

ALTERACIONES HIPOCAMPALES Y CAMBIOS COGNITIVOS PRECEDEN AL DEPOSITO DE PLACAS AMILOIDES EN UN MODELO MURINO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER*

JUAN BEAUQUIS^{1,2}, ÁNGELES VINUESA^{1,2}, CARLOS POMILIO^{1,2}, PATRICIO PAVÍA^{1,2}, FLAVIA SARAVIA^{1,2}

¹Laboratorio de Neurobiología del Envejecimiento, Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET;

²Laboratorio de Neurobiología, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina

*Premio Eduardo Soto, Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Mar del Plata, noviembre de 2013

Resumen Existen múltiples evidencias de alteraciones neuronales y gliales en etapas avanzadas de la enfermedad de Alzheimer con abundantes depósitos cerebrales de beta amiloide, aunque hay pocos datos de cambios tempranos que podrían contribuir al desarrollo de la enfermedad. Evaluamos alteraciones morfológicas neuronales y gliales, y cambios cognitivos y emocionales tempranos en ratones transgénicos PDAPP-J20 (Tg), portadores del gen humano de APP (*amyloid precursor protein*) mutado, a los 5 meses de edad, aún sin depósitos amiloides en el hipocampo y con niveles bajos de péptidos amiloides cerebrales. Mediante inmunohistoquímica para NeuN, los Tg presentaron menor número de neuronas piramidales y granulares en el hipocampo, junto con un menor volumen de la estructura, en comparación con los controles no transgénicos. La neurogénesis se encontró afectada, evidenciada por reducido número de neuronas DCX+ en el giro dentado. En la región CA3, hubo una menor densidad de sinaptofisina sugiriendo alteraciones sinápticas entre neuronas granulares y piramidales, sin cambios en la densidad de espinas dendríticas en CA1. Utilizando microscopía confocal, observamos una disminución del número de astrocitos GFAP+ con una reducción de la complejidad celular, sugiriendo atrofia glial. Se detectó un déficit cognitivo (reconocimiento de localización novedosa de un objeto) y un aumento de la ansiedad (campo abierto) en los Tg, con aumento en los núcleos c-Fos+ en amígdala, evidenciando el papel de la emocionalidad en los inicios de la enfermedad. El estudio de las alteraciones iniciales en la enfermedad amiloide podría contribuir al desarrollo de métodos de diagnóstico temprano y de terapéutica preventiva.

Palabras clave: enfermedad de Alzheimer, ratón transgénico, hipocampo, glía, neurogénesis, memoria

Abstract *Hippocampal and cognitive alterations precede amyloid deposition in a mouse model of Alzheimer's disease.* Although there is strong evidence about neuronal and glial disturbances at advanced stages of Alzheimer's disease, less attention has been directed to early, pre-amyloid changes that could contribute to the progression of the disease. We evaluated neuronal and glial morphological changes and behavioral disturbances in PDAPP-J20 transgenic (Tg) mice, carrying mutated human APP gene (amyloid precursor protein), at 5 months of age, before brain amyloid deposition occurs. Using NeuN immunohistochemistry we found decreased numbers of pyramidal and granular neurons in the hippocampus associated with a reduction of hippocampal volume in Tg mice compared with controls. Neurogenesis was impaired, evidenced by means of DCX immunohistochemistry in the dentate gyrus. In the CA3 region we found a decreased density of synaptophysin, suggesting synaptic disturbance, but no changes were found in CA1 synaptic spine density. Using confocal microscopy we observed decreased number and cell complexity of GFAP+ astrocytes, indicating potential glial atrophy. Cognitive impairment (novel location recognition test) and increased anxiety (open field) were detected in Tg mice, associated with more c-Fos+ nuclei in the amygdala, possibly indicating a role for emotionality in early stages of the disease. The study of early alterations in the course of amyloid pathology could contribute to the development of diagnostic and preventive strategies.

