

Expresión de BACE-1 y su asociación con astrogliosis y taupatía en demencias

María Victoria Chacón Quintero^{1,2}, Rafael Andrés Posada-Duque^{1,2}, Gloria Patricia Cardona-Gómez^{1*}

¹Área de neurobiología celular y molecular, Grupo de Neurociencias de Antioquia, Universidad de Antioquia. ²Instituto de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, Seccional Oriente.

*Autor correspondencia: Gloria Patricia Cardona-Gómez (patricia.cardonag@udea.edu.co). Calle 62 # 52-59, Torre 1, laboratorio 412, Grupo de Neurociencias, SIU, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Número de páginas: 24; Número de figuras: 5; Numero de figuras suplementarias: 2; Numero de tablas: 1; Número de palabras: 8961; Resumen: 311; Introducción: 1206; y Discusión: 1841.

Abreviaciones: BACE-1, proteasa del ácido aspártico de la proteína precursora amiloide del sitio $\beta 1$; A β , Beta-amiloide; AD, alzheimer disease; UNV, unidad neurovascular; BBB, Blod Brain Barrier; CNS, central nervous system; SAD, sporadic alzheimer disease; FAD, Familiar Alzheimer disease; CADASIL, Arteriopatía cerebral autosómica dominante con infartos subcorticales y leucoencefalopatía; APP, proteína precursora amiloide; PS1, presinilina 1; GFAP, Glial fibrillar acid protein; AT-8, TAU hiperfosforilado; VaD, Demencia vascular; NFT, Neurofibrilar tangle;

Declaración de significancia: Este trabajo muestra que la enzima BACE-1 se encuentra asociada a la producción de Taupatía en astrocitos en demencia de tipo familiar y esporádico en el hipocampo humano. Además, BACE-1 colocaliza en los vasos sanguíneos que se encuentran cercanos a astrocitos reactivos y depósitos de TAU hiperfosforilado en el área CA1 de pacientes con Alzheimer esporádico y en menor proporción en CADASIL. Estos hallazgos ayudan a entender

el papel de la enzima BACE-1 en el deterioro de la unidad neurovascular como un factor convergente en las demencias.

Resumen

La enfermedad de Alzheimer (AD) es un trastorno neurodegenerativo progresivo que comienza con déficits de memoria leve que evolucionan con el tiempo hasta alcanzar un deterioro cognitivo total y la pérdida de las funciones ejecutivas. La disfunción en la unidad neurovascular (UNV) es un componente clave en el deterioro progresivo de la patología de Alzheimer y crítico en la demencia vascular. Se ha sugerido en estudios recientes que la inflamación desempeña papeles tempranos y quizás causales en la patogénesis de la AD relacionado con daños en la UNV, posiblemente en parte por la sobreactivación de la proteasa del ácido aspártico de la proteína precursora amiloide del sitio β 1 (BACE1), que es responsable de la cascada de β -amiloide. En este estudio se realizó un análisis comparativo por medio de técnicas histológicas con inmunohistoquímica e inmunofluorescencia de la expresión y la localización tisular de BACE1, además, se analizó la relación de dicho marcador con la taupatía y astrogliosis mediante western blot e inmunoprecipitación en cerebros humanos con demencia de tipo esporádico y genético (CADASIL, SAD, FAD). Nuestros resultados muestran un aumento significativo en la inmunoreactividad de BACE1, AT-8, GFAP, de manera diferencial en las demencias estudiadas, sin embargo se observa una asociación entre BACE1 con taupatía en los astrocitos del área CA1 de hipocampos con demencia. Además, BACE1 inmunoprecipita con AT-8 y GFAP formando complejos moleculares y específicamente en CA1 la expresión de BACE1 se asocia con los astrocitos reactivos (astrogliosis) que se encuentran cercanos o solapante a los vasos sanguíneos y a su vez asociados con la positividad de Tau principalmente en Alzheimer esporádico y en menor proporción en CADASIL. En conjunto, los resultados sugieren que la desregulación de BACE1 en astrocitos puede tener un papel relevante en las alteraciones observadas en la UNV en demencia y se propone como un factor convergente para explicar el deterioro cerebral en la demencia con componente vascular.

Palabras claves: BACE-1, astrogliosis, taupatia, endotelio, hipocampo humano, demencia vascular.

1. Introducción

La enfermedad de Alzheimer (AD) representa hasta el 80% de los casos de demencia, por lo que constituye la forma más común de esta patología. Es un trastorno neurodegenerativo progresivo

que afecta a las personas de edad avanzada, que comienza con déficits de memoria leve que evolucionan con el tiempo hasta alcanzar el deterioro cognitivo total y la pérdida de las funciones ejecutivas (1). La formación de depósitos de amiloide, que es causada por la oligomerización y agregación del péptido beta-amiloide (A β) y los ovillos neurofibrilares, que es causada por la agregación de la proteína tau hiperfosforilada (taupatía), se consideran las principales características patológicas de la enfermedad de Alzheimer (2). En paralelo, la disfunción cerebrovascular también se ha documentado en la demencia de tipo vascular, un grupo de trastornos cerebrales heterogéneos en los que el deterioro cognitivo se asocia a patologías preexistentes en la red vascular cerebral (3). La AD puede presentarse de dos formas: Alzheimer esporádico (SAD) o Alzheimer Familiar (FAD) (4). La FAD de inicio precoz está asociada con un patrón de herencia mendeliana autosómica dominante de mutaciones en los genes de las proteínas PPA (Proteína precursora amiloide, 32 mutaciones), PS1 (Presinilina-1, 180 mutaciones) o PS2 (Presinilina-2, 10 mutaciones). Por su parte, la SAD está influenciada por factores ambientales, el envejecimiento y estilos de vida poco saludables (5,6).

Algunos estudios recientes sugieren un papel central de la disfunción en la UNV como un componente clave en el deterioro progresivo de la patología de Alzheimer y crítico en la Demencia vascular, pero además como un mediador temprano en el inicio de procesos de cascadas neurodegenerativas observadas en ambas enfermedades (7,8). La comprensión de los mecanismos moleculares y celulares implicados en la disfunción de UNV constituiría una herramienta extraordinaria para obtener una mejor comprensión de la patobiología de Alzheimer y Demencia vascular, lo que en consecuencia conduciría al desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos (9). Destacar la contribución de la disfunción de UNV en la patobiología de estas enfermedades y dilucidar los mecanismos patológicos moleculares y celulares implicados contribuirían a la comprensión del desarrollo de la enfermedad. Además, darían sugerencia de nuevos y potenciales blancos terapéuticos que puedan mantener un microambiente cerebral óptimo adecuado para la función neuronal (10). La hipótesis de la cascada amiloide sugiere que la neurotoxicidad media la producción del péptido amiloide- β multimérico y la consiguiente hiperfosforilación de tau, formación de ovillos neurofibrilares y deterioro cognitivo. Sin embargo, las etiopatogénesis molecular que conducen a esos eventos no se comprende completamente. Se ha sugerido recientemente que la inflamación desempeña papeles tempranos y quizás causales en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer relacionado con daños en la UNV, posiblemente en parte por la sobreactivación de la proteasa del ácido aspártico de

la proteína precursora amiloide del sitio $\beta 1$ (BACE1), que es responsable de la cascada de β -amiloide (11).

