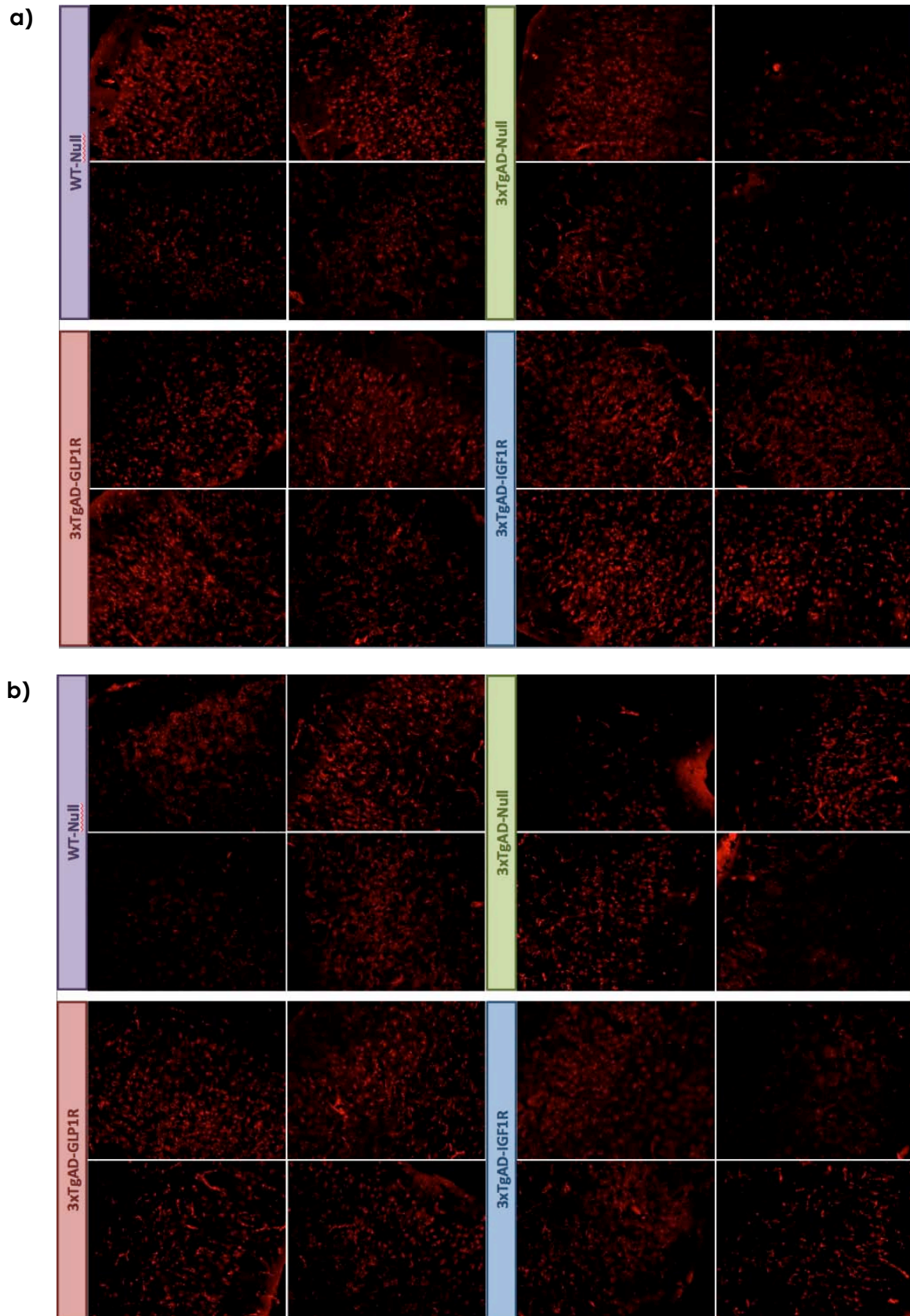


Figura 3.34. Mejora en la densidad neuronal en el córtex de los animales 3xTgAD tratados. Cortes sagitales de cerebro de machos WT (a1), 3xTgAD-Null (a2), 3xTgAD-GLP1R (a3), 3xTgAD-GLP1R (a4) y hembras WT (b1), 3xTgAD-Null (b2), 3xTgAD (b3), y 3xTgAD-GLP1R (b4), hibridados con un anticuerpo anti-NeuN y un anticuerpo secundario anti-mouse Alexa Fluor (rojo). Fotografías del córtex, objetivo 20x.

IV. DISCUSIÓN

1. Enfermedad de Alzheimer y Resistencia a la Insulina en CNS

La enfermedad de Alzheimer es el principal tipo de demencia en adultos mayores de 65 años, y se caracteriza por la acumulación intra y extraneuronal del péptido β -amiloide ($A\beta$), que se deposita en forma de placas amiloides. La segunda característica de la AD es la hiperfosforilación o fosforilación anómala de la proteína tau, una proteína de unión a los microtúbulos, provocando su agregación en ovillos neurofibrilares.

Se estima que la AD afecta en la actualidad a más de 24 millones de personas en el mundo y está previsto que cuadruplique en 2050 (Reitz and Mayeux, 2014). Se trata de un problema de gran importancia, no sólo por los costes económicos (el 1% del PIB mundial), sino también porque, debido a las características de la enfermedad, afecta a la calidad de vida de los pacientes, pero también a la de los familiares.

Aunque existen numerosas teorías acerca de las causas que provocan el desarrollo de la AD, lo cierto es que ésta es una enfermedad multifactorial, en la que converge la disfunción de varios sistemas que, por otra parte, parecen depender unos de otros y, por tanto, es difícil establecer una única causa primigenia. La hipótesis colinérgica, según la cual, la destrucción de las neuronas colinérgicas es la principal causa del desarrollo de la enfermedad, es una de las más extendidas y, de hecho, los tratamientos actuales se basan en administración de inhibidores de la colinesterasa. No obstante, estos tratamientos no han demostrado ser tan eficaces como prometían en un principio, y sólo muestran cierta eficacia en las primeras fases de la AD.

Existen otros muchos factores que influyen en el desarrollo de la AD, y en los últimos años se ha estudiado extensamente el papel de la diabetes mellitus como un factor de riesgo para el desarrollo de AD. Así, entre pacientes con DM, la prevalencia de la AD es de 1,5 a 2 veces mayor que entre personas sin DM, y ocurre lo mismo en sentido contrario, la prevalencia de la DM es del 82% en pacientes de AD, frente al 42% en personas sin AD. Concretamente, la resistencia a la insulina es mayor en pacientes de AD sin el alelo ApoE ϵ 4.

La DM es una enfermedad que afecta a 347 millones de personas y según las predicciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2030 será la séptima causa de muerte en el mundo. Además, la DM provoca otros problemas, como la enfermedad cardiovascular, neuropatía y retinopatía diabética. Todas estas razones hacen que se haya invertido mucho en la investigación de fármacos para la diabetes. Algunos de ellos, como la rosiglitazona, la metoformina, la liraglutida y la exenatida se han probado en estudios de memoria con pacientes de AD con diferentes resultados. Así, mientras que la metformina aumenta la síntesis del péptido $A\beta$ (Chen et al., 2009), la rosiglitazona colabora en la salida de estos péptidos del Sistema Nervioso Central (CNS) a través de la Barrera Hematoencefálica (BBB) al aumentar la expresión del LRP1, uno de los transportadores del $A\beta$ hacia la periferia. En cuanto a la liraglutida y la exenatida, ambos son análogos del GLP-1 y ambos se han mostrado capaces de mejorar la memoria en ratones (McClellan et al., 2010), (Porter et al., 2010 Met 2010), (Isacson et al., 2011).

También se ha demostrado un efecto beneficioso sobre la memoria tras la administración de insulina por vía intravenosa en personas sanas (Kern et al., 2001) y en pacientes de AD (Craft et al., 1996), (Craft et al., 1999a), (Craft et al., 2003). Esta técnica presenta el inconveniente de provocar una hipoglucemia a menos que se administre glucosa de forma simultánea a la insulina (Kern et al., 2001). Para evitar esto, se ha probado también la administración intranasal, que también ha demostrado ser efectiva en la mejora de la memoria en personas sanas (Benedict et al., 2004) así como en pacientes de AD (Reger et al., 2008). De hecho, se ha demostrado que tanto la insulina como el IGF-1 y el GLP-1 (cuyas vías de señalización presentan numerosos puntos en común) pueden actuar a nivel del CNS como factores de crecimiento, neuroprotección y moduladores de la plasticidad sináptica.

Se han realizado numerosos estudios para dilucidar la causa de la resistencia a la insulina en los pacientes de AD. Muchos de ellos coinciden en que los niveles de los receptores de insulina (IR), IGF-1 (IGF-1R) y GLP-1 (GLP-1R), así como los niveles de otras proteínas de la vía de señalización de los mismos, como IRS-2, se encuentran alterados tanto en pacientes de AD como en los modelos animales de AD.

Existen diferentes modelos animales para el estudio de la AD, entre los que destaca el modelo triple transgénico (3xTgAD), producido en el laboratorio del Dr. LaFerla en 2003 y que expresa los transgenes humanos APP_{Swe}, Tau_{P301L} y PS_{M146V}, todas ellas, mutaciones encontradas en los pacientes de AD. Se trata de un modelo muy completo, que mimetiza muy bien los síntomas de los pacientes de AD, tanto desde el punto de vista histopatológico como por las características psiquiátricas y de comportamiento. En 2004 se creó una colonia española de este modelo en la Unidad de Psicología Médica del Instituto de Neurociencias de la UAB y, por todo ello, decidimos utilizar este modelo para llevar a cabo nuestros estudios.

En primer lugar, nos interesaba saber si las alteraciones en los niveles de los receptores de IR, IGF-1R, GLP-1R e IRS-2 se daban también en el modelo 3xTgAD y si éstas son causa o consecuencia de la patología de la AD. De manera que comenzamos analizando los niveles de dichos receptores en muestras de animales machos 3xTgAD y WT de 6 meses de edad, que se corresponde con la etapa prodromal (asintomática) de la AD en este modelo. Para ello, diseccionamos el cerebro en 7 áreas diferentes (hipocampo, hipotálamo, bulbo olfatorio, córtex prefrontal, motor y entorrino, y cerebelo).

Lo que observamos fue que los niveles de las cuatro proteínas analizadas por western blots no diferían significativamente entre los animales 3xTgAD y los animales WT, excepto en cerebelo, donde los niveles de IGF-1R e IRS-2 descienden significativamente en los animales 3xTgAD en comparación con los animales WT.

En el trabajo publicado en 2010 por Moloney et al., se reportaba, en el modelo Tg2576, un aumento a los 18 meses de edad en los niveles de IGF-1R de los astrocitos que rodean las placas amiloides, pero un descenso en los niveles encontrados en neuronas. En cambio, los estudios de Liu et al. en 2011 y de Talbot et al. en 2012, donde utilizan la técnica del western-blot a partir de homogenados de proteínas de hipocampo y

cerebelo, como ocurre en nuestro caso, no encuentran diferencias en los niveles de IGF-1R total entre pacientes de AD y personas sanas. Así pues, es posible que en estos casos, las diferencias estén enmascaradas por el cambio en el perfil de expresión de los receptores entre los distintos tipos celulares del cerebro. Además, la mayoría de los estudios publicados utilizan muestras de pacientes de AD en un estado de la enfermedad avanzado (etapas Braak4-6), mientras que nuestros resultados en este análisis corresponden a animales en la etapa prodromal.

Por tanto, podríamos concluir que, a la vista de esto, a los 6 meses de vida de los ratones 6xTgAD no existen diferencias evidentes en los niveles de los receptores estudiados que puedan actuar como los responsables en el inicio de la enfermedad, y que futuros cambios en dichos niveles podrían entenderse como una consecuencia de todos los cambios que tienen lugar en el cerebro de los animales 3xTgAD, más que como una causa de los mismos. Según este razonamiento, y a la vista de nuestros resultados, también se podría deducir que la expresión de IGF-1R e IRS-2 en el cerebelo es particularmente sensible a estos cambios.

Por otra parte, los estudios de Rivera et al. y de Steen et al., ambos realizados en 2005 en el laboratorio de la Dra. Suzanne M. de la Monte, muestran un descenso en los niveles del mRNA de IR e IGF-1R en muestras de pacientes de AD (etapas Braak 4-6) al compararlos con muestras de pacientes sanos, y que esta reducción correlaciona con el avance de la enfermedad, especialmente con el avance de la patología de la proteína tau. De manera que el siguiente paso era analizar los niveles del mRNA de IR, IGF-1R, GLP-1R e IRS-2 en animales 3xTgAD y WT a diferentes edades. Concretamente, seleccionamos la edad de 6 meses, de la que ya disponíamos los datos relativos a los niveles de proteínas; también decidimos analizar la expresión a 9 meses, edad a la que, según los estudios de Oddo et al., ya se puede observar placa difusa en el hipocampo de los animales 3xTgAD. Por último, nos interesaba la edad de 12 meses, cuando, según el mismo estudio de Oddo et al., se encuentran placas evidentes en hipocampo. Se descartó analizar edades más avanzadas debido a que, a partir de 12 meses, la supervivencia de los animales 3xTgAD cae significativamente, por lo que los resultados podrían estar sesgados.

De esta manera descubrimos que, en contra de lo esperado, mientras que a nivel de mRNA no observamos diferencias en la expresión de los genes analizados entre animales 3xTgAD de 6 meses respecto a controles WT de la misma edad, esta expresión tiende a aumentar con la edad en la mayoría de las áreas estudiadas (excepto en hipotálamo), tanto en los animales WT como en los animales 3xTgAD. Además, al comparar la expresión de los animales 3xTgAD con la de los animales WT, se observa un aumento significativo en la expresión de IGF-1R y de IRS-2 en diferentes áreas a la edad de 9 meses, diferencias que desaparecen cuando los animales tienen 12 meses de edad.

Una posible explicación a este perfil de expresión podría ser que se trate de un efecto de compensación que se dispara entre los 6 y los 9 meses de edad como consecuencia de un descenso en la actividad del

receptor IGF-1R. De hecho, si bien los estudios de Li et al. y Talbot et al. mencionados anteriormente muestran que los niveles de IGF-1R no varían, sí que lo hacen los niveles de proteínas intermedias de la vía de señalización, como IRS-1, Akt, PKC y mTOR en su estado activado (fosforilado), así como la capacidad de respuesta de IR e IGF-1R a una estimulación *ex vivo* con insulina e IGF-1 respectivamente. De hecho, según el estudio de Xie et al. en 2002, los ADDLs compiten con la insulina por unirse al IR (Xie et al.), e, incluso, según los resultados de DeFelice et al. en 2009, inducen la internalización de los mismos desde la membrana celular de la neurona en cultivos de neuronas de hipocampo (De Felice et al.), afectando todo ello a la activación de la vía de señalización del mismo.

Así pues, nos propusimos analizar los niveles de IGF-1R total y fosforilado en muestras de proteínas de los mismos animales de 9 y 12 meses empleados en el análisis de expresión, y descubrimos que el cerebelo es nuevamente la zona donde se encuentran los mayores cambios, y que el aumento de expresión que habíamos visto a nivel de mRNA a los 9 meses se repite, y es aún más acusado, a nivel de proteínas. También se mantiene, aunque en menor grado, en los animales de 12 meses de edad. Este aumento de los niveles IGF-1R total consigue compensar, sólo parcialmente, el brusco descenso que experimenta la proporción de IGF-1R fosforilado respecto al total, haciendo que los niveles totales de fosforilación, a pesar de que continúan siendo muy bajos en los animales 3xTgAD en comparación a los animales WT, no lo sean tanto. En cambio, en hipocampo ocurre lo contrario. Como habíamos visto, su expresión a nivel del mRNA no difiere significativamente entre los animales 3xTgAD y WT, pero a nivel proteico experimenta una significativa reducción en los animales 3xTgAD, tanto a 9 como, especialmente, a 12 meses. En cambio, los niveles de IGF-1R fosforilado no se reducen tanto, debido a que, proporcionalmente, el IGF-1R que queda, se encuentra más fosforilado.

Una explicación a este comportamiento tan diferente entre hipocampo y cerebelo podría deberse a la disposición anatómica de ambas áreas. Así, el hipocampo se encuentra muy cerca de los órganos circunventriculares (CVOs), donde la entrada de la insulina o IGF-1 desde la periferia está facilitada a través del epitelio del plexo coroide. Esto permite que la concentración de insulina en los CVOs y, posiblemente, en hipocampo, sea mayor que en el resto de cerebro, por lo que, el efecto descrito por Xie et al., no será tan importante, y predominará el efecto en la reducción de la activación de la vía de la insulina debido a la internalización de los IR provocada por los ADDLs (De Felice et al.). Es decir, los defectos en la vía de señalización de la insulina/IGF-1 se debe a un descenso en la cantidad de IGF-1R en la membrana de las neuronas de hipocampo. En cambio, en el cerebelo, más alejado del plexo coroideo, la concentración de insulina e IGF-1 es menor, lo que lo convierte en un órgano más sensible a la competencia entre ADDLs e insulina. Por tanto, sería posible que, de forma natural, se incremente la expresión del IGF-1R para compensar la interferencia que los ADDLs provocan en la activación de la vía de la insulina/IGF-1. Para demostrar esto, sería necesario realizar un estudio histológico sobre la concentración de insulina en las diferentes áreas cerebrales de los

animales 3xTgAD a las diferentes edades analizadas, pero esto se escapa de los objetivos de la presente tesis doctoral.

No obstante, para comprobar si la evolución temporal de los cambios de las diferentes formas de IGF-1R correlaciona con la evolución de los cambios histopatológicos propios de la AD, realizamos un estudio histopatológico de muestras de animales WT y 3xTgAD de 4, 6, 9 y 12 meses para estudiar los niveles de A β en la CA1 de hipocampo. De esta manera pudimos demostrar que los niveles de A β intraneuronal alcanzan su máximo a los 6 meses de edad de los animales 3xTgAD, lo que coincide con las observaciones de Oddo et al. en 2006. A los 12 meses, la acumulación del A β cambia de una localización intraneuronal a una localización extraneuronal, formando depósitos en forma de placas. Estos datos apoyan la hipótesis de que la acumulación intraneuronal de A β a 6 meses podría ser la causa que provoca una cadena de efectos que provoca finalmente los cambios en la expresión de IGF-1R entre los 6 y los 9 meses de edad. De hecho, los resultados de García-Mesa et al. en 2011 demuestran que las alteraciones debidas al estrés oxidativo se disparan en el modelo 3xTgAD a partir de los 7 meses de edad (García-Mesa et al.). También se ha comprobado que en el modelo 3xTgAD tiene lugar la sobreexpresión de enzimas antioxidantes a diferentes edades, de manera que los niveles de la NAD(P)H:quinona oxido-reductasa 1(NQO1) aumentan a los 2 meses de edad, la superóxido dismutasa 1 (SOD1) a los 4 meses y Sirtuina 1 (SIRT1) a los 6 meses de edad (García-Mesa et al.). De manera que tendría sentido que, a edades más avanzadas, se disparen mecanismos auxiliares que protejan al cerebro de las lesiones oxidativas e inflamatorias. El IGF-1, mediante la unión a su receptor, es capaz de proteger al cerebro del estrés oxidativo estimulando la expresión de SOD1. Sin embargo, la síntesis de IGF-1 en el hígado y las células de la musculatura vascular está regulada por diferentes factores endocrinos y un aumento en su producción tendría un efecto sistémico. En cambio, el aumento de la expresión del IGF-1R en el cerebro supone un mecanismo específico, local y eficaz de neuroprotección.

Por otra parte, la presencia de A β en el espacio extraneuronal en la CA1 de hipocampo a los 12 meses de edad de los animales 3xTgAD coincide con el mayor descenso observado en los niveles de IGF-1R total en hipocampo, lo que apoya la hipótesis de que el A β provoca la internalización del mismo. En cuanto a la histopatología asociada a la proteína tau, se observa un máximo a los 12 meses de edad de los animales 3xTgAD, coincidiendo con las observaciones de Oddo et al., según el cual la acumulación de A β precede a la formación de los ovillos neurofibrilares (NFT)(Oddo et al.).

En definitiva, según los resultados obtenidos, nuestra hipótesis es que la acumulación extraneuronal de A β podría inducir la internalización del IGF-1R en el hipocampo de los animales 3xTgAD y, debido a las funciones de la vía de señalización de la insulina/IGF-1, esto podría contribuir a los procesos degenerativos que tienen lugar en la AD y, por tanto, a los déficits cognitivos asociados. Por otra parte, puesto que en cerebelo parece existir un mecanismo natural por el cual la expresión de IGF-1R aumenta ante un descenso en la activación de su vía de señalización, nos propusimos emplear herramientas de terapia génica para aumentar

la expresión de IGF-1R (sobreexpresar) en hipocampo. De esta manera pretendíamos comprobar si un aumento en la vía de señalización de la insulina/IGF-1R produce un efecto de neuroprotección suficiente como para restaurar parte de los problemas de conducta de los animales 3xTgAD. Por otra parte, también teníamos interés en conocer el efecto de una reducción significativa en la expresión de IR/IGF-1R en el inicio de la AD mediante el uso de técnicas de silenciamiento génico (shRNAs).

2 Desarrollo de herramientas de Terapia Génica

Para llevar a cabo los experimentos de silenciamiento y sobreexpresión necesitábamos, en primer lugar, diseñar una estrategia adecuada, incluyendo la elección de un vector que nos permitiera la transducción de neuronas de forma estable en el tiempo. De entre las diferentes técnicas empleadas actualmente para la transducción génica, los vectores virales son los que permiten una mayor eficiencia y especificidad, teniendo en cuenta que los distintos serotipos virales suelen tener tropismos diferentes.

Los vectores adenoasociados (AAVs) se caracterizan por tener un genoma de 4,7kb, con dos marcos de lectura: 1, rep, que codifica las proteínas responsables de la replicación del virus; y 2, cap, con la secuencia codificante de las proteínas de la cápside. El genoma de los AAVs también presenta sendas secuencias de repeticiones invertidas en ambos extremos (ITRs). Estas secuencias le permiten integrarse en el genoma del huésped, asegurando una expresión del transgén estable en el tiempo. Existen diferentes serotipos de AAVs, cada uno de los cuales presenta una especificidad concreta para la transducción de determinados tipos celulares. Así, puesto que el AAV2 es el más estudiado y que el AAVrh10 ha demostrado ser muy eficiente en la transducción de neuronas, escogimos el vector pseudotipado AAV2rh10 (es decir, con las ITRs y los genes rep del AAV2, y los genes cap del AAVrh10), para la realización de nuestro estudio.

En cuanto a los transgenes, para el experimento de silenciamiento se diseñó una batería de shRNAs para el silenciamiento de IGF-1R, se clonaron en un plásmido diseñado en nuestro laboratorio con esta finalidad y se seleccionó el más eficiente para el silenciamiento in vitro, con una eficiencia de hasta el 60%. También disponíamos en el laboratorio de un shRNA para el silenciamiento de IR, diseñado por Anna Massó.

Respecto al experimento de sobreexpresión, inicialmente nos planteamos producir vectores con los transgenes del IR, el IGF-1R y el GLP-1R. En nuestro laboratorio disponemos de diferentes plásmidos de expresión que contienen las ITRs necesarias para la producción de AAVs. Estos son el pGG2, el pGV y el pCAG-WPRE. Los dos primeros contienen el promotor del citomegalovirus (CMV), y el segundo, el promotor y los elementos reguladores del gen de la β -actina de pollo (CAG). Este último promotor es más potente que el CMV, pero la distancia entre ITRs del vector (3,3Kb) también es mayor que la de los plásmidos pGV o pGG2 (1,3Kb y 1,7Kb, respectivamente), lo que hace que el pCAG-WPRE tenga menor capacidad para el transgén que el pGV y el pGG2. Así pues, debido al tamaño de los transgenes (1,4Kb el GLP-1R, 4Kb el IGF-1R y 4,1 Kb

el IR) se decidió clonar el cDNA del IGF-1R en el pGV y el cDNA del GLP-1R en el pCAG. El IR se descartó porque su tamaño es más grande del tamaño óptimo para la generación de AAVs (5,5Kb entre ITRs en lugar de 4,7Kb). Las pruebas in vitro de los vectores AAV2/rh10-GLP1R y AAV2/rh10-IGF1R muestran que ambos vectores son funcionales.

En cuanto a la vía de administración, puesto que nuestra intención era comprobar si era posible generar un efecto beneficioso sobre la memoria y el comportamiento de los animales 3xTgAD, era necesario transducir específicamente aquellas áreas cerebrales relacionadas con estas funciones, es decir, principalmente, hipocampo y córtex prefrontal respectivamente. Por tanto, era necesario realizar una administración intracraneal en dichas áreas, mediante el uso de un aparato estereotáxico.

Para el diseño experimental, nos basamos en los resultados inmunohistoquímicos de los animales de 4 a 12 meses. Según éstos, y en concordancia con los resultados reportados por Hirata-Fukae et al. en 2008, las hembras presentan una patología A β en la CA1 de hipocampo más severa que los machos, y a 4 meses ya se observa su acumulación intraneuronal. La evolución temporal de la acumulación intraneuronal de A β que observamos en este estudio coincide con los resultados de Oddo et al. en 2006, según los cuales, entre los 2 y los 12 meses del modelo 3xTgAD, la edad a la que la A β intraneuronal es máxima es a los 6 meses (Oddo et al.). Por otra parte, parece evidente que, para conseguir ver las posibles diferencias provocadas por el efecto del silenciamiento de IR/IGF-1R será más fácil cuando la señal no está saturada, es decir, a los 4 meses de edad. Así pues, para el experimento de silenciamiento, decidimos inyectar los vectores en el hipocampo de hembras de 2 meses y analizar los efectos del silenciamiento de IR/IGF-1R a los 4 meses de edad.

Por otra parte, a 12 meses encontramos numerosos depósitos de placas amiloides en hembras y se observan diferencias significativas con los depósitos que presentan los machos. También es a 12 meses cuando la acumulación de proteína tau fosforilada en córtex comienza a ser evidente, por lo que, al igual que en los estudios de Oddo et al. de 2003, la patología amiloide precede en nuestra colonia a la patología de la proteína tau, apoyando la teoría de la cascada amiloide (Oddo et al.). A la vista de estos resultados, decidimos llevar a cabo el experimento de sobreexpresión tanto en machos como en hembras antes de que la acumulación intraneuronal de A β alcance su máximo, y evaluar sus efectos cuando sabemos que la patología está bien establecida en los animales 3xTgAD, es decir, cuando éstos cumplan los 12 meses de edad. Así, inyectamos los vectores AAV2/rh10-GLP1R y AAV2/rh10-IGF1R en el hipocampo y el córtex prefrontal de animales 3xTgAD de 5 meses de edad, y 7 meses más tarde analizamos la conducta y las habilidades cognitivas de los animales inyectados. A modo de control, también inyectamos animales WT y 3xTgAD con un vector AAV2/rh10-Null.

Existen pocos estudios en los que analicen la conducta de las hembras 3xTgAD, pero en humanos, la incidencia de la AD es mayor en las mujeres que en los hombres en todas las franjas de edad (4,7% frente a 2,6% en pacientes mayores de 65 años (Zandi et al., 2002), 19,6% frente a un 12,4% en pacientes mayores de

75 años y 86,7% frente al 15% en pacientes mayores de 90 años (Fratiglioni et al., 1997)). Así pues, la importancia de nuestro estudio radica no sólo en que es la primera vez que se demuestra un efecto del IGF-1R y el GLP-1R en un modelo de AD, sino que, además, se lleva a cabo tanto en machos como en hembras, y se comparan las diferencias de comportamiento entre ellos y las diferencias de ambos tratamientos debidas al sexo.

3 Efecto del IGF-1R y el GLP-1R en animales 3xTgAD

En primer lugar, se ha demostrado que el silenciamiento de la vía de la Insulina/IGF-1R en hembras 3xTgAD provoca un aumento significativo de la histopatología de A β en hipocampo a los 4 meses de edad. Es decir, se puede concluir que la razón por la que la resistencia a la insulina es un factor de riesgo para el desarrollo de la AD es porque provoca un aumento en la acumulación intraneuronal del péptido A β en las etapas iniciales de la patología.

Por otra parte, para el análisis del efecto de la sobreexpresión de IGF-1R y GLP-1R en animales 3xTgAD, se ha utilizado una batería de pruebas de conducta y memoria, así como análisis histológicos y bioquímicos. Antes de proceder a la batería de pruebas de conducta, se comprobó el estado físico de los animales, analizando su equilibrio, coordinación, fuerza física y resistencia, coordinación motora y capacidad visual. No se observan déficits significativos en las capacidades sensoriomotoras de los animales 3xTgAD sin tratar ni los 3xTgAD tratados, excepto por lo que respecta a un descenso en la latencia de caída de las hembras 3xTgAD-Null en la barra metálica. No obstante, los animales permanecen inmóviles, tanto en la barra metálica como en la de madera, por lo que la evaluación de la coordinación motora en estas pruebas no es posible y esto sólo puede realizarse a partir de los resultados de la prueba con la percha. En esta prueba, los animales no muestran problemas de fuerza física ni de resistencia, presentan altas latencias de caída, y tienden a utilizar las patas trasera y la cola para ayudarse a recorrer la percha, mostrando una buena coordinación motora. De hecho, tanto en los machos como en las hembras, se observa que los animales tratados presentan una mayor latencia de caída en la prueba de 60 segundos, pero estas diferencias no se deben a que los animales pesen menos, pues no se observan diferencias significativas en cuanto al peso y la distancia recorrida por los animales tampoco es significativamente diferentes, por lo que tampoco se debe a diferencias en su coordinación motora. Asimismo, ningún animal presenta problemas visuales. De manera que, en general, concluimos que los animales empleados en este estudio no presentan problemas físicos que puedan afectar a su comportamiento en las diferentes pruebas de conducta llevadas a cabo con ellos.

3.1. Efecto de la sobreexpresión de IGF-1R y GLP-1R en los BPSD de los animales 3xTgAD.

Para el análisis de conducta de los animales inyectados se diseñó toda una batería de pruebas, que incluían el *Corner Test*, el *Open Field* y el *Black and White* para el análisis del temor/ansiedad, inhibición/desinhibición conductual y la curiosidad o capacidad exploratoria. En este estudio, los machos y las hembras se han sometido a las mismas pruebas con un día de diferencia para evitar la posible influencia de los olores. Debido a las grandes diferencias observadas en este estudio entre machos y hembras, se discutirán los resultados de unos y otras por separado.

3.1.1. Efecto de la sobreexpresión de IGF-1R y GLP-1R en machos 3xTgAD.

Para llevar a cabo la prueba del *Open Field*, se deposita el animal en el centro de un tablero blanco e iluminado. Esta prueba se utiliza para medir la actividad motora/exploratoria influida por componentes emocionales de reactividad ante una situación no sólo novedosa, sino también fuertemente aversiva. Aunque los roedores presentan una tendencia natural a explorar espacios nuevos, son animales nocturnos y tienden a evitar los espacios abiertos e iluminados como una adaptación evolutiva para evitar los depredadores. Es decir, la actividad exploratoria en el *Open Field* se ve influida por una mayor neofobia y por la aversión que provoca la exposición a un espacio abierto e iluminado. Así pues, las latencias del movimiento de los animales pueden considerarse un indicador de la inhibición conductual que sufren los animales como consecuencia de la neofobia y temor/ansiedad experimentada por los animales, y, en cuanto a la actividad motora y exploradora, se mide por el número de líneas horizontales que cruzan los animales (crossings) y el número de levantamientos que realizan (rearings).

En nuestro caso, los machos 3xTgAD presentan una clara inhibición conductual, con un freezing prolongado, y sólo la mitad de ellos consiguen salir del centro. Además, de éstos, sólo uno llega hasta la periferia y muestra actividad exploratoria horizontal. En cambio, de los diez machos WT, nueve consiguen salir del centro y la mitad llegan a la periferia y muestran una conducta exploratoria horizontal y vertical. Esto indica un elevado nivel de temor/ansiedad en los machos 3xTgAD. En el caso de los machos 3xTgAD-GLP1R y 3xTgAD-IGF1R, la inhibición conductual es menor que en los 3xTgAD-Null, acercándose a los valores de los animales WT. Los efectos son especialmente evidentes en los animales tratados con el vector AAV2/rh10-GLP1R, pues la totalidad de los animales de este grupo consigue salir del centro, y, aunque dos de ellos no llegan a la periferia, el resto muestran una actividad exploratoria horizontal y vertical similar a la de los animales WT. En cambio, aunque la mayoría de los machos 3xTgAD-IGF1R consiguen salir del centro, sólo la mitad llegan a la periferia y presentan actividad exploratoria horizontal, y sólo uno presenta actividad exploratoria vertical.

Otra de las pruebas llevadas a cabo en esta tesis doctoral para el estudio del temor/ansiedad de los animales es la caja *Black-and-White*. Esta prueba consiste en dejar al animal en el interior de un compartimento negro que se encuentra conectado con un compartimento blanco a través de una pequeña abertura. La evaluación de los animales en esta prueba se apoya en la naturaleza nocturna de los roedores, lo que hace que presenten una preferencia por los espacios oscuros y cerrados y eviten los espacios iluminados. Sin embargo, los roedores también presentan una tendencia a explorar los espacios nuevos, de manera que la latencia de los animales en salir al compartimento blanco, las veces que salen y el tiempo total que pasan en el mismo, son criterios que permiten evaluar el nivel del temor/ansiedad del animal frente a su curiosidad por explorar espacios nuevos (Crawley and Goodwin, 1980), (Holmes et al., 2002).

De acuerdo con este paradigma, analizamos el comportamiento de los animales y observamos que, como ocurría en el *Open Field*, los machos 3xTgAD presentan una marcada inhibición conductual ante los espacios iluminados, y su latencia en salir al compartimento blanco es significativamente mayor que la de los animales WT, así como el número de salidas. Consecuentemente, el tiempo total que pasan los machos 3xTgAD en el compartimento blanco es significativamente menor que el de los machos WT. De hecho, aunque la actividad exploratoria horizontal no se afecta en los machos 3xTgAD en comparación con los machos WT, sí se observa una fuerte inhibición de la actividad exploratoria vertical de los machos 3xTgAD durante toda la prueba, tanto en el compartimento negro como en el blanco. En cualquier caso, la proporción en la actividad exploratoria tanto horizontal como vertical entre el compartimento negro y el blanco aumenta en los machos 3xTgAD. Todo ello indica un mayor nivel de ansiedad en los machos 3xTgAD y un mayor temor a los espacios blancos en comparación con los WT.

La sobreexpresión de GLP-1R en los machos 3xTgAD revierte este comportamiento en todos los aspectos, tanto en la latencia de salida al compartimento blanco, como en el número de veces que sale y el tiempo que permaneces en el mismo, así como en la actividad vertical y el elevado temor por los espacios iluminados. Se debe destacar que, aunque la proporción en la actividad entre ambos compartimentos se revierte tanto en los machos 3xTgAD-GLP1R como en los machos 3xTgAD-IGF1R hasta niveles similares a los de los WT, la actividad horizontal total aumenta en el caso de los machos 3xTgAD-GLP1R y se reduce en el caso de los machos 3xTgAD-IGF1R incluso más que en los machos 3xTgAD. No obstante, la actividad vertical de los machos 3xTgAD-GLP1R es similar a la de los machos WT y la de los 3xTgAD-IGF1R es similar a la de los 3xTgAD-Null, por lo que, en principio, las diferencias en la actividad horizontal no las consideramos consistentes en el conjunto de resultados.

Por otra parte, el *Corner Test* es útil para evaluar la neofobia de los animales ante una situación moderadamente novedosa y no aversiva, puesto que se utilizan jaulas idénticas a las usadas para su estabulación. En nuestro experimento, los machos 3xTgAD no muestran alteraciones significativas en su actividad al compararla con la de los machos WT. Esto entra en contradicción con la mayoría de estudios publicados, que

indican que los animales 3xTgAD tienden a presentar cierta inhibición conductual debido a la neofobia que experimentan en este test, y que depende de la edad y del sexo del animal. Así, según diversos estudios, comienza a observarse una reducción en la actividad vertical a partir de los 2 meses de edad de los animales 3xTgAD, y a los 6 meses la actividad horizontal también se reduce en comparación con los animales WT (Gimenez-Llort et al.), (Garcia-Mesa et al., 2011), (Cañete), (Blázquez), (Torres-Lista et al.). Estos estudios muestran que la inhibición conductual no sólo tiene lugar en el *Corner Test*, sino que correlaciona con el comportamiento observado en otras pruebas como el *Open Field*, el *Plus Maze* y la caja *Black-and-White*.