Key words: Alzheimer's disease, transgenic mice, hippocampus, glia, neurogenesis, memory

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa y la primera causa de demencia.

Cambios cognitivos y de la personalidad son los principales síntomas, mientras que sus características histopatológicas son las placas amiloides (PA), compuestas mayormente de péptidos β amiloides ($A\beta$), y los ovillos neurofibrilares de proteína tau hiperfosforilada. Si bien no se conoce con certeza la causa de la acumulación de $A\beta$, podría deberse a un aumento en su producción, como ocurre cuando existen mutaciones en la proteína

Recibido: 19-III-2014

Aceptado: 28-V-2014

Dirección postal: Dr. Juan Beauquis, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Int. Güiraldes 2160, Pab. II, piso 4, 1428 Buenos Aires, Argentina
e-mail: juanbeauquis@gmail.com

precursora de amiloide o en las enzimas que la clivan, o a un déficit en su eliminación o degradación^{1,2}. Se han descrito en profundidad alteraciones inflamatorias y gliales que ocurren en la cercanía de los depósitos amiloides y principalmente en etapas avanzadas de la enfermedad¹. Cambios reactivos en la astrogliá así como diferentes grados de activación microglial son alteraciones comunes en muestras cerebrales *post mortem* de pacientes con EA, acompañadas de pérdida o atrofia neuronal y cambios sinápticos. En contraposición, la información disponible sobre cambios tempranos es escasa³, cuando una intervención terapéutica podría ser más efectiva. En las etapas previas al depósito de PA existen oligómeros A β solubles cuya toxicidad podría subyacer al déficit sináptico temprano que se ha descrito en modelos animales de la EA⁴. La disfunción sináptica y glial llevaría a la pérdida de neuronas y de los circuitos que ellas integran conduciendo al daño cognitivo y a la demencia. Sin embargo, existen discrepancias respecto a la pérdida de neuronas en los diferentes modelos animales de la EA^{5,6}.

Los astrocitos desempeñan múltiples funciones fisiológicas que contribuyen a la homeostasis y a la función del sistema nervioso central. En un contexto inflamatorio o neurodegenerativo, los astrocitos se vuelven reactivos, experimentan cambios morfológicos, pierden sus funciones fisiológicas y promueven el daño neuronal y la muerte celular⁷. Estos cambios no han sido observados en etapas tempranas de la EA aunque es posible que existan alteraciones sutiles que podrían integrar una primera fase patogénica. Recientemente, y en coincidencia con hallazgos en otros modelos animales⁸, describimos dos subpoblaciones de astrocitos en el hipocampo de ratones transgénicos PDAPP-J20, modelo aceptado de la EA, en una etapa en la que existe abundante depósito de PA. Por un lado, astrocitos reactivos "clásicos", con agrandamiento del soma y de sus procesos, que se encuentran asociados a PA. Por el otro, astrocitos no asociados a PA, con cambios morfológicos distintos a los clásicos⁹. Por lo expuesto, sería importante poder detectar cambios cerebrales precoces que ayuden tanto a comprender el proceso fisiopatológico involucrado en la EA como a identificar blancos terapéuticos tempranos.

Tomando como hipótesis que existen cambios celulares independientes del depósito de péptidos A β , en el presente trabajo nos propusimos estudiar poblaciones neuronales y astrogliales en una etapa temprana de la enfermedad en la que aún no hay PA en el hipocampo, en ratones transgénicos PDAPP-J20 de 5 meses de edad. Paralelamente realizamos una evaluación conductual para detectar cambios cognitivos y emocionales. Se estudiaron ratones PDAPP-J20, portadores del gen humano de APP (*amyloid precursor protein*) con las mutaciones Swe e Ind para la EA familiar, que desarrollan enfermedad amiloide y disfunción cognitiva de manera progresiva¹⁰ y que, en etapas avanzadas, presentan hiperfosforilación