BACE1 es una proteasa aspártica transmembrana de tipo I. La localización subcelular de BACE1 está dentro de la red trans-Golgi y el compartimento endosomal. Aunque, BACE1 alcanza la membrana plasmática debido al tráfico de vesículas, se recicla rápidamente. Solo una cantidad limitada de escisión de APP por BACE1 tiene lugar en la membrana plasmática; el procesamiento primario de APP mediado por BACE1 ocurre en vesículas endocíticas donde el ambiente de pH bajo favorece la actividad enzimática (12). $A\beta$ se genera mediante el procesamiento enzimático de la proteína precursora de amiloide (APP). Este proceso implica la escisión de la APP por la enzima de escisión de la APP del sitio $\beta 1$ (BACE1) y el complejo de la γ -secretasa, que contiene presenilina 1 o 2 (PS1 o PS2) como la subunidad catalítica para generar los péptidos $A\beta 40$ y $A\beta 42$ (13). Estudios experimentales han descrito evidencia de que BACE-1 se expresa en células endoteliales de la BBB de origen humano; además mostraron su localización predominante de membrana con una distribución abluminal de BACE-1 en microvasos cerebrales. Estos hallazgos sugieren un papel crítico para BACE-1 en la BBB en la generación de $A\beta$ y en los aspectos vasculares de la enfermedad de Alzheimer, particularmente en el desarrollo de la angiopatía cerebral amiloide (14). Actualmente se cree que las neuronas son la principal fuente de $A\beta$ en los cerebros normales y con AD (15). Entre las poblaciones celulares específicas en el sistema nervioso central (CNS), las neuronas expresan niveles más altos de BACE1 que las células gliales como los astrocitos, lo que indica que es menos probable que los astrocitos sean generadores significativos de $A\beta$ en condiciones normales. En contraste, la posibilidad de que la generación de $A\beta$ derivado de astrocitos, a pesar de ser baja, podría contribuir significativamente a los niveles de $A\beta$ cerebral y exacerbar así la patología amiloide de manera progresiva en el deterioro asociada a la AD (16). Los astrocitos pueden responder a estas condiciones patológicas a través de un proceso denominado astrogliosis reactiva (17). Durante este estado el astrocito sufre cambios morfológicos y metabólicos que permiten reconocer y eliminar sustancias tóxicas como el $A\beta$ y la proteína tau hiperfosforilada (18). Sin embargo, los astrocitos que se mantienen en un estado reactivo, pierden su funcionalidad e inducen una pérdida significativa de células neuronales en el CNS (19).

Tau es una proteína asociada a microtúbulos, que es abundante en axones, promueve la polimerización y modula la estabilización dinámica del citoesqueleto de actina (20). Sin embargo,

se ha demostrado que la hiperfosforilación de tau produce agregaciones conocidas como tauopatías (21). Un factor común en las tauopatías es la redistribución aberrante de tau desde los axones al soma y las dendritas y la acumulación de filamentos anormales que están altamente fosforilados y forman láminas β y filamentos helicoidales emparejados (PHF) antes de la formación de los ovillos neurofibrilares (22). Este proceso favorece la pérdida de circuitos neuronales que soportan la disfunción cognitiva (23). La proteína Tau hiperfosforilada también se encuentra en células gliales como los astrocitos. Su etiología es incierta, pero su presencia es lo suficientemente ubicua como para merecer una mayor caracterización y clasificación, lo que puede estimular los estudios clínico-patológicos y la investigación de su patobiología. BACE1 puede tener una acción más directa sobre la tauopatía porque su silenciamiento disminuye la tasa de fosforilación de tau en neuronas *in vitro* y en el hipocampo en un modelo triple de ratones AD transgénicos. A pesar de la gran cantidad de evidencia que respalda la hipótesis amiloide de la patogénesis de AD, los esfuerzos para desarrollar agentes que de manera segura reduzcan las concentraciones de A β en el sistema nervioso central en ratones y humanos no han tenido éxito hasta la fecha (24).

Finalmente, es necesario comprender los mecanismos de la etiopatogenia debida a la desregulación de BACE1 y el papel de esta en las alteraciones de la UNV en la demencia vascular. En este estudio nos enfocamos en determinar si la expresión de BACE1 asocia con astrocitos reactivos (astrogliosis) cercanos a vasos sanguíneos y la positividad de tau en demencia con componente vascular, como factor convergente para explicar el deterioro de la unidad neurovascular, aún no descrito en la literatura. El objetivo principal de este estudio fue realizar un análisis comparativo de la expresión y ubicación tisular de Beta-Secretasa 1, en relación con tauopatía y astrogliosis en cerebros humanos con demencia vascular (esporádico y genético: CADASIL, SAD, FAD).

2. Materiales y métodos

2.1 Tejido cerebral humano

Tejido cerebral postmortem de hipocampo de 5 casos de enfermedad de Alzheimer familiar (FAD) (mutación PS1 E280A), 5 casos a enfermedad de Alzheimer esporádica (SAD), 5 casos de arteriopatía cerebral autosómica dominante con infartos subcorticales y leucoencefalopatía

(CADASIL) y 5 controles sanos pareados por edad obtenidos del Neurobanco de la Universidad de Antioquia se incluyeron en este estudio.

Se obtuvo el consentimiento informado para la investigación, este estudio fue aprobado por el comité de bioética para estudios en humanos de la Universidad de Antioquia. Se fijaron bloques de tejido por inmersión en una solución de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (PB) 0,1 M, pH 7,4, a 4°C durante 7 días. Una vez transcurridos los 7 días, los tejidos fueron sometidos a un gradiente de sacarosa en PB al 0,1 M a concentraciones de 7%, 25% y 30%. Los fragmentos de tejido del hipocampo se embebieron en isopentano y su posterior almacenamiento a -80 °C. Luego, se realizaron rebanadas de 50 µm en criostato (Leica CM1850). Los casos utilizados para la realización de este estudio se muestran en la tabla 1.

2.2 Inmunohistoquímica

Las secciones de tejidos de hipocampo humano en flotación (50 µm de espesor) se sometieron a exposición de epitopes en ácido fórmico al 98% durante 5-6 min a 85 °C, y Triton X-100 al 30% en PB 0.1 M durante 5 min. La actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó usando metanol 1:1 con peróxido de hidrógeno al 1% (H₂O₂) en PB 0,1 M durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los sitios de unión de anticuerpos no específicos se bloquearon con suero bovino al 1% (BSA) (Sigma) y Tritón X-100 al 0,3% en PB 0,1 M durante 1 h. Las secciones fueron incubadas con anti-BACE1 de conejo (ab108394, abcam, 1: 100), anti-human-PHF-tau de ratón (AT-8, MN1020, Thermo, 1: 1000), anti-Glial Fibrillary Acid Protein anti-GFAP de ratón (G3893, Sigma Aldrich, 1:250), Anti-vimentina de conejo (ab137321, abcam, 1:250) anticuerpo primario con 0.3% Triton X-100 y 0.3% BSA en 0.1 M PB a 4°C por 3 noches. Después, las rodajas se incubaron con anticuerpo secundario biotinilado de ratón (31800, Invitrogen, 1:250) y biotinilado de conejo (B2770, Invitrogen, 1:250) durante 1 hora y luego se incubaron con el complejo avidina biotina (ABC Standard Peroxidase Staining Kit, Pierce #32020, 1:250 reactivo A:B) durante 1 hora. La tinción se realizó usando Diaminobencidina (DAB, 12623957, Thermo) en H₂O₂ al 1%. Las rodajas fueron montadas y secadas en portaobjetos, posteriormente se deshidrataron por gradiente alcoholes, se cubrieron con una solución de montaje (Consulmount) y se analizó la inmunoreactividad a magnificaciones de 4x, 10x y 40x por microscopia de luz con la cámara Nikon digital sight DS-L1 en el microscopio Nikon Epsilon E200. Las imágenes se analizaron mediante el uso de umbral binario en el software ImageJ (NIH, USA) para evaluar el porcentaje de tinción inmunohistoquímica en el área total por cada región seleccionada: hipocampo (CA1, CA4) y subículo.