No obstante, aunque algunos estudios han demostrado que los animales 3xTgAD presentan una clara inhibición conductual en estas pruebas, con una menor actividad locomotora, y un mayor freezing, todo ello debido a un mayor temor/ansiedad (Gimenez-Llort et al.), (Sterniczuk et al.), (Garcia-Mesa et al.), otros trabajos indican que los animales 3xTgAD pueden presentar desinhibición conductual en diferentes pruebas como *Open Field*, el *Plus Maze* y la prueba de la *Black-and-White box* cuando se los compara con animales WT (Pietro Paolo et al.), (Cañete).

En definitiva, los machos 3xTgAD muestran una clara inhibición conductual ante situaciones nuevas y fuertemente ansiogénicas, cuando se los compara con machos WT y la sobreexpresión de GLP-1R consigue restaurar este comportamiento hasta niveles similares a los de los WT, pero esto no ocurre con la sobreexpresión de IGF-1R.

3.1.2. Efecto de la sobreexpresión de IGF-1R y GLP-1R en hembras 3xTgAD.

Las hembras 3xTgAD presentan una clara hiperactividad en el *Corner Test* al compararlas tanto con las hembras WT como con los machos 3xTgAD, con un aumento en la actividad vertical, y que se corrige con el tratamiento realizado. Aunque en la prueba del *Corner Test* no sea habitual encontrar un comportamiento de hiperactividad, algunos estudios demuestran, mediante el análisis de la actividad diaria de los animales en su jaula, que tanto el modelo 3xTgAD como otros modelos transgénicos de AD pueden presentar hiperactividad cuando se los compara con animales WT (Lalonde et al.), (Lalonde et al.) y este comportamiento se ha relacionado con un mal funcionamiento del hipocampo (Bast et al., 2001), (Zhang et al., 2002).

Por otra parte, las hembras 3xTgAD presentan una inhibición conductual prácticamente total en el *Open Field*, y sólo una, de las cinco del grupo 3xTgAD, sale del cuadrado central, aunque sin llegar a la periferia, mientras que, de las hembras WT, nueve de las doce consiguen salir del centro, de las cuales siete llegan a la periferia y exhiben actividad exploratoria, tanto horizontal como vertical. Así pues, estos resultados indican que las hembras 3xTgAD presentan un evidente perfil de inhibición conductual en una situación fuertemente aversiva como lo es la exposición a un espacio abierto e iluminado, probablemente debido a un elevado temor/ansiedad y que es más aún más acusado que el observado en los machos 3xTgAD. Por otra parte, el efecto de ambos tratamientos en las hembras reduce la inhibición conductual inicial, consiguiendo que,

en ambos casos, la mitad de las hembras lleguen hasta la periferia, pero apenas mejora la actividad exploratoria.

Por lo que respecta a los resultados de las hembras en la caja *Black-and-White*, no existen diferencias significativas, pero se observa una tendencia en las hembras 3xTgAD a salir antes y más veces al compartimento blanco, así como a pasar más tiempo en el mismo. De hecho, aunque la actividad exploratoria global de las hembras 3xTgAD es menor que la de las hembras WT, la proporción en la actividad desarrollada entre ambos compartimentos indica que las hembras WT muestran una preferencia por el compartimento negro frente al blanco, mientras que la actividad de las hembras 3xTgAD es similar en ambos compartimentos. Debido a que las defecaciones realizadas por las hembras 3xTgAD durante la prueba tiende a aumentar también respecto a las de las hembras WT, podemos concluir que las hembras 3xTgAD presentan un elevado nivel de ansiedad y neofobia que provoca una reducción en su actividad exploratoria, pero, simultáneamente, se observa también una desinhibición ante la exposición a un espacio iluminado. El tratamiento con los vectores AAV2/rh10-GLP1R y AAV2/rh10-IGF1R consigue revertir este comportamiento desinhibido hasta valores similares a los de las hembras WT, aunque no consiguen corregir la reducción en la actividad global de las 3xTgAD.

Aunque la mayoría de los estudios sobre el comportamiento de los animales relacionado con la ansiedad demuestran que una mayor neofobia y ansiedad correlacionan con una mayor inhibición conductual, algunos de ellos indican que el comportamiento de los animales ante situaciones de ansiedad depende de la naturaleza de la prueba, y puede existir diferencias entre los resultados del *Open Field* y los de otras pruebas como el *Plus Maze* o la caja *Black-and-White* (Cañete), (Roy et al.). Una posible explicación es que el *Open Field*, en el que se expone a los animales a un único espacio abierto e iluminado, tiene un componente más ansiogénico que la caja *Black-and-White*, donde el compartimento negro representa un refugio, donde los animales pueden entrar, y para salir al compartimento blanco, los animales deben realizar una toma de decisiones.

Así pues, el comportamiento de las hembras ante situaciones de novedad/aversivas parece depender del grado de ansiogenicidad de la prueba. Así, ante una situación moderadamente nueva, o en la que el animal puede llevar a cabo una serie de toma de decisiones ante dicha situación de ansiedad, las hembras 3xTgAD tienden a presentar desinhibición conductual o hiperactividad. En cambio, cuando la prueba es altamente ansiogénica, su inhibición conductual es mayor que la de los machos.

Este dimorfismo sexual en el comportamiento de los animales 3xTgAD en situaciones de novedad y ansiedad ya ha sido descrito anteriormente para esta misma colonia (Cañete), (Blázquez), así como para otras colonias del modelo 3xTgAD (Pietropaolo et al.). La dirección en la que van las diferencias entre machos y hembras, no obstante, son controvertidas. Así, los resultados de Blázquez en 2011 apuntan a que la ansiedad experimentada por los machos es mayor que en las hembras, mientras que los de Cañete muestran

que los machos presentan desinhibición conductual en el Plus Maze y la caja Black-and-White, pero sin diferencias en el *Open Field* (Cañete) y, en cuanto a los estudios de Pietropaolo et al., indican que tanto los machos como las hembras 3xTgAD presentan una mayor reacción de miedo y que la actividad de las hembras 3xTgAD es menor que las de las WT (Pietropaolo et al.).

En cuanto a los tratamientos realizados, su efecto también difiere en función del sexo. Así, mientras que en los machos se observa un mayor efecto beneficioso en aquéllos inyectados con el vector AAV2/rh10-GLP1R, en el caso de las hembras se observan efectos similares de los dos tratamientos, aunque más moderados que los efectos que presenta la sobreexpresión de GLP-1R en machos 3xTgAD.

3.2. Efecto de la sobreexpresión de IGF-1R y GLP-1R en las habilidades cognitivas de los animales 3xTgAD.

Una vez teníamos caracterizado el perfil BPSD de nuestra colonia, así como los efectos del tratamiento, el siguiente paso era analizar las capacidades cognitivas de los animales, tanto su memoria de trabajo, como su capacidad de aprendizaje espacial y su memoria espacial a largo y corto plazo. Para ello, se usó el *T-maze* y el *Morris Water Maze*.

3.2.1. Efectos sobre la memoria de trabajo (*T-maze*) de los machos 3xTgAD.

La prueba de alternancia espontánea en el *T-maze* es útil para medir la memoria de trabajo, que depende de la función del hipocampo y se basa en la tendencia natural de los ratones a explorar ambientes nuevos. Esta prueba presenta la ventaja de ser un entorno cerrado y negro, por lo que, aunque el animal puede experimentar cierta neofobia, el componente ansiogénico de esta prueba es muy leve. Debido a la tendencia de los roedores a explorar espacios nuevos, el animal necesita recordar en qué brazo del *T-maze* ha estado previamente para entrar en el que aún no ha explorado. Por ello, la prueba de la alternancia espontánea se ha utilizado como una prueba simple y rápida para medir la memoria de trabajo espacial de los animales, evitando la necesidad de realizar sesiones de entrenamiento y la influencia de efectos emocionales aversivos (Gerlai).

No obstante, se debe tener en cuenta que la elección del animal para entrar en uno u otro brazo del *T-maze* no depende exclusivamente de su capacidad de recordar el brazo en el que ha estado previamente, sino que también puede estar influida por otros factores, como la motivación del animal por la novedad (Hughes). Además, es frecuente encontrar en la literatura el uso de la técnica de alternancia espontánea continua, en la que se deja al animal recorrer libremente el aparato durante un tiempo determinado y, al finalizar la prueba, si la trayectoria entre los tres brazos del *T-maze* (ABC) ha sido ABCBACBACA, el número de alternancias será de 6 alternancias/8 posibilidades. Sin embargo, el problema que presenta este paradig-

ma es que durante la prueba el animal va dejando olores en su recorrido, que pueden influir en sus próximas elecciones. Así pues, en este caso nos hemos decidido por llevar a cabo un único evento de alternancia espontánea. Es decir, se deja al animal recorrer libremente el aparato hasta que realice la primera alternancia entre los tres brazos del *T-maze*. Si esto lo hace en la primera ocasión que tiene, se considera que el animal ha realizado correctamente la prueba de alternancia espontánea; si no, se considera que el animal “lo ha hecho mal” y se apunta el número de errores cometidos hasta alternar correctamente los tres brazos del aparato.

Así pues, siguiendo este criterio, observamos que los machos 3xTgAD no presentan déficits en su memoria de trabajo, pues, de los animales que llevan a cabo la prueba, todos la realizan correctamente. De hecho, la diferencia la encontramos en la proporción de animales que no llegan a realizar la prueba, y cuya memoria, por tanto, no podemos evaluar. Mientras que, de los machos WT, hasta el 90% de los animales acaban la prueba, en cambio, sólo dos tercios de los machos 3xTgAD lo hace. En este caso, puesto que el componente ansiogénico de esta prueba es muy leve, la inhibición conductual de los machos se podría explicar por una falta de motivación o por la existencia de apatía en los machos 3xTgAD. Esta apatía podría participar, junto con la ansiedad, en la inhibición conductual descrita en el *Open Field* y la caja *Black-and-White* y, a diferencia del comportamiento ansioso, la sobreexpresión tanto de GLP-1R como de IGF-1R parecen ser igualmente efectivas para la corrección de la apatía.

La apatía es uno de los síntomas neuropsiquiátricos no cognitivos junto con la depresión, ansiedad, apatía e irritabilidad más frecuentes en pacientes de AD (Leger and Banks, 2014), (Lyketsos et al., 2011). Sin embargo, aunque la neofobia y ansiedad ha sido ampliamente estudiada en diferentes modelos transgénicos de AD, existen pocos estudios que se centren en la apatía de los mismos, probablemente debido a que la hipoactividad de los animales observada en pruebas como el *Open Field* o el *Plus Maze* se asocian generalmente a la ansiedad de los animales. No obstante, algunos estudios analizan la actividad diaria espontánea de los animales y desde los 2 meses de edad ya se observa una menor actividad locomotora, posiblemente debido a una apatía moderada (Filali et al., 2012), (Lauritzen and R.).

3.2.2. Efectos sobre la memoria de trabajo (*T-maze*) de las hembras 3xTgAD.

En el caso de las hembras 3xTgAD, a diferencia de lo que ocurre en los machos, sí se observa un déficit significativo en la memoria de trabajo al compararlas con las hembras WT. Esto correlaciona con la acumulación de placas amiloides en la CA1 de hipocampo, la cual, según nuestros resultados, es mucho más agresiva en las hembras que en los machos, especialmente a los 12 meses de edad. Nuestros resultados demuestran que la sobreexpresión de GLP-1R en hembras 3xTgAD mejora la memoria de trabajo de las mismas, pero esto no ocurre al sobreexpresar IGF-1R.

Los déficits en la capacidad de memoria de trabajo ha sido estudiada en diferentes modelos transgénicos, entre ellos, un modelo transgénico ApoE que no presenta depósitos amiloides (Hartman et al.), el modelo TgCRND8, que expresa la mutación Swedish y la mutación Indiana del gen APP humano (Lovasic et al.), así como en el modelo 3xTgAD (Blázquez), (Stevens and Brown). Todos ellos muestran un déficit en la memoria de trabajo de los animales transgénicos en comparación con los animales WT. También está descrito que la memoria de trabajo depende de la función del hipocampo (Olton and Papas), (Steele and Morris), y se ha demostrado que ratas con una lesión hipocampal presentan una peor ejecución de la alternancia espontánea (Johnson et al., 1977).

Estos resultados coinciden con las observaciones realizadas en pacientes de AD, en los cuales se detectan déficits cognitivos en diferentes aspectos, entre los cuales la memoria de trabajo se encuentra especialmente afectada (Baddeley et al.), (Kensinger et al.).

3.2.3. Efectos sobre la capacidad de aprendizaje y memoria espacial (*Morris Water Maze*) de los machos 3xTgAD.

El hipocampo también es el responsable de la memoria y el aprendizaje espacial. Para evaluar estos aspectos en nuestros animales, se utilizó la prueba del *Morris Water Maze (MWM)* (Morris, 1984), en la que los animales son sumergidos en una piscina circular y, tomando como referencia las señales contextuales del laboratorio, deben ser capaces de aprender la localización de una plataforma situada en el interior de la piscina y donde pueden subirse para poder dejar de nadar. El aprendizaje se realiza a través de cuatro sesiones diarias, separadas por un intervalo de 40-45 minutos, durante cinco días consecutivos, el primero de los cuales la plataforma es visible 1 cm por encima de la superficie del agua y marcada con una bandera (*Cue*), y durante los cuatro días siguientes, la plataforma se mantiene sumergida (*Place Task, PT*).

La primera observación que realizamos durante el MWM fue que los machos WT tienden a flotar pasivamente en el agua sin buscar la plataforma, pero esto no se observa en los animales 3xTgAD. Este fenómeno ya ha sido descrito previamente en los resultados publicados recientemente por Baeta-Corral, y es un comportamiento que se mantiene en los animales WT a lo largo de toda la prueba, pero con ciertas variaciones en función del día. Así, tanto nuestros resultados como los de Baeta-Corral indican que el día que menos veces flotan de forma pasiva es el día de la *Cue*, lo que nos hace pensar que no es un problema de motivación (Baeta-Corral and Gimenez-Llort). En cambio, el primer día de la plataforma sumergida es el día que más flotan en ambos estudios, por lo que es posible que se trate de una estrategia durante la cual el animal toma las referencias espaciales necesarias para buscar la plataforma. Por otra parte, los machos WT alcanzan su máxima capacidad de aprendizaje (mínima distancia hasta la plataforma) entre el tercer y el cuarto día de entrenamiento, y es también cuando presentan un menor número de flotaciones, que vuelve a aumentar el

último día, posiblemente debido a falta de motivación (llegan sin problemas a la plataforma, ya han aprendido todo lo que podía) o al agotamiento físico.

Estos eventos de flotación hacen que la velocidad de natación de los machos WT sea significativamente menor que la de los 3xTgAD. Esta observación también ha sido descrita en diferentes estudios realizados con este modelo (Pietropaolo et al.), (Gimenez-Llort et al.), (Cañete), y, teniendo en cuenta que, según los resultados anteriormente discutidos, los animales 3xTgAD presentan un mayor nivel de ansiedad, esto podría también contribuir a la mayor velocidad de los animales 3xTgAD. No obstante, aunque las diferencias de velocidad entre los machos 3xTgAD y los WT se mantienen a lo largo de toda la prueba, en el caso de los 3xTgAD-GLP1R se observa una tendencia a reducir su velocidad progresivamente, hasta llegar a los valores que presentan los WT en el último día de entrenamiento. Esto apoyaría la hipótesis de que las diferencias de velocidad se deban a la ansiedad de los machos 3xTgAD, puesto que coincide con los resultados discutidos anteriormente, según los cuales el vector AAV2/rh10-GLP1R es efectivo en reducir la ansiedad de los machos 3xTgAD. Las diferencias en la velocidad de natación son el motivo de que, para evaluar el aprendizaje de los animales a lo largo del entrenamiento, se evalúen los valores de las distancias nadadas hasta la plataforma, en lugar de las latencias.

Teniendo en cuenta todo ello, en los machos 3xTgAD no detectamos déficits significativos en la capacidad de aprendizaje debidos al genotipo ni al tratamiento, solamente se observa que en la *Cue1* la distancia recorrida por los machos 3xTgAD es mucho mayor que la de los machos WT hasta alcanzar la plataforma. En las pruebas sensoriomotoras no se detectaron deficiencias en la capacidad visual de los animales 3xTgAD, y su velocidad de natación no indica falta de motivación. Por lo tanto, es posible que los machos 3xTgAD, no sean capaces de relacionar la presencia de la bandera con una posible ruta de escape, como sí lo hacen los animales WT, e intentan buscar otras salidas de la piscina. Este comportamiento se observa en todos los machos 3xTgAD, con independencia del tratamiento.

A lo largo del día, los machos 3xTgAD son capaces de aprender a asociar la presencia de la bandera con la plataforma aunque su máxima capacidad de aprendizaje en el primer día es menor que la de los machos WT. De hecho, los machos 3xTgAD muestran un aprendizaje más lento a lo largo de toda la prueba de adquisición. En cuanto a la capacidad de retención, también se observa que los machos 3xTgAD tardan más en recordar la posición de la plataforma entre el último trial de un día y el primero del día siguiente. Por lo que respecta al tratamiento, tanto los machos 3xTgAD-GLP1R como los 3xTgAD-IGF1R presentan un perfil de aprendizaje muy similar al de los machos 3xTgAD-Null.

Aunque son numerosos los estudios que encuentran déficits en la capacidad de aprendizaje de los animales 3xTgAD en comparación con animales WT, éstos aparecen en función de la edad del animal y con un acusado dimorfismo sexual. También parecen intervenir factores externos relacionados con la metodología que afectan a los resultados obtenidos en el *MWM*. Así, los resultados publicados en la bibliografía dife-

ren en cuanto a la aparición de los primeros déficits tanto en la capacidad de aprendizaje como en la memoria espacial de los machos 3xTgAD (Clinton et al.), (Pietropaolo et al.), (Garcia-Mesa et al.), (Baeta-Corral and Gimenez-Llort).

En nuestro caso, los machos no muestran diferencias importantes en su capacidad de aprendizaje, y tampoco se observan diferencias en las distancias recorridas durante el removal hasta pasar por primera vez por la zona donde se encontraba la plataforma en ninguno de los grupos, lo que indica que los machos 3xTgAD no presentan problemas de memoria espacial. En cambio, el número de veces que pasan los machos por la zona donde se encontraba la plataforma durante las pruebas del removal y la estrategia de búsqueda de los animales sí son significativamente diferentes entre los diferentes grupos de machos. Todo ello indica que tanto los machos WT como los 3xTgAD presentan un comportamiento perseverante al no encontrar la plataforma, pero el tratamiento con el vector AAV2/rh10-GLP1R revierte esta conducta y aporta una mayor flexibilidad en su estrategia de búsqueda de la plataforma. Este fenómeno se observa también en los machos 3xTgAD-IGF1R en el removal de las 24h, día en el que los machos 3xTgAD-GLP1R, a diferencia del resto de los grupos, no van directos hacia la zona de la plataforma. Así pues, los machos 3xTgAD tratados presentan una mayor flexibilidad cognitiva que los no tratados e, incluso que los machos WT.

Estas diferencias en las estrategias de búsqueda de la plataforma y la flexibilidad cognitiva de los animales 3xTgAD ya han sido comentadas previamente en estudios como el de Baeta-Corral en 2015. En dicho estudio emplean machos de 13 meses de edad y, coincidiendo con los resultados aquí descritos, no se observan diferencias en la memoria corto plazo de los machos 3xTgAD y todos los animales van directos a la zona donde se encontraba la plataforma. Sin embargo, sus resultados indican que, si bien los machos 3xTgAD presentan un comportamiento perseverante como en nuestro caso, los machos WT presentan una mayor flexibilidad cognitiva, y adoptan diferentes estrategias de búsqueda de la plataforma tras no encontrarla donde debería estar. Esto no lo observamos en los machos WT, pero sí en los machos 3xTgAD tratados, lo que indicaría una mejora en las capacidades cognitivas de los mismos.

3.2.4. Efectos sobre la capacidad de aprendizaje y memoria espacial (*Morris Water Maze*) de las hembras 3xTgAD.

Al igual que con los machos WT, las hembras WT también presentan una tendencia a flotar pasivamente en el agua, especialmente el primer día de entrenamiento con la plataforma sumergida, donde diez de las doce hembras WT adquieren esta estrategia durante el último trial. Es también en el PT1.4 cuando se hace evidente el aprendizaje de las hembras WT, pues, aunque no se observan diferencias significativas en el tiempo que tardan en llegar a la plataforma entre el PT1.1 y el PT1.4, sí existe una diferencia significativa en la distancia recorrida para llegar a la plataforma, lo que coincide con la teoría de que esta estrategia les sirve para tomar referencias espaciales. De hecho, en las hembras WT se observa un aprendizaje progresivo hasta

el cuarto día, cuando son capaces de retener lo aprendido el día anterior (no existen diferencias significativas entre la distancia recorrida hasta la plataforma entre el PT2.4 y el PT3.1), y es también en el cuarto día cuando presentan un menor número de flotaciones, que vuelve a aumentar el último día de entrenamiento, posiblemente debido a falta de motivación (llegan sin problemas a la plataforma, ya han aprendido todo lo que podían) o al agotamiento físico.

Estas diferencias en la flotación y velocidad hacen que, como en los machos, en las hembras se analicen también las distancias en lugar del tiempo que tardan en llegar a la plataforma. De esta manera, observamos que las hembras WT presentan un perfil de aprendizaje similar al de los machos WT, pero en las hembras 3xTgAD se observa una peor capacidad de aprendizaje tanto al compararlas con las hembras WT como al compararlas con los machos 3xTgAD, como ya había sido descrito en otros estudios realizados con esta misma colonia (Cañete), (Blázquez) y con otras colonias de este modelo (Clinton et al.).

Así, como ocurría con los machos, la distancia recorrida por las hembras 3xTgAD en la *Cue1* es mucho mayor que la de las hembras WT hasta alcanzar la plataforma, independientemente del tratamiento, con la plataforma visible, aunque al final del día las hembras 3xTgAD consiguen llegar al mismo nivel de aprendizaje que las hembras WT. Estos déficits en la capacidad de aprendizaje de las hembras 3xTgAD no sólo se presentan durante el día de la *Cue*. Así, tanto el aprendizaje y la capacidad de retención de las hembras 3xTgAD son mucho más lentos que los de las hembras WT. Por otra parte, las hembras 3xTgAD también presentan un aprendizaje más lento que los machos 3xTgAD.

La sobreexpresión de IGF-1R y GLP-1R hacen que las hembras 3xTgAD tratadas presenten un aprendizaje más rápido con la plataforma visible que las hembras 3xTgAD-Null. Además, las hembras tratadas con el vector AAV2/rh10-IGF1R, si bien en el primer trial no recuerdan la posición de la plataforma desde el día de la *Cue* y sus distancias son significativamente superiores que las de las hembras WT, muestran un rápido aprendizaje y en los trials sucesivos de ese mismo día y los siguientes, sus valores de distancias son similares que los mostrados por las hembras WT, y, al igual que éstas, en el tercer día ya muestran capacidad de retención. De hecho, durante el cuarto día de entrenamiento, las distancias de las hembras 3xTgAD-IGF1R son incluso menores que las de las hembras WT. En cambio, las hembras 3xTgAD-GLP1R demuestran una mayor capacidad para recordar la posición de la plataforma tras el día de la *Cue*, pero su capacidad para mejorar durante los días de entrenamiento con la plataforma sumergida es muy limitada, de forma similar a lo que les ocurre a las hembras 3xTgAD-Null.

Este dimorfismo sexual en la capacidad de aprendizaje espacial de los animales 3xTgAD ya ha sido descrito previamente en diferentes estudios (Clinton et al.), (Pietropaolo et al.). Así, mientras que existe cierta controversia sobre la edad a la que empiezan a aparecer los primeros déficits cognitivos de los machos 3xTgAD en el *Morris Water Maze*, en el caso de las hembras 3xTgAD, los déficits cognitivos son más significativos que los de los machos 3xTgAD y aparecen antes. De hecho, García-Mesa et al. encuentran diferencias

significativas en las latencias de llegada a la plataforma durante la fase de adquisición del MWM en las hembras desde los 4 meses de edad (García-Mesa et al.).

Además, las hembras 3xTgAD presentan también déficits de memoria tanto a corto como a largo plazo respecto a las hembras WT. Ambos tratamientos, una vez más, tienen efectos diferentes, puesto que las hembras 3xTgAD-IGF1R presentan distancias similares a las de las hembras WT y significativamente diferentes de las de las hembras 3xTgAD-Null en la prueba de memoria a corto plazo, pero en las hembras 3xTgAD-GLP1R esto sólo ocurre en la prueba de memoria a largo plazo.

En cuanto a la flexibilidad cognitiva de las hembras, sólo se observan diferencias significativas en el removal de las 2 horas y éstas se deben tanto al genotipo como al tratamiento. De manera que las hembras 3xTgAD, además de presentar problemas de memoria que se reflejan en que la trayectoria descrita hasta pasar por primera vez por la zona de la plataforma es mayor, mantienen también un comportamiento perseverante, y centran su búsqueda en una misma zona, aunque se trate de un cuadrante equivocado. Por su parte, las hembras 3xTgAD-IGF1R presentan una mejora en su memoria espacial, así como en su flexibilidad cognitiva para cambiar su estrategia de búsqueda, y las hembras 3xTgAD-GLP1R, si bien no mejoran su memoria, sí reducen el comportamiento perseverante observado en las hembras 3xTgAD-Null.

En definitiva, nuestro estudio indica que los animales 3xTgAD presentan mayores niveles de temor/ansiedad que los animales WT, aunque hembras y machos tienen maneras distintas de reaccionar frente a este temor/ansiedad, y que los problemas cognitivos son mayores en las hembras 3xTgAD que en los machos. Los tratamientos empleados son efectivos tanto en reducir la ansiedad como en mejorar las habilidades cognitivas de los animales 3xTgAD, con un claro dimorfismo sexual, siendo más eficiente el vector AAV2/rh10-GLP1R en los machos y el AAV2/rh10-IGF1R en las hembras.

4 Análisis de la expresión de los transgenes virales.

Por otra parte, para comprobar que los cambios observados en el comportamiento y las habilidades cognitivas de los animales 3xTgAD inyectados con los vectores AAV2/rh10-GLP1R y AAV2/rh10-IGF1R, se deben realmente a un aumento en la expresión de los transgenes, al finalizar la batería de pruebas de comportamiento, se extrajeron muestras de cerebro para inmunohistoquímica, así como para el análisis de RNA y proteínas. En primer lugar, mediante la técnica de PCR cuantitativa, pudimos comprobar que la sobreexpresión de los transgenes no es igualmente efectiva en las dos áreas inyectadas en ambos sexos. Así, en los machos se consigue una mejor sobreexpresión de ambos transgenes en el córtex prefrontal, y en hipocampo sólo se detecta la sobreexpresión de GLP-1R. En cambio, en las hembras ocurre al contrario, la sobreexpresión se consigue mejor en hipocampo. Estas diferencias podrían deberse a problemas metodológicos, aunque son muy consistentes, ningún macho sobreexpresa IGF-1R en hipocampo y ninguna de las hembras lo

hace en córtex prefrontal. La existencia de mecanismos endógenos secundarios que controlen la expresión de estos transgenes en las diferentes áreas cerebrales también es poco probable y difícil de demostrar.

En cualquier caso, en los machos, la sobreexpresión se consigue principalmente en el córtex prefrontal, y existen diversos estudios que relacionan las alteraciones en esta zona con problemas neuropsiquiátricos como la apatía y la depresión (Holthoff et al.), la ansiedad (Bishop et al.) y la irritabilidad (Telzer et al.). También se ha observado un defecto en los mecanismos que regulan la conectividad entre el córtex prefrontal y la amígdala en pacientes con trastornos de ansiedad (Sladky et al., 2015). Así pues, teniendo en cuenta que los machos 3xTgAD que sobreexpresan GLP-1R en el córtex prefrontal presentan un menor nivel de ansiedad y apatía que los animales 3xTgAD-Null, podemos concluir que el GLP-1R tiene un papel neuroprotector que mantiene la integridad de los circuitos neuronales necesarios para evitar el desarrollo de los síntomas neuropsiquiátricos asociados a la demencia.

Por otra parte, en las hembras se consigue una mayor sobreexpresión de los transgenes en el hipocampo, estructura relacionada con los procesos cognitivos y el almacenamiento de la memoria. Puesto que nuestros resultados indican que las hembras 3xTgAD-IGF1R presentan menos problemas de aprendizaje y memoria espacial que las hembras 3xTgAD-Null, todo ello nos permitiría concluir que el IGF-1R, al igual que el GLP-1R en el córtex prefrontal, también es capaz de ejercer un efecto de protección que evita la degeneración de los mecanismos responsables del almacenamiento de memoria en el hipocampo.

5 Efecto de la sobreexpresión de IGF-1R y GLP-1R en la histopatología asociada a la AD de los animales 3xTgAD

Se ha demostrado la correlación entre los niveles de A β y algunos de los síntomas neurológicos del AD como los problemas en la memoria verbal y la función ejecutiva, y la ansiedad (Pietrzak et al., 2015). También se sabe que la patología amiloide es más agresiva en las hembras que en los machos 3xTgAD (Hirata-Fukae et al., 2008). En concordancia con esto, los resultados histopatológicos obtenidos en este estudio demuestran que la acumulación de placas amiloides en el hipocampo de las hembras 3xTgAD de 12 meses es significativamente mayor que la que se observa en los machos 3xTgAD. En cuanto a los animales tratados, los machos 3xTgAD-GLP1R presentan una reducción en la acumulación de placas amiloides, lo que correlaciona con la mayor flexibilidad cognitiva de los mismos. Sin embargo, aunque la sobreexpresión de IGF-1R en las hembras 3xTgAD consigue mejorar su capacidad de aprendizaje y memoria espacial, existe una gran variabilidad interindividual encontrada en relación a la acumulación de placas amiloides tanto en el grupo 3xTgAD-Null como en el grupo 3xTgAD-IGF1R y no se observan diferencias significativas entre ambos grupos.

También se ha relacionado la ansiedad con alteraciones en la funcionalidad de la amígdala en pacientes de AD (Hashimoto et al.). Además, en el modelo 3xTgAD, una mayor acumulación intraneuronal de A β en la amígdala se relaciona con un incremento en la ansiedad mostrada por los animales (España et al., 2010). Sin embargo, aunque los animales 3xTgAD presentan claramente una elevada ansiedad en comparación con los animales WT, éstas no se deben a la existencia de una mayor acumulación de A β en la amígdala de los animales 3xTgAD.

Por otra parte, puesto que las placas amiloides provocan la activación de la microglía, decidimos analizar el estado de activación de la microglía en nuestras muestras mediante la detección del marcador Iba-1. En consistencia con los resultados relativos a la patología amiloide, encontramos que las hembras 3xTgAD presentan una mayor cantidad de microglía activada que las hembras WT. Pero, curiosamente, aunque el tratamiento con los vectores AAV2/rh10-GLP1R y AAV2/rh10-IGF1R no consigue reducir de forma significativa la acumulación de A β en el hipocampo ni en la amígdala de las hembras 3xTgAD, sí que consigue reducir la neuroinflamación asociada a este proceso.

Por otra parte, debido a que los machos 3xTgAD no presentan una patología amiloide tan agresiva como la de las hembras, la neuroinflamación también es menor y no se observan diferencias significativas entre machos 3xTg y WT. Sin embargo, sorprendentemente, ésta aumenta en los animales inyectados con el vector AAV2/rh10-IGF1R, lo que correlaciona con los resultados obtenidos en la prueba de la caja *Black-and-White*, en la que los machos 3xTgAD-IGF1R presentan una inhibición conductual aún mayor que la de los machos 3xTgAD.

En cuanto a la patología asociada a la proteína tau, como ocurre en el caso de la patología amiloide, la afectación de las hembras 3xTgAD es más evidente que en los machos cuando se comparan con sus respectivos controles. Además, los resultados comentados hasta ahora no explican las diferencias entre los efectos de los dos tratamientos llevados a cabo en esta tesis. Sin embargo, la sobreexpresión de IGF-1R en el hipocampo de las hembras consigue reducir la acumulación de proteína tau fosforilada en el córtex de las hembras 3xTgAD de forma más eficiente que la sobreexpresión de GLP-1R. Así pues, observamos una correlación entre la mejora en el aprendizaje y memoria espacial de las hembras 3xTgAD y los niveles de la proteína tau fosforilada. Nuestros resultados coinciden con los estudios que demuestran que la reducción en los niveles de proteína tau mejora el aprendizaje espacial y la memoria en diferentes modelos (Roberson et al.), (Cheng et al.). Esto se ha observado también en un modelo transgénico con la APP humana, a pesar de que los niveles de A β sean altos (Roberson et al.).

Finalmente, también se analizó la densidad neuronal en el córtex cerebral de los animales inyectados. La neurodegeneración es otro de los principales marcadores en pacientes de AD y, aunque en general se considera que en el modelo 3xTgAD no se produce una pérdida neuronal importante y la densidad sináptica del hipocampo no muestra cambios en los animales 3xTgAD en comparación con los animales WT (Bertoni-

Freddari et al.), según nuestros resultados, las únicas diferencias entre machos WT y 3xTgAD las encontramos en relación a la pérdida neuronal observada en el córtex cerebral de los animales. Lo mismo ocurre en las hembras y, en ambos casos, la sobreexpresión de IGF-1R y GLP-1R consigue revertir esta neurodegeneración. La neurodegeneración observada en pacientes de AD corresponde principalmente al sistema colinérgico y diversos estudios demuestran el papel de las neuronas colinérgicas que conectan el córtex prefrontal con los núcleos basales en la flexibilidad cognitiva (Boulougouris et al.), (Okada et al.). Es decir, teniendo en cuenta que el patrón de los problemas de neurodegeneración de los animales analizados correlaciona con las diferencias en la flexibilidad cognitiva de los mismos, es posible que se deba a que la pérdida neuronal observada corresponda a neuronas colinérgicas. No obstante, esta hipótesis no ha sido comprobada en esta tesis doctoral.

Es decir, los resultados histológicos correlacionan con los déficits cognitivos de los animales 3xTgAD y demuestran que el efecto de la sobreexpresión de IGF-1R consigue revertir la neurodegeneración tanto en machos como en hembras, probablemente debido a su papel neurotrófico, así como la acumulación de tau fosforilada en hembras. En cambio, la sobreexpresión de GLP-1R sólo consigue revertir la neurodegeneración.

Finalmente, considerando todos los resultados presentados en esta tesis, podemos concluir que existe una clara relación entre los niveles de expresión de diferentes genes relacionados con la vía de la insulina y el desarrollo de los síntomas característicos de la enfermedad de Alzheimer. Así, la expresión de diferentes genes relacionados con la vía de la insulina se encuentra alterada en el modelo 3xTgAD, especialmente a partir de los 9 meses, por lo que puede entenderse como una consecuencia más que como una causa de la enfermedad. Concretamente, la expresión de IGF-1R a nivel de mRNA aumenta en diferentes áreas cerebrales, probablemente para compensar la reducción de los niveles del IGF-1R total y fosforilado en áreas implicadas para la memoria y el comportamiento como lo son el hipocampo y el córtex prefrontal.

La sintomatología del modelo 3xTgAD presenta un claro dimorfismo sexual tanto a nivel de miedo/ansiedad ante situaciones novedosas y aversivas como en lo que respecta a sus habilidades cognitivas, siendo las hembras las que presentan las alteraciones más significativas. A su vez, estos resultados correlacionan con el estado histopatológico de los animales, tanto a nivel de acumulación de A β y tau, como a nivel de neuroinflamación.

La sobreexpresión de IGF-1R en machos sólo se consigue en córtex prefrontal y ésta no tiene ningún efecto. En cambio, en las hembras provoca una evidente mejora de las habilidades cognitivas, debida a una reducción en la acumulación de la proteína tau. Asimismo, la sobreexpresión de IGF-1R en el hipocampo de las hembras consigue reducir la neuroinflamación del mismo así como la pérdida neuronal en el córtex cerebral.