de Tau¹¹. La colonia de ratones transgénicos se mantuvo mediante cruces con ratones C57BL/6J en el Bioterio del IBYME en condiciones estándar de luz-oscuridad, temperatura y humedad. El transgen se detectó mediante PCR. Los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética del IBYME y siguieron las directivas de la Guía para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio del NIH. A los 5 meses de edad los animales fueron anestesiados con ketamina y xilacina y perfundidos con NaCl 0.9% y paraformaldehído 4%. Luego de fijar por 24 horas, se obtuvieron cortes cerebrales coronales de 60 μ m en vibrátomo. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas mediante la prueba *t* de Student y, para el análisis de la conducta en la prueba de campo abierto, por estadística multivariada. Se consideró un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

Se determinaron los niveles cerebrales de péptidos A β mediante ELISA en homogenatos de cerebro, encontrando que fueron muy bajos en los Tg (A β 1-40: 0.525 ± 0.308 y A β 1-42: 1.264 ± 0.751) y no detectables en los controles. Se realizó la tinción de rojo Congo¹². Los animales Tg presentaron marca prácticamente indetectable mientras que en los NTg no se encontró marca. Se utilizaron cortes cerebrales de ratones PDAPP-J20 de 20 meses de edad como controles positivos (Fig. 1 A), encontrando una carga de placas significativamente mayor que a los 5 meses ($p < 0.01$).

Utilizando inmunohistoquímica para NeuN (Fig. 1 B) y análisis de imágenes determinamos el volumen del hipocampo y sus sub-regiones, el número de neuronas y el diámetro de las neuronas granulares. Los Tg mostraron una disminución del volumen del hipocampo de 14.3 % (9.583 ± 0.244 mm³ en NTg vs. 8.210 ± 0.405 mm³ en Tg; $p < 0.01$). También, el volumen de CA1 de los Tg mostró una reducción del 27% (0.365 ± 0.028 mm³ en NTg vs. 0.266 ± 0.028 mm³ en Tg; $p < 0.05$) mientras que el volumen de la GCL disminuyó 28% (0.519 ± 0.021 mm³ en NTg vs. 0.374 ± 0.034 mm³ en Tg; $p < 0.01$). La reducción del volumen se acompañó de un menor número de neuronas en los Tg en CA1 ($62\,740 \pm 5369$ células/CA1 en NTg vs. $46\,200 \pm 5247$ en Tg; $p < 0.05$) y en GCL ($131\,700 \pm 5583$ células/GCL en NTg vs. $105\,700 \pm 12\,290$ en Tg; $p < 0.05$). Se observó una disminución en el diámetro de las neuronas granulares en ratones Tg (7.882 ± 0.200 μ m en NTg y 7.335 ± 0.120 en Tg; $p < 0.05$).

Se evaluó la neurogénesis adulta mediante la cuantificación del número de neuronas *doublecortin+* DCX (Fig. 1C), en el giro dentado y su grado de maduración. El número de neuronas DCX+ en el giro dentado fue menor en los ratones PDAPP que en los controles ($p < 0.001$). Dividimos la población de células DCX+ entre una población madura y otra inmadura por características morfológicas y encontramos que en los animales Tg existía una disminución mayor de las células inmaduras, posiblemente indicando una alteración en la proliferación.