2.3 Inmunofluorescencia

Para la tinción de inmunofluorescencia, se realizó un procedimiento similar al descrito anteriormente en inmunohistoquímica. Después de la recuperación antigénica con ácido fórmico, la autofluorescencia del tejido y el fondo se bloquearon con Sudan Black B al 0,1% en etanol al 70% durante 10 minutos. Se realizó preincubación con BSA 1% y triton 0.3%, luego las secciones se incubaron con la mezcla de anticuerpos primarios para la primera triple inmunofluorescencia se utilizaron GFAP de conejo (PA516291, Invitrogen, 1:250), anti-human-PHF-tau (AT-8, MN1020, Thermo, 1: 250) y la sonda DyLight 649 lectin UEA (Vector Labs; Cat. ·DL-1068; 1:750) y para la segunda mezcla se utilizaron BACE1 (ab108394, abcam, 1: 100), anti-GFAP (Glial Fibrillary Acid Protein) de raton (G3893, Sigma Aldrich, 1:250) y la sonda DyLight 649 lectin UEA en 0.3% Triton X-100 y 0.3% BSA en 0.1 M PB a 4°C por 3 noches. Se utilizaron anticuerpos fluorescentes anti-conejo Alexa 488 (A11008, Invitrogen, 1:750), anti-ratón Alexa 594 (A11005, Invitrogen, 1:750), anti-conejo Alexa 594 (A11012, Invitrogen, 1:750) y anti-raton Alexa 488 (A11001, Invitrogen, 1:750) se dejaron en incubación durante una hora. Las secciones de tejido fueron lavadas tres veces durante 5 min y luego las preparaciones fueron montadas en placas portaobjetos y selladas en cubreobjetos con Fluoro-Gel (Electron Microscopy Sciences). Las secciones incubadas en paralelo sin anticuerpo primario se incluyeron como controles negativos de la unión de fondo del anticuerpo secundario y para discriminar la autofluorescencia. La omisión de los anticuerpos primarios no produjo tinción.

2.4 Microscopia confocal

Las secciones de tejido montadas con triple etiqueta inmunologica fueron fotografiadas en un microscopio confocal de escaneo láser (FV1000 Olympus, Japón) utilizando un objetivo de 60X (aceite de inmersión, NA 1.42) y el programa Olympus Fluoview. Se registraron un total de dos campos en el área CA1 para cada tejido. Para cada caso experimental, se obtuvieron 21 secciones individuales consecutivas a intervalos de 0.5 μm en todos los canales a lo largo del eje z de la muestra. Los parametros de adquisición de imágenes se mantuvieron igual entre los casos. Se generaron imágenes de proyección máxima para cada campo usando el software ImageJ (NIH, USA).

2.5 Western blotting

El área CA1 de los tejidos de hipocampo humano se diseccionó y se almacenó a -80°C antes de su uso. Las muestras se lisaron en Tris 10 mM (pH 7,4), NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, glicerol al 10%, NP40 al 1%, ortovanadato 1 nM, NaF 5 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM y un coctel inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich). Los lisados (que contenían $\sim 50\ \mu\text{g}$ de proteínas, cuantificados usando el método Bradford) se cargaron en geles de electroforesis al 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare) a 250 mA durante 2 h usando un sistema de transferencia electroforética. Las membranas se incubaron durante la noche a 4°C en anti- BACE1 (ab108394, abcam, 1: 100) TAU total de ratón (AT-5, 136400, Thermo, 1:100) y anti-GFAP de ratón (G3893, Sigma Aldrich, 1:250) y anti- β actina de ratón (Promega, 1:5000). Se utilizaron anticuerpos secundarios cabra anti-ratón o anti-conejo (LICOR; 1: 5,000) acoplados IRDye 800 680 CW. Los blots se visualizaron utilizando el sistema de imágenes infrarrojas Odyssey (LI-COR Biosciences, Estados Unidos). Para minimizar la variación entre ensayos, las muestras de todos los grupos experimentales se procesaron en paralelo.

2.6 Inmunoprecipitación

Para la inmunoprecipitación se realizó un procedimiento similar al descrito para el procedimiento de Western Blotting. Las muestras se lisaron en Tris 10 mM (pH 7,4), NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, glicerol al 10%, NP40 al 1%, ortovanadato 1 nM, NaF 5 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM y un coctel inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich). Los lisados se clarificaron por centrifugación a 14,000 rpm durante 5 min. Se realizó un ensayo de cuantificación de proteínas de PIERCE, y luego se incubaron $200\ \mu\text{g}$ de proteína durante la noche a 4°C en presencia de anti-BACE1 (ab108394, abcam, 1: 100). Se agregaron microesferas de proteína G-sepharose y las muestras se incubaron durante 2 h adicionales a temperatura ambiente. Los complejos inmunes se lavaron tres veces usando un tampón de lisis de inmunoprecipitación antes de la SDS-PAGE y la inmunotransferencia. Las proteínas se separaron usando SDS-PAGE al 10%, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham) y se sondearon con anti-GFAP de ratón (G3893, Sigma Aldrich, 1:250) y anti-human-PHF-tau de ratón (AT-8, MN1020, Thermo, 1: 250). Los lisados totales se usaron como controles positivos, y la incubación con péptido IgG (395040065, Thermo, 1:500) se usó como control negativo de inmunoprecipitación. Los blots se visualizaron utilizando el sistema de imágenes infrarrojas Odyssey (LI-COR Biosciences, Estados Unidos). Para minimizar la variación entre ensayos, las muestras de todos los grupos experimentales se procesaron en paralelo.

2.7 Análisis estadísticos

El análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism software (versión 6.0). Los datos se representaron como la media +/- el error estándar de la media (SEM) para las variables cuantitativas. Se realizó prueba de homogeneidad de varianzas, luego un análisis multivariado para datos paramétrico ANOVA de una vía, pruebas poshoc Kruskal-Wallis y t de Student. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos.

3. Resultados

3.1 Localización tisular diferencial de BACE-1 en el área CA1 de hipocampo de pacientes con enfermedad de Alzheimer familiar y esporádico

Se evaluó la localización espacial de la enzima BACE-1 en las áreas CA1, CA4 y Subículo del hipocampo humano de pacientes con demencias, como se muestra en la fig 1, a. En el área CA1 encontramos un aumento significativo de la inmunoreactividad de BACE-1 en los grupos de Alzheimer familiar y esporádico, respecto al grupo control. No se encontraron diferencias significativas para el grupo CADASIL (fig. 1, b). Para el área CA4 la mayor inmunoreactividad de BACE-1 se evidenció en el grupo control y fue significativamente menor para los grupos SAD y CADASIL con respecto al control sano. Se encontró una tendencia a la disminución de BACE-1 en CA4 en el grupo de Alzheimer familiar, como se observa en la figura 1, c. Para el área del subículo se encontró un aumento significativo de BACE-1 para el grupo FAD y CADASIL (fig. 1, d). El grupo SAD presentó una tendencia al aumento en el marcaje de BACE-1, sin embargo este no fue significativo.

Mediante el análisis histológico por inmunohistoquímica se determinó una mayor expresión de BACE-1 en el área CA1 para los grupos de demencias y en el área CA4 para el grupo control. El área CA1 fue seleccionada para análisis mediante Western Blotting, como se evidencia en la figura 1, e. Se observó una tendencia al aumento en BACE-1 en el área CA1 de FAD, SAD y CADASIL con respecto al control sano, sin embargo no se obtuvo diferencia significativa.