Por otra parte, la sobreexpresión de GLP-1R en hipocampo y córtex prefrontal tiene un evidente efecto en la reducción de la acumulación amiloide, así como una reducción de la pérdida neuronal de los machos, lo que se refleja en una tanto en la corrección de la ansiedad como en mejorar la flexibilidad cognitiva 3xTgAD en los mismos. Sin embargo, su sobreexpresión en las hembras sólo se consigue en hipocampo y su efecto es menor. Así, aunque se observa una cierta mejora en lo que respecta a la conducta de temor/ansiedad de las hembras 3xTgAD, probablemente debido a la reducción en la neuroinflamación en la amígdala, su efecto en las habilidades cognitivas de las hembras es limitado y sólo se observa una mejora de la memoria a largo plazo de las mismas, que correlaciona con una reducción en la neuroinflamación del hipocampo y en la pérdida neuronal. La acumulación de A β y de tau fosforilada no varían con la sobreexpresión de GLP-1R en las hembras.

V. CONCLUSIONES

1. La primera alteración observada en los animales 3xTgAD es la acumulación intraneuronal de A β a 4 meses de edad, que aumenta a los 6 meses. Entre los 6 y los 9 meses de edad, no se produce el mismo aumento, probablemente debido a un cambio de una localización intraneuronal de los péptidos A β a una localización extraneuronal.
2. A los 6 meses de edad (etapa prodromal en el modelo 3xTgAD) no se observan diferencias significativas en los niveles de IR, IGF-1R, GLP-1R o IRS-2 a nivel de proteína ni tampoco a nivel de RNA en comparación con animales WT.
3. A los 9 meses de edad, tiene lugar un aumento significativo en la expresión de IGF-1 a nivel de mRNA en los animales 3xTgAD en comparación con los animales WT. En cambio, a nivel de proteína, se produce un descenso a los 9 y 12 meses de edad en los niveles de IGF-1R total y fosforilado en diferentes zonas cerebrales de los animales 3xTgAD en comparación con animales WT de la misma edad.
4. El silenciamiento de la vía de la insulina en hembras 3xTgAD mediante la inyección en hipocampo de un vector AAV que expresa un shRNA-IGF1R provoca un aumento en la acumulación intraneuronal de A β a los 4 meses de edad.
5. Los animales 3xTgAD presentan un dimorfismo sexual en los síntomas neuropsiquiátricos asociados a la demencia (BPSD). Así, los machos 3xTgAD adoptan un comportamiento de inhibición conductual en comparación con los machos WT, debida a la presencia de ansiedad y de apatía. En cambio, el comportamiento de las hembras depende del nivel de ansiedad de la prueba, siendo de desinhibición cuando la ansiedad es moderada (como en la prueba del *Corner Test* o la caja *Black-and-White*) y de inhibición ante niveles de ansiedad más elevados (como en el caso del *Open Field*).
6. La sobreexpresión de GLP-1R revierte los BPSD observados tanto en machos como en hembras, mientras que la sobreexpresión de IGF-1R sólo es efectivo en las hembras.
7. Las habilidades cognitivas de los animales 3xTgAD también presentan diferencias de género. Los machos 3xTgAD no presentan déficits significativos en la memoria de trabajo ni en la memoria espacial aunque presentan un aprendizaje espacial más lento que el de los machos WT. Las hembras 3xTgAD, en cambio, presentan déficits en su memoria de trabajo, así como en el aprendizaje y memoria espacial.

8. Los machos 3xTgAD tratados presentan una mayor flexibilidad cognitiva que los machos 3xTgAD sin tratar y que los machos WT, siendo más evidente en los machos que sobreexpresan GLP-1R.
9. En las hembras, la sobreexpresión de IGF-1R mejora la capacidad de aprendizaje, la memoria espacial a corto plazo, y su flexibilidad cognitiva. En cambio, la sobreexpresión de GLP-1R sólo lo mejora la memoria a corto plazo de las hembras 3xTgAD.
10. La acumulación de placas amiloides en los animales 3xTgAD es más agresiva en las hembras que en los machos. Estos depósitos amiloides provocan una activación de la microglía en el hipocampo y la amígdala de las hembras 3xTgAD que no tiene lugar en los machos.
11. La sobreexpresión GLP-1R sólo consigue reducir la acumulación de A β en los machos y la sobreexpresión de IGF-1R no es capaz de reducir los depósitos amiloides en machos ni en hembras. En cambio, la sobreexpresión tanto de IGF-1R como de GLP-1R consiguen controlar los niveles de activación de la microglía en las hembras 3xTgAD.
12. Existe también un dimorfismo sexual en relación a la acumulación de proteína tau fosforilada. Así, al contrario de lo observado en los machos, las hembras 3xTgAD presentan una acumulación de tau fosforilada más evidente que las hembras WT.
13. La sobreexpresión de GLP-1R no consigue reducir la acumulación de tau fosforilada en las hembras 3xTgAD. Sin embargo, la sobreexpresión de IGF-1R sí consigue reducir esta acumulación y es la responsable de la mejora en las habilidades cognitivas de las hembras 3xTgAD-IGF1R.
14. Los animales 3xTgAD presentan una menor densidad neuronal al compararlos con animales WT, independientemente del sexo del animal. Los tratamientos con AAV2/rh10-GLp1R y AAV2/rh10-IGF1R consiguen, en ambos sexos, revertir esta pérdida neuronal y correlaciona con la mejora en la flexibilidad cognitiva de los animales tratados.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Ratones Triple Transgénicos Alzheimer's Disease (3xTgAD)

Se han utilizado ratones 3xTgAD y animales WT con un fondo genético 129/C57Bl6, machos y hembras de 4, 6, 9 y 12 meses. Los animales pertenecen a la colonia española, creada en julio de 2004 en la Unidad de Psicología Médica del Instituto de Neurociencias de la UAB a partir de progenitores recibidos del laboratorio del Dr. Frank LaFerla, del Departamento de Neurobiología y Conducta de la Universidad de California, Irvine (EEUU). Estos animales se han criado en el Servei d'Estabulari de la Universitat Autònoma de Barcelona, han sido alimentados ad-libitum con una dieta estándar en general y enriquecida puntualmente en Fembendazol (150ppm) durante un episodio de infección por parásitos. Se han mantenido en ciclos de luz-oscuridad de 12 horas de duración, según el procedimiento1049R4 (CEEAH de la UAB).

Todos los experimentos se han llevado a cabo en las instalaciones del Servei d'Estabulari.

1.2. Vectores plasmídicos

Los vectores plasmídicos utilizados en esta tesis doctoral son: pGV (generado en nuestro laboratorio), pAAVCAG-PLK-GFP-WPRE (generado en nuestro laboratorio), pSL-AAV-GFP-ITR (generado en nuestro laboratorio), pCR-XL-TOPO-IGF1R (ImaGenes), pBlueScript-GLP1R (ImaGenes), p-123T (MoBiTec), pXX6 (Généthon), pRep2Cap10 (generado en nuestro laboratorio). Además, en esta tesis se han generado los vectores pSMD2-TR-shIGF1R-1, pSMD2-TR-shIGF1R-2, pSMD2-TR-shIGF1R-3, pSMD2-TR-shIR, pGV-IGF1R, pCAG-GLP1R.

1.3. Cultivos bacterianos

1.3.1. Medio de crecimiento

Se prepara el medio a base del reactivo de Luria Broth (Mille's LB Broth, Conda) a razón de 25g por cada litro de agua. Se autoclava y posteriormente este medio se utilizará para el crecimiento de cultivos bacterianos, tanto para la realización de minipreparaciones de DNA como de maxipreparaciones.

1.3.2. Placas de cultivo

Las placas utilizadas para el crecimiento bacteriano son de LB-agar, y se preparan mezclando 25g de Luria Broth (Mille's LB Broth, Conda) y 15g de agar (Conda) por cada litro de agua. La mezcla se autoclava y

se deja que la temperatura de la misma baje hasta unos 45°C, momento en que se añade el antibiótico selectivo correspondiente en proporción 1:1.000 y se reparte la mezcla en placas de petri a 25mL por placa. Se deja secar antes de guardarlas a 4°C.

Antibióticos: Ampicilina (Fisher Chemical) (Preparada en agua destilada a una concentración de 100mg/ml)
 Kanamicina (GIBCO) (Preparada en agua destilada a una concentración de 10mg/mL)

1.3.3. Tampones para la preparación de bacterias quimiocompetentes

TFB1 (4°C): 100 mM RbCl (*Sigma*)
 50 mM MgCl₂ (Panreac)
 30 mM AcK (*Sigma*)
 10mM CaCl₂ (Panreac)
 15% glicerol (*Sigma*)
 pH= 5.8

TFB2 (4°C): 10 mM MOPS (Fluka)
 10 mM RbCl (*Sigma*)
 75 mM CaCl₂ (Panreac)
 15% glicerol (*Sigma*)
 pH= 6.8

Ambos tampones se esterilizan por filtración con filtros de 0,22µm (Millex).

1.3.4. Tampones para minipreparaciones de DNA

Tampón P1 o de resuspensión (4°C): 50 mM Tris-HCl (*Sigma*) pH=8.0
 10mM EDTA (USB)
 100mg/mL RNasaA (QIAGEN)

Tampón P2 o de lisis (RT): 200mM NaOH (Panreac)
 1% (w/v) SDS (Amresco)

Tampón P3 o de precipitación de proteínas (4°C): 3M AcK (*Sigma*)
 pH=5.5

1.4. Cloning

1.4.1. Enzimas

Para la digestión de los plásmidos empleados en experimentos de clonaje, se han empleado distintas enzimas de restricción de New England Biolabs (Servicios Hospitalarios) y Thermo Fisher Scientific. Para la desfosforilación de los extremos de los vectores tras la digestión, se ha empleado la FastAP™ Thermosensiti-

ve Alkaline Phosphatase (Thermo Fisher Scientific). Para la ligación de dos fragmentos, se ha utilizado la T4 DNA Ligasa (Thermo Fisher Scientific).

1.4.2. Reactivos para la preparación de geles de agarosa

Agarosa (Lonza)

TAE 1X: 40mM Tris-acético
0,1 mM EDTA
pH=8.0

RedSafe™ Nucleic Staining Acid Solution (Sigma), usado a una dilución 1:30.000 a partir del original en una disolución de Agarosa-TAE al 1-2%.

Marcadores de peso molecular: GeneRuler 1kb DNA Ladder (ThermoFisher Scientific)
GeneRuler 100pb DNA Ladder (ThermoFisher Scientific)

Para visualizar las bandas de DNA, se utiliza el fotodocumentador SynGene, que dispone de una fuente de luz ultravioleta y una cámara fotográfica. Al software asociado a este dispositivo permite realizar fotos con una mayor o menor exposición dependiendo de nuestras necesidades.

1.5. Cultivos celulares

El trabajo con cultivos celulares se ha llevado a cabo en las instalaciones de nivel de bioseguridad 2 para asegurar la esterilidad de todos los materiales y reactivos utilizados. Se ha trabajado en el interior de una campana de flujo laminar con sistema de luz ultravioleta (Telstar). Los cultivos se mantenían en un incubador (Forma Scientific) a 37°C y 5% CO₂, con una humedad relativa del 95%.

Para la observación del cultivo durante su mantenimiento se ha utilizado un microscopio Nikon, y para la observación de fluorescencia en células transfectadas o infectadas, se ha empleado un microscopio Nikon acoplado a una lámpara de luz de emisión de fluorescencia (Nikon) y a una cámara Digital Sight DS-U1 (Nikon). Para la criopreservación de los viales, se mantenían en un congelador -80°C en criotubos.

1.5.1. Líneas celulares

Las líneas celulares empleadas en esta tesis doctoral han sido las HEK-293-QB (Q-BIOgene) y HEK-293-AAV (Stratagene), clones de la línea celular inmortalizada de células humanas embrionarias de riñón HEK-293. Esta línea expresa el gen adenoviral E1 en trans y permite la producción de vectores AAV mediante una triple transfección con un plásmido que contenga las ITRs, otro con los genes rep y cap y otro con los genes adenovirales, excepto el E1. La línea HEK-293-QB se ha empleado para la realización de *studios in vitro*, y la HEK-293-AAV, puesto que es un clon que permite la producción de altos títulos de AAVs, se ha empleado para las producciones de los vectores adenoasociados.

1.5.2. Medios de cultivo y suplementos

Para el mantenimiento normal de los cultivos celulares se ha usado medio de crecimiento Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Labclinics), complementado con un 10% (v/v) de Suero Fetal Bovino (FBS) (Labclinics) y un 1% (v/v) de antibióticos Penicilina/Streptomina (P/S) (Labclinics).

En cambio, para la transfección se ha utilizado DMEM con sólo un 1% de FBS, y para la infección con AAVs, con un 2% de FBS.

Para la congelación de viales, se ha empleado FBS con un 10% de Dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma).

1.5.3. Tampones y reactivos empleados en cultivos celulares y producción de vectores virales

El tampón utilizado en la resuspensión de las células para llevar a cabo los pases de mantenimiento, se trata de:

Tampón Fosfato Salino (PBS): 137 mM NaCl (Panreac)
3mM KCl (Panreac)
10mM Na₂HPO₄·12H₂O (Panreac)
1,7mM KH₂PO₄ (Panreac)
pH= 7,4

Para la transfección, se emplea polietilenimina (PEI) lineal (PolyScience) y NaCl 0,9% (B. Braun).

Para la producción y purificación de AAVs se emplea:

Tampón de lisis: 50 mM Tris (Sigma)
20mM NaCl (Panreac)
2 mM MgCl₂ (Panreac)

PBS-MK: 1mM MgCl₂ (Panreac)
2,5 mM KCl (Panreac)
PBS

Para la determinación del título de las producciones de AAVs, es necesario hidrolizar la cápside del virus para liberar el genoma del mismo y cuantificarlo. El tampón de lisis empleado para ello es el siguiente:

Tampón de lisis: 20mM Tris pH=7.4 (Sigma)
200mM NaCl (Panreac)
0,2% SDS (Amresco)

1.6. Tampones de proteínas

1.6.1. Tampón RIPA

50 mM Tris (Sigma)
150 mM NaCl (Panreac)
1 mM EDTA (USB)
1% NP-40 (Fluka)
0,25% Sodium deoxycholate (Sigma)
50 mM NaF (Sigma)
10 mM C₃H₇Na₂O₅P·xH₂O (Sigma)
Na₄O₇P₂·10H₂O (Sigma)
Inhibidores de proteasas (Roche)

1.6.2. Reactivos para la preparación de los geles

SDS-Tris-HCl a pH 8.8: 1,5 M Tris (Sigma)
0,4% SDS (Amresco)

SDS-Tris-HCl a pH 6.8: 0,5 M Tris (Sigma)
0,4% SDS (Amresco)

Acrilamida:Bisacrilamida (29:1) (Amresco)

Tetrametil-etilen-diamina (TEMED) (Sigma)

Persulfato de amonio (APS) al 10% (Sigma)

Tampón de carga (6x): 375mM Tris-HCl pH 6,8
48% glicerol
9% β-mercaptoetanol
6% SDS
0,03% Azul de Bromofenol

1.6.3. Tampón de electroforesis

3,02 g Tris (Sigma)
14,4 g Glicina (Sigma)
1 g SDS (Amresco)
1L agua

1.6.4. Tampón de transferencia

5,02 g Tris (Sigma)
14,4 g Glicina (Sigma)
0,2 L metanol (Panreac)
0,8 L agua

1.6.5. TBS-T

50 mM Tris (Sigma)
136 mM NaCl (Panreac)
40 mM KCl (Panreac)
0,1% Tween-20 (Sigma)
pH=7.5

1.7. Anticuerpos

1.7.1. Para western-blot

Anticuerpos primarios:

Anti-Insulin R β (C-19), producido en conejo. Este anticuerpo se ha usado a una concentración de 1 μ g/mL en una incubación *overnight* a 4°C.

Anti-IGF-1R β (H-60) (Santa Cruz), producido en conejo. Este anticuerpo se ha usado a una concentración de 1 μ g/mL en una incubación *overnight* a 4°C.

Anti-IGF-1R β (Cell Signalling), producido en conejo. Este anticuerpo se ha usado a una dilución 1:1000 a partir del original en una incubación *overnight* a 4°C.

Anti-Phospho-IGF-I Receptor β (Tyr1135/1136)/Insulin Receptor β (Tyr1150/1151) (19H7), producido en conejo. Este anticuerpo se ha usado a una dilución 1:1.000 a partir del original en una incubación *overnight* a 4°C.

Anti-GLP1R (H-55), producido en conejo. Este anticuerpo se ha usado a una concentración de 1 μ g/mL en una incubación *overnight* a 4°C.

Anti-IRS-2 (H-205) (Santa Cruz), producido en conejo. Este anticuerpo se ha usado a una concentración de 1 μ g/mL en una incubación *overnight* a 4°C.

Anti β -actina (Sigma-Aldrich), producido en conejo. Este anticuerpo se ha usado a una concentración de 0,6 μ g/mL en una incubación *overnight* a 4°C.

Anti- β -tubulina (Sigma-Aldrich), producido en conejo. Este anticuerpo se ha usado a una concentración de 0,7 μ g/mL en una incubación *overnight* a 4°C.

Anticuerpo secundario:

Polyclona Swine Anti-Rabbit Ig/HRP (DakoCytomation). Este anticuerpo se ha usado a una dilución 1:10000 a partir del original en una incubación durante 1 hora a temperatura ambiente.

1.7.2. Para inmunohistoquímica

Anticuerpos primarios:

Anti- β -amyloid, 1-16 (6E10) Monoclonal Antibody, Purified (SIGNET, Covance), producido en ratón. Este anticuerpo se ha usado a una concentración de 0,5 μ g/mL, en una incubación *overnight* a 4°C. El epítipo de este anticuerpo se encuentra entre los aminoácidos 3-8 del A β .

Anti-Human-PHF-Tau Monoclonal Antibody, Purified (Thermo-Fisher), producido en ratón. Este anticuerpo se ha usado a una concentración de 1 μ g/mL en una incubación *overnight* a 4°C. El epítipo de este anticuerpo corresponde al residuo Thr231 fosforilado de la proteína humana Tau40.

Anti-Iba1 (Wako), producido en conejo. Este anticuerpo se ha usado a una concentración de 0,5 μ g/mL en una incubación *overnight* a 4°C.

Anti-Neuronal Nuclei (NeuN) Monoclonal Antibody (Millipore), producido en ratón. Este anticuerpo se ha usado a una concentración de 1 μ g/mL en una incubación *overnight* a 4°C.

Anticuerpos secundarios:

Alexa Fluor goat anti-Mouse IgG (Invitrogen). Este anticuerpo se ha usado a una dilución 1:200 a partir del original en una incubación durante 1 hora a temperatura ambiente.

Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG (H+L) (Invitrogen). Este anticuerpo se ha usado a una dilución 1:200 a partir del original en una incubación durante 1 hora a temperatura ambiente.

1.8. Oligonucleótidos para la amplificación génica por PCR

Los oligonucleótidos que se han utilizado como cebadores o *primers* en las reacciones de PCR que se han realizado en esta tesis son los siguientes:

Para la amplificación de un fragmento del gen del receptor de insulina:

IR Forward: GCTTGCTGAGCAACCTTATC (T_m = 61,26)

IR Revers: TTGAGCAGGTTGACGATTCC (T_m = 62,45)

La secuencia amplificada es de 181 pares de bases.

Para la amplificación de un fragmento del gen del receptor de IGF-1:

IGF-1R Forward: CTCAAGGATGGTGTCTTCACTAC (T_m = 57,86)

IGF-1R Revers: CACCCTCCATGACGAAAC (T_m = 57,30)

La secuencia amplificada es de 136 pares de bases.

Para la amplificación de un fragmento del gen del receptor de GLP-1:

GLP-1R Forward: CAAGCTGTTACAGAACTCTCC (Tm = 59,14)

GLP-1R Revers: ATATTCAAGTGCTCCAGCCTC (Tm = 58,42)

La secuencia amplificada es de 135 pares de bases.

Para la amplificación de un fragmento del gen del IRS-2:

IRS-2 Forward: TTCCAGAACGGCCTCAACTAT

IRS-2 Revers: CCTTCCTTCAAGTGATGGGACA

La secuencia amplificada es de 219 pares de bases.

Para la amplificación de un fragmento del gen de la APP:

APP Forward: GCTTGCACCAGTTCTGGATGG

APP Revers: GAGGTATTCAGTCATGTGCT

La secuencia amplificada es de 450 pares de bases.

Para la amplificación de un fragmento del gen de la proteína tau:

APP Forward: GAGGTATTCAGTCATGTGCT

APP Revers: TTCAAAGTTCACCTGATAGT

La secuencia amplificada es de 350 pares de bases.

Para la amplificación de un fragmento del gen de la actina:

Actina Forward: CACTATTGGCAACGAGCGGTTC

Actina Revers: ACTTGCGGTGCACGATGGAG

La secuencia amplificada es de 150 pares de bases.

2. MÉTODOS

2.1. Técnicas de extracción y manipulación del DNA

2.1.1. Preparación de bacterias quimiocompetentes

Para poder transformar bacterias con el plásmido de nuestro interés, éstas han de ser capaces de adquirir el DNA. Para ello, se emplean 5µL bacterias quimiocompetentes TOP10 (Invitrogen), las cuales se hacen crecer en 3mL de LB durante toda la noche a 37°C y en agitación. Con este precultivo se inoculará al día siguiente un cultivo de 200mL de LB y el cual se incuba a 37°C y en agitación hasta alcanzar una densidad óptica (DO_{600}) de 0,5 (fase exponencial de la curva de crecimiento).

Una vez se tiene el cultivo a la densidad óptica deseada, se incuba en hielo durante 5 minutos y a continuación, junto al mechero bunsen, se reparte en 4 tubos falcons de 50 mL. Se centrifuga durante 5 minutos a 4.000g y 4°C para precipitar las bacterias y poder así eliminar el sobrenadante decantando el tubo. A continuación, los precipitados se resuspenden en 30mL de TFB1 por cada 100mL de cultivo y se incuba en hielo durante 90 minutos. Transcurrido este tiempo, se centrifugan los tubos a 4.000g y 4°C durante otros 5 minutos y se vuelve a decantar el sobrenadante. Posteriormente, se resuspenden los precipitados en 4 mL por cada 100 mL de cultivo original y se hacen alícuotas de 100µL en tubos eppendorf enfriados previamente a -80°C, manteniéndolos en nieve carbónica y cerca de un mechero bunsen. Las alícuotas se almacenan a -80°C.

2.1.2. Transformación de bacterias quimiocompetentes por choque térmico

La transformación de bacterias con DNA plasmídico consiste en introducir un plásmido de interés en una bacteria, donde se replicará junto con el cromosoma bacteriano. La división celular y el posterior cultivo y crecimiento de las bacterias transformadas permite la amplificación del plásmido, el cual se puede extraer por diferentes métodos en función de la cantidad y pureza requerida del mismo.

Para empezar, se descongelan los viales de células quimiocompetentes necesarios (teniendo en cuenta la necesidad de un control positivo y uno negativo). Para ello, se incuban los viales en hielo durante 10 minutos. A continuación, se añaden 0,3-0,5µg de DNA y se mantienen los tubos en hielo 30 minutos más y a continuación se lleva a cabo el choque térmico (heat shock), incubándolos durante 45 segundos en un baño de agua a 42°C y devolviéndolos inmediatamente al hielo. Tras 2 minutos en hielo, se añade 200µL de LB a cada vial y se incuban a 37°C en agitación durante 1 hora. Este paso permite que se exprese el gen de resistencia a un antibiótico determinado que contiene el plásmido y que servirá para seleccionar las bacterias transformadas haciéndolas crecer en una placa de LB-agar con el antibiótico correspondiente. Para ello,

se vierten los 300µL presentes en el vial sobre una de estas placas y se extiende con la ayuda de un asa de siembra. Las placas se incuban durante toda la noche en una estufa a 37°C.

2.1.3. Minipreparaciones de DNA plasmídico

Para la obtención de pequeñas cantidades de DNA plasmídico, se llevan a cabo minipreparaciones (minis) de DNA. Para ello, se parte de un cultivo bacteriano inoculado el día anterior en 3mL de LB (al que se ha añadido el antibiótico para el que presenta resistencia el plásmido de interés) con una colonia crecida en una placa LB-agar (selectiva para la misma resistencia) y crecido durante toda la noche.

En primer lugar se centrifuga 1,5mL del cultivo a 12.000g durante un minuto para precipitar las bacterias al fondo del tubo y eliminar el sobrenadante. A continuación se añaden 200 µL de P1 para resuspender las bacterias y se lisan con 400 µL de P2. Tras invertir varias veces e incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente, se añaden 400 µL de P3 para neutralizar la mezcla y precipitar las proteínas presentes en la misma, invirtiendo el tubo hasta la homogeneización total y se incuba en hielo durante 10 minutos para ayudar a la precipitación. A continuación se centrifuga durante 10 minutos a 12.000g para que el precipitado se deposite en el fondo y recuperar el sobrenadante.

Finalmente, se procede a la precipitación del DNA con 0,6 volúmenes de isopropanol (Panreac), e incubando la solución durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras centrifugar nuevamente a 12.000g durante 10 minutos, se obtiene un precipitado de DNA, se descarta el sobrenadante y el precipitado se lava con 400 µL de etanol (Panreac) al 70% (v/v) y una última centrifugación a 12.000g durante 5 minutos. Se descarta el sobrenadante, se deja secar el precipitado durante 5 minutos y por último se resuspende con 20µL de agua MilliQ con RNasaA (QIAGEN).

2.1.4. Maxipreparaciones de DNA plasmídico

Para obtener mayores cantidades de DNA y de la pureza necesaria para poder transfectar células de mamífero en cultivo, las minis no son adecuadas, y se deben realizar maxipreparaciones (maxis) de DNA. Para ello, se parte de un volumen de cultivo mucho mayor (200mL), inoculado el día anterior a partir de un precultivo como el usado para las minis y con el antibiótico adecuado. Para llevar a cabo la extracción se ha utilizado el kit comercial E.Z.N.A.TM Fastfilter (Omega Bio-Tek), siguiendo las indicaciones del fabricante.

2.1.5. Digestión de DNA por enzimas de restricción

Las endonucleasas de restricción son enzimas que reconocen de manera específica unas secuencias de unos pocos nucleótidos, e hidrolizan el enlace fosfodiéster entre dos nucleótidos concretos en las dos cadenas de DNA. Esto permite cortar una secuencia concreta de un plásmido e introducirla en un segundo vector para generar un constructo con las características necesarias para el estudio.

Además, conociendo la secuencia nucleotídica del plásmido de interés se puede saber dónde cortará una enzima concreta y, por tanto, podemos estimar el tamaño de los fragmentos que resultarán. Esto permite comprobar si una ligación se ha producido correctamente, puesto que los fragmentos resultantes del plásmido original (parental) serán diferentes de los originados por el constructo generado. Las enzimas de restricción se han empleado con los tampones y en las condiciones especificadas por el fabricante (aproximadamente entre 5-10U de enzima por reacción).

2.1.6. Electroforesis de fragmentos de DNA en geles de agarosa

Para analizar los tamaños de los fragmentos de DNA resultantes de una digestión o, también, de una PCR, se separan por electroforesis en gel de agarosa. Para ello, en primer lugar se prepara un gel disolviendo agarosa al 1-2%, en función del tamaño de los fragmentos a separar, en tampón TAE. Para disolver la agarosa es necesario calentar la mezcla, una vez disuelta, se enfría ligeramente, se añade RedSafe en una proporción 1:30.000 y se vierte la mezcla en un soporte de geles, con un peine que permita hacer unos pocillos en el gel del tamaño deseado. Se deja polimerizar a temperatura ambiente. Una vez polimerizado, se coloca en la cubeta de electroforesis, se disponen las muestras en los pocillos, acompañadas de un marcador de peso molecular, bien de 1kb-10kb, bien de 100pb-1kb y se aplica una tensión de 80-120V durante el tiempo necesario para que se separen las bandas.

2.1.7. Purificación de fragmentos de DNA

La purificación de DNA a partir de bandas de agarosa se ha realizado con el kit comercial de GENE-CLEAN® (MPBio), siguiendo las especificaciones del fabricante.

2.1.8. Ligación

Para introducir un fragmento de DNA en el vector adecuado se lleva a cabo por ligación de ambos fragmentos, usando la T4DNA ligasa. Se debe tener en cuenta que, en el caso de que el vector se haya digerido con una única enzima, para evitar que ambos extremos del mismo religuen entre sí, se desfosforilan utilizando una fosfatasa alcalina. Para ello, se añade 1U del enzima al tubo del vector, 2µL del tampón 10x y se lleva la mezcla hasta un volumen total de 20µL. Se incuba a 37°C durante 15-20 minutos y finalmente se inactiva el enzima incubándola 5 minutos a 75°C.

Para la ligación, se preparan dos reacciones con condiciones diferentes para aumentar las probabilidades de ligación. Así, por una parte, se mezclan en un tubo eppendorf 50ng de vector con una cantidad equimolar (1:1) de inserto (calculada en función del número de pb de ambos fragmentos) y, por otra, se prepara una condición (1:3). A estos tubos se añade 1,5µL de tampón de la ligasa (10x) y 10U de ligasa, y se lleva hasta un volumen total de 15µL. De la misma forma se preparan los controles: uno sin ligasa para comprobar el fondo de vector sin digerir, y otro sin inserto para comprobar la eficiencia de la fosfatasa.

Finalmente se incuban las muestras a 16°C durante un mínimo de 4 horas (normalmente toda la noche) y se comprueba el resultado transformando bacterias quimiocompetentes, las cuales, al sembrarlas en placas de LB-agar deben producir colonias en las muestras 1:1 y 1:3, pero no en los controles. A continuación se pican varias colonias de las placas 1:1 ó 1:3, se crecen y se verifica la identidad del plásmido mediante la realización minis o maxis para obtener finalmente las cantidades necesarias de nuestro constructo para llevar a cabo los experimentos.

2.2. Técnicas de extracción y manipulación del RNA

2.2.1. Extracción de RNA: Método del QIAzol

El RNA es muy inestable y se degrada muy fácilmente. Por ello, se debe trabajar siempre con guantes, en una superficie limpia, con materiales libres de RNasa y mantener las muestras en hielo.

Sobre la muestra, conservada a -80°C, se añade 1 mL de QIAzol (QIAGEN) por cada 100 mg de tejido y se homogeniza con ayuda del TissueLyserLT (QIAGEN). A continuación se centrifuga durante 10 minutos a 12.000xg y 4°C y el sobrenadante se transfiere a un tubo eppendorf nuevo, se incuba 5 minutos a temperatura ambiente y se añaden 0,2 mL de cloroformo (Panreac) por cada 1mL de QIAzol añadido, agitando bien con vórtex.

Tras incubar 3 minutos a temperatura ambiente, se centrifuga 15 minutos de la misma forma que se ha hecho anteriormente y el sobrenadante se traspasa a un tubo nuevo. Se procede entonces a la precipitación del RNA con isopropanol a razón de 0,5 mL/1mL de QIAzol, agitando bien, incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugando durante 10 minutos como anteriormente. Para lavar el precipitado se emplea etanol 75% (1mL etanol/1mL QIAzol) y se centrifuga durante 5 minutos a 7.500g y 4°C. Finalmente, se resuspende el precipitado con 20 µL de agua DEPC.

2.2.2. Cuantificación de RNA: Nanodrop

Se emplea el espectrómetro Nanodrop, con el software *ND-1000 v:3.2.1* para determinar la concentración de las muestras de RNA, tomando 2 µL de la misma.

2.2.3. Experion

Para analizar la calidad del mRNA extraído, se emplea el sistema Experion (Figura 2.1). Para ello, se parte de 2 µL de muestra, y se desnaturalizan las muestras y 1 µL de ladder durante 2 minutos a 72°C, tras lo cual se pasan al hielo.

A continuación, se prepara el Gel Stain (GS): 65 μL gel filtrado + 1 μL stain azul (debe mantenerse en oscuridad); y las muestras: 5 μL loading tampón + 1 μL muestra (o RNA ladder).

CHIP (5a): 9 μL GS \rightarrow imprimir en la estación de imprimación (8), valor B de presión y 1 de tiempo (30 segundos).
 9 μL GS
 9 μL gel
 6 μL ladder y de cada una de las 12 muestras

A continuación se carga el chip en la estación de electroforesis (1).



Figura 6.41. Componentes del sistema Experion. Experion es un kit para la electroforesis automática de ácidos nucleicos y en esta tesis se emplea para evaluar la calidad del mRNA extraído de tejidos animales. El kit se compone por:

2. La estación de electroforesis
3. Software para el análisis de los resultados
4. Agitador vórtex adaptado a la forma de los chips
5. Reactivos que incluyen el GS, el gel, el stain azul y el ladder

(5), (6), (7) Chips

(8) Estación de imprimación

Los reactivos y chips son proporcionados por el Laboratori d'Anàlisi y Fotodocumentació de la Facultat de Ciències de la UAB. Los datos son procesados por *Experion™ Software, version 3.0, System Operation and Data Analysis Tools (Bio-Rad)* (2).

2.2.4. Retrotranscripción

Se parte de 1 μg de RNA y se diluye hasta 15 μL con H_2O DEPC. Para eliminar las estructuras secundarias del RNA, se desnaturaliza durante 20 minutos a 65 $^{\circ}\text{C}$. A continuación, se utiliza el kit comercial *iScript^(R) cDNA Synthesis kit (100 reacciones) (BioRad)*, siguiendo las especificaciones del fabricante.

2.3. Amplificación de DNA por PCR

Se parte de 20 ng de DNA. En el caso de que el DNA proceda de una retrotranscripción, se puede considerar que 1 μg de RNA puede dar lugar a un 1 μg de DNA copia (cDNA), que se encuentra en 20 μL . Este DNA se diluye cinco veces y la mezcla de reacción es la siguiente, en un volumen total de 25 μL :

Tampón (10X, con MgCl_2)	2,5 μL
Oligo FW (10 pmol/ μL)	1 μL (0,4 mM)
Oligo RV (10 pmol/ μL)	1 μL (0,4 mM)
dNTPs (25mM) (Invitrogen)	0,4 μL (200 μM)
DreamTaq (5u/ μL) (ThermoScientific)	0,3 μL (1,5 u)
Molde (0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	2 μL (20 ng)
Agua	15,8 μL

El programa empleado en el termociclador (Eppendorf, Mastercycler gradient) consiste en 45 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, alineamiento a una temperatura adecuada a cada pareja de primers, o bien un gradiente de temperatura, durante 30 segundos, y una temperatura de elongación de 72 °C durante 30 segundos.

2.4. Análisis de la expresión por PCR cuantitativa

Para la mezcla se emplea SYBR Green suministrado por el Laboratori d'Anàlisi y Fotodocumentació de la Facultat de Ciències de la UAB y se lleva a cabo la reacción en el termociclador del mismo servicio. La mezcla, por cada pocillo de reacción, se compone de:

SYBR Green (BioRad, REF 172-5124)	5 µL
Oligo FW	0,4 µL
Oligo REV	0,4 µL
cDNA	2 µL
Agua	2,2 µL

Los datos son procesados informáticamente por el software Bio-Rad CFX Manager.

Para calcular la expresión relativa de cada gen, se lleva a cabo la PCR de un gen de referencia, la actina. Los cálculos se realizan mediante el uso del programa kPCR diseñado por el Dr. Miguel Chillón, basado en los cálculos publicados por Pfaffl et al. (Pfaffl)

2.5. Técnicas de extracción y análisis de proteínas

2.5.1. Extracción de proteínas: Método RIPA

Se añaden 300 µL de tampón RIPA a la muestra de tejido (conservada a -80 °C) y se homogeneiza con un sonicador, con pulsos de 30 segundos, separados por descansos de otros 30 segundos. Todo el proceso se lleva a cabo en hielo para evitar el sobrecalentamiento de la muestra al sonicar.

A continuación se centrifuga durante 20 minutos a 14.000xg a 4 °C, y el sobrenadante se pasa a un tubo Eppendorf nuevo.

2.5.2. Cuantificación de proteínas: Método BCA

En primer lugar, para cuantificar las muestras se hacen diluciones 1:5, 1:10 y 1:20. La cuantificación se realiza empleando el kit comercial *BCA Protein Assay Kit*, 23227 (Thermo Scientific), que consta de un reactivo A (carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, ácido bicinconínico y tartrato de sodio en hidróxido de sodio 0,1 M) y un reactivo B (4% de sulfato de cobre).

Como patrón se utiliza la albúmina estándar suministrada por el kit en ampollas de 2mg/mL, y se hacen diluciones seriadas de 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL y 0 mg/mL para construir la recta patrón.

Para la determinación, se mezclan el reactivo A y el B en una proporción 50:1 y se añaden 2 μ L de muestra o patrón a 40 μ L de esta mezcla.