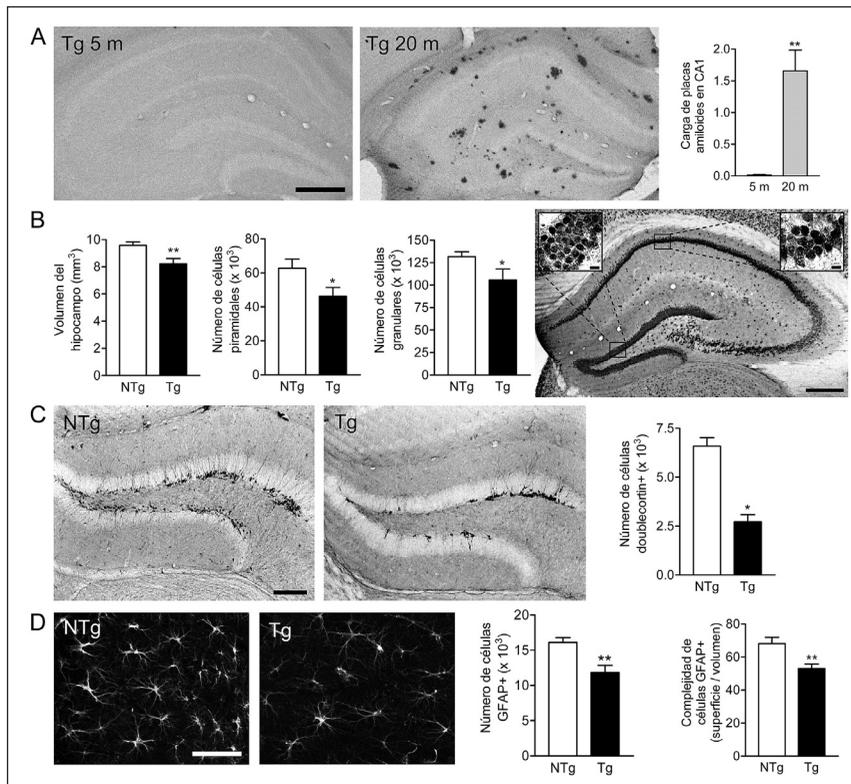


Fig. 1.– A. Tinción de rojo Congo en el hipocampo de ratones transgénicos (Tg) de 5 meses y 20 meses de edad (barra 300 μ m). A los 5 meses no se encontraron depósitos amiloides. A los 20 meses se encontraron abundantes placas amiloides y un aumento en la carga amiloide medida en CA1. B. Inmunohistoquímica para NeuN (barra 300 μ m) y cuantificación del volumen del hipocampo y el número de neuronas granulares (inserto izquierdo en la microfotografía, barra 10 μ m) y piramidales (inserto derecho). C. Microfotografías de la inmunohistoquímica para *doublecortin* (DCX) en el giro dentado (barra 150 μ m) y cuantificación del número de neuronas DCX+ en el giro dentado. D. Imagen promediada a partir de múltiples planos de confocal de la inmunofluorescencia para GFAP (barra 50 μ m) y análisis del número y complejidad de los astrocitos GFAP+. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

Se analizó la densidad óptica de sinaptofisina en el *stratum lucidum* de CA3 para detectar densidades presinápticas. Al analizar la inmunorreactividad para sinaptofisina, encontramos que los Tg presentaron una menor densidad óptica que los controles ($p < 0.05$). Mediante la tinción de Golgi se determinó la densidad de espinas dendríticas en piramidales de CA1 pero no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (0.922 ± 0.031 en NTg vs. 0.937 ± 0.056 en Tg).

Por microscopía confocal se determinó el número, el volumen y la superficie celular de los astrocitos positivos para GFAP en el *stratum radiatum* (*str rad*) de CA1 (Fig. 1D). El número de astrocitos GFAP+ se encontró disminuido en los animales Tg en ausencia de placas amiloides (16120 ± 671 GFAP+ células/*str rad* CA1 en NTg vs. 11820 ± 1033 en Tg; $p < 0.01$). La complejidad (calculada como índice superficie/volumen de cada célula) fue menor en los animales Tg (68.19 ± 3.80 vs. 53.01 ± 2.72 en NTg y Tg respectivamente; $p < 0.01$). No se encontraron cambios en superficie y volumen individualmente.