3.2 Los ovillos neurofibrilares se acumulan en áreas CA1, CA4 y Subículo de hipocampo humano de pacientes con enfermedad de Alzheimer familiar y esporádico

Las acumulaciones intracelulares de la proteína TAU hiperfosforilada formando ovillos neurofibrilares son uno de los marcadores patológicos de la enfermedad de Alzheimer. Para

analizar la asociación entre la producción de tauopatía en las demencias y su localización tisular en diferentes áreas del hipocampo humano CA1, CA4 y Subículo se realizó un análisis inmunohistoquímico con marcaje de TAU hiperfosforilado (AT-8) como se muestra en la figura 2, a.

Se observó para el área CA1 un aumento significativo de Tau hiperfosforilado para los grupos FAD y SAD, siendo este aumento significativamente mayor para los casos de Alzheimer Familiar comparados con el control. La comparación entre CADASIL con respecto al control dio como resultado un aumento de AT-8 en este grupo, sin embargo no arrojó diferencias significativas (fig. 2, b).

Al analizar los niveles de inmunorreactividad de AT-8 en el área CA4, se evidenció un patrón similar al encontrado en el área CA1. Se observó un aumento significativo en AT-8 en los grupos FAD y SAD, sin embargo fue significativamente mayor para los casos de Alzheimer Familiar comparado con el control. Para el grupo CADASIL no se encontraron diferencias respecto al control (fig. 2, c). En el área del Subículo pudimos observar mayores niveles de Tau hiperfosforilado en los grupos FAD y SAD, este aumento fue significativo para ambos grupos experimentales. En el caso de CADASIL se encontraron niveles de AT-8 muy bajos, similares a los encontrados para el grupo control (fig. 2, d).

Se realizó un lisado del área CA1 para análisis de los niveles de proteína TAU total (AT-5) por Western blotting como se evidencia en la figura 2, e. No se encontraron diferencias significativas, sin embargo se observó una tendencia al aumento en los niveles de proteína TAU total para las demencias comparadas con el control.

3.3 Astrogliosis en área CA1 y Subículo del hipocampo de pacientes con Alzheimer familiar

La caracterización de la población astrocitaria en diferentes áreas del hipocampo CA1, CA4 y subículo se llevó a cabo mediante inmunomarcaje de GFAP. Este marcador evidencia la presencia de astrocitos reactivos y el desarrollo de astrogliosis como un fenómeno convergente observado en las demencias. La inmunohistoquímica para GFAP evidenció cambios en la población de astrocitos reactivos a través de las áreas del hipocampo analizadas (fig. 3,a). Para el área CA1 se observó un aumento en GFAP en los tres grupos experimentales analizados, pero este fue significativamente mayor para el grupo de Alzheimer familiar y en los demás grupos SAD y CADASIL se observó un aumento leve no significativo (fig. 3,b). En el caso del área CA4 no hubo diferencias significativas, y se presentó una tendencia a la disminución en los diferentes grupos de

demencia, principalmente en SAD y CADASIL (fig. 3,c). Inversamente, en el subículo hubo una tendencia de aumento en GFAP en las demencias, este aumento fue significativo solo para el grupo de Alzheimer familiar (fig. 3,d). Los niveles de proteína GFAP en el área CA1 del hipocampo analizados por Western blotting. Muestran una tendencia no significativa de dichos niveles en el Alzheimer esporádico sin cambios en FAD y CADASIL respecto al grupo control. (fig. 3,e).

La afección de las poblaciones astrocitarias en las demencias se relacionan también con el compromiso de la vasculatura, para ello se realizó un inmunomarcaje Vimentina (fig S. 1) se observó que hay un aumento de la Vimentina en el área CA1 de pacientes con Alzheimer familiar y una reducción en el subículo en CADASIL, sin cambios en CA4 respecto al grupo control. Y la inmunoreactividad de la Claudina-5 sugiere una tendencia al aumento en CA1 y subículo en Alzheimer esporádico (fig S. 2), a diferencia de los otros grupos que no presentaron cambios.

3.4 BACE-1 forma complejo molecular con GFAP y Tau hiperfosforilado en el área CA1 de cerebros con demencia

Para determinar si BACE-1 podía asociarse con Tau hiperfosforilado y GFAP, se realizó un ensayo de co-inmunoprecipitación. Se inmunoprecipito BACE-1 y posteriormente se hicieron incubaciones para GFAP y para AT-8, como se muestra en la figura 4. En este ensayo se observó que BACE-1 se asocia con GFAP en el área CA1 (fig 4,a) y AT-8, lo cual significa la formación de un complejo molecular entre estas proteínas, su presencia aumentada en astrocitos de los diferentes grupos de demencia. Además, observamos que la enzima BACE-1 se asocia con Tau patológica en el área CA1. Evidenciamos que BACE-1 inmunoprecipita con AT-8 (fig 4,b) y que BACE-1 (70 KDa) tiene asociación, es decir que forma complejo molecular con AT-8 (79 KDa) en el área CA1 del hipocampo.

3.5 BACE1 y AT-8 se expresan en astrocitos y endotelio vascular principalmente en Alzheimer esporádico

Se realizó la caracterización morfológica de la asociación entre BACE-1, GFAP y AT-8 con el endotelio vascular en el área CA1 del hipocampo en demencias. Para esto se realizaron triples inmunomarcajes para los diferentes grupos experimentales. La triple inmunotinción para AT-8 + GFAP + Lectina se muestra en la figura 5,a. Para este marcaje se observó un patrón de co-localización entre AT-8 y GFAP, es decir, se observó expresión de TAU hiperfosforilado en astrocitos reactivos que se encuentran cercanos a los vasos sanguíneos marcados con lectina

(marcador endotelial). Este patrón de localización entre astrocitos y AT-8 se observó principalmente en Alzheimer esporádico y CADASIL.

La triple inmunofluorescencia para BACE-1 + GFAP + Lectina se muestra en la figura 5,b. Observamos un patrón de co-localización de BACE-1 con GFAP, preferencialmente en los grupos FAD Y SAD. Además, se observó co-localización con el endotelio vascular para este inmunomarcaje. Observamos que los astrocitos reactivos que se encuentran cercanos a vasos sanguíneos tienen presencia de BACE-1 y se asocian a su vez con el endotelio. Por lo tanto, sugerimos que la enzima BACE-1 se asocia con tau hiperfosforilado en astrocitos y además presenta un patrón de cercanía y asociación al endotelio vascular.

1. Discusión

Esta investigación muestra una asociación molecular y tisular entre BACE1 con tau hiperfosforilado en los astrocitos del área CA1 de hipocampo con diagnóstico de demencia. Dicha asociación se encuentra cercana o solapante a los vasos sanguíneos, de manera más generalizada en Alzheimer esporádico y en menor proporción en CADASIL; sugiriendo que la desregulación de BACE1 puede tener un papel relevante en las alteraciones observadas en la UNV en demencia y se propone como un factor convergente en el deterioro cerebral en las demencias, involucrando el componente vascular.

Estudios previos han señalado el efecto de BACE1 sobre el deterioro de la UNV (25). El mantenimiento de cada uno de los componentes de la UNV cumple un rol fundamental en el mantenimiento de la homeostasis cerebral regulando el flujo sanguíneo, promoviendo el intercambio de moléculas a través de la BBB estableciendo una barrera inmune y proporcionando un soporte trófico (26). Además, a diferencia de otros órganos, las células endoteliales en la mayoría de las regiones cerebrales están unidas por intrincados complejos de unión formados por ocludinas y claudinas (uniones estrechas) que impiden el intercambio bidireccional de sustancias hidrofílicas entre la sangre y el cerebro, una característica clave de la BBB (27). En este sentido destacamos el rol del mantenimiento de la BBB y la integridad del endotelio en el mantenimiento de la homeostasis cerebral, en el cual BACE1 podría tener un papel relevante.