A continuación se lleva a cabo la determinación espectrofotométrica en un lector de ELISA con el programa específico para el método BCA.

2.5.3. Western-Blot

2.5.3.1. Preparación de los geles (separador al 7% y concentrador al 4%)

Separador	Concentrador
0,7 mL Acrilamida/bisacril. 29:1 40%	0,195 mL Acrilamida/bisacril. 29:1 40%
1 mL 4X Tris-HCl SDS pH 8,8	0,5 mL Tris-HCl SDS pH 6,8
2,3 mL agua	1,305 mL agua
25 μ L APS	25 μ L APS
5 μ L TEMED	5 μ L TEMED

Poner el gel separador entre los vidrios BIO-RAD, dejar polimerizar y a continuación poner el gel concentrador y el peine.

2.5.3.2. Preparación de las muestras

Mezclar 25 μ g de proteína (en un volumen total de 15 μ L) con 3 μ L de tampón de carga 6X. Desnaturalizar durante 10 minutos a 100 °C e incubar posteriormente 2 minutos en hielo.

2.5.3.3. Electroforesis

Poner los geles en la cubeta, añadir el tampón de electroforesis y cargar las muestras. Llevar a cabo la electroforesis a 60V durante 10 minutos, tras los cuales se sube el voltaje hasta 100V y se corre hasta que el frente llegue al final del gel. Para la identificación de las bandas según su tamaño se ha empleado un marcador de peso molecular (*PageRuler Pre-Stained*, Thermo Scientific).

2.5.3.4. Preparación de la transferencia

Se cortan papeles *Whatman* y una membrana *Amersham Hybond-P (GE Healthcare)* del tamaño del gel, y se incuban los geles durante 20 minutos en tampón de transferencia y los papeles *whatman* durante 10 minutos.

Por otra parte, se activa la membrana en metanol durante 10 minutos, se lava durante 5 minutos con agua destilada y finalmente se incuba durante 10 minutos en tampón de transferencia.

2.5.3.5. Transferencia

Se utiliza el sistema *Trans-Blot Turbo* (BioRad), y se coloca, desde el polo negativo al positivo en primer lugar un trozo de papel *Whatman*, a continuación el gel, la membrana, y un segundo trozo de papel *Whatman*. La transferencia se lleva a cabo a 30V durante 30-45 minutos.

2.5.3.6. Inmunodetección

A continuación se prepara la solución de bloqueo: BSA (*Sigma*) al 0,5% en TBST o leche en polvo (*Central Lechera Asturiana*) al 5% en TBST y se incuba la membrana en ella durante 1 hora en agitación. Esta solución se emplea también para diluir el anticuerpo primario (ver diluciones en el apartado 1.7.1. *Anticuerpos para Western-blot* de la sección 1. *Materiales*). La membrana se pone en agitación durante toda la noche dentro de una bolsa con la dilución correspondiente según el anticuerpo utilizado.

El anticuerpo secundario se prepara de la misma forma (1:10.000), tras lavar la membrana con TBST (TBS con 0,1% tween) con tres lavados rápidos, otro de 10 minutos y otro de 5 minutos. Tras la incubación durante 1 hora del anticuerpo secundario, se repiten los lavados y uno adicional en TBS.

Finalmente, se lleva a cabo la detección con los reactivos *ImmobilonTM Western Chemiluminiscent HRP Substrate* (*Millipore*):

- *HRP Substrate Peroxide Solution*
- *HRP Substrate Luminol Reagent*

La peroxidasa unida al anticuerpo secundario cataliza la oxidación del luminol por el peróxido y el luminol oxidado emite luz, que se puede detectar empleando un cassette con un film fotosensible *Amersham HyperfilmTM ECL* (*GE Healthcare*).

2.5.3.7. Densitometrías y cuantificación de bandas

Para cuantificar la intensidad de las bandas obtenidas, se ha empleado el Software *ImageStudioLite* (*LI-COR Biosciences*).

2.6. Técnicas de cultivos celulares

2.6.1. Mantenimiento y pases de cultivos en monocapa

El mantenimiento de las células utilizadas se ha realizado en placas de 15 cm, realizando un pase cuando las células alcanzan una confluencia del 75-80%. Para ello, se aspira el medio y se realiza un lavado con 5 mL de D-PBS. A continuación, se retira este PBS y se añaden 10 mL más para resuspender las células por pipeteo. Se pueden utilizar estos 10 mL para resuspender una placa más de la misma manera. A continuación, todo el volumen se pasa a un tubo *Falcon* y se centrifuga durante 5 minutos a 1.000g. Tras la centri-

fugación, las células quedan formando un precipitado al fondo del tubo y se elimina el sobrenadante por aspiración. El precipitado de células se resuspende suavemente con 2mL de medio por cada placa original, utilizando la pipeta, y se reparte en placas nuevas, donde se han añadido 17,5mL por placa. La cantidad de células a repartir en cada nueva placa depende de la dilución que se desee realizar, que, a su vez, depende de cada tipo de célula y de su ritmo de crecimiento, así como del uso que se le vaya a dar a las células. De manera que, por ejemplo, para el mantenimiento semanal de los cultivos, para las 293-AAV se realiza normalmente una dilución 1:3 ó 1:4 cada 3 ó 4 días respectivamente, mientras que las 293-QB se diluyen entre 1:6 y 1:8 para el mismo transcurso de tiempo. Por otra parte, si las células se han de utilizar al día siguiente para una transfección, por ejemplo, las 293-QB se diluyen 1:2 y las 293-AAV no se diluyen.

2.6.2. Congelación y descongelación de viales

Se procede de forma similar a la descrita para realizar un pase, pero una vez se obtiene el precipitado de células, éste se resuspende en 1mL de medio de congelación y se pasa a un criotubo. Inmediatamente, el criotubo se guarda en un depósito de congelación gradual y éste, a su vez, se guarda en un congelador -80°C. Al día siguiente, ya se pueden almacenar los criotubos en una caja de congelación.

2.6.3. Introducción de DNA plasmídico por transfección

La transfección de células de mamífero con constructos plasmídicos permite realizar un estudio *in vitro* de las funciones de los mismos. En primer lugar, se debe tener en cuenta que para llevar a cabo una transfección con una buena eficiencia es necesario que las células se encuentren a una confluencia del 70%, para lo cual se pueden sembrar el día de antes o dos días antes con la dilución adecuada.

En función de cuál sea el objetivo de la transfección, ésta se puede llevar a cabo en placas de 6 pozos (cuando es suficiente la visualización de las mismas para observar el resultado de las mismas o si se prevé utilizar un citómetro de flujo para ello); también se pueden transfectar placas de 10 cm si posteriormente se desea realizar una extracción de proteínas o RNA de las células transfectadas; y, en el caso de la producción de vectores adenoasociados, se lleva a cabo la transfección de placas de 15 cm. El procedimiento no varía en función del tipo de placa utilizada, y sólo se deben variar las cantidades de los reactivos de forma proporcional al número de células crecidas en la placa. Aquí se detallarán las cantidades usadas para transfectar un pozo de una placa de 6 pozos ($1,2 \times 10^6$ células).

En primer lugar, se disuelven 3µg de DNA en 200µL de NaCl 0,9% y, paralelamente, se prepara otra dilución con 6,75 µL de PEI 10mM (2,25µL por cada µg de DNA) en NaCl 0,9% ajustando un volumen total igual al de la dilución de DNA. A continuación, la dilución de PEI se añade gota a gota sobre la dilución de DNA, agitando con la punta de la pipeta durante la adición. La mezcla se incuba a temperatura ambiente

durante 20 minutos, tiempo en el que se forman los complejos entre el DNA y el PEI y que permitirá su entrada a través de la membrana de la célula.

Por otra parte, se aspira el medio del pozo o placa a transfectar y se añade medio de transfección (750 μ L en el caso de un pozo de placa de 6 pozos). A continuación se adiciona la mezcla PEI/DNA con cuidado de que no se resuspendan las células y la placa se guarda en el incubador de cultivos celulares durante 3-4 horas en el caso de las células 293-QB y hasta 6 horas para las 293-AAV. Al cabo de este tiempo, se aspira el medio y se añade medio fresco de crecimiento y se guardan en el incubador durante 48-72 horas, periodo en el que el plásmido tiene tiempo de expresarse en el interior de la célula.

2.6.4. Infección con vectores adenoasociados

Para probar la funcionalidad de un virus *in vitro*, se utilizan células 293-QB a una confluencia del 70%. En primer lugar, se aspira el medio de la placa y se añade el medio de infección justo para cubrir el fondo del pozo (50 μ L en el caso de un pozo de placa de 96, 750 μ L en uno de placa de 6 pozos). A continuación es suficiente con añadir el virus al pozo y guardar la placa en el incubador durante 24 horas. Al cabo de este tiempo, se añade medio de crecimiento hasta el volumen normal de mantenimiento y se mantiene en el incubador durante 48 horas más.

2.7. Producción y purificación de vectores adenoasociados

Las producciones de vectores adenoasociados realizadas en esta tesis doctoral se han llevado a cabo en las instalaciones de bioseguridad de nivel 2 (NSB2) del CBATEG, siguiendo el Reglamento de Seguridad de la Unidad de Producción de Vectores. Los residuos generados se han eliminado de acuerdo a los procedimientos de NSB2.

2.7.1. Producción de AAV2/10

Los vectores adenoasociados utilizados en esta tesis son AAVs pseudotipados, con las ITRs y los genes de replicación del AAV2, y los genes de la cápside del AAVrh10. Para ello, se realiza una triple transfección (Xiao et al., 1998) de células 293-AAV en la que se emplean tres plásmidos diferentes, uno contiene el transgén y el promotor de interés, así como las secuencias ITR necesarias para el empaquetamiento del virus; el plásmido Rep2Cap10 expresa los genes rep del AAV2 y los genes cap del AAVrh10; y, por último, el plásmido pXX6 expresa los genes del adenovirus (helper) necesarios para la replicación del AAV. Para la transfección se usa el método por polietilenimina (PEI) explicado anteriormente.

Para la producción de AAVs se emplean 20 placas de 15 cm, y la cantidad total de DNA transfectado es de 50 μ g por placa. Para ello, se mezclan los tres plásmidos en cantidades equimolares, calculadas en función del número de pb de cada uno. Tras mezclar el DNA con el PEI e incubarlos durante 20 minutos a tem-

peratura ambiente, se reparten 2mL en cada una de las placas, en las previamente se ha retirado el medio de crecimiento por 14 mL de medio de transfección. Las placas se guardan en el incubador durante 6 horas, tiempo al cabo del cual se retiran 8 mL de medio, se añaden 8 mL más de medio de crecimiento y se vuelven a guardar en el incubador durante 48 horas más.

Transcurrido este tiempo, se recogen las células con la ayuda de un rascador o *scraper*, se pasan a tubos Falcon de 50 mL y se centrifugan a 1000g durante 5 minutos. El sobrenadante se pasa a tubos nuevos, a razón de 35 mL/tubo y el precipitado se resuspende en 30 mL de tampón de lisis. Sobrenadante y precipitado se pueden guardar a -80°C hasta que se proceda a la purificación del virus.

2.7.2. Purificación por gradiente de iodixanol

Para la purificación del AAV, se siguen dos procedimientos paralelos que parten, bien del sobrenadante que se guardó al recoger las células, bien del precipitado, resuspendido y congelado en tampón de lisis.

Purificación a partir del sobrenadante: A cada tubo donde se pusieron 35 mL de sobrenadante se añaden 9 mL de Polietilenglicol (PEG) 40% (Fluka) y 1,2 mL de NaCl M y se incuba a 4°C durante 3 horas para precipitar las partículas víricas. Transcurrido este tiempo, se centrifuga a 3.000g y 4°C durante 30 minutos, se decanta el sobrenadante y los precipitados se resuspenden en un total de 5 mL de tampón de lisis, pipeteando enérgicamente para asegurar una completa disgregación del precipitado. A continuación, se añade 1µL de benzonasa (U/mL) (Novagen) y se incuba a 37°C durante 1 hora para eliminar los posibles restos de DNA celular. Transcurrido este tiempo, se mantiene a 4°C durante 48 horas hasta que se lleve a cabo la purificación en gradiente de iodixanol.

Purificación a partir del precipitado: En primer lugar, para asegurar la completa lisis de las células, se llevan a cabo tres ciclos de congelación-descongelación. Posteriormente, se centrifuga a 2.000g durante 10 minutos para precipitar los restos celulares y recuperar el sobrenadante, donde quedan disueltos todos los componentes solubles de la célula, y éste se pasa a un tubo falcon nuevo. Se añaden entonces 6µL de benzonasa (U/mL) y se incuba a 37°C durante 1 hora para degradar el DNA celular. Tras esta incubación, se centrifuga a 3.000g durante 20 minutos para precipitar los restos de DNA y se vuelve a recuperar el sobrenadante. A continuación se añaden 7,5mL de PEG 40% y 1mL de NaCl M y se incuba a 4°C durante 3 horas para precipitar las partículas víricas. Transcurrido este tiempo, se centrifuga a 8.000g y 4°C durante 15 minutos, se elimina el sobrenadante por decantación y se resuspende el precipitado en 5 mL de tampón de lisis. Finalmente, al igual que en la purificación a partir del sobrenadante, se incuba a 4°C durante 48 horas antes de llevar a cabo el último paso de la purificación.

Ambos procedimientos convergen en un último paso de purificación por gradiente de iodixanol. Para ello, se preparan 4 diluciones a diferentes concentraciones de iodixanol de la siguiente manera:

1. 9mL de Iodixanol 15% en NaCl 1M en PBS-MK
2. 6mL de Iodixanol 25% en PBS-MK con 20 μ L de phenol red (rojo).
3. 5mL de Iodixanol 40% en PBS-MK
4. 5mL de Iodixanol 60% con 2 μ de phenol red (amarillo).

El gradiente se forma añadiendo lentamente las distintas diluciones de iodixanol, comenzando por la menos densa, y continuando de forma consecutiva, en el fondo del tubo, atravesando las capas anteriormente depositadas. Por último, se añaden los 10mL del lisado (5mL de la purificación del sobrenadante y 5mL de la del precipitado). Se enrasa el tubo hasta arriba y se sella. Si fuera necesario, se prepara otro tubo con PBK-MK para compensar la centrifuga. Si se llevan a cabo dos purificaciones de manera simultánea, se equilibran los dos gradientes entre sí. El gradiente se centrifuga en una centrifuga de alta velocidad, a 69.000g y 16°C durante 90 minutos.

Finalmente, se emplea un colector de fracciones para perforar el tubo por el fondo, y se recogen fracciones de 500 μ L del virus purificado. Los primeros 3 μ L de se desechan y se recogen un total de 8 fracciones, que más tarde se titularán por la técnica del picogreen.

2.7.3. Determinación del título de la producción por picogreen

La determinación del título de las producciones de vectores adenoasociados se ha realizado por la técnica del picogreen (App Vir), una molécula que se intercala en la doble cadena de DNA. El procedimiento se ha realizado según el protocolo de Piedra et al. (Piedra et al.). Debido a que los AAVs poseen un genoma de cadena sencilla en el interior de una cápside proteica, se debe llevar a cabo un paso previo diluyendo 2 μ L de cada fracción por duplicado hasta un volumen total de 10 μ L con TE, a lo que se añaden 10 μ L de tampón de lisis. Entonces se somete la muestra a un calentamiento durante 1 hora a 70°C en el termociclador para desnaturalizar las proteínas de la cápside y se liberen los genomas (los cuales estarán compuestos por cadenas + y cadenas – en proporciones similares) y a continuación se baja la temperatura 5°C cada minuto para favorecer la hibridación de cadenas + y – (procedentes de distintas cápsides).

Por otra parte, para tener un control de la cantidad de DNA libre contaminante que pueda existir en la preparación, se toman otros 2 μ L de cada muestra por duplicado y se enrasan hasta un volumen total de 20 μ L con TE.

Tras la preparación de todas la muestras, se disponen los 20 μ L de cada una en los pocillos de una placa negra de 96 pocillos, junto con una recta patrón compuesta por muestras de 40ng, 13,33ng, 4,44ng, 1,48ng, 0,49ng, 0,16ng y 0,12ng de DNA. El blanco se hace con TE. A continuación se añaden 180 μ L de picro-

green en cada pocillo, y tras una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, se lee la fluorescencia de cada muestra con un fluorímetro.

Para convertir los valores de fluorescencia obtenidos para cada muestra en ng de DNA, se interpolan los valores de cada muestra en la recta patrón y, sobre este valor se aplica la siguiente fórmula:

$$ng/mL = \frac{A \cdot 1,82 \cdot 10^{12}}{B}$$

Donde A= ng DNA·1000/200µL, son los ng/mL de DNA de cada muestra, y B es la longitud del genoma del AAV (distancia entre las ITRs).

De esta manera se tiene en cuenta que la fluorescencia puede estar afectada por el tamaño del genoma, y que ésta se genera al hibridar una cadena de una partícula vírica con la de otra, por lo que se añade el factor de corrección de 1,82.

2.8. Experimento in vivo

2.8.1. Genotipado de los animales

Previamente a la utilización de los animales para la inyección de los vectores generados, se comprueba su genotipo mediante una extracción de DNA genómico y una PCR que amplifica un fragmento de los genes APP y tau.

Para la extracción de genómico, se parte de un trozo de cola del animal y se digiere incubándolo a 56°C en agitación durante toda la noche en un tampón de lisis con proteinasa K .

Tampón de lisis: 100 mM Tris pH 8,5
 200 mM NaCl
 5 mM EDTA
 0,2% SDS

Antes de su uso, se añaden 100µg/mL de proteinasa K.

Tras la digestión de las colas, se centrifugan a 12.000 rpm durante 5 minutos y se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo, donde se añaden 500µL de isopropanol para precipitar el DNA. Tras agitar la mezcla, se centrifuga de nuevo a 12.000 rpm durante 10 minutos y se elimina el sobrenadante. A continuación se lava el precipitado de DNA con 500µL de EtOH 70%. Se vuelve a centrifugar durante unos segundos y se elimina el sobrenadante. Se deja secar el precipitado y finalmente se resuspende en una solución de TE (10mM Tris-HCl pH 7,4, 1mM EDTA pH 8,0) agitándolo toda la noche a 56 °C o durante 2 horas a 65°C.

2.8.2. Inyección intracraneal de vectores AAV.

El procedimiento de inyección in vivo de vectores adenoasociados se llevó a cabo en las instalaciones del Servei d'Estabulari de la UAB. Los ratones fueron manipulados de acuerdo a las normas de bienestar animal y todo el protocolo fue aceptado por el Comité de Ética de la UAB (CEAAH 2196).

La inyección intracraneal consiste en la administración directa a una zona concreta del cerebro. En el caso de los vectores con el cDNA de IGF1R y GLP1R, se inyectan en el hipocampo, principal órgano implicado en los procesos de memoria, y en el córtex prefrontal, área responsable del comportamiento y la toma de decisiones. En el caso de los vectores con los shRNAs, se inyectan sólo en hipocampo, área en la que empiezan a aparecer los primeros depósitos de A β intraneuronal. En ambos casos se realiza una inyección en cada hemisferio, con un volumen total de 3 μ L de virus a una concentración de $1,58 \cdot 10^{12}$ vg/mL en el primer caso y de 10^{12} vg/mL en el segundo.

Para empezar, el animal es anestesiado con una mezcla de Ketamina/Xilacina (10mg/1mg por kg de peso) inyectada por vía intraperitoneal. Para evitar la sequedad de la cornea, se aplica una gota de NaCl 0,9% (B. Braun, REF) en cada ojo. Se comprueba el reflejo podal y cuando éste desaparece se procede a iniciar la cirugía. En primer lugar, se realiza un corte de unos 7-8mm en la piel del cráneo del animal, y se localiza el punto Bregma. A continuación, con la ayuda de un aparato estereotáxico, se coloca la aguja de una jeringa Hamilton de 10 μ L (en cuyo interior se ha dispuesto la solución con el virus) en el punto correspondiente a las coordenadas de uno de los puntos de administración. Se marca la posición de este punto y con una aguja de 0,40 se perfora cuidadosamente el cráneo sin tocar el cerebro. A través de este agujero, se introduce la Hamilton, acoplada a una bomba de microinyección, que dispensa el contenido de la jeringa a un ritmo de 0,5 μ L/minuto.

Tras realizar la inyección de la misma manera en todos los puntos de administración, se retira al animal del aparato estereotáxico, se cierra la herida con una grapa y se devuelve a su jaula administrando calor hasta su recuperación de la anestesia si fuera necesario para evitar la hipotermia.

Las coordenadas de los puntos de inyección fueron las siguientes:

Hipocampo: AP: -2,46mm, L: 2,7mm, V: -2,5mm

Córtex Prefrontal: AP: 2,80mm, L: 1,5mm, V: -1,4mm

2.9. Pruebas de comportamiento

2.9.1. Pruebas sensoriomotoras

2.9.1.1. Barra de madera

Para medir la coordinación motora y el equilibrio se utiliza una barra de madera de 1cm de diámetro, suspendida 40cm por encima de la superficie de trabajo. El animal se coloca en el centro de esta barra, donde se han marcado segmentos de 10cm de longitud a un lado y otro del centro. Se cuenta el número de segmentos que recorre el animal en 20 segundos y, en su caso, el tiempo que tarda en caer. Se realizan 2 trials consecutivos.



Figura 6.42. Prueba de equilibrio y coordinación en la barra de madera.

2.9.1.2. Barra de metal

Como en el caso anterior, esto permite medir la coordinación motora y el equilibrio, pero con una mayor dificultad para el animal, pues no puede clavar las garras en la madera para evitar caer. Como en el caso anterior, se llevan a cabo 2 trials consecutivos de 20 segundos cada uno, y se anota el número de segmentos recorridos y la latencia en caer.

2.9.1.3. Percha

Utilizando una percha metálica, se puede medir la capacidad prensil y la coordinación motora del animal, dejando que éste se agarre con las patas delanteras a la barra horizontal de la percha, de 2mm de diámetro y 400mm de longitud, y suspendida 60 cm por encima de la superficie de trabajo. El animal se coloca en el centro de la misma y se realizan 2 trials de 5 segundos cada uno y un tercero de 60s. El tiempo que tarda en caer en el trial de 5 segundos es indicativo de la fuerza física del animal, y los segmentos recorridos dan una idea de la coordinación motora del mismo. Por su parte, tiempo que tarda en caer en el trial de 60 segundos es directamente proporcional a la resistencia física, y los segmentos recorridos correlacionan con la coordinación locomotora.



Figura 6.43. Prueba de fuerza, resistencia física y coordinación locomotora en la percha.

2.9.1.4. Prueba de reflejos

Por último, se miden los reflejos visual y de extensión de las patas posteriores, suspendiendo al ratón por la cola desde una altura de unos 50cm y acercándolo lentamente hacia una superficie negra. El test se realiza 3 veces consecutivas, observando si el animal extiende hacia delante las patas delanteras (reflejo visual correcto) y si extiende hacia atrás las traseras (reflejo de extensión correcto).

2.9.2. Corner Test

En la prueba del corner, se coloca al animal en el centro de una caja idéntica a la utilizada para su estabulación. Se deja que el animal explore libremente la caja durante 30 segundos, contabilizando el número de veces que se acerca a cualquiera de las esquinas (corners) y las veces que se levanta sobre sus patas traseras, apoyando las delanteras en la pared de la caja (rearings). También se anota el tiempo en el que el animal realiza el primer rearing.

2.9.3. Open Field

En esta prueba se emplea un tablero blanco de 50x50cm, con unas paredes de 10 cm de alto. En dicho tablero se dibuja una cuadrícula de 5x5 cuadrados de 10x10cm. Se coloca al ratón en el cuadrado del

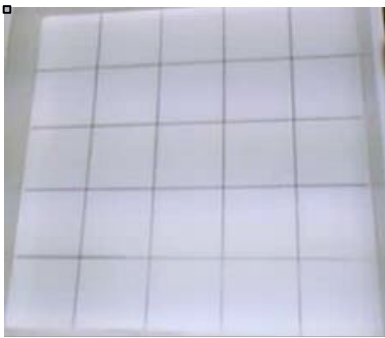


Figura 6.44. Tablero empleado en la prueba del *Open Field*.

centro y se le deja durante 5 minutos que explore el tablero. Se anota el tiempo en el que el ratón sale de la cuadrícula central, el tiempo en el que llega a la última línea de cuadrados (periferia) y el tiempo en el que realiza el primer rearing y el primer grooming. Para cada minuto, se contabiliza el número de líneas horizontales que cruza en su recorrido (crossings), lo que servirá para estimar la actividad horizontal del animal. También se cuentan las veces que realiza un rearing, tanto en la pared como en el centro del tablero, para estimar la actividad vertical, así como los groomings realizados.

Entre animal y animal, se limpia el aparato con etanol y agua.

2.9.4. Black and White Box Test

Para realizar esta prueba se precisa de una caja dividida en dos partes, una de color blanco y otra de color negro. La parte blanca presenta en el fondo una cuadrícula de 2x3 de 10x10cm y la negra, una cuadrícula de 2x2 de las mismas dimensiones. Ambas partes se comunican por una abertura a modo de puerta de 5x7cm. Para empezar, se coloca al animal en una de las dos esquinas más alejadas de la puerta de la parte negra. Durante 5 minutos, se deja que el animal explore libremente, se anota el tiempo que tarda en salir por primera vez a la parte blanca y el número de veces que atraviesa la puerta de una parte a otra. También se contabiliza el número de crossings y rearings en cada una de las dos partes.



Figura 6.45. Caja Black-and-White.

Entre animal y animal, se limpia el aparato con etanol y agua.

2.9.5. T-Maze

Se utiliza un laberinto en forma de “T” para llevar a cabo una prueba de “Spontaneous Alternation”. Para ello, se coloca al ratón en el extremo del brazo más largo de la “T”, mirando hacia la pared. En esta parte existe una compuerta que, inicialmente, se encontrará cerrada. Se observa el comportamiento del animal, anotando el tiempo que tarda en mover una mano por primera vez y el momento en que se gira hacia la compuerta. Al cabo de 20 segundos, se abre dicha compuerta y a partir de este momento, se deja que el



Figura 6.46. Estructura empleada en el T-maze.

animal explore todo el laberinto. También se anota el tiempo que tarda en llegar a la intersección de la “T” y el momento en el que entra en cada uno de los otros brazos. Se considera que el test se ha realizado correctamente si el animal va pasando de un brazo a otro de la “T” de forma que no entre en un brazo que ya ha visitado si aún le queda otro por explorar. En caso contrario, se deja que el ratón explore el laberinto hasta que haya realizado todo el recorrido, y se anotará el número de veces que ha entrado en un brazo que ya había explorado anteriormente (errores).

Entre animal y animal, se limpia el aparato con etanol y agua.

2.9.6. Morris Water Maze

Previamente a la realización del *Morris Water Maze (MWM)*, se deben disponer los animales en cajas individuales, en las que permanecerán durante los periodos entre los diferentes trials de un mismo día. Al final del día, los animales se devuelven a su jaula de estabulación junto con el resto de animales que comparten la misma jaula.

Se emplea una piscina de 1 metro de diámetro, en la cual se coloca una plataforma cilíndrica de unos 10cm de altura y 8cm de diámetro en posición Norte respecto al observador, y a una distancia de unos 10cm de la pared de la piscina. En el agua ($T^{\circ} = 25 \pm 2$ °C) se añade pintura blanca hasta que quede opaca.

Esta prueba se realiza a lo largo de seis días, y en el primero, la plataforma es visible por encima de la superficie del agua y se señala con una bandera. Este primer día se llamará *CUE*. Para cada animal se llevan a cabo 4 trials, durante los cuales el ratón se introduce en la piscina por el Este o el Oeste de forma alterna. Se deja que el ratón nade libremente por la piscina hasta que encuentre la plataforma y se suba a ella, donde permanecerá durante 20 segundos. Al cabo de este tiempo, se retira al animal y se le devuelve a su caja individual. Se deja que el animal nade durante un máximo de 60 segundos, si al cabo de este tiempo, el animal no ha subido a la plataforma, se le coloca encima de la misma y se le deja allí durante 20 segundos, tras los cuales se le devuelve a su caja. En cada trial, se introducirán todos los animales de forma consecutiva y, al

acabar con el último, se comienza el siguiente trial con todos los animales en el mismo orden, un periodo entre trial y trial de unos 45-50 minutos.

Al día siguiente, se añade agua a la piscina hasta que la superficie de la misma quede aproximadamente 50mm por encima de la plataforma. También se retira la bandera. El procedimiento es el mismo que durante el primer día, pero se considera suficiente con que el animal toque la plataforma, aunque no se suba a ella. Así se procede durante tres días más (entrenamiento, prueba de adquisición o *Place Task, PT*) y, en el último día, al cabo de 2 horas desde el último trial, se realiza un trial más durante el que se lleva a cabo una prueba de memoria, sin la plataforma (*Removal*). Al cabo de 24h (6º día) del último PT, se realiza una nueva prueba de memoria.

Todas las pruebas de comportamiento, a excepción de las pruebas sensoriomotoras y el *Corner Test*, son grabadas con una cámara Labtec WebCam Pro. Para el análisis de las distancias nadadas por los animales en el *MWM* se ha empleado el Software *Smart3* (Panlab).

2.10. Eutanasia y toma de muestras

La eutanasia de los animales se lleva a cabo por decapitación tras ser anestesiados con Isoflurano. Rápidamente, para evitar la degradación del RNA y las proteínas, se procede a la extirpación del cerebro, y se disecciona en 7 áreas diferentes: Bulbo Olfatorio, Córtex Prefrontal, Córtex Motor, Córtex Entorrino, Cerebelo, Hipocampo e Hipotálamo. Las muestras se congelan rápidamente en nitrógeno líquido o nieve carbónica, y se guardan a -80°C hasta su uso.

Se procesan ambos hemisferios de la misma manera, utilizando uno para la extracción de proteínas y el otro para la extracción de RNA, o bien, uno de los dos se disecciona en áreas para extracción de proteínas o RNA y el otro se mantiene entero y se pone en un tubo con paraformaldehído 4% para fijarlo e incluirlo posteriormente en bloques de OCT para realizar tinciones e inmunohistoquímicas.

2.11. Inmunohistoquímica y tinciones de cortes histológicos

2.11.1. Fijación e inclusión en bloques de OCT

Tras la extracción del cerebro, éste se corta por la mitad en sentido sagital, reservándose una mitad para su disección en diferentes áreas que serán usadas para la extracción de RNA o proteínas, y la otra mitad se guarda en un tubo falcon de 15 mL con 5 mL de paraformaldehído 4% preparado en una dilución de tampón fosfato (0,02M NaH₂PO₄, 0,08M Na₂HPO₄). Para asegurar la fijación del tejido, se mantiene así a 4°C durante un mínimo de 4-5 días. Transcurrido este tiempo, se lava el tejido con PBS entre 5 y 7 veces y se sumergen en una disolución de sacarosa al 30%, que actuará de criopreservante. Así se mantiene durante

24-48 horas a 4°C, tiempo durante el cual se observa que, inicialmente, el tejido flota en esta disolución, pero a medida que la sacarosa penetra en el tejido, éste se va hundiendo, hasta llegar al fondo. La solución se cambia 2-3 veces en este periodo.

A continuación, los tejidos se colocan en moldes de plástico y se cubren con OCT (O.C.T. Compand, Tissue-Tek, Sakura) y los moldes se sumergen en isopentano enfriado con nitrógeno líquido, hasta que quedan completamente congelados. Los bloques se guardan a -20°C hasta su posterior procesamiento en el criostato.

2.11.2. Realización de cortes y montaje

Los cortes de los bloques de OCT se realizan en el criostato con un espesor de 20µm. Previamente, se deben tratar con silane los portas donde se pescarán los cortes. Para ello, se incuban con silane durante 1 minuto, y a continuación se lavan con PBS y se dejan secar toda la noche a 55°C. Los cortes de tejido se disponen sobre estos portas y se guardan a -20°C hasta llevar a cabo la tinción o la inmunohistoquímica.

2.11.3. Inmunohistoquímica

Para empezar, se calientan los portas con las muestras a 55°C durante 10 minutos y se realiza un lavado con Tris 0,05M (Sigma, REF T1503-1KG), seguido de dos lavados con Tris 0,05M-Tween 20, de 10 minutos cada uno. A continuación, se incuba con la solución de bloqueo (BSA 0,2% en Tris-Tween) durante 1 hora a temperatura ambiente y transcurrido este tiempo, se añade el anticuerpo primario (diluido en solución de bloqueo a la dilución adecuada) y se incuba a 4°C durante toda la noche. Así, al día siguiente, se realizan 3 lavados con Tris-Tween de 10 minutos cada uno y a continuación se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario, diluido también en solución de bloqueo. Finalmente se realizan 3 lavados como los anteriores y un último lavado con Tris 0,05M de 10 minutos, y se procede a montar las muestras con DPX y un cubreobjetos.

Las muestras se han visualizado en un microscopio Nikon acoplado a una lámpara de emisión de fluorescencia y a una cámara (Nikon)

2.12. Análisis estadístico

Los resultados relativos a los estudios de expresión se presentan como la media de los valores obtenidos para cada muestra \pm la desviación estándar, y los resultados de las pruebas de comportamiento se expresan como la media de los valores obtenidos para cada animal \pm el error estándar (SEM= Desviación típica/ \sqrt{n}). Las diferencias entre grupos se analizaron, siguiendo el test estadístico adecuado a las condiciones del experimento: T-studen, ANOVA de una vía, ANOVA de dos vías o por comparaciones múltiples conside-

rando diferencias estadísticas significativas para valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) y $p < 0,0001$ (****).

VII. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

A

- Abbas T, Favre E, Holscher C (2009) Impairment of synaptic plasticity and memory formation in GLP-1 receptor KO mice: Interaction between type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Behavioural brain research* 205:265-271.
- Abbott MA, Wells DG, Fallon JR (1999) The insulin receptor tyrosine kinase substrate p58/53 and the insulin receptor are components of CNS synapses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:7300-7308.
- Aberg MA, Aberg ND, Palmer TD, Alborn AM, Carlsson-Skwirut C, Bang P, Rosengren LE, Olsson T, Gage FH, Eriksson PS (2003) IGF-I has a direct proliferative effect in adult hippocampal progenitor cells. *Molecular and cellular neurosciences* 24:23-40.
- Acland GM, Aguirre GD, Bennett J, Aleman TS, Cideciyan AV, Bencicelli J, Dejneka NS, Pearce-Kelling SE, Maguire AM, Palczewski K, Hauswirth WW, Jacobson SG (2005) Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 12:1072-1082.
- Adriouch S, Franck E, Drouot L, Bonneau C, Jolinon N, Salvetti A, Boyer O (2011) Improved Immunological Tolerance Following Combination Therapy with CTLA-4/Ig and AAV-Mediated PD-L1/2 Muscle Gene Transfer. *Frontiers in microbiology* 2:199.
- Agardh CD, Lesniak MA, Gerritsen GC, Roth J (1986) The influence of plasma insulin concentrations on tissue insulin levels in rodents: a study of the diabetic Chinese hamster and the ob/ob mouse. *Metabolism: clinical and experimental* 35:244-249.
- Al-Bassam J, Ozer RS, Safer D, Halpain S, Milligan RA (2002) MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments. *The Journal of cell biology* 157:1187-1196.
- Alden TD, Pittman DD, Hankins GR, Beres EJ, Engh JA, Das S, Hudson SB, Kerns KM, Kallmes DF, Helm GA (1999) In vivo endochondral bone formation using a bone morphogenetic protein 2 adenoviral vector. *Human gene therapy* 10:2245-2253.
- Aleman R, Lai S, Lou YC, Jan HY, Fang X, Zhang WW (1999) Complementary adenoviral vectors for oncolysis. *Cancer gene therapy* 6:21-25.
- Altman R, Rutledge JC (2010) The vascular contribution to Alzheimer's disease. *Clin Sci (Lond)* 119:407-421.
- Alvarez E, Martinez MD, Roncero I, Chowen JA, Garcia-Cuartero B, Gispert JD, Sanz C, Vazquez P, Maldonado A, de Caceres J, Desco M, Pozo MA, Blazquez E (2005) The expression of GLP-1 receptor mRNA and protein allows the effect of GLP-1 on glucose metabolism in the human hypothalamus and brainstem. *Journal of neurochemistry* 92:798-806.
- Alvarez EO, Beauquis J, Revsin Y, Banzan AM, Roig P, De Nicola AF, Saravia F (2009) Cognitive dysfunction and hippocampal changes in experimental type 1 diabetes. *Behavioural brain research* 198:224-230.
- Ancoli-Israel S, Parker L, Sinaee R, Fell RL, Kripke DF (1989) Sleep fragmentation in patients from a nursing home. *Journal of gerontology* 44:M18-21.
- Anliker B, Muller U (2006) The functions of mammalian amyloid precursor protein and related amyloid precursor-like proteins. *Neuro-degenerative diseases* 3:239-246.
- Araujo JA, Studzinski CM, Milgram NW (2005) Further evidence for the cholinergic hypothesis of aging and dementia from the canine model of aging. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 29:411-422.
- Ariza L, Gimenez-Llort L, Cubizolle A, Pages G, Garcia-Lareu B, Serratrice N, Cots D, Thwaite R, Chillon M, Kremer EJ, Bosch A (2014) Central nervous system delivery of helper-dependent canine adenovirus corrects neuropathology and behavior in mucopolysaccharidosis type VII mice. *Human gene therapy* 25:199-211.
- Avery OT, Macleod CM, McCarty M (1944) Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type Iii. *The Journal of experimental medicine* 79:137-158.
- Awad N, Gagnon M, Messier C (2004) The relationship between impaired glucose tolerance, type 2 diabetes, and cognitive function. *Journal of clinical and experimental neuropsychology* 26:1044-1080.