Se realizó la prueba de reconocimiento de localización novedosa (NLR) (Fig. 2 A), colocando al ratón en una caja

plástica (30 \times 30 cm) junto con dos objetos idénticos en dos esquinas adyacentes de la caja permitiendo explorar por 10 min (T1). Luego se retiró al ratón y se relocalizó uno de los dos objetos. Al cabo de 60 min se reintrodujo al ratón a la caja y se lo dejó explorar por 10 min (T2). Se cuantificó el tiempo que cada ratón exploró cada objeto en T2 y se calculó el % del tiempo que dedicó a cada objeto. Se observó que los ratones transgénicos exploraron una menor proporción del tiempo el objeto desplazado con respecto al control ($67.60 \pm 2.81\%$ en NTg y $54.18 \pm 3.26\%$ en Tg; $p < 0.01$). Los Tg no difirieron del nivel de azar (50%) para una prueba de este tipo ($p = 0.24$) mientras que los NTg sí ($p < 0.0001$).

Se realizó la prueba de campo abierto utilizando una caja de 55 \times 55 cm dividida en 5 \times 5 cuadrados y se cuantificó el número de *rearings*, cruces, el tiempo en la periferia de la caja y el tiempo de reacción (Fig. 2 B). Se calcularon variables cualitativas (actividad, defecación, reacción) y se realizó estadística multivariada para su análisis. Se determinó la función discriminante utilizando los factores *rearings*, % tiempo en la periferia y cruces. Se vio que fue negativa para los NTg (-0.51 ± 0.26) y

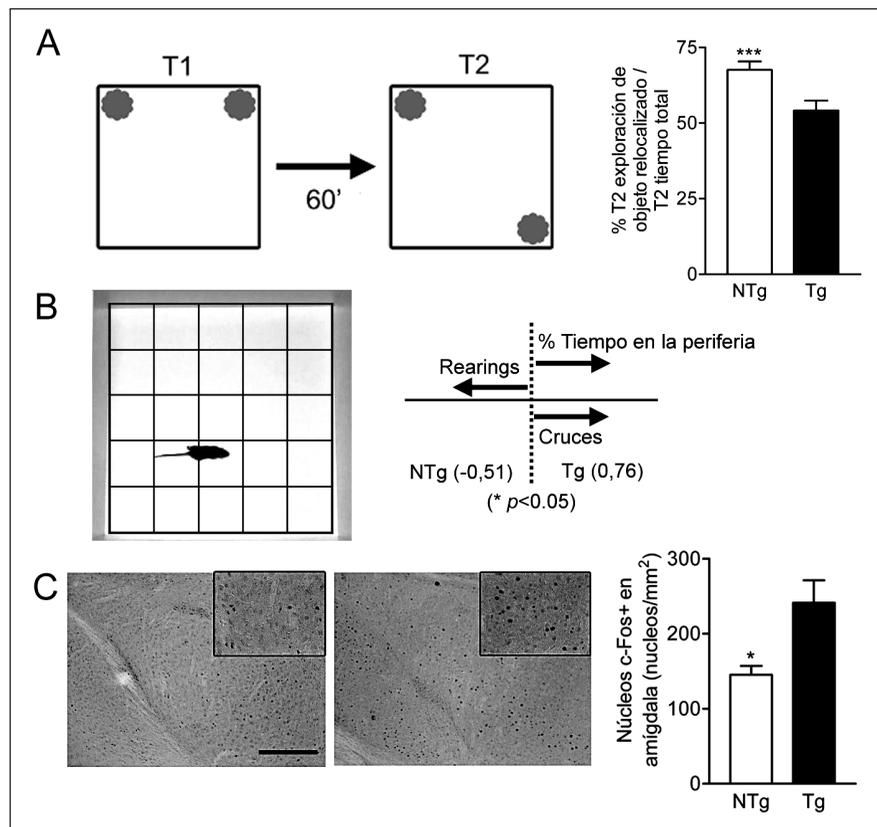


Fig. 2.— A. Protocolo de la prueba de reconocimiento de localización novedosa de un objeto. Se utilizaron T1 y T2 de 10 min con intervalo de 60 min. Se cuantificó el % de tiempo en T2 utilizado para explorar el objeto relocalizado. B. En la prueba de campo abierto (5 min) se cuantificaron los *rearrings*, los cruces y el % de tiempo en la periferia. C. Inmunohistoquímica para c-Fos en amígdala (barra 150 μ m) y cuantificación de los núcleos positivos. * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$.