Nuestros resultados muestran que BACE1 se asocia con astrogliosis y además co-localiza con el endotelio vascular en el área CA1. Estos hallazgos se han reportado en algunos estudios anteriores donde mostraron la localización predominante de BACE-1 en la membrana abluminal de los vasos

de la BBB, donde es capaz de escindir la APP circulante y / o neuronal, como lo encontraron en las células endoteliales cerebrales primarias de ratón inhibidas por BACE-1 (28). Dado que las células endoteliales del cerebro tienen abundantes mitocondrias, el A β generado en la BBB por la actividad enzimática del BACE-1 endotelial puede servir como punto inicial que conduce a una cascada de eventos que comienzan con estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, interrupción de la función BBB, y posterior neurodegeneración (29). Estos estudios implican un papel de BACE-1 en la integridad de la BBB más allá de solo la generación de A β , en la etiopatogénesis de diferentes tipos de demencia.

Algunos estudios anteriores sugieren también que los astrocitos reactivos también pueden representar una fuente celular alternativa de péptidos A β . Por ejemplo, se ha informado un aumento en la expresión de APP, la generación de péptidos b-amiloides y la formación acelerada de placas b-amiloides para varios modelos animales de gliosis crónica (30,31). De esta manera los astrocitos reactivos pueden representar un fuente celular adicional de péptidos A β bajo una variedad de condiciones patológicas presentes en cerebros humanos con AD y en modelos animales de AD. También, se identificó un BACE1 en un biblioteca de ADNc de astrocitos humanos, lo que confirma nuestros hallazgos, que los astrocitos expresan BACE1 (32). Sin embargo, hay informes de la expresión de BACE1 restringido a las neuronas en el cerebro roedor normal (33 - 35).

Nuestro estudio muestra que BACE-1 se encuentra en astrocitos reactivos, algunos autores en estudios previos abordaron esta pregunta para diferentes lesiones evaluando la activación glial con respecto a BACE-1. Donde BACE1 se observó en astrocitos inmunorreactivos en los tejidos cerebrales afectados después de la oclusión de la arteria cerebral media, en el tronco encefálico después de la inducción de encefalomiелitis autoinmune experimental y en hipocampo después de una infección cerebral con el virus de la enfermedad de Borna (36). En particular, la expresión de BACE1 también se demostró en astrocitos reactivos en las proximidades de las placas A β en el cerebro de pacientes con EA (36). Hasta el momento, se entiende que la expresión astrocítica de BACE1 es solo relevante para el desarrollo de AD si los astrocitos también expresan el sustrato BACE1 y la APP. Por ejemplo, astrocitos primarios expresan APP y generan cantidades significativas de péptidos A β (37 - 41). Además, la APP también se expresa por astrocitos reactivos en modelos experimentales de gliosis crónica (42), y la expresión de APP astrocítica da como resultado una mayor generación de A β y fragmentos A4-CT derivados de escisión BACE1 (43, 44). No obstante,

es importante dejar abierta la posibilidad de un posible papel de BACE1 en el metabolismo de lípidos y procesos inflamatorios como nos lo ha sugerido estudios previos en el laboratorio (11, 45). Además, estudios aun no publicados muestran que el inhibidor de BACE1 es capaz de proteger los astrocitos y el endotelio de un ambiente tóxico por glutamato, reduciendo la pérdida de la disrupción endotelial y la astrogliosis reactiva (46).

Por lo tanto, es clave mencionar, la estrecha relación del endotelio con los astrocitos, ya que desempeñan un papel fundamental en la formación y la integridad de la UNV, desempeñando funciones conjuntas como: suplir de metabolitos a las neuronas, regular el flujo sanguíneo a través de la BBB y controlar los niveles de iones y neurotransmisores extracelularmente, manteniendo la homeostasis del parénquima cerebral (47). Las interacciones entre estas células y el endotelio promueven y mantienen muchas de las características fisiológicas y metabólicas que son exclusivas de la BBB (48). La pérdida de integridad de BBB produce un aumento de la permeabilidad vascular y se asocia con un flujo sanguíneo cerebral reducido y respuestas hemodinámicas deterioradas (49). La desintegración de la BBB permite el ingreso de moléculas tóxicas derivadas de la sangre, células y agentes microbianos que pueden desencadenar múltiples vías de neurodegeneración (6). Las poblaciones de astrocitos reactivos encontradas en nuestros grupos de estudio, especialmente en CA1 de hipocampo de pacientes con demencias pueden estar implicados en procesos de neurodegeneración y neuroprotección; en términos de neurodegeneración estos median la propagación de señales pro-inflamatorias, además de activar procesos catabólicos y desencadenar la apoptosis; pero también interceden en la recaptación y síntesis de neurotransmisores, inducen la neurogénesis y angiogénesis y median la antioxidación aportando a la neuroprotección (50). Lo cual se apoya con el papel de la BACE1 en astrocitos y endotelio al reducir los núcleos apoptóticos, reducir la expresión de IL-1 β y mejorar la distribución del citoplasma a la membrana de proteínas de adhesión celular como Claudina 5 en un ambiente de toxicidad por glutamato (46), estando esto en concordancia con la acumulación de Claudina 5 en la región CA1 y en el subículo en Alzheimer esporádico en nuestros actuales resultados. Así como, que la inhibición de BACE1 es capaz de reducir la activación proinflamatoria por ácido araquidónico y COX-2 en ratón viejos modelo de Alzheimer, asociados a la recuperación de la función cognitiva (45).

Por otro lado, la taupatía como marcador histopatológico de la enfermedad de Alzheimer está involucrado en la exacerbación del deterioro cerebral y es el marcador histopatológico del

trastorno cognitivo y las demencias. De acuerdo a los presentes hallazgos, se observa que BACE1 forma complejos moleculares con la proteína TAU hiperfosforilada (AT-8), donde comúnmente se ha asociado estos agregados de TAU hiperfosforilado a las neuronas, pero esta proteína también se encuentra en células gliales como los astrocitos (51). Lo cual fue confirmado por este estudio, en el cual detectamos que en el área CA1 los astrocitos reactivos en la enfermedad de Alzheimer de tipo Familiar y esporádico son también AT-8 positivos. Es decir que los depósitos de esta proteína anormalmente fosforilada no provienen solo de la población neuronal en esta área del hipocampo. Este hallazgo es respaldado por algunos estudios previos en los que gracias a la introducción de la tinción de plata de Gallyas y particularmente a la inmunohistoquímica de tau, condujo a la identificación de la patología astrogliótica de tau en el cerebro con enfermedades neurológicas (52-57, 60, 61), pero también en el cerebro envejecido sin cambios relacionados con AD, deterioro cognitivo o trastornos del movimiento (58-59, 62). Donde se encontró que astrocitos reactivos con astrogliosis expresan también TAU (52-62). Lo cual sugiere, que astrocitos AT-8 positivos ayudan a la exacerbación de la neurodegeneración en las demencias. Además, en conjunto estos hallazgos significan que el silenciamiento de BACE-1 reduce la taupatía en astrocitos y en el endotelio, lo cual fue apoyado por nuestros estudios previos donde se encontraron que se da una recuperación de la función cognitiva en ratones 3xTg-AD viejos con silenciamiento de BACE1 en el hipocampo, tras la regulación de la homeostasis del fosfolípido fosfatidiletanolamina (45), lo cual fue previamente demostrado tras el bloqueo del inhibidor de la lipidación de fosfatidiletanolamina (PE), en el autofagosoma, 3-metiladenina (3-MA) (63), apoyado a su vez por una acción del silenciamiento de BACE1 dependiente de desaturasa 1 y 6 sobre la reducción de la hiperfosforilación de TAU en neuronas (11). Aunque también estuvo relacionado con el bloqueo de la actividad MAPK de la proteína básica de mielina (MBP) en un modelo de ratones transgénicos triples con AD (16), no obstante la PE es altamente enriquecida en la banda miélinica que recubre los axones (64, 65)