B

- Babri S, Badie HG, Khamenei S, Seyedlar MO (2007) Intrahippocampal insulin improves memory in a passive-avoidance task in male wistar rats. *Brain and cognition* 64:86-91.
- Baddeley AD, Bressi S, Della Sala S, Logie R, Spinnler H (1991) The decline of working memory in Alzheimer's disease. A longitudinal study. *Brain : a journal of neurology* 114 (Pt 6):2521-2542.
- Baeta-Corral R, Gimenez-Llort L (2015) Persistent hyperactivity and distinctive strategy features in the *Morris Water Maze* in 3xTg-AD mice at advanced stages of disease. *Behavioral neuroscience* 129:129-137.
- Banks WA, Jaspán JB, Huang W, Kastin AJ (1997) Transport of insulin across the blood-brain barrier: saturability at euglycemic doses of insulin. *Peptides* 18:1423-1429.
- Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Lieberburg I, Motter R, Nguyen M, Soriano F, Vasquez N, Weiss K, Welch B, Seubert P, Schenk D, Yednock T (2000)

- Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nature medicine* 6:916-919.
- Barger SW, Harmon AD (1997) Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E. *Nature* 388:878-881.
- Bast T, Zhang WN, Heidebreder C, Feldon J (2001) Hyperactivity and disruption of prepulse inhibition induced by N-methyl-D-aspartate stimulation of the ventral hippocampus and the effects of pretreatment with haloperidol and clozapine. *Neuroscience* 103:325-335.
- Baura GD, Foster DM, Porte D, Jr., Kahn SE, Bergman RN, Cobelli C, Schwartz MW (1993) Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain. *The Journal of clinical investigation* 92:1824-1830.
- Beattie EC, Carroll RC, Yu X, Morishita W, Yasuda H, von Zastrow M, Malenka RC (2000) Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. *Nature neuroscience* 3:1291-1300.
- Beauquis J, Saravia F, Coulaud J, Roig P, Dardenne M, Homo-Delarche F, De Nicola A (2008) Prominently decreased hippocampal neurogenesis in a spontaneous model of type 1 diabetes, the nonobese diabetic mouse. *Experimental neurology* 210:359-367.
- Beck M, Bigl V, Rossner S (2003) Guinea pigs as a nontransgenic model for APP processing in vitro and in vivo. *Neurochemical research* 28:637-644.
- Benedict C, Hallschmid M, Hatke A, Schultes B, Fehm HL, Born J, Kern W (2004) Intranasal insulin improves memory in humans. *Psychoneuroendocrinology* 29:1326-1334.
- Bennett DA, Schneider JA, Arvanitakis Z, Kelly JF, Aggarwal NT, Shah RC, Wilson RS (2006) Neuropathology of older persons without cognitive impairment from two community-based studies. *Neurology* 66:1837-1844.
- Benton D (1990) The impact of increasing blood glucose on psychological functioning. *Biological psychology* 30:13-19.
- Bergenstal RM, Wysham C, Macconell L, Malloy J, Walsh B, Yan P, Wilhelm K, Malone J, Porter LE (2010) Efficacy and safety of exenatide once weekly versus sitagliptin or pioglitazone as an adjunct to metformin for treatment of type 2 diabetes (DURATION-2): a randomised trial. *Lancet* 376:431-439.
- Berns KI, Pinkerton TC, Thomas GF, Hoggan MD (1975) Detection of adeno-associated virus (AAV)-specific nucleotide sequences in DNA isolated from latently infected Detroit 6 cells. *Virology* 68:556-560.
- Berns KI, Rose JA (1970) Evidence for a single-stranded adenovirus-associated virus genome: isolation and separation of complementary single strands. *Journal of virology* 5:693-699.
- Bertoni-Freddari C, Sensi SL, Giorgetti B, Baliotti M, Di Stefano G, Canzoniero LM, Casoli T, Fattoretti P (2008) Decreased presence of perforated synapses in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Rejuvenation research* 11:309-313.
- Bertram L, Blacker D, Mullin K, Keeney D, Jones J, Basu S, Yhu S, McInnis MG, Go RC, Vekrellis K, Selkoe DJ, Saunders AJ, Tanzi RE (2000) Evidence for genetic linkage of Alzheimer's disease to chromosome 10q. *Science* 290:2302-2303.
- Bevan AK, Duque S, Foust KD, Morales PR, Braun L, Schmelzer L, Chan CM, McCrate M, Chicoine LG, Coley BD, Porensky PN, Kolb SJ, Mendell JR, Burghes AH, Kaspar BK (2011) Systemic gene delivery in large species for targeting spinal cord, brain, and peripheral tissues for pediatric disorders. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 19:1971-1980.
- Bhat NR, Thirumangalakudi L (2013) Increased tau phosphorylation and impaired brain insulin/IGF signaling in mice fed a high fat/high cholesterol diet. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 36:781-789.
- Biessels GJ, Kappelle LJ (2005) Increased risk of Alzheimer's disease in Type II diabetes: insulin resistance of the brain or insulin-induced amyloid pathology? *Biochemical Society transactions* 33:1041-1044.
- Bingham EM, Hopkins D, Smith D, Pernet A, Hallett W, Reed L, Marsden PK, Amiel SA (2002) The role of insulin in human brain glucose metabolism: an 18fluoro-deoxyglucose positron emission tomography study. *Diabetes* 51:3384-3390.
- Bish LT, Sleeper MM, Reynolds C, Gazzara J, Withnall E, Singletary GE, Buchlis G, Hui D, High KA, Gao G, Wilson JM, Sweeney HL (2011) Cardiac gene transfer of short hairpin RNA directed against phospholamban effectively knocks down gene expression but causes cellular toxicity in canines. *Human gene therapy* 22:969-977.
- Bishop SJ, Duncan J, Lawrence AD (2004) State anxiety modulation of the amygdala response to unattended threat-related stimuli. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:10364-10368.
- Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, Shearer G, Chang L, Chiang Y, Tolstoshev P, Greenblatt JJ, Rosenberg SA, Klein H, Berger M, Mullen CA, Ramsey WJ, Muul L, Morgan RA, Anderson WF (1995) T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270:475-480.
- Blázquez G (2011) Enriquecimiento ambiental en ratones 3xTgAD (modelo de Alzheimer) : perfiles cognitivos y emotivos. *Universitat Autònoma de Barcelona*.
- Bluher M, Kahn BB, Kahn CR (2003) Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science* 299:572-574.
- Bohannon NJ, Corp ES, Wilcox BJ, Figlewicz DP, Dorsa DM, Baskin DG (1988) Localization of binding sites for insulin-like growth factor-I (IGF-I) in the rat brain by quantitative autoradiography. *Brain research* 444:205-213.
- Bordignon C, Notarangelo LD, Nobili N, Ferrari G, Casorati G, Panina P, Mazzolari E, Maggioni D, Rossi C, Servida P, Ugazio AG, Mavilio F (1995) Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA- immunodeficient patients. *Science* 270:470-475.
- Bordji K, Becerril-Ortega J, Nicole O, Buisson A (2010) Activation of extrasynaptic, but not synaptic, NMDA receptors modifies amyloid precursor protein expression pattern and increases amyloid-ss production. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:15927-15942.
- Borenfreund E, Bendich A (1961) A Study of the Penetration of Mammalian Cells by Deoxyribonucleic Acids. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* 9:81-91.

- Boulougouris V, Dalley JW, Robbins TW (2007) Effects of orbitofrontal, infralimbic and prelimbic cortical lesions on serial spatial reversal learning in the rat. *Behavioural brain research* 179:219-228.
- Boutin S, Monteilhet V, Veron P, Leborgne C, Benveniste O, Montus MF, Masurier C (2010) Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors. *Human gene therapy* 21:704-712.
- Boyd FT, Jr., Clarke DW, Muther TF, Raizada MK (1985) Insulin receptors and insulin modulation of norepinephrine uptake in neuronal cultures from rat brain. *The Journal of biological chemistry* 260:15880-15884.
- Boyt AA, Taddei TK, Hallmayer J, Helmerhorst E, Gandy SE, Craft S, Martins RN (2000) The effect of insulin and glucose on the plasma concentration of Alzheimer's amyloid precursor protein. *Neuroscience* 95:727-734.
- Braak H, Braak E (1991a) Alzheimer's disease affects limbic nuclei of the thalamus. *Acta neuropathologica* 81:261-268.
- Braak H, Braak E (1991b) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathologica* 82:239-259.
- Braak H, Del Tredici K (2004) Alzheimer's disease: intraneuronal alterations precede insoluble amyloid-beta formation. *Neurobiology of aging* 25:713-718; discussion 743-716.
- Brands AM, Biessels GJ, de Haan EH, Kappelle LJ, Kessels RP (2005) The effects of type 1 diabetes on cognitive performance: a meta-analysis. *Diabetes care* 28:726-735.
- Brant AM, Jess TJ, Milligan G, Brown CM, Gould GW (1993) Immunological analysis of glucose transporters expressed in different regions of the rat brain and central nervous system. *Biochemical and biophysical research communications* 192:1297-1302.
- Brief DJ, Davis JD (1984) Reduction of food intake and body weight by chronic intraventricular insulin infusion. *Brain research bulletin* 12:571-575.
- Brown AL, Graham DE, Nissley SP, Hill DJ, Strain AJ, Rechler MM (1986) Developmental regulation of insulin-like growth factor II mRNA in different rat tissues. *The Journal of biological chemistry* 261:13144-13150.
- Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Muller-Wieland D, Kahn CR (2000) Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289:2122-2125.
- Brussee V, Cunningham FA, Zochodne DW (2004) Direct insulin signaling of neurons reverses diabetic neuropathy. *Diabetes* 53:1824-1830.
- Budd GC, Pansky B, Cordell B (1986) Detection of insulin synthesis in mammalian anterior pituitary cells by immunohistochemistry and demonstration of insulin-related transcripts by in situ RNA-DNA hybridization. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 34:673-678.
- Budker V, Zhang G, Knechtle S, Wolff JA (1996) Naked DNA delivered intraportally expresses efficiently in hepatocytes. *Gene therapy* 3:593-598.
- Buller RM, Janik JE, Sebring ED, Rose JA (1981) Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. *Journal of virology* 40:241-247.
- Bullock R, Touchon J, Bergman H, Gambina G, He Y, Rapatz G, Nagel J, Lane R (2005) Rivastigmine and donepezil treatment in moderate to moderately-severe Alzheimer's disease over a 2-year period. *Current medical research and opinion* 21:1317-1327.
- Bunck MC, Diamant M, Corner A, Eliasson B, Malloy JL, Shaginian RM, Deng W, Kendall DM, Taskinen MR, Smith U, Yki-Jarvinen H, Heine RJ (2009) One-year treatment with exenatide improves beta-cell function, compared with insulin glargine, in metformin-treated type 2 diabetic patients: a randomized, controlled trial. *Diabetes care* 32:762-768.
- Buteau J, Foisy S, Rhodes CJ, Carpenter L, Biden TJ, Prentki M (2001) Protein kinase Czeta activation mediates glucagon-like peptide-1-induced pancreatic beta-cell proliferation. *Diabetes* 50:2237-2243.
- Buteau J, Roduit R, Susini S, Prentki M (1999) Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX-1) DNA binding activity in beta (INS-1)-cells. *Diabetologia* 42:856-864.

C

- Cacabelos R, Takeda M, Winblad B (1999) The glutamatergic system and neurodegeneration in dementia: preventive strategies in Alzheimer's disease. *International journal of geriatric psychiatry* 14:3-47.
- Calcedo R, Vandenberghe LH, Gao G, Lin J, Wilson JM (2009) Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *The Journal of infectious diseases* 199:381-390.
- Cañete A (2011) Efectos de la estimulación postnatal en el perfil cognitivo y emocional del modelo de ratón 3xTgAD para la enfermedad de Alzheimer. *Universitat Autònoma de Barcelona*.
- Carro E, Trejo JL, Gerber A, Loetscher H, Torrado J, Metzger F, Torres-Aleman I (2006a) Therapeutic actions of insulin-like growth factor I on APP/PS2 mice with severe brain amyloidosis. *Neurobiology of aging* 27:1250-1257.
- Carro E, Trejo JL, Gomez-Isla T, LeRoith D, Torres-Aleman I (2002) Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. *Nature medicine* 8:1390-1397.
- Carro E, Trejo JL, Spuch C, Bohl D, Heard JM, Torres-Aleman I (2006b) Blockade of the insulin-like growth factor I receptor in the choroid plexus originates Alzheimer's-like neuropathology in rodents: new cues into the human disease? *Neurobiology of aging* 27:1618-1631.
- Casto BC, Atchison RW, Hammon WM (1967) Studies on the relationship between adeno-associated virus type I (AAV-1) and adenoviruses. I. Replication of AAV-1 in certain cell cultures and its effect on helper adenovirus. *Virology* 32:52-59.

- Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova JL, Bousso P, Deist FL, Fischer A (2000) Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288:669-672.
- Cearley CN, Wolfe JH (2006) Transduction characteristics of adeno-associated virus vectors expressing cap serotypes 7, 8, 9, and Rh10 in the mouse brain. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 13:528-537.
- Chadeuf G, Favre D, Tessier J, Provost N, Nony P, Kleinschmidt J, Moullier P, Salvetti A (2000) Efficient recombinant adeno-associated virus production by a stable rep-cap HeLa cell line correlates with adenovirus-induced amplification of the integrated rep-cap genome. *The journal of gene medicine* 2:260-268.
- Chandrasekaran K, Giordano T, Brady DR, Stoll J, Martin LJ, Rapoport SI (1994) Impairment in mitochondrial cytochrome oxidase gene expression in Alzheimer disease. *Brain research Molecular brain research* 24:336-340.
- Chang GQ, Karatayev O, Davydova Z, Wortley K, Leibowitz SF (2005) Glucose injection reduces neuropeptide Y and agouti-related protein expression in the arcuate nucleus: a possible physiological role in eating behavior. *Brain research Molecular brain research* 135:69-80.
- Chen S, Liu AR, An FM, Yao WB, Gao XD (2012) Amelioration of neurodegenerative changes in cellular and rat models of diabetes-related Alzheimer's disease by exendin-4. *Age (Dordr)* 34:1211-1224.
- Chen Y, Zhou K, Wang R, Liu Y, Kwak YD, Ma T, Thompson RC, Zhao Y, Smith L, Gasparini L, Luo Z, Xu H, Liao FF (2009) Antidiabetic drug metformin (GlucophageR) increases biogenesis of Alzheimer's amyloid peptides via up-regulating BACE1 transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:3907-3912.
- Cheng B, Mattson MP (1992) IGF-I and IGF-II protect cultured hippocampal and septal neurons against calcium-mediated hypoglycemic damage. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 12:1558-1566.
- Cheng JS, Craft R, Yu GQ, Ho K, Wang X, Mohan G, Mangnitsky S, Ponnusamy R, Mucke L (2014) Tau reduction diminishes spatial learning and memory deficits after mild repetitive traumatic brain injury in mice. *PloS one* 9:e115765.
- Chernausek SD, Jacobs S, Van Wyk JJ (1981) Structural similarities between human receptors for somatomedin C and insulin: analysis by affinity labeling. *Biochemistry* 20:7345-7350.
- Cheung AK, Hoggan MD, Hauswirth WW, Berns KI (1980) Integration of the adeno-associated virus genome into cellular DNA in latently infected human Detroit 6 cells. *Journal of virology* 33:739-748.
- Choate KA, Khavari PA (1997) Direct cutaneous gene delivery in a human genetic skin disease. *Human gene therapy* 8:1659-1665.
- Chowen JA, de Fonseca FR, Alvarez E, Navarro M, Garcia-Segura LM, Blazquez E (1999) Increased glucagon-like peptide-1 receptor expression in glia after mechanical lesion of the rat brain. *Neuropeptides* 33:212-215.
- Chung JA, Cummings JL (2000) Neurobehavioral and neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: characteristics and treatment. *Neurologic clinics* 18:829-846.
- Cline MJ, Stang H, Mercola K, Morse L, Ruprecht R, Brown J, Salser W (1980) Gene transfer in intact animals. *Nature* 284:422-425.
- Clinton LK, Billings LM, Green KN, Caccamo A, Ngo J, Oddo S, McLaugh JL, LaFerla FM (2007) Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice. *Neurobiology of disease* 28:76-82.
- Cohen E, Paulsson JF, Blinder P, Burstyn-Cohen T, Du D, Estepa G, Adame A, Pham HM, Holzenberger M, Kelly JW, Masliah E, Dillin A (2009) Reduced IGF-1 signaling delays age-associated proteotoxicity in mice. *Cell* 139:1157-1169.
- Coleman ES, Dennis JC, Braden TD, Judd RL, Posner P (2010) Insulin treatment prevents diabetes-induced alterations in astrocyte glutamate uptake and GFAP content in rats at 4 and 8 weeks of diabetes duration. *Brain research* 1306:131-141.
- Colle MA, Piguet F, Bertrand L, Raoul S, Bieche I, Dubreil L, Sloothaak D, Bouquet C, Moullier P, Aubourg P, Cherel Y, Cartier N, Sevin C (2010) Efficient intracerebral delivery of AAV5 vector encoding human ARSA in non-human primate. *Human molecular genetics* 19:147-158.
- Convit A, Wolf OT, Tarshish C, de Leon MJ (2003) Reduced glucose tolerance is associated with poor memory performance and hippocampal atrophy among normal elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:2019-2022.
- Cook DG, Leverenz JB, McMillan PJ, Kulstad JJ, Ericksen S, Roth RA, Schellenberg GD, Jin LW, Kovacina KS, Craft S (2003) Reduced hippocampal insulin-degrading enzyme in late-onset Alzheimer's disease is associated with the apolipoprotein E-epsilon4 allele. *The American journal of pathology* 162:313-319.
- Cooper GJ, Willis AC, Clark A, Turner RC, Sim RB, Reid KB (1987) Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84:8628-8632.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261:921-923.
- Cornu M, Modi H, Kawamori D, Kulkarni RN, Joffraud M, Thorens B (2010) Glucagon-like peptide-1 increases beta-cell glucose competence and proliferation by translational induction of insulin-like growth factor-1 receptor expression. *The Journal of biological chemistry* 285:10538-10545.
- Corvera S, Whitehead RE, Mottola C, Czech MP (1986) The insulin-like growth factor II receptor is phosphorylated by a tyrosine kinase in adipocyte plasma membranes. *The Journal of biological chemistry* 261:7675-7679.
- Courreges JP, Vilsboll T, Zdravkovic M, Le-Thi T, Krarup T, Schmitz O, Verhoeven R, Buganova I, Madsbad S (2008) Beneficial effects of once-daily liraglutide, a human glucagon-like peptide-1 analogue, on cardiovascular risk biomarkers in patients with Type 2 diabetes. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 25:1129-1131.
- Courtney C, Farrell D, Gray R, Hills R, Lynch L, Sellwood E, Edwards S, Hardyman W, Raftery J, Crome P, Lendon C, Shaw H, Bentham P (2004) Long-term donepezil treatment in 565 patients with Alzheimer's disease (AD2000): randomised double-blind trial. *Lancet* 363:2105-2115.

- Craft S, Asthana S, Cook DG, Baker LD, Cherrier M, Purganan K, Wait C, Petrova A, Latendresse S, Watson GS, Newcomer JW, Schellenberg GD, Krohn AJ (2003) Insulin dose-response effects on memory and plasma amyloid precursor protein in Alzheimer's disease: interactions with apolipoprotein E genotype. *Psychoneuroendocrinology* 28:809-822.
- Craft S, Asthana S, Newcomer JW, Wilkinson CW, Matos IT, Baker LD, Cherrier M, Lofgreen C, Latendresse S, Petrova A, Plymate S, Raskind M, Grimwood K, Veith RC (1999a) Enhancement of memory in Alzheimer disease with insulin and somatostatin, but not glucose. *Archives of general psychiatry* 56:1135-1140.
- Craft S, Asthana S, Schellenberg G, Cherrier M, Baker LD, Newcomer J, Plymate S, Latendresse S, Petrova A, Raskind M, Peskind E, Lofgreen C, Grimwood K (1999b) Insulin metabolism in Alzheimer's disease differs according to apolipoprotein E genotype and gender. *Neuroendocrinology* 70:146-152.
- Craft S, Newcomer J, Kanne S, Dagogo-Jack S, Cryer P, Sheline Y, Luby J, Dagogo-Jack A, Alderson A (1996) Memory improvement following induced hyperinsulinemia in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 17:123-130.
- Craft S, Peskind E, Schwartz MW, Schellenberg GD, Raskind M, Porte D, Jr. (1998) Cerebrospinal fluid and plasma insulin levels in Alzheimer's disease: relationship to severity of dementia and apolipoprotein E genotype. *Neurology* 50:164-168.
- Craig AT, Gavrilova O, Dwyer NK, Jou W, Pack S, Liu E, Pechhold K, Schmidt M, McAlister VJ, Chiorini JA, Blanchette-Mackie EJ, Harlan DM, Owens RA (2009) Transduction of rat pancreatic islets with pseudotyped adeno-associated virus vectors. *Virology journal* 6:61.
- Crawley J, Goodwin FK (1980) Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 13:167-170.
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378:785-789.
- Cukierman T, Gerstein HC, Williamson JD (2005) Cognitive decline and dementia in diabetes--systematic overview of prospective observational studies. *Diabetologia* 48:2460-2469.
- Cummings BJ, Head E, Afagh AJ, Milgram NW, Cotman CW (1996a) Beta-amyloid accumulation correlates with cognitive dysfunction in the aged canine. *Neurobiology of learning and memory* 66:11-23.
- Cummings BJ, Head E, Ruehl W, Milgram NW, Cotman CW (1996b) The canine as an animal model of human aging and dementia. *Neurobiology of aging* 17:259-268.

D

- D'Amico M, Di Filippo C, Marfella R, Abbatecola AM, Ferraraccio F, Rossi F, Paolisso G (2010) Long-term inhibition of dipeptidyl peptidase-4 in Alzheimer's prone mice. *Experimental gerontology* 45:202-207.
- D'Ercole AJ, Stiles AD, Underwood LE (1984) Tissue concentrations of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81:935-939.
- Dahm R (2006) Alzheimer's discovery. *Current biology* : CB 16:R906-910.
- Dalvi PS, Nazarians-Armavil A, Purser MJ, Belsham DD (2012) Glucagon-like peptide-1 receptor agonist, exendin-4, regulates feeding-associated neuropeptides in hypothalamic neurons in vivo and in vitro. *Endocrinology* 153:2208-2222.
- Darreh-Shori T, Almkvist O, Guan ZZ, Garlind A, Strandberg B, Svensson AL, Soreq H, Hellstrom-Lindahl E, Nordberg A (2002) Sustained cholinesterase inhibition in AD patients receiving rivastigmine for 12 months. *Neurology* 59:563-572.
- Davies P, Maloney AJ (1976) Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 2:1403.
- de Bresser J, Tiehuis AM, van den Berg E, Reijmer YD, Jongen C, Kappelle LJ, Mali WP, Viergever MA, Biessels GJ (2010) Progression of cerebral atrophy and white matter hyperintensities in patients with type 2 diabetes. *Diabetes care* 33:1309-1314.
- De Felice FG (2013) Alzheimer's disease and insulin resistance: translating basic science into clinical applications. *The Journal of clinical investigation* 123:531-539.
- De Felice FG, Vieira MN, Bomfim TR, Decker H, Velasco PT, Lambert MP, Viola KL, Zhao WQ, Ferreira ST, Klein WL (2009) Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: insulin signaling prevents the pathogenic binding of Abeta oligomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:1971-1976.
- de Leon MJ, Ferris SH, George AE, Christman DR, Fowler JS, Gentes C, Reisberg B, Gee B, Emmerich M, Yonekura Y, Brodie J, Kricheff, II, Wolf AP (1983) Positron emission tomographic studies of aging and Alzheimer disease. *AJNR American journal of neuroradiology* 4:568-571.
- De Santi S, de Leon MJ, Rusinek H, Convit A, Tarshish CY, Roche A, Tsui WH, Kandil E, Boppana M, Daisley K, Wang GJ, Schlyer D, Fowler J (2001) Hippocampal formation glucose metabolism and volume losses in MCI and AD. *Neurobiology of aging* 22:529-539.
- Deacon CF, Nauck MA, Toft-Nielsen M, Pridal L, Willms B, Holst JJ (1995) Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH2-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes* 44:1126-1131.
- Deane R, Du Yan S, Subramaryan RK, LaRue B, Jovanovic S, Hogg E, Welch D, Manness L, Lin C, Yu J, Zhu H, Ghiso J, Frangione B, Stern A, Schmidt AM, Armstrong DL, Arnold B, Liliensiek B, Nawroth P, Hofman F, Kindy M, Stern D, Zlokovic B (2003) RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nature medicine* 9:907-913.

- Deane R, Wu Z, Sagare A, Davis J, Du Yan S, Hamm K, Xu F, Parisi M, LaRue B, Hu HW, Spijkers P, Guo H, Song X, Lenting PJ, Van Nostrand WE, Zlokovic BV (2004) LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of A β isoforms. *Neuron* 43:333-344.
- Debons AF, Krinsky I, From A (1970) A direct action of insulin on the hypothalamic satiety center. *The American journal of physiology* 219:938-943.
- DeGiorgio LA, Shimizu Y, Chun HS, Cho BP, Sugama S, Joh TH, Volpe BT (2002) APP knockout attenuates microglial activation and enhances neuron survival in substantia nigra compacta after axotomy. *Glia* 38:174-178.
- den Heijer T, Vermeer SE, van Dijk EJ, Prins ND, Koudstaal PJ, Hofman A, Breteler MM (2003) Type 2 diabetes and atrophy of medial temporal lobe structures on brain MRI. *Diabetologia* 46:1604-1610.
- Devaskar SU, Giddings SJ, Rajakumar PA, Carnaghi LR, Menon RK, Zahm DS (1994) Insulin gene expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells. *The Journal of biological chemistry* 269:8445-8454.
- Devi L, Alldred MJ, Ginsberg SD, Ohno M (2012) Mechanisms underlying insulin deficiency-induced acceleration of beta-amyloidosis in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS one* 7:e32792.
- Diniz MO, Cariri FA, Aps LR, Ferreira LC (2013) Enhanced therapeutic effects conferred by an experimental DNA vaccine targeting human papillomavirus-induced tumors. *Human gene therapy* 24:861-870.
- Dodiya HB, Bjorklund T, Stansell J, 3rd, Mandel RJ, Kirik D, Kordower JH (2010) Differential transduction following basal ganglia administration of distinct pseudotyped AAV capsid serotypes in nonhuman primates. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 18:579-587.
- Dore S, Kar S, Quirion R (1997) Insulin-like growth factor I protects and rescues hippocampal neurons against beta-amyloid- and human amylin-induced toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:4772-4777.
- Dou JT, Chen M, Dufour F, Alkon DL, Zhao WQ (2005) Insulin receptor signaling in long-term memory consolidation following spatial learning. *Learn Mem* 12:646-655.
- Drucker DJ, Nauck MA (2006) The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet* 368:1696-1705.
- Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S, Chick WL, Habener JF (1987) Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84:3434-3438.
- Du P, Wood KM, Rosner MH, Cunningham D, Tate B, Geoghegan KF (2007) Dominance of amyloid precursor protein sequence over host cell secretases in determining beta-amyloid profiles studies of interspecies variation and drug action by internally standardized immunoprecipitation/mass spectrometry. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 320:1144-1152.
- Duarte AI, Santos MS, Oliveira CR, Rego AC (2005) Insulin neuroprotection against oxidative stress in cortical neurons--involvement of uric acid and glutathione antioxidant defenses. *Free radical biology & medicine* 39:876-889.
- Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Cummings JL, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, Delacourte A, Frisoni G, Fox NC, Galasko D, Gauthier S, Hampel H, Jicha GA, Meguro K, O'Brien J, Pasquier F, Robert P, Rossor M, Salloway S, Sarazin M, de Souza LC, Stern Y, Visser PJ, Scheltens P (2010) Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *The Lancet Neurology* 9:1118-1127.
- Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME (1997) Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275:661-665.
- Duffy KR, Pardridge WM, Rosenfeld RG (1988) Human blood-brain barrier insulin-like growth factor receptor. *Metabolism: clinical and experimental* 37:136-140.
- Dupraz S, Grassi D, Karnas D, Nieto Guil AF, Hicks D, Quiroga S (2013) The insulin-like growth factor 1 receptor is essential for axonal regeneration in adult central nervous system neurons. *PLoS one* 8:e54462.
- Durieux AC, Bonnefoy R, Busso T, Freyssen D (2004) In vivo gene electrotransfer into skeletal muscle: effects of plasmid DNA on the occurrence and extent of muscle damage. *The journal of gene medicine* 6:809-816.
- During MJ, Cao L, Zuzga DS, Francis JS, Fitzsimons HL, Jiao X, Bland RJ, Klugmann M, Banks WA, Drucker DJ, Haile CN (2003) Glucagon-like peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection. *Nature medicine* 9:1173-1179.

E

- Edbauer D, Willem M, Lammich S, Steiner H, Haass C (2002) Insulin-degrading enzyme rapidly removes the beta-amyloid precursor protein intracellular domain (AICD). *The Journal of biological chemistry* 277:13389-13393.
- Edland SD, Wavrant-De Vriese F, Compton D, Smith GE, Ivnik R, Boeve BF, Tangalos EG, Petersen RC (2003) Insulin degrading enzyme (IDE) genetic variants and risk of Alzheimer's disease: evidence of effect modification by apolipoprotein E (APOE). *Neuroscience letters* 345:21-24.
- El Messari S, Leloup C, Quignon M, Brisorgueil MJ, Penicaud L, Arluison M (1998) Immunocytochemical localization of the insulin-responsive glucose transporter 4 (Glut4) in the rat central nervous system. *The Journal of comparative neurology* 399:492-512.
- Elgee NJ, Williams RH, Lee ND (1954) Distribution and degradation studies with insulin I131. *The Journal of clinical investigation* 33:1252-1260.

- Ellis RJ, Olichney JM, Thal LJ, Mirra SS, Morris JC, Beekly D, Heyman A (1996) Cerebral amyloid angiopathy in the brains of patients with Alzheimer's disease: the CERAD experience, Part XV. *Neurology* 46:1592-1596.
- Esakof DD, Maysky M, Losordo DW, Vale PR, Lathi K, Pastore JO, Symes JF, Isner JM (1999) Intraoperative multiplane transesophageal echocardiography for guiding direct myocardial gene transfer of vascular endothelial growth factor in patients with refractory angina pectoris. *Human gene therapy* 10:2307-2314.
- Espana J, Gimenez-Llort L, Valero J, Minano A, Rabano A, Rodriguez-Alvarez J, LaFerla FM, Saura CA (2010) Intraneuronal beta-amyloid accumulation in the amygdala enhances fear and anxiety in Alzheimer's disease transgenic mice. *Biological psychiatry* 67:513-521.

F

- Farilla L, Hui H, Bertolotto C, Kang E, Bulotta A, Di Mario U, Perfetti R (2002) Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats. *Endocrinology* 143:4397-4408.
- Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, Eckman CB, Tanzi RE, Selkoe DJ, Guenette S (2003) Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:4162-4167.
- Ferguson SC, Blane A, Perros P, McCrimmon RJ, Best JJ, Wardlaw J, Deary IJ, Frier BM (2003) Cognitive ability and brain structure in type 1 diabetes: relation to microangiopathy and preceding severe hypoglycemia. *Diabetes* 52:149-156.
- Ferguson SC, Blane A, Wardlaw J, Frier BM, Perros P, McCrimmon RJ, Deary IJ (2005) Influence of an early-onset age of type 1 diabetes on cerebral structure and cognitive function. *Diabetes care* 28:1431-1437.
- Ferla R, Claudiani P, Cotugno G, Saccone P, De Leonibus E, Auricchio A (2014) Similar therapeutic efficacy between a single administration of gene therapy and multiple administrations of recombinant enzyme in a mouse model of lysosomal storage disease. *Human gene therapy* 25:609-618.
- Fernandez AM, Torres-Aleman I (2012) The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nature reviews Neuroscience* 13:225-239.
- Fife KH, Berns KI, Murray K (1977) Structure and nucleotide sequence of the terminal regions of adeno-associated virus DNA. *Virology* 78:475-477.
- Figlewicz DP, Szot P, Israel PA, Payne C, Dorsa DM (1993) Insulin reduces norepinephrine transporter mRNA in vivo in rat locus coeruleus. *Brain research* 602:161-164.
- Filali M, Lalonde R, Theriault P, Julien C, Calon F, Planel E (2012) Cognitive and non-cognitive behaviors in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease expressing mutated APP, PS1, and Mapt (3xTg-AD). *Behavioural brain research* 234:334-342.
- Finn JD, Hui D, Downey HD, Dunn D, Pien GC, Mingozzi F, Zhou S, High KA (2010) Proteasome inhibitors decrease AAV2 capsid derived peptide epitope presentation on MHC class I following transduction. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 18:135-142.
- Fischer D, Li Y, Ahlemeyer B, Krieglstein J, Kissel T (2003) In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* 24:1121-1131.
- Flotte T, Carter B, Conrad C, Guggino W, Reynolds T, Rosenstein B, Taylor G, Walden S, Wetzel R (1996) A phase I study of an adeno-associated virus-CFTR gene vector in adult CF patients with mild lung disease. *Human gene therapy* 7:1145-1159.
- Flotte TR, Fischer AC, Goetzmann J, Mueller C, Cebotaru L, Yan Z, Wang L, Wilson JM, Guggino WB, Engelhardt JF (2010) Dual reporter comparative indexing of rAAV pseudotyped vectors in chimpanzee airway. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 18:594-600.
- Flotte TR, Zeitlin PL, Reynolds TC, Heald AE, Pedersen P, Beck S, Conrad CK, Brass-Ernst L, Humphries M, Sullivan K, Wetzel R, Taylor G, Carter BJ, Guggino WB (2003) Phase I trial of intranasal and endobronchial administration of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 (rAAV2)-CFTR vector in adult cystic fibrosis patients: a two-part clinical study. *Human gene therapy* 14:1079-1088.
- Foster JK, Lidder PG, Sunram SI (1998) Glucose and memory: fractionation of enhancement effects? *Psychopharmacology* 137:259-270.
- Foust KD, Nurre E, Montgomery CL, Hernandez A, Chan CM, Kaspar BK (2009) Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nature biotechnology* 27:59-65.
- Frank HJ, Jankovic-Vokes T, Partridge WM, Morris WL (1985) Enhanced insulin binding to blood-brain barrier in vivo and to brain microvessels in vitro in newborn rabbits. *Diabetes* 34:728-733.
- Fratiglioni L, Viitanen M, von Strauss E, Tontodonati V, Herlitz A, Winblad B (1997) Very old women at highest risk of dementia and Alzheimer's disease: incidence data from the Kungsholmen Project, Stockholm. *Neurology* 48:132-138.
- Freude S, Hettich MM, Schumann C, Stohr O, Koch L, Kohler C, Udelhoven M, Leeser U, Muller M, Kubota N, Kadowaki T, Krone W, Schroder H, Bruning JC, Schubert M (2009) Neuronal IGF-1 resistance reduces Abeta accumulation and protects against premature death in a model of Alzheimer's disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23:3315-3324.
- Freude S, Plum L, Schnitker J, Leeser U, Udelhoven M, Krone W, Bruning JC, Schubert M (2005) Peripheral hyperinsulinemia promotes tau phosphorylation in vivo. *Diabetes* 54:3343-3348.