positiva para los Tg (0.76 ± 0.23), difiriendo entre los grupos ($p < 0.05$). La función discriminante fue positiva al asociarse a reducción de *rearrings* y % de tiempo en la periferia y al aumento de cruces. Las variables canónicas mostraron que los transgénicos se asociaron a mayor actividad, reacción retardada y defecación ($p < 0.05$).

Se cuantificó el número de núcleos c-Fos+ en amígdala basolateral (Fig. 2 C) y se encontró un aumento en los animales transgénicos con respecto a los controles ($p < 0.01$), indicando una mayor activación neuronal, posiblemente subyaciendo al comportamiento simil-ansioso detectado en el campo abierto.

En nuestro estudio encontramos múltiples cambios neuronales y gliales en el hipocampo del ratón PDAPP-J20 en una etapa temprana de la enfermedad, cuando aún no hay PA y los niveles de péptidos amiloides cerebrales detectados por ELISA son bajos. Al no haber PA, la fuente principal del A β detectado debería ser la fracción soluble, la cual posee reconocidos efectos neurotóxicos¹³. Determinamos que la pérdida de volumen se asoció a un menor número de neuronas y a un menor diámetro celular (granulares). Algunos autores han descrito una asociación

entre la disminución del volumen neuronal hipocampal y el déficit cognitivo⁵. En el estudio de la neurogénesis mediante la detección del marcador DCX, encontramos que no solo estaba disminuido el número de neuronas jóvenes en los ratones Tg, sino que estaban afectadas principalmente las neuronas más inmaduras, sugiriendo una proliferación celular alterada e indicando que ésta podría ser otra vía afectada tempranamente. Reforzando la idea de un daño en la conectividad cerebral, encontramos una disminución del contenido de sinaptofisina en la región CA3, lo que reflejaría un daño en el circuito hipocampal. Sin embargo, no encontramos cambios en la densidad de espinas dendríticas en CA1 mediante la técnica de Golgi, lo cual podría indicar que es necesaria una mayor progresión de la enfermedad para que se evidencie el daño. La astrogliosis que acompaña el proceso neurodegenerativo ha sido descrita con anterioridad^{8, 14} aunque existe relativamente escasa evidencia de cambios gliales tempranos. Como muestran nuestros resultados, el número y la complejidad de los astrocitos GFAP+ se encontraron disminuidos en los ratones Tg incluso en una etapa temprana de la patología. Nuestro grupo está

actualmente estudiando la funcionalidad de estos astrocitos para determinar si está afectada desde el inicio de la enfermedad. Encontramos que los ratones Tg presentaron alteraciones en la memoria y un fenotipo ansioso en comparación con los controles. Si bien se han descrito múltiples alteraciones cognitivas en modelos de EA, la mayoría se han encontrado en etapas avanzadas¹⁰. La disfunción cognitiva podría asociarse con la disminución de la capacidad neurogénica y de la densidad de sinaptofisina dado el rol que este circuito cumple en el proceso de memoria espacial. Paralelamente, encontramos que existe un fenotipo ansioso que coincide con un aumento de la actividad neuronal c-Fos+ en la amígdala. Se ha sugerido que la conducta ansiosa podría ser un factor de riesgo para enfermedades asociadas al envejecimiento¹⁵.