Por otro lado, y en perspectiva, la expresión prominente de BACE-1 en el BBB plantea interesantes posibilidades novedosas de diseño de fármacos. Hasta ahora, la evolución de los inhibidores de la β -secretasa como objetivos terapéuticos fue lenta, porque muchos no llegaron al cerebro o fueron transportados rápidamente al torrente sanguíneo. En modelos animales transgénicos de AD, la administración continua de inhibidores de BACE-1 ha mostrado algún beneficio en términos de disminución de la carga de placa $A\beta$ y el rendimiento cognitivo. Algunos de estos inhibidores están en fases clínicas tempranas ahora (66). El direccionamiento farmacológico de epítomos

extracelulares específicos de BACE-1 en el lado luminal del endotelio que mira hacia la sangre podría facilitar el diseño del fármaco, ya que puede evitarse la necesidad de penetración cerebral y la resistencia al transporte del flujo de salida del fármaco. Alternativamente, los transportadores BBB, como los receptores de transferrina, podrían dirigirse a internalizar el fármaco inhibidor en el endotelio BBB, donde puede interactuar con la proteína BACE-1 para inhibir su actividad (67). En esta línea, el grupo de Ryan Watts en Genentech generó un anticuerpo bi-específico con un brazo que contiene la especificidad del receptor de transferrina para la transcitosis a través del BBB y el otro brazo que contiene la especificidad para BACE-1 (67). Los autores muestran una mayor biodisponibilidad del anticuerpo BACE-1 en el parénquima y una menor carga de A β en un modelo de ratón con AD (68). Estudios previos sugieren a BACE-1 en el BBB como un objetivo fundamental contra los aspectos vasculares en dicha enfermedad. Además, proponen que los medicamentos dirigidos a BACE-1 dentro del BBB podrían convertirse en nuevas terapias contra la AD que potencialmente conduzcan a mejores resultados clínicos (69).

Finalmente, los resultados de nuestro trabajo proponen el papel de la enzima BACE1 como un agente asociado a la astrogliosis y taupatía en hipocampo de pacientes con demencias. Además se encuentra asociado con el deterioro del endotelio vascular específicamente en el área CA1 de hipocampo de pacientes con enfermedad de Alzheimer esporádica y con CADASIL. Destacamos la asociación de BACE1 con astrogliosis y taupatía como un factor convergente encontrado en las demencias.

Referencias

1. Querfurth HW, Laferla FM. Alzheimer's Disease. 2010;329–44.
2. Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. Science. 2002; 298: 789-791.
3. Iadecola C. The pathobiology of vascular dementia. Neuron. 2013; 80: 844-866.
4. Lopera F. La enfermedad de Alzheimer familiar. Rev Neuropsicol Neuropsiquiatría y Neurociencias,. 2012;12:163–88.
5. Breteler MMB. Vascular risk factors for Alzheimer ' s disease : An epidemiologic perspective. 2000;21:153–60.
6. Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic B V. Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. Nat Rev Neurol . 2018;14(3):133–50.
7. Nation DA, Sweeney MD, Montagne A, Sagare AP, D'Orazio LM, Pachicano M, et al. Blood–brain barrier breakdown is an early biomarker of human cognitive dysfunction. Nat

- Med. 2019;25(2):270–6.
8. Zenaro E, Piacentino G, Constantin G. The blood-brain barrier in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2017;107:41–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2016.07.007>
 9. ElAli A. Neurovascular Unit Dysfunction in Dementia: A Brief Summary. *Austin Alzheimers J Parkinsons Dis*. 2014. 1(3): 5.
 10. Hermann DM, ElAli A. The abluminal endothelial membrane in neurovascular remodeling in health and disease. *Sci Signal*. 2012; 5: re4.
 11. Javier G.Villamil Ortiz , Gloria. P Cardona Gómez. cPLA2 and desaturases underlie the tau hyperphosphorylation offset induced by BACE knock-down in neuronal primary cultures. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018. 08. 028.
 12. Kandalepas, P. C., and Vassar, R. Identification and biology of β -secretase. *J. Neurochem*. 2012. 120(Suppl. 1), 55–61.
 13. Thinakaran, G., and Koo, E. H. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J. Biol. Chem*. 2008. 283, 29615–29619.
 14. Devraj, K., Poznanovic, S., Spahn, C., Schwall, G., Harter, P. N., Mittelbronn, M., Liebner, S. BACE-1 is expressed in the blood-brain barrier endothelium and is upregulated in a murine model of Alzheimer's disease. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2016. 36(7), 1281–1294.
 15. Jie Zhao, Tracy O'Connor, Robert Vassar. The contribution of activated astrocytes to A β production: Implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *Journal Neuroinflammation*. 2011; 8: 150.
 16. Piedrahita, D., Castro-Alvarez, J. F., Boudreau, R. L., Villegas-Lanau, A., Kosik, K. S., Gallego-Gomez, J. C., et al. beta-Secretase 1's targeting reduces hyperphosphorylated tau, implying autophagy actors in 3xTg-AD mice. *Front. Cell Neurosci*. 2016. 9:498.
 17. Haim L Ben, Rowitch D. Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2016; Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn.2016.159>
 18. Pereira Diniz L, Tortelli V, Matias I, Morgado J, Bérigamo Araujo AP, Melo HM, et al. Astrocyte Transforming Growth Factor Beta 1 Protects Synapses against A β Oligomers in Alzheimer's Disease Model. *J Neurosci* [Internet]. 2017;37(28):6797–809. Available from: <http://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.3351-16.2017>
 19. Iram T, Trudler D, Kain D, Kanner S, Galron R, Vassar R, et al. Astrocytes from old

- Alzheimer's disease mice are impaired in A β uptake and in neuroprotection. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2016;96:84–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2016.08.001>
20. Hashiguchi, M., and Hashiguchi, T. Kinase-kinase interaction and modulation of tau phosphorylation. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2013.300, 121–160. doi: 10.1016/B978-0-12-405210-9.00004-7
 21. Kimura, T., Ishiguro, K., and Hisanaga, S. Physiological and pathological phosphorylation of tau by Cdk5. *Front. Mol. Neurosci.* 2014. 7:65. doi: 10.3389/fnmol.2014.00065
 22. Spillantini, M. G., and Goedert, M. Tau pathology and neurodegeneration. *Lancet Neurol.* 2013. 12, 609–622. doi: 10.1016/S1474-4422(13)70090-5
 23. Shahani, N., and Brandt, R. Functions and malfunctions of the tau proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 2002. 59, 1668–1680. doi: 10.1007/PL00012495
 24. M.E. Kennedy, A.W. Stamford, X. Chen, K. Cox, J.N. Cumming, M.F. Dockendorf, M. Egan, L. Ereshefsky, R.A. Hodgson, L.A. Hyde, S. Jhee, H.J. Kleijn, R. Kuvelkar, W. Li, B.A. Mattson, H. Mei, J. Palcza, J.D. Scott, M. Tanen, M.D. Troyer, J.L. Tseng, J.A. Stone, E.M. Parker, M.S. The BACE1 inhibitor verubecestat (MK-8931) reduces CNS beta-amyloid in animal models and in Alzheimer's disease patients. *Scitranslmed.* 2016. 10.1126
 25. Iadecola C. NEUROVASCULAR REGULATION IN THE NORMAL BRAIN AND IN ALZHEIMER'S DISEASE. *Nature reviews neuroscience.* 2004;5(May).
 26. Abbott NJ, Rönnebeck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(1):41–53.
 27. Dyrna F, Hanske S, Krueger M, Bechmann I. The Blood-Brain Barrier. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013. 8:763–773.
 28. Kavi Devraj, Slobodan Poznanovic, Christoph Spahn, Gerhard Schwall, Patrick N Harter, Michel Mittelbronn, Katia Antoniello, Paolo Paganetti, Andreas Muhs, Mike Heilemann, Richard A Hawkins, André Schrattenholz, Stefan Liebner. BACE-1 is expressed in the blood-brain barrier endothelium and is upregulated in a murine model of Alzheimer's disease. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016 Jul; 36(7): 1281–1294.
 29. Elhusseiny A, Cohen Z, Olivier A, et al. Functional acetylcholine muscarinic receptor subtypes in human brain microcirculation: identification and cellular localization. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 794–802.
 30. Martins R. N., Taddei K., Kendall C., Evin G., Bates K. A. and Harvey A. R. Altered expression of apolipoprotein E, amyloid precursor protein and presenilin-1 is associated with chronic reactive gliosis in rat cortical tissue. *Neuroscience.* 2001. 106, 557–569