- Frolich L, Blum-Degen D, Bernstein HG, Engelsberger S, Humrich J, Laufer S, Muschner D, Thalheimer A, Turk A, Hoyer S, Zochling R, Boissl KW, Jellinger K, Riederer P (1998) Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *Journal of neural transmission* 105:423-438.
- Furukawa K, Sopher BL, Rydel RE, Begley JG, Pham DG, Martin GM, Fox M, Mattson MP (1996) Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *Journal of neurochemistry* 67:1882-1896.

G

- Gabriel N, Hareendran S, Sen D, Gadkari RA, Sudha G, Selot R, Hussain M, Dhaknamoorthy R, Samuel R, Srinivasan N, Srivastava A, Jayandharan GR (2013) Bioengineering of AAV2 capsid at specific serine, threonine, or lysine residues improves its transduction efficiency in vitro and in vivo. *Human gene therapy methods* 24:80-93.
- Gallichan WS, Kafri T, Krahl T, Verma IM, Sarvetnick N (1998) Lentivirus-mediated transduction of islet grafts with interleukin 4 results in sustained gene expression and protection from insulinitis. *Human gene therapy* 9:2717-2726.
- Gammeltoft S, Fehlmann M, Van Obberghen E (1985a) Insulin receptors in the mammalian central nervous system: binding characteristics and subunit structure. *Biochimie* 67:1147-1153.
- Gammeltoft S, Haselbacher GK, Humbel RE, Fehlmann M, Van Obberghen E (1985b) Two types of receptor for insulin-like growth factors in mammalian brain. *The EMBO journal* 4:3407-3412.
- Gammeltoft S, Kowalski A, Fehlmann M, van Obberghen E (1984a) Insulin receptors in rat brain: insulin stimulates phosphorylation of its receptor beta-subunit. *FEBS letters* 172:87-90.
- Gammeltoft S, Staun-Olsen P, Ottesen B, Fahrenkrug J (1984b) Insulin receptors in rat brain cortex. Kinetic evidence for a receptor subtype in the central nervous system. *Peptides* 5:937-944.
- Gao G, Bish LT, Sleeper MM, Mu X, Sun L, Lou Y, Duan J, Hu C, Wang L, Sweeney HL (2011) Transendocardial delivery of AAV6 results in highly efficient and global cardiac gene transfer in rhesus macaques. *Human gene therapy* 22:979-984.
- Gao GP, Lu F, Sanmiguel JC, Tran PT, Abbas Z, Lynd KS, Marsh J, Spinner NB, Wilson JM (2002) Rep/Cap gene amplification and high-yield production of AAV in an A549 cell line expressing Rep/Cap. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 5:644-649.
- Gao GP, Lu Y, Sun X, Johnston J, Calcedo R, Grant R, Wilson JM (2006) High-level transgene expression in nonhuman primate liver with novel adeno-associated virus serotypes containing self-complementary genomes. *Journal of virology* 80:6192-6194.
- Garcia-Mesa Y, Lopez-Ramos JC, Gimenez-Llort L, Revilla S, Guerra R, Gruart A, Laferla FM, Cristofol R, Delgado-Garcia JM, Sanfeliu C (2011) Physical exercise protects against Alzheimer's disease in 3xTg-AD mice. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 24:421-454.
- Gasparini L, Gouras GK, Wang R, Gross RS, Beal MF, Greengard P, Xu H (2001) Stimulation of beta-amyloid precursor protein trafficking by insulin reduces intraneuronal beta-amyloid and requires mitogen-activated protein kinase signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21:2561-2570.
- Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA, Berg S, Fiske A, Pedersen NL (2006) Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Archives of general psychiatry* 63:168-174.
- Gaudieri PA, Chen R, Greer TF, Holmes CS (2008) Cognitive function in children with type 1 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes care* 31:1892-1897.
- Gault VA, Holscher C (2008) GLP-1 agonists facilitate hippocampal LTP and reverse the impairment of LTP induced by beta-amyloid. *European journal of pharmacology* 587:112-117.
- Gauthier S, Loft H, Cummings J (2008) Improvement in behavioural symptoms in patients with moderate to severe Alzheimer's disease by memantine: a pooled data analysis. *International journal of geriatric psychiatry* 23:537-545.
- Gearing M, Tigges J, Mori H, Mirra SS (1997) beta-Amyloid (A beta) deposition in the brains of aged orangutans. *Neurobiology of aging* 18:139-146.
- Gerlai R (1998) A new continuous alternation task in *T-maze* detects hippocampal dysfunction in mice. A strain comparison and lesion study. *Behavioural brain research* 95:91-101.
- Gimenez-Llort L, Blazquez G, Canete T, Johansson B, Oddo S, Tobena A, LaFerla FM, Fernandez-Teruel A (2007) Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer's disease in mice: a role for intraneuronal amyloid. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 31:125-147.
- Gimenez-Llort L, Garcia Y, Buccieri K, Revilla S, Sunol C, Cristofol R, Sanfeliu C (2010) Gender-Specific Neuroimmunoendocrine Response to Treadmill Exercise in 3xTg-AD Mice. *International journal of Alzheimer's disease* 2010:128354.
- Gissel H, Clausen T (2001) Excitation-induced Ca²⁺ influx and skeletal muscle cell damage. *Acta physiologica Scandinavica* 171:327-334.
- Glenner GG, Eanes ED, Wiley CA (1988) Amyloid fibrils formed from a segment of the pancreatic islet amyloid protein. *Biochemical and biophysical research communications* 155:608-614.
- Glenner GG, Wong CW (1984a) Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochemical and biophysical research communications* 122:1131-1135.
- Glenner GG, Wong CW (1984b) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and biophysical research communications* 120:885-890.
- Glenner GG, Wong CW, Quaranta V, Eanes ED (1984) The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Applied pathology* 2:357-369.

- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, et al. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349:704-706.
- Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA (1989) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3:519-526.
- Goke R, Larsen PJ, Mikkelsen JD, Sheikh SP (1995) Distribution of GLP-1 binding sites in the rat brain: evidence that exendin-4 is a ligand of brain GLP-1 binding sites. *The European journal of neuroscience* 7:2294-2300.
- Gonzalo-Ruiz A, Gonzalez I, Sanz-Anquela JM (2003) Effects of beta-amyloid protein on serotonergic, noradrenergic, and cholinergic markers in neurons of the pontomesencephalic tegmentum in the rat. *Journal of chemical neuroanatomy* 26:153-169.
- Gonzalo-Ruiz A, Sanz JM, Arevalo J, Geula C, Gonzalo P (2005) Amyloid beta peptide-induced cholinergic fibres loss in the cerebral cortex of the rat is modified by diet high in lipids and by age. *Journal of chemical neuroanatomy* 29:31-48.
- Gotz J, Chen F, van Dorpe J, Nitsch RM (2001) Formation of neurofibrillary tangles in P301 τ transgenic mice induced by A β 42 fibrils. *Science* 293:1491-1495.
- Govind S, Kozma R, Monfries C, Lim L, Ahmed S (2001) Cdc42Hs facilitates cytoskeletal reorganization and neurite outgrowth by localizing the 58-kD insulin receptor substrate to filamentous actin. *The Journal of cell biology* 152:579-594.
- Graham FL, van der Eb AJ (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52:456-467.
- Gray SJ, Matagne V, Bachaboina L, Yadav S, Ojeda SR, Samulski RJ (2011) Preclinical differences of intravascular AAV9 delivery to neurons and glia: a comparative study of adult mice and nonhuman primates. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 19:1058-1069.
- Gromada J, Dissing S, Bokvist K, Renstrom E, Frokjaer-Jensen J, Wulff BS, Rorsman P (1995) Glucagon-like peptide I increases cytoplasmic calcium in insulin-secreting beta TC3-cells by enhancement of intracellular calcium mobilization. *Diabetes* 44:767-774.
- Grossardt C, Engeland CE, Bossow S, Halama N, Zaoui K, Leber MF, Springfield C, Jaeger D, von Kalle C, Ungerechts G (2013) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-armed oncolytic measles virus is an effective therapeutic cancer vaccine. *Human gene therapy* 24:644-654.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM (1986) Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *The Journal of biological chemistry* 261:6084-6089.
- Guiroy DC, Miyazaki M, Multhaup G, Fischer P, Garruto RM, Beyreuther K, Masters CL, Simms G, Gibbs CJ, Jr., Gajdusek DC (1987) Amyloid of neurofibrillary tangles of Guamanian parkinsonism-dementia and Alzheimer disease share identical amino acid sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84:2073-2077.
- Guo J, Yu C, Li H, Liu F, Feng R, Wang H, Meng Y, Li Z, Ju G, Wang J (2010) Impaired neural stem/progenitor cell proliferation in streptozotocin-induced and spontaneous diabetic mice. *Neuroscience research* 68:329-336.
- Gutniak M, Orskov C, Holst JJ, Ahren B, Efendic S (1992) Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1 (7-36)amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus. *The New England journal of medicine* 326:1316-1322.

H

- Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, Bouneaud C, Hue C, De Villartay JP, Thrasher AJ, Wulffraat N, Sorensen R, Dupuis-Girod S, Fischer A, Davies EG, Kuis W, Leiva L, Cavazzana-Calvo M (2002) Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *The New England journal of medicine* 346:1185-1193.
- Hadri L, Bobe R, Kawase Y, Ladage D, Ishikawa K, Atassi F, Lebeche D, Kranias EG, Leopold JA, Lompre AM, Lipskaia L, Hajjar RJ (2010) SERCA2a gene transfer enhances eNOS expression and activity in endothelial cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 18:1284-1292.
- Hajjar RJ, Zsebo K, Deckelbaum L, Thompson C, Rudy J, Yaroshinsky A, Ly H, Kawase Y, Wagner K, Borow K, Jaski B, London B, Greenberg B, Pauly DF, Patten R, Starling R, Mancini D, Jessup M (2008) Design of a phase 1/2 trial of intracoronary administration of AAV1/SERCA2a in patients with heart failure. *Journal of cardiac failure* 14:355-367.
- Halbert CL, Madtes DK, Vaughan AE, Wang Z, Storb R, Tapscott SJ, Miller AD (2010) Expression of human alpha1-antitrypsin in mice and dogs following AAV6 vector-mediated gene transfer to the lungs. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 18:1165-1172.
- Hall JL, Gonder-Frederick LA, Chewing WW, Silveira J, Gold PE (1989) Glucose enhancement of performance on memory tests in young and aged humans. *Neuropsychologia* 27:1129-1138.
- Hama E, Shirohata K, Masumoto H, Sekine-Aizawa Y, Aizawa H, Saido TC (2001) Clearance of extracellular and cell-associated amyloid beta peptide through viral expression of neprilysin in primary neurons. *Journal of biochemistry* 130:721-726.
- Hamabe W, Fujita R, Ueda H (2003) Neuronal necrosis inhibition by insulin through protein kinase C activation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 307:205-212.
- Hamilton A, Patterson S, Porter D, Gault VA, Holscher C (2011) Novel GLP-1 mimetics developed to treat type 2 diabetes promote progenitor cell proliferation in the brain. *Journal of neuroscience research* 89:481-489.
- Han VK, D'Ercole AJ, Lund PK (1987) Cellular localization of somatomedin (insulin-like growth factor) messenger RNA in the human fetus. *Science* 236:193-197.
- Han WN, Holscher C, Yuan L, Yang W, Wang XH, Wu MN, Qi JS (2013) Liraglutide protects against amyloid-beta protein-induced impairment of spatial learning and memory in rats. *Neurobiology of aging* 34:576-588.
- Hardy JA, Higgins GA (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256:184-185.

- Hartman RE, Wozniak DF, Nardi A, Olney JW, Sartorius L, Holtzman DM (2001) Behavioral phenotyping of GFAP-apoE3 and -apoE4 transgenic mice: apoE4 mice show profound working memory impairments in the absence of Alzheimer's-like neuropathology. *Experimental neurology* 170:326-344.
- Haselbacher GK, Schwab ME, Pasi A, Humbel RE (1985) Insulin-like growth factor II (IGF II) in human brain: regional distribution of IGF II and of higher molecular mass forms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82:2153-2157.
- Hashimoto H, Monserratt L, Nguyen P, Feil D, Harwood D, Mandelkern MA, Sultzer DL (2006) Anxiety and regional cortical glucose metabolism in patients with Alzheimer's disease. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* 18:521-528.
- Hatfield JS, Millard WJ, Smith CJ (1974) Short-term influence of intra-ventromedial hypothalamic administration of insulin on feeding in normal and diabetic rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 2:223-226.
- Hattori Y, Jojima T, Tomizawa A, Satoh H, Hattori S, Kasai K, Hayashi T (2010) A glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogue, liraglutide, upregulates nitric oxide production and exerts anti-inflammatory action in endothelial cells. *Diabetologia* 53:2256-2263.
- Hauswirth WW, Berns KI (1977) Origin and termination of adeno-associated virus DNA replication. *Virology* 78:488-499.
- Havrankova J, Roth J, Brownstein M (1978a) Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature* 272:827-829.
- Havrankova J, Roth J, Brownstein MJ (1979) Concentrations of insulin and insulin receptors in the brain are independent of peripheral insulin levels. *Studies of obese and streptozotocin-treated rodents. The Journal of clinical investigation* 64:636-642.
- Havrankova J, Schmechel D, Roth J, Brownstein M (1978b) Identification of insulin in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75:5737-5741.
- Hayes MR, Leichner TM, Zhao S, Lee GS, Chowansky A, Zimmer D, De Jonghe BC, Kanoski SE, Grill HJ, Bence KK (2011) Intracellular signals mediating the food intake-suppressive effects of hindbrain glucagon-like peptide-1 receptor activation. *Cell metabolism* 13:320-330.
- Head E (2007) Combining an antioxidant-fortified diet with behavioral enrichment leads to cognitive improvement and reduced brain pathology in aging canines: strategies for healthy aging. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1114:398-406.
- Head E, Callahan H, Muggenburg BA, Cotman CW, Milgram NW (1998) Visual-discrimination learning ability and beta-amyloid accumulation in the dog. *Neurobiology of aging* 19:415-425.
- Head E, Liu J, Hagen TM, Muggenburg BA, Milgram NW, Ames BN, Cotman CW (2002) Oxidative damage increases with age in a canine model of human brain aging. *Journal of neurochemistry* 82:375-381.
- Head E, McCleary R, Hahn FF, Milgram NW, Cotman CW (2000) Region-specific age at onset of beta-amyloid in dogs. *Neurobiology of aging* 21:89-96.
- Head E, Mehta R, Hartley J, Kameka M, Cummings BJ, Cotman CW, Ruehl WW, Milgram NW (1995) Spatial learning and memory as a function of age in the dog. *Behavioral neuroscience* 109:851-858.
- Hebb DO (1949) Chapter 4. *The Organization of Behavior*.
- Heidenreich KA, Zahniser NR, Berhanu P, Brandenburg D, Olefsky JM (1983) Structural differences between insulin receptors in the brain and peripheral target tissues. *The Journal of biological chemistry* 258:8527-8530.
- Heneka MT, O'Banion MK (2007) Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Journal of neuroimmunology* 184:69-91.
- Hermonat PL, Labow MA, Wright R, Berns KI, Muzyczka N (1984) Genetics of adeno-associated virus: isolation and preliminary characterization of adeno-associated virus type 2 mutants. *Journal of virology* 51:329-339.
- Hickman MA, Malone RW, Lehmann-Bruinsma K, Sih TR, Knoell D, Szoka FC, Walzem R, Carlson DM, Powell JS (1994) Gene expression following direct injection of DNA into liver. *Human gene therapy* 5:1477-1483.
- Hirata-Fukae C, Li HF, Hoe HS, Gray AJ, Minami SS, Hamada K, Niikura T, Hua F, Tsukagoshi-Nagai H, Horikoshi-Sakuraba Y, Mughal M, Rebeck GW, LaFerla FM, Mattson MP, Iwata N, Saido TC, Klein WL, Duff KE, Aisen PS, Matsuoka Y (2008) Females exhibit more extensive amyloid, but not tau, pathology in an Alzheimer transgenic model. *Brain research* 1216:92-103.
- Ho A, Sudhof TC (2004) Binding of F-spondin to amyloid-beta precursor protein: a candidate amyloid-beta precursor protein ligand that modulates amyloid-beta precursor protein cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:2548-2553.
- Hodge RD, D'Ercole AJ, O'Kusky JR (2007) Insulin-like growth factor-I (IGF-I) inhibits neuronal apoptosis in the developing cerebral cortex in vivo. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 25:233-241.
- Holmes A, Wrenn CC, Harris AP, Thayer KE, Crawley JN (2002) Behavioral profiles of inbred strains on novel olfactory, spatial and emotional tests for reference memory in mice. *Genes, brain, and behavior* 1:55-69.
- Holthoff VA, Beuthien-Baumann B, Kalbe E, Ludecke S, Lenz O, Zundorf G, Spirling S, Schierz K, Winiecki P, Sorbi S, Herholz K (2005) Regional cerebral metabolism in early Alzheimer's disease with clinically significant apathy or depression. *Biological psychiatry* 57:412-421.
- Homs J, Ariza L, Pages G, Udina E, Navarro X, Chillon M, Bosch A (2011) Schwann cell targeting via intrasciatic injection of AAV8 as gene therapy strategy for peripheral nerve regeneration. *Gene therapy* 18:622-630.
- Hong M, Lee VM (1997) Insulin and insulin-like growth factor-1 regulate tau phosphorylation in cultured human neurons. *The Journal of biological chemistry* 272:19547-19553.
- Howard DB, Powers K, Wang Y, Harvey BK (2008) Tropism and toxicity of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 6, 7, 8, and 9 in rat neurons and glia in vitro. *Virology* 372:24-34.
- Hu W, Gray NW, Brimijoin S (2003) Amyloid-beta increases acetylcholinesterase expression in neuroblastoma cells by reducing enzyme degradation. *Journal of neurochemistry* 86:470-478.

- Huang CC, Lee CC, Hsu KS (2004) An investigation into signal transduction mechanisms involved in insulin-induced long-term depression in the CA1 region of the hippocampus. *Journal of neurochemistry* 89:217-231.
- Hughes RN (2004) The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 28:497-505.
- Hunter K, Holscher C (2012) Drugs developed to treat diabetes, liraglutide and lixisenatide, cross the blood brain barrier and enhance neurogenesis. *BMC neuroscience* 13:33.
- Huttner NA, Girod A, Perabo L, Edbauer D, Kleinschmidt JA, Buning H, Hallek M (2003) Genetic modifications of the adeno-associated virus type 2 capsid reduce the affinity and the neutralizing effects of human serum antibodies. *Gene therapy* 10:2139-2147.
- Hyde SC, Pringle IA, Abdullah S, Lawton AE, Davies LA, Varathalingam A, Nunez-Alonso G, Green AM, Bazzani RP, Sumner-Jones SG, Chan M, Li H, Yew NS, Cheng SH, Boyd AC, Davies JC, Griesenbach U, Porteous DJ, Sheppard DN, Munkonge FM, Alton EW, Gill DR (2008) CpG-free plasmids confer reduced inflammation and sustained pulmonary gene expression. *Nature biotechnology* 26:549-551.
- Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Carrillo MC, Dickson DW, Duyckaerts C, Frosch MP, Masliah E, Mirra SS, Nelson PT, Schneider JA, Thal DR, Thies B, Trojanowski JQ, Vinters HV, Montine TJ (2012) National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 8:1-13.

I

- Imaoka T, Date I, Ohmoto T, Nagatsu T (1998) Significant behavioral recovery in Parkinson's disease model by direct intracerebral gene transfer using continuous injection of a plasmid DNA-liposome complex. *Human gene therapy* 9:1093-1102.
- Isacson R, Nielsen E, Dannaeus K, Bertilsson G, Patrone C, Zachrisson O, Wikstrom L (2011) The glucagon-like peptide 1 receptor agonist exendin-4 improves reference memory performance and decreases immobility in the forced swim test. *European journal of pharmacology* 650:249-255.
- Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Hama E, Lee HJ, Saido TC (2001) Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. *Science* 292:1550-1552.

J

- Janson J, Ashley RH, Harrison D, McIntyre S, Butler PC (1999) The mechanism of islet amyloid polypeptide toxicity is membrane disruption by intermediate-sized toxic amyloid particles. *Diabetes* 48:491-498.
- Janson J, Laedtke T, Parisi JE, O'Brien P, Petersen RC, Butler PC (2004) Increased risk of type 2 diabetes in Alzheimer disease. *Diabetes* 53:474-481.
- Johnson CT, Olton DS, Gage FH, 3rd, Jenko PG (1977) Damage to hippocampus and hippocampal connections: effects on DRL and spontaneous alternation. *Journal of comparative and physiological psychology* 91:508-522.
- Johnson KH, O'Brien TD, Hayden DW, Jordan K, Ghobrial HK, Mahoney WC, Westermarck P (1988) Immunolocalization of islet amyloid polypeptide (IAPP) in pancreatic beta cells by means of peroxidase-antiperoxidase (PAP) and protein A-gold techniques. *The American journal of pathology* 130:1-8.
- Johnston JC, Gasmi M, Lim LE, Elder JH, Yee JK, Jolly DJ, Campbell KP, Davidson BL, Sauter SL (1999) Minimum requirements for efficient transduction of dividing and nondividing cells by feline immunodeficiency virus vectors. *Journal of virology* 73:4991-5000.
- Johnstone EM, Chaney MO, Norris FH, Pascual R, Little SP (1991) Conservation of the sequence of the Alzheimer's disease amyloid peptide in dog, polar bear and five other mammals by cross-species polymerase chain reaction analysis. *Brain research Molecular brain research* 10:299-305.

K

- Kaiyala KJ, Prigeon RL, Kahn SE, Woods SC, Schwartz MW (2000) Obesity induced by a high-fat diet is associated with reduced brain insulin transport in dogs. *Diabetes* 49:1525-1533.
- Kamino K, Orr HT, Payami H, Wijsman EM, Alonso ME, Pulst SM, Anderson L, O'Dahl S, Nemens E, White JA, et al. (1992) Linkage and mutational analysis of familial Alzheimer disease kindreds for the APP gene region. *American journal of human genetics* 51:998-1014.
- Kang J, Muller-Hill B (1990) Differential splicing of Alzheimer's disease amyloid A4 precursor RNA in rat tissues: PreA4(695) mRNA is predominantly produced in rat and human brain. *Biochemical and biophysical research communications* 166:1192-1200.
- Kanse SM, Kreyman B, Ghatei MA, Bloom SR (1988) Identification and characterization of glucagon-like peptide-1 7-36 amide-binding sites in the rat brain and lung. *FEBS letters* 241:209-212.
- Kaplan RJ, Greenwood CE, Winocur G, Wolever TM (2000) Cognitive performance is associated with glucose regulation in healthy elderly persons and can be enhanced with glucose and dietary carbohydrates. *The American journal of clinical nutrition* 72:825-836.

- Kar S, Fan J, Smith MJ, Goedert M, Amos LA (2003) Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol. *The EMBO journal* 22:70-77.
- Karman J, Gumlaw NK, Zhang J, Jiang JL, Cheng SH, Zhu Y (2012) Proteasome inhibition is partially effective in attenuating pre-existing immunity against recombinant adeno-associated viral vectors. *PLoS one* 7:e34684.
- Karoor V, Wang L, Wang HY, Malbon CC (1998) Insulin stimulates sequestration of beta-adrenergic receptors and enhanced association of beta-adrenergic receptors with Grb2 via tyrosine 350. *The Journal of biological chemistry* 273:33035-33041.
- Kastin AJ, Akerstrom V (2003) Entry of exendin-4 into brain is rapid but may be limited at high doses. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 27:313-318.
- Kastin AJ, Akerstrom V, Pan W (2002) Interactions of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) with the blood-brain barrier. *Journal of molecular neuroscience : MN* 18:7-14.
- Kasuga M, Hedo JA, Yamada KM, Kahn CR (1982a) The structure of insulin receptor and its subunits. Evidence for multiple nonreduced forms and a 210,000 possible proreceptor. *The Journal of biological chemistry* 257:10392-10399.
- Kasuga M, Zick Y, Blithe DL, Crettaz M, Kahn CR (1982b) Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor in a cell-free system. *Nature* 298:667-669.
- Kawase Y, Ly HQ, Prunier F, Lebeche D, Shi Y, Jin H, Hadri L, Yoneyama R, Hoshino K, Takewa Y, Sakata S, Peluso R, Zsebo K, Gwathmey JK, Tardif JC, Tanguay JF, Hajjar RJ (2008) Reversal of cardiac dysfunction after long-term expression of SERCA2a by gene transfer in a pre-clinical model of heart failure. *Journal of the American College of Cardiology* 51:1112-1119.
- Kay ER (1961) Incorporation of deoxyribonucleic acid by mammalian cells in vitro. *Nature* 191:387-388.
- Kensinger EA, Shearer DK, Locascio JJ, Growdon JH, Corkin S (2003) Working memory in mild Alzheimer's disease and early Parkinson's disease. *Neuropsychology* 17:230-239.
- Kern W, Peters A, Fruehwald-Schultes B, Deininger E, Born J, Fehm HL (2001) Improving influence of insulin on cognitive functions in humans. *Neuroendocrinology* 74:270-280.
- Kidd M (1963) Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 197:192-193.
- Kim B, Backus C, Oh S, Hayes JM, Feldman EL (2009) Increased tau phosphorylation and cleavage in mouse models of type 1 and type 2 diabetes. *Endocrinology* 150:5294-5301.
- Kim B, Feldman EL (2012) Insulin resistance in the nervous system. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 23:133-141.
- Kim HJ, Greenleaf JF, Kinnick RR, Bronk JT, Bolander ME (1996) Ultrasound-mediated transfection of mammalian cells. *Human gene therapy* 7:1339-1346.
- Kirschner RJ, Goldberg AL (1983) A high molecular weight metalloendoprotease from the cytosol of mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* 258:967-976.
- Kitraki E, Bozas E, Philippidis H, Stylianopoulou F (1993) Aging-related changes in IGF-II and c-fos gene expression in the rat brain. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 11:1-9.
- Kjeldsen T, Andersen AS, Wiberg FC, Rasmussen JS, Schaffer L, Balschmidt P, Moller KB, Moller NP (1991) The ligand specificities of the insulin receptor and the insulin-like growth factor I receptor reside in different regions of a common binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:4404-4408.
- Klein RL, Dayton RD, Tatom JB, Henderson KM, Henning PP (2008) AAV8, 9, Rh10, Rh43 vector gene transfer in the rat brain: effects of serotype, promoter and purification method. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 16:89-96.
- Klonoff DC, Buse JB, Nielsen LL, Guan X, Bowlus CL, Holcombe JH, Wintle ME, Maggs DG (2008) Exenatide effects on diabetes, obesity, cardiovascular risk factors and hepatic biomarkers in patients with type 2 diabetes treated for at least 3 years. *Current medical research and opinion* 24:275-286.
- Kloppenborg RP, van den Berg E, Kappelle LJ, Biessels GJ (2008) Diabetes and other vascular risk factors for dementia: which factor matters most? A systematic review. *European journal of pharmacology* 585:97-108.
- Knopman DS, Parisi JE, Salviati A, Floriach-Robert M, Boeve BF, Ivnik RJ, Smith GE, Dickson DW, Johnson KA, Petersen LE, McDonald WC, Braak H, Petersen RC (2003) Neuropathology of cognitively normal elderly. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 62:1087-1095.
- Kobayashi K, Iwai T, Sasaki-Hamada S, Kamanaka G, Oka J (2013) Exendin (5-39), an antagonist of GLP-1 receptor, modulates synaptic transmission via glutamate uptake in the dentate gyrus. *Brain research* 1505:1-10.
- Koch S, Pohl P, Cobet U, Rainov NG (2000) Ultrasound enhancement of liposome-mediated cell transfection is caused by cavitation effects. *Ultrasound in medicine & biology* 26:897-903.
- Kocot FJ, Carter BJ, Garon CF, Rose JA (1973) Self-complementarity of terminal sequences within plus or minus strands of adenovirus-associated virus DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70:215-219.
- Koerber JT, Klimczak R, Jang JH, Dalkara D, Flannery JG, Schaffer DV (2009) Molecular evolution of adeno-associated virus for enhanced glial gene delivery. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 17:2088-2095.
- Kohlbrenner E, Aslanidi G, Nash K, Shklyayev S, Campbell-Thompson M, Byrne BJ, Snyder RO, Muzyczka N, Warrington KH, Jr., Zolotukhin S (2005) Successful production of pseudotyped rAAV vectors using a modified baculovirus expression system. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 12:1217-1225.
- Kohn DB, Sadelain M, Glorioso JC (2003) Occurrence of leukaemia following gene therapy of X-linked SCID. *Nature reviews Cancer* 3:477-488.
- Koo EH (2002) The beta-amyloid precursor protein (APP) and Alzheimer's disease: does the tail wag the dog? *Traffic* 3:763-770.

- Kopf SR, Baratti CM (1999) Effects of posttraining administration of insulin on retention of a habituation response in mice: participation of a central cholinergic mechanism. *Neurobiology of learning and memory* 71:50-61.
- Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ (1986) Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83:4044-4048.
- Kota J, Handy CR, Haidet AM, Montgomery CL, Eagle A, Rodino-Klapac LR, Tucker D, Shilling CJ, Therlfall WR, Walker CM, Weisbrode SE, Janssen PM, Clark KR, Sahenk Z, Mendell JR, Kaspar BK (2009) Follistatin gene delivery enhances muscle growth and strength in nonhuman primates. *Science translational medicine* 1:6ra15.
- Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM (1995) CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374:546-549.
- Kugler S, Lingor P, Scholl U, Zolotukhin S, Bahr M (2003) Differential transgene expression in brain cells in vivo and in vitro from AAV-2 vectors with small transcriptional control units. *Virology* 311:89-95.
- Kumar A, Haroon E, Darwin C, Pham D, Ajilore O, Rodriguez G, Mintz J (2008) Gray matter prefrontal changes in type 2 diabetes detected using MRI. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI* 27:14-19.
- Kurochkin IV, Goto S (1994) Alzheimer's beta-amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme. *FEBS letters* 345:33-37.

L

- Lacroix MC, Badonnel K, Meunier N, Tan F, Schlegel-Le Poupon C, Durieux D, Monnerie R, Baly C, Congar P, Salesse R, Caillol M (2008) Expression of insulin system in the olfactory epithelium: first approaches to its role and regulation. *Journal of neuroendocrinology* 20:1176-1190.
- Lage JM (2006) 100 Years of Alzheimer's disease (1906-2006). *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 9:15-26.
- Lalana AP (2012) Demencias.
- Lalonde R, Dumont M, Staufienbiel M, Sturchler-Pierrat C, Strazielle C (2002) Spatial learning, exploration, anxiety, and motor coordination in female APP23 transgenic mice with the Swedish mutation. *Brain research* 956:36-44.
- Lalonde R, Lewis TL, Strazielle C, Kim H, Fukuchi K (2003) Transgenic mice expressing the betaAPP695SWE mutation: effects on exploratory activity, anxiety, and motor coordination. *Brain research* 977:38-45.
- Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:6448-6453.
- Landsberg G (2005) Therapeutic agents for the treatment of cognitive dysfunction syndrome in senior dogs. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 29:471-479.
- Larsen PJ, Tang-Christensen M, Holst JJ, Orskov C (1997) Distribution of glucagon-like peptide-1 and other preproglucagon-derived peptides in the rat hypothalamus and brainstem. *Neuroscience* 77:257-270.
- Larsson H, Holst JJ, Ahren B (1997) Glucagon-like peptide-1 reduces hepatic glucose production indirectly through insulin and glucagon in humans. *Acta physiologica Scandinavica* 160:413-422.
- Lauritzen I, R. P-P (2011) Apathy-like syndrome associated with early lesion in the triple-transgenic 3xTgAD mouse. *Alzheimer's and Dementia*
- Le HT, Yu QC, Wilson JM, Croyle MA (2005) Utility of PEGylated recombinant adeno-associated viruses for gene transfer. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 108:161-177.
- Le Meur G, Stieger K, Smith AJ, Weber M, Deschamps JY, Nivard D, Mendes-Madeira A, Provost N, Pereon Y, Cherel Y, Ali RR, Hamel C, Moullier P, Rolling F (2007) Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium. *Gene therapy* 14:292-303.
- Lee G, Neve RL, Kosik KS (1989) The microtubule binding domain of tau protein. *Neuron* 2:1615-1624.
- Lee GK, Maheshri N, Kaspar B, Schaffer DV (2005) PEG conjugation moderately protects adeno-associated viral vectors against antibody neutralization. *Biotechnology and bioengineering* 92:24-34.
- Lee NC, Chien YH, Hu MH, Liu WS, Chen PW, Wang WH, Tzen KY, Byrne BJ, Hwu WL (2014) Treatment of congenital neurotransmitter deficiencies by intracerebral ventricular injection of an adeno-associated virus serotype 9 vector. *Human gene therapy* 25:189-198.
- Leger GC, Banks SJ (2014) Neuropsychiatric symptom profile differs based on pathology in patients with clinically diagnosed behavioral variant frontotemporal dementia. *Dementia and geriatric cognitive disorders* 37:104-112.
- Leissring MA, Farris W, Chang AY, Walsh DM, Wu X, Sun X, Frosch MP, Selkoe DJ (2003) Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron* 40:1087-1093.
- Lemere CA, Oh J, Stanish HA, Peng Y, Pepivani I, Fagan AM, Yamaguchi H, Westmoreland SV, Mansfield KG (2008) Cerebral amyloid-beta protein accumulation with aging in cotton-top tamarins: a model of early Alzheimer's disease? *Rejuvenation research* 11:321-332.
- Lester-Coll N, Rivera EJ, Soscia SJ, Doiron K, Wands JR, de la Monte SM (2006) Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 9:13-33.
- Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, et al. (1995a) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269:973-977.