En conclusión, en este estudio hemos encontrado alteraciones estructurales y morfológicas en el hipocampo de ratones transgénicos PDAPP-J20 en una etapa temprana de la patología en la que aún no hay PA y los péptidos solubles derivados de APP se encuentran en niveles muy bajos. Los cambios en el diámetro neuronal y en la complejidad glial podrían ser indicadores tempranos del progreso de la enfermedad. Aún resta responder la pregunta acerca de cuáles serían los fenómenos iniciadores de la enfermedad. Creemos que estos resultados podrán ayudar en la identificación de blancos terapéuticos y síntomas iniciales en la enfermedad de Alzheimer ,fundamentales para contribuir a un diagnóstico precoz y controlar su progresión.

Conflicto de intereses: El presente trabajo se realizó con el aporte económico de la ANPCYT (PICT 2011-1012) y de Fundación Roemmers. Juan Beauquis y Flavia Saravia son Investigadores del CONICET. Ángeles Vinuesa y Carlos Pomilio son becarios doctorales CONICET y Patricio Pavía es becario doctoral ANPCYT.

Bibliografía

1. Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet* 2006; 368: 387-403.
2. Leal MC, Fernández Gamba A, Morelli L, Castaño EM. Proteólisis cerebral del péptido amiloide- β : Relevancia de la enzima degradadora de insulina en la enfermedad de Alzheimer. *Medicina (B Aires)* 2009; 69: 466-72.
3. Beauquis J, Vinuesa A, Pomilio C, Pavia P, Galvan V, Saravia F. Neuronal and glial alterations, increased anxiety, and cognitive impairment before hippocampal amyloid deposition in PDAPP mice, model of Alzheimer's disease. *Hippocampus* 2014; 24: 257-69.
4. Palop JJ, Mucke L. Epilepsy and cognitive impairments in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2009; 66: 435-40.
5. Gemmell E, Bosomworth H, Allan L et al. Hippocampal neuronal atrophy and cognitive function in delayed poststroke and aging-related dementias. *Stroke* 2012; 43: 808-14.
6. Irizarry MC, Soriano F, McNamara M, et al. Abeta deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse. *J Neurosci* 1997; 17: 7053-9.
7. Steele ML, Robinson SR. Reactive astrocytes give neurons less support: implications for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2012; 33: 413-23.
8. Verkhratsky A, Sofroniew MV, Messing A, et al. Neurological diseases as primary gliopathies: A reassessment of neurocentrism. *ASN Neuro* 2012 Apr 5; 4(3). pii: e00082.
9. Beauquis J, Pavia P, Pomilio C, et al. Environmental enrichment prevents astroglial pathological changes in the hippocampus of APP transgenic mice, model of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 2013; 239: 28-37.
10. Galvan V, Gorostiza OF, Banwait S, et al. Reversal of Alzheimer's-like pathology and behavior in human APP transgenic mice by mutation of Asp664. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 7130-5.
11. Simon AM, Schiapparelli L, Salazar-Colocho P, et al. Overexpression of wild-type human APP in mice causes cognitive deficits and pathological features unrelated to Abeta levels. *Neurobiol Dis* 2009; 33: 369-78.
12. Wilcock DM, Gordon MN, Morgan D. Quantification of cerebral amyloid angiopathy and parenchymal amyloid plaques with Congo red histochemical stain. *Nat Protoc* 2006; 1: 1591-5.
13. Larson ME, Lesne SE. Soluble Abeta oligomer production and toxicity. *J Neurochem* 2012; 120 Suppl 1: 125-39.
14. Vanzani MC, Iacono RF, Caccuri RL, Berria MI. Immunohistochemical and morphometric features of astrocyte reactivity vs. plaque location in Alzheimer's disease. *Medicina (B Aires)* 2005; 65: 213-8.
15. O'Donovan A, Slavich GM, Epel ES, Neylan TC. Exaggerated neurobiological sensitivity to threat as a mechanism linking anxiety with increased risk for diseases of aging. *Neurosci Biobehav Rev* 2013; 37: 96-108.