31. Uryu K., Laurer H., McIntosh T., Pratico D., Martinez D., Leight S., Lee V. M. and Trojanowski J. Q. Repetitive mild brain trauma accelerates Ab deposition, lipid peroxidation, and cognitive impairment in a transgenic mouse model of Alzheimer amyloidosis. *J. Neurosci.* 2002. 22, 446–454.
32. Yan R., Bienkowski M. J., Shuck M. E. et al. (1999) Membraneanchored aspartyl protease with Alzheimer's disease b-secretase activity. *Nature* 402, 533–537.
33. Vassar R., Bennett B. D., Babu-Khan S. et al. (1999) b-Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735–741.
34. Bigl M., Apelt J., Lushekina E. A., Lange-Dohna C., Roßner S. and Schliebs R. (2000) Expression of b-secretase mRNA in transgenic Tg2576 mouse brain with Alzheimer plaque pathology. *Neurosci. Lett.* 292, 107–110.
35. Roßner S., Apelt J., Schliebs R., Perez-Polo J. R. and Bigl V. (2001) Neuronal and glial b-secretase (BACE) protein expression in transgenic Tg2576 mice with amyloid plaque pathology. *J. Neurosci. Res.* 64, 437–446.
36. Hartlage-Rußsamen M., Zeitschel U., Apelt J. et al. Astrocytic expression of the Alzheimer's disease b-secretase (BACE) is stimulus-dependent. *Glia.* 2003. 41, 169–179
37. Gray C. W. and Patel A. J. Regulation of b-amyloid precursor protein isoform mRNAs by transforming growth factor-b1 and interleukin-1b in astrocytes. *Mol. Brain Res.* 1993. 19, 251–256.
38. Amara F. M., Junaid A., Clough R. R. and Liang B. TGF-b(1), regulation of Alzheimer amyloid precursor protein mRNA expression in a normal human astrocyte cell line: mRNA stabilization. *Mol. Brain. Res.* 1999. 71, 42–49.
39. Beck M., Brückner M. K., Holzer M., Kaap S., Pannicke T., Arendt T. and Bigl V. Guinea-pig primary cell cultures provide a model to study expression and amyloidogenic processing of endogenous amyloid precursor protein. *Neuroscienc.* 2000. 95, 243–254.
40. Blasko I., Veerhuis R., Stampfer-Kountchev M., Saurwein-Teissl M., Eikelenboom P. and Grubeck-Loebenstein B. Costimulatory effects of interferon-c and interleukin-1b or tumor necrosis factor a on the synthesis of Ab1–40 and Ab1–42 by human astrocytes. *Neurobiol. Dis.* 2000. 7, 682–689.
41. Docagne F., Gabriel C., Lebourrier N., Lesné S., Hommet Y., Plawinski L., MacKenzie E. T. and Vivien D. Sp1 and Smad transcription factors co-operate to mediate TGF-b-dependent

- activation of the amyloid- β precursor protein gene transcription. *Biochem. J.* 2004. 383, 393–399.
42. Martins R. N., Taddei K., Kendall C., Evin G., Bates K. A. and Harvey A. R. Altered expression of apolipoprotein E, amyloid precursor protein and presenilin-1 is associated with chronic reactive gliosis in rat cortical tissue. *Neuroscience.* 2001. 106, 557–569.
 43. Bates K. A., Fonte J., Robertson T. A., Martins R. N. and Harvey A. R. Chronic gliosis triggers Alzheimer's disease-like processing of amyloid precursor protein. *Neuroscience.* 2002. 113, 785–796.
 44. Lesné S., Docagne F., Gabriel C. et al. Transforming growth factor- β 1 potentiates amyloid- β generation in astrocytes and in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 2003. 278, 18 408–18 418.
 45. JG Villamil-Ortiz , A. Barrera-Ocampo , D. Piedrahita , CM Velasquez-Rodriguez , JD Arias-Londono , GP Cardona-Gomez. BACE1 RNAi restaura la composición de los derivados de fosfatidiletanolamina relacionados con la mejora de la memoria en ratones 3xTg-AD de edad avanzada . *Cell. Neurosci.* , 10. 2016. artículo 260.
 46. Pineda-Lopez L et al en preparación
 47. Brambilla, L., Martorana, F., & Rossi, D. 2013. Astrocyte signaling and neurodegeneration *New insights into CNS disorders*, 7(1), 28–36.
 48. Alvarez JI, Katayama T, Prat A. Glial influence on the blood brain barrier. *Glia.* 2013;61(12):1939–58.
 49. Zlokovic B V. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer ' s disease and other disorders. 2011;12(December):723–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3114>
 50. Becerra-Calixto, A., & Cardona-Gómez, G. P. The Role of Astrocytes in Neuroprotection after Brain Stroke: Potential in Cell Therapy. *Frontiers in Molecular Neuroscience.* 2017. 10(April), 1–12. Available from: <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00088>
 51. Kovacs G.G., Ferrer I., Grinberg L.T., Alafuzoff I., Attems J., Budka H., Cairns N.J., Crary J.F., Duyckaerts C., Ghetti B. Aging-related tau astrogliopathy (ARTAG): harmonized evaluation strategy. *Acta Neuropathol.* 2016;131:87–102. doi: 10.1007/s00401-015-1509-x.
 52. Arima K, Izumiyama Y, Nakamura M, Nakayama H, Kimura M, Ando S, Ikeda K, Takahashi K. Argyrophilic tau-positive twisted and non-twisted tubules in astrocytic processes in

- brains of Alzheimer-type dementia: an electron microscopical study. *Acta Neuropathol.* 1998;95:28–39.
53. Beach TG, Sue L, Scott S, Layne K, Newell A, Walker D, Baker M, Sahara N, Yen SH, Hutton M, et al. Hippocampal sclerosis dementia with tauopathy. *Brain Pathol.* 2003;13:263–278.
 54. Botez G, Probst A, Ipsen S, Tolnay M. Astrocytes expressing hyperphosphorylated tau protein without glial fibrillary tangles in argyrophilic grain disease. *Acta Neuropathol.* 1999;98:251–256.
 55. Ferrer I, Lopez-Gonzalez I, Carmona M, Arregui L, Dalfo E, Torrejon-Escribano B, Diehl R, Kovacs GG. Glial and neuronal tau pathology in tauopathies: characterization of disease-specific phenotypes and tau pathology progression. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2014;73:81–97.
 56. Hishikawa N, Hashizume Y, Yoshida M, Niwa J, Tanaka F, Sobue G. Tuft-shaped astrocytes in Lewy body disease. *Acta Neuropathol.* 2005;109:373–380.
 57. Jellinger KA, Attems J. Neurofibrillary tangle-predominant dementia: comparison with classical Alzheimer disease. *Acta Neuropathol.* 2007;113:107–117.
 58. Kovacs GG, Milenkovic I, Wohrer A, Hoftberger R, Gelpi E, Haberler C, Honigschnabl S, Reiner-Concin A, Heinzl H, Jungwirth S, et al. Non-Alzheimer neurodegenerative pathologies and their combinations are more frequent than commonly believed in the elderly brain: a community-based autopsy series. *Acta Neuropathol.* 2013;126:365–384.
 59. Lace G, Ince PG, Brayne C, Savva GM, Matthews FE, de Silva R, Simpson JE, Wharton SB. Mesial temporal astrocyte tau pathology in the MRC-CFAS ageing brain cohort. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2012;34:15–24.
 60. Lopez-Gonzalez I, Carmona M, Blanco R, Luna-Munoz J, Martinez-Mandonado A, Mena R, Ferrer I. Characterization of thorn-shaped astrocytes in white matter of temporal lobe in Alzheimer's disease brains. *Brain Pathol.* 2013;23:144–153.
 61. Munoz DG, Woulfe J, Kertesz A. Argyrophilic thorny astrocyte clusters in association with Alzheimer's disease pathology in possible primary progressive aphasia. *Acta Neuropathol.* 2007;114:347–357.
 62. Schultz C, Ghebremedhin E, Del Tredici K, Rub U, Braak H. High prevalence of thorn-shaped astrocytes in the aged human medial temporal lobe. *Neurobiol Aging.* 2004;25:397–405.