- Levy-Lahad E, Wijsman EM, Nemens E, Anderson L, Goddard KA, Weber JL, Bird TD, Schellenberg GD (1995b) A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science* 269:970-973.
- Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, Yen SH, Sahara N, Skipper L, Yager D, Eckman C, Hardy J, Hutton M, McGowan E (2001) Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* 293:1487-1491.
- Li C, Narkbunnam N, Samulski RJ, Asokan A, Hu G, Jacobson LJ, Manco-Johnson MJ, Monahan PE (2012) Neutralizing antibodies against adeno-associated virus examined prospectively in pediatric patients with hemophilia. *Gene therapy* 19:288-294.
- Li S, Hong S, Shepardson NE, Walsh DM, Shankar GM, Selkoe D (2009) Soluble oligomers of amyloid beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron* 62:788-801.
- Li Y, Duffy KB, Ottinger MA, Ray B, Bailey JA, Holloway HW, Tweedie D, Perry T, Mattson MP, Kapogiannis D, Sambamurti K, Lahiri DK, Greig NH (2010a) GLP-1 receptor stimulation reduces amyloid-beta peptide accumulation and cytotoxicity in cellular and animal models of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 19:1205-1219.
- Li Y, Hansotia T, Yusta B, Ris F, Halban PA, Drucker DJ (2003) Glucagon-like peptide-1 receptor signaling modulates beta cell apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 278:471-478.
- Li Y, Tweedie D, Mattson MP, Holloway HW, Greig NH (2010b) Enhancing the GLP-1 receptor signaling pathway leads to proliferation and neuroprotection in human neuroblastoma cells. *Journal of neurochemistry* 113:1621-1631.
- Lichtenwalner RJ, Forbes ME, Bennett SA, Lynch CD, Sonntag WE, Riddle DR (2001) Intracerebroventricular infusion of insulin-like growth factor-I ameliorates the age-related decline in hippocampal neurogenesis. *Neuroscience* 107:603-613.
- Lin JW, Ju W, Foster K, Lee SH, Ahmadian G, Wyszynski M, Wang YT, Sheng M (2000) Distinct molecular mechanisms and divergent endocytotic pathways of AMPA receptor internalization. *Nature neuroscience* 3:1282-1290.
- Lipps BV, Mayor HD (1980) Properties of adeno-associated virus (type 1) replicated in rodent cells by murine adenovirus. *The Journal of general virology* 51:223-227.
- Liu F, Song Y, Liu D (1999) Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene therapy* 6:1258-1266.
- Liu H, Yang H, Wang D, Liu Y, Liu X, Li Y, Xie L, Wang G (2009a) Insulin regulates P-glycoprotein in rat brain microvessel endothelial cells via an insulin receptor-mediated PKC/NF-kappaB pathway but not a PI3K/Akt pathway. *European journal of pharmacology* 602:277-282.
- Liu X, Voulgaropoulou F, Chen R, Johnson PR, Clark KR (2000) Selective Rep-Cap gene amplification as a mechanism for high-titer recombinant AAV production from stable cell lines. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2:394-403.
- Liu Y, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX (2011) Deficient brain insulin signalling pathway in Alzheimer's disease and diabetes. *The Journal of pathology* 225:54-62.
- Liu Y, Zhang YW, Wang X, Zhang H, You X, Liao FF, Xu H (2009b) Intracellular trafficking of presenilin 1 is regulated by beta-amyloid precursor protein and phospholipase D1. *The Journal of biological chemistry* 284:12145-12152.
- Lobnig BM, Kromeke O, Optenhostert-Porst C, Wolf OT (2006) Hippocampal volume and cognitive performance in long-standing Type 1 diabetic patients without macrovascular complications. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 23:32-39.
- Lochrie MA, Tatsuno GP, Christie B, McDonnell JW, Zhou S, Surosky R, Pierce GF, Colosi P (2006) Mutations on the external surfaces of adeno-associated virus type 2 capsids that affect transduction and neutralization. *Journal of virology* 80:821-834.
- Loo DT, Copani A, Pike CJ, Whitemore ER, Walencewicz AJ, Cotman CW (1993) Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:7951-7955.
- Lorenzo A, Razzaboni B, Weir GC, Yankner BA (1994) Pancreatic islet cell toxicity of amylin associated with type-2 diabetes mellitus. *Nature* 368:756-760.
- Lorenzo A, Yuan M, Zhang Z, Paganetti PA, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Mautino J, Vigo FS, Sommer B, Yankner BA (2000) Amyloid beta interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechanism in Alzheimer's disease. *Nature neuroscience* 3:460-464.
- Lovasic L, Bauschke H, Janus C (2005) Working memory impairment in a transgenic amyloid precursor protein TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. *Genes, brain, and behavior* 4:197-208.
- Lu L, Lee WC, Takayama T, Qian S, Gambotto A, Robbins PD, Thomson AW (1999) Genetic engineering of dendritic cells to express immunosuppressive molecules (viral IL-10, TGF-beta, and CTLA4Ig). *Journal of leukocyte biology* 66:293-296.
- Lu-Nguyen NB, Broadstock M, Schliesser MG, Bartholomae CC, von Kalle C, Schmidt M, Yanez-Munoz RJ (2014) Transgenic expression of human glial cell line-derived neurotrophic factor from integration-deficient lentiviral vectors is neuroprotective in a rodent model of Parkinson's disease. *Human gene therapy* 25:631-641.
- Lucignani G, Namba H, Nehlig A, Porrino LJ, Kennedy C, Sokoloff L (1987) Effects of insulin on local cerebral glucose utilization in the rat. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 7:309-314.
- Luo Y, Bolon B, Kahn S, Bennett BD, Babu-Khan S, Denis P, Fan W, Kha H, Zhang J, Gong Y, Martin L, Louis JC, Yan Q, Richards WG, Citron M, Vassar R (2001) Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nature neuroscience* 4:231-232.
- Lusby E, Bohenzky R, Berns KI (1981) Inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA: independence of the orientation at either end of the genome. *Journal of virology* 37:1083-1086.
- Lusby E, Fife KH, Berns KI (1980) Nucleotide sequence of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA. *Journal of virology* 34:402-409.

Lyketsos CG, Carrillo MC, Ryan JM, Khachaturian AS, Trzepacz P, Amatniek J, Cedarbaum J, Brashear R, Miller DS (2011) Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 7:532-539.

M

- Maelicke A, Samochocki M, Jostock R, Fehrenbacher A, Ludwig J, Albuquerque EX, Zerlin M (2001) Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new treatment strategy for Alzheimer's disease. *Biological psychiatry* 49:279-288.
- Maesako M, Uemura K, Kuzuya A, Sasaki K, Asada M, Watanabe K, Ando K, Kubota M, Kihara T, Kinoshita A (2011) Presenilin regulates insulin signaling via a gamma-secretase-independent mechanism. *The Journal of biological chemistry* 286:25309-25316.
- Magin-Lachmann C, Kotzamanis G, D'Aiuto L, Cooke H, Huxley C, Wagner E (2004) In vitro and in vivo delivery of intact BAC DNA -- comparison of different methods. *The journal of gene medicine* 6:195-209.
- Maguire AM, High KA, Auricchio A, Wright JF, Pierce EA, Testa F, Mingozi F, Bennicelli JL, Ying GS, Rossi S, Fulton A, Marshall KA, Banfi S, Chung DC, Morgan JI, Hauck B, Zelenia O, Zhu X, Raffini L, Coppieters F, De Baere E, Shindler KS, Volpe NJ, Surace EM, Acerra C, Lyubarsky A, Redmond TM, Stone E, Sun J, McDonnell JW, Leroy BP, Simonelli F, Bennett J (2009) Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 374:1597-1605.
- Maheshri N, Koerber JT, Kaspar BK, Schaffer DV (2006) Directed evolution of adeno-associated virus yields enhanced gene delivery vectors. *Nature biotechnology* 24:198-204.
- Mahley RW (1988) Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240:622-630.
- Man HY, Lin JW, Ju WH, Ahmadian G, Liu L, Becker LE, Sheng M, Wang YT (2000) Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization. *Neuron* 25:649-662.
- Maniatis T, Kee SG, Efstratiadis A, Kafatos FC (1976) Amplification and characterization of a beta-globin gene synthesized in vitro. *Cell* 8:163-182.
- Manning CA, Parsons MW, Gold PE (1992) Anterograde and retrograde enhancement of 24-h memory by glucose in elderly humans. *Behavioral and neural biology* 58:125-130.
- Manning CA, Ragozzino ME, Gold PE (1993) Glucose enhancement of memory in patients with probable senile dementia of the Alzheimer's type. *Neurobiology of aging* 14:523-528.
- Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, Glader B, Ragni M, Rasko JJ, Ozelo MC, Hoots K, Blatt P, Konkle B, Dake M, Kaye R, Razavi M, Zajko A, Zehnder J, Rustagi PK, Nakai H, Chew A, Leonard D, Wright JF, Lessard RR, Sommer JM, Tigges M, Sabatino D, Luk A, Jiang H, Mingozi F, Couto L, Ertl HC, High KA, Kay MA (2006) Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nature medicine* 12:342-347.
- Marfaing P, Penicaud L, Broer Y, Mraovitch S, Calando Y, Picon L (1990) Effects of hyperinsulinemia on local cerebral insulin binding and glucose utilization in normoglycemic awake rats. *Neuroscience letters* 115:279-285.
- Margolis RU, Altszuler N (1967) Insulin in the cerebrospinal fluid. *Nature* 215:1375-1376.
- Markakis EA, Vives KP, Bober J, Leichtle S, Leranath C, Beecham J, Elsworth JD, Roth RH, Samulski RJ, Redmond DE, Jr. (2010) Comparative transduction efficiency of AAV vector serotypes 1-6 in the substantia nigra and striatum of the primate brain. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 18:588-593.
- Markowska AL, Mooney M, Sonntag WE (1998) Insulin-like growth factor-1 ameliorates age-related behavioral deficits. *Neuroscience* 87:559-569.
- Martins RN, Harper CG, Stokes GB, Masters CL (1986) Increased cerebral glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in Alzheimer's disease may reflect oxidative stress. *Journal of neurochemistry* 46:1042-1045.
- Masliah E, Mallory M, Ge N, Alford M, Veinbergs I, Roses AD (1995) Neurodegeneration in the central nervous system of apoE-deficient mice. *Experimental neurology* 136:107-122.
- Massague J, Czech MP (1982) The subunit structures of two distinct receptors for insulin-like growth factors I and II and their relationship to the insulin receptor. *The Journal of biological chemistry* 257:5038-5045.
- Masters CL, Multhaup G, Simms G, Pottgiesser J, Martins RN, Beyreuther K (1985) Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *The EMBO journal* 4:2757-2763.
- Matsunaga W, Shirokawa T, Isobe K (2003) Specific uptake of Abeta1-40 in rat brain occurs in astrocyte, but not in microglia. *Neuroscience letters* 342:129-131.
- Matsuzaki T, Sasaki K, Tanizaki Y, Hata J, Fujimi K, Matsui Y, Sekita A, Suzuki SO, Kanba S, Kiyohara Y, Iwaki T (2010) Insulin resistance is associated with the pathology of Alzheimer disease: the Hisayama study. *Neurology* 75:764-770.
- Mayor HD, Torikai K, Melnick JL, Mandel M (1969) Plus and minus single-stranded DNA separately encapsidated in adeno-associated satellite virions. *Science* 166:1280-1282.
- McClellan PL, Gault VA, Harriott P, Holscher C (2010) Glucagon-like peptide-1 analogues enhance synaptic plasticity in the brain: a link between diabetes and Alzheimer's disease. *European journal of pharmacology* 630:158-162.
- McClellan PL, Holscher C (2014) Liraglutide can reverse memory impairment, synaptic loss and reduce plaque load in aged APP/PS1 mice, a model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 76 Pt A:57-67.

- McClellan PL, Parthasarathy V, Faivre E, Holscher C (2011) The diabetes drug liraglutide prevents degenerative processes in a mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:6587-6594.
- McDermott JR, Gibson AM (1997) Degradation of Alzheimer's beta-amyloid protein by human and rat brain peptidases: involvement of insulin-degrading enzyme. *Neurochemical research* 22:49-56.
- McIntyre N, Holdsworth CD, Turner DS (1965) Intestinal factors in the control of insulin secretion. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 25:1317-1324.
- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34:939-944.
- McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Jr., Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R, Mohs RC, Morris JC, Rossor MN, Scheltens P, Carrillo MC, Thies B, Weintraub S, Phelps CH (2011) The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 7:263-269.
- McRory JE, Sherwood NM (1997) Ancient divergence of insulin and insulin-like growth factor. *DNA and cell biology* 16:939-949.
- Meghrouh J, Aucoin MG, Jacob D, Chahal PS, Arcand N, Kamen AA (2005) Production of recombinant adeno-associated viral vectors using a baculovirus/insect cell suspension culture system: from shake flasks to a 20-L bioreactor. *Biotechnology progress* 21:154-160.
- Melov S, Adlard PA, Morten K, Johnson F, Golden TR, Hinerfeld D, Schilling B, Mavros C, Masters CL, Volitakis I, Li QX, Loughton K, Hubbard A, Cherny RA, Gibson B, Bush AI (2007) Mitochondrial oxidative stress causes hyperphosphorylation of tau. *PLoS one* 2:e536.
- Menendez-Gonzalez M, Perez-Pinera P, Martinez-Rivera M, Calatayud MT, Blazquez Menes B (2005) APP processing and the APP-KPI domain involvement in the amyloid cascade. *Neuro-degenerative diseases* 2:277-283.
- Merchenthaler I, Lane M, Shughrue P (1999) Distribution of pre-pro-glucagon and glucagon-like peptide-1 receptor messenger RNAs in the rat central nervous system. *The Journal of comparative neurology* 403:261-280.
- Mercola KE, Stang HD, Browne J, Salsler W, Cline MJ (1980) Insertion of a new gene of viral origin into bone marrow cells of mice. *Science* 208:1033-1035.
- Messier C, Gagnon M, Knott V (1997) Effect of glucose and peripheral glucose regulation on memory in the elderly. *Neurobiology of aging* 18:297-304.
- Mesulam M, Guillozet A, Shaw P, Quinn B (2002) Widely spread butyrylcholinesterase can hydrolyze acetylcholine in the normal and Alzheimer brain. *Neurobiology of disease* 9:88-93.
- Meyer KB, Thompson MM, Levy MY, Barron LG, Szoka FC, Jr. (1995) Intratracheal gene delivery to the mouse airway: characterization of plasmid DNA expression and pharmacokinetics. *Gene therapy* 2:450-460.
- Mielke R, Herholz K, Grond M, Kessler J, Heiss WD (1992) Differences of regional cerebral glucose metabolism between presenile and senile dementia of Alzheimer type. *Neurobiology of aging* 13:93-98.
- Mielke R, Herholz K, Grond M, Kessler J, Heiss WD (1994) Clinical deterioration in probable Alzheimer's disease correlates with progressive metabolic impairment of association areas. *Dementia* 5:36-41.
- Miklossy J, Qing H, Radenovic A, Kis A, Vileno B, Laszlo F, Miller L, Martins RN, Waeber G, Mooser V, Bosman F, Khalili K, Darbinian N, McGeer PL (2010) Beta amyloid and hyperphosphorylated tau deposits in the pancreas in type 2 diabetes. *Neurobiology of aging* 31:1503-1515.
- Milgram NW, Zicker SC, Head E, Muggenburg BA, Murphey H, Ikeda-Douglas CJ, Cotman CW (2002) Dietary enrichment counteracts age-associated cognitive dysfunction in canines. *Neurobiology of aging* 23:737-745.
- Miller BC, Eckman EA, Sambamurti K, Dobbs N, Chow KM, Eckman CB, Hersh LB, Thiele DL (2003) Amyloid-beta peptide levels in brain are inversely correlated with insulin activity levels in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:6221-6226.
- Miller DG, Adam MA, Miller AD (1990) Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Molecular and cellular biology* 10:4239-4242.
- Mingozzi F, Maus MV, Hui DJ, Sabatino DE, Murphy SL, Rasko JE, Ragni MV, Manno CS, Sommer J, Jiang H, Pierce GF, Ertl HC, High KA (2007) CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nature medicine* 13:419-422.
- Minoshima S, Giordani B, Berent S, Frey KA, Foster NL, Kuhl DE (1997) Metabolic reduction in the posterior cingulate cortex in very early Alzheimer's disease. *Annals of neurology* 42:85-94.
- Mirra SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM, Vogel FS, Hughes JP, van Belle G, Berg L (1991) The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 41:479-486.
- Mirzabekov TA, Lin MC, Kagan BL (1996) Pore formation by the cytotoxic islet amyloid peptide amylin. *The Journal of biological chemistry* 271:1988-1992.
- Mojsov S, Weir GC, Habener JF (1987) Insulinotropin: glucagon-like peptide I (7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas. *The Journal of clinical investigation* 79:616-619.
- Molinuevo JL, Berthier ML, Rami L (2011) Donepezil provides greater benefits in mild compared to moderate Alzheimer's disease: implications for early diagnosis and treatment. *Archives of gerontology and geriatrics* 52:18-22.
- Moloney AM, Griffin RJ, Timmons S, O'Connor R, Ravid R, O'Neill C (2010) Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signalling. *Neurobiology of aging* 31:224-243.

- Moon JH, Kim HJ, Yang AH, Kim HM, Lee BW, Kang ES, Lee HC, Cha BS (2012) The effect of rosiglitazone on LRP1 expression and amyloid beta uptake in human brain microvascular endothelial cells: a possible role of a low-dose thiazolidinedione for dementia treatment. *Int J Neuropsychopharmacol* 15:135-142.
- Moosavi M, Naghdi N, Chooapani S (2007) Intra CA1 insulin microinjection improves memory consolidation and retrieval. *Peptides* 28:1029-1034.
- Moosavi M, Naghdi N, Maghsoudi N, Zahedi Asl S (2006) The effect of intrahippocampal insulin microinjection on spatial learning and memory. *Hormones and behavior* 50:748-752.
- Mora F, Exposito I, Sanz B, Blazquez E (1992) Selective release of glutamine and glutamic acid produced by perfusion of GLP-1 (7-36) amide in the basal ganglia of the conscious rat. *Brain research bulletin* 29:359-361.
- Morgan DO, Edman JC, Standring DN, Fried VA, Smith MC, Roth RA, Rutter WJ (1987) Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein. *Nature* 329:301-307.
- Morgan DO, Jarnagin K, Roth RA (1986) Purification and characterization of the receptor for insulin-like growth factor I. *Biochemistry* 25:5560-5564.
- Mori H, Kondo J, Ihara Y (1987) Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Science* 235:1641-1644.
- Morris R (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of neuroscience methods* 11:47-60.
- Moskalenko M, Chen L, van Roey M, Donahue BA, Snyder RO, McArthur JG, Patel SD (2000) Epitope mapping of human anti-adenovirus type 2 neutralizing antibodies: implications for gene therapy and virus structure. *Journal of virology* 74:1761-1766.
- Muller-Hill B, Beyreuther K (1989) Molecular biology of Alzheimer's disease. *Annual review of biochemistry* 58:287-307.

N

- Nagy Z, Esiri MM, Jobst KA, Morris JH, King EM, McDonald B, Litchfield S, Smith A, Barnetson L, Smith AD (1995) Relative roles of plaques and tangles in the dementia of Alzheimer's disease: correlations using three sets of neuropathological criteria. *Dementia* 6:21-31.
- Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D (1996) In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272:263-267.
- Namba Y, Tomonaga M, Kawasaki H, Otomo E, Ikeda K (1991) Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain research* 541:163-166.
- Naor M, Steingruber HJ, Westhoff K, Schottenfeld-Naor Y, Gries AF (1997) Cognitive function in elderly non-insulin-dependent diabetic patients before and after inpatient treatment for metabolic control. *Journal of diabetes and its complications* 11:40-46.
- Nathwani AC, Gray JT, McIntosh J, Ng CY, Zhou J, Spence Y, Cochrane M, Gray E, Tuddenham EG, Davidoff AM (2007) Safe and efficient transduction of the liver after peripheral vein infusion of self-complementary AAV vector results in stable therapeutic expression of human FIX in nonhuman primates. *Blood* 109:1414-1421.
- Nathwani AC, Gray JT, Ng CY, Zhou J, Spence Y, Waddington SN, Tuddenham EG, Kembell-Cook G, McIntosh J, Boon-Spijker M, Mertens K, Davidoff AM (2006) Self-complementary adeno-associated virus vectors containing a novel liver-specific human factor IX expression cassette enable highly efficient transduction of murine and nonhuman primate liver. *Blood* 107:2653-2661.
- Nauck M, Frid A, Hermansen K, Shah NS, Tankova T, Mitha IH, Zdravkovic M, Doring M, Matthews DR (2009) Efficacy and safety comparison of liraglutide, glimepiride, and placebo, all in combination with metformin, in type 2 diabetes: the LEAD (liraglutide effect and action in diabetes)-2 study. *Diabetes care* 32:84-90.
- Nauck MA, Duran S, Kim D, Johns D, Northrup J, Festa A, Brodows R, Trautmann M (2007) A comparison of twice-daily exenatide and biphasic insulin aspart in patients with type 2 diabetes who were suboptimally controlled with sulfonylurea and metformin: a non-inferiority study. *Diabetologia* 50:259-267.
- Nauck MA, Hompesch M, Filipczak R, Le TD, Zdravkovic M, Gumprecht J (2006) Five weeks of treatment with the GLP-1 analogue liraglutide improves glycaemic control and lowers body weight in subjects with type 2 diabetes. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 114:417-423.
- Nemoto T, Toyoshima-Aoyama F, Yanagita T, Maruta T, Fujita H, Koshida T, Yonaha T, Wada A, Sawaguchi A, Murakami M (2014) New insights concerning insulin synthesis and its secretion in rat hippocampus and cerebral cortex: amyloid-beta1-42-induced reduction of proinsulin level via glycogen synthase kinase-3beta. *Cellular signalling* 26:253-259.
- Niswender KD, Morrison CD, Clegg DJ, Olson R, Baskin DG, Myers MG, Jr., Seeley RJ, Schwartz MW (2003) Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia. *Diabetes* 52:227-231.
- Novak V, Hajjar I (2010) The relationship between blood pressure and cognitive function. *Nature reviews Cardiology* 7:686-698.
- Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, Jones PK, Ghanbari H, Wataya T, Shimohama S, Chiba S, Atwood CS, Petersen RB, Smith MA (2001) Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 60:759-767.

Nunomura A, Perry G, Pappolla MA, Wade R, Hirai K, Chiba S, Smith MA (1999) RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:1959-1964.

O

- Obici S, Feng Z, Karkanas G, Baskin DG, Rossetti L (2002) Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nature neuroscience* 5:566-572.
- Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM (2003a) Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 24:1063-1070.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM (2003b) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39:409-421.
- Oddo S, Caccamo A, Tran L, Lambert MP, Glabe CG, Klein WL, LaFerla FM (2006) Temporal profile of amyloid-beta (Abeta) oligomerization in an in vivo model of Alzheimer disease. A link between Abeta and tau pathology. *The Journal of biological chemistry* 281:1599-1604.
- Okada K, Nishizawa K, Fukabori R, Kai N, Shiota A, Ueda M, Tsutsui Y, Sakata S, Matsushita N, Kobayashi K (2014) Enhanced flexibility of place discrimination learning by targeting striatal cholinergic interneurons. *Nature communications* 5:3778.
- Olton DS, Papas BC (1979) Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia* 17:669-682.
- Opii WO, Joshi G, Head E, Milgram NW, Muggenburg BA, Klein JB, Pierce WM, Cotman CW, Butterfield DA (2008) Proteomic identification of brain proteins in the canine model of human aging following a long-term treatment with antioxidants and a program of behavioral enrichment: relevance to Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 29:51-70.
- Orskov C, Jeppesen J, Madsbad S, Holst JJ (1991) Proglucagon products in plasma of noninsulin-dependent diabetics and nondiabetic controls in the fasting state and after oral glucose and intravenous arginine. *The Journal of clinical investigation* 87:415-423.
- Owen OE, Reichard GA, Jr., Boden G, Shuman C (1974) Comparative measurements of glucose, beta-hydroxybutyrate, acetoacetate, and insulin in blood and cerebrospinal fluid during starvation. *Metabolism: clinical and experimental* 23:7-14.

P

- Pacak CA, Mah CS, Thattaliyath BD, Conlon TJ, Lewis MA, Cloutier DE, Zolotukhin I, Tarantal AF, Byrne BJ (2006) Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo. *Circulation research* 99:e3-9.
- Paneda A, Vanrell L, Mauleon I, Crettaz JS, Berraondo P, Timmermans EJ, Beattie SG, Twisk J, van Deventer S, Prieto J, Fontanellas A, Rodriguez-Pena MS, Gonzalez-Aseguinolaza G (2009) Effect of adeno-associated virus serotype and genomic structure on liver transduction and biodistribution in mice of both genders. *Human gene therapy* 20:908-917.
- Papaioannou N, Tooten PC, van Ederen AM, Bohl JR, Rofina J, Tsangaris T, Gruys E (2001) Immunohistochemical investigation of the brain of aged dogs. I. Detection of neurofibrillary tangles and of 4-hydroxynonenal protein, an oxidative damage product, in senile plaques. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis* 8:11-21.
- Parker M, Bellec J, McFarland T, Scripps V, Appukuttan B, Hartzell M, Yeager A, Hady T, Mitrophanous KA, Stout T, Ellis S (2014) Suppression of neovascularization of donor corneas by transduction with equine infectious anemia virus-based lentiviral vectors expressing endostatin and angiostatin. *Human gene therapy* 25:408-418.
- Parks WP, Melnick JL, Rongey R, Mayor HD (1967) Physical assay and growth cycle studies of a defective adeno-satellite virus. *Journal of virology* 1:171-180.
- Parsons MW, Gold PE (1992) Glucose enhancement of memory in elderly humans: an inverted-U dose-response curve. *Neurobiology of aging* 13:401-404.
- Patterson C, Feightner J, Garcia A, MacKnight C (2007) Primary prevention of dementia. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 3:348-354.
- Paxinos G, B.J. FK *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*: Academic Press.
- Pearson-Leary J, McNay EC (2012) Intrahippocampal administration of amyloid-beta(1-42) oligomers acutely impairs spatial working memory, insulin signaling, and hippocampal metabolism. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 30:413-422.
- Pellicano M, Bulati M, Buffa S, Barbagallo M, Di Prima A, Misiano G, Picone P, Di Carlo M, Nuzzo D, Candore G, Vasto S, Lio D, Caruso C, Colonna-Romano G (2010) Systemic immune responses in Alzheimer's disease: in vitro mononuclear cell activation and cytokine production. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 21:181-192.
- Perez A, Morelli L, Cresto JC, Castano EM (2000) Degradation of soluble amyloid beta-peptides 1-40, 1-42, and the Dutch variant 1-40Q by insulin degrading enzyme from Alzheimer disease and control brains. *Neurochemical research* 25:247-255.
- Pericak-Vance MA, Bebout JL, Gaskell PC, Jr., Yamaoka LH, Hung WY, Alberts MJ, Walker AP, Bartlett RJ, Haynes CA, Welsh KA, et al. (1991) Linkage studies in familial Alzheimer disease: evidence for chromosome 19 linkage. *American journal of human genetics* 48:1034-1050.

- Perry EK, Gibson PH, Blessed G, Perry RH, Tomlinson BE (1977) Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia. Choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy brain tissue. *Journal of the neurological sciences* 34:247-265.
- Perry EK, Tomlinson BE, Blessed G, Bergmann K, Gibson PH, Perry RH (1978) Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *British medical journal* 2:1457-1459.
- Perry G, Friedman R, Shaw G, Chau V (1987) Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84:3033-3036.
- Perry T, Haughey NJ, Mattson MP, Egan JM, Greig NH (2002a) Protection and reversal of excitotoxic neuronal damage by glucagon-like peptide-1 and exendin-4. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 302:881-888.
- Perry T, Lahiri DK, Chen D, Zhou J, Shaw KT, Egan JM, Greig NH (2002b) A novel neurotrophic property of glucagon-like peptide 1: a promoter of nerve growth factor-mediated differentiation in PC12 cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 300:958-966.
- Perry T, Lahiri DK, Sambamurti K, Chen D, Mattson MP, Egan JM, Greig NH (2003) Glucagon-like peptide-1 decreases endogenous amyloid-beta peptide (A β) levels and protects hippocampal neurons from death induced by A β and iron. *Journal of neuroscience research* 72:603-612.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29:e45.
- Phillips N, Kay MA (2014) Characterization of vector-based delivery of neurogenin-3 in murine diabetes. *Human gene therapy* 25:651-661.
- Piedra J, Ontiveros M, Miravet S, Penalva C, Monfar M, Chillon M (2015) Development of a rapid, robust, and universal picogreen-based method to titer adeno-associated vectors. *Human gene therapy methods* 26:35-42.
- Pietropaolo S, Feldon J, Yee BK (2008a) Age-dependent phenotypic characteristics of a triple transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Behavioral neuroscience* 122:733-747.
- Pietropaolo S, Sun Y, Li R, Brana C, Feldon J, Yee BK (2008b) The impact of voluntary exercise on mental health in rodents: a neuroplasticity perspective. *Behavioural brain research* 192:42-60.
- Pietrzak RH, Lim YY, Neumeister A, Ames D, Ellis KA, Harrington K, Lautenschlager NT, Restrepo C, Martins RN, Masters CL, Villemagne VL, Rowe CC, Maruff P (2015) Amyloid-beta, anxiety, and cognitive decline in preclinical Alzheimer disease: a multicenter, prospective cohort study. *JAMA psychiatry* 72:284-291.
- Piroli GG, Grillo CA, Reznikov LR, Adams S, McEwen BS, Charron MJ, Reagan LP (2007) Corticosterone impairs insulin-stimulated translocation of GLUT4 in the rat hippocampus. *Neuroendocrinology* 85:71-80.
- Pleger ST, Shan C, Ksienzyk J, Bekeredjian R, Boekstegers P, Hinkel R, Schinkel S, Leuchs B, Ludwig J, Qiu G, Weber C, Raake P, Koch WJ, Katus HA, Muller OJ, Most P (2011) Cardiac AAV9-S100A1 gene therapy rescues post-ischemic heart failure in a preclinical large animal model. *Science translational medicine* 3:92ra64.
- Popplewell L, Koo T, Leclerc X, Duclert A, Mamchaoui K, Gouble A, Mouly V, Voit T, Paques F, Cedrone F, Isman O, Yanez-Munoz RJ, Dickson G (2013) Gene correction of a duchenne muscular dystrophy mutation by meganuclease-enhanced exon knock-in. *Human gene therapy* 24:692-701.
- Porter DW, Kerr BD, Flatt PR, Holscher C, Gault VA (2010) Four weeks administration of Liraglutide improves memory and learning as well as glycaemic control in mice with high fat dietary-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes, obesity & metabolism* 12:891-899.
- Poston RS, Mann MJ, Hoyt EG, Ennen M, Dzau VJ, Robbins RC (1999) Antisense oligodeoxynucleotides prevent acute cardiac allograft rejection via a novel, nontoxic, highly efficient transfection method. *Transplantation* 68:825-832.
- Prabhakar S, Taherian M, Gianni D, Conlon TJ, Fulci G, Brockmann J, Stemmer-Rachamimov A, Sena-Esteves M, Breakefield XO, Brenner GJ (2013) Regression of schwannomas induced by adeno-associated virus-mediated delivery of caspase-1. *Human gene therapy* 24:152-162.
- Praprotnik D, Smith MA, Richey PL, Vinters HV, Perry G (1996) Plasma membrane fragility in dystrophic neurites in senile plaques of Alzheimer's disease: an index of oxidative stress. *Acta neuropathologica* 91:1-5.
- Pratico D, Uryu K, Leight S, Trojanowski JQ, Lee VM (2001) Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21:4183-4187.
- Premkumar DR, Smith MA, Richey PL, Petersen RB, Castellani R, Kutty RK, Wiggert B, Perry G, Kalaria RN (1995) Induction of heme oxygenase-1 mRNA and protein in neocortex and cerebral vessels in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* 65:1399-1402.
- Profenno LA, Porsteinsson AP, Faraone SV (2010) Meta-analysis of Alzheimer's disease risk with obesity, diabetes, and related disorders. *Biological psychiatry* 67:505-512.
- Puente EC, Silverstein J, Bree AJ, Musikantow DR, Wozniak DF, Maloney S, Daphna-Iken D, Fisher SJ (2010) Recurrent moderate hypoglycemia ameliorates brain damage and cognitive dysfunction induced by severe hypoglycemia. *Diabetes* 59:1055-1062.
- Pugliese M, Mascort J, Mahy N, Ferrer I (2006) Diffuse beta-amyloid plaques and hyperphosphorylated tau are unrelated processes in aged dogs with behavioral deficits. *Acta neuropathologica* 112:175-183.

- Qiao C, Li J, Zheng H, Bogan J, Li J, Yuan Z, Zhang C, Bogan D, Kornegay J, Xiao X (2009) Hydrodynamic limb vein injection of adeno-associated virus serotype 8 vector carrying canine myostatin propeptide gene into normal dogs enhances muscle growth. *Human gene therapy* 20:1-10.
- Qin Z, Sun Z, Huang J, Hu Y, Wu Z, Mei B (2008) Mutated recombinant human glucagon-like peptide-1 protects SH-SY5Y cells from apoptosis induced by amyloid-beta peptide (1-42). *Neuroscience letters* 444:217-221.
- Qiu WQ, Ye Z, Kholodenko D, Seubert P, Selkoe DJ (1997) Degradation of amyloid beta-protein by a metalloprotease secreted by microglia and other neural and non-neural cells. *The Journal of biological chemistry* 272:6641-6646.

R

- Raake PW, Hinkel R, Muller S, Delker S, Kreuzpointner R, Kupatt C, Katus HA, Kleinschmidt JA, Boekstegers P, Muller OJ (2008) Cardio-specific long-term gene expression in a porcine model after selective pressure-regulated retroinfusion of adeno-associated viral (AAV) vectors. *Gene therapy* 15:12-17.
- Rachman J, Barrow BA, Levy JC, Turner RC (1997) Near-normalisation of diurnal glucose concentrations by continuous administration of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in subjects with NIDDM. *Diabetologia* 40:205-211.
- Raizada MK, Yang JW, Fellows RE (1980) Binding of [125I]insulin to specific receptors and stimulation of nucleotide incorporation in cells cultured from rat brain. *Brain research* 200:389-400.
- Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao GP, Wilson JM, Batshaw ML (2003) Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Molecular genetics and metabolism* 80:148-158.
- Raper SE, Yudkoff M, Chirmule N, Gao GP, Nunes F, Haskal ZJ, Furth EE, Probert KJ, Robinson MB, Magosin S, Simoes H, Speicher L, Hughes J, Tazelaar J, Wivel NA, Wilson JM, Batshaw ML (2002) A pilot study of in vivo liver-directed gene transfer with an adenoviral vector in partial ornithine transcarbamylase deficiency. *Human gene therapy* 13:163-175.
- Raskind MA, Peskind ER, Truyen L, Kershaw P, Damaraju CV (2004) The cognitive benefits of galantamine are sustained for at least 36 months: a long-term extension trial. *Archives of neurology* 61:252-256.
- Raz E, Carson DA, Parker SE, Parr TB, Abai AM, Aichinger G, Gromkowski SH, Singh M, Lew D, Yankauckas MA, et al. (1994) Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:9519-9523.
- Recio-Pinto E, Lang FF, Ishii DN (1984) Insulin and insulin-like growth factor II permit nerve growth factor binding and the neurite formation response in cultured human neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81:2562-2566.
- Recio-Pinto E, Rechler MM, Ishii DN (1986) Effects of insulin, insulin-like growth factor-II, and nerve growth factor on neurite formation and survival in cultured sympathetic and sensory neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 6:1211-1219.
- Rees T, Hammond PI, Soreq H, Younkin S, Brimijoin S (2003) Acetylcholinesterase promotes beta-amyloid plaques in cerebral cortex. *Neurobiology of aging* 24:777-787.
- Reger MA, Watson GS, Frey WH, 2nd, Baker LD, Cholerton B, Keeling ML, Belongia DA, Fishel MA, Plymate SR, Schellenberg GD, Cherrier MM, Craft S (2006) Effects of intranasal insulin on cognition in memory-impaired older adults: modulation by APOE genotype. *Neurobiology of aging* 27:451-458.
- Reger MA, Watson GS, Green PS, Baker LD, Cholerton B, Fishel MA, Plymate SR, Cherrier MM, Schellenberg GD, Frey WH, 2nd, Craft S (2008) Intranasal insulin administration dose-dependently modulates verbal memory and plasma amyloid-beta in memory-impaired older adults. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 13:323-331.
- Reitz C, Mayeux R (2014) Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochemical pharmacology* 88:640-651.
- Revsin Y, Saravia F, Roig P, Lima A, de Kloet ER, Homo-Delarche F, De Nicola AF (2005) Neuronal and astroglial alterations in the hippocampus of a mouse model for type 1 diabetes. *Brain research* 1038:22-31.
- Richter JA, Perry EK, Tomlinson BE (1980) Acetylcholine and choline levels in post-mortem human brain tissue: preliminary observations in Alzheimer's disease. *Life sciences* 26:1683-1689.
- Rivera EJ, Goldin A, Fulmer N, Tavares R, Wands JR, de la Monte SM (2005) Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 8:247-268.
- Roberson ED, Halabisky B, Yoo JW, Yao J, Chin J, Yan F, Wu T, Hamto P, Devidze N, Yu GQ, Palop JJ, Noebels JL, Mucke L (2011) Amyloid-beta/Fyn-induced synaptic, network, and cognitive impairments depend on tau levels in multiple mouse models of Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:700-711.
- Roberson ED, Scarce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, Gerstein H, Yu GQ, Mucke L (2007) Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* 316:750-754.
- Rofina JE, van Ederen AM, Toussaint MJ, Secreve M, van der Spek A, van der Meer I, Van Eerdenburg FJ, Gruys E (2006) Cognitive disturbances in old dogs suffering from the canine counterpart of Alzheimer's disease. *Brain research* 1069:216-226.
- Rogaeva E, Meng Y, Lee JH, Gu Y, Kawarai T, Zou F, Katayama T, Baldwin CT, Cheng R, Hasegawa H, Chen F, Shibata N, Lunetta KL, Pardossi-Piquard R, Bohm C, Wakutani Y, Cupples LA, Cuenco KT, Green RC, Pinessi L, Rainero I, Sorbi S, Bruni A, Duara R, Friedland RP, Inzelberg R, Hampe W, Bujo H, Song YQ, Andersen OM, Willnow TE, Graff-Radford N, Petersen RC, Dickson D,

- Der SD, Fraser PE, Schmitt-Ulms G, Younkin S, Mayeux R, Farrer LA, St George-Hyslop P (2007) The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nature genetics* 39:168-177.
- Rogers S, Lowenthal A, Terheggen HG, Columbo JP (1973) Induction of arginase activity with the Shope papilloma virus in tissue culture cells from an argininemic patient. *The Journal of experimental medicine* 137:1091-1096.
- Rohan de Silva HA, Jen A, Wickenden C, Jen LS, Wilkinson SL, Patel AJ (1997) Cell-specific expression of beta-amyloid precursor protein isoform mRNAs and proteins in neurons and astrocytes. *Brain research Molecular brain research* 47:147-156.
- Rose JA, Maizel JV, Jr., Inman JK, Shatkin AJ (1971) Structural proteins of adenovirus-associated viruses. *Journal of virology* 8:766-770.
- Rotwein P, Burgess SK, Milbrandt JD, Krause JE (1988) Differential expression of insulin-like growth factor genes in rat central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:265-269.
- Roy V, Belzung C, Delarue C, Chapillon P (2001) Environmental enrichment in BALB/c mice: effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatory odor. *Physiology & behavior* 74:313-320.
- Royo NC, Vandenberghe LH, Ma JY, Hauspurg A, Yu L, Maronski M, Johnston J, Dichter MA, Wilson JM, Watson DJ (2008) Specific AAV serotypes stably transduce primary hippocampal and cortical cultures with high efficiency and low toxicity. *Brain research* 1190:15-22.
- Russell MJ, White R, Patel E, Markesbery WR, Watson CR, Geddes JW (1992) Familial influence on plaque formation in the beagle brain. *Neuroreport* 3:1093-1096.