63. D. Piedrahita , JF Castro-Alvarez , RL Boudreau , A. Villegas Lanau , KS Kosik , JC Gallego-Gomez , GP Cardona-Gómez. β -secretasa 1 reduce la tau hiperfosforilada, lo que implica actores de autofagia en ratones 3xTg-AD. *Cell. Neurosci.* 2016.
64. Fledrich R, Abdelaal T, Rasch L, et al. Targeting myelin lipid metabolism as a potential therapeutic strategy in a model of CMT1A neuropathy. *Nat Commun.* 2018; 9(1):3025. Published 2018 Aug 2. doi:10.1038/s41467-018-05420-0
65. Zamparo I, Francia S, Franchi SA, et al. Axonal Odorant Receptors Mediate Axon Targeting. *Cell Rep.* 2019;29(13):4334–4348.e7. doi:10.1016/j.celrep.2019.11.099
66. Ghosh AK, Brindisi M, Tang J. Developing β -secretase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2011; 120(Suppl 1): 71–83.
67. Yu YJ, Zhang Y, Kenrick M, et al. Boosting brain uptake of a therapeutic antibody by reducing its affinity for a transcytosis target. *Sci Transl Med* 2011; 3: 84ra44.
68. Simpson IA, Ponnuru P, Klinger ME, et al. A novel model for brain iron uptake: introducing the concept of regulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2015; 35: 48–57.
69. Rossner S, Lange-Dohna C, Zeitschel U, Perez-Polo JR. Alzheimer's disease beta-secretase BACE1 is not a neuron-specific enzyme. *J Neurochem.* 2005 Jan;92(2):226-34. Review. PMID: 15663471

Leyendas de las figuras

Tabla 1. Casos de estudio utilizados según la condición patológica. Controles sanos (C), Alzheimer familiar (F), Alzheimer esporádico (S), CADASIL (A), código de identificación del neurobanco de la Universidad de Antioquia, Código del área de neurobiología del Grupo de Neurociencias de Antioquia, edad de muerte y género.

Figura 1. BACE-1 incrementa en CA1 de pacientes con enfermedad de Alzheimer familiar y esporádico. a) Imágenes representativas de inmunorreactividad de BACE1 en el área CA1, el área CA4 y el subículo de tejidos de hipocampo humano. Ampliación: 10x y 40x; barra de escala: 50 μ m. b) Los valores en el gráfico de barras se expresan en porcentaje densitométrico de inmunorreactividad de BACE1 en el área CA1, c) el área CA4, d) el subículo e) Bandas representativas e intensidades densitométricas de BACE-1 en lisados del área CA1 de hipocampo. Se usó actina como control de carga. FAD: Alzheimer de tipo familiar (mutación E280A de la presenilina 1); SAD: Alzheimer esporádico; CADASIL: Arteriopatía cerebral autosómica dominante con infartos subcorticales y leucoencefalopatía. Los datos se expresan como las medias \pm SEM. n = 4. * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001.

Figura 2. Tau hiperfosforilado incrementa en áreas del hipocampo de pacientes con Enfermedad de Alzheimer familiar y esporádico. a) Imágenes representativas de inmunorreactividad de AT-8 en el área CA1, el área CA4 y el subículo de tejidos de hipocampo humano. Ampliación: 10x y 40x; barra de escala: 50 μ m. b) Los valores en el gráfico de barras se expresan en porcentaje densitométrico de inmunorreactividad de AT-8 en el área CA1, c) el área CA4, d) el subículo e) Bandas representativas e intensidades densitométricas de Astrocitos reactivos en lisados del área CA1 de hipocampo. Se usó actina como control de carga. Los datos se expresan como las medias \pm SEM. n = 4. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Figura 3. Astroglisis en el área CA1 y subículo de pacientes con Enfermedad de Alzheimer de tipo familiar. a) Imágenes representativas de inmunorreactividad de GFAP en el área CA1, el área CA4 y el subículo de tejidos de hipocampo humano. Ampliación: 10x y 40x; barra de escala: 50 μ m. b) Los valores en el gráfico de barras se expresan en porcentaje densitométrico de inmunorreactividad de GFAP en el área CA1, c) el área CA4 d) el subículo e) Bandas representativas e intensidades densitométricas de GFAP en lisados del área CA1 de hipocampo. Se usó actina como control de carga. Los datos se expresan como las medias \pm SEM. n = 4. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Figura 4. BACE-1 inmunoprecipita con GFAP y Tau hiperfosforilado en el area CA1 de cerebros con demencia. Se muestran bandas representativas de inmunoprecipitación de BACE-1 asociado con a) GFAP y b) AT-8. IgG se utilizó como control negativo de inmunoprecipitación.

Figura 5. BACE-1 y AT-8 se co-expresan en vasos y astrocitos de hipocampo principalmente en la región CA1 del hipocampo de Alzheimer esporádico. Inmunofluorescencia de vasos sanguíneos teñidos con Dylight Lectina 649 (Magenta) en triple tinción con a) AT-8 marcados con Alexa fluor 488 (verde) y astrocitos reactivos marcados con Alexa fluor 594 (rojo) Ampliación a 60x y zoom de 2x. Barra de escala: 50 μ m. b) BACE-1 marcado con Alexa fluor 488 (verde) y astrocitos reactivos (rojo).

Figura suplementaria 1. Cambios de vimentina en el área CA1 de pacientes con enfermedad de Alzheimer familiar. a) Imágenes representativas de inmunorreactividad de Vimentina en el área CA1, el área CA4 y el subículo de tejidos de hipocampo humano. Ampliación: 10x y 40x; barra de escala: 50 μ m. b) Los valores en el gráfico de barras se expresan en porcentaje densitométrico de inmunorreactividad de Vimentina en el área CA1, c) el área CA4, d) el subículo. Los datos se expresan como las medias \pm SEM. n = 4. * $p < 0.05$.

Figura suplementaria 2. Cambios de Claudina-5 en el área CA1 de pacientes con enfermedad de Alzheimer esporádico. a) Imágenes representativas de inmunorreactividad de Claudina-5 en el área CA1, el área CA4 y el subículo de tejidos de hipocampo humano. Ampliación: 10x y 40x; barra de escala: 50 μ m. b) Los valores en el gráfico de barras se expresan en porcentaje densitométrico de inmunorreactividad de Vimentina en el área CA1, c) el área CA4, d) el subículo. Los datos se expresan como las medias \pm SEM. n = 4.