S

- Sack BK, Merchant S, Markusic DM, Nathwani AC, Davidoff AM, Byrne BJ, Herzog RW (2012) Transient B cell depletion or improved transgene expression by codon optimization promote tolerance to factor VIII in gene therapy. *PloS one* 7:e37671.
- Sambrook J, Westphal H, Srinivasan PR, Dulbecco R (1968) The integrated state of viral DNA in SV40-transformed cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 60:1288-1295.
- Samulski RJ, Berns KI, Tan M, Muzyczka N (1982) Cloning of adeno-associated virus into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79:2077-2081.
- Sankar R, Thamocharan S, Shin D, Moley KH, Devaskar SU (2002) Insulin-responsive glucose transporters-GLUT8 and GLUT4 are expressed in the developing mammalian brain. *Brain research Molecular brain research* 107:157-165.
- Sarasa M (2006) [Experimental models for Alzheimer's disease research]. *Revista de neurologia* 42:297-301.
- Sarasa M, Pesini P (2009) Natural non-transgenic animal models for research in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer research* 6:171-178.
- Sarasa M, Sorribas V, Terradoa J, Climent S, Palacios JM, Mengod G (2000) Alzheimer beta-amyloid precursor proteins display specific patterns of expression during embryogenesis. *Mechanisms of development* 94:233-236.
- Saravia FE, Revsin Y, Gonzalez Deniselle MC, Gonzalez SL, Roig P, Lima A, Homo-Delarche F, De Nicola AF (2002) Increased astrocyte reactivity in the hippocampus of murine models of type 1 diabetes: the nonobese diabetic (NOD) and streptozotocin-treated mice. *Brain research* 957:345-353.
- Sarkar R, Mucci M, Addya S, Tetreault R, Bellinger DA, Nichols TC, Kazanian HH, Jr. (2006) Long-term efficacy of adeno-associated virus serotypes 8 and 9 in hemophilia A dogs and mice. *Human gene therapy* 17:427-439.
- Sarkar S, Fekete C, Legradi G, Lechan RM (2003) Glucagon like peptide-1 (7-36) amide (GLP-1) nerve terminals densely innervate corticotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain research* 985:163-168.
- Sasaoka T, Ishiki M, Sawa T, Ishihara H, Takata Y, Imamura T, Usui I, Olefsky JM, Kobayashi M (1996) Comparison of the insulin and insulin-like growth factor 1 mitogenic intracellular signaling pathways. *Endocrinology* 137:4427-4434.
- Satpute-Krishnan P, DeGiorgis JA, Bearer EL (2003) Fast anterograde transport of herpes simplex virus: role for the amyloid precursor protein of Alzheimer's disease. *Aging cell* 2:305-318.
- Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ, et al. (1993) Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43:1467-1472.
- Sauter A, Goldstein M, Engel J, Ueta K (1983) Effect of insulin on central catecholamines. *Brain research* 260:330-333.
- Schafer M, Erdo SL (1991) Development of glutamate neurotoxicity in cortical cultures: induction of vulnerability by insulin. *Brain research Developmental brain research* 62:293-296.
- Schechter R, Whitmire J, Beju D, Jackson KW, Harlow R, Gavin JR, 3rd (1995) An immunohistochemical and in situ hybridization study of insulin-like growth factor I within fetal neuron cell cultures. *Brain research* 670:1-13.
- Schechter R, Whitmire J, Holtzclaw L, George M, Harlow R, Devaskar SU (1992) Developmental regulation of insulin in the mammalian central nervous system. *Brain research* 582:27-37.
- Schechter R, Yanovitch T, Abboud M, Johnson G, 3rd, Gaskins J (1998) Effects of brain endogenous insulin on neurofilament and MAPK in fetal rat neuron cell cultures. *Brain research* 808:270-278.
- Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, Orr HT, Anderson L, Nemens E, White JA, Bonnycastle L, Weber JL, Alonso ME, et al. (1992) Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* 258:668-671.
- Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandeventer C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P (1999) Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400:173-177.

- Schreiber S, Kampgen E, Wagner E, Pirkhammer D, Trcka J, Korschan H, Lindemann A, Dorffner R, Kittler H, Kasteliz F, Kupcu Z, Sinski A, Zatloukal K, Buschle M, Schmidt W, Birnstiel M, Kempe RE, Voigt T, Weber HA, Pehamberger H, Mertelsmann R, Brocker EB, Wolff K, Stingl G (1999) Immunotherapy of metastatic malignant melanoma by a vaccine consisting of autologous interleukin 2-transfected cancer cells: outcome of a phase I study. *Human gene therapy* 10:983-993.
- Schrijvers EM, Witteman JC, Sijbrands EJ, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM (2010) Insulin metabolism and the risk of Alzheimer disease: the Rotterdam Study. *Neurology* 75:1982-1987.
- Schubert M, Brazil DP, Burks DJ, Kushner JA, Ye J, Flint CL, Farhang-Fallah J, Dikkes P, Warot XM, Rio C, Corfas G, White MF (2003) Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:7084-7092.
- Schubert M, Gautam D, Surjo D, Ueki K, Baudler S, Schubert D, Kondo T, Alber J, Galldiks N, Kustermann E, Arndt S, Jacobs AH, Krone W, Kahn CR, Bruning JC (2004) Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:3100-3105.
- Schultz C, Hubbard GB, Rub U, Braak E, Braak H (2000) Age-related progression of tau pathology in brains of baboons. *Neurobiology of aging* 21:905-912.
- Schumacher R, Mosthaf L, Schlessinger J, Brandenburg D, Ullrich A (1991) Insulin and insulin-like growth factor-1 binding specificity is determined by distinct regions of their cognate receptors. *The Journal of biological chemistry* 266:19288-19295.
- Schwartz MW, Bergman RN, Kahn SE, Taborsky GJ, Jr., Fisher LD, Sipols AJ, Woods SC, Steil GM, Porte D, Jr. (1991) Evidence for entry of plasma insulin into cerebrospinal fluid through an intermediate compartment in dogs. Quantitative aspects and implications for transport. *The Journal of clinical investigation* 88:1272-1281.
- Schwartz MW, Figlewicz DF, Kahn SE, Baskin DG, Greenwood MR, Porte D, Jr. (1990) Insulin binding to brain capillaries is reduced in genetically obese, hyperinsulinemic Zucker rats. *Peptides* 11:467-472.
- Seaquist ER, Damberg GS, Tkac I, Gruetter R (2001) The effect of insulin on in vivo cerebral glucose concentrations and rates of glucose transport/metabolism in humans. *Diabetes* 50:2203-2209.
- Selkoe DJ (2000) Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Annals of the New York Academy of Sciences* 924:17-25.
- Sen D, Gadkari RA, Sudha G, Gabriel N, Kumar YS, Selot R, Samuel R, Rajalingam S, Ramya V, Nair SC, Srinivasan N, Srivastava A, Jayandharan GR (2013) Targeted modifications in adeno-associated virus serotype 8 capsid improves its hepatic gene transfer efficiency in vivo. *Human gene therapy methods* 24:104-116.
- Sergeant N, Delacourte A, Buee L (2005) Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochimica et biophysica acta* 1739:179-197.
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HA, Haines JL, Pericak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375:754-760.
- Shibata M, Yamada S, Kumar SR, Calero M, Bading J, Frangione B, Holtzman DM, Miller CA, Strickland DK, Ghiso J, Zlokovic BV (2000) Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *The Journal of clinical investigation* 106:1489-1499.
- Shu S, Li X, Yang Y, Zhang Y, Li T, Liang C, Wan J (2011) Inhibitory effect of siRNA targeting IGF-1R on endometrial carcinoma. *International immunopharmacology* 11:244-249.
- Sims NR, Bowen DM, Smith CC, Flack RH, Davison AN, Snowden JS, Neary D (1980) Glucose metabolism and acetylcholine synthesis in relation to neuronal activity in Alzheimer's disease. *Lancet* 1:333-336.
- Singh P, Jain A, Kaur G (2004) Impact of hypoglycemia and diabetes on CNS: correlation of mitochondrial oxidative stress with DNA damage. *Molecular and cellular biochemistry* 260:153-159.
- Sisodia SS (1992) Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:6075-6079.
- Sisodia SS, Koo EH, Beyreuther K, Unterbeck A, Price DL (1990) Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science* 248:492-495.
- Siwak CT, Gruet P, Woehrl F, Muggenburg BA, Murphey HL, Milgram NW (2000) Comparison of the effects of adrafinil, propentofylline, and nicergoline on behavior in aged dogs. *American journal of veterinary research* 61:1410-1414.
- Siwak CT, Tapp PD, Head E, Zicker SC, Murphey HL, Muggenburg BA, Ikeda-Douglas CJ, Cotman CW, Milgram NW (2005) Chronic antioxidant and mitochondrial cofactor administration improves discrimination learning in aged but not young dogs. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 29:461-469.
- Siwak CT, Tapp PD, Milgram NW (2001) Effect of age and level of cognitive function on spontaneous and exploratory behaviors in the beagle dog. *Learn Mem* 8:317-325.
- Skeberdis VA, Lan J, Zheng X, Zukin RS, Bennett MV (2001) Insulin promotes rapid delivery of N-methyl-D- aspartate receptors to the cell surface by exocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:3561-3566.
- Skoglund G, Hussain MA, Holz GG (2000) Glucagon-like peptide 1 stimulates insulin gene promoter activity by protein kinase A-independent activation of the rat insulin I gene cAMP response element. *Diabetes* 49:1156-1164.
- Sladky R, Hoflich A, Kublbock M, Kraus C, Baldinger P, Moser E, Lanzenberger R, Windischberger C (2015) Disrupted effective connectivity between the amygdala and orbitofrontal cortex in social anxiety disorder during emotion discrimination revealed by dynamic causal modeling for fMRI. *Cereb Cortex* 25:895-903.
- Sola C, Garcia-Ladona FJ, Sarasa M, Mengod G, Probst A, Palacios G, Palacios JM (1993) Beta APP gene expression is increased in the rat brain after motor neuron axotomy. *The European journal of neuroscience* 5:795-808.

- Sondhi D, Hackett NR, Peterson DA, Stratton J, Baad M, Travis KM, Wilson JM, Crystal RG (2007) Enhanced survival of the LINCL mouse following CLN2 gene transfer using the rh.10 rhesus macaque-derived adeno-associated virus vector. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 15:481-491.
- Soos MA, Field CE, Siddle K (1993) Purified hybrid insulin/insulin-like growth factor-I receptors bind insulin-like growth factor-I, but not insulin, with high affinity. *The Biochemical journal* 290 (Pt 2):419-426.
- Soos MA, Whittaker J, Lammers R, Ullrich A, Siddle K (1990) Receptors for insulin and insulin-like growth factor-I can form hybrid dimers. Characterisation of hybrid receptors in transfected cells. *The Biochemical journal* 270:383-390.
- Sosa L, Dupraz S, Laurino L, Bollati F, Bisbal M, Caceres A, Pfenninger KH, Quiroga S (2006) IGF-1 receptor is essential for the establishment of hippocampal neuronal polarity. *Nature neuroscience* 9:993-995.
- Soutar MP, Kim WY, Williamson R, Pegg M, Hastie CJ, McLauchlan H, Snider WD, Gordon-Weeks PR, Sutherland C (2010) Evidence that glycogen synthase kinase-3 isoforms have distinct substrate preference in the brain. *Journal of neurochemistry* 115:974-983.
- Sparks DL, Schreurs BG (2003) Trace amounts of copper in water induce beta-amyloid plaques and learning deficits in a rabbit model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:11065-11069.
- Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, Iwatsubo T, Jack CR, Jr., Kaye J, Montine TJ, Park DC, Reiman EM, Rowe CC, Siemers E, Stern Y, Yaffe K, Carrillo MC, Thies B, Morrison-Bogorad M, Wagster MV, Phelps CH (2011) Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 7:280-292.
- Srivastava A, Lusby EW, Berns KI (1983) Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *Journal of virology* 45:555-564.
- Stanek LM, Sardi SP, Mastis B, Richards AR, Treleaven CM, Taksir T, Misra K, Cheng SH, Shihabuddin LS (2014) Silencing mutant huntingtin by adeno-associated virus-mediated RNA interference ameliorates disease manifestations in the YAC128 mouse model of Huntington's disease. *Human gene therapy* 25:461-474.
- Steele RJ, Morris RG (1999) Delay-dependent impairment of a matching-to-place task with chronic and intrahippocampal infusion of the NMDA-antagonist D-AP5. *Hippocampus* 9:118-136.
- Steen E, Terry BM, Rivera EJ, Cannon JL, Neely TR, Tavares R, Xu XJ, Wands JR, de la Monte SM (2005) Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 7:63-80.
- Sterman DH, Treat J, Litzky LA, Amin KM, Coonrod L, Molnar-Kimber K, Recio A, Knox L, Wilson JM, Albelda SM, Kaiser LR (1998) Adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy in patients with localized malignancy: results of a phase I clinical trial in malignant mesothelioma. *Human gene therapy* 9:1083-1092.
- Sterniczuk R, Antle MC, Laferla FM, Dyck RH (2010a) Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: part 2. Behavioral and cognitive changes. *Brain research* 1348:149-155.
- Sterniczuk R, Dyck RH, Laferla FM, Antle MC (2010b) Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: part 1. Circadian changes. *Brain research* 1348:139-148.
- Stevens LM, Brown RE (2015) Reference and working memory deficits in the 3xTg-AD mouse between 2 and 15-months of age: A cross-sectional study. *Behavioural brain research* 278:496-505.
- Stewart WF, Kawas C, Corrada M, Metter EJ (1997) Risk of Alzheimer's disease and duration of NSAID use. *Neurology* 48:626-632.
- Stieger K, Colle MA, Dubreil L, Mendes-Madeira A, Weber M, Le Meur G, Deschamps JY, Provost N, Nivard D, Cherel Y, Moullier P, Rolling F (2008) Subretinal delivery of recombinant AAV serotype 8 vector in dogs results in gene transfer to neurons in the brain. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 16:916-923.
- Stoffers DA, Kieffer TJ, Hussain MA, Drucker DJ, Bonner-Weir S, Habener JF, Egan JM (2000) Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes* 49:741-748.
- Strassnig M, Ganguli M (2005) About a peculiar disease of the cerebral cortex: Alzheimer's original case revisited. *Psychiatry (Edgmont)* 2:30-33.
- Straus SE, Sebring ED, Rose JA (1976) Concatemers of alternating plus and minus strands are intermediates in adenovirus-associated virus DNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73:742-746.
- Street JS, Clark WS, Gannon KS, Cummings JL, Bymaster FP, Tamura RN, Mitan SJ, Kadam DL, Sanger TM, Feldman PD, Tollefson GD, Breier A (2000) Olanzapine treatment of psychotic and behavioral symptoms in patients with Alzheimer disease in nursing care facilities: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. The HGEU Study Group. *Archives of general psychiatry* 57:968-976.
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD (1993a) Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:1977-1981.
- Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, Dong LM, Salvesen GS, Pericak-Vance M, Schmechel D, Saunders AM, Goldgaber D, Roses AD (1993b) Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:8098-8102.
- Strubbe JH, Mein CG (1977) Increased feeding in response to bilateral injection of insulin antibodies in the VMH. *Physiology & behavior* 19:309-313.
- Suh HS, Zhao ML, Derico L, Choi N, Lee SC (2013) Insulin-like growth factor 1 and 2 (IGF1, IGF2) expression in human microglia: differential regulation by inflammatory mediators. *Journal of neuroinflammation* 10:37.

- Swisher SG, Roth JA, Nemunaitis J, Lawrence DD, Kemp BL, Carrasco CH, Connors DG, El-Naggar AK, Fossella F, Glisson BS, Hong WK, Khuri FR, Kurie JM, Lee JJ, Lee JS, Mack M, Merritt JA, Nguyen DM, Nesbitt JC, Perez-Soler R, Pisters KM, Putnam JB, Jr., Richli WR, Savin M, Schrupp DS, Shin DM, Shulkin A, Walsh GL, Wait J, Weill D, Waugh MK (1999) Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 91:763-771.
- Szybalska EH, Szybalski W (1962) Genetics of human cell line. IV. DNA-mediated heritable transformation of a biochemical trait. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 48:2026-2034.

T

- Tabin CJ, Hoffmann JW, Goff SP, Weinberg RA (1982) Adaptation of a retrovirus as a eucaryotic vector transmitting the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Molecular and cellular biology* 2:426-436.
- Taguchi A, Wartschow LM, White MF (2007) Brain IRS2 signaling coordinates life span and nutrient homeostasis. *Science* 317:369-372.
- Talbot K, Wang HY, Kazi H, Han LY, Bakshi KP, Stucky A, Fuino RL, Kawaguchi KR, Samoyedny AJ, Wilson RS, Arvanitakis Z, Schneider JA, Wolf BA, Bennett DA, Trojanowski JQ, Arnold SE (2012) Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *The Journal of clinical investigation* 122:1316-1338.
- Tamaki C, Ohtsuki S, Terasaki T (2007) Insulin facilitates the hepatic clearance of plasma amyloid beta-peptide (1-40) by intracellular translocation of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) to the plasma membrane in hepatocytes. *Molecular pharmacology* 72:850-855.
- Tanzi RE, Moir RD, Wagner SL (2004) Clearance of Alzheimer's Aβ peptide: the many roads to perdition. *Neuron* 43:605-608.
- Tapp PD, Siwak CT, Estrada J, Holowachuk D, Milgram NW (2003) Effects of age on measures of complex working memory span in the beagle dog (*Canis familiaris*) using two versions of a spatial list learning paradigm. *Learn Mem* 10:148-160.
- Tardieu M, Zerah M, Husson B, de Bournonville S, Deiva K, Adamsbaum C, Vincent F, Hocquemiller M, Broissand C, Furlan V, Ballabio A, Fraldi A, Crystal RG, Baugnon T, Roujeau T, Heard JM, Danos O (2014) Intracerebral administration of adeno-associated viral vector serotype rh.10 carrying human SGSH and SUMF1 cDNAs in children with mucopolysaccharidosis type IIIA disease: results of a phase I/II trial. *Human gene therapy* 25:506-516.
- Tariot PN, Farlow MR, Grossberg GT, Graham SM, McDonald S, Gergel I (2004) Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving donepezil: a randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 291:317-324.
- Tascon RE, Colston MJ, Ragno S, Stavropoulos E, Gregory D, Lowrie DB (1996) Vaccination against tuberculosis by DNA injection. *Nature medicine* 2:888-892.
- Telzer EH, Mogg K, Bradley BP, Mai X, Ernst M, Pine DS, Monk CS (2008) Relationship between trait anxiety, prefrontal cortex, and attention bias to angry faces in children and adolescents. *Biological psychology* 79:216-222.
- Terheggen HG, Lowenthal A, Lavinha F, Colombo JP, Rogers S (1975) Unsuccessful trial of gene replacement in arginase deficiency. *Zeitschrift für Kinderheilkunde* 119:1-3.
- Terry AV, Jr., Buccafusco JJ (2003) The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 306:821-827.
- Thakker DR, Weatherspoon MR, Harrison J, Keene TE, Lane DS, Kaemmerer WF, Stewart GR, Shafer LL (2009) Intracerebroventricular amyloid-beta antibodies reduce cerebral amyloid angiopathy and associated micro-hemorrhages in aged Tg2576 mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:4501-4506.
- Thal DR, Rub U, Orantes M, Braak H (2002) Phases of Aβ deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* 58:1791-1800.
- Toromanoff A, Adjali O, Larcher T, Hill M, Guigand L, Chenuaud P, Deschamps JY, Gauthier O, Blancho G, Vanhove B, Rolling F, Chérel Y, Moullier P, Anegón I, Le Guiner C (2010) Lack of immunotoxicity after regional intravenous (RI) delivery of rAAV to nonhuman primate skeletal muscle. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 18:151-160.
- Toromanoff A, Chérel Y, Guilbaud M, Penaud-Budloo M, Snyder RO, Haskins ME, Deschamps JY, Guigand L, Podevin G, Arruda VR, High KA, Stedman HH, Rolling F, Anegón I, Moullier P, Le Guiner C (2008) Safety and efficacy of regional intravenous (r.i.) versus intramuscular (i.m.) delivery of rAAV1 and rAAV8 to nonhuman primate skeletal muscle. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 16:1291-1299.
- Torres-Lista V, Parrado-Fernandez C, Alvarez-Monton I, Frontinan-Rubio J, Duran-Prado M, Peinado JR, Johansson B, Alcain FJ, Gimenez-Llort L (2014) Neophobia, NQO1 and SIRT1 as premorbid and prodromal indicators of AD in 3xTg-AD mice. *Behavioural brain research* 271:140-146.
- Tourrel C, Bailbe D, Lacorne M, Meile MJ, Kergoat M, Portha B (2002) Persistent improvement of type 2 diabetes in the Goto-Kakizaki rat model by expansion of the beta-cell mass during the prediabetic period with glucagon-like peptide-1 or exendin-4. *Diabetes* 51:1443-1452.
- Townsend M, Mehta T, Selkoe DJ (2007) Soluble Aβ inhibits specific signal transduction cascades common to the insulin receptor pathway. *The Journal of biological chemistry* 282:33305-33312.
- Trueba-Saiz A, Cavada C, Fernandez AM, Leon T, Gonzalez DA, Fortea Ormaechea J, Lleo A, Del Ser T, Nunez A, Torres-Aleman I (2013) Loss of serum IGF-I input to the brain as an early biomarker of disease onset in Alzheimer mice. *Translational psychiatry* 3:e330.

Tuszynski MH, Thal L, Pay M, Salmon DP, U HS, Bakay R, Patel P, Blesch A, Vahlsing HL, Ho G, Tong G, Potkin SG, Fallon J, Hansen L, Mufson EJ, Kordower JH, Gall C, Conner J (2005) A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Nature medicine* 11:551-555.

U

- Ugen KE, Nyland SB, Boyer JD, Vidal C, Lera L, Rasheid S, Chattergoon M, Bagarazzi ML, Ciccarelli R, Higgins T, Baine Y, Ginsberg R, Macgregor RR, Weiner DB (1998) DNA vaccination with HIV-1 expressing constructs elicits immune responses in humans. *Vaccine* 16:1818-1821.
- Ullrich A, Bell JR, Chen EY, Herrera R, Petruzzelli LM, Dull TJ, Gray A, Coussens L, Liao YC, Tsubokawa M, et al. (1985) Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* 313:756-761.
- Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, Henzel W, Le Bon T, Kathuria S, Chen E, et al. (1986) Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *The EMBO journal* 5:2503-2512.
- Urabe M, Ding C, Kotin RM (2002) Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Human gene therapy* 13:1935-1943.

V

- Valente T, Gella A, Fernandez-Busquets X, Unzeta M, Durany N (2010) Immunohistochemical analysis of human brain suggests pathological synergism of Alzheimer's disease and diabetes mellitus. *Neurobiology of disease* 37:67-76.
- van Heemst D, Beekman M, Mooijaart SP, Heijmans BT, Brandt BW, Zwaan BJ, Slagboom PE, Westendorp RG (2005) Reduced insulin/IGF-1 signalling and human longevity. *Aging cell* 4:79-85.
- Vandenbergh LH, Bell P, Maguire AM, Cearley CN, Xiao R, Calcedo R, Wang L, Castle MJ, Maguire AC, Grant R, Wolfe JH, Wilson JM, Bennett J (2011) Dosage thresholds for AAV2 and AAV8 photoreceptor gene therapy in monkey. *Science translational medicine* 3:88ra54.
- Vanhanen M, Koivisto K, Kuusisto J, Mykkanen L, Helkala EL, Hanninen T, Riekkinen P, Sr., Soininen H, Laakso M (1998) Cognitive function in an elderly population with persistent impaired glucose tolerance. *Diabetes care* 21:398-402.
- Viltsboll T, Zdravkovic M, Le-Thi T, Krarup T, Schmitz O, Courreges JP, Verhoeven R, Buganova I, Madsbad S (2007) Liraglutide, a long-acting human glucagon-like peptide-1 analog, given as monotherapy significantly improves glycemic control and lowers body weight without risk of hypoglycemia in patients with type 2 diabetes. *Diabetes care* 30:1608-1610.
- Vincent AM, McLean LL, Backus C, Feldman EL (2005) Short-term hyperglycemia produces oxidative damage and apoptosis in neurons. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19:638-640.
- von der Leyen HE, Braun-Dullaeus R, Mann MJ, Zhang L, Niebauer J, Dzau VJ (1999) A pressure-mediated nonviral method for efficient arterial gene and oligonucleotide transfer. *Human gene therapy* 10:2355-2364.

W

- Wade N (1981) Gene therapy caught in more entanglements. *Science* 212:24-25.
- Wallum BJ, Taborsky GJ, Jr., Porte D, Jr., Figlewicz DP, Jacobson L, Beard JC, Ward WK, Dorsa D (1987) Cerebrospinal fluid insulin levels increase during intravenous insulin infusions in man. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 64:190-194.
- Wan Q, Xiong ZG, Man HY, Ackerley CA, Braunton J, Lu WY, Becker LE, MacDonald JF, Wang YT (1997) Recruitment of functional GABA(A) receptors to postsynaptic domains by insulin. *Nature* 388:686-690.
- Wang L, Calcedo R, Nichols TC, Bellinger DA, Dillow A, Verma IM, Wilson JM (2005a) Sustained correction of disease in naive and AAV2-pretreated hemophilia B dogs: AAV2/8-mediated, liver-directed gene therapy. *Blood* 105:3079-3086.
- Wang P, Yang G, Mosier DR, Chang P, Zaidi T, Gong YD, Zhao NM, Dominguez B, Lee KF, Gan WB, Zheng H (2005b) Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-Like protein 2. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:1219-1225.
- Wang X, Zheng W, Xie JW, Wang T, Wang SL, Teng WP, Wang ZY (2010) Insulin deficiency exacerbates cerebral amyloidosis and behavioral deficits in an Alzheimer transgenic mouse model. *Molecular neurodegeneration* 5:46.
- Wang YH, Wang ZX, Qiu Y, Xiong J, Chen YX, Miao DS, De W (2009) Lentivirus-mediated RNAi knockdown of insulin-like growth factor-1 receptor inhibits growth, reduces invasion, and enhances radiosensitivity in human osteosarcoma cells. *Molecular and cellular biochemistry* 327:257-266.
- Wang YT, Linden DJ (2000) Expression of cerebellar long-term depression requires postsynaptic clathrin-mediated endocytosis. *Neuron* 25:635-647.

- Wang Z, Kuhr CS, Allen JM, Blankinship M, Gregorevic P, Chamberlain JS, Tapscott SJ, Storb R (2007) Sustained AAV-mediated dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy with a brief course of immunosuppression. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 15:1160-1166.
- Weggen S, Rogers M, Eriksen J (2007) NSAIDs: small molecules for prevention of Alzheimer's disease or precursors for future drug development? *Trends in pharmacological sciences* 28:536-543.
- Wegiel J, Wisniewski HM, Dziewiatkowski J, Tarnawski M, Dziewiatkowska A, Morys J, Soltysiak Z, Kim KS (1996) Subpopulation of dogs with severe brain parenchymal beta amyloidosis distinguished with cluster analysis. *Brain research* 728:20-26.
- Wegiel J, Wisniewski HM, Soltysiak Z (1998) Region- and cell-type-specific pattern of tau phosphorylation in dog brain. *Brain research* 802:259-266.
- Wei CM, Gibson M, Spear PG, Scolnick EM (1981) Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene of Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1. *Journal of virology* 39:935-944.
- Westermarck P, Wilander E (1978) The influence of amyloid deposits on the islet volume in maturity onset diabetes mellitus. *Diabetologia* 15:417-421.
- White JD, Thesier DM, Swain JB, Katz MG, Tomasulo C, Henderson A, Wang L, Yarnall C, Fargnoli A, Sumaroka M, Isidro A, Petrov M, Holt D, Nolen-Walston R, Koch WJ, Stedman HH, Rabinowitz J, Bridges CR (2011) Myocardial gene delivery using molecular cardiac surgery with recombinant adeno-associated virus vectors in vivo. *Gene therapy* 18:546-552.
- Whitehouse PJ, Price DL, Clark AW, Coyle JT, DeLong MR (1981) Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Annals of neurology* 10:122-126.
- Wigler M, Pellicer A, Silverstein S, Axel R (1978) Biochemical transfer of single-copy eucaryotic genes using total cellular DNA as donor. *Cell* 14:725-731.
- Winblad B, Kilander L, Eriksson S, Minthon L, Batsman S, Wetterholm AL, Jansson-Blixt C, Haglund A (2006) Donepezil in patients with severe Alzheimer's disease: double-blind, parallel-group, placebo-controlled study. *Lancet* 367:1057-1065.
- Wisniewski T, Castano EM, Golabek A, Vogel T, Frangione B (1994) Acceleration of Alzheimer's fibril formation by apolipoprotein E in vitro. *The American journal of pathology* 145:1030-1035.
- Wisniewski T, Frangione B (1992) Apolipoprotein E: a pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid. *Neuroscience letters* 135:235-238.
- Wisniewski T, Lalowski M, Bobik M, Russell M, Strosznajder J, Frangione B (1996) Amyloid beta 1-42 deposits do not lead to Alzheimer's neuritic plaques in aged dogs. *The Biochemical journal* 313 (Pt 2):575-580.
- Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF (1998) Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391:900-904.
- Wobus CE, Hugle-Dorr B, Girod A, Petersen G, Hallek M, Kleinschmidt JA (2000) Monoclonal antibodies against the adeno-associated virus type 2 (AAV-2) capsid: epitope mapping and identification of capsid domains involved in AAV-2-cell interaction and neutralization of AAV-2 infection. *Journal of virology* 74:9281-9293.
- Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL (1990) Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247:1465-1468.
- Wu Z, Asokan A, Samulski RJ (2006) Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 14:316-327.

X

- Xiao X, Li J, Samulski RJ (1998) Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *Journal of virology* 72:2224-2232.
- Xie L, Helmerhorst E, Taddei K, Plewright B, Van Bronswijk W, Martins R (2002) Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:RC221.
- Xu G, Stoffers DA, Habener JF, Bonner-Weir S (1999) Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes* 48:2270-2276.
- Xu J, Ma C, Bass C, Terwilliger EF (2005) A combination of mutations enhances the neurotropism of AAV-2. *Virology* 341:203-214.

Y

- Yamazaki T, Koo EH, Selkoe DJ (1997) Cell surface amyloid beta-protein precursor colocalizes with beta 1 integrins at substrate contact sites in neural cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:1004-1010.
- Yew NS, Wang KX, Przybylska M, Bagley RG, Stedman M, Marshall J, Scheule RK, Cheng SH (1999) Contribution of plasmid DNA to inflammation in the lung after administration of cationic lipid:pDNA complexes. *Human gene therapy* 10:223-234.
- Yip CC, Moule ML, Yeung CW (1980) Characterization of insulin receptor subunits in brain and other tissues by photoaffinity labeling. *Biochemical and biophysical research communications* 96:1671-1678.
- Young WS, 3rd (1986) Periventricular hypothalamic cells in the rat brain contain insulin mRNA. *Neuropeptides* 8:93-97.

Z

- Zabner J, Couture LA, Gregory RJ, Graham SM, Smith AE, Welsh MJ (1993) Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis. *Cell* 75:207-216.
- Zahniser NR, Goens MB, Hanaway PJ, Vinyach JV (1984) Characterization and regulation of insulin receptors in rat brain. *Journal of neurochemistry* 42:1354-1362.
- Zander M, Madsbad S, Madsen JL, Holst JJ (2002) Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. *Lancet* 359:824-830.
- Zandi PP, Carlson MC, Plassman BL, Welsh-Bohmer KA, Mayer LS, Steffens DC, Breitner JC (2002) Hormone replacement therapy and incidence of Alzheimer disease in older women: the Cache County Study. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 288:2123-2129.
- Zhang B, Tang XC, Zhang HY (2013) Alternations of central insulin-like growth factor-1 sensitivity in APP/PS1 transgenic mice and neuronal models. *Journal of neuroscience research* 91:717-725.
- Zhang G, Gao X, Song YK, Vollmer R, Stolz DB, Gasiorowski JZ, Dean DA, Liu D (2004) Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery. *Gene therapy* 11:675-682.
- Zhang G, Vargo D, Budker V, Armstrong N, Knechtle S, Wolff JA (1997) Expression of naked plasmid DNA injected into the afferent and efferent vessels of rodent and dog livers. *Human gene therapy* 8:1763-1772.
- Zhang H, Yang B, Mu X, Ahmed SS, Su Q, He R, Wang H, Mueller C, Sena-Esteves M, Brown R, Xu Z, Gao G (2011a) Several rAAV vectors efficiently cross the blood-brain barrier and transduce neurons and astrocytes in the neonatal mouse central nervous system. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 19:1440-1448.
- Zhang HG, Wang YM, Xie JF, Liang X, Hsu HC, Zhang X, Douglas J, Curiel DT, Mountz JD (2001) Recombinant adenovirus expressing adeno-associated virus cap and rep proteins supports production of high-titer recombinant adeno-associated virus. *Gene therapy* 8:704-712.
- Zhang WN, Bast T, Feldon J (2002) Effects of hippocampal N-methyl-D-aspartate infusion on locomotor activity and prepulse inhibition: differences between the dorsal and ventral hippocampus. *Behavioral neuroscience* 116:72-84.
- Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H (2011b) APP processing in Alzheimer's disease. *Molecular brain* 4:3.
- Zhao W, Chen H, Xu H, Moore E, Meiri N, Quon MJ, Alkon DL (1999) Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. *The Journal of biological chemistry* 274:34893-34902.
- Zhao WQ, De Felice FG, Fernandez S, Chen H, Lambert MP, Quon MJ, Krafft GA, Klein WL (2008) Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22:246-260.
- Zhao WQ, Lacor PN, Chen H, Lambert MP, Quon MJ, Krafft GA, Klein WL (2009) Insulin receptor dysfunction impairs cellular clearance of neurotoxic oligomeric A β . *The Journal of biological chemistry* 284:18742-18753.
- Zhao Z, Xiang Z, Haroutunian V, Buxbaum JD, Stetka B, Pasinetti GM (2007) Insulin degrading enzyme activity selectively decreases in the hippocampal formation of cases at high risk to develop Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 28:824-830.
- Zhong L, Li B, Mah CS, Govindasamy L, Agbandje-McKenna M, Cooper M, Herzog RW, Zolotukhin I, Warrington KH, Jr., Weigel-Van Aken KA, Hobbs JA, Zolotukhin S, Muzyczka N, Srivastava A (2008) Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:7827-7832.
- Zhu D, Chen C, Purwanti YI, Du S, Lam DH, Wu C, Zeng J, Toh HC, Wang S (2014) Induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells transduced with baculovirus encoding CD40 ligand for immunogene therapy in mouse models of breast cancer. *Human gene therapy* 25:747-758.
- Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, Rabinowitz JE (2008) Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 16:1073-1080.
- Zlokovic BV (2005) Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends in neurosciences* 28:202-208.
- Zlokovic BV, Deane R, Sagare AP, Bell RD, Winkler EA (2010) Low-density lipoprotein receptor-related protein-1: a serial clearance homeostatic mechanism controlling Alzheimer's amyloid beta-peptide elimination from the brain. *Journal of neurochemistry* 115:1077-1